DETEKSI MOLEKULER MEGALOCYTIVIRUS PADA IKAN NEON TETRA (*Paracheirodon innesi*) YANG DILALULINTASKAN DI BALAI BESAR KIPM JAKARTA I

M.Affandi, Firsty Rahmatia
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Satya Negara Indonesia

ABSTRAK

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Balai Besar KIPM Jakarta I dimulai dari bulan Juni 2018 sampai Juli 2018. Pengambilan sampel uji dilakukan di daerah mayoritas suplayer atau eksportir ikan mengambil ikan seperti Bogor dan Depok. Sampel uji diambil dari beberapa farm kemudian dipilih secara acak dari beberapa akuarium pemeliharaan ikan. Jumlah sampel yang diambil sebanyak 19 ekor setiap farm berdasarkan dengan model perhitungan amos. Sampel kemudian diuji dengan metode PCR untuk mengetahui ada tidaknya Megalocytivirus. Hasil elektroforesis PCR dari seluruh sampel yang diuji tidak menunjukkan keberadaan Megalocytivirus. Meskipun dari hasil pemeriksaan klinis maupun laboratoris tidak ditemukan ikan yang terserang oleh Megalocytivirus namun tetap harus jadi perhatian karena ikan-ikan jenis tetra termasuk ikan neon tetra adalah agen pembawa Megalocytivirus. Namun kewaspadaan dalam budidaya perikanan terhadap penyakit perlu sekali mendapat perhatian utama.

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Ikan hias merupakan komoditas penting perikanan yang saat ini banyak menghasilkan devisa bagi negara. Berdasarkan data BPS-RI Tahun 2018 (Suhana. 2018), ekspor ikan hias Indonesia tahun 2017 mencapai US\$ 27,61 juta atau tumbuh 12,05 % dibandingkan tahun 2016 (US\$ 24,64 juta). Salah satu komoditas ikan hias yang memiliki peluang pasar tinggi adalah ikan neon tetra (*Paracheirodon innesi*), yang memiliki pasar mencakup wilayah Eropa, Amerika Serikat, Asia dan Australia.

Negara tujuan ekspor mensyaratkan bahwa ikan yang masuk ke negara mereka harus bebas dari berbagai macam penyakit salah satunya harus bebas dari Megalocytivirus. Deteksi dini Megalocytivirus pada komoditas ikan sangat diperlukan untuk mengurangi dampak kerugian yang disebabkan oleh serangan Megalocytivirus.

Pembatasan Masalah

Subjek penelitian : Ikan neon tetra (*Paracheirodon innesi*)
Objek penelitian : Keberadaan Megalocytivirus
Parameter penelitian : Deteksi Megalocytivirus pada ikan neon tetra

Rumusan Masalah

Negara tujuan ekspor mensyaratkan ikan yang masuk ke Negara mereka harus bebas dari berbagai penyakit, salah satunya adalah Megalocytivirus. Berdasarkan hal tersebut diatas perlu dilakukan penelitian deteksi Megalocytivirus sehingga dapat dilakukan pencegahan sebelum diserang oleh penyakit ini.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan Megalocytivirus pada ikan neon tetra yang akan dilalulintaskan di Balai Besar KIPM Jakarta

Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini untuk mendeteksi keberadaan Megalocytivirus pada ikan neon tetra yang akan dilalulintaskan di Balai Besar KIPM Jakarta I baik untuk kiriman domestik maupun untuk dieskpor keluar negeri, sehingga dapat mengurangi resiko ditolaknya ikan di daerah atau negara tujuan.

METODOLOGI

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Balai Besar KIPM Jakarta I dimulai dari bulan Juni 2018 sampai Juli 2018.

Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Alat pengukur konsentrasi DNA berbasis spektrofotometri UV, freezer (-20°C atau lebih rendah), heating block atau waterbath, laminar flow, mesin real time PCR, mini mixer, mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1000 µl, alat bedah pinset dan gunting, sentrifius, mini sentrifius, peralatan gelas, timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 µg.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Buffer tris EDTA , nuclease-free water, etanol, filtered microcip berbagai ukuran 0,1 µl – 1000 µl, isopropanol, kloroform, kit real-time PCR, larutan ekstraksi DNA, larutan penghambat DNase, masker, penggerus jaringan, plasmid standar positif Megalocytivirus, sarung tangan, 1 set primer dan probe, tabungan mikro ukuran 0,2 ml, 1,5 ml – 2 ml, tabungan atau microplate PCR optikal ukuran 0,1 ml – 0,2 ml atau tabungan kapiler ukuran 20 µl – 100 µl.

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel uji dilakukan di daerah mayoritas suplayer atau eksportir ikan mengambil ikan seperti Bogor dan Depok. Sampel uji diambil dari beberapa farm kemudian dipilih secara acak dari beberapa akuarium pemeliharaan ikan. Penentuan besaran contoh uji pada suatu populasi berdasarkan Martin et al.(1987) menggunakan pendekatan tingkat akurasi 95% dan error 5%. Sebagai perhitungan awal asumsi prevalensi ditetapkan sebanyak 15%. Jumlah sampel yang diambil berdasarkan dengan model perhitungan amos sesuai dengan Surat Keputusan Kepala Badan KIPM No. 32/KEP-BKIPM/2015.

Sumber : Modifikasi Amos (1985) dalam

SOP Pengambilan Contoh Media pembawa Hidup dan Non Hidup

Berdasarkan Tabel 1 maka penghitungan jumlah sampel yang diuji pada penelitian ini disajikan pada tabel di bawah ini (Tabel. 2)

Tabel 2. Jumlah Sampel Ikan Untuk Pengujian

No	Asal Sampel	Σ Populasi (ekor)	Σ Sampel (ekor)
1	Bogor 1	10000	19
2	Bogor 2	8000	19
3	Bogor 3	7000	19
No	Asal Sampel	Σ Populasi (ekor)	Σ Sampel (ekor)
1	Depok 1	10000	19
2	Depok 2	9000	19
3	Depok 3	10000	19
	Jumlah	54000	114

Prosedur

Persiapan contoh uji

Langkah-langkah persiapan contoh uji sebagai berikut : ikan ukuran kecil (kurang dari 1 cm), maka diambil contoh uji secara utuh, jika ikan ukuran sedang (ukuran 1 cm – 6 cm), maka ambil contoh uji dari insang, hati dan limpa, dan ikan ukuran lebih dari 6 cm, maka ambil contoh uji dari insang, hati dan limpa baik dalam kondisi segar atau beku (-20°C) atau yang sudah diawetkan dalam larutan preservative DNA.

Ekstraksi DNA dengan Metode Preseipitasi

Langkah-langkahnya sebagai berikut : masukkan 20 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml, tambahkan 600 μl larutan kit ekstraksi DNA komersial Dodecyl trimethyl bromide-ammonium (DTAB), homogenkan menggunakan penggerus pellet, inkubasi pada suhu 75°C selama 5 menit, dan dinginkan pada suhu 25°C , tambahkan 700 μl kloroform, tutup tabung mikro dan kocok dengan minimixer selama 20 detik, sentrifugasi contoh uji pada 12000 x g selama 5 menit, pindahkan 200 μl cairan lapisan paling atas ke dalam tabung mikro baru, tambahkan larutan kit ekstraksi Cetyl

trimethylammonium bromide (CTAB) sebanyak 100 µl dan ddH₂O sebanyak 900 µl, kocok dengan minimixer dan inkubasikan pada suhu 75°C selama 5 menit, sentrifugasi pada 12000 x g selama 5 menit, pindahkan cairan bening ke dalam tabung mikro baru yang berisi 300 µl etanol 95%, homogenkan dengan minimixer, sentrifugasi pada 12000 x g selama 5 menit, buang supernatant, cuci pellet dengan 200 µl etanol 75%, sentrifugasi pada 7500 x g selama 2 menit, keringkan pellet DNA, larutkan pellet DNA dengan ddH₂O atau TE buffer, simpan larutan DNA pada suhu -20°C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada freezer dengan suhu yang lebih rendah (kurang dari -40°C) dalam bentuk alikuot.

Pengukuran DNA Langkah-langkahnya sebagai berikut

: ukur konsentrasi DNA dengan alat pengukur konsentrasi DNA pada panjang gelombang 260 nm, periksa kemurnian DNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan, simpan larutan DNA pada suhu -20°C apabila tidak langsung digunakan.

Amplifikasi Langkah-langkahnya sebagai berikut

: cairkan DNA template, Quantitect 2x PCR master Mix, primer, probe, Nuclease-free water dengan meletakkan di atas rak blok es, buat preparasi master mix, siapkan volume master mix n+1, (n = setiap 10 jumlah reaksi) lebih banyak dari yang dibutuhkan. Contoh uji minimal dianalisis secara duplo, homogenkan semua bahan master mix dan distribusikan ke masing-masing tabung/plate PCR optikal, masukkan 2 µl template DNA (10 ng – 100 ng) contoh uji, control positif ekstraksi, control negatif ekstraksi, control positif amplifikasi (DNA), control negatif amplifikasi (NTC) dan 4 standar positif, lakukan amplifikasi dengan real-time PCR

Interpretasi Hasil

Hasil data berdasarkan software real-time PCR yang digunakan selanjutnya dianalisis secara deskriptif.

Parameter Uji

Deteksi virus hasil real time PCR

Parameter ini dianalisis berdasarkan hasil akhir real time PCR dan dibandingkan dengan kontrol positif/negatif. Infestasi (Dogiel dkk.,1970) Infestasi menunjukkan jumlah ikan yang terinfeksi dari sampel yang diuji Infestasi(%)

$$= \frac{h}{h} 100\%$$

Gejala klinis

Parameter ini diamati berdasarkan data sekunder dan primer yang ditemukan di tempat pengambilan sampel. Gejala klinis meliputi perubahan morfologi, nafsu makan dan tingkah laku ikan.

Analisis Data

Data deteksi Megalocytivirus pada ikan Neon Tetra yang di lalulintaskan di Balai Besar KIPM Jakarta I disajikan dalam bentuk tabel dan gambar serta dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya serangan Megalocytivirus pada ikan neon tetra yang dilalulintaskan di Balai Besar KIPM Jakarta I. Sampel ikan diperiksa morfologi organ dalamnya (Gambar 4) dan dilanjutkan pengujian dengan metode PCR.

Gambar 4. Penampakan morfologi organdalam ikan neon tetra

Hasil elektroforesis PCR dapat dilihat pada tabel 4. Jumlah sampel yang diuji adalah sebanyak 6 sampel yang berasal dari Bogor 1, Bogor 2, Bogor 3, Depok 1, Depok 2 dan Depok 3.

Tabel. 3 Hasil Elektroforesis Megalocytivirus pada Ikan Neon Tetra

NO	HASIL	KETERANGAN
1	M + - 1 2 3	Hasil elektroforesis sampel insang, hati dan limpa pada sampel ikan dari wilayah Bogor 1. Keterangan (M) marker, (+) kontrol positif, (-) kontrol negatif, (1) sampel 1, (2) sampel 2, (3) sampel 3
2	M + - 1 2 3 398 bp	Hasil elektroforesis sampel insang, hati dan limpa pada sampel ikan dari wilayah Bogor 2. Keterangan (M) marker, (+) kontrol positif, (-) kontrol negatif, (1) sampel 1, (2) sampel 2, (3) sampel 3
3	M + - 1 2 3	Hasil elektroforesis sampel insang, hati dan limpa pada sampel ikan dari wilayah Bogor 3.

	<p>398 bp</p>	<p>Keterangan (M) marker, (+) kontrol positif, (-) kontrol negatif, (1) sampel 1, (2) sampel 2, (3) sampel 3</p>
4	<p>M + - 12 3</p> <p>398 bp</p>	<p>Hasil elektroforesis sampel insang, hati dan limpa pada sampel ikan dari wilayah Depok 1. Keterangan (M) marker, (+) kontrol positif, (-) kontrol negatif, (1) sampel 1, (2) sampel 2, (3) sampel 3</p>
5	<p>M + - 1 2 3</p> <p>398 bp</p>	<p>Hasil elektroforesis sampel insang, hati dan limpa pada sampel ikan dari wilayah Depok 2. Keterangan (M) marker, (+) kontrol positif, (-) kontrol negatif, (1) sampel 1, (2) sampel 2, (3) sampel 3</p>

6	M + - 1 2 3 398 bp	Hasil elektroforesis sampel insang, hati dan limpa pada sampel ikan dari wilayah Depok 3. Keterangan (M) marker, (+) kontrol positif, (-) kontrol negatif, (1) sampel 1, (2) sampel 2, (3) sampel 3
---	--	---

Parameter kedua yang diamati adalah infestasi. Hasil pengamatan tersaji dalam Tabel 5 di bawah ini.

Tabel 5. Investasi jumlah ikan neon tetra yang terinfeksi

No	Asal Sampel	Σ Ikan Terserang	Σ Sampel	Infeksi (%)
1	Bogor 1	0	19	0
2	Bogor 2	0	19	0
3	Bogor 3	0	19	0
4	Depok 1	0	19	0
5	Depok 2	0	19	0
6	Depok 3	0	19	0

Parameter ketiga yang diamati adalah gejala klinis. Gejala klinis yang dijumpai dilapangan tidak menunjukkan perubahan morfologi ikan, nafsu makan ikan masih sangat baik dan tingkah laku berenang masih sangat aktif.

PEMBAHASAN

Dari pengujian sampel yang dilakukan selama penelitian ini dari sampel Bogor 1, Bogor 2, Bogor 3, Depok 1, Depok 2 dan Depok 3 pita negatif tidak muncul

sesuai dengan marker yang digunakan. Contoh uji dinyatakan positif apabila terlihat naiknya kurva diatas garis threshold/cut off dan nilai Ct lebih kecil atau sama dengan LoD, sedangkan contoh uji dinyatakan negatif apabila berada dibawah garis threshold/cut off dan nilai Ct lebih besar dari LoD dengan tingkat kepercayaan 95%.

Pada first step PCR amplikon yang dielektroforesis dikatakan positif jika terbaca atau terdapat pita tunggal pada 430 bp dan untuk nested PCR dikatakan positif jika terbaca atau terdapat pita tunggal pada 167 bp. Ini menunjukkan ikan neon tetra yang diuji bebas dari serangan Megalocytivirus dan dapat dikatakan bahwa ikan neon tetra yang berasal dari daerah Bogor dan Depok bebas dari Megalocytivirus.

Persentase infestasi ikan yang terserang penyakit Megalocytivirus dari sampel Bogor 1 sebesar 0 %, Bogor 2 sebesar 0 %, Bogor 3 sebesar 0 %, Depok 1 sebesar 0 %, Depok 2 sebesar 0 % dan Depok 3 sebesar 0 %, ini berarti indikasi ikan yang terserang penyakit tidak ada.

Gejala klinis yang ditemukan selama pengamatan dilapangan menunjukkan ikan masih sangat aktif berenang, nafsu makan bagus dan warna ikan sangat cerah. Pencegahan terhadap Megalocytivirus dapat dilakukan dengan Cara Berbudidaya Ikan yang Baik. Menggunakan air yang bebas dari pencemaran, menjaga kebersihan wadah dan alam pemeliharaan ikan, mengatur padat tebar ikan tiap kolam/akuarium, memberikan pakan sesuai aturan dan menggunakan obat atau bahan kimia yang sudah terdaftar dan tidak berlebihan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dari 6 (enam) titik pengambilan sampel (3 titik daerah Bogor dan 3 titik daerah Depok) dapat disimpulkan bahwa tidak terdeteksi ikan neon tetra (*Paracheirodon innesi*) yang terserang oleh Megalocytivirus baik ikan yang berasal dari daerah Bogor maupun dari daerah Depok.

Saran

Meskipun dari hasil pemeriksaan klinis maupun laboratoris tidak ditemukan ikan yang terserang oleh Megalocytivirus namun tetap harus jadi perhatian karena ikan-ikan jenis tetra termasuk ikan neon tetra adalah agen pembawa Megalocytivirus. Namun kewaspadaan dalam budidaya perikanan terhadap penyakit perlu sekali mendapat perhatian utama.

DAFTAR PUSTAKA

- Abangsoeharto."tahap-budidaya-ikan-hias-neon tetra".<https://www.google.com.sg/search?q=ikan+neon+tetra&source>. [12 April 2018, pk 20,28]
- Abidin, L.O.B., 2013, Deteksi Molekuler Megalocytivirus pada ikan Budidaya dengan Metode Polymerase Chain Reaction_Restriction Fragment Length Polymorphism. Tesis Program Studi Bioteknologi Sekolah Pascasarjana UGM. Yogyakarta.
- Andrew M. Q. King, Michael J Adams, Eric B. Carstens and Elliot J. Lefkowitz., 2012. Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. International Union of Microbiological Societies. Virology Division. Elsevier Academic Press.
- Balai Besar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Jakarta I. 2017. Laporan Pemantauan Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) Tahun 2017. Tangerang
- Balai Uji Standar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan. 2015. Protokol Pengujian PCR *Megalocytivirus*. Jakarta
- Chao, C.B., C.Y., Y.Y.Lai, C.S Lin and H.T Huang. 2004. Histological, Ultrastructural, and in situ Hybridization Study on Enlarged Cell in Grouper *Ephinephelus* Hybrids Infected by Grouper Iridovirus in Taiwan (TGIV). Dis. Aquat. Org., 58:127-142
- Lingga Pinus dan Heru Susanto, 1989, *Ikan Hias Air Tawar*, Penebar Swadaya Jakarta.
- Martin et al. (1987), Quaternary Evolution of The Central Part of The Brazilian Coast: The Role of Relative Sea-Level Variation and Shoreline Drift in Quaternary Coastal Geology of West Africa and South America, UNESCO reports in Marine Science, No. 43, Fig. 16, hal. 130
- Suhana. "Nilai Ekspor Ikan Hias Tahun 2017 Tumbuh 12,05 Persen".<https://suhana.web.id/2018/01/17/nilai-ekspor-ikan-hias-2017-tumbuh-1205-persen/>. [18 Agustus 2018, pk 18,36]