

PEMERIKSAAN *Viral Nervous Necrosis* (VNN) PADA IKAN DENGAN METODE *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

***Viral nervous necrosis* (VNN) EXAMINATION AT FISH BY *Polymerase Chain Reaction* (PCR) METHOD**

Elly Fitriatin dan Abdul Manan

Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo - Surabaya, 60115 Telp. 031-5911451

Abstract

Fish production annually has increased. Trading activities of Fishery in Indonesia both exports and imports will continue to increase every year. Control and monitoring of fisheries products was transported in Indonesia aims to reduce the risk of entry and spread of pests and diseases of fish in Indonesia. The purpose of Study is to know examination techniques of virus *Viral Nervous Necrosis* (VNN) at fish by *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method. This Study was held in the Quarantine Fish Quality Control and Safety of Fishery Products (BBKIPM-KHP) Soekarno Hatta Tangerang, Banten on January 12th to February 12th, 2015. The methods of data fetching consisted of primary and secondary data. The data fetching was performed with active participation, observation, interviews, and literature. Examination methods *Viral Nervous Necrosis* (VNN) by *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Stages of virus examination by PCR method includes necropsy samples, RNA extraction, amplification, electrophoresis, and the diagnosis results using UV transluminator. Fish samples were examined VNN virus consisting of a live fish and frozen fish both commodity exports, imports, or domestic. The results showed that all fish samples are negative infected with the virus VNN.

Keywords : *Viral nervous necrosis* (VNN), PCR Technique, Examination result

Pendahuluan

Kegiatan perdagangan produk perikanan di Indonesia baik ekspor maupun impor setiap tahunnya akan terus meningkat dengan potensi sumber daya yang besar, maka lalulintas komoditas perikanan baik antar negara maupun antar area di dalam wilayah Indonesia akan meningkat. Hal ini memberikan peluang besar terhadap resiko masuk dan tersebarnya hama dan penyakit ikan yang berasal dari luar negeri maupun antar area di wilayah Indonesia. Terkait dengan usaha pencegahan dan penanggulangan wabah penyakit, sehingga diselenggarakan Karantina Ikan di Indonesia. Jenis virus yang berbahaya dan sering menyebabkan kerugian pada budidaya perikanan adalah *Viral Nervous Necrosis* (VNN). Virus VNN telah banyak dilaporkan menginfeksi ikan laut yang dibudidayakan di Indonesia dan telah ditetapkan dalam Kepmen nomor 26 tahun 2013 sebagai Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) Golongan I.

Metode diagnosis patogen virus dapat dilakukan dengan cara melihat gejala klinis, histopatologi, mikroskop elektron, isolasi agen virus dalam kultur sel yang kemudian diikuti dengan identifikasi secara molekuler atau dengan metode *Polymerase Chain Reaction*

(PCR). Metode PCR ini telah banyak digunakan oleh laboratorium uji di Indonesia, karena dinilai dengan menggunakan metode ini dapat diperoleh hasil secara cepat dan sangat efektif.

Tujuan Studi ini adalah untuk mengetahui teknik dan hasil pemeriksaan VNN (*Viral nervous necrosis*) pada ikan dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Materi dan Metode

Studi ini dilaksanakan di Balai Besar Karantina Ikan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan (BBKIPM-KHP) Soekarno Hatta Tangerang, Banten pada tanggal 12 Januari-12 Februari 2015. Metode kerja yang digunakan adalah metode deskriptif sedangkan pengumpulan data dilakukan dengan cara observasi, wawancara, partisipasi aktif dan telaah pustaka.

Hasil dan Pembahasan

Kegiatan pemeriksaan virus yang dilakukan meliputi beberapa tahapan yaitu penerimaan sampel, persiapan sampel, dan pemeriksaan secara PCR.

Penerimaan Sampel

Penerimaan sampel berupa ikan diterima oleh balai dari pemilik yang mengirimkan sampel. Sampel yang masuk kemudian didata oleh petugas bagian penerimaan sampel. Sampel diberi kode sesuai jenis sampel yaitu DK untuk sampel yang dilalulintaskan secara domestik, E untuk sampel yang akan diekspor, IM untuk sampel yang diimpor (ikan hidup), dan IB untuk sampel yang diimpor dalam kondisi mati (ikan beku). Sampel yang sudah didata, kemudian dikirim ke Laboratorium BBKIPM Soekarno-Hatta beserta surat tanda terima penerimaan sampel yang berisi data awal tentang sampel, tanggal penerimaan, jenis sampel, permohonan pemeriksaan, dan kode sampel. Surat tersebut dibuat rangkap dua, satu untuk pengguna jasa, dan satu lagi digunakan sebagai arsip.

Persiapan Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk pemeriksaan virus adalah 1) *Dissecting set*, 2) Alat penumbuk atau mortar, 3) *Microtube* (1.5 ml dan 0.2 ml), 4) *Micropipet* (100-1000 μ l, 10-200 μ l, 10-100 μ l, 0.5-10 μ l, 0.1-3 μ l), 5) *Microtip* (1000 μ l, 200 μ l, dan 10 μ l), 6) *Laminary flow*, 7) *Thermoblock* (inkubator), 8) *Vortex*, 9) *Centrifuge*, 10) *Mini Centrifuge*, 11) *Refrigerator*, 12) *Freezer*, 13) *Thermocycler-Biometra*, 14) *Stopwatch*, 15) *Powerpac – Biorad*, 16) *Uvidoc* (UV *transilluminator*) yang terhubung dengan monitor dan printer, 17) Cetakan Gel, 18) Spatula.

Bahan yang digunakan adalah, 1) Ethanol 70 %, 2) *RNA Extraction solution*, 3) *Chloroform*, 4) Isopropanol, 5) Ethanol 75 %, 6) DEPC ddH₂O, 7) *Reagent (First PCR: Nucleus free water, RT-AMV acces quick enzyme, master mix acces quick, primer VNN (F₂ dan R₃), 8) Template RNA, 9) Nested PCR premix: GoTaq Green Master mix, Primer (F₂ dan R₃), 10) Kontrol positif VNN, 11) *Yeast* (kontrol negatif), 12) *DNA Marker 100bp*, 13) *Agarose gel*, 14) *TE buffer*, 15) Larutan EtBr (*Etidium Bromide*), 16) Air.*

Sterilisasi Alat

Sterilisasi adalah proses pemusnahan semua bentuk kehidupan terutama mikroorganisme. Laboratorium Balai Besar Karantina Ikan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan Soekarno-Hatta melakukan sterilisasi peralatan menggunakan sinar *ultaviolet* dan *autoclave*. Sinar *ultaviolet* berfungsi untuk mensterilkan ruangan dan peralatan yang ada di dalamnya. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Srigele dan Zaetun (2014) bahwa terjadi penurunan jumlah bakteri

sebelum dan sesudah paparan sinar *ultraviolet*. *Autoclave* digunakan untuk sterilisasi alat yaitu *microtube* dan *microtip*. Prinsip sterilisasi dengan *autoclave* adalah menggunakan suhu dan tekanan tinggi. Menurut Pelczar (1988) metode paling efektif untuk membunuh mikroorganisme adalah dengan menggunakan suhu tinggi dan kelembaban tinggi.

Preparasi Sampel

Preparasi sampel untuk pemeriksaan VNN, jika sampel berukuran lebih dari 3 cm maka organ yang diambil yaitu mata dan otak dan jika berukuran kurang dari 3 cm seperti benih maka diambil seluruh bagian tubuh atau hanya bagian kepala saja. Pengambilan organ mata dan otak disebabkan karena organ tersebut memiliki reseptor yang spesifik dengan virus VNN. Pada penelitian yang dilakukan oleh Munday *et al.* (2002) bahwa virus ini ditemukan berada dalam sitoplasma sel otak pada ikan kakap dan kerapu. Organ yang sudah diambil dimasukkan dalam botol sampel yang sudah diisi dengan *Ethanol 70%*, kemudian diberi label kode sampel serta target virus yang diperiksa. Penggunaan *Ethanol 70%* berfungsi untuk menyimpan sampel organ dan menjaga kualitas materi genetik target uji.

Ekstraksi RNA

Prinsip dari ekstraksi adalah memisahkan asam nukleat dengan komponen sel lainnya. Menurut Langga (2012) ada tiga tahap utama dalam ekstraksi materi genetik yaitu perusakan membran sel (lisis), pemisahan materi genetik dari bahan padat seperti protein dan selulosa, serta pemurnian materi genetik. Langkah pertama pada proses ekstraksi RNA adalah proses fisik dimana sampel organ diambil sebanyak ± 20 mg, dipotong halus atau digerus. Penggerusan dilakukan untuk memperluas permukaan bidang sentuh sampel dengan *reagent* untuk meningkatkan efektivitas ekstraksi. Proses kimia yaitu dengan menambahkan larutan guanidine tiosianat dan kloroform untuk pemisahan materi genetik dari protein dan selulosa, serta penambahan isopropanol dan ethanol untuk pemurnian materi genetik.

Amplifikasi

Amplifikasi merupakan proses utama dalam PCR. Amplifikasi bertujuan untuk memperbanyak DNA target untuk dapat dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarose. Satu siklus dalam proses amplifikasi meliputi tiga tahapan yaitu denaturasi, *annealing primer*, dan ekstensi. Pada proses

amplifikasi dapat terjadi 30-40 siklus yang dapat menghasilkan berjuta-juta DNA. Proses amplifikasi virus RNA dari VNN di BKKIPM Soekarno-Hatta menggunakan metode amplifikasi *two step* yaitu RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*) dan *Nested* RT-PCR. Proses amplifikasi dijalankan dalam mesin PCR atau *Thermocycler*.

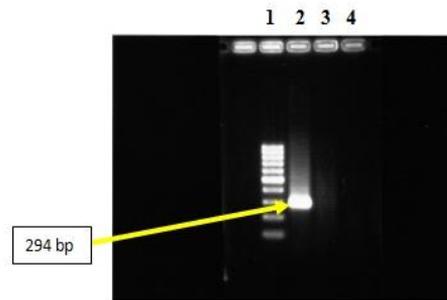
Amplifikasi tahap pertama adalah *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Proses RT-PCR digunakan untuk sintesis RNA menjadi *complimentary* DNA (cDNA) untai tunggal agar dapat diamplifikasi menggunakan mesin PCR. Komponen utama dalam proses PCR adalah DNA cetakan, *primer*, dNTPs, *Taq* DNA polimerase, dan larutan *buffer* (Verkuil *et al.*, 2008). Proses amplifikasi tahap kedua yaitu *Nested* RT-PCR. Menurut Yusuf (2010) *Nested* RT-PCR memungkinkan untuk mengurangi kontaminasi pada produk selama amplifikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan. *Nested* primer akan menyatu dengan produk PCR yang pertama dan menghasilkan produk yang lebih pendek daripada produk yang pertama.

Elektroforesis

DNA hasil amplifikasi dianalisa lebih lanjut menggunakan elektroforesis untuk dapat melihat apakah sampel yang diperiksa positif atau negatif terinfeksi virus VNN. Pada prinsipnya adalah DNA yang bermuatan negatif akan berpindah menuju ke arah muatan positif dalam medan listrik. Menurut Seow and Bahaman (2012) perpindahan tersebut tergantung pada kondisi *buffer*, suhu, durasi waktu, konsentrasi gel dan ukuran molekul. Tahapan dalam proses elektroforesis adalah pembuatan Gel Agarose, elektroforesis, dan pewarnaan.

Diagnosa Hasil

Gel hasil elektroforesis yang telah direndam dengan larutan EtBr, kemudian dimasukkan dalam alat UV doc atau UV *Transluminator*. Setelah UV *Transluminator* dinyalakan, pita DNA akan berpendar. Hasil dari sampel dapat dilihat dilayar monitor yang terhubung dengan UV *Transluminator*. Band atau pita DNA yang muncul pada sampel dibandingkan dengan band yang muncul pada kontrol positif. Sampel yang dinyatakan positif VNN apabila band sampel ada pada ukuran 294 bp atau sejajar dengan band pada kontrol positif.



Gambar 1. Hasil elektroforesis VNN (Sumber : Dokumentasi BKKIPM Soekarno-Hatta, 2015)

Keterangan :

1. Marker DNA 100 bp
2. Kontrol positif VNN
3. Kontrol negatif
4. Sampel (negatif)

Dari hasil pemeriksaan diperoleh sampel negatif VNN. Sampel ikan yang diperiksa dalam keadaan tampak sehat dan tidak menunjukkan gejala klinis. Pemeriksaan dilakukan pada ikan yang dilalulintaskan melalui Bandara Soekarno-Hatta Tangerang, Banten bertujuan untuk mencegah masuk dan tersebarnya wabah penyakit VNN di Indonesia. Mengingat pada tahun 1998 terjadi kasus kematian yang disebabkan oleh VNN ditemukan pada budidaya ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) dengan tingkat kematian mencapai 100 % (Sugianti, 2005). Penyakit virus tidak bisa disembuhkan 100 %, karena ikan yang masih hidup setelah terinfeksi virus akan berperan sebagai inang perantara (*carrier*).

Kesimpulan

Teknik pemeriksaan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) pada ikan terdiri dari beberapa tahapan yaitu ekstraksi RNA, amplifikasi, elektroforesis dan diagnosa hasil. Pada 62 sampel ikan hasil pemeriksaan menunjukkan sampel ikan tersebut negatif terinfeksi oleh virus VNN.

Daftar Pustaka

- Keputusan Menteri Kelautan Dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 26 Tahun 2013 Tentang tentang Penetapan Jenis-Jenis Hama Dan Penyakit Ikan Karantina, Golongan, Media Pembawa, Dan Sebarannya. Jakarta.
- Langga, I. F., M. Restu, dan T. Kuswinanti. 2012. Optimalisasi Suhu dan Lama Inkubasi dalam Ekstraksi DNA Tanaman Bitti (*Vitex cofassus Reinw*)

- serta Analisis Keragaman Genetik dengan Teknik RAPD-PCR. *J. Sains & Teknologi*. Vol.12 (3) : 265 – 276.
- Munday B.L., Kwang J. dan Moody N. 2002. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Jurnal of Fish Diseases* Vol. 25: 127–142.
- Pelczar, M.J. dan E.C.S Chan. 1988. *Dasar – Dasar Mikrobiologi* 2. UI-Press. Jakarta. Hal 461-467
- Seow V. L and A.R. Bahaman. 2012. Discriminatory Power of Agarose Gel Electrophoresis in DNA Fragments Analysis. In: Magdeldin S. *Gel Electrophoresis – Principles And Basics*. In Tech. Croatia. Hal 41-56
- Sugianti, B. 2005. Pemanfaatan Tumbuhan Obat Tradisional Dalam Pengendalian Penyakit Ikan. *Makalah Falsafah Sains*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 37 hal.
- Srigede L. dan S. Zaetun. 2014. Paparan Sinar Ultra Violet (UV) dengan Pengamatan Waktu Sterilisasi terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus* sp. *Media Bina Ilmiah* Vol. 8 (6) : 75-79.
- Verkuil E.V., A. van Belkum, dan J. P. Hays. 2008. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Netherlands : Springer Science + Business Media B. V.
- Yusuf, Z. K. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Saintek* Vol.5 (6) : 1-6.