

## DETEKSI *RED SEA BREAM IRIDOVIRUS* (RSIV) DENGAN TEKNIK PCR PADA BENIH IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*) DI STASIUN KIPM YOGYAKARTA

Hamiyawati Qoimatu Dini Alfaruqi<sup>1\*</sup>, Sutopo Aris Wibowo<sup>2</sup> dan Annisa Khumaira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Bioteknologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta

<sup>2</sup>Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (KIPM) Yogyakarta

\*Email: miaalfaruqi@gmail.com

### Abstrak

#### Keywords:

Ikan gurame; red sea bream iridovirus (RSIV); PCR; Stasiun KIPM.

Kebutuhan benih gurame semakin meningkat sejalan dengan pengembangan usaha budidaya gurame yang semakin luas. Hal tersebut berdampak pada peningkatan lalulintas perdagangan benih gurame dan Stasiun KIPM adalah lembaga yang berwenang untuk melakukan pengawasan serta pencegahan apabila terdapat HPI/HPIK. Red sea bream iridovirus (RSIV) merupakan salah satu agen penyakit dari golongan virus yang menyebabkan kematian massal pada budidaya benih gurame. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi RSIV pada benih gurame dengan teknik PCR. Metode deteksi menggunakan tahapan molekuler yang mengacu pada metode The Office International des Epizooties (OIE). Amplifikasi DNA virus menggunakan primer spesifik RSIV yaitu primer forward 1F (5'-CTCAACACTCTGGCTCATC-3') dan primer reverse 1R (5'-GCACCAACACATCTCCTATC-3') dengan ampikon yang dihasilkan sebesar 570 bp. Produk PCR divisualisasi dengan elektroforesis gel agarose 1%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga sampel benih gurame negatif RSIV. Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya pita DNA pada gel elektroforesis, sehingga benih gurame tersebut aman jika dilalulintaskan.

### 1. PENDAHULUAN

Ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) merupakan salah satu komoditas ikan air tawar yang banyak dikonsumsi karena rasa dagingnya yang enak. Metode pemeliharaan yang relatif mudah dan memiliki nilai ekonomis tinggi menyebabkan ikan gurame banyak dibudidayakan di Indonesia [1]. Hal ini diperkuat dengan data produksi ikan gurame nasional yang mengalami peningkatan sebesar 19,86% per tahun sejak tahun 2009 sampai dengan 2013, yaitu dari 46.254 ton meningkat menjadi 94.605 ton [2].

Sejalan dengan pengembangan usaha budidaya gurame yang semakin luas, maka

kebutuhan benih gurame menjadi semakin meningkat. Namun, permasalahan yang sering dihadapi dalam budidaya gurame ini adalah tingginya tingkat mortalitas pada tahap larva dan benih yang mencapai 50-70% [3]. Faktor lingkungan dapat berperan sebagai pemicu terjadinya stres pada benih gurame yang kemudian akan memicu munculnya penyakit yang disebabkan oleh bakteri maupun virus [4].

*Red sea bream iridovirus* (RSIV) adalah virus DNA untai ganda (110 kbp) yang diklasifikasikan ke dalam genus *Megalocytivirus* dan famili *Iridoviridae* [5]. RSIV merupakan agen penyebab *red sea iridoviral disease* (RSIVD) dan pertama kali diisolasi dari ikan laut merah (*Pagrus major*) di Jepang pada tahun 1990.

RSIV menginfeksi ikan pada periode suhu air yang relatif tinggi. Gejala klinis pada ikan yang terinfeksi RSIV ditandai dengan ikan menjadi lesu, berenang abnormal, mengalami anemia berat, terdapat ruam pada insang serta terjadi pembengkakan pada limpa dengan mortalitas mencapai 20-60% [6]. Infeksi yang disebabkan oleh RSIV menyebabkan kematian massal dan kerugian besar pada budidaya ikan laut maupun ikan air tawar di Jepang dan Asia Tenggara [7], termasuk di Indonesia [8].

Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (KIPM) Yogyakarta sebagai Unit Pelaksana Teknis (UPT) BKIPM di wilayah Daerah Istimewa Yogyakarta memiliki tugas untuk mencegah masuk dan tersebarnya hama penyakit ikan (HPI) serta hama dan penyakit ikan karantina (HPIK). Hal ini didasari karena banyaknya komoditas ikan yang dilalulintaskan melalui ekspor, impor maupun domestik. Sebagai langkah antisipasi, Stasiun KIPM Yogyakarta melakukan deteksi dini sebagai cara untuk meminimalisir dan mencegah terjadinya wabah atau penularan yang lebih luas pada ikan budidaya, salah satunya yang disebabkan oleh infeksi RSIV.

RSIV dapat dideteksi secara cepat menggunakan teknik *Polymerase chain reaction* (PCR). PCR merupakan teknik untuk memperbanyak salinan untai DNA menggunakan sepasang primer melalui reaksi enzimatik oleh DNA *polimerase* dalam kondisi suhu yang telah diatur pada

mesin PCR [9]. Teknik PCR memiliki sensitifitas yang baik dan kemampuan untuk menguji berbagai agen patogen dalam berbagai jenis sampel [10]. Oleh karena itu, teknik PCR dapat digunakan untuk deteksi cepat pada ikan yang terinfeksi RSIV. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi RSIV pada benih gurame dengan teknik PCR di Stasiun KIPM Yogyakarta.

## 2. METODE

Penelitian ini dilakukan dengan metode deskriptif kualitatif. Sampel benih gurame yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari pengguna jasa yang mengikuti program cara karantina ikan yang baik (CKIB). Pengumpulan data dilakukan berdasarkan pengujian eksperimental di laboratorium secara langsung. Adapun penelitian ini dilaksanakan di Stasiun KIPM Yogyakarta.

### 2.1. Preparasi Sampel Benih Gurame

Sampel benih gurame dilabeli terlebih dahulu dengan menuliskan kode berupa nama program (CKIB), tanggal masuk sampel dan nomor urut untuk membedakan dengan sampel lainnya. Sampel benih gurame pada penelitian ini tidak dilakukan pembedahan, melainkan seluruh organ tubuh yang dijadikan sebagai target pegujian karena ukuran tubuhnya < 2 cm (Gambar 1). Sampel selanjutnya dimasukkan ke dalam mikrotube yang telah dilabeli sebelumnya.



Gambar 1. Sampel benih gurame

## 2.2. Ekstraksi DNA Virus Pada Sampel Benih Gurame

Ekstraksi DNA dilakukan untuk mendapatkan DNA murni. Ekstraksi DNA pada benih gurame mengacu pada metode *The Office International des Epizooties* (OIE) [11]. Ekstraksi DNA pada penelitian ini menggunakan *Wizard Genomic Purification Kit* (Promega). Sampel benih gurame hasil preparasi selanjutnya dilakukan pelisisan sel secara fisik yaitu dengan penggerusan yang sebelumnya sudah ditambahkan dengan 300  $\mu\text{L}$  *nuclei lysis solution*. Sampel diinkubasi pada suhu 75°C selama 30 menit. Kemudian ditambahkan 3  $\mu\text{L}$  *RNAse solution* untuk menghilangkan RNA. Sampel di vortex supaya homogen dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. *Protein precipitation solution* ditambahkan sebanyak 200  $\mu\text{L}$ , kemudian di vortex. Sampel di *sentrifuge* dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam mikrotube baru. Sebanyak 600  $\mu\text{L}$  isopropanol ditambahkan, dan mikrotube diinversi hingga benang-benang DNA terlihat. Sampel di *sentrifuge* kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Hasil sentrifugasi akan terbentuk pellet putih yaitu berupa endapan DNA pada *tube*. Supernatan dibuang dan pellet dicuci dengan 600  $\mu\text{L}$  ethanol dingin, dan sampel di *sentrifuge* kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Pencucian dengan ethanol dingin diulang sebanyak 3 kali agar pengotor atau kontaminan benar-benar hilang. Pellet dikering anginkan pada suhu ruang selama 10-15 menit sampai *tube* benar-benar kering. Selanjutnya ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  *DNA rehydration solution*. Sampel DNA yang telah murni selanjutnya akan digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi DNA.

## 2.3. Amplifikasi DNA Virus Dengan Teknik PCR

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR mengacu pada metode *The Office International des Epizooties* (OIE) [11]. Amplifikasi DNA menggunakan sepasang

primer spesifik RSIV yaitu primer *forward* 1F (5'-CTCAACACTCTGGCTCATC-3') dan primer *reverse* 1R (5'-GCACCAAC-ACATCTCCTATC-3'). Total volume reaksi PCR dalam PCR-*tube* adalah 25  $\mu\text{L}$  yang mengandung 12,5  $\mu\text{L}$  *Go Taq Green Master Mix* (Promega), 11  $\mu\text{L}$  *nuclease free water* (NFW), 0,5  $\mu\text{L}$  *DNA template*, serta primer *forward* 1F dan *reverse* 1R masing-masing sebanyak 0,5  $\mu\text{L}$ . Proses amplifikasi dilakukan dengan mesin *thermal cycler* dengan pengaturan program yaitu pre-denaturasi (94°C selama 2 menit), denaturasi (94°C selama 30 detik), *annealing* (57°C selama 1 menit), *extension* (72°C selama 1 menit) dan *final extension* (72°C selama 5 menit). Tahapan amplifikasi diulang sebanyak 30 siklus. Amplikon yang dihasilkan memiliki ukuran 570 bp.

## 2.4. Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA

Visualisasi produk PCR dilakukan dengan metode elektroforesis mengikuti metode *The Office International des Epizooties* (OIE) [11]. Gel *agarose* 1% dibuat dengan mencampurkan *agarose* dengan *buffer* TAE, kemudian dimasukkan ke dalam oven selama 10 menit. Setelah itu, larutan *agarose* didiamkan hingga suhunya turun. Selanjutnya ke dalam larutan ditambahkan 3  $\mu\text{L}$  *FloroSafe* sebagai *gel stain*. Produk PCR dimasukkan ke dalam sumuran gel sebanyak 5  $\mu\text{L}$ . Selanjutnya, 5  $\mu\text{L}$  *DNA marker* (100 bp) dimasukkan ke dalam sumuran gel untuk menentukan panjang *base pair* (bp). Kontrol positif yang digunakan yaitu DNA RSIV koleksi dari Laboratorium Virus di Stasiun KIPM Yogyakarta serta kontrol negatif yaitu NFW. Sampel DNA tersebut dielektroforesis dengan 100 Volt selama 30 menit. Setelah itu, gel *agarose* divisualisasi dengan UV *transilluminator*.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

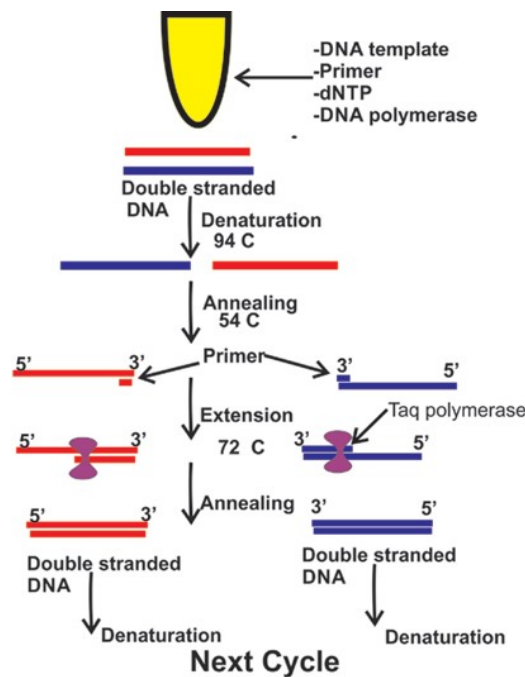
RSIV diketahui sebagai agen penyakit yang dapat menimbulkan kematian massal pada budidaya ikan laut maupun ikan air tawar. Mode utama transmisi RSIV adalah horizontal terutama melalui air [12] yang menyebabkan tingkat kematian pada ikan

mencapai 20-60%. Gejala klinis pada ikan yang terinfeksi RSIV ditandai dengan ikan menjadi lesu, berenang abnormal, mengalami anemia berat, terdapat ruam pada insang serta terjadi pembengkakan limpa dan berujung pada kematian ikan.

Teknik PCR digunakan untuk mendeteksi RSIV pada benih gurame di Stasiun KIPM Yogyakarta. Teknik ini didasarkan pada proses amplifikasi atau perbanyakan DNA menggunakan sepasang primer melalui reaksi enzimatik. Primer merupakan salah satu bagian penting

dalam reaksi PCR yang berfungsi sebagai inisiator pada sintesis DNA target. Selain primer, DNA *template*, nukleotida dan DNA *polymerase* dicampur dalam PCR-*tube* dan dimasukkan ke dalam mesin yang dapat mengontrol suhu [9]. Amplifikasi DNA dengan teknik PCR secara umum terdiri dari beberapa tahap diantaranya denaturasi, *annealing* dan *extension* (Gambar 2).

Denaturasi merupakan proses pelepasan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal dengan suhu yang tinggi.



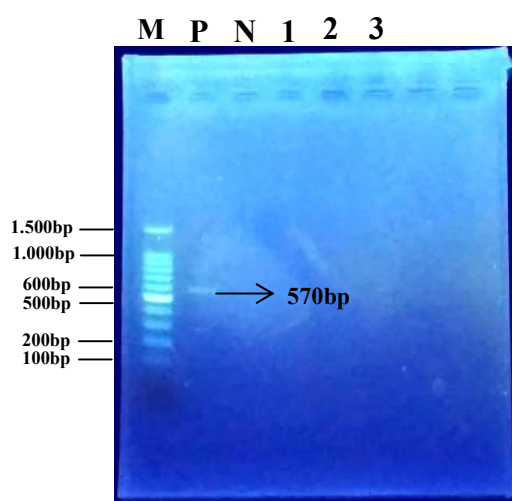
Gambar 2. Skema prinsip dasar teknik PCR [13].

Proses ini akan memudahkan primer untuk menempel pada untai DNA. Proses penempelan primer spesifik terjadi pada tahap *annealing*, dimana primer akan menempel dengan sekuen DNA yang komplementer pada ujung 3'. Selanjutnya untai DNA akan disintesis oleh enzim DNA *polymerase* (*Taq polymerase*) untuk tahap pemanjangan (*extension*) yang dimulai pada ujung 3' ke ujung 5', kemudian akan terbentuk DNA untai ganda yang baru [13]. Adapun pada penelitian ini dilakukan proses pre-denaturasi dan *final extension*. Pre-denaturasi merupakan tahap awal amplifikasi untuk menyiapkan suhu pada

*thermal cycler* sebelum dilakukan proses denaturasi. Sedangkan *final extension* dilakukan agar proses pemanjangan dengan enzim DNA *polymerase* terjadi secara optimal. Amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 30 siklus, agar DNA target dapat terlihat ketika dilakukan elektroforesis.

Berdasarkan visualisasi gel elektroforesis yang ditunjukkan oleh Gambar 3 didapatkan hasil negatif RSIV pada tiga sampel benih gurame. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terbentuknya pita DNA pada sampel yang sejajar dengan marker dan kontrol positif (570 bp) pada gel elektroforesis. Sedangkan sampel yang

positif terinfeksi RSIV akan terbentuk pita DNA yang sejajar dengan marker dan kontrol positif.



Gambar 3. Visualisasi DNA pada gel elektroforesis. M (Marker); P (Kontrol positif); N (Kontrol negatif); 1-3 (sampel).

Tabel 1. Hasil pengujian RSIV pada benih gurame dengan PCR

Nomor sampel	Kode Sampel	Hasil Pengujian PCR
1	CKIB/220419/02	Negatif
2	CKIB/230419/01	Negatif
3	CKIB/240419/01d	Negatif

Tabel 1 menunjukkan data pengujian PCR pada sampel benih gurame dari pengguna jasa CKIB dengan hasil negatif. Sampel benih gurame yang dilakukan pengujian dapat dinyatakan bebas dari infeksi RSIV. Selanjutnya, Stasiun KIPM Yogyakarta akan memberikan Laporan Hasil Pengujian (LHP) dan Sertifikat Kesehatan Ikan sebagai tanda bukti telah memenuhi persyaratan bahwa komoditas yang akan dilalulintaskan atau yang akan dilakukan pengiriman telah melalui tahap uji kesehatan ikan.

#### 4. KESIMPULAN

Teknik PCR dapat digunakan untuk deteksi RSIV pada benih gurame karena memiliki spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi. Berdasarkan hasil penelitian pada ketiga sampel yang diuji tidak ditemukan sampel benih gurame yang positif terinfeksi RSIV. Hal ini ditandai dengan

tidak terbentuknya pita DNA pada sampel yang sejajar dengan marker dan kontrol positif (570 bp) pada gel elektroforesis.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada Stasiun KIPM Yogyakarta yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan penelitian ini di Laboratorium Virus Stasiun KIPM Yogyakarta dan juga kepada pihak lain yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian ini.

#### REFERENSI

- [1] Budiana, Rahardja BS. Teknik Pembenihan Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*) Di Balai Benih Ikan Ngoro, Jombang. *Journal of Aquacultur and Fish Health*. 2018; 7(3):1–8.
- [2] Kusbiyanto, Nuryanto A, Soedibja PHT. Deteksi gen major histocompatibility complex class II pada yuwana gurami



- sowang, *Osphronemus goramy* Lacepede, 1801 asal satu pemijahan. *Jurnal Iktiologi Indonesia*. 2016; 16(3):279–88.
- [3] Lucas WGF, Kalesaran OJ, Lumenta C. Pertumbuhan dan kelangsungan hidup larva gurami (*Osphronemus gouramy*) dengan pemberian beberapa jenis pakan. *Jurnal Budidaya Perairan*. 2015; 3(2):19–28.
- [4] Prasetyo AD, Marmaini, Fitriyanti R. Uji toksisitas ginseng kiyapi pada benih ikan gurami (*Osphronemus goramy* LAC). *Jurnal Ilmu-ilmu Perikanan dan Budidaya Perairan*. 2017; 12(2):1–5.
- [5] Jancovich J., Chinchar V., Hyatt A, Miyazaki T, Williams T, Zhang Q. Family Iridoviridae. In: *Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2012. p. 193–210.
- [6] Kurita J, Nakajima K. Megalocytiviruses. *Viruses*. 2012; 4:521–38.
- [7] Ito T, Yoshiura Y, Kamaishi T, Yoshida K, Nakajima K. Prevalence of red sea bream iridovirus among organs of Japanese amberjack (*Seriola quinqueradiata*) exposed to cultured red sea bream iridovirus. *Journal of General Virology*. 2013; 94:2094–101.
- [8] Ma'mun F, Imanudin K, Untari T. Identification of iridovirus based on molecular and imunohistochemistry studies on the grouper fish (*Epinephelus* sp.) in Lombok, Indonesia. *Research Journal of Agriculture and Environmental Management*. 2018; 7(2):18–22.
- [9] Kumar V, Barman D, Kumar A. Immunoserological and molecular techniques used in fish disease diagnosis-A mini review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 2014; 1(3):111–7.
- [10] Miller M, Sabrautzki S, Beyerlein A, Brielmeier M. Combining fish and environmental PCR for diagnostics of diseased laboratory zebrafish in recirculating systems. *PLoS One*. 2019; 14(9):4–12.
- [11] OIE. Red sea bream iridoviral disease. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. 2009. p. 251–61.
- [12] Sivasankar P. A review on DNA viral diseases of fish. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 2017; 5(4):443–50.
- [13] Dey P. Polymerase chain reaction: principle, technique and applications in pathology. In: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. 2018. p. 201–11.