

**Pemeriksaan *Viral Nervous Necrosis Virus* pada Sampel Air Pemeliharaan Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dengan Metode Imunositokimia *Streptavidin Biotin***

**Examination of Viral Nervous Necrosis Virus in The Water Sample of the Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) with Immunocytochemistry of Streptavidin Biotin**

**Putu Eka Sudaryatma<sup>1</sup>, Artanti Tri Lestari<sup>1</sup>, Yenny Trisnasari<sup>1</sup>, D. Lia Lidayana<sup>1</sup>, Wahyu Nurlita<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorium Uji Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan kelas I Denpasar  
E-mail: eka\_narita@yahoo.com

**Abstract**

One of potencies of marine waters that is developed, and starts to have the international market is grouper fish. Tiger grouper culture can not be separated from disease factors that may attack and destroy the cultivation. One of the important diseases that can cause mass mortality in fish, especially in grouper larvae and juveniles stadium is viral nervous necrosis (VNN). Examination by using immunocytochemical method of streptavidin biotin (SB) undertaken to develop early detection of VNN in order to be applied in preventing spread of the VNN disease in seeds of tiger groupers that are already distributed worldwide in Indonesia. And also, this SB methodology can also be applied to the tiger groupers without any injuring or even killing of the fish for the purpose of sampling. In the present study, the preliminary test was done to determine the infectivity level of the inoculum (VNN virus) owned by the Office of Fish Quarantine, Quality Control, and Fishery Safety Class I Denpasar, Bali. Whereas, the main test was done by collecting water sample from tiger grouper fish farming that was infected with VNN. The water sample was examined by using immunocytochemical method of SB after being confirmed by RT-PCR-positive test that was previously purified. Based on both SB and PCR tests having VNN positive results, it is concluded that the immunocytochemical method of SB could be applied as early, rapid and accurate detection of VNN in only a 24 hours post infection by using water as the sample.

**Keywords:** VNN, water sample, streptavidin biotin, RT-PCR, tiger grouper

**Abstrak**

Salah satu potensi perairan laut yang sudah dikembangkan dan mulai menunjukkan pasar internasional adalah ikan kerapu. Budidaya kerapu macan tidak lepas dari faktor penyakit yang dapat menyerang dan menggagalkan hasil budidaya. Salah satu penyakit yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu, terutama pada stadia larva dan juvenil adalah *viral nervous necrosis* (VNN). Pada penelitian ini, dikembangkan metode imunositokimia *streptavidin biotin* untuk deteksi awal penyakit VNN sehingga dapat diaplikasikan dalam rangka pencegahan penyebaran penyakit pada benih yang dilalu-lintaskan dan tidak perlu untuk melukai atau bahkan mematikan ikan kerapu macan pada saat pengambilan sampel. Pemeriksaan diawali dengan uji pendahuluan untuk mengetahui tingkat infektifitas inoculum (virus) penyebab VNN yang dimiliki oleh Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan kelas I Denpasar. Uji utama dilakukan dengan mengambil sampel air pemeliharaan kerapu yang terinfeksi VNN kemudian dilakukan pemeriksaan imunositokimia dan dikonfirmasi dengan pengujian RT-PCR yang sebelumnya sudah dilakukan purifikasi.

Berdasarkan uji imunositokimia dan uji konfirmasi dengan RT-PCR yang kedua-duanya menunjukkan hasil positif, maka disimpulkan, bahwa uji imunositokimia dapat digunakan untuk deteksi dini virus penyebab VNN secara cepat, tepat dan akurat 24 jam pasca infeksi pada air pemeliharaan ikan.

**Kata kunci :** VNN, sampel air, *streptavidin biotin*, RT-PCR, ikan kerapu macan

## Pendahuluan

Salah satu potensi perairan laut yang sudah dikembangkan dan mulai menunjukkan pasar internasional adalah ikan kerapu. Ikan kerapu tersebar luas di perairan yang berkarang di daerah tropis maupun subtropis. Beberapa jenis ikan kerapu yang sudah menjadi sasaran budidaya adalah kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*), kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), kerapu sunu (*Epinephelus leopardus*) dan kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*). Jenis kerapu tersebut memiliki nilai jual yang tinggi dan untuk proses budidayanya digunakan komponen-komponen lokal. Kerapu macan termasuk satu diantara kerapu yang Pemeriksaan Penyakit *viral nervous necrosis* berhasil dibudidayakan dengan tingkat kehidupannya mencapai 40% pada pembudidaya penetasan ikan kerapu skala rumah tangga di Bali (Anonim, 1998). Ketersediaan benih ikan kerapu selalu kontinyu karena tidak terpengaruh musim. Dengan keunggulan yang maksimal tersebut, maka spesies ikan kerapu sudah dapat menembus pasar internasional yang banyak dilalulintaskan antar daerah untuk mencukupi pasokan benih, dan antar negara untuk kebutuhan konsumsi.

Faktor penyakit adalah terutama yang dapat menyerang dan menggagalkan hasil budidaya kerapu. *Viral nervous necrosis* (VNN) merupakan salah satu penyakit virus Kerapu. Salah satu penyakit yang telah dilaporkan oleh peneliti adalah *viral nervous necrosis* (VNN) yang dapat

menyebabkan kematian masal pada ikan kerapu, terutama pada stadia larva dan juvenil.

Di Indonesia, penyakit VNN ditemukan pertama kali pada ikan kakap putih budidaya di daerah Banyuwangi. Pada kasus VNN tersebut, kakap putih menunjukkan gejala klinis, antara lain lesu dan berenang berputar dengan perut di permukaan. Selain itu, ikan kakap putih seringkali muncul ke permukaan dengan berenang secara vertikal (Koesharyani *et al.*, 1999). Gejala klinis yang tampak tersebut memiliki kesamaan dengan gejala klinis pada ikan keparu yang terinfeksi VNN. Virus penyebab penyakit VNN, pada umumnya, menyerang sistem saraf pusat, terutama otak mengakibatkan ikan berenang berputar-putar, mengambang di permukaan dengan perut menghadap ke atas dan pigmentasi yang warnanya lebih gelap. Pada pemeriksaan histopatologisnya, maka akan terlihat adanya vakuolisasi pada otak, sumsum tulang dan retina mata, serta ada hemoragis hepatosit dan limpa yang disertai dengan infiltrasi heterofil dan sel-sel radang mononukleus. Untuk uji diagnostik laboratorik, selain melalui pemeriksaan histopatologis, juga dapat dilakukan dengan uji *reverse transcriptase -polymerase chain reaction* (RT-PCR), *fluorescent antibody technique* (FAT) dan imunositokimia (OIE, 2006).

Untuk menjamin mutu dan kesehatan produk hasil kelautan dan perikanan, Karantina Ikan wajib bertanggung jawab terhadap pencegahan terhadap masuk, penyebaran dan keluarnya penyakit ikan dari lalu lintas produk perikanan dan kelautan tersebut

yang kemungkinan dapat sebagai media pembawa hama dan penyakit ikan dengan mengaplikasikan uji laboratoris sebagai salah satu kegiatan karantina ikan, antara lain: pengawasan. Kegiatan pengawasan di Laboratorium Karantina Ikan mengacu pada Keputusan Menteri No. 3 Tahun 2010 tentang Hama Penyakit Ikan (HPI) dan atau Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) serta daftar penyakit yang dapat dilalulintaskan antar negara dan atau antar daerah yang tercantum pada OIE. Penyakit VNN termasuk penyakit HPIK golongan satu, yang penyebarannya perlu pengawasan secara ketat. Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Denpasar sebagai salah satu pintu keluar masuk komoditas ekspor berusaha mencegah penyebaran penyakit VNN pada benih kerapu macan. Frekuensi lalulintas komoditas benih kerapu yang tinggi menuntut Laboratorium Uji Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Denpasar untuk mengembangkan teknik pendeteksi awal untuk penyakit VNN agar dapat mencegah penyebaran penyakit pada benih ikan yang dilalulintaskan. Tujuan utama penelitian ini adalah untuk pengembangan dan pengaplikasian uji imunositokimia pada air pemeliharaan ikan kerapu macan sebagai upaya deteksi dini penyakit *viral nervous necrosis* (VNN). Dengan demikian, diharapkan, bahwa untuk deteksi dini VNN nantinya tidak perlu lagi digunakan sampel ikan hidup, ataupun sampel yang diperoleh dengan cara melukai ikan kerapu macan pada saat pengambilan sampel ataupun bahkan mematikan atau melakukan nekropsis ikan.

## Materi dan Metode

Bahan yang digunakan adalah 80 ekor kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dengan ukuran panjang 8-10 cm sejumlah 80 ekor, pakan ikan kerapu dan air laut steril. Untuk bahan imunositokimia digunakan akuades, *phosphate buffer saline* (PBS), metanol absolut, *kit streptavidin-biotin*, antibodi poliklonal anti VNN dan pewarna hematoksilin. Sedangkan, untuk bahan pemeriksaan RT-PCR VNN digunakan *kit IQ-2000*, kloroform, isopropanol, alkohol 75% dan 95%, DEPC, bahan-bahan amplifikasi, *nuclease free water*, agarosa, bufer TAE, ethidium bromida, aquades, kertas *gel doc print*, *kit high pure viral nucleic acid* (Roche®), sediaan inokulum (virus penyebab VNN) yang dimiliki oleh Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Denpasar.

Alat yang digunakan adalah bak ikan, ember, seser, termometer, refraktometer, sarung tangan, masker, papan bedah, mortar, *seperangkat alat nekropsis ikan*, *glass ware*, pipet mikro, tabung mikro 0,2 dan 1,5 ml, tip mikro, alat suntik ukuran 1-5 ml, gelas benda, gelas penutup, *analytical balance*, *hot plate*, vorteks, mikser, *thermal blok*, *patsel*, rak tabung mikro, almari beku -20° dan -80° C, mesin PCR, elektroforesis dan UV *trans-illuminator*.

Koleksi inokulum virus penyebab VNN yang dimiliki oleh Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan kelas I Denpasar memiliki konsentrasi  $9,25 \times 10^2$  µg/ml. Konsentrasi partikel VNN kemudian diencerkan menjadi  $10^{1.5}$  µg/ml dan disuntikkan 100 µl setiap

ikan. Menurut Kokawa *et al.* (2008),  $LD_{50}$  dari homogen otak mengandung konsentrasi inokulum  $10^{1.5} LD_{50}/100 \mu l$ .

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui infektifitas koleksi inokulum virus penyebab VNN pada kerapu macan. Inokulum virus penyebab VNN diinfeksi ke kerapu sehat sebanyak 10 ekor untuk melihat patogenitasnya. Kerapu macan yang menunjukkan gejala klinis terinfeksi virus VNN kemudian diambil organ, antara lain: mata, otak, otot-daging, hati, limpa, jantung dan ginjal untuk diperiksa dengan tehnik RT-PCR dan imunohistokimia. Setelah kerapu macan terdeteksi positif VNN dengan uji PCR dan imunohistokimia, maka inokulum VNN tersebut siap digunakan untuk menginfeksi ikan kerapu pada uji utama.

Kerapu macan berukuran 8-10 cm diaklimatisasi selama sepuluh hari, untuk mengetahui dan menentukan tingkat kesehatan kerapu macan. Sepuluh ekor kerapu macan digunakan sebagai kontrol negatif. Kerapu macan tersebut harus memiliki hasil negatif virus penyebab VNN dengan uji RT-PCR, dan imunohistokimia. Kemudian, 40 ekor kerapu macan diinjeksi dengan inokulum virus penyebab VNN sebanyak 100  $\mu l$  dengan konsentrasi  $10^{1.5}$  pada setiap ikan, yang diawali dengan mengusap kapas beralkohol 70% ke permukaan ikan sebelum dan sesudah penyuntikan virus VNN. Pemeliharaan ikan yang telah diinjeksi inokulum virus penyebab VNN dilakukan pada empat akuarium yang berbeda tanpa siklus pergantian air selama tujuh hari. Pengamatan gejala klinis ikan dan pengambilan sampel air pemeliharaan dilakukan 24 jam pasca-infeksi dan

berturut-turut setiap 24 jam berikutnya. Pemeriksaan virus VNN dengan sampel air dilakukan dengan pengujian imunositokimia dan untuk konfirmasi uji digunakan pemeriksaan RT-PCR. Sebelum dilakukan uji konfirmasi air dengan pemeriksaan RT-PCR, air pemeliharaan ikan kerapu tersebut terlebih dahulu dilakukan uji purifikasi virus VNN.

Air pemeliharaan yang diambil dan telah dihomogenkan, selanjutnya di-apus tipis pada permukaan gelas benda dan dibiarkan mengering. Sediaan apus yang sudah kering difiksasi metanol selama 10 menit, kemudian dilakukan pewarnaan imunositokimia *streptavidin biotin* dengan tahapan seperti yang tercantum pada petunjuk cara pewarnaannya pada perangkat diagnosis *streptavidin-biotin*. Sesudah pewarnaan selesai kemudian ditetesi bahan perekat yang larut air, ditutup dengan gelas penutup dan diamati dibawah mikroskop cahaya. Hasil positif apabila pada sediaan apus sampel air yang telah diwarnai imunositokimia *streptavidin-biotin* tersebut terlihat adanya presipitasi (virus VNN) yang berwarna coklat keemasan.

Air pemeliharaan ikan kerapu macan yang telah dihomogenkan diambil sebanyak 200  $\mu l$  dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml dan dikerjakan sesuai dengan intruksi *kit High Pure Viral Nucleic Acid* (Roche®) sampai selesai. Elusi asam nukleus disimpan pada suhu  $-80^{\circ}C$  (sediaan). Untuk pemeriksaan RT-PCR digunakan 15  $\mu l$  sediaan.

Analisa hasil dilakukan secara deskriptif dengan membandingkan hasil pengamatan gejala klinis, air ikan yang diuji imunositokimia dan konfirmasi uji dengan RT-PCR.



## Hasil dan Kesimpulan

Kerapu macan yang telah diinfeksi virus penyebab VNN pada uji utama menunjukkan gejala klinis pada gerakan renang dan disorientasi lingkungan, serta perubahan warna tubuh. Perubahan gerakan renang ikan kerapu macan yang sangat mudah dikenali sebagai akibat infeksi virus penyebab VNN adalah berenang berputar-putar dan vertikal, kehilangan disorientasi lingkungan (menabrak-nabrakkan diri ke dinding dan dasar aquarium) dan warna tubuh yang terlihat lebih gelap

(Tabel 1; Gambar 1). Infeksi virus penyebab VNN pada ikan yang dilakukan melalui injeksi intramuskular sangat cepat menyebar dan menginfeksi inang melalui serabut saraf perifer yang ada di otot-daging, tersebar masuk ke dalam sistem saraf pusat dan mata, dan akan mengakibatkan ikan kehilangan orientasi berenang dan disfungsi visual. Pada penelitian ini, nekropsis yang dilakukan pada ikan kerapu yang mati menunjukkan adanya perubahan patologis anatomis pada organ-organ, yaitu insang pucat, limpa bengkak dan hemoragis, warna hati memucat dan konsistensinya rapuh, ginjal bengkak, gelembung renang dilatasi dan usus kembung.

Tabel 1. Pengamatan gejala klinis ikan yang diinfeksi virus penyebab VNN

Waktu (Pasca -injeksi)	Gejala klinis	Lesi patologis anatomis
24 jam	Ikan mulai berenang miring di permukaan. Warna tubuh memucat	Sirip ekor geripis, sirip ekor geripis, insang pucat, hati merah pucat, limpa bengkak
48 jam	Ikan berenang vertikal di permukaan, berenang dan menabrakan diri ke dinding aquarium, warna tubuh menggelap	Nekrosis di bawah mulut, sirip ekor geripis, insang pucat, limpa bengkak dan hemoragi, hati pucat dan bengkak
72 jam	Ikan berenang dengan tubuh terbalik, tidak ada refleksi, banyak ikan yang sekarat dan sudah ada ikan yg mati	Sirip ekor geripis, mulut luka, insang pucat, limpa bengkak dan berwarna kehitaman, ginjal bengkak, hati pucat dan usus kembung

Ikan yang terinfeksi virus penyebab VNN akan mengalami perubahan gerakan berenang, yaitu berenang berputar di permukaan dan warna tubuh yang lebih gelap (Yoshikoshi and Inoue, 1990). Perubahan gerakan renang tampak sangat jelas dan ada luka di bagian bawah mulut. Hal tersebut menunjukkan, bahwa ikan mulai kehilangan keseimbangan dalam berenang sehingga seringkali menabrakkan diri ke dinding dan/atau dasar

aquarium. Benih ikan yang terserang VNN dapat berbeda berdasarkan pada umurnya. Pada ikan kerapu yang berumur 45 hari sampai 4 bulan akan terlihat berdiam di dasar bak, berenang terbalik, gerakan lemah, warna kulit menjadi gelap dan nafsu makan menurun drastis. Pada umumnya, ikan akan mati dalam waktu 3 -5 hari setelah adanya gejala klinis tersebut (Roza *et al.*, 2003).



Gambar 1. Ikan kerapu macan 48 jam pasca-infeksi VNN. Tubuh ikan kerapu tampak lebih gelap.

Gejala klinis yang sama dilaporkan oleh Gilda dan Leobert (2011). Ikan yang terinfeksi virus penyebab VNN mempunyai saluran pencernaan yang kosong dan hanya berisi udara, serta dilatasi gelembung renang. Perubahan patologis anatomis terlihat pada organ terutama, hati dan limpa. Hati terlihat pucat dan membengkak, serta limpa membengkak dan hemoragis (Gambar 2). Perubahan patologis anatomis pada hati dan limpa tersebut akibat infeksi virus VNN yang melanjut dan terjadi viremia. Saluran pencernaan ikan yang kembung diakibatkan oleh adanya hasil fermentasi bakteri normal saluran pencernaan dan diikuti oleh adanya akumulasi cairan yang berwarna coklat kehijauan. Akibat infeksi virus VNN pada sistem saraf pusat dan mata, maka ikan kehilangan kemampuan penglihatan dan gerak peristaltik usus tidak teratur akibat kerusakan sistem saraf perifer. Virus VNN bersifat neurotrofik dan dapat bereplikasi dalam serabut-serabut saraf dan dapat secara cepat menyebar dan menyerang organ-organ lain di dalam tubuh ikan yang dilalui oleh sistem saraf perifer (Korsnes, 2008).



Gambar 2. Lesi patologis anatomis pada Ikan kerapu macan 48 jam pasca-infeksi virus VNN. Limpa bengkak dan hemoragis, hati pucat dan bengkak.

Virus virus penyebab VNN dapat menginfeksi ikan melalui tiga cara, yaitu: 1. Melalui sel-sel epitelia saluran pencernaan, 2. Melalui akson saraf yang ada di permukaan sel dan 3. Melalui sirkulasi darah (Korsnes, 2008). Ikan yang diinfeksi virus penyebab VNN melalui injeksi intra muskular (i.m.), menyerang ikan dan selanjutnya mereplikasikan diri di dalam sitoplasma ataupun nukleus sel-sel otot-daging, kemudian menyebar dan ber-replikasi di serabut saraf perifer dan selanjutnya virus VNN akan langsung masuk ke dalam sistem saraf pusat, yaitu otak dan medula spinalis.

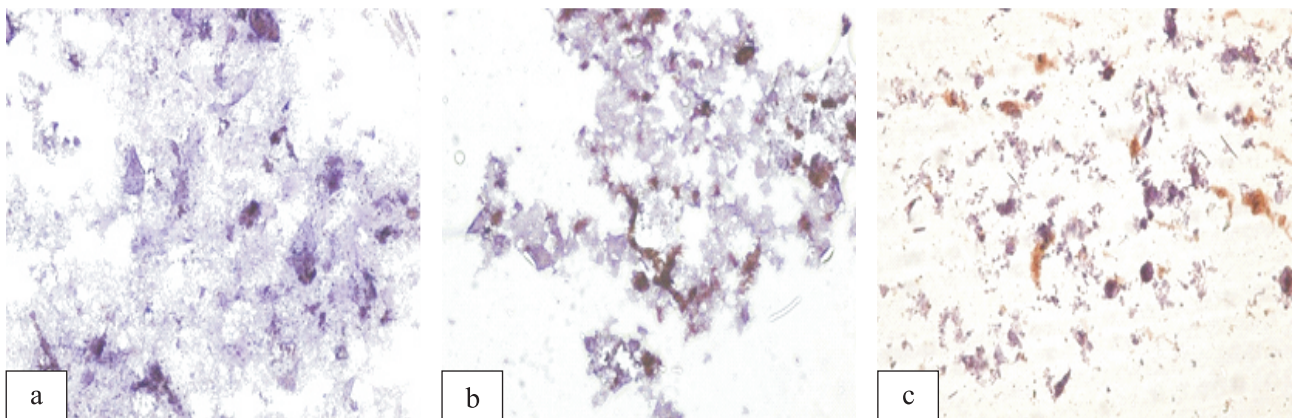
Pada penelitian ini, kematian ikan mulai terjadi pada hari ketiga pasca-infeksi, dan pada saat dinekropsi, pada ikan-ikan tersebut terlihat adanya lesi patologis anatomis, yaitu limpa yang bengkak, hati yang pucat dan rapuh, serta adanya dilatasi gelembung renang. Kejadian tersebut menggambarkan infeksi virus penyebab VNN telah menyerang seluruh organ-organ di dalam tubuh. Ikan. Kematian yang mendadak dan massal juga terjadi pada hari ketiga pasca-infeksi virus VNN. Hal tersebut juga sesuai dengan yang dilaporkan oleh

Gilda *et al.* (2011). Ikan kerapu yang diinfeksi VNN akan mati 50-80 jam pasca-inokulasi virus VNN.

Reaksi positif pada air pemeliharaan ikan kerapu yang diinfeksi virus penyebab VNN menghasilkan reaksi spesifik antibodi-antigen yang terwarnai oleh kromogen, menunjukkan warna coklat-keemasan setelah diuji melalui pendekatan imunologis imunositokimia *streptavidin biotin* (SB). Sedangkan, pada sampel air kontrol (negatif VNN) tidak terjadi reaksi ikatan antara antibodi-antigen sehingga pada sediaan apus sampel air tidak terlihat adanya warna coklat keemasan (Gambar 3-4). Hasil positif sediaan apus sampel air dengan uji imunositokimia SB yang membuktikan, bahwa virus yang diinfeksi pada ikan sudah berada di air pemeliharaan dalam selang waktu 24 jam. Keluarnya virus dari tubuh ikan dan kemudian masuk ke dalam air dapat melalui feses, lendir dan insang. Feses merupakan hasil ekskresi dari saluran pencernaan yang merupakan salah satu media pembawa virus VNN yang berada di dalam saluran

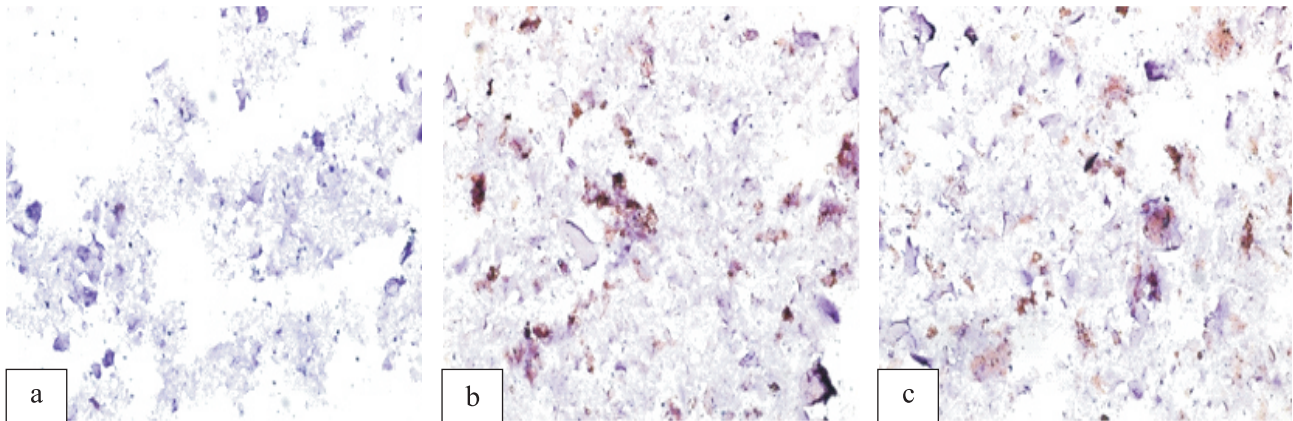
pencernaan. Virus VNN dapat menginfeksi melalui saluran pencernaan melalui serabut-serabut saraf perifer dari ikan dan selanjutnya dikeluarkan melalui sel-sel epitelia saluran pencernaan. Virus VNN dapat berada pada sel-sel epitelia saluran pencernaan, serabut-serabut otot jantung (miokardia), sel-sel saraf dan makrofag (Grotomol *et al.*, 1997). Adanya virus VNN di dalam saluran pencernaan telah dilaporkan oleh Chi *et al.* (2001) melalui uji imunohistokimia pada sel epitel saluran pencernaan ikan kerapu.

Reaksi positif pada air pemeliharaan ikan kerapu yang diinfeksi virus penyebab VNN menghasilkan reaksi spesifik antibodi-antigen yang terwarnai oleh kromogen, menunjukkan warna coklat-keemasan setelah diuji melalui pendekatan imunologis imunositokimia *streptavidin biotin* (SB). Sedangkan, pada sampel air kontrol (negatif VNN) tidak terjadi reaksi ikatan antara antibodi-antigen sehingga pada sediaan apus sampel air tidak terlihat adanya warna coklat keemasan (Gambar 3-4).



Gambar 3. Gambaran imunositokimia sediaan apus air pemeliharaan kerapu macan 24 jam pasca- infeksi virus VNN. a. Kontrol negatif: Sediaan apus air tidak terlihat adanya warna coklat keemasan, b. Kontrol positif: Sediaan apus air terlihat ada warna coklat keemasan dan c. Sediaan apus air laut kohabitasi yang terinfeksi virus VNN: Sediaan apus air adalah positif yang terlihat ada warna coklat keemasan (SB, 1000x.).





Gambar 4. Gambaran imunositokimia sediaan apus air pemeliharaan Kerapu Macan 48 jam pasca infeksi virus VNN: a) Kontrol negatif: Sediaan apus air tidak terlihat adanya warna coklat keemasan, b) Kontrol positif: Sediaan apus air terlihat ada warna coklat keemasan dan c. Sediaan apus air laut kohabitasi yang terinfeksi virus VNN adalah positif yang terlihat berwarna coklat keemasan (SB, 1000x.).

Hasil positif sediaan apus sampel air dengan uji imunositokimia SB yang membuktikan, bahwa virus yang diinfeksi pada ikan sudah berada di air pemeliharaan dalam selang waktu 24 jam. Keluarnya virus dari tubuh ikan dan kemudian masuk ke dalam air dapat melalui feses, lendir dan insang. Feses merupakan hasil ekskresi dari saluran pencernaan yang merupakan salah satu media pembawa virus VNN yang berada di dalam saluran pencernaan. Virus VNN dapat menginfeksi melalui saluran pencernaan melalui serabut-serabut saraf perifer dari ikan dan selanjutnya dikeluarkan melalui sel-sel epitelia saluran pencernaan. Virus VNN dapat berada pada sel-sel epitelia saluran pencernaan, serabut-serabut otot jantung (miokardia), sel-sel saraf dan makrofag (Grotomol *et al.*, 1997). Adanya virus VNN di dalam saluran pencernaan telah dilaporkan oleh Chi *et al.* (2001) melalui uji imunohistokimia pada sel epitel saluran pencernaan ikan kerapu.

Pada penelitian ini, terbukti, bahwa penularan VNN dapat terjadi secara horizontal

dengan ditemukannya virus penyebab VNN pada air pemeliharaan ikan yang dilakukan pemeriksaan imunositokimia SB. Virus yang keluar dari tubuh ikan yang terinfeksi dan berada di dalam air dapat berada di dalam air pemeliharaan setelah 24 jam pasca-infeksi. Untuk koleksi virus yang terdapat dalam air digunakan teknik presipitasi virus dalam air melalui penambahan senyawa  $Al(OH)_3$ , sehingga terjadi ikatan elektrostatis antara virus yang bermuatan negatif dan  $Al(OH)_3$  yang bermuatan positif ( $Al^{3+}$ ).

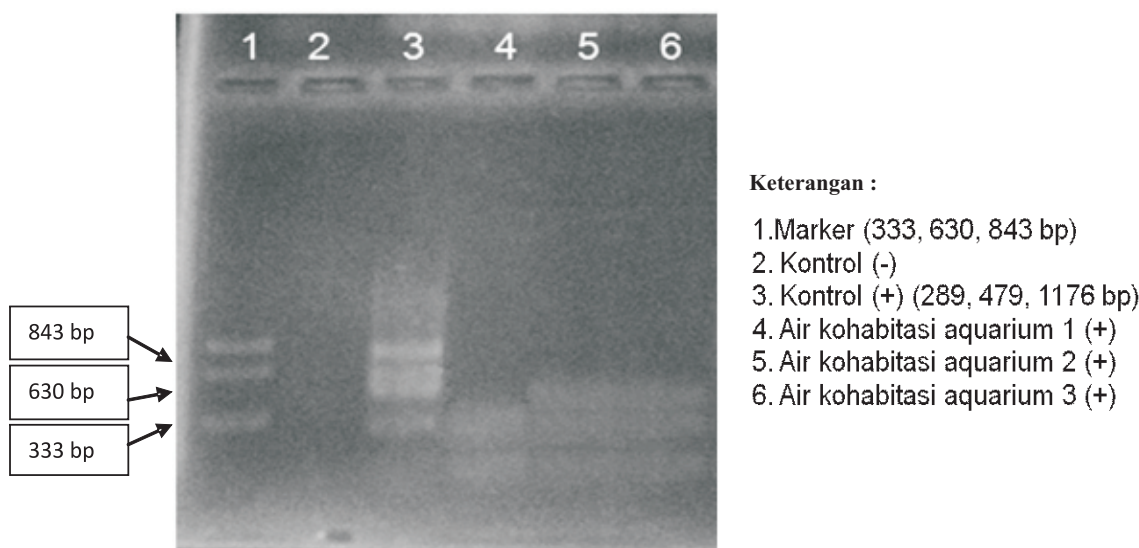
Ikan sehat yang terinfeksi virus penyebab VNN akibat masuknya virus yang ada di air melalui kontak langsung dengan permukaan tubuh, antara lain: lendir, sirip dan otot-daging termasuk pada permukaan sel-sel epitelia saluran pencernaan dikenal dengan nama *water borne disease*. Virus yang masuk melalui permukaan tubuh dapat langsung ber-replikasi di sel-sel epitelia permukaan saluran pencernaan dan masuk ke dalam sistem saraf pusat melalui transfer dari sistem saraf perifer



(Nervus Vagus) (Korsnes, 2008). Pada penelitian ini, keberadaan VNN dalam air dapat bertahan selama 48 jam pasca-infeksi. Virus VNN diduga dapat bertahan hidup pada mikroorganisme air, seperti alga, parasit dan debris nekrotik sel-sel epitelia, terutama dari saluran pencernaan. Selain itu, protein sisa dari pakan ikan pada perairan budidaya ikan juga merupakan tempat replikasi virus VNN. Dilaporkan, bahwa *betanodavirus* yang merupakan virus penyebab VNN dapat juga menginfeksi mikroorganisme perairan laut dan ikan yang tidak merupakan inang spesifik dari VNN (Korsnes, 2008). Hal tersebut dapat terjadi

karena virus VNN adalah stabil jika berada di lingkungan perairan dan bahkan dapat bertahan hidup pada suhu ekstrem dan adanya pemberian desinfektan (Arimoto *et al.*, 1996).

Pada penelitian ini, pengujian virus penyebab VNN pada air pemeliharaan yang sudah dilakukan dengan pemeriksaan imunositokimia SB, dilanjutkan verifikasi dengan menggunakan tehnik RT-PCR yang bertujuan untuk konfirmasi hasil uji imunositokimia SB pada sediaan air yang positif VNN tersebut. Hasil uji RT-PCR air pemeliharaan kerapu macan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil pemeriksaan RT-PCR air pemeliharaan ikan kerapu macan jam ke-24, 48 dan 72 pasca-infeksi VNN

Hasil uji RT-PCR menunjukkan, bahwa air pemeliharaan kerapu macan pada jam ke-24 sampai jam ke-72 pasca infeksi VNN semuanya positif VNN. Hal tersebut membuktikan, bahwa pada sampel air dengan uji RT-PCR dapat dideteksi VNN pada 24 jam pasca-infeksi VNN. Berdasarkan hasil uji imunositokimia SB dan dilanjutkan dengan

konfirmasi uji dengan pemeriksaan RT-PCR yang menunjukkan hasil positif, maka untuk pemeriksaan VNN secara dini dapat digunakan sampel air dengan uji imunositokimia SB yang cepat, tepat, akurat dan diterima dapat secara ilmiah, hukum dan internasional, serta sesuai dengan petunjuk OIE, yang memiliki kelebihan tanpa membunuh dan atau

melukai ikan kerapu macan sehingga dapat mencegah penyebaran penyakit VNN lebih awal.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. drh. Hastari Wuryastuti, M.Sc., Ph.D. dan Prof. drh. R. Wasito, M.Sc., Ph.D., Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada yang telah membimbing dalam penelitian dan penulisan naskah.

### Daftar Pustaka

- \_\_\_\_\_ (2001) *Pembudidayaan Dan Manajemen Kesehatan Kerapu*. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center (SEAFDEC). Iloilo, Philippines.
- \_\_\_\_\_ (2006) *Manual IQ 2000*. Farming Intelligence Tech. Corp. <http://www.iq2000kit.com>. Diakses pada tanggal 26 Maret 2012.
- Al Qodri, Sudjiharno, A. H. dan Anidiastuti. (2004) *Pemilihan Lokasi Pembenihan Kerapu*. Balai Budidaya Laut Lampung. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Departemen Kelautan dan Perikanan, Lampung.
- Anonimus. (2008) *The Circulatory System In Fish*. <http://www.earthlife.com>. Diakses pada tanggal 10 Maret 2012.
- Antoro, S., Sarwono, H. A. dan Sudjiharno. (2004) *Biologi Kerapu Pembenihan Kerapu*. Balai Budidaya Laut Lampung. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Departemen Kelautan dan Perikanan, Lampung.
- Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura G. and Furusawa, I. (1996) Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture J.* 143:15-22.
- Artanti, T. (2010) Nilai diagnostik imunositokimia *viral nervous necrosis* (VNN) pada kerapu macan. Laporan Uji Coba Balai Karantina Ikan
- Ngurah Rai. Jakarta.
- Brown, C.C., Olander H.J. and Senne, D.A. (1992) A Pathogenesis study of highly pathogenic avian influenza virus (H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>) in chickens, Using Immunohistochemistry. *J. Comp. Path.* 107: 341-348.
- Chi, S.C., Lo, B.J. and Lin, S.S. (2001) Characterization Of Grouper Nervous. *J. Fish Dis* 24: 3-13.
- Firiasari, A. (2009) Pengamatan ekspresi protein dengan metode imunositokimia. CCRC Farmasi UGM. Yogyakarta.
- Fujaya, Y. (2004) Fisiologi ikan. Rineka Cipta. Jakarta.
- Gilda, D, Lio-Po and Leobert D P. (2011) *Viral disease Chapter I*. <http://rfdp.seafdec.org.ph>. Diakses pada tanggal 25 Maret 2011.
- Grotmol, S., Bergh O. and Totland, G.K. (1999) Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (Ver) to yolk-sac larvae of the atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: Occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Dis. Aq. Org.* 36 : 95-106.
- Grotmol S., Totland, G.K., Thorud, K. and Hjeltnes, B.K. (1997) Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: A probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Dis. Aq. Org.* 29: 85-97.
- Katayama, M. (1960) *Fauna Javonica Serranidae (Piscea) Biogeographical Society Of Japan*. Tokyo New Service. Ltd. Ginza Nishi. Japan.
- Korsnes, K. (2008) *Nervous Necrosis virus (VNN) in farmed Norwegian fish species*. Thesis of Philosophiae Doctor (PhD) University of Bergen. Norway: Bergen.
- Koesharyani I., Zafran & Yuasa I. (1999) Deteksi Viral Nervous Necrosis (Vnn) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (Pcr) Pada Ikan Kerapu Bebek. *Pros.Sem.Nas.Pen. Dis. Tek.Budidaya Laut dan Pantai* : 237-240.

- Kokawa, Y., I. Takami, T. Nishizawa & M. Yoshimizu. (2008) Amixed Infection In Sevenband Grouper *Epinephelus Septemfasciatus* Affected With Viral Nervous Necrosis (Vnn). *Aquaculture* 284: 41-45.
- Mori, K., Sugaya, E., Nishioka, T., Gomez, D.K., Fujinamy, Y., Arimoto, M., Okinaka, Y. & Nakai, T. (2005) *Detection of betanodaviruses from feed fish used in marine aquaculture*. In: EAAP 12th International Conference Diseases of Fish and Shellfish, 11-16 September 2005, Copenhagen, Denmark.
- Nguyen, H.D., Nakai, T. and Muroga, K. (1996) Progression of *Striped Jack Nervous Necrosis Virus* (NNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Dis. Aq. Org.* 24 : 99-105.
- OIE (2006) *Manual of diagnostic for aquatic animals*. France.
- Rantam, F.A. (2003) *Metode Imunologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Roza, D., Johnny and Yuasa K. (2003) Viral diseases of grouper in Indonesia. Makalah pada Training on Grouper Hatchery Seed Production. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol – NACA Bangkok. Gondol, 1-21 Mei 2003.
- Sunaryanto, Sulistyono, I. Chaidir, and Sudjiharno (2001) *Pengembangan Teknologi Budidaya Kerapu : Permasalahan Dan Kebijakan*. *Prosiding lokakarya nasional. Pengembangan agribisnis kerapu : Peningkatan daya saing agribisnis kerapu yang berkelanjutan melalui penerapan IPTEK*. Jakarta.
- Wasito (1995) Penerapan Uji Imunologi Untuk Mendiagnosa HPIK Pada Kegiatan Lalu Lintas Ikan. Seminar Nasional Hama dan Penyakit Ikan Karantina dan Daerah penyebarannya. Jakarta.
- Weeks, B.A. and Warinner, J.E. (1986) *Functional Evaluation Of Macrophages In : Fish From A Polluted Estuary*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12 : 313-320.
- Yoshikoshi, K. and Inoue, K., 1990. Viral Nervous Necrosis in hatchery larvae and juvenils of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schelgel). *J. Fish Dis.* 13: 69-77.
- Yuasa, K., Koesharyani I., Roza D., Mahardika K., Johnny F. and Zafran, (2001). *Manual For PCR Procedure : Rapid Diagnosis on Viral Nervous Necrosis (VNN) in Grouper. Lolitkanta – JICA Booklet 13 : 35 – 37.*