

Artikel penelitian

Deteksi Viral Nervous Necrosis (VNN) pada Ikan Kakap Putih (*L. calcarifer*) dengan Metode RT-qPCR

Nadiyahawati ¹, Lili suharli ^{1*}, Joko santosa ²

¹ Program Studi Bioteknologi, Fakultas Ilmu dan Teknologi Hayati, Universitas Teknologi Sumbawa

² Balai Perikanan Budidaya Laut (BPBL) Lombok

* Corresponding author (lili.suharli@uts.ac.id)

Riwayat artikel

Diterima : 20 Juli 2023
Disetujui : 4 Feb 2023
Diterbitkan : 9 Feb 2024

Diedit Oleh

Alifiandi Setiawan

ABSTRACT

Sea bass is one of the main raw materials because it grows quickly. The problem in cultivating white snapper is the attack of diseases such as VNN (Viral Nervous Necrosis). The VNN virus can attack the central nervous system, retina of the eye and reproductive organs. A common symptom of this disease is loss of appetite which causes the fish to become weak, pale, swim irregularly, and often raise their heads to the surface of the water. To overcome this disease, early diagnosis can be done using the RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction) method. Viruses that attack in small quantities or do not cause symptoms of disease can be tracked early, because RNA viruses in small quantities can be multiplied by PCR. This study aims to determine the results of VNN testing on white snapper using the RT-qPCR method. The methods used include taking the brain from the target organ, RNA extraction, and RNA amplification. RNA amplification has several stages, namely denaturation, annealing and extension. The result showed that white sea bass could not be diagnosed as infected with VNN, because the negative control used was not valid. This is because the negative control reagent mix is contaminated so that it exceeds the threshold limit.

Keywords: White sea bass; RT-qPCR; VNN

ABSTRAK

Ikan kakap putih merupakan salah satu komoditas utama karena memiliki pertumbuhan yang cepat. Permasalahan dalam budidaya ikan kakap putih yaitu adanya serangan penyakit seperti VNN (Viral Nervous Necrosis). Virus VNN dapat menyerang sistem saraf pusat, retina mata, dan organ reproduksi. Gejala umum penyakit ini adalah hilangnya nafsu makan yang menyebabkan ikan menjadi lemah, pucat, berenang tidak beraturan, dan sering mengangkat kepala ke permukaan air. Untuk mengatasi penyakit tersebut dapat dilakukan dengan cara diagnosa dini dengan metode RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction). Virus yang menyerang dalam jumlah kecil atau tidak menimbulkan gejala penyakit dapat dilacak sejak dini, karena RNA virus dalam jumlah sedikit dapat diperbanyak dengan PCR. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil pengujian VNN pada ikan kakap putih dengan metode RT-qPCR. Metode yang digunakan meliputi pengambilan otak dari organ target, ekstraksi RNA, dan amplifikasi RNA. Amplifikasi RNA memiliki beberapa tahapan yaitu denaturasi, annealing, dan ekstention. Hasil menunjukkan bahwa ikan kakap putih tidak berhasil didiagnosa terinfeksi VNN, sebab kontrol negatif yang digunakan tidak valid. Hal ini dikarenakan mix reagen kontrol negatif terkontaminasi sehingga melewati batas threshold.

Kata kunci: Ikan kakap putih; RT-qPCR; VNN

Sitasi :

Nadiyahawati., Suharli, L., Santosa, J. (2024). Deteksi Viral Nervous Necrosis (VNN) pada Ikan Kakap Putih (*L. calcarifer*) dengan Metode RT-qPCR. *Journal of Life Science and Technology*. 2(1). 36-41

PENDAHULUAN

Ikan kakap putih (*Lates calcarifer*) merupakan salah satu komoditas budidaya laut unggulan Indonesia, karena memiliki pertumbuhan yang relatif cepat (Windarto *et al.*, 2019). Harga jual ikan kakap putih berkisar Rp 75.000 - Rp 80.000/kg (Yaqin *et al.*, 2018). Ikan kakap putih telah banyak dibudidayakan di Indonesia karena nilai ekonomis dan tingginya permintaan baik dalam negeri maupun luar negeri. Berdasarkan data kebutuhan yang diterima dari Kementerian dan Kelautan RI Tahun 2020, kebutuhan ikan kakap putih sebanyak 522.267 ton dan data produksi sebanyak 492.267 ton. Tingginya kebutuhan tersebut menyebabkan budidaya ikan kakap putih memiliki potensi untuk dikembangkan (Kusumanti *et al.*, 2022).

Budidaya ikan kakap putih tidak terlepas dari berbagai permasalahan yaitu adanya serangan penyakit. Penyakit yang menyerang ikan kakap adalah bakteri, parasit, jamur dan virus. Salah satu penyakit yang dapat menyebabkan kematian adalah VNN (*Viral Nervous Necrosis*). Penyakit ini ditemukan di Amerika Utara pada tahun 1990, dan mengancam produksi perikanan laut di dunia. VNN merupakan penyakit golongan *Nodaviridae* yang dapat menyebabkan kematian larva dan ikan dewasa pada berbagai jenis ikan laut (Prihartini, 2016). Virus ini dapat menyerang sistem saraf pusat, retina mata dan organ reproduksi. Penyebab adanya penyakit ini adalah hilangnya keseimbangan antara lingkungan (kualitas air), inang (ikan), patogen (organisme penyakit) yang dapat menimbulkan stres pada ikan. Gejala umum penyakit ini antara lain hilangnya nafsu makan sehingga menyebabkan ikan sangat lemah, warna tubuh pucat, berenang tidak teratur, dan sering mengangkat kepala ke permukaan air (Sembiring *et al.*, 2018).

Penyakit tersebut dapat diatasi dengan cara diagnosa dini pada ikan kakap putih dengan menggunakan metode RT-qPCR (*Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction*). Virus yang menyerang dalam jumlah sedikit atau tidak menimbulkan gejala penyakit dapat dilacak sejak dini, karena RNA virus yang jumlahnya sedikit dapat diperbanyak dengan PCR. Metode ini bekerja dengan melakukan pengamatan pada saat reaksi berlangsung, sehingga keberadaan RNA yang diamplifikasi dapat dianalisis menggunakan *Fluoregenic probe*. Oleh karena itu, pada metode ini pengamatan hasil tidak lagi membutuhkan langkah elektroforesis. Hasil akhir dari proses amplifikasi RT-qPCR adalah nilai Ct yang merupakan perpotongan antara garis *threshold* dan kurva amplifikasi. Metode RT-qPCR ini memiliki keunggulan sensitivitas yang lebih tinggi sehingga amplifikasi dapat terjadi secara bersamaan serta kuantitas RNA dapat diketahui. Selain memiliki sensitivitas yang tinggi, metode ini juga lebih dinamis, resiko kontaminasi silang lebih kecil, dan kemampuan aplikasi pengujiannya lebih banyak (Black *et al.*, 2020). Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil pengujian virus VNN (*Viral Nervous Necrosis*) pada ikan kakap putih dengan metode RT-qPCR.

METODE

Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai September 2022 di Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan di Balai Perikanan Budidaya Laut (BPBL) Lombok.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mikrotube ukuran 1,5 ml, mikropipet, tip, tabung koleksi, sentrifuge, vortex, spin down, laminar air flow, mesin Real-Time PCR, multiwell plates, penggerus, spin kolom.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu buffer RLT, buffer RW 1, buffer RPE, etanol, RNase-free water, primer spesifik VNN, probe VNN, taqman fast virus 1-step master mix dan gen fragmen sintesis.

Prosedur kerja

Adapun prosedur kerja dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut :

Teknik pengambilan sampel ikan kakap putih

Tahap awal yang dilakukan adalah identifikasi secara morfologi dengan mengamati ciri-ciri fisik ikan kakap putih. Sampel yang akan diperiksa dibedah terlebih dahulu dengan mengambil

bagian otak dari ikan menggunakan gunting dan pinset. Jika ekstraksi belum dapat dilakukan sebaiknya sampel difiksasi dengan alkohol 96 % kemudian disimpan pada suhu ruangan untuk mengawetkan sampel yang akan diamati.

Ekstraksi RNA sampel ikan kakap putih

Ekstraksi RNA dilakukan dengan mini kit qiagen RNeasy menggunakan protokol untuk *tissues*. Proses ekstraksi ini menggunakan bagian otak yang sudah dipisahkan dari ikan, kemudian dimasukkan kedalam mikrotube ukuran 1,5 ml. Ditambahkan larutan RLT sebanyak 350 μ l kemudian digerus sampai berwarna keruh menggunakan grinder. Disentrifus dengan kecepatan maksimal selama 3 menit. Hasil dari sentrifugasi menghasilkan supernatan yang mengandung RNA dan dimasukkan kedalam mikrotube yang baru. Ditambahkan 350 μ l etanol dan vortex selama 15 detik. Larutan dari mikrotube dipindahkan pada qiamp mini spin kolom, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 RPM selama 1 menit. Selanjutnya qiamp mini spin kolom dimasukkan kedalam tabung koleksi yang baru, setelah itu tabung koleksi yang berisi filtrat dibuang. Ditambahkan 700 μ l buffer RW 1 tanpa menyentuh dinding tabung, lalu disentrifus dengan kecepatan 8000 RPM selama 1 menit, dan kolom dimasukkan kembali pada tabung koleksi yang baru, dan tabung koleksi yang berisi filtrat dibuang. Ditambahkan 500 μ l buffer RPE, disentrifugasi dengan kecepatan 8000 RPM selama 1 menit. Kolom dimasukkan kembali pada tabung koleksi yang baru dan tabung koleksi yang berisi filtrat dibuang. Ditambahkan kembali 500 μ l buffer RPE dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 RPM selama 2 menit. kolom dimasukkan pada mikrotub ukuran 1,5 ml yang baru dan tabung koleksi yang berisi filtrat dibuang. Ditambahkan 70 μ l *RNase-free water* tanpa menyentuh dinding tabung. Disentrifugasi dengan kecepatan 8000 RPM selama 1 menit, kemudian qiamp mini spin kolom dibuang. Larutan yang berada didalam mikrotub merupakan RNA yang dihasilkan dari proses ekstraksi. RNA hasil ekstraksi kemudian dapat digunakan langsung dalam proses PCR atau disimpan pada suhu -80 °C.

Amplifikasi PCR

Adapun tahap amplifikasi PCR sebagai berikut:

Tahap pengenceran standar kurva

Pengenceran standar kurva sebagai kontrol positif dapat dilakukan dengan membuat lima tingkat pengenceran yaitu 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1 dan kemudian diamplifikasi. Pengenceran dimulai dengan menambahkan 9 μ l *nuclease free water* ke setiap tabung standar. Kemudian 1 μ l gen fragmen sintesis dimasukkan ke mikrotub pengenceran 10^5 lalu divortex. 1 μ l dari pengenceran 10^5 dimasukkan ke pengenceran 10^4 dan seterusnya sampai pengenceran 10^1 .

Tahap preparasi reagen PCR

Campuran reaksi dibuat dengan komposisi untuk satu reaksi seperti pada tabel 1. Terlebih dahulu menghitung jumlah reaksi master mix yang dibutuhkan untuk sampel RNA, kontrol negatif, dan kontrol positif. Dimasukkan sebanyak 25 μ l master mix kedalam tube 0,2 ml. Ditambahkan 135 μ l ddH₂O, primer dan probe sebanyak 1 μ l, divortex sampai tercampur rata. Ditambahkan 17,5 μ l master mix kedalam masing-masing well. Kemudian ditambahkan 3 μ l sampel RNA dan kontrol positif serta lubang well yang berisi master mix PCR sebagai kontrol negatif (NTC). *Well plate* ditutup menggunakan *optical adhesive film* dan dipastikan tertutup rapat untuk menghindari penguapan larutan master mix. Kemudian dimasukkan well kedalam mesin Real-Time PCR dengan pengaturan suhu dapat di lihat pada tabel 2.

Tabel 1. Komposisi pereaksi RT-qPCR yang digunakan.

Komponen reaksi	Volume reaksi (μ l)
4X Taqman PCR Master Mix	12,5
VNN RNA2 F (5'-CAA CTG ACA RCG AHC ACA C-3')	0,125
VNN RNA2 R (5'-CCC ACC AYT TGG CVA C-3')	0,125
VNN RNA2 Probe (5'-FAM-TYC ARG CRA CTC GTG GTG CVG-BHQI-3')	0,125
RNase-free water	7,25

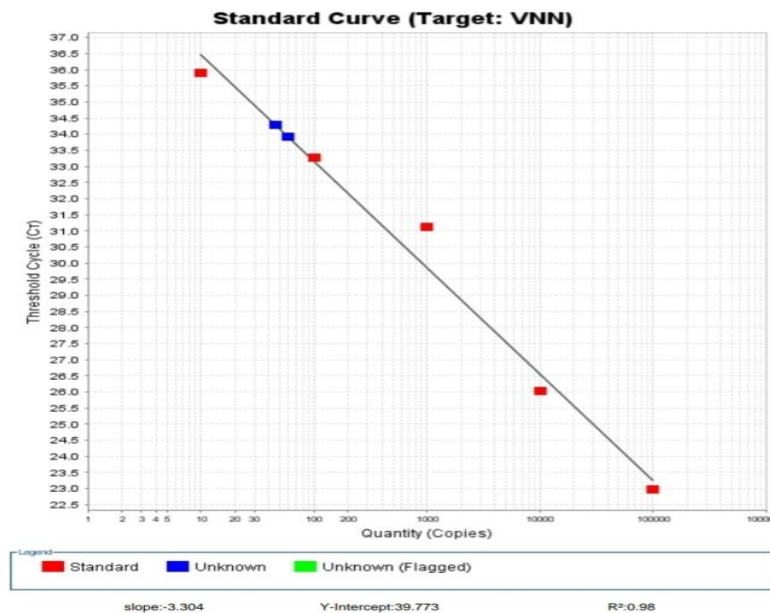
Tabel 2. Setting siklus PCR dalam mesin Real-Time PCR.

Proses	Suhu (°C)	Waktu
Reverse-transcriptase	48	10 menit
Hot start activation	95	10 menit
Denaturasi	95	15 detik
Anneling & ekstension	60	45 detik
Siklus PCR	40 Siklus	

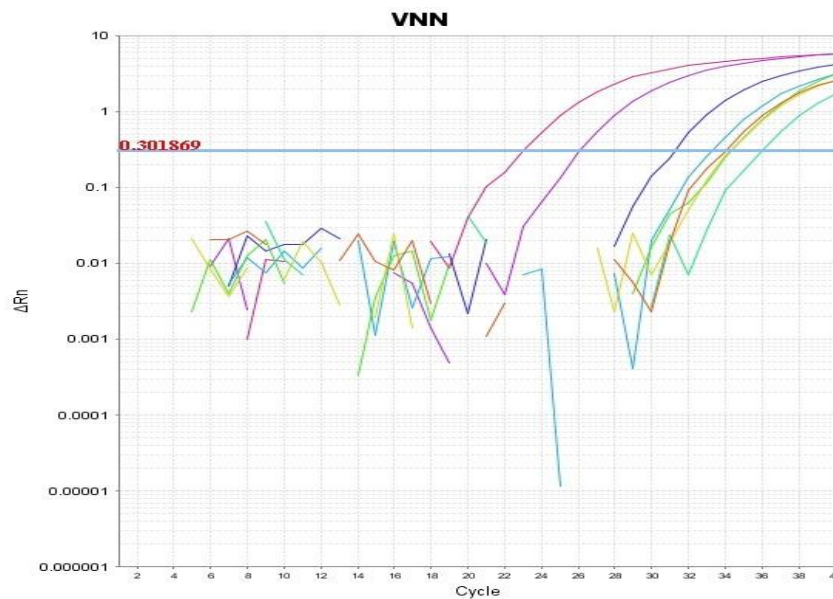
HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi virus VNN dengan RT-qPCR

Amplifikasi virus VNN dilakukan secara otomatis oleh perangkat lunak komputer dan ditunjukkan dalam bentuk kurva standar dan grafik amplifikasi. Kurva standar merupakan hubungan antara log konsentrasi dan garis *threshold cycle* (Ct) yang digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel. Titik-titik kurva standar pada gambar 1 menunjukkan bahwa tingkat pengenceran tersebut memiliki nilai Ct. Nilai Ct merupakan perpotongan garis *threshold* dengan kurva standar sampel uji. Kurva standar dari amplifikasi sampel ikan kakap putih dengan pengenceran 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 adalah sebagai berikut:

Gambar 1. Kurva standar sampel ikan kakap putih (*L. calcarifer* dengan pengenceran standar.

Adanya garis yang terlihat pada kurva standar menunjukkan kuantitas RNA virus yang diperoleh dan kualitas pengenceran yang dilakukan. Semakin rendah standar pengenceran pada kurva standar maka semakin akurat hasil yang didapatkan. Sebaliknya, semakin tinggi standar pengencerannya maka menghasilkan jumlah RNA virus yang tidak diharapkan. Hal ini disebabkan pengenceran yang telah dilakukan kurang optimal. Kurva standar pengenceran (gambar 1) terlihat bahwa garis *threshold* sampel ikan kakap putih sudah sesuai dengan kurva standar yaitu memiliki nilai slope $-3,304 > -3,10$ dan nilai $R^2 = 0,980$. Adapun menurut Tan *et al.*, (2020), kurva standar yang baik harus memiliki nilai slope sekitar $-3,58$ dan $-3,10$ serta nilai $R^2 > 0,980$. Hal ini menunjukkan bahwa nilai slope dan nilai R^2 sampel ikan kakap putih sudah memberikan hasil yang baik. Selain itu, didapatkan kuantitas dari RNA virus yang teramplifikasi dan masing-masing sampel memiliki perpotongan garis *threshold*. Hal ini menunjukkan bahwa adanya deteksi RNA VNN yang didapatkan dari sampel ikan kakap putih yang ditunjukkan pada gambar 2 di bawah ini.



Gambar 2. Kurva standar sampel ikan kakap putih (*L. calcarifer*) dengan amplifikasi RT- qPCR VNN.

Berdasarkan hasil amplifikasi dengan metode RT-qPCR, pengujian dikatakan positif apabila grafik amplifikasi ditandai dengan akumulasi signal *Fluoresen* dan melewati *base line threshold*, sebaliknya pengujian dikatakan negatif apabila grafik amplifikasi tidak melewati *base line threshold*. Berdasarkan hasil analisis data pada gambar 2, dapat diketahui bahwa grafik amplifikasi sampel ikan kakap putih tidak berhasil didiagnosa sebab kontrol negatif yang digunakan tidak valid atau melewati garis *threshold*. Menurut Mindhumalid (2018) kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui apakah saat pencampuran mix reagen kedalam sampel terdapat kontaminasi atau tidak. Kurva amplifikasi NTC sebagai kontrol negatif yang terkontaminasi akan melewati garis *threshold* sehingga hasil PCR tidak dapat digunakan. Hasil yang hampir sama ditunjukkan pada penelitian Zafar (2020) menunjukkan bahwa hasil pemeriksaan menggunakan metode PCR dapat diragukan karena adanya kemungkinan hasil positif palsu dan negatif palsu. Penyebab kontaminasi grafik amplifikasi (gambar 2) sampel di atas terjadi karena tidak menjalankan protokol sesuai alur pengerjaan pemeriksaan yang benar sehingga menyebabkan kemungkinan adanya hasil positif palsu (Damo *et al.*, 2021).

Selain itu, menurut Nandini *et al.*, (2020) pengujian menggunakan metode RT-qPCR dapat memberikan hasil yang salah dikarenakan adanya kesalahan teknis dan kontaminasi pada reagen. Sedangkan menurut Agustiniingsih *et al.*, (2020) penyebab kontrol negatif positif yaitu kontaminasi dari pipet dan reagen saat preparasi reagen, kontaminasi silang dari tube lainnya, kontaminasi yang berasal dari template atau ampikon pada alat kerja lab, dan adanya aerosol yang berasal dari pipipetan yang kurang baik. Menurut Annisa *et al.*, (2024) tingkat keberhasilan menggunakan metode RT-qPCR dipengaruhi oleh konsentrasi primer dan suhu *annealing* yang digunakan. Apabila konsentrasi primer yang digunakan rendah atau tinggi dapat menyebabkan sensibilitas reaksi sehingga menghasilkan hasil negatif palsu (Siswanto *et al.*, 2019). Selain itu, suhu yang digunakan pada tahap *annealing* harus optimal, karena suhu yang tidak sesuai dapat menyebabkan kegagalan dalam proses PCR. Suhu yang rendah menyebabkan adanya penempelan sekuen DNA yang tidak sesuai. Sebaliknya apabila suhu yang digunakan terlalu tinggi dapat menyebabkan primer tidak dapat menempel pada DNA target (Amanda, 2019).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa sampel ikan kakap putih (*lates calcarifer*) yang diamati tidak dapat didiagnosa terinfeksi VNN, dikarenakan mix reagen dari NTC (*No Template Control*) telah terkontaminasi sehingga menyebabkan kontrol negatif melewati *base line threshold*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada pihak Fakultas Ilmu dan Teknologi Hayati, Universitas Teknologi Sumbawa, dan Balai Perikanan Budidaya Laut (BPBL) Lombok yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini sehingga dapat terlaksanakan dengan baik.

REFERENSI

- Agustiningsih, A., Nugraha, A. A., Daryanto, D., Pawestri, H. A., Ikawati, H. D., Harianja, H., & Sugianto, S. (2020). Pedoman pemeriksaan PCR Sars-Cov-2 bagi petugas laboratorium.
- Amanda, K. (2019). Optimasi suhu aneling proses pcr amplifikasi gen shv bakteri *Escherichia coli* pasien ulkus diabetik. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran Untan*, 4, 10-16.
- Annisa, R. K., Lisdiana, L., & Widyayanti, A. T. (2024). Optimasi metode nested PCR untuk mendeteksi vibrio *Parahaemolyticus* AHPND pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Berkala Ilmiah Biologi*, 13, 1-13.
- Black, E. M., Lowings, J. P., Smith, J., Heaton, P. R., & Mcelhinney, L. M. (2020). A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using tagman technology. *Journal of Virological Methods*, 105, 25-35.
- Damo, N. Y., Porotu'o, J. P., Rambert, G. I., & Rares, F. E. S. (2021). Diagnostik Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) dengan pemeriksaan laboratorium mikrobiologi klinik. *Jurnal E-Biomedik*, 9, 77-86.
- Kusumanti, I., Iskandar, A., Sesaria, S., & Muslim, AB. (2022). Studi kelayakan usaha pembenihan ikan kakap putih di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo, Jawa Timur. *Ziraa'ah Majalah Ilmiah Pertanian*, 47, 195-206.
- Mindhumalid, T. (2018). *Identifikasi gen mecA pada methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (Doctoral dissertation, Universitas Muhammadiyah Semarang).
- Nandini, S., Jeremiah, S. S., & Ryo, A. (2020). Interpreting diagnostic test for SARS-nCoV-2. *JAMA*.
- Prihartini, N. C. (2016). Distribusi pathognomik virulensi VNN (*Viral Nervous Necrosis*) pada benih nila (*Oreochromis* sp). *Jurnal Ilmu Perikanan*, 7, 51-56.
- Sembiring, S. B. M., Gigih, S. W., Ketut, M., Zeny, W., & Haryanti. (2018). Prevalensi infeksi *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dan iridovirus pada hatcheri dan budidaya ikan laut. *Media Akuakultur*, 13, 83-90.
- Siswanto, Y. P., Merdekawati, F., Ernawati, E., Hardiana, A. T., & Kurniawan, E. (2019). Optimasi suhu *annealing* dan konsentrasi primer untuk deteksi *Brugia malayi* menggunakan Real-Time PCR. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*, 11, 314-321.
- Windarto, S., Hastuti, S., Subandiyono, Nugroho, R. A., & Sarjito. (2019). Performa pertumbuhan ikan kakap putih (*Lates calcarifer*) yang dibudidayakan dalam sistem Keramba Jaring Apung (KJA). *Jurnal Sains Akuakultur Tropis*, 3, 56-60.
- Yaqin, M. A., Santoso, L., & Saputra, S. (2018). Pengaruh pemberian pakan dengan kadar protein berbeda terhadap performa pertumbuhan ikan kakap putih (*Lates calcarifer*) di keramba jaring apung. *Sains Teknologi Akuakultur*, 2, 12-19.
- Zafar, H. The microbiology of coronaviruses. (2020). *Journal of Pakistan Medical Association*, 70, 46.