

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

PEMETAAN GENOMIK DAERAH RNA2 (*COAT PROTEIN*) *BETANODAVIRUS* PENYEBAB PENYAKIT *VIRAL NERVOUS NECROSIS* (VNN)

GENOMIC MAPPING RNA2 REGION (COAT PROTEIN) BETANODAVIRUS *CAUSATIVE AGENT OF VIRAL NECROSIS VIRUS (VNN)*

Khumaira Puspasari¹, Zakiyah W², Ade Nurdin², Hasriani², Freddy Riatmono², dan Ishaq Saputra^{1#}

¹ Balai Besar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Jakarta I

Gedung Karantina Pertanian Bandara Soekarno - Hatta Tangerang 15126, Banten

²Balai uji Standar Karantina Ikan

Jl. Raya Mabes Hankam No.26, Setu, Kec. Cipayung, Kota Jakarta Timur, Daerah Khusus Ibukota Jakarta 13890

E-mail: isaputra.6m2@gmail.com

(Diterima: 22 November 2020; Diterima setelah perbaikan: 14 Desember 2020; Disetujui: 14 Desember 2020)

ABSTRAK

Ikan kerapu dan kakap merupakan komoditas ikan penting di Indonesia yang memiliki berbagai jenis spesies maupun hasil silangannya. Salah satu permasalahan dalam kegiatan budidaya kelompok ikan ini yaitu adanya ancaman serangan virus *Viral Necrosis Virus* (VNN). Pada penelitian ini, dilakukan upaya pemetaan *Betanodavirus* sebagai penyebab VNN pada sentra budidaya ikan kerapu maupun kakap di wilayah Indonesia. Pemetaan genomik daerah RNA2 (*coat protein*) *Betanodavirus* dilakukan berdasarkan pada sejumlah 355 ekor ikan sampel dengan berbagai ukuran. Pengujian *Betanodavirus* dilakukan dengan metode *Reverse Transcriptase – Nested PCR*. Sedangkan untuk mengetahui sekuen dan hubungan kekerabatan lebih detail dilakukan sekuensing DNA dan analisa filogenetik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Betanodavirus* yang ditemukan pada sampel yang diperoleh merupakan golongan dari *Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus* (RGNNV). Selain itu, dari sejumlah sampel yang diperoleh dapat dikategorikan menjadi delapan sekuen utama. Berdasarkan analisa filogenetik yang telah dilakukan, *Betanodavirus* dari sampel ikan dapat digolongkan menjadi tiga kluster utama dengan tingkat kemiripan masing-masing kluster adalah 99.0%, 99.0% dan 96.02%.

KATA KUNCI: ikan kerapu; penyakit; virus; filogenetik

ABSTRACT

Grouper are important fish commodities in Indonesia which have various species and crosses. One of the problems in the cultivation of these fish groups is the threat of Viral Necrosis Virus (VNN). In this study, an attempt was made to map *Betanodavirus* as a cause of VNN in the grouper aquaculture production centre in Indonesia. Genomic mapping of RNA2 (*coat protein*) *Betanodavirus* was carried out based on a number of 355 fish samples with various sizes. *Betanodavirus* testing was carried out using the Reverse Transcriptase - Nested PCR method. Meanwhile, to find out the sequence and kinship relationships in more detail DNA sequencing and phylogenetic analysis were performed. The results showed that *Betanodaviruses* found in the samples obtained were a group from the Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV). In addition, the number of samples obtained can be categorized into eight main sequences. Based on phylogenetic analysis that has been done, *Betanodavirus* from fish samples can be classified into three main clusters with similarity levels of each cluster are 99.0%, 99.0% and 96.02%.

KEYWORDS : *grouper; diseases; virus; phylogeny*

Korespondensi: Balai Besar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan Jakarta
E-mail: isaputra.6m2@gmail.com

PENDAHULUAN

Penyakit *viral nervous necrosis* (VNN) atau *viral encephalopathy and retinopathy* (VER), diketahui menjadi penyebab kematian masal pada lebih dari 40 spesies ikan laut pada tahap larva dan juvenile hingga mencapai prevalensi 100% di hampir seluruh bagian dunia (Munday *et al.*, 2002). Berbagai penelitian melaporkan bahwa kematian masal yang disebabkan VNN telah memberikan kerugian ekonomi yang sangat besar pada budidaya air laut. Penyakit ini muncul kebanyakan pada tahap perkembangan awal ikan (Bovo *et al.*, 1999). Meskipun penyakit ini kebanyakan menyerang tahap larva dan juvenile, kematian serius juga telah dilaporkan pada ikan dewasa, seperti pada halibut Atlantik (*Hippoglossus hippoglossus*) (Grotmol *et al.* 2000), kerapu *sevenband* (*Epinephelus septemfasciatus*) (Iwamoto *et al.*, 2000), dan kakap Eropa (*Dicentrarchus labrax*) (Dalla Valle *et al.*, 2001).

Menurut Bovo *et al.* (1999), kondisi neuropatologikal infeksius yang dicirikan oleh adanya nekrosis pada sistem syaraf pusat, termasuk otak dan retina, disertai dengan gejala klinis seperti perilaku berenang yang tidak normal, ikan mengapung dengan perut di atas disebabkan oleh pembengkakan gelembung renang (*swim bladder*), warna tubuh terlihat lebih gelap dan selera makan berkurang. Lebih lanjut Munday *et al.* (2002) melaporkan tidak adanya gejala klinis pada ikan yang terkena virus ini, akan tetapi memperlihatkan bermacam-macam perilaku berenang yang tidak menentu seperti berenang spiral, berputar-putar, perut mengambang di atas dengan inflasi pada kantung renang, atau miring, meskipun perilaku berenang yang tidak normal ini tidak terlihat pada larva yang terinfeksi.

Selama beberapa tahun metode “*Gold Standard*” untuk mendeteksi VER atau VNN adalah dengan mengisolasi agen virus pada kultur sel diikuti dengan identifikasi secara imunologi atau molekuler. Saat ini beberapa perangkat karakterisasi molekuler dengan sensitivitas tinggi telah banyak dijabarkan tetapi diperlukan validasi lebih lanjut melalui pengujian profisiensi antar-laboratorium, atau pengujian pembandingan menggunakan metode “*Gold Standard*”, yaitu dengan menemukan bentukan dari virus. Diagnosis presumtif VNN didasarkan pada gejala klinis, diikuti dengan pemeriksaan histopatologi dengan melihat adanya vakuola pada jaringan otak, syaraf tulang belakang, dan/atau retina. Sedangkan untuk diagnosis konfirmatori dilakukan menggunakan metode pewarnaan imunologis, *fluorescent antibody technique* (FAT), atau imunohistokimia (IHK), menggunakan antibodi poliklonal atau monoklonal (Nguyen *et al.*, 1996; Grotmol *et al.*, 1999; OIE, 2003).

Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) merupakan metode paling cepat dan mudah untuk mendiagnosa ikan yang secara klinis terinfeksi. *Nested* PCR sangat berguna untuk mendiagnosa ikan yang tidak memperlihatkan gejala klinis (induk). Terdapat sejumlah metode RT-PCR dan *nested* PCR menggunakan primer dan protokol yang berbeda, tetapi metode-metode tersebut belum terstandarisasi (Cutrin *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2001; Nishizawa, T. *et al.*, 1997; Sindre *et al.*, 2000; Thiery *et al.*, 2004). Di antara metode PCR tersebut, pasangan primer R3 dan F2 (Nishizawa, T. *et al.*, 1995) dirancang untuk mengamplifikasi daerah yang bervariasi (ca. 380 basa) dari gen protein mantel SJNNV (Thiéry *et al.*, 2001), tetapi banyaknya varian genotip dari *Betanodavirus* terkadang membuat tidak terdeteksinya keberadaan *Betanodavirus* varian lain pada ikan. Metode lain seperti histopatologi dengan pewarnaan imun atau isolasi virus pada sel kultur, perlu diikutsertakan untuk diagnosis pasti.

Penyakit VNN sudah dilaporkan dari berbagai negara, termasuk di Asia Selatan dan Timur (RRC, Cina Taipei, India, Indonesia, Iran, Jepang, Korea, Malaysia, Filipina, Thailand, Vietnam), Oceania (Australia, Tahiti), Mediterania (Perancis, Yunani, Israel, Italia, Malta, Portugal, Spanyol, Tunisia) UK, Norwegia, Karibia dan Amerika Utara (Kanada, USA) (Munday *et al.*, 2002). Di Indonesia, kejadian penyakit VNN ditemukan pertama kali di daerah Banyuwangi, Jawa Timur pada budidaya kakap putih (Koesharyani *et al.* 1999). Meskipun setelah kejadian tersebut kematian masal pada beberapa kerapu budidaya di Indonesia disebabkan VNN telah dilaporkan, hingga saat ini belum ada laporan tentang penyebaran *Betanodavirus* sebagai agen utama penyebab VNN di Indonesia. Sebagai salah satu negara penghasil ikan jenis grouper termasuk kakap dan kerapu, data penyebaran maupun kode genetik penyakit ini sangat diperlukan. Oleh karena itu perlu untuk dilakukan pemetaan genomik daerah RNA2 (*Coat Protein*) *Betanodavirus* sebagai penyebab penyakit VNN di Wilayah Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Sampel Ikan

Sampel ikan diambil dari 13 daerah yang merupakan sentra budidaya kerapu dan kakap yaitu BBAP Ujung Batee (Aceh), Medan, BBAP Situbondo (Jawa Timur), BBPPBL Gondol (Bali), Lombok dan Bima (Nusa Tenggara Barat), Batam dan Pangkal Pinang (Kepulauan Riau), Ambon (Maluku), Gorontalo, Tanjung Pinang, Lampung dan Kepulauan Seribu (DKI Jakarta) pada Bulan Juli – September 2017. Ukuran sampel ikan yang diambil pada kegiatan ini difokuskan pada stadia telur, larva dan juvenil ikan, tetapi beberapa ikan ukuran

pasar juga dilakukan pemeriksaan. Seluruh sampel pengujian difiksatif menggunakan alkohol 70%. Untuk ikan dewasa, organ tubuh yang diambil sebagai sampel adalah bagian mata dan otak. Seluruh rangkaian pengujian dilakukan di Balai Uji Standar Karantina Ikan, Cilangkap – Jakarta Timur.

Ekstraksi RNA

RNA diekstraksi dari jaringan organ otak dan mata menggunakan RNA Extraction® (IQ2000) sesuai dengan instruksi pabrik. Sebanyak 20 – 30 mg jaringan dimasukkan ke dalam tabung 1.5 ml yang berisi larutan ekstraksi RNA sebanyak 500 µl dan digerus menggunakan pestle, kemudian divortex selama 20 detik. Larutan tersebut kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 5 menit dan ditambahkan klorofom sebanyak 100 µl dan divortex selama 20 detik. Tabung yang berisi sampel jaringan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan sebanyak 200 µl dipindahkan ke tabung mikro baru, lalu ditambahkan isopropanol sebanyak 200 µl, dan divortex selama 20 detik, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet kemudian dicuci menggunakan 500 µl alkohol 75 %, dan disentrifugasi pada kecepatan 9.000 rpm selama 5 menit. Alkohol kemudian dibuang, pelet dikering-anginkan selama 10 menit. Pelet dilarutkan dengan menambahkan 200 µl

DEPC atau disesuaikan dengan banyaknya pelet dan disimpan pada suhu -80°C sampai akan digunakan. Konsentrasi RNA diukur menggunakan RNA/DNA spektrofotometer (Gene Quant pro).

Reverse Transcriptase – Nested PCR

Sintesis cDNA dan amplifikasi daerah coat protein betanodavirus dilakukan menggunakan kit Access Quick – AMV® RT PCR (Promega) di mana semua komponen untuk *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) dicampur dalam satu tabung dan proses *reverse transcriptase* secara otomatis langsung diikuti dengan proses PCR. Pasangan primer VER-1 dan VER-2 (Panzarin *et al.*, 2010), VNNV1 dan VNNV2 (Dalla Valle *et al.*, 2001), serta F2 dan R3 (Thiery *et al.*, 2004) digunakan masing-masing dalam proses first RT-PCR ini. Proses *nested* PCR dilakukan guna memperkuat keberadaan DNA menggunakan Go Taq® Green Master Mix (Promega) dengan pasangan primer CP1 dan CP2 (Panzarin *et al.*, 2010) untuk *nested* PCR dari cDNA hasil RT-PCR menggunakan pasangan primer VER-1 dan VER-2 serta VNNV1 dan VNNV2, pasangan primer F2 dan NR3 untuk *nested* PCR dari cDNA hasil RT-PCR menggunakan pasangan primer F2 dan R3. Semua primer yang digunakan untuk proses *reverse-transcriptase* PCR, amplifikasi dan sekuensing dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Primer PCR yang digunakan untuk analisa RT-PCR dan sekuensing

Table 1. PCR Primers used for RT-PCR analysis and sequencing

| Pengujian / Primer | Sekuens (5' – 3') | cDNA (DQ864760) | Referensi |
|-------------------------------------|-------------------------|-----------------|------------------------------------|
| <i>1st RT-PCR</i> | | | |
| VER1 (F) | GACTGGGACACGCTGCTAGA | 272 – 291 | Panzarin <i>et al.</i> (2010) |
| VER2 (R) | AGTCGAACACTCCAGCGACA | 620 – 601 | |
| <i>Nested PCR</i> | | | |
| CP1(F) | CAACTGACAACGATCACACCTTC | 392 – 414 | Panzarin <i>et al.</i> (2010) |
| CP2(R) | CAATCGAACACTCCAGCGACA | | |
| <i>1st RT-PCR</i> | | | |
| VNNV1 (F) | ACACTGGAGTTTGAAATTCA | 316 – 335 | Dalla Valle <i>et al.</i> (2001) |
| VNNV2 (R) | GTCTTGTTGAAGTTGTCCCA | 901 - 920 | |
| <i>Nested PCR</i> | | | |
| CP1(F) | CAACTGACAACGATCACACCTTC | 392 – 414 | Panzarin <i>et al.</i> (2010) |
| CP2(R) | CAATCGAACACTCCAGCGACA | | |
| <i>1st RT-PCR</i> | | | |
| F2 (F) | CGTGTCAGTCATGTGTCGCT | - | Nishizawa, T. <i>et al.</i> (1997) |
| R3 (R) | CGAGTCAACACGGGTGAAGA | | |
| <i>Nested PCR</i> | | | |
| F2 (F) | CGTGTCAGTCATGTGTCGCT | 970 – 951 | Thiery <i>et al.</i> , (1999b) |
| NR3(R) | GGATTTGACGGGGCTGCTCA | | |

Komposisi reaksi dilakukan sesuai dengan protokol kit pengujian. Untuk 1st RT-PCR dengan volume akhir reaksi 25 μ l, terdiri dari AMV 0.5 μ l, *Access quick* 12.5 μ l, primer *forward* dan *reverse* dengan konsentrasi 10 μ M masing-masing sebanyak 2.0 μ l, template RNA 4.0 μ l dan *Nuclease free water* 4 μ l. Sedangkan untuk *nested PCR*, terdiri dari GoTag green® *mastermix* sebanyak 25 μ l, primer *forward* dan *reverse* dengan konsentrasi 10 μ M masing-masing sebanyak 4.0 μ l, template cDNA 4.0 μ l dan *Nuclease free water* sebanyak 13 μ l.

Kondisi siklus masing-masing 1st RT-PCR dan *nested PCR* dapat dilihat pada Tabel 2. Reaksi PCR RT-Nested PCR dilakukan menggunakan thermal cycler (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystem). Produk yang telah diamplifikasi kemudian dianalisa untuk kemurnian dan ukurannya menggunakan elektroforesis dalam 1.2% gel agarose setelah diwarnai dengan SyBr save (Invitrogen). Produk PCR pada gel kemudian dipurifikasi menggunakan Qia Quick® Purification Kit sesuai dengan instruksi pabrik. Kemurnian dan kuantitas DNA diukur menggunakan RNA/DNA spektrofotometer (Gene Quant *pro*, USA).

Hasil purifikasi disekuens dua arah menggunakan BigDye® Terminator Cycle Sequencing (Applied BioSystem, USA), sesuai dengan instruksi pabrik. Kondisi *cycle sequencing* adalah sebagai berikut 96 °C selama 10 detik, 50 °C selama 5 detik and 60 °C selama 4 menit untuk 25 siklus. Purifikasi produk *cycle sequencing* menggunakan presipitasi etanol/EDTA. Denaturasi dilakukan pada suhu 95 °C selama 5 menit dengan menambahkan Hi-Di formamide 1:1 ke dalam produk purifikasi. *Capillary electrophoresis* dilakukan dengan mesin *sequencer* Applied Biosystems 3130 DNA Analyser.

Multiple Alignment dan Analisis Filogenetik

Sekuen nukleotida dan asam amino di-align menggunakan CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Analisa filogenetik dilakukan terhadap sembilan sekuen baru yang dihasilkan dari penelitian ini ditambah dengan 28 sekuen yang diambil dari data GenBank (NCBI). Dua sekuen dari kelompok terakhir (BBV, accession number NC002037; NOV, accession number AF174534) merupakan nodavirus yang bukan pada ikan. Kedua sekuen tersebut dipilih sebagai outgroup untuk menguji monophyly dari Nodavirus pada ikan. Pohon filogenetik dibangun dengan CLUSTAL W dan kemudian ditampilkan dengan *TreeView* (Page, 1996). Hubungan filogenetik diantara spesies ditentukan menggunakan metoda *Neighbour-Joining* (NJ tree) (Saitou & Nei, 1987). Reliabilitas pohon NJ disimpulkan menggunakan metode

bootstrap Felsenstein dengan 1000 replikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyakit VNN sampai saat ini dilaporkan terjadi pada lebih dari 50 spesies ikan, terutama pada spesies ikan laut. Penyakit ini pertama kali dilaporkan pada tahun 1987 pada tambak ikan barramundi (kakap Asia) *Lates calcarifer* di Australia (Glazebrook *et al.* 1987), Malaysia (Awang 1987), Thailand (Glazebrook *et al.*, 1990), dan Tahiti (Renault *et al.* 1991). Dalam periode waktu yang berdekatan kondisi penyakit yang sama dikarenakan virus menyerupai picorna dilaporkan pada larva dan juvenile ikan Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* dan striped jack di Jepang (Yoshikoshi & Inoue, 1990) dan turbot *Scophthalmus maximus* (Bloch *et al.*, 1991), kakap Eropa, *Dicentrarchus labrax* (Breuil *et al.*, 1991), redspotted grouper, *Epinephelus akaara* (Mori *et al.*, 1991), dan striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Mori *et al.*, 1992). Pada penelitian ini diperoleh ikan sampel sebanyak 355 ekor ikan yang terdiri dari kerapu lumpur (*E. tauvina*), kerapu macan (*E. fuscoguttatus*), *E. polyphakeion* x *E. fuscoguttatus*, *E. polyphakeion* x *C. altivelis*, *Epinephelus spp*, Ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) dan kakap putih (*L. calcarifer*). Hasil positif VNN terdeteksi pada ikan kerapu lumpur dari Aceh dan Medan dengan prevalensi masing-masing sebesar 33.33% dan 42.5%, ikan kerapu batik (*E. polyphakeion*) dari Situbondo (50%), kerapu dari Situbondo (29.41%) dan Gondol (29.36%), kerapu (tidak tertelusur spesiesnya) dari Bima (100%), Pangkal Pinang (100%), dan Lampung (100%), serta kerapu tikus dari Gorontalo (100%). Sampel ikan kerapu dari Lombok, Tanjung Pinang dan Kepulauan Seribu menunjukkan hasil pengujian VNN negatif. Beberapa ikan kerapu persilangan seperti kerapu cantik (silangan kerapu macan dan kerapu batik) dan kerapu kustang (silangan kerapu tikus dan kerapu kertang) juga menunjukkan hasil negatif pengujian VNN. Sampel ikan kakap putih pada kegiatan ini juga memberikan hasil negatif VNN.

Sekuensing telah dilakukan terhadap delapan tipe sekuen yang berbeda (Tabel 3), yang berbeda setidaknya dua basa pada sekuen tersebut, ditambah dengan sekuen dari sampel bawal bintang positif VNN yang dikirim oleh Balai Besar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Jakarta 1.

Betanodavirus penyebab penyakit VNN pada ikan merupakan virus RNA dengan ukuran sangat kecil yang hanya terdiri dari dua molekul RNA untai tunggal (RNA1 dan RNA2). RNA1 mengkode protein non-struktural (RNA-dependent RNA polymerase) dan RNA2 yang mengkode *coat protein*. Capsid (sinonim: coat) merupakan struktur seperti rangka, regular yang

Tabel 2 Profil 1st RT- PCR dan nested PCR
 Table 2. First RT- PCR dan nested PCR profile

| 1st RT-PCR | | | | | |
|---------------------------------|---------------|------------|-----------|----------|----------------|
| Pasangan primer VER1 dan VER2 | | | | | |
| Reverse transcriptase | Inaktivasi RT | Denaturasi | Anneling | Elongasi | Final elongasi |
| | | | 40 siklus | | |
| 48 °C | 94 °C | 94 °C | 60 °C | 72 °C | 72 °C |
| 30 menit | 2 menit | 30 detik | 30 detik | 45 detik | 10 menit |
| 1st RT-PCR | | | | | |
| Pasangan primer VNNV1 dan VNNV2 | | | | | |
| Reverse transcriptase | Inaktivasi RT | Denaturasi | Anneling | Elongasi | Final elongasi |
| | | | 40 siklus | | |
| 48 °C | 94 °C | 95 °C | 58 °C | 72 °C | 72 °C |
| 30 menit | 2 menit | 30 detik | 30 detik | 30 detik | 10 menit |
| Nested PCR | | | | | |
| Pasangan primer CP1 dan CP2 | | | | | |
| | Inkubasi | Denaturasi | Anneling | Elongasi | Final elongasi |
| | | | 40 siklus | | |
| | 94 °C | 94 °C | 60 °C | 72 °C | 72 °C |
| | 2 menit | 30 detik | 30 detik | 30 detik | 10 menit |
| 1st RT-PCR | | | | | |
| Pasangan primer F2 dan R3 | | | | | |
| Reverse transcriptase | Inaktivasi RT | Denaturasi | Anneling | Elongasi | Final elongasi |
| | | | 25 siklus | | |
| 48 °C | 94 °C | 94 °C | 55 °C | 72 °C | 72 °C |
| 45 menit | 2 menit | 40 detik | 40 detik | 40 detik | 5 menit |
| Nested PCR | | | | | |
| Pasangan primer F2 dan NR3 | | | | | |
| | Inkubasi | Denaturasi | Anneling | Elongasi | Final elongasi |
| | | | 25 siklus | | |
| | 94 °C | 94 °C | 50 °C | 72 °C | 72 °C |
| | 2 menit | 40 detik | 40 detik | 40 detik | 5 menit |

terdiri dari agregat subunit protein yang menutupi asam nukleat virus. Semua virus mempunyai *coat protein* atau capsid protein yang menutup dan melindungi asam nukleatnya. Setiap capsid terbangun dari subunit identik yang disebut capsomer, terbuat dari protein. Salah satu fungsi capsid selain melindungi genomnya dari lingkungan adalah berinteraksi dengan reseptor inang untuk masuk ke dalam sel dan melepaskan asam nukleatnya. Fungsi tersebut menjadi pertimbangan dalam berbagai penelitian dan pengujian virus dalam mendeteksi dan mengidentifikasi suatu virus.

Pada penelitian ini data sekuen dari sebagian fragmen gen *coat protein* (RNA2) dari *Nodavirus* pada ikan yang dikoleksi dari beberapa spesies ikan kerapu di beberapa daerah di Indonesia. Bagian pertama dari virus yang akan menempel pada reseptor inang adalah *coat protein*. Spesies ikan yang berbeda diasumsikan akan mempunyai reseptor yang berbeda, sehingga gen *coat protein* (RNA2) dari *Betanodavirus* pun berbeda. Virus RNA juga lebih mudah bervariasi, tetapi tidak mustahil apabila terdapat dua atau lebih spesies ikan yang mempunyai reseptor yang sama. Sehingga analisa sekuen dari *coat protein Betanodavirus* baik untuk

digunakan dalam pemetaan filogenetik dari *Betanodavirus*, yang dapat digunakan dalam penentuan daerah nukleotida untuk keperluan pengujian atau deteksi penyakit VNN pada ikan, juga sebagai bahan referensi dalam pembuatan suatu vaksin DNA atau RNA.

Multiple Alignment dan Analisis Filogenetik

Pada penelitian ini, hasil multiple alignment nukleotida dan asam amino daerah coat protein menggunakan CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) terhadap sembilan sekuen daerah coat protein (RNA2) betanodavirus yang dihasilkan dalam penelitian ini dengan 26 sekuen daerah coat protein (RNA2) nodavirus pada ikan yang diambil dari database Gen Bank (NCBI). Panjang total alignment adalah 509 (posisi nukleotida adalah basa 392 hingga 901 dari sekuen tipe TNV (AJ608266). Sekuen dari isolat betanodavirus yang dihasilkan dalam penelitian ini mempunyai selisih panjang nukleotida sebanyak tujuh dengan isolat referens AJ608266 (turbot noda virus = TNV). Identitas sekuen di antara 35 sekuen tersebut adalah

71.45% untuk nukleotida atau lebih dan 26.035% atau lebih untuk asam amino.

Hasil dari analisa filogenetik (Gambar 1) adalah: 1) nodavirus pada ikan merupakan kelompok monofiletik (sangat berbeda dengan nodavirus pada serangga); 2) TNV merupakan cluster tersendiri dari betanodavirus; 3) TPNNV dan SJNNV merupakan sister group; 4) BFNNV dan cluster RGNNV adalah sister group; 4) cluster RGNNV dan BFNNV lebih beragam daripada TPNNV dan SJNNV, dengan kluster yang paling beragam adalah RGNNV; 5) semua isolate betanodavirus yang dihasilkan dalam penelitian ini termasuk dalam cluster RGNNV; dan 6) isolat-isolat betanodavirus yang dihasilkan dalam penelitian ini terbagi dalam tiga grup. Grup pertama terdiri dari isolat betanodavirus TGNNVGondol_49_03/13 (sumber *E. fuscogutattus* dari Gondol), *E.polyphakeion*NNVSitubondo_34_03/13 (sumber *E. polyphakeion* dari Situbondo), *Epinephelus*NNVLampung_157 (sumber *Epinephelus* spp. dari Lampung) dan *Bawal*Bintang_180 (sumber *bawal bintang*). Kemiripan diantara isolat-isolat tersebut adalah diatas 99%.

Tabel 3 Sumber Betanodavirus pada ikan yang digunakan dalam penelitian

Table 3. *Betanodavirus sources in present experiment*

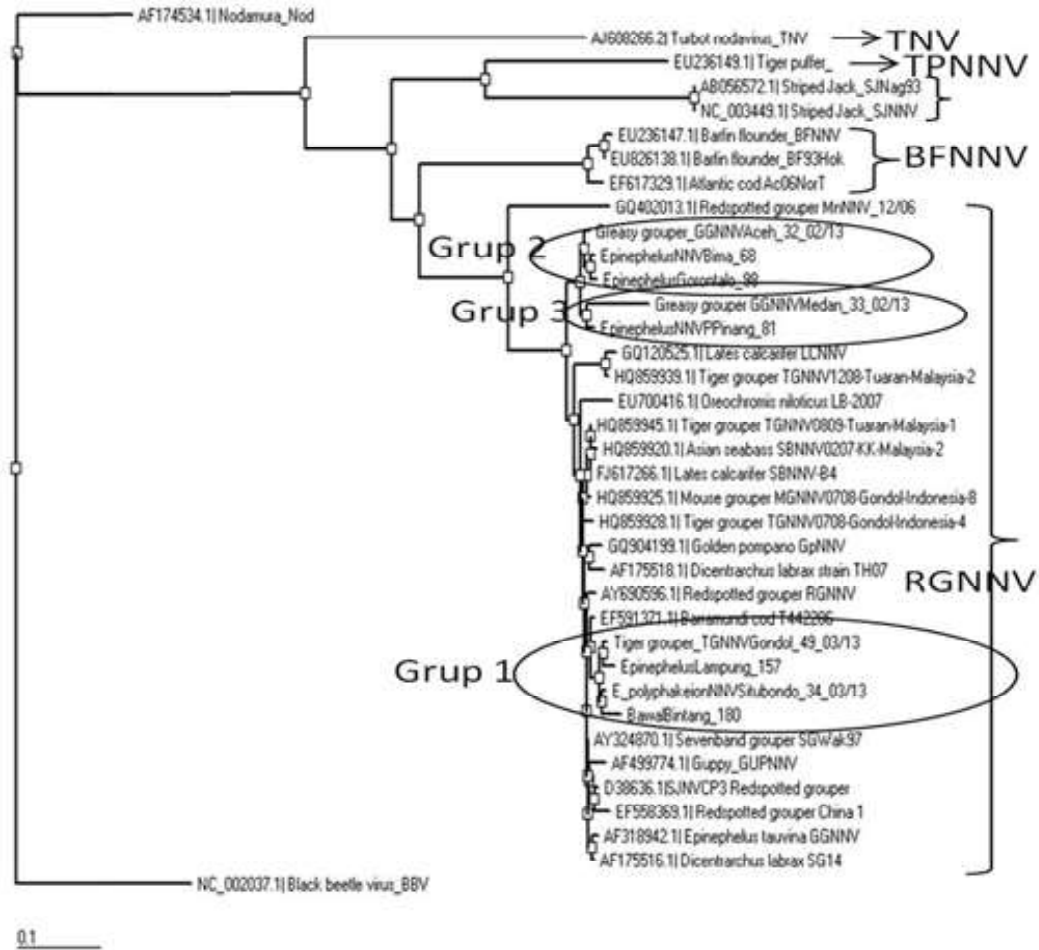
| Isolat | Spesies ikan | Asal daerah |
|---|--|-------------|
| GGNNVAceh_32_02/13 | Kerapu lumpur (<i>E. tauvina</i>) | Aceh |
| GGNNVMedan_33_02/13 | Kerapu lumpur (<i>E. tauvina</i>) | Medan |
| <i>E.Polyphakeion</i> NNVSitubond o_34_03/13 | Kerapu batik (<i>E. polyphakeion</i>) | Situbondo |
| TGNNVGondol_49_03/13 | Kerapu macan (<i>E. fuscogutattus</i>) | Bali |
| <i>Epinephelus</i> NNVBima_68 | Kerapu (<i>Epinephelus</i> spp.) | NTB |
| <i>Epinephelus</i> NNVP.Pinang_81 | Kerapu (<i>Epinephelus</i> spp.) | Pkl. Pinang |
| <i>Epinephelus</i> NNVGorontalo_98 | Kerapu (<i>Epinephelus</i> spp.) | Gorontalo |
| <i>Epinephelus</i> NNVLampung_157 | Kerapu (<i>Epinephelus</i> spp.) | Lampung |

Grup kedua terdiri dari isolate betanodavirus GGNNVAceh_32_02/13 (sumber *E. tauvina* dari Aceh), *Epinephelus*NNVBima_68 (sumber *Epinephelus* spp. dari Bima), dan *Epinephelus*NNVGorontalo_98 (sumber *Epinephelus* spp. dari Gorontalo). Kemiripan diantara grup kedua ini di atas 99%. Grup ketiga adalah isolate betanodavirus GGNNVMedan_33_02/13 (sumber *E. tauvina* dari Medan) dan *Epinephelus*NNVP.Pinang_81 (sumber *Epinephelus* spp. dari Pangkal Pinang). Kemiripan antara kedua isolate hanya 96.02%. Isolat grup ketiga ini terpisah dari dua

grup sebelumnya karena hanya memiliki kemiripan 92.82% sampai 93.23% dengan grup pertama, dan 95.62% sampai 95.82% dengan grup kedua. Keberadaan grup kedua lebih menyebar dibandingkan dengan grup pertama, sedangkan keberadaan dari grup ketiga lebih terpusat daripada kedua grup sebelumnya. Penyebaran dari grup-grup tersebut dapat dilihat pada Gambar 2. Kemiripan sekuen coat protein antara isolat TGNNV0708-Gondol-8 (sumber *E. fuscogutattus* dari Gondol) yang dilaporkan oleh Malaysia (Ransangan *et al.*, 2013) dengan isolat dari grup pertama adalah di

atas 98%, sedangkan dengan isolat dari grup kedua hanya 97%, dan dengan grup ketiga hanya 93%. Berdasarkan analisa filogenetik yang telah dilakukan pada penelitian ini, maka dapat ditampilkan sebaran

betanodavirus beserta grup masing-masing grup berdasarkan lokasi pengambilan sampel pada gambar2 berikut :



Gambar 1 Analisa Filogenetik terhadap Sampel.
 Figure 1. Samples phylogeny analysis .



Gambar 2 Distribusi geografi Betanodavirus.
 Figure 2. Geographical Distribution of Betanodaviruses.

Distribusi geografi dari sampel betanodavirus yang dikumpulkan dari beberapa daerah di Indonesia. Keterangan: ● adalah RGNNV Indonesia Grup 1; ▲ adalah RGNNV Indonesia Grup 2; dan ■ adalah RGNNV Grup 3.

Beberapa spesies ikan kerapu hasil persilangan menunjukkan hasil negatif VNN, kemungkinan dikarenakan persilangan antara spesies kerapu mampu meningkatkan kekebalan tubuh ikan tersebut terhadap *Betanodavirus* dibandingkan dengan spesies tunggal. Hasil negatif VNN pada kakap putih kemungkinan disebabkan karena adaptasi *Betanodavirus* pada ikan kerapu menyebabkan virus VNN tersebut tidak terlalu patogen pada kakap putih. Asumsi dan hipotesis penyebab hasil negatif tersebut harus dibuktikan dan dikonfirmasi lebih lanjut dengan penelitian yang mendukung, dengan jumlah contoh uji yang memadai dan kerangka penelitian yang benar.

Hasil *multiple alignment* dan analisa filogenetik memperlihatkan bahwa *Nodavirus* pada ikan merupakan monophyly terhadap anggota Nodaviridae lain. Hasil dari penelitian ini juga mengkonfirmasi keberadaan dari empat cluster dalam *Betanodavirus* yaitu tipe TPNNV, SJNNV, BFNNV dan RGNNV (Nishizawa *et al.* 1995, Dalla Valle *et al.* 2001), dan juga menunjukkan bahwa *turbot nodavirus* (TNV) berbeda dari empat genotip *Betanodavirus*, sehingga diusulkan sebagai genotip ke-5 dalam *Betanodavirus* seperti yang diusulkan Johansen *et al.* (2004). TNV, TPNNV dan SJNNV merupakan cluster yang lebih primitif dibandingkan dengan kluster BFNNV dan RGNNV, dengan anggota yang paling beragam adalah kluster RGNNV, hal ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Dalla Valle *et al.* 2001.

Semua isolat *Betanodavirus* yang dikumpulkan dari beberapa spesies ikan kerapu di beberapa daerah di Indonesia tergabung dalam kluster RGNNV dan membentuk setidaknya tiga grup. Terbentuknya tiga grup RGNNV pada isolat-isolat dan daerah penyebaran yang luas tersebut menunjukkan kemungkinan sumber virus dari masing-masing grup berbeda, dan adanya ada modifikasi dari gen *coat protein* yang mengadaptasi pada spesies kerapu yang berbeda-beda. Penjelasan-penjelasan tersebut tetapi harus dibuktikan dan dikonfirmasi lebih lanjut dengan data sekunder mengenai data pergerakan atau transportasi dari kerapu-kerapu yang ada di wilayah Indonesia dan masuk serta keluarnya kerapu ke dalam dan ke luar wilayah Indonesia. Penjelasan-penjelasan tersebut juga harus dibuktikan melalui data mengenai epidemiologi penyakit VNN yang jelas seperti (asal benih, prevalensi kejadian VNN pada suatu daerah outbreak, jumlah populasi, sistem manajemen budidaya dan kaidah

pengambilan contoh). Penelitian-penelitian selanjutnya dengan kaidah penelitian yang memperhatikan aspek epidemiologi dengan benar diperlukan untuk mempertegas hasil penelitian ini. Keragaman genotip isolat *Betanodavirus* di Indonesia ini bermanfaat untuk pengembangan vaksin berbasis DNA atau RNA dari *coat protein*. Keberhasilan suatu vaksin salah satunya adalah dengan pemilihan protein utama dan penting dari suatu virus dalam menginfeksi inang. Capsid atau *coat protein* dari *Betanodavirus* merupakan bagian yang utama dalam prosen infeksi, karena berkaitan dengan interaksinya dengan reseptor inang.

KESIMPULAN

Analisa filogenetik coat protein dari *Betanodavirus* menunjukkan bahwa *Betanodavirus* merupakan virus yang monofili dengan *Nodavirus* lainnya. Pada penelitian ini diketahui bahwa kluster *Betanodavirus* dari sampel yang diperoleh dapat digolongkan menjadi TNV, TPNNV, SJNNV, BFNNV dan RGNNV. Isolat *Betanodavirus* yang dikoleksi selama penelitian ini semuanya masuk ke dalam *Betanodavirus* tipe RGNNV. Sekurangnya terdapat tiga grup RGNNV yang berbeda dari isolat *Betanodavirus* di Indonesia berdasarkan hasil sekuen daerah *coat protein* (RNA2), *multiple alignment* dan analisa filogenetik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bloch, B., Gravningen, K., & Larsen, J. L. (1991). Encephalomyelitis among turbot associated with picornavirus-like agent. *Diseases of Aquatic Organisms - DISEASE AQUAT ORG*, 10, 65-70. doi:10.3354/dao010065
- Bovo, G., Nishizawa, T., Maltese, C., Borghesan, F., Mutinelli, F., Montesi, F., & Mas, S. (1999). Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Research*, 63, 143-146. doi:10.1016/S0168-1702(99)00068-4
- Breuil, G., Bonami, J.-R., Pépin, J., & Pichot, Y. (1991). Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 97, 109-116. doi:10.1016/0044-8486(91)90258-9
- Cutrin, J., Dopazo, C., Thiéry, R., Leao, P., Oliveira, J., Barja, J., & Bandin, I. (2007). Emergence of pathogenic betanodavirus belonging to the SJNNV genogroup in farmed fish species from the Iberian Peninsula. *Journal of Fish Diseases*, 30, 225-232. doi:10.1111/j.1365-2761.2007.00803.x
- Dalla Valle, L., Negrisolo, E., Patarnello, P., Zanella, L., Maltese, C., Bovo, G., & Colombo, L. (2001). Sequence comparison and phylogenetic analysis of fish nodaviruses based on the coat protein

- gene. *Arch Virol*, 146(6), 1125-1137. doi:10.1007/s007050170110
- Glazebrook, J., Heasman, M., & Beer, S. W. (1990). Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases - J FISH DISEASES*, 13, 245-249. doi:10.1111/j.1365-2761.1990.tb00780.x
- Gomez, D., Sato, J., Mushiake, K., Isshiki, T., Okinaka, Y., & Nakai, T. (2004). PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *Journal of Fish Diseases*, 27, 603-608. doi:10.1111/j.1365-2761.2004.00577.x
- Huang, M., Tan, C., Munday, Kwang, Mathew, & Ngoh. (2001). Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases*, 24. doi:10.1046/j.1365-2761.2001.00270.x
- Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M., & Furusawa, I. (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43(2), 81-89.
- Kurniawati, M. D., Sumaryam, & Hayati, N. (2019). Aplikasi polymerase Chain Reaction (PCR) Konvensional dan Real Time -PCR untuk Deteksi Virus VNN (Viral Nervous Necrosis) pada ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscogutattus*). *Techno-Fish*, 3(1), 19-27.
- Mori, K.-I., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K., & Furusawa, I. (1992). Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187(1), 368-371. doi:https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90329-N
- Mori, K.-i., Nakai, T., Nagahara, M., Muroga, K., Mekuchi, T., & Kanno, T. (1991). A Viral Disease in Hatchery-reared Larvae and Juveniles of Redspotted Grouper. *Fish Pathology*, 26(4), 209-210. doi:10.3147/jspf.26.209
- Munday, B. L., Kwang, J., & Moody, N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 25(3), 127-142. doi:10.1046/j.1365-2761.2002.00350.x
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T., & Muroga, K. (1997). Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl Environ Microbiol*, 63(4), 1633.
- Nishizawa, T., Mori, K.-i., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I., & Muroga, K. (1995). Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *Journal of General Virology*, 76(7), 1563-1569. doi:https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-7-1563
- Page, R. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer applications in the biosciences : CABIOS*, 12, 357-358. doi:10.1093/bioinformatics/12.4.357
- Panzarin, V., Patarnello, P., Mori, A., Rampazzo, E., Cappelozza, E., Bovo, G., & Cattoli, G. (2010). Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of Betanodavirus in clinical specimens. *Archives of Virology*, 155, 1193-1203. doi:10.1007/s00705-010-0701-5
- Ransangan, J., B.O., M., T.M.M., L., Lu, K. C., A, S., & A., A. (2013). Betanodavirus Infection in Marine Fish Aquaculture in Malaysia. *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences*, 1(7), 10-15.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Sindre, G., Audun, H. N., Eirik, B., Geir, K. T., & Toyohiko, N. (2000). Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 39(2), 79-88.
- Thiéry, R., Arnauld, C., & Delsert, C. (2001). Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *Journal of Fish Diseases*, 22, 201-207. doi:10.1046/j.1365-2761.1999.00164.x
- Thiery, R., Cozien, J., de Boisseson, C., Kerbart-Boscher, S., & Nevarez, L. (2004). Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity. *J Gen Virol*, 85(Pt 10), 3079-3087. doi:10.1099/vir.0.80264-0
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673
- Yoshikoshi, K., & Inoue, K. (1990). Viral nervous necrosis of hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrot-fish *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases - J FISH DISEASES*, 13, 69-77. doi:10.1111/j.1365-2761.1990.tb00758.x