

**Studi Imunositokimia Darah dan Suspensi Organ Kerapu Macan
(*Epinephelus fuscoguttatus*) yang Diinfeksi Virus Isolat
Lapang Penyebab *Viral Nervous Necrosis***

Immunocytochemical Study on Blood and Organ Suspension of Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) Infected with Field Isolate of Viral Nervous Necrosis

Artanti Tri Lestari¹, Putu Eka Sudaryatma¹

¹Laboratorium Uji Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan kelas I Denpasar
Email : putuekasudaryatma@yahoo.com

Abstract

One potential marine cultures that have been developed and started to show the international market is grouper. Grouper culture can not be separated from factors that can affect disease and cultivation. One of the diseases that has been reported by researchers is viral nervous necrosis (VNN) causing mass mortality in fish, especially grouper larvae and juvenile stadia. Laboratory of Balai KIPM kelas I Denpasar develop rapid diagnostic techniques, precise and accurate test using immunocytochemistry of blood and organs as one of the initial inspection. Tiger grouper sized 150-300 g as much as 50 and acclimatized, then 10 fishes used as controls, 40 fishes were injected with inoculum VNN 10^{1.5} reared without water replacement cycle for ten days. Clinical observation and organ sampling performed 12 hours post-infection and consecutive every 12 hours. Blood samples and organs were collected for immunocytochemical (streptavidin-biotin) and a confirmatory test using RT - PCR using kit IQ -2000 VNN. Immunocytochemistry and RT-PCR showed positive results against VNN blood smears and suspensions organs of grouper fish with 24 hours post-infection . Based on the test results, the immunocytochemistry test on the blood and organ suspensions can be used as a detection technique VNN which is rapid, precise and accurate.

Key words: immunochemical, tiger grouper, blood, organs, VNN.

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 telah dilaporkan oleh peneliti adalah *viral nervous necrosis* (VNN) yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu, terutama pada stadia larva dan *juvenile*. Laboratorium Balai KIPM kelas I Denpasar mengembangkan teknik diagnosa yang cepat, tepat dan akurat dengan menggunakan uji imunositokimia pada preparat apus darah dan organ sebagai salah satu metode pemeriksaan awal VNN. Kerapu macan berukuran 150g - 300 g sebanyak 50 ekor diaklimatisasi, sepuluh ekor kerapu sebagai kontrol, 40 ekor diinjeksi dengan inokulum VNN konsentrasi 10^{1.5} yang dipelihara tanpa siklus pergantian air selama sepuluh hari. Pengamatan gejala klinis dan pengambilan sampel organ dilakukan 12 jam pasca infeksi dan berturut-turut setiap 12 jam, pengambilan sampel darah dan organ digunakan untuk pemeriksaan imunositokimia (*streptavidin-biotin*) dan uji konfirmasi digunakan pemeriksaan RT-PCR *kit IQ-2000* VNN. Uji imunositokimia dan RT-PCR menunjukkan hasil positif VNN terhadap preparat apus darah dan suspensi organ kerapu macan 24 jam pasca infeksi. Berdasarkan hasil uji tersebut, penggunaan uji imunositokimia pada preparat apus darah dan suspensi organ dapat digunakan sebagai teknik deteksi VNN yang cepat, tepat dan akurat.

Kata kunci : imunokimia, kerapu macan, darah, organ, VNN.

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 baik daerah tropis maupun subtropis (Antoro 2004). Budidaya kerapu macan tidak lepas dari faktor penyakit yang dapat menyerang dan menggagalkan hasil budidaya. Salah satu penyakit yang telah dilaporkan oleh peneliti adalah *viral nervous necrosis* (VNN) yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu terutama pada stadia larva dan juvenil (Sunaryanto 2001). Penyakit budidaya dapat menyebar melalui banyak perantara seperti air, media pembawa penyakit (produk hasil perikanan) dan pakan pada budidaya. Penyebaran penyakit dapat dicegah dengan mendeteksi media pembawa penyakit yang dilihat dari gejala klinis dan uji Laboratorium. Keberadaan infeksi penyakit dapat dilihat dari antigen yang terdapat pada darah atau organ target yang dituju.

Virus ini dapat ditularkan melalui air dari ikan yang terinfeksi ke ikan yang sehat dalam waktu 4 hari kontak. *Nodaviruses* juga dapat terdeteksi pada ikan tanpa tanda-tanda penyakit klinis. Dengan demikian, induk kerapu dapat menjadi sumber virus untuk larvanya (Roza dkk., 2003). Gejala klinis ikan kerapu yang terinfeksi VNN tampak berputar-putar dan perilaku berenang horizontal dan inflasi gelembung renang. *Viral nervous necrosis* menyerang otak sehingga menyebabkan ikan berenang berputar, mengambang di permukaan dengan perut menghadap ke atas dan pigmentasi

yang lebih pekat pada warna ikan. Gambaran histopatologis terlihat banyak ruang-ruang kosong pada otak, mata dan sumsum tulang belakang, hemoragi di hati dan limpa, infiltrasi sel radang, terutama mononukleus (Gilda 2009).

Untuk mencegah penyebaran penyakit VNN pada kerapu yang dilalulintaskan, maka 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. Menurut OIE (2006) deteksi VNN yang disarankan adalah dengan menggunakan tehnik RT - PCR , I F A T , E L I S A dan imunohistokimia/imunositokimia. Oleh karena itu Laboratorium Uji Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan kelas I Denpasar mengembangkan teknik diagnosa yang cepat, tepat dan akurat dengan menggunakan uji imunositokimia pada preparat apus darah dan organ sebagai sebagai salah satu metode pemeriksaan awal VNN.

Materi dan Metode

Bahan yang digunakan dalam uji coba, yaitu kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dengan ukuran berat 150 - 300 g sejumlah 50 ekor; pakan ikan kerapu. Untuk bahan imunokimia digunakan akuades, *phospate buffer saline* (PBS), metanol absolut, *streptavidin-biotin kit*, antibodi poliklonal VNN, pewarna hematoksilin dan entelen. Bahan pemeriksaan RT -PCR VNN menggunakan *kit IQ-2000*, *chloroform*, isopronol, alkohol 75%

dan 95%, bahan amplifikasi, *nuclease free water*, agarose, TAE *buffer*, *ethidium bromide*, *distilled water*, kertas *gel doc print*.

Alat yang digunakan adalah bak ikan, ember, seser, termometer, refraktometer, sarung tangan, masker, papan bedah, mortar, *dissecting set*, *glassware*, mikropipet, *microtube* 0,2 dan 1,5 ml, *microtip*, *sput* ukuran 1-5 ml, *object glass*, *cover glass*, pipet, *analytical balance*, *hot plate*, *vortex mixer*, *thermal blok*, *patsel* dan *glass ware*, rak *microtube*, *deep freezer*, *freezer*, *thermalcycler*, elektroforesis dan UV *Trans-illuminator*.

Koleksi inokulum isolat lapang penyebab VNN yang dimiliki oleh Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan kelas I Denpasar memiliki konsentrasi $9,25 \times 10^2$ $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi partikel VNN kemudian diencerkan menjadi $10^{1.5}$ $\mu\text{g/ml}$ dan disuntikkan 100 μl setiap ikan. Menurut Kokawa *et al.* (2008), LD_{50} homogen otak mengandung $10^{1.5}$ $\text{LD}_{50}/100 \mu\text{l}$.

Kerapu macan berat 150-300 g diaklimatisasi selama lima hari untuk mengetahui status kesehatan kerapu macan. Sepuluh ekor kerapu yang digunakan sebagai kontrol memiliki hasil negatif VNN dengan uji RT-PCR, dan imunokimia. Kemudian, 40 ekor kerapu macan di injeksi dengan inokulum VNN sebanyak 100 μl dengan konsentrasi $10^{1.5}$ pada setiap ikan dengan diawali pengusapan kapas beralkohol 70% pada permukaan ikan sebelum dan sesudah diinjeksi. Pemeliharaan ikan yang diinjeksi inokulum virus penyebab VNN dilakukan pada empat bak yang berbeda tanpa

siklus pergantian air selama sepuluh hari. Pengamatan gejala klinis ikan dan pengambilan sampel organ dilakukan 12 jam pasca infeksi dan berturut-turut setiap 12 jam berikutnya. Ikan yang menunjukkan gejala klinis virus penyebab VNN dan atau kondisi sekarat langsung dilakukan pengamatan makroskopis dan pengambilan sampel darah dan organ (mata, otak, hati, jantung, insang, limpa dan ginjal) untuk dilakukan pemeriksaan imunositokimia dan uji konfirmasi menggunakan pemeriksa RT-PCR. Sampel organ ikan digerus sampai halus dengan mortar steril dan dihomogenkan.

Darah dan suspensi organ yang didapat dan telah dihomogenkan, selanjutnya di-apus tipis pada permukaan *object glass* dan dibiarkan mengering. Sediaan yang sudah mengering kemudian difiksasi dengan metanol selama 10 menit, kemudian dilakukan pewarnaan imunositokimia *streptavidin biotin* dengan tahapan seperti yang tercantum pada petunjuk cara pewarnaannya pada perangkat diagnosis *streptavidin biotin*. Setelah selesai tahap pewarnaan preparat ditetesi dengan bahan perekat yang larut air, ditutup dengan *cover glass* dan diamati dibawah mikroskop cahaya. Hasil positif preparat darah dan organ setelah diwarnai *streptavidin biotin* apabila ditemukan virus VNN berwarna coklat keemasan pada sel darah dan atau suspensi organ. Darah dan suspensi organ yang dihomogenkan diambil masing-masing sebanyak 15 μl untuk dilakukan uji konfirmasi sesuai dengan instruksi *kit IQ-2000* pemeriksaan VNN. Analisis hasil dilakukan secara deskriptif dengan membandingkan hasil pengamatan gejala klinis,

pengujian imunositokimia darah dan organ, serta uji konfirmasi dengan RT-PCR.

Hasil dan Pembahasan

Kerapu macan yang dipelihara

menunjukkan perubahan gejala klinis dan warna tubuh setelah diinfeksi VNN. Gejala klinis ikan juga mengalami perubahan selama pemeliharaan. Perubahan gejala klinis dan lesi patologi anatomi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengamatan gejala klinis dan lesi patologis anatomis ikan pasca injeksi

Waktu (pasca injeksi)	Gejala klinis	Lesi patologi anatomi
12 jam	Berenang normal, gesit, menggerombol di dasar bak	insang geripis, tubuh menggelap.
24 jam	Sudah ada ikan yang berenang di permukaan, berenang miring tapi masih gesit dan warna tubuh menggelap	Sirip ekor geripis, mulut bawah luka, insang pucat, hati merah kuning, perut kembung, limpa bengkak.
36 jam	Ada ikan berenang di permukaan, berenang miring tapi masih gesit dan warna tubuh menggelap	Sirip ekor geripis, mulut bawah luka, tubuh menggelap, limpa bengkak dan bercak-bercak merah, hati menguning.
48 jam	Ikan berenang di permukaan, berenang vertikal, kurang gesit, warna tubuh ada menggelap	Luka di mulut, merah di sirip dada, sirip ekor geripis, limpa bengkak dan bercak-bercak merah, hati menguning.
57 jam	Ikan sekarat, tidak ada refleks dan sudah ada ikan mati	Sirip ekor geripis, mulut luka, hati rapuh dan kuning, limpa bengkak dan ginjal bengkak.

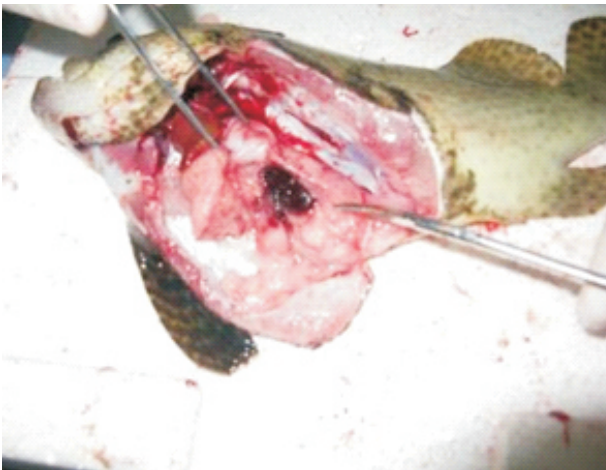
Gejala klinis kerapu macan yang diinjeksi maupun yang tidak diinjeksi VNN pada awal pengamatan sampai 12 jam menunjukkan gerakan renang yang masih normal dan gesit. Ikan banyak menggerombol di dasar bak yang masih menunjukkan gejala yang normal karena pada umumnya, kerapu menggerombol dan diam di dasar bak. Waktu pengamatan 24-36 jam kemudian setelah diinjeksi, kerapu macan menunjukkan gerakan berenang di permukaan dan warna tubuh yang mulai menggelap (Gambar 1), dan bila diberi gerak reflek, ikan masih memberikan perlawanan yang gesit. Hati terlihat

berwarna coklat kekuningan dan limpa membengkak (Gambar 2).

Gerakan renang ikan mulai menurun setelah 48 jam kemudian, ikan banyak berenang di permukaan dan berenang vertikal, ini menunjukkan bahwa ikan sudah mulai kehilangan keseimbangan. Warna ikan menjadi menggelap atau pucat menunjukkan bahwa ikan mengalami stres. Ikan yang terinfeksi virus penyebab VNN akan mengalami perubahan gerakan berenang dan warna tubuh yang menggelap dan berenang berputar di permukaan (Yoshikoshi and Inoue, 1990).



Gambar 1. Kerapu macan yang berwarna lebih gelap.



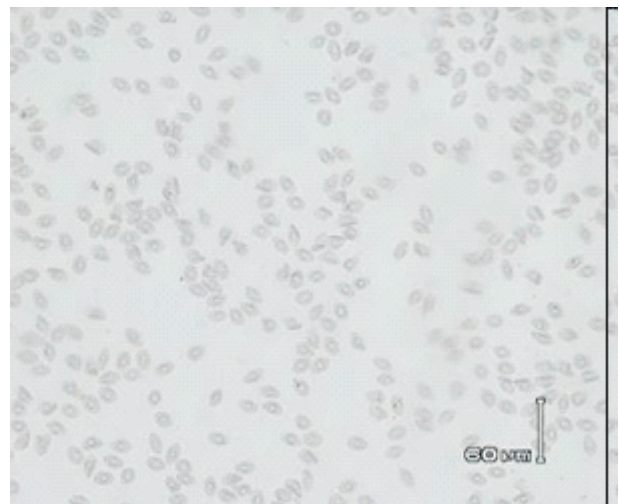
Gambar 2. Hati berwarna coklat kekuningan dan limpa bengkak.

Ikan mulai berenang tidak beraturan dan terjadi penurunan gerak reflek, serta ikan mulai sekarat setelah 57 jam pengamatan. Banyak ikan yang mati setelah 57 jam pengamatan. Infeksi VNN telah menyerang seluruh ikan dan menyebabkan kematian yang mendadak dan massal. Keadaan ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Gilda *et al.* (2009),

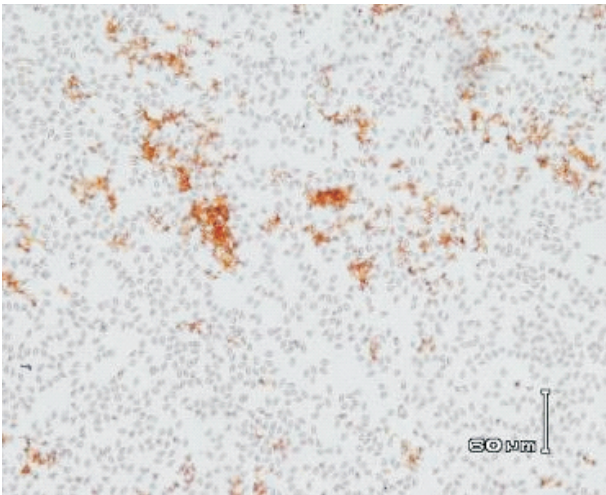
bahwa kerapu yang diinfeksi VNN akan mati setelah 50-80 jam pasca inokulasi. Penularan VNN dari ikan yang sakit membutuhkan waktu 4 hari pada infeksi alami yang dikohabitasi dalam kolam (Nguyen *et al.*, 1996).

Gejala klinis pada fisik ikan dan organ dalam kerapu macan menunjukkan bahwa ikan banyak mengalami luka pada mulut dan sirip yang geripis, perubahan gerakan renang tampak sangat jelas dengan adanya luka di bagian bawah mulut, keadaan ini menandakan bahwa ikan mulai kehilangan keseimbangan dalam berenang sehingga seringkali terlihat menabrakkan diri ke dinding dan/atau dasar kolam. Organ hati menunjukkan warna kuning, limpa dan ginjal yang membengkak. Perubahan jaringan ini mungkin disebabkan oleh infeksi virus VNN (Grotmol *et al.*, 1997; Grotmol *et al.*, 1999).

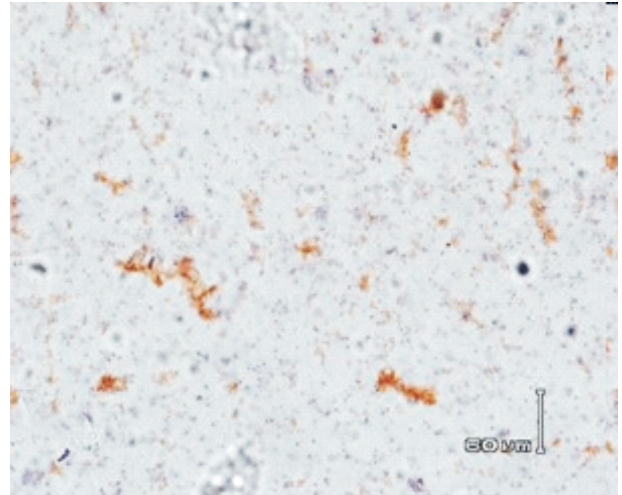
Hasil pengamatan imunositokimia pada apus darah kerapu macan yg diinjeksi inokulum VNN dan kerapu macan yang tertular VNN dengan kohabitasi seperti pada Gambar 3-7.



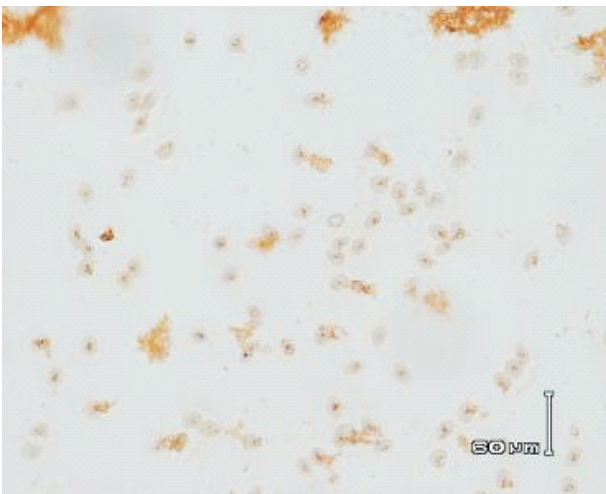
Gambar 3. Imunositokimia *streptavidin biotin* pada sediaan apus darah kerapu macan kontrol (tidak diinjeksi virus penyebab VNN).



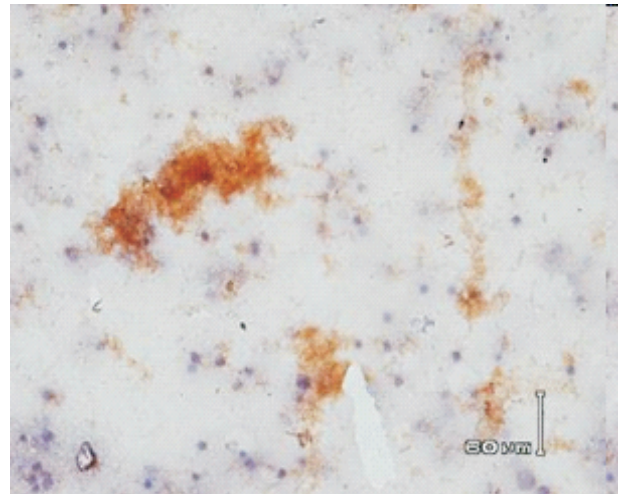
Gambar 4. Imunositokimia *streptavidin biotin* pada sediaan apus darah kerapu macan 24 jam pasca diinfeksi virus penyebab VNN. Virus VNN terlihat berwarna coklat kemerahan.



Gambar 6. Imunositokimia *streptavidin biotin* pada sediaan apus suspensi organ kerapu macan 24 jam pasca diinfeksi virus penyebab VNN. Positif berwarna coklat kemerahan.



Gambar 5. Imunositokimia *streptavidin biotin* pada sediaan apus darah kerapu macan 48 jam pasca diinfeksi virus penyebab VNN. Virus VNN terlihat berwarna coklat kemerahan terdapat pada inti sel dan sitoplasma sel darah merah.

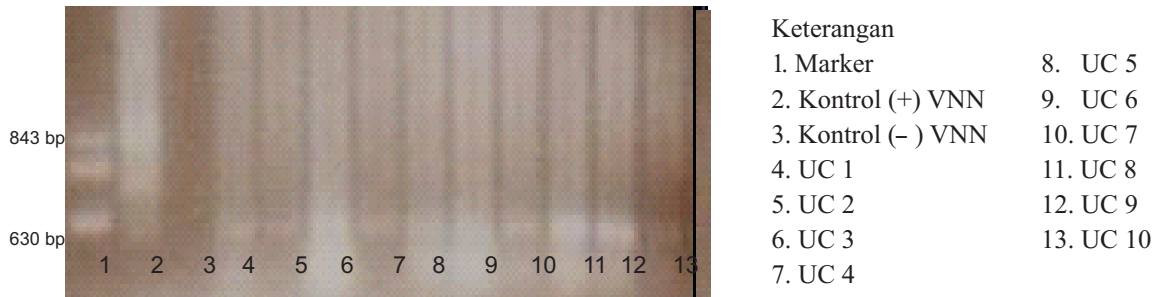


Gambar 7. Imunositokimia *streptavidin biotin* pada sediaan apus suspensi organ kerapu macan 48 jam pasca diinfeksi virus penyebab VNN. Positif berwarna coklat kemerahan.

Virus penyebab VNN dapat menginfeksi ikan melalui tiga cara yaitu: sel epitelium saluran pencernaan, akson saraf perifer dan sirkulasi darah (Korsnes, 2008). Darah merupakan salah satu media pembawa virus yang dapat menjangkau seluruh sistem organ, seperti saluran pencernaan, sistem pernafasan melalui sirkulasi darah. Virus dapat menginfeksi sistem organ melalui saraf perifer ikan dan dikeluarkan melalui sel-sel epitelia saluran pencernaan. Keluarnya virus VNN dari ikan dapat melalui feses, lendir dan insang (Sudaryatma dkk., 2012b). Uji imunositokimia pada preparat suspensi

organ menunjukkan hasil positif VNN yang ditandai dengan warna coklat keemasan di sekitar sel yang berwarna ungu. Hal ini menunjukkan bahwa virus VNN telah menyebar ke seluruh organ. Terjadinya infeksi virus dipengaruhi oleh daya tahan tubuh, tingkat virulensi dan konsentrasi virus di dalam tubuh ikan.

Pengujian VNN dengan menggunakan tehnik RT-PCR bertujuan untuk konfirmasi hasil uji imunositokimia. Hasil uji RT-PCR kerapu macan dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Hasil uji RT-PCR kerapu macan positif VNN

Hasil uji RT-PCR menunjukkan bahwa kerapu yang diinjeksi virus penyebab VNN semuanya positif VNN. Metode pemeriksaan PCR tidak berpengaruh terhadap munculnya virus VNN pada ikan kerapu yang diinfeksi virus VNN intra muskuler ataupun kohabitasi (Yuasa *et al.*, 2001). Uji imunositokimia dan RT-PCR menunjukkan hasil positif VNN terhadap apus darah dan suspensi organ kerapu macan 24 jam pasca infeksi virus penyebab VNN. Berdasarkan hasil uji tersebut, penggunaan uji imunositokimia pada preparat apus darah dan suspensi organ dapat digunakan sebagai tehnik deteksi VNN yang cepat, tepat dan akurat.

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 selama uji coba dan penulisan naskah.

Daftar Pustaka

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. Hal. 5,7 dan 11.

- Aria, P. (2008) Darah ikan. <http://maswira.wordpress.com>. (10 Maret 2009)
- Chi, S.C., Lo, B.J. and Lin, S.S. (2001) Characterization of grouper nervous. *J. Fish Dis.* 24: 3-3.
- 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.
- Gilda, D., Lio – Po and Leobert, D.P. (2009) Viral Disease Chapter I. <http://rfdp.seafdec.org.ph>. Diakses 27 Februari 2013.
- 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 dan 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, 1999; p. 237-240.
- Kokawa Y., Takami, I., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. (2008) A mixed infection in sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* affected with viral nervous necrosis (VNN). *Aquaculture* 284: 41-45.
- 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, Paris, France.
- Roza, D., Johnny dan 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. 12 p.
- Sudaryatma, P.E., Artanti, T.L., Trisnasari, T., Lidayana, D.L. dan Nurlita, W. (2012a) Pemeriksaan *Viral Nervous Necrosis* Pada Sampel Air Pemeliharaan Ikan Kerapu Macan Dengan Metode Imunositokimia *Streptavidin Biotin*. *J. Sain Vet.* 2: 2-12.
- Sudaryatma, P.E., Artanti, T.L., Sunarsih, N.L., Widiarti, K.S. dan Nurhidayah, S.N. (2012b) Imunositokimia *Streptavidin Biotin*: Deteksi Dini *Viral Nervous Necrosis* Pada Lendir Ikan Kerapu Macan. *J. Sain Vet.* 1: 99-109.
- Sunaryanto, Sulisty, Chaidir dan Sudjiharno (2001) Pengembangan teknologi budidaya kerapu: Permasalahan dan kebijaksanaan. Prosiding Lokakarya Nasional. Pengembangan Agribisnis Kerapu. Peningkatan daya saing agribisnis kerapu yang berkelanjutan melalui penerapan IPTEK. Jakarta, 28-29 Agustus 2001: p.1-16.
- 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. dan Zafran (2001) *Manual for PCR Procedure : Rapid Diagnosis on Viral Nervous Necrosis (VNN) in Grouper*. Lolitkanta – JICA Booklet No. 13. 35 pp.