

Infeksi *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus* dan *Viral Nervous Necrosis* pada Ikan Air Laut yang Diidentifikasi Dengan Multipleks *Polymerase Chain Reaction*

Identification of Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus and Viral Nervous Necrosis in Seawater Fish by Multiplex Polymerase Chain Reaction

Hidayati Kumalasari¹, Putu Eka Sudaryatma², Artanti Tri Lestari², Wahyu Nurlita², Wahyu Andy Nugraha¹, Nur Hasanah¹,
Ida Ayu Mirah Meliana Dewi³, Ni Putu Arya Shintya Anggraeni³

¹Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Trunojoyo, Madura

²Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan, Denpasar

³Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Bali

*Corresponding author, Email: putueka.sudaryatma@gmail.com

Naskah diterima: 16 Maret 2022, direvisi: 19 Mei 2022, diterima: 19 Mei 2022

Abstract

Indonesia become a maritime country with large of ocean area and beach line with marine species diversity reaching 37% of the world's fish. This makes Indonesia has aquaculture potential that is supported by an appropriate climate. However, the challenge of viral diseases caused by *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus* (ISKNV) and *Viral Nervous Necrosis* (VNN) would hamper marine aquaculture and cause huge economic losses. Therefore, it is necessary to carry out early detection methods that are efficient, fast, precise and accurate to identify these viral disease. Here we developed a multiplex-PCR (mPCR) a method that can detect simultaneously of the ISKNV and VNN. The results of this method showed high sensitivity and specificity by using MCP and CP gene target primers to detect ISKNV and VNN, respectively. From a total of 353 samples of seawater fish examined by mPCR, positive results following of single infection of ISKNV and VNN were 14 and 2, respectively. We also found that 18 grouper fish was coinfecting with these viruses. From these results, it shows that the mPCR method developed has efficiency, faster and high accuracy. This founding was possible to be applied in laboratory testing or early detection system in the field for ISKNV and VNN.

Keywords: ISKNV; Seawater fish; Multiplex-PCR; Fish disease; VNN

Abstrak

Indonesia yang memiliki julukan negara maritim dengan keberagaman spesies mencapai 37% ikan di dunia. Hal ini menjadikan Indonesia memiliki potensi perikanan budidaya yang didukung dengan iklim yang sesuai. Akan tetapi, tantangan penyakit virus yang disebabkan oleh *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus* (ISKNV) dan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) dapat menghambat budidaya perikanan laut dan menyebabkan kerugian ekonomi yang besar. Oleh karena itu, perlu dilakukan adanya deteksi dini dengan metode yang efisien, cepat, tepat dan akurat dalam mengidentifikasi penyakit virus ini. Disini kami mengembangkan metode multipleks-PCR (mPCR) yang dapat mendeteksi secara simultan virus penyebab ISKNV dan VNN. Hasil dari metode ini menunjukkan adanya sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi menggunakan primer dengan target gen MCP dan CP untuk mendeteksi ISKNV dan VNN, secara berurutan. Dari total 353 sampel ikan air laut yang diperiksa menggunakan aplikasi mPCR, menunjukkan ikan air laut terinfeksi tunggal ISKNV dan VNN sebanyak 14 dan 2 ikan, secara berurutan. Kami juga menemukan ko-infeksi pada kedua virus pada ikan kerapu sebanyak 18 sampel. Dari hasil ini, menunjukkan bahwa metode mPCR yang dikembangkan memiliki efisiensi, kecepatan dan keakuratan, sehingga dapat diaplikasikan dalam mendeteksi ISKNV dan VNN pada pengujian laboratorium atau deteksi dini di lokasi budidaya.

Kata kunci: ISKNV; Ikan air laut; Multipleks-PCR; Penyakit ikan; VNN

Pendahuluan

Indonesia yang memiliki julukan negara maritim memiliki luas lautan 3,1 juta km², perairan Zona Ekonomi Eksklusif seluas 2,7 juta km² dan panjang garis pantai mencapai 81.000 km (Putri *et al.*, 2016). Dengan bermodalkan luasnya perairan dan bersuhu hangat menjadikan potensi perikanan yang sangat beragam mencapai 37% dari spesies ikan di dunia (Khoironi & Saskara, 2015). Hal ini menjadikan Indonesia memiliki potensi perikanan budidaya yang mencapai 13 juta ton (Heckman *et al.*, 2020). Proses budidaya perikanan di Indonesia sangat didukung dengan iklim yang sesuai, akan tetapi penyakit yang disebabkan oleh parasit, virus atau bakteri dapat menghambat budidaya dan menyebabkan kerugian ekonomi (Sarjito *et al.*, 2013).

Penyakit ikan yang banyak mempengaruhi proses budidaya adalah infeksi virus yang mengakibatkan mortalitas tinggi adalah *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus* (ISKNV) (Rimmer *et al.*, 2012) dan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) (Sembiring *et al.*, 2018). ISKNV tergolong Megalocytivirus dari family Iridoviridae yang memiliki DNA untai ganda simetri berbentuk icosahedral dengan diameter 120-200 nm. Megalocytivirus diketahui menginfeksi ikan budidaya laut di Jepang pada tahun 1990 tergolong dalam keluarga Ranavirus bersama genus Lymphocystivirus dan Ranavirus (Inouye *et al.*, 1992). Penyebaran virus ke beberapa negara Asia Tenggara termasuk Cina, Korea, Taiwan, Singapura dan Indonesia yang menyerang budidaya ikan air laut (Ma *et al.*, 2012). Virus ini bereplikasi pada organ limpa dan ginjal ikan (Sembiring *et al.*, 2018) dengan menunjukkan gejala klinis yaitu ikan terlihat lesu, pergerakan renang lemah, anemia, dan pembesaran pada limpa sehingga dapat menyebabkan kematian hingga 60% populasi budidaya (Gustavo *et al.*, 2020)

VNN dikenal sebagai virus ensefalopati dan retinopati dengan dua RNA untai tunggal yang termasuk dalam genus Betanodavirus (Ma *et al.*, 2012). Deteksi dini sebagai langkahantisipasi untuk meminimalisir terjadinya penyebaran virus pada proses budidaya yang disebabkan oleh ISKNV dan VNN. Penyakit VNN pada ikan air laut telah dilaporkan pertama kali di Jepang (Nguyen *et al.*, 1994; Yoshikoshi & Inoue, 1990) dan menyebabkan kematian beber-

apa spesies ikan laut di benua Erop, Asia sampai Australia (Dalla Valle *et al.*, 2001). Kasus VNN di Indonesia ditemukan pada budidaya ikan kakap putih di Jawa Timur pada tahun 1997 dan di Bali pada tahun 1998 (Zafran *et al.*, 1998). Gejala klinis ikan yang terserang virus VNN terlihat lesu, mengambang di permukaan dengan posisi perut menghadap ke atas, ikan berenang berputar, hiperaktif dan kepala dipermukaan (Sudaryatma *et al.*, 2012) serta nafsu makan menurun (Sembiring *et al.*, 2018). Penggunaan metode yang cepat dan tepat dalam mendeteksi penyakit virus saat ini menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan untaian oligonukleotida pendek sebagai primernya (Angeline *et al.*, 2020; Yuenleni, 2019). Penggunaan PCR konvensional membutuhkan tenaga dan waktu yang besar dengan biaya yang tidak murah sehingga diperlukan adanya pengembangan metode PCR yang lebih cepat dan murah. Multipleks PCR (mPCR) merupakan metode yang sudah banyak dikembangkan untuk mendeteksi lebih dari satu virus pada penyebab penyakit udang (Kim *et al.*, 2015; Thamizhvanan *et al.*, 2019). Metode mPCR merupakan jenis metode PCR yang dilakukan menggunakan dua atau lebih target gen secara bersamaan untuk diamplifikasi dalam reaksi yang sama atau berbeda (Maksum *et al.*, 2018) Untuk mendapatkan metode diagnosa yang cepat, tepat, dan murah maka diperlukan pengembangan metode mPCR yang dapat mendeteksi ISKNV dan VNN secara bersamaan dengan menggunakan suhu *annealing* yang sama yaitu 58 °C. Sehingga metode multipleks-PCR sebagai salah satu teknik diagnosa yang cepat dan murah yang dapat dilakukan di laboratorium klinis maupun laboratporium lapangan.

Materi dan Metode

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Virologi Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Denpasar (Balai KIPM Denpasar) dari bulan September 2021 hingga Januari 2022. Sampel yang berjumlah 353 ekor ikan didapatkan dari unit usaha pembudidaya ikan hias, unit pengolahan ikan dan unit usaha pembenihan ikan budidaya laut

di Denpasar, Badung, Karangasem dan Buleleng. Seluruh sampel ikan (hidup dan segar) ditransportasikan menuju laboratorium dengan menggunakan wadah tertutup berpendingin dan dilanjutkan dengan pengujian.

Ekstraksi Asam Nukleat dari Sampel

Seluruh sampel dilakukan pemingsanan dan euthanasia sebelum dinekropsi untuk dikoleksi organ target mata, otak, limpa, hati dan ginjal. Total target organ seberat 200 mg ditambahkan 400 µl PBS kemudian digerus, dihomogenkan, dan di-centrifuge $5.000 \times rpm$ selama 5 menit. Supernatan dikoleksi dan ditambahkan *lysis buffer* (Geneaid, Taiwan) kemudian diinkubasi disuhu ruang selama 10 menit. Dilanjutkan dengan proses ekstraksi DNA dan RNA menggunakan metode kolom dari *Viral Nucleic Acid Extraction Kit II* (Geneaid, Taiwan) sesuai dengan prosedur kerja yang telah disediakan oleh perusahaan. Seluruh proses ekstraksi menggunakan sistem vakum dari QIAvac (QIAGEN, Japan). Total DNA dan RNA yang dikoleksi dalam 50 µl *Nuclease-free water* disimpan dalam $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai siap digunakan.

Oligonukleotida Primer

Oligonukleotida primer yang digunakan untuk mendeteksi Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (ISKNV) sesuai dengan (Rimmer *et al.*, 2012) dengan target gen major capsid protein (MCP) sebagai berikut: Mg-F (5'-GTTTGATGCGATGGAGACCC-3') dan Mg-R (5'-ATGCCAATCATCTTGTGTAGCC-3'), primer ini menghasilkan 389 bp produk PCR. Sedangkan primer yang digunakan untuk mendeteksi Viral Nervous Necrosis (VNN) dengan target gen coat protein (CP) pada RNA2 yang menghasilkan 230 bp produk PCR sesuai yang digunakan oleh (Dalla Valle *et al.*, 2005) yaitu: VNN-F (5'-CAACTGACAACGATCACCTTC-3') dan VNN-R (5'-CAATCGAACTCCAGCGACA-3'). Seluruh primer ini diproduksi oleh Integrated DNA Technology (IDT, Singapore).

Optimalisasi Multiplex-Polymerase Chain Reaction

Optimalisasi *multiplex-Polymerase Chain Reaction* (mPCR) dilakukan dengan metoda

one-run yaitu proses amplifikasi secara bersamaan pada masing-masing target gen virus dengan menggunakan metode konvensional PCR. Kedua primer diamplifikasi dengan metode *one run-reverse transcription* PCR (RT-PCR) yang meliputi tiga tahapan, yaitu proses *reverse-transcription* $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit dan $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 2 menit, diikuti dengan tahap amplifikasi 30 siklus (denaturasi $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 30 detik, *annealing* (55 dan 58) $^{\circ}\text{C}$ selama 45 detik dilanjutkan ekstensi $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 60 detik) dan tahap ekstensi akhir $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit. Suhu *annealing* (55 dan 58 $^{\circ}\text{C}$) dan konsentrasi primer (0,3 dan 0,5 μM) merupakan parameter yang dioptimalisasi. Seluruh proses mPCR menggunakan reagen master mix Bioline (Meridian Bioscience, USA) dan enzim AMV *reverse-transcriptase* (Promega, USA) dengan total volume reaksi 25 µl sesuai dengan instruksi yang disediakan oleh perusahaan, meliputi 2X My Taq HS Red Mix, primer, enzim *reverse transcription* (hanya ISKNV), *nuclease-free water*, dan asam nukleat dari sampel yaitu 2 µl. Seluruh proses optimalisasi mPCR *one-run* menggunakan kontrol positif berupa *partial fragment-dsDNA* (IDT, Singapore) masing-masing virus sesuai dengan target gen yang digunakan. Hasil amplifikasi selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose dengan konsentrasi 1,5% yang ditambahkan 1% gel-red (EMD Millipore, USA) sebagai pewarna nukleotida. Batas pembacaan pita pada agarose menggunakan marker 100 bp (Takara-Bio, Japan). Proses elektroforesis menggunakan Mupid-Exu *Submarine Electrophoresis* (Mupid, Japan) pada tegangan listrik 100 Volt selama 25 menit. Visualisasi dan proses dokumentasi pita sampel pada agarose menggunakan UV Transluminator UVITEC-Cambridge FireReader (UVITEC, UK).

Uji Spesifisitas dari Multiplex-Polymerase Chain Reaction

Untuk mengetahui primer yang digunakan hanya spesifik terhadap gen target pada metode mPCR ini dan menghindari *cross-amplified condition*, maka primer ISKNV dan VNN diuji menggunakan kontrol positif dari *Tilapia-lake virus*, *Channel-catfish virus*, *Koi herpesvirus*, *Infectious hematopoietic necrosis virus*, *Epi-zootic hematopoietic necrosis virus*, *White-spot*

syndrome virus, Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus dan *Monodon-type baculovirus* sesuai dengan metode amplifikasi diatas.

Uji Sensitifitas dari *Multiplex-Polymerase Chain Reaction*

Sensitivitas primer ISKNV dan VNN pada mPCR dilakukan dengan mengencerkan kontrol positif menggunakan 1X TE buffer (Promega, USA). Pengenceran 10 kali dari 10^{-1} sampai 10^{-5} dilakukan pada total volume 20 μ l. Total DNA dari setiap pengenceran diukur menggunakan spektrofotometer SAFAS UVmc (SAFAS, Monaco).

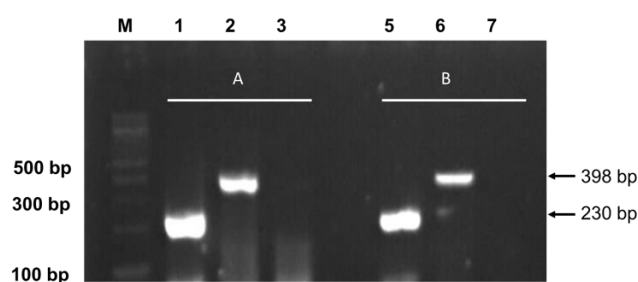
Aplikasi *Multiplex-Polymerase Chain Reaction* pada Sampel Ikan

Seluruh hasil ekstraksi total DNA dan RNA dari target organ, antara lain: mata, otak, limpa, hati dan ginjal ikan diukur dan disetarakan konsentrasinya menjadi 100 ng/ μ l. Amplifikasi menggunakan metode mPCR yang telah dioptimalisasi diatas menggunakan MultiGene Optimax Thermal Cycler (Labnet International, USA) dan divisualisasi menggunakan UV Transilluminator UVITEC Cambridge FireReader (UVITEC, UK) dari agarose yang dielektroforesis. Hanya sampel yang menunjukkan hasil positif dikonfirmasi dengan pengulangan untuk mempertegas hasil yang didapat.

Hasil dan Pembahasan

Pada optimalisasi *multiplex-PCR*, tahapan *annealing* menggunakan suhu 55 °C dan 58 °C (Gambar 1) untuk diamplifikasi dengan metode *one-run* RT-PCR. Suhu 55 °C menjadi suhu optimal untuk dapat mendeteksi ISKNV dan VNN secara jelas dan tidak adanya sisa primer pada visualisasi elektroforesis. Keberhasilan dari PCR adalah kesesuaian dan efisiensi primer serta optimalisasi proses amplifikasi. Optimalisasi waktu dan suhu *annealing* dari proses amplifikasi sangat mempengaruhi jumlah templet DNA, hal ini dikarenakan suhu *annealing* yang tidak tepat dapat menyebabkan mispriming (Ardiansyah et al., 2018; Yuenleni, 2019). Selain itu, proses polimerisasi primer pada DNA target sangat tergantung pada tahapan *annealing*, suhu dan waktu yang tidak optimum

akan menyebabkan kegagalan polimerisasi primer (Langga et al., 2012). Menurut Uslan & Pharmawati (2015) suhu *annealing* merupakan suhu yang membantu sepasang primer untuk menempel dengan komplemen DNA target pada saat proses amplifikasi berlangsung, yakni berkisar 50 – 65 °C. Oleh karena itu, seluruh reaksi amplifikasi mPCR pada penelitian ini menggunakan suhu *annealing* 55 °C sesuai dengan hasil optimalisasi dibawah.



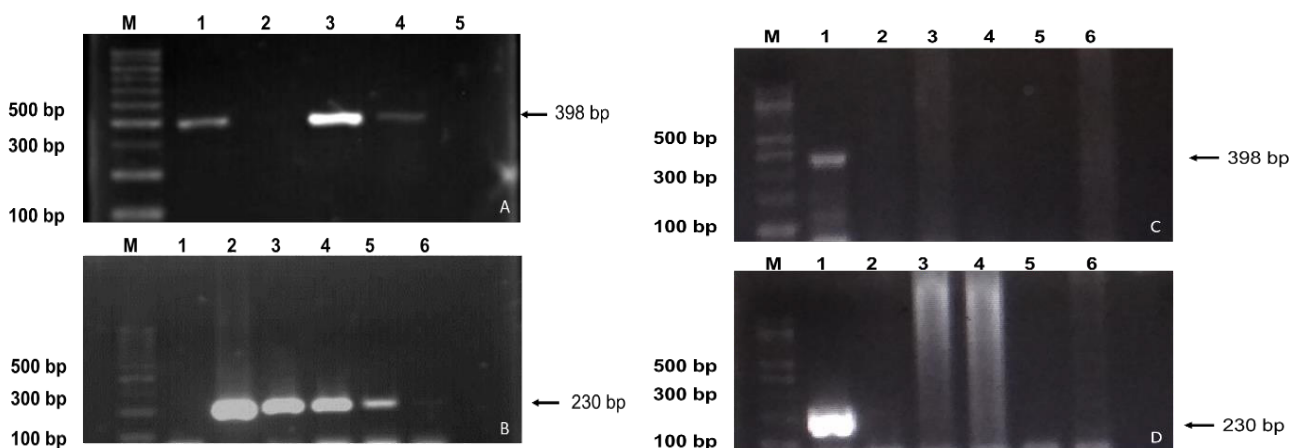
Gambar 1. Hasil optimalisasi *Multiplex-PCR* dengan menggunakan primer ISKNV dan VNN, Keterangan; M: Marker 100 bp; A) Produk PCR dengan suhu *annealing* 58°C; 1: VNN; 2: ISKNV; 3: NFW; B) Produk PCR dengan suhu *annealing* 55°C; 5: VNN; 6: ISKNV; 7: NFW.

Sensitivitas dari metode mPCR menunjukkan nilai konsentrasi mencapai 0,432 ng/ μ l untuk VNN dengan primer CP dan 0,96 ng/ μ l untuk primer MCP pada penyakit ISKNV. Uji ini dilakukan dengan melakukan pengenceran bertingkat kelipatan sepuluh pada kontrol positif. Dengan adanya perbedaan konsentrasi awal dari kontrol positif kedua target virus yang digunakan mengakibatkan adanya perbedaan dalam pembacaan hasil elektroforesis dalam agarose yang divisualisasikan pada Gambar 2. Sedangkan pada uji spesifisitas mPCR, primer ISKNV dan VNN digunakan untuk mengamplifikasi kontrol positif dari *Tilapia-lake virus, Channel-catfish virus, Koi herpesvirus, Infectious hematopoietic necrosis virus, Epizootic haematopoietic necrosis virus, Whitespot syndrome virus, Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus* dan *Monodon-type baculovirus*. Berdasarkan hasil visual, didapatkan bahwa primer ISKNV dan VNN tidak dapat mengamplifikasi kontrol positif selain dari target yang telah ditentukan. Hal ini membuktikan primer ISKNV atau VNN spesifik pada target gen pada pengujian mPCR ini.

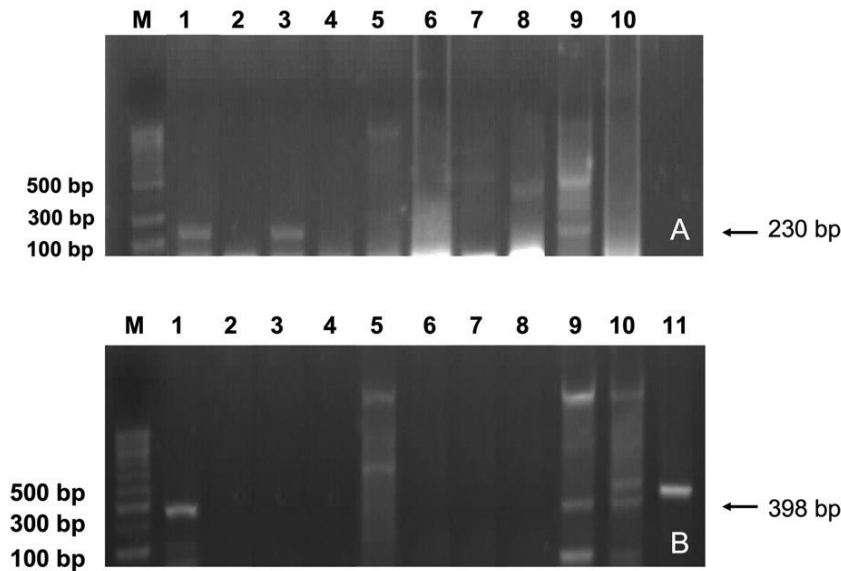
Keberhasilan amplifikasi PCR terletak pada perancangan primer yang spesifik dengan beberapa pertimbangan yaitu panjang primer 15 – 30 basa, terdapat unsur basa G-C yang optimal berkisar 40 – 60%, ujung -3' primer harus mengandung G atau C berfungsi meningkatkan efisiensi *priming* (Lorenz, 2012). Uji spesifisitas menunjukan bahwa primer yang telah disiapkan tidak menghasilkan amplicon dengan ukuran yang diharapkan untuk jalur target gen lain. Primer yang digunakan dalam penelitian ini menargetkan *coat protein (CP)* untuk deteksi RNA2 pada VNN, hal ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Dalla Valle *et al.*, (2005) untuk mendeteksi gen RNA2 genotip VNN dengan berat molekul 42 KDa yang menghasilkan produk PCR 230 bp. VNN termasuk dalam golongan *Betanodavirus* yang merupakan jenis virus RNA tunggal dengan ukuran sangat kecil yang terdiri dari untaian RNA1 dan RNA2 (Ma *et al.*, 2012). RNA1 memiliki fungsi untuk mengkode protein non-struktural (*RNA-dependent RNA polymerase*) sedangkan RNA2 berfungsi untuk mengkode *coat protein* (Puspasari *et al.*, 2020). Sedangkan primer ISKNV yang menargetkan gen major capsid protein (MCP) dari golongan megalocytivirus. Target gen MCP merupakan gen berperan penting dalam menentukan analisis kekerabatan virus golongan megalocytivirus (Go & Whittington, 2006). Menurut Murwantoko

et al., (2009) gen MCP merupakan sebuah kode protein kapsul yang memiliki komponen utama 40% hingga 45% dari polipeptida partikel virus dan memiliki ukuran sekitar 50 kDa dari ISKNV. Sekuen dari protein kapsid banyak digunakan untuk mengkalsifikasikan dari taksonomi karena memiliki karakter yang relative stabil juga memiliki variasi basa yang dapat membedakan antara isolat dari virus yang dekat dengan kekerabatannya (Go & Whittington, 2006). Metode mPCR memiliki keunggulan dari kecepatan, spesifisitas dan efesiensi (Deng *et al.*, 2018).

Dari total 353 sampel ikan air laut yang diperiksa menggunakan aplikasi mPCR, teridentifikasi adanya positif VNN pada 12 sampel ikan *Epinephelus sp.*, sedangkan *Chromis dimidiata* dan *Cirrhilabrus sp.* masing-masing sejumlah 1 sampel. Pada deteksi ISKNV, ditemukan adanya positif sebanyak 6 sampel *Epinephelus sp.*, 3 sampel *Katsuwonus pelamis*, 2 sampel *Pomacentrus sp.*, masing-masing 1 sampel pada *Decapterus sp.*, *Scomberomorini sp.*, *Amphiprion ocellaris*, dan *Chromis viridis*. Selain itu, kami menemukan adanya ko-infeksi dari kedua virus tersebut sebanyak 18 sampel dari ikan Kerapu (*Epinephelus family*). Beberapa peneliti menemukan bahwa VNN menyerang 10 famili ikan laut dari Indo-Pasifik serta Mediterania (Toffan *et al.*, 2017) termasuk Indonesia yang dapat menyebabkan mortalitas



Gambar 2. Hasil sensitivitas dan spesifisitas *Multipleks-PCR* dengan primer ISKNV dan VNN. (A) Sensitivitas ISKNV, M: Marker 100 bp, 1: Kontrol positif, 2: Kontrol negatif, 3 – 5: Pengenceran kontrol positif ISKNV 10^{-1} – 10^{-3} . (B) Sensitivitas VNN, M: Marker 100 bp, 1: Kontrol negatif, 2-6: Pengenceran kontrol positif VNN 10^{-1} – 10^{-5} . (C) Spesifisitas primer ISKNV, M: Marker 100 bp, 1: Kontrol positif ISKNV, 2: *Nucleus-free water*, 3: Kontrol positif KHV, 4: Kontrol positif TiLV, 5: Kontrol positif EHNV, 6: Kontrol positif CCV, (D) Spesifisitas primer VNN, M: Marker 100 bp, 1: Kontrol positif VNN, 2: *Nucleus-free water*, 3: Kontrol positif WSSV, 4: Kontrol positif IHNV, 5: Kontrol positif IHNV, 6: Kontrol positif MBV.



Gambar 3. Hasil elektroforesis *Multipleks-PCR* dengan primer VNN dengan target 230 bp dan ISKNV dengan target 398 bp yang diaplikasikan pada sampel lapangan. (A) Sampel yang diaplikasikan menggunakan primer VNN, M: Marker 100 bp, 1: Kontrol positif, 2: Kontrol negatif, 3 – 10: Sampel. (B) Sampel yang diaplikasikan menggunakan primer ISKNV, M: Marker 100 bp, 1: Kontrol positif, 2: Kontrol negatif, 3 – 11: Sampel.

mencapai 100% pada larva Ikan kerapu di Bali dan Ikan kakap putih di Jawa Timur (Zafran *et al.*, 2012). Infeksi VNN adalah kondisi neuropatologi menular yang menyebabkan kematian besar pada larva beberapa spesies teleost laut di Eropa, Jepang, Asia Tenggara dan Australia (Dalla Valle *et al.*, 2001). Penyakit VNN adalah penyakit serius dalam budidaya ikan laut dengan menyerang sistem saraf pada stadia larva, retina mata dan organ reproduksi pada ikan dewasa (Yang *et al.*, 2021). Penyakit ini secara umum dapat menginfeksi seluruh fase pertumbuhan pada ikan kerapu (Sembiring *et al.*, 2018). Gejala klinis ikan yang terserang virus VNN terlihat tampak lesu, mengambang di atas permukaan dengan posisi perut menghadap ke atas. Penyakit VNN dapat menginfeksi otak sehingga dapat menyebabkan ikan berenang berputar (Sudaryatma *et al.*, 2012), nafsu makan menurun, warna pada ikan terlihat pucat, pergerakan pada saat berenang hiperaktif, serta sering menghentakan kepala ke atas permukaan air secara sporadik (Sembiring *et al.*, 2018). VNN termasuk dalam anggota keluarga *Nodaviridae* yang tergolong dalam genus *betanodavirus* yang memiliki kapsid kecil, tidak memiliki lapisan luar dan berbentuk ikosahedral yang mengelilingi materi genetik yang terdiri dari RNA tunggal, positif sense (Toubanaki *et al.*, 2022). *Betanodavirus* memiliki empat cluster

yakni tipe TNV, TPNNV, SJJNV, BFNNV serta RGNNV (Dalla Valle *et al.*, 2001; Nishizawa *et al.*, 1995; Puspasari *et al.*, 2020). Infeksi ISKNV menimbulkan kematian mencapai 20 – 60% (Rifai *et al.*, 2020) yang sering terjadi terutama di musim panas pada negara subtropis atau negara dengan periode suhu air yang relatif tinggi lebih lama (Kurita & Nakajima, 2012) represented by red sea bream iridovirus (RSIV). Virus ini dapat menyerang bagian organ ikan pada limpa dan ginjal dengan gejala klinis ikan tampak lesu, berenang lambat dan tidak terkondisikan, menunjukkan anemia berat, dan pembesaran pada limpa (Gustavo *et al.*, 2020). ISKNV termasuk genus dari *Iridovirus* yang memiliki simetri ikosahedral dan memiliki ukuran lebih besar dari VNN yaitu 120-200 nm. Penyebaran virus secara geografis yang dapat dijumpai di Asia Tenggara, Cina, Jepang, Korea, Taiwan, Singapura dan Indonesia (Ma *et al.*, 2012). Virus ini telah diketahui sejak 1990 yang menyebabkan penyakit kematian massal pada tiga puluh spesies ikan laut yang dibudidaya (Inouye *et al.*, 1992).

Kesimpulan

Dari total 353 sampel ikan air laut yang diperiksa menggunakan aplikasi mPCR, menunjukkan ikan air laut terinfeksi tunggal ISKNV dan VNN sebanyak 20 dan 14 ikan, secara

berurutan. Kami juga menemukan ko-infeksi pada kedua virus pada ikan kerapu sebanyak 18 sampel. Dari hasil ini, menunjukkan bahwa metode mPCR yang dikembangkan memiliki efisiensi, kecepatan dan keakuratan, sehingga dapat diaplikasikan dalam mendeteksi ISKNV dan VNN pada pengujian Isborstorium atau deteksi dini di lokasi budidaya. Multipleks-PCR merupakan sebuah metode yang mendeteksi dua jenis pathogen virus (ISKNV dan VNN) secara bersamaan yang dilakukan dengan penyederhanaan proses amplifikasi dengan menggunakan tahapan dan suhu yang sama dalam satu kali pengujian, sehingga dapat menghemat waktu dan biaya dengan tetap mempertahankan spesifisitas dan sensitifitas pengujian yang tinggi. Pengembangan metode ini diharapkan dapat membantu mempercepat pekerjaan pengujian laboratorium sehingga dapat memberikan informasi status dan deteksi dini penyakit di lokasi budidaya.

Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada *Center for Animal Disease Control (CADIC), University of Miyazaki, Jepang* dalam membantu penyediaan bahan baku biologi molekuler dan alat vakum yang digunakan dalam penelitian ini. Selain itu, kami mengucapkan terima kasih kepada Balai KIPM Denpasar yang telah menyediakan sarana dan fasilitas dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Angeline, L., Putra, G., Yonathan, C. J., Imania, N., Hilmy, M., Firdaus, R., & Yoewono, J. R. (2020). *Stannum : Jurnal Sains dan Terapan Kimia A Review of the Development of Polymerase Chain Reaction Technique and Its Uses in Scientific Field*. 2(1), 17–30. <https://doi.org/10.33019/jstk.v>
- Ardiansyah, F., Laiila, H., Muharni, M., & Windusari, Y. (2018). *Analisis Polimorfisme Padi Varietas Lokal Sumatera Selatan*. 7(1), 50–58.
- Dalla Valle, L., Negrisolo, E., Patarnello, P., Zanella, L., Maltese, C., Bovo, G., & Colombo, L. (2001). Sequence comparison and phylogenetic analysis of fish nodaviruses based on the coat protein gene. *Archives of Virology*, 146(6), 1125–1137. <https://doi.org/10.1007/s007050170110>
- Dalla Valle, L., Toffolo, V., Lamprecht, M., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., & Colombo, L. (2005). Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Veterinary Microbiology*, 110(3–4), 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.07.014>
- Deng, X., Zhang, J., Su, J., Liu, H., Cong, Y., Zhang, L., Zhang, K., & Shi, N. (2018). A multiplex PCR method for the simultaneous detection of three viruses associated with canine viral enteric infections. *Archives of Virology*, 0123456789, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3828-4>
- Go, J., & Whittington, R. (2006). Experimental transmission and virulence of a megalocytivirus (Family Iridoviridae) of dwarf gourami (*Colisa lalia*) from Asia in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) in Australia. *Aquaculture*, 258(1–4), 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.033>
- Gustavo, J., Paley, R. R. K., Hunt, W., Ziddah, P. A., Nkansa, M., Guilder, J., Gray, J., & Duodu, S. (2020). First detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) associated with massive mortalities in farmed tilapia in Africa. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1–14(September). <https://doi.org/10.1111/tbed.13825>
- Heckman, J. J., Pinto, R., & Savelyev, P. A. (2020). Rencana Strategis 2020-2024 Deputi Bidang Koordinasi Sumber Daya Maritim. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.
- Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y., & Sorimachi, M. (1992). Iridovirus Infection of Cultured Red Sea Bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology*, 27(1), 19–27. <https://doi.org/10.3147/jsfp.27.19>

- Khoironi, F. E., & Saskara, I. A. N. (2015). Analisis Pengaruh Kurs Dollar, Inflasi, dan Produksi terhadap Ekspor Ikan Hias di Provinsi Bali. *E-Journal EP Unud*, 6(3), 337–361.
- Kim, H., Ryu, J., Lee, S., Kim, E., & Kim, H. (2015). Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. *BMC Microbiology*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0577-3>
- Kurita, J., & Nakajima, K. (2012). Megalocytiviruses. *Viruses*, 4(4), 521–538. <https://doi.org/10.3390/v4040521>
- Langga, I. F., Restu, M., & Kuswinanti, T. (2012). Optimalisasi suhu dan lama inkubasi dalam ekstraksi dna tanaman bitti (. *J Sains & Teknologi*, 12(3), 265–276.
- Lorenz, T. C. (2012). *Polymerase Chain Reaction : Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies*. May, 1–14. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Ma, H., Xie, J., Weng, S., Zhou, T., & He, J. (2012). Co-infection of megalocytivirus and viral nervous necrosis virus in a very severe mass mortality of juvenile orange-spotted groupers (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 358–359, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.032>
- Maksum, I. P., Amalia, R., Kamara, D. S., Diana, S., & Rachman, R. W. (2018). PCR Multiplex untuk Identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* Resisten terhadap Isoniazid dan Rifampisin pada Galur Lokal Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat Multiplex PCR for Identification the Isoniazid- and Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (Local Strain of Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat). 4(November), 107–118.
- Murwantoko, Handayani, christina retina, & Pratiwi, R. (2009). Cloning and Sequence Analysis of Capsid Protein Gene of Iridovirus Indonesian Isolates. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 14(1), 1117–1123.
- Nguyen, H. D., Mekuchi, T., Imura, K., Nakai, T., Nishizawa, T., & Muroga, K. (1994). Occurrence of Viral Nervous Necrosis (VNN) in Hatchery-Reared Juvenile Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 60(5), 551–554. <https://doi.org/10.2331/fishsci.60.551>
- Nishizawa, T., Mori -i., K., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I., & Muroga, K. (1995). Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *Journal of General Virology*, 76(7), 1563–1569. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-7-1563>
- Puspasari, K., W, Z., Nurdin, A., Hasriani, Freddy, R., & Ishaq, S. (2020). Pemetaan Genomik Daerah RNA2 (Coat Protein) Betanodavirus Penyebab Penyakit Viral Nervous Necrosis (VNN). *Jurnal Kelautan Dan Perikanan Terapan*, 3(2), 79–87.
- Putri, D. A. S., Rosjadi, F., Sundari, M. S., & DAYA. (2016). Dwi Ayu Sekarini Putri, Firman Rosjadi, Made Siti Sundari. *Ekonomi Dan Bisnis*, 2017, 11–18.
- Rifai, A. B., Luh, N., Ika, P., Yulianah, L., Pasaribu, F. H., Medik, D. M., Ilmu, D., Hewan, P., Karantina, S., Pengendalian, I., & Riau, K. (2020). *Infeksi Megalocytivirus pada Budidaya Ikan Air Laut dan Ikan Air Tawar di Beberapa Provinsi di Indonesia*. 21(36), 423–434. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2020.21.3.423>
- Rimmer, A. E., Becker, J. A., Tweedie, A., & Whittington, R. J. (2012). Development of a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay for the detection of dwarf gourami iridovirus (DGIV) and other megalocytiviruses and comparison with the Office International des Epizooties (OIE) reference PCR protocol. *Aquaculture*, 358–359, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.034>

- Sarjito, I., Ir, P., Budi, S., Harjuno, A., & Haditomo, C. (2013). *PARASIT DAN PENYAKIT IKAN*.
- Sembiring, S. B. M., Wibawa, G. S., Mahardika, K., Widiastuti, Z., & Haryanti, H. (2018). Prevalensi Infeksi Viral Nervous Necrosis (Vnn) Dan Iridovirus Pada Hatcheri Dan Budidaya Ikan Laut. *Media Akuakultur*, 13(2), 83. <https://doi.org/10.15578/ma.13.2.2018.83-90>
- Sudaryatma, P. E., Lestari, A. T., Sunarsih, N. L., Widiarti, K. S., Hidayah, S. N., & Srinoto, D. (2012). Imunositokimia Streptavidin Biotin : Deteksi Dini Viral Nervous Necrosis Virus pada Lendir Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) [in Indonesian]. *Jurnal Sain Veteriner*, 30(March), 99–109.
- Thamizhvanan, S., Sivakumar, S., Santhosh Kumar, S., Vinoth Kumar, D., Suryakodi, S., Balaji, K., Rajkumar, T., Vimal, S., Abdul Majeed, S., Taju, G., & Sahul Hameed, A. S. (2019). Multiple infections caused by white spot syndrome virus and Enterocytozoon hepatopenaei in pond-reared *Penaeus vannamei* in India and multiplex PCR for their simultaneous detection. *Journal of Fish Diseases*, 42(3), 447–454. <https://doi.org/10.1111/jfd.12956>
- Toffan, A., Pascoli, F., Pretto, T., Panzarin, V., Abbadì, M., Buratin, A., Quartesan, R., Gijón, D., & Padrós, F. (2017). *Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (Sparus aurata) caused by reassortant betanodavirus RGNNV / SJNNV : an emerging threat for Mediterranean aquaculture*. *May*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep46755>
- Toubanaki, D. K., Efstathiou, A., & Karagouni, E. (2022). Transcriptomic Analysis of Fish Hosts Responses to Nervous Necrosis Virus. *Pathogens*, 11 (201), 1–30.
- Uslan, U., & Pharmawati, M. (2015). Optimasi Konsentrasi DNA dan MgCl₂ pada Reaksi Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA untuk Analisis Keragaman Genetik Tanaman Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) (Optimization of DNA and MgCl₂ Concentrations in Polymerase Chain Reacti. *Jurnal Bios Logos*, 5(1). <https://doi.org/10.35799/jbl.5.1.2015.9316>
- Yang, Z., Yue, G. H., & Wong, S. M. (2021). VNN disease and status of breeding for resistance to NNV in aquaculture. *Aquaculture and Fisheries*, April. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.04.001>
- Yoshikoshi, K., & Inoue, K. (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 13(1), 69–77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1990.tb00758.x>
- Yuenleni. (2019). *LANGKAH-LANGKAH OPTIMASI PCR ISSN 2655 4887 (Print) , ISSN 2655 1624 (Online) ISSN 2655 4887 (Print) , ISSN 2655 1624 (Online)*. 1(3), 51–56.
- Zafran, Koesharyani, I., Johnny, F., Yuasa, K., Harada, T., & Hatai, K. (2012). Viral Nervous Grouper altivelis Necrosis Larvae in in Hump and Cromileptes Juveniles Indonesia. *Fish Pathology*, 35(2), 95–96.
- Zafran, Z., Harada, T., I. Koesharyan, I. K., Yuasa, K., & Hatai, K. (1998). Indonesian Hatcery Reared Seabass Larvae (Lates calcarifer), Associated With Viral Nervous Necrosis (VNN). *Indonesian Fisheries Research Journal*, 4(1), 19. <https://doi.org/10.15578/ifrj.4.1.1998.19-22>