

<b>Full Paper</b>
-------------------

## KASUS INFEKSI VIRUS IRIDO PADA BENIH IKAN KERAPU PASIR, *Epinephelus Corallicola* DI HATCHERY

### IRIDO VIRUS INFECTION CASE ON SEED OF CORAL GROUPEL FISH, *Epinephelus corallicola* IN HATCHERY

Fris Johnny dan Des Roza

Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol PO BOX 140 – Singaraja 81101, Bali  
Penulis untuk korespondensi; E-mail: frisjravel@yahoo.com

#### Abstract

Seeding effort of coral grouper fish, *Epinephelus corallicola* in Research Institute for Mariculture Gondol, Bali has been blazed the way, but in rearing of seed still be found constraint as height of mortality. One of the causes that have been known was by virus infection disease. An attempt for diagnosis iridovirus infection at seed coral grouper fish has been done in Laboratory of Pathology RIM Gondol. Seed of coral grouper Fish sand age around 60 days shows symptom as no eating, populating in basin base, turns color to become darker and here in after death. Disease detection of the showing symptom seed that has not generated death was observed based on pathology anatomis and virus infection using PCR-probe. Disease detection also conducted to seed after showing symptom and generates high death. Detection based on pathology anatomis resulted in many "giant cells" from spleen organ. Disease detection based on PCR-probe of seed which has not died yields thin positive band of iridovirus, while observation of death seed high yields crystal clear positive band of iridovirus at 570 bp.

Keywords : *Epinephelus corallicola*, hatchery, iridovirus, seed of coral grouper

#### Pengantar

Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL) Gondol, Bali telah berhasil menemukan teknologi pembenihan dan pembesaran berbagai jenis kerapu, diantaranya kerapu bebek (*Epinephelus altivelis*), kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*), kerapu batik (*Epinephelus microdon*) dan kerapu sunu (*Plectropomus leopardus*). Ikan kerapu merupakan jenis ikan yang bernilai ekonomi tinggi karena diminati oleh konsumen sebagai ikan hias dan ikan konsumsi. Pasar ikan kerapu selain untuk pasar lokal juga untuk ekspor seperti ke Singapura, Hongkong, Taiwan, dan Cina. Saat ini BBRPBL Gondol telah merintis upaya pembenihan ikan kerapu pasir (*Epinephelus corallicola*). Ikan kerapu pasir dengan nama lain *Serranus altivelioides* atau *Serranus corallicola* termasuk kedalam famili *Serranidae*. Nama umum ikan ini adalah Coral grouper, Coral rockcod dan Coral rock-cod. Ikan kerapu pasir banyak ditemukan di perairan Western Pacific (Thailand, Hong Kong dan Taiwan), Western Australia, Philipina dan Indonesia. Ikan ini hidup di daerah karang sampai kedalaman 60 m, panjang total ikan dapat mencapai 49 cm. Selama ini, benih Ikan kerapu pasir masih dipasok dari alam dan usaha budidayanya baru dilaksanakan

di Indonesia belum lama ini. Ikan kerapu pasir selain diminati sebagai ikan hias dengan ukuran kecil dengan panjang antara 5 - 12 cm, diminati juga sebagai ikan konsumsi di pasar Asia dengan berat 600 – 1.300g. Harga ikan kerapu pasir cukup tinggi di pasar lokal terbukti pada pengumpul Denpasar dan Jakarta harga ikan ini sudah berkisar Rp. 95.000,00/kg, dan untuk pasar ekspor harganya pun lebih tinggi (Sugama *et al.*, 2008).

Upaya perintisan pembenihan ikan kerapu pasir di hatchery BBRPBL Gondol, masih menemukan banyak kendala, diantaranya masih tingginya angka kematian. Penyebab kematian benih ikan kerapu pasir di hatchery diantaranya adalah penyakit infeksi virus. Penyakit infeksi virus yang sering menimbulkan kematian masal pada benih ikan kerapu adalah dari jenis viral nervous necrosis (VNN) dan iridovirus (famili iridoviridae) (Koesharyani *et al.*, 2001).

Iridovirus merupakan DNA virus yang diklasifikasikan ke dalam famili iridoviridae, dan dengan mikroskop elektron virus ini terlihat berbentuk *hexagonal* atau *icosahedral* dengan diameter yang bervariasi yaitu berkisar 120-240 nm, serta berkembang pada sitoplasma sel-sel yang terinfeksi (Inouye *et al.*, 1992; Danayadol *et al.*, 1997; Chou *et al.*, 1998). Kasus infeksi Iridovirus pertama dilaporkan terjadi di Sumatera Utara oleh Rukyani *et*

*al.* (1993) dan menyerang ikan kerapu lumpur (Owens, 1993). Pada tahun 2001, BBRPL Gondol melaporkan bahwa benih kerapu lumpur asal Lamongan Jatim juga telah terinfeksi (Mahardika *et al.*, 2002). Ikan yang terinfeksi menunjukkan gejala klinis berenang lemah atau diam di dasar air, kadang-kadang seperti tidur, sehingga penyakit ini disebut juga penyakit tidur. Secara histopatologi ditemukan sel-sel yang membesar (*giant cell*) yang merupakan ciri khas infeksi iridovirus pada jaringan haematopoietik dan saluran pencernaan (Danayadol *et al.*, 1997; Mahardika *et al.*, 2001). Infeksi iridovirus pada ikan kerapu dapat dideteksi secara cepat dengan metoda PCR (*Polymerase chain reaction*) (Kurita *et al.*, 1998; Koesharyani *et al.*, 2001). Virus ini juga terbukti sangat mudah menular dengan menggunakan air sebagai media penularannya. Oleh karena itu, ikan yang terserang harus segera dipindahkan dan dipisahkan dari ikan yang sehat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui infeksi iridovirus pada benih ikan kerapu pasir melalui pengamatan gejala klinis, perubahan patologi anatomis dan deteksi dengan *polymerase chain reaction* (PCR).

## Bahan dan Metode

### *Ikan uji*

Ikan uji yang digunakan adalah benih ikan kerapu pasir yang berumur 50-60 hari dengan ukuran 3-4 cm. Ikan dipelihara dalam bak beton volume 4 m<sup>3</sup> dengan sistem air mengalir dan diaerasi. Benih yang mengalami infeksi penyakit memperlihatkan gejala klinis tidak mau makan, berdiam di dasar bak seperti tidur, warna tubuh menjadi lebih gelap, dan pada tingkat parah mengalami kematian yang cukup tinggi. Sampel benih sakit diambil dari benih yang memperlihatkan gejala klinis dan yang telah mengalami kematian.

### *Pengambilan sampel uji*

Dari sampel ikan yang masih hidup dikoleksi limpa dan dilakukan pembuatan preparat usap pada gelas preparat dan dilanjutkan dengan pewarnaan Giemsa 3%. Pengamatan histopatologi dilakukan menggunakan mikroskop terhadap ikan yang setengah mati dan mati. Organ limpa dikoleksi dan disimpan dalam larutan alkohol 70%, selanjutnya dilakukan deteksi virus dengan menggunakan metoda PCR.

### *Pewarnaan preparat usap organ limpa*

Organ limpa yang telah dipotong diusapkan pada gelas preparat beberapa kali, dikeringanginkan dan diamkan beberapa menit. Selanjutnya diwarnai

dengan Giemsa 3% (Giemsa 3 ml + 97 ml air PDAM) selama 45 – 60 menit. Pereaksi Giemsa terdiri dari tiga bahan kimia, yaitu: metil biru, eosin dan azul. Metil biru mewarnai nukleus dengan warna biru, eosin mewarnai sitoplasma dengan warna merah muda dan granula pada leukosit diwarnai oleh azul. Kemudian preparat dicuci dengan aquades, dikeringkan dan diamati dengan menggunakan mikroskop.

### *Deteksi iridovirus dengan metoda PCR*

Organ yang digunakan untuk mendeteksi iridovirus adalah organ limpa sebanyak 50-100 mg organ. Organ ditempatkan dalam mikrotube dan ditambahkan bahan lisis trizol. *Primers* yang digunakan adalah sekuen genom DNA Red Seabream iridovirus (RSIV), dengan susunan *primer forward* 1F: '5-CTCAAACACTCTGGCTCATC-'3 dan *reverse primer* 1R: '5-GCACCAACACATCTCCTATC-'3. DNA target berukuran 570 bp (Kurita *et al.*, 1998). Amplifikasi dilakukan dengan mencampur beberapa reagen dari DNA-kit dan templet DNA iridovirus sampel. Campuran tersebut kemudian diinkubasikan pada alat Progene (Techne) dengan kit Promega dengan suhu denaturasi 94°C selama 30 detik, suhu *annealing* 57°C selama 60 detik dan suhu *extension*/polimerisasi 72°C selama 60 detik. Siklus ini berlangsung 30 kali, yang kemudian dilanjutkan dengan *extension* suhu 72°C selama 5 menit (Kurita *et al.*, 1998). Analisa hasil amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis pada 1,5% Agarose gel dengan kekuatan 100V selama 20-25 menit dalam 1xTAE Buffer. Marker yang digunakan adalah  $\lambda$  Hind III (125-23130 bp). Hasil amplifikasi diwarnai menggunakan Ethidium Bromide 0,5mg/ml dalam 1xTAE Buffer. Interpretasi untuk menentukan ada atau tidaknya infeksi oleh iridovirus dilakukan dengan Ultraviolet Transluminator dan hasilnya didokumentasikan menggunakan kamera polaroid.

## Hasil dan Pembahasan

Benih ikan kerapu pasir yang terinfeksi memperlihatkan gejala klinis berupa nafsu makan menurun, lemah, berdiam di dasar bak seperti tidur dan warna tubuh lebih gelap, kemudian ikan-ikan tersebut akan mati. Angka kematian akibat infeksi ini mencapai 70%.

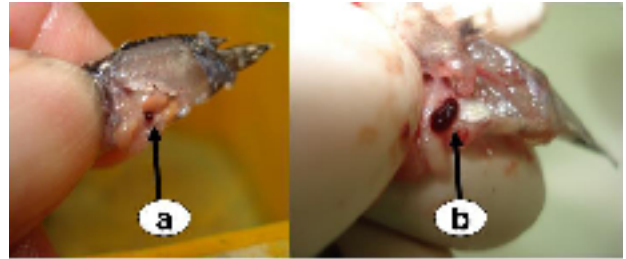
Setelah dilakukan pembedahan benih ikan kerapu pasir yang terinfeksi, dilakukan pengamatan patologi anatomis. Hasil pengamatan memperlihatkan terjadinya pembengkakan pada organ limpa. Organ limpa secara normal dapat dilihat pada Gambar 1a, sedangkan organ limpa kerapu yang terinfeksi tampak membengkak seperti yang dapat dilihat pada Gambar 1b. Organ limpa

normal dan yang mengalami pembengkakan dipotong, diusapkan pada preparat gelas, selanjutnya diwarnai dengan Giemsa. Pengamatan patologi anatomis organ limpa ini menunjukkan banyaknya sel-sel raksasa (*giant cell*) seperti terlihat pada Gambar 2b. Sel-sel raksasa yang dikenal sebagai leukosit merupakan salah satu sel darah yang mempunyai peran sangat penting dalam sistem kekebalan tubuh ikan. Leukosit sangat berbeda dari eritrosit karena memiliki kemampuan bergerak bebas. Leukosit mampu keluar dari pembuluh darah menuju jaringan. Jumlah seluruh leukosit jauh di bawah eritrosit dan jumlahnya bervariasi berdasarkan jenis hewannya. Jumlah leukosit yang menyimpang dari keadaan normal mempunyai arti klinik penting dalam mengevaluasi gangguan kesehatan. Jumlah leukosit akan meningkat secara pesat dalam waktu yang singkat apabila terjadi suatu penyakit infeksi (Manning & Tatner, 1985; Iwama & Nakanishi, 1996; Dhamawan, 2002).

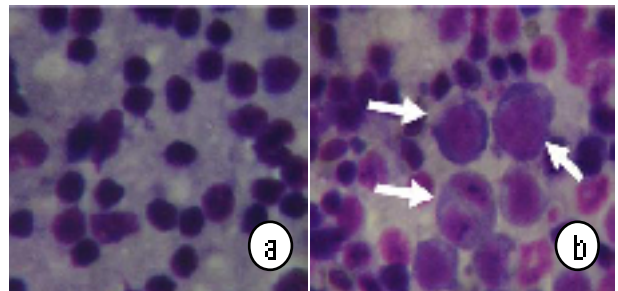
Hasil pengamatan histopatologis terhadap organ limpa menunjukkan adanya sel-sel yang nekrosis dan yang membesar, terutama pada jaringan pembentuk darah (*haematopoietic tissue*) yang mengindikasikan bahwa organ tersebut merupakan organ target dari infeksi iridovirus (Danayadol *et al.*, 1997). Gejala klinis yang terlihat pada benih ikan kerapu pasir ini juga sama dengan yang dilaporkan pada ikan kakap merah (*Pagrus major*) (Inouye *et al.*, 1992; Nakajima & Sorimachi, 1994; Nakajima *et al.*, 1997), ikan kerapu (*Epinephelus malabaricus*) (Danayadol *et al.*, 1997; Kasornchandra & Khongpradit, 1997), *Epinephelus* sp. (Owen, 1993), kerapu lumpur dan *Epinephelus bleekeri* (Mahardika *et al.*, 2002).

Deteksi iridovirus dengan metoda PCR menggunakan primer spesifik RSIV menunjukkan bahwa benih ikan kerapu pasir terbukti terinfeksi iridovirus. Hal ini terlihat dari gambaran hasil elektroforesis yaitu menunjukkan adanya garis (*band*) (570 bp) pada gel agarose (Gambar 3). Infeksi iridovirus diketahui sebagai suatu penyakit yang mematikan pada budidaya ikan kerapu di keramba jaring apung. Kerugian ekonomi yang disebabkan oleh penyakit ini sangat tinggi, karena virus ini menginfeksi pada stadia larva sampai ukuran siap jual. Penyakit ini ditemukan pertama kali di Indonesia pada ikan kerapu lumpur pada jaring tancap di Sumatera Utara pada tahun 2000 dengan kematian lebih dari 80%. Selanjutnya infeksi virus ini juga ditemukan di hatchery BBRPBL Gondol pada ikan kerapu lumpur, kerapu *duskytail* (*Epinephelus bleekery*), kerapu macan, dan kerapu bebek (Koesharyani *et al.*, 2001; Mahardika *et al.*, 2002 & 2004b; Zafran *et al.*, 2002; Johnny *et al.*,

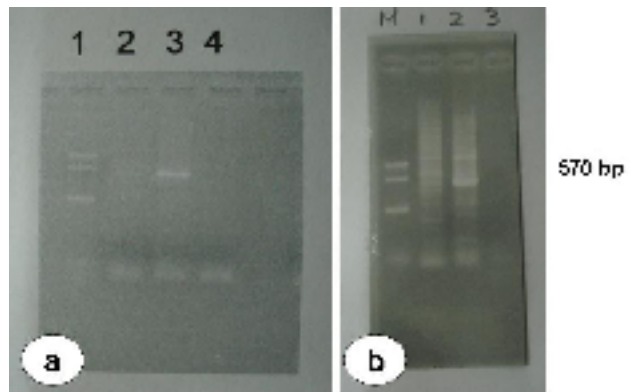
2004; Johnny & Roza, 2005; Johnny *et al.*, 2005a; Johnny *et al.*, 2005 b).



Gambar 1. Organ limpa benih ikan kerapu pasir yang normal (a) dan terinfeksi (b).



Gambar 2. Pewarnaan *Giemsa* organ limpa yang normal (a) dan organ limpa yang bengkak (b) dan banyaknya ditemukan "*giant cells*" pada organ limpa yang bengkak (tanda panah).



Gambar 3. Hasil de teksi PCR dari benih ikan kerapu pasir yang terinfeksi iridovirus (pada Gambar 4a, no. 1 adalah Marker, no. 2 adalah sampel yang dideteksi, no. 3 kontrol positif dan no. 4 kontrol negatif; pada gambar 4b, M adalah marker, no. 1 sampel yang dideteksi, no. 2 kontrol positif dan no. 3 kontrol negatif)

Dari hasil uji kerentanan ikan kerapu lumpur dan kerapu batik terhadap infeksi iridovirus, dilaporkan bahwa kedua ikan kerapu tersebut apabila diinfeksi dengan iridovirus pada pengenceran 10.000 kali masih menimbulkan kematian yang tinggi (Mahardika *et al.*, 2004a). Pada

laporan lainnya dinyatakan bahwa iridovirus dapat menginfeksi ikan kerapu macan pada semua tingkatan umur atau stadia (Mahardika *et al.*, 2004b).

Upaya pengendalian penyakit infeksi Iridovirus tidak ada yang efektif, baik pengendalian dengan antibiotik maupun dengan bahan-bahan anti virus lainnya. Tindakan pencegahan penyakit infeksi iridovirus ini di BBRPBL Gondol telah diupayakan, diantaranya penggunaan imunostimulan bakterin dengan cara penyuntikan intraperitoneal pada benih ikan kerapu lumpur dosis 0,1 mL dengan kepadatan  $10^7$  cfu/mL. Upaya ini mampu meningkatkan sintasan benih terhadap infeksi Iridovirus (Johnny *et al.*, 2005b). Pemberian vaksin pada juvenil ikan kerapu lumpur dengan cara perendaman mampu meningkatkan imunitas dan sintasan benih terhadap infeksi Iridovirus (Johnny & Roza, 2005). Sedangkan penambahan vitamin C dan imunostimulan dalam pakan dapat meningkatkan sintasan dan respon imun non-spesifik benih ikan kerapu lumpur (Johnny *et al.*, 2005<sup>a</sup>). Ikan kerapu lumpur juga dilaporkan rentan terhadap infeksi Iridovirus. Paparan hemositologi menunjukkan nilai hematokrit yang rendah sekitar 25%. Gambaran hemositologi ini juga ditunjukkan dengan anemia yang berat dilihat dari warna insang yang pucat (Koesharyani *et al.*, 2001).

### Kesimpulan

Berdasarkan pengamatan gejala klinis, perubahan anatomi patologis dan deteksi virus dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) terhadap benih ikan kerapu pasir (*Epinephelus corallicola*) diketahui positif terinfeksi iridovirus sejak stadia larva dengan tingkat kematian hingga 70%.

### Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada saudara Katimin sebagai Teknisi Larva Rearing, saudara Slamet Haryanto dan Ansori sebagai Teknisi Laboratorium Patologi atas bantuannya sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

### Daftar Pustaka

Chou, H.Y., C.C. Hsu & T.Y. Peng. 1998. Isolation and characterization of pathogenic iridovirus from cultured grouper, *Epinephelus* sp. in Taiwan. *Fish Pathology*. 33:201-206.

Danayadol, Y., S. Direkbusarakom, S. Boonyaratpalin, T. Miyazaki & M. Miyata. 1997. Iridovirus infection in

brown-spotted grouper, *Epinephelus malabaricus* cultured in Thailand. In T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds) *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section. Asian Fisheries Society. Manila. P. 67-72.

Dharmawan, N.S. 2002. Pengantar Patologi Klinik Veteriner. Pelawa Sari Denpasar. 111 pp.

Inouye, K., K. Yamano, Y. Maeno, K. Nakajima, M. Matsuoka, Y. Wada & M. Sorimachi. 1992. Iridovirus infection on cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology*. 27:19-27.

Johnny, F., D. Roza, K. Mahardika, Zafran & A. Prijono. 2004. Peningkatan kekebalan benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* terhadap infeksi iridovirus melalui manajemen lingkungan, penggunaan imunostimulan dan vaksin. Laporan hasil penelitian BBRPBL (unpublish). 14 halaman.

Johnny, F. & D. Roza. 2005. Respon juvenil ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* terhadap vaksin virus irido melalui perendaman. Prosiding Seminar Nasional dan Kongres Biologi XIII Yogyakarta. Hal. 389-393.

Johnny, F., D. Roza, Zafran & A. Prijono. 005<sup>a</sup>. Aplikasi vitamin C dan imunostimulan pada produksi benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* untuk meningkatkan sistim kebal ikan terhadap infeksi virus irido. Laporan Hasil Riset T.A. 2005

Johnny, F., D. Roza, K. Mahardika, Zafran & A. Prijono. 2005<sup>b</sup>. Penggunaan Imunostimulan Untuk Meningkatkan Kekebalan Non-Spesifik Benih Ikan Kerapu Lumpur, *Epinephelus coioides* Terhadap Infeksi Virus Irido. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Vol. 11(5):75-84.

Kasornchandra, J. & R. Khongpradit. 1997. Isolation and preliminary characterization of a pathogenic iridovirus in nursing grouper, *Epinephelus malabaricus*. In T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds) *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section. Asian Fisheries Society. Manila. P. 61-66..

Kurita, J., K. Nakajima, I., Hirono & T. Aoki. 1998. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathology*. 33:17-23.

Koesharyani, I., K. Mahardika, K. Sugama & K. Yuasa. 2001. Iridovirus penyebab kematian pada budidaya ikan kerapu lumpur, *Epinephelus*

- coioides*: Deteksi menggunakan polymerase chain reaction (PCR). Kumpulan makalah teknologi budidaya laut dan pengembangan sea farming di Indonesia. Dep. Kelautan dan Perikanan RI bekerjasama dengan JICA. Hal. 228-234.
- Mahardika, K., Zafran, D. Roza, F. Johnny & A. Prijono. 2002. Studi pendahuluan penggunaan vaksin iridovirus (inaktif vaksin) pada juvenil kerapu lumpur, *Epinephelus coioides*. Laporan Hasil Penelitian DIP 2002 Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol. Hal. 195-202.
- Mahardika, K., Zafran, F. Johnny & D. Roza. 2004<sup>a</sup>. Tingkat kerentanan ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* dalam berbagai umur terhadap infeksi iridovirus. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. Vol. 10(1):47-53.
- Mahardika, K., Zafran, D. Roza & F. Johnny. 2004<sup>b</sup>. Uji kerentanan ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* dan kerapu batik, *Epinephelus microdon* terhadap infeksi iridovirus. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. Vol. 10(2):83-88.
- Nakajima, K. & M. Sorimachi. 1994. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. Fish Pathology. 29:29-33.
- Nakajima, K., Y. Maeno, J. Kurita & Y. Inoui, 1997. Vaccination against red sea bream iridoviral disease in red sea bream. Fish Pathology, 32 (4), 205–209.
- Owen, L., 1993. Report & sleepy grouper disease. Depart. of Biomedical and Tropical Veterinary Science. James Cook University of North Queensland Townsville. Australia. 481 p.
- Rukyani, A., P. Taufik & A. Yuliansyah. 1993. Laporan survey kasus kematian ikan kerapu di daerah Sumatera Utara. 12 p.
- Sugama, K., I.N.A. Giri & I. Koesharyani. 2008. Research and development on mass production of grouper seeds in Indonesia. Kumpulan Abstrak World Aquaculture 2008 di Busan, Korea, 19-23 Mei 2008: 688.
- Zafran, K. Mahardika, D. Roza, F. Johnny & A. Priono. 2002. Patogenisitas iridovirus yang diisolasi dari kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* terhadap ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*, kerapu batik, *Epinephelus microdon*, kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* dan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus*. Laporan hasil Penelitian Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol-Bali TA. 2002.