

Infeksi *Megalocytivirus* pada Budidaya Ikan Air Laut dan Ikan Air Tawar di Beberapa Provinsi di Indonesia

(*MEGALOCYTIVIRUS INFECTION IN MARINE AND FRESHWATER FISHES IN SEVERAL REGIONS IN INDONESIA*)

Achmad Bahtiar Rifai^{1,2}, Ni Luh Putu Ika Mayasari¹,
Lina Yulianah², Fachriyan Hasmi Pasaribu¹

¹Divisi Mikrobiologi Medik
Departemen Ilmu Penyakit Hewan
dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
Jl. Agatis Kampus Dramaga Bogor 16680 Indonesia
²Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu
dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Batam
Jl. M Nahar No 1 Batam Center,
Batam, Kepulauan Riau, Indonesia 29464
Email: abherifai@gmail.com

ABSTRAK

Megalocytivirus termasuk ke dalam anggota Family Iridoviridae dan menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat tinggi dalam budidaya ikan. *Megalocytivirus* memiliki tiga spesies antara lain *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus* (ISKNV), *Red Sea Bream Iridovirus* (RSIV), dan *Turbot Reddish Body Iridovirus* (TRBIV). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi virus Megalocyti dan mengidentifikasi spesies (ISKNV, RSIV, dan TRBIV) serta untuk menentukan status terbaru dari infeksi *Megalocytivirus* di Indonesia. Sampel diambil dari budidaya ikan air laut antara lain kerapu, barramundi, dan bawal bintang, sedangkan pada ikan air tawar adalah ikan gurami, nila, dan ikan hias air tawar dari 12 kabupaten di Indonesia. Ikan yang dipilih adalah ikan dengan tanda-tanda klinis, seperti tubuh terlihat gelap, nafsu makan menurun, angka kematian di atas 40%, kurang aktif berenang (lesu) dan memisahkan diri dari kelompok ikan lain. Metode untuk deteksi virus menggunakan tes koaglutinasi, dan identifikasi spesies menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan gen target *Major Capsid Protein* (MCP). Semua sampel dari Kota Medan di Provinsi Sumatera Utara menunjukkan hasil negatif baik secara serologis dan molekuler, sementara 11 provinsi lainnya memberikan hasil yang bervariasi. Semua sampel ikan air tawar antara lain ikan gurami dan ikan hias air tawar terinfeksi ISKNV, sedangkan ikan kerapu, kakap dan bawal bintang dari budidaya air laut terinfeksi ISKNV. Organisme RSIV ditemukan di dua provinsi yaitu Lampung dan Nusa Tenggara Barat yang menginfeksi ikan kerapu dan bawal bintang. Virus TRBIV tidak terdeteksi di semua sampel.

Kata-kata kunci: ISKNV; megalocytivirus; PCR; RSIV; TRBIV

ABSTRACT

Megalocytivirus is a member of Iridoviridae family and causes very high economic losses in fish farming. *Megalocytivirus* has three species, Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (ISKNV), Red Sea Bream Iridovirus (RSIV), and Turbot Reddish Body Iridovirus (TRBIV). This study aims to detect *Megalocytivirus* and identify the species (ISKNV, RSIV and TRBIV) in order to determine the latest status of *Megalocytivirus* infection in Indonesia. Samples were taken from marineculture include grouper, barramundi and silver pomfret, while in freshwater fishes were gourami, tilapia and freshwater ornamental fish from several provinces in Indonesia. Selected samples were fishes with clinical signs such as the body looks dark, lost appetite, mortality rate above 40%, less active in swimming (lethargy) and separated from the groups. The The co-agglutination test was used for virus detection, and species identification was carried out using the Polymerase Chain Reaction (PCR) with Major Capsid Protein (MCP) as the target

gene. All samples from Medan City of North Sumatra Province showed negative results in both serology-based and molecular-based detection, while 11 other provinces gave mixed results. All freshwater fish samples included gourami and freshwater ornamental fish were infected with ISKNV, while grouper, barramundi, and silver pomfret from marine culture were infected with ISKNV. RSIV was found in two provinces, namely Lampung and West Nusa Tenggara, which infect groupers and pomfret. The TRBIV virus was not detected in all samples.

Keywords: ISKNV; Megalocytivirus; PCR; RSIV; TRBIV

PENDAHULUAN

Salah satu kendala dalam budidaya ikan adalah serangan penyakit yang saat ini masih menjadi permasalahan. Penyakit pada ikan merupakan suatu keadaan abnormal yang ditandai dengan penurunan kemampuan ikan secara gradual dalam mempertahankan fungsi fisiologis normal (Irianto 2005). Faktor yang dapat memengaruhi penyebaran penyakit pada ikan; antara lain suhu air, perbedaan musim, dan sumber polusi pada air (Lafferty *et al.*, 2015). Ikan budidaya sangat rentan terhadap serangan infeksi mikroorganisme patogen seperti virus, bakteri, dan parasit (Adams dan Thompson 2006). Patogen yang dapat menyebabkan kerugian ekonomi mencapai 80% salah satunya adalah *Megalocytivirus*.

Megalocytivirus memiliki tiga spesies dua di antaranya, yaitu *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus* (ISKNV) dan *Red Sea Bream Iridovirus* (RSIV) sudah berhasil dideteksi di Indonesia (Abidin 2013), sedangkan *Turbo Reddish Body Iridovirus* (TRBIV) hanya pada ikan *flatfish* di Korea dan China (Jing *et al.*, 2018). *Megalocytivirus* dapat menyerang berbagai jenis ikan dan menyebabkan mortalitas 20–60% serta tersebar hampir di seluruh Asia. Infeksi *Megalocytivirus* telah terdeteksi di Indonesia, yakni pada ikan air tawar dan laut (Abidin 2013). *Megalocytivirus* menyerang lebih dari 30 spesies ikan laut yang dibudidayakan di berbagai negara (Kurita dan Nakajima, 2012). Wabah akibat *Megalocytivirus* bersifat *epizootic* yang dapat menyebabkan kematian masal ikan budidaya dalam waktu yang relatif singkat (1-2 minggu) dari awal kejadian. Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia mengeluarkan surat keputusan nomor 81 tahun 2015 tentang daerah penyebaran *Megalocytivirus* di Indonesia saat ini adalah Sumatera Utara, Sumatera Barat, Lampung, Bali, dan Kepulauan Riau (KKP 2015a). Penyebaran *Megalocytivirus* sangat cepat akibat dari lalulintas ataupun dari perdagangan baik domestik maupun internasional.

Infeksi *Megalocytivirus* sebagian besar dapat ditularkan secara horizontal antar individu (He *et al.*, 2002) dan melalui air atau jaringan yang terinfeksi (He *et al.*, 2002; Go *et al.*, 2006; Subramaniam *et al.*, 2012), namun infeksi secara umum ditandai dengan kerusakan dan pembengkakan limpa dan ginjal kemudian diikuti dengan kematian inang (Sung *et al.*, 2010). Karakteristik infeksi pada masing-masing spesies *Megalocytivirus* sangat identik sehingga pengamatan secara gejala klinis untuk membedakan spesies penyebab sangat sulit dilakukan.

Saat ini sudah terdapat beberapa model vaksin seperti vaksin inaktif, rekombinan protein maupun DNA vaksin dan sudah dilakukan penelitian dengan hasil yang mampu mencegah infeksi *Megalocytivirus*. Berdasarkan surat keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia nomor 80 tahun 2015 *Megalocytivirus* digolongkan sebagai Hama Penyakit Ikan Karantina Golongan 1, sehingga penyakit ini menjadi salah satu prioritas dan diperlukan pengawasan serta pencegahan yang ketat agar tidak menyebar luas ke daerah yang masih bebas (KKP 2015b). Selain itu metode uji yang cepat dan tepat untuk mendeteksi penyakit ini secara dini sangat diperlukan, maka kesiapan pemerintah provinsi, kabupaten ataupun kota dituntut agar dapat mendukung upaya pencegahan dan penularan penyakit tersebut, agar kerugian ekonomi industri budidaya perikanan laut maupun tawar dapat dicegah. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi infeksi *Megalocytivirus* dan melakukan identifikasi spesies *Megalocytivirus* yang menyebabkan infeksi dibudidaya ikan di Indonesia sehingga diperoleh informasi terbaru tentang daerah yang terinfeksi *Megalocytivirus*.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan bulan Agustus 2018 sampai Juni 2019 di Laboratorium Balai Uji Standar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Jakarta.

Tahapan Penelitian

Penelitian dilakukan dalam lima tahapan, yaitu 1) pengambilan sampel ikan sakit; 2) uji serologis dengan kit koaglutinasi; 3) ekstraksi DNA; 4) deteksi *Megalocytivirus* menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR); dan 5) deteksi spesies *Megalocytivirus* dengan metode PCR.

Sampel Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di beberapa Provinsi di Indonesia antara lain Sumatera Utara, Sumatera Barat, Kepulauan Riau, Lampung, Banten, Daerah Khusus Ibukota (DKI) Jakarta, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Bali, Nusa Tenggara Barat (NTB), dan Maluku. Sampel yang dipilih adalah ikan yang sakit dengan tanda-tanda warna tubuh ikan menjadi lebih gelap, berenang ditepian atau di dasar kolam dan memisahkan diri dari kelompok ikan lain. Sampel ikan berasal dari ikan air laut, terdiri dari ikan kakap, kerapu, dan bawal bintang yang diambil dari keramba jaring apung, sedangkan ikan air tawar terdiri dari ikan gurami, cupang, gurami hias, dan nila yang diambil dari kolam tanah dan akuarium. Ikan tersebut dibawa ke laboratorium dengan menggunakan rantai dingin dengan suhu minimal 4°C, lalu dinekropsi untuk diambil organ ginjal dan limpa dari masing-masing ikan. Organ limpa dan ginjal tersebut dibagi menjadi beberapa bagian, sebagian digunakan untuk pengujian serologis dan molekuler, sebagian lagi disimpan dalam *freezer* -20°C untuk arsip.

Uji Serologis

Kit koaglutinasi *Megalocytivirus* untuk uji serologis didapatkan dari Balai Karantina Ikan Tanjungpinang, Kepulauan Riau berdasarkan metode Saharia dan Prasad (2011). Sampel organ limpa dan ginjal digerus dan dibuat suspensi organ menggunakan pelarut *buffer saline* dengan perbandingan 1:1 (g/L) dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Filtrat/supernatan dari sampel diteteskan pada gelas objek dan ditambahkan reagen koaglutinasi dengan volume yang sama (1:1). Pengamatan aglutinasi dilakukan setelah inkubasi selama 30 menit. Hasil positif menunjukkan adanya aglutinasi (terbentuk butiran pasir halus) yang artinya terbentuk ikatan antara antigen dan antibodi yang homolog.

Ekstraksi *Deoxyribo Nucleis Acid* (DNA)

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan DNA-ase (DNeasy® Blood and Tissue Kit, Qiagen). Sampel organ ginjal dan limpa untuk uji molekuler sebanyak 25-30 mg dipotong kecil-kecil kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 mL. Tahapan selanjutnya dilakukan sesuai dengan panduan perusahaan. Hasil DNA kemudian disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20 °C.

Deteksi *Megalocytivirus* dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Keberadaan *Megalocytivirus* dideteksi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan *HotStarTaq® Master Mix Kit* (Qiagen). Amplifikasi menggunakan primer *forward* 52 -AGGTGTCGGTGTCATTAAC GACCTG-32 dan *reverse* 52 -TCTCAGGCATG CTGGGCGCAAAG-32 (Kurita dan Nakajima, 2012). Gen target untuk *Megalocytivirus* adalah *Major Capsid Protein* (MCP) dengan panjang amplicon 777 bp. Amplifikasi PCR dilakukan dengan total volume 25 μ L larutan reaksi yang terdiri dari 8,5 μ L *RNase-free water*, 1,5 μ L *HotStarTaq Master Mix 2 \times* (Qiagen), 1 μ L primer *forward* (10 μ M), 1 μ L primer *reverse* (10 μ M) dan 2 μ L sampel DNA. Siklus amplifikasi diawali dengan pre denaturasi 94 °C selama tiga menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 94 °C selama 30 detik, *annealing* 58 °C selama satu menit, ekstensi pada suhu 72 °C selama satu menit dan ekstensi akhir satu siklus pada suhu 72 °C selama 10 menit. Hasil PCR selanjutnya divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan 1,5% *agarose gel* dan pewarnaan menggunakan SYBR Green 0,5 μ g/mL. Marker yang digunakan adalah DNA marker 100 bp.

Deteksi Spesies *Megalocytivirus* dengan Metode PCR

Sampel yang menunjukkan hasil positif terhadap deteksi *Megalocytivirus* kemudian dilanjutkan dengan deteksi terhadap spesies ISKNV, RSIV dan TRBIV menggunakan metode PCR. Gen target, sekuen primer, dan panjang amplicon ditampilkan pada Tabel 1.

Amplifikasi PCR dilakukan dengan total volume 25 μ L yang terdiri dari 8,5 μ L *RNase-free water*, 12,5 μ L *HotStarTaq Master Mix 2 \times* (Qiagen), 1 μ L primer *forward* (10 μ M), 1 μ L primer *reverse* (10 μ M) dan 2 μ L sampel DNA. Siklus amplifikasi diawali dengan pre denaturasi

Tabel 1. Primer spesifik untuk deteksi spesies *Megalocytivirus*

Gen	Target spesies	Sekuen primer ^a	Panjang amplikon ^a
MCP	RSIV	(F) 52 -CCCGCACTGACCAACGTGTCC-32 (R) 52 -CACAGGGTGACTGAACCTCAGGTTCG-32	191 bp
MCP	ISKNV	(F) 52 -GGTGGCCGGCATCACCAACGGC-32 (R) 52 -ACGGGGTGACTGAACCTG-32	415 bp
MCP	TRBIV	(F) 52 -TTCATCGACATCTCCGCTTTC-32 (R) 52 -TSTGACCGTTGGTGATACCGGAG-32	453 bp

Keterangan: ^aKurita dan Nakajima, 2012

94 °C selama tiga menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 94 °C selama 30 detik, *annealing* untuk semua primer 58 °C selama satu menit, ekstensi pada suhu 72 °C selama satu menit dan ekstensi akhir satu siklus pada suhu 72 °C selama 10 menit. Hasil PCR selanjutnya divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan 1.5% *agarose gel* dan pewarnaan menggunakan *SYBR Green* 0,5 µg/mL. Marker yang digunakan adalah DNA marker 100bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perolehan Sampel Ikan dengan Tanda Klinis Infeksi Virus

Pada penelitian ini sebanyak 103 sampel ikan berhasil diperoleh dari 15 kabupaten di 12 provinsi di Indonesia. Sampel ikan air tawar diambil dari kolam tanah dan aquarium, sedangkan untuk ikan air laut diambil dari keramba jaring apung. Ikan air tawar yang diperoleh antara lain ikan gurami, gurami hias, dan cupang, sedangkan air laut antara lain ikan kerapu, kakap, dan bawal bintang dengan jumlah sampel masing-masing bervariasi (Tabel 2). Gejala klinis yang terlihat di antaranya adalah tubuh ikan terlihat gelap, nafsu makan berkurang, kurang aktif berenang (lesu) dan memisahkan diri dari kelompoknya, sedangkan berdasarkan hasil pengamatan patologi anatomi terlihat insang dan hati pucat, limpa dan ginjal mengalami pembengkakan. Menurut Wang *et al.* (2003), ikan yang kurang aktif berenang (lesu) diakibatkan karena kurangnya suplai oksigen yang disertai dengan anemia berat sehingga aktivitas jantung dan otot menurun. Secara umum, ikan yang terinfeksi *Megalocytivirus* dari tiga spesies yang ada memiliki kesamaan gejala klinis, sehingga sulit

untuk membedakan spesies penyebab infeksi hanya berdasarkan pada gejala klinis.

Hasil penelitian Subramaniam *et al.* (2012a) menunjukkan *Megalocytivirus* dapat menginfeksi ikan air laut dan ikan air tawar termasuk kerapu lumpur, kerapu malabar, gurami, *cichlid*, kakap dan *angelfish*. Beberapa peneliti mengungkapkan bahwa penyebaran *Megalocytivirus* dapat terjadi karena adanya lalu lintas ikan baik secara domestik, ekspor, dan impor (Sudthongkong *et al.*, 2002; Go *et al.*, 2006; Subramaniam *et al.*, 2012b). Penularan *Megalocytivirus* pada ikan yang rentan di suatu populasi dapat terjadi melalui air, memakan jaringan atau organisme yang terinfeksi (He *et al.*, 2002; Go *et al.*, 2006; Subramaniam *et al.*, 2012). Berdasarkan hasil percobaan di laboratorium menunjukan *Megalocytivirus* dapat ditularkan secara horizontal antar individu baik pada spesies ikan yang sama maupun yang berbeda, sedangkan penularan secara vertikal belum pernah dilaporkan (He *et al.*, 2002).

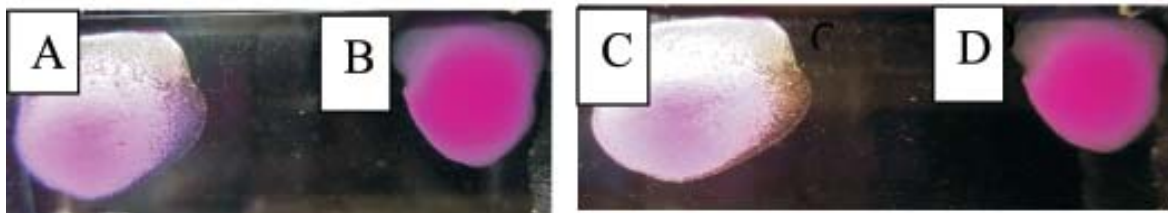
Deteksi *Megalocytivirus* dengan Uji Serologi

Seluruh sampel asal Sumatera Utara (10 sampel) menunjukkan hasil negatif secara serologis, sedangkan semua sampel dari Provinsi Jawa Tengah, Jawa Timur, Bali dan NTB menunjukkan hasil positif. Sampel asal Provinsi Sumatera Barat, Kepulauan Riau, Lampung, Banten, DKI Jakarta, Jawa Barat dan Maluku menunjukkan hasil yang bervariasi. Hasil uji koaglutinasi ditampilkan pada Tabel 3.

Berdasarkan pengujian dengan kit koaglutinasi, sampel ikan sakit yang diambil dari beberapa daerah di Indonesia menunjukkan adanya aglutinasi hanya dalam waktu 15 menit setelah direaksikan dengan antibodi terhadap *Megalocytivirus* yang ada dalam kit koaglutinasi (Gambar 1). Kit koaglutinasi mengandung

Tabel 2. Hasil perolehan sampel ikan air laut dan ikan air tawar dari 12 provinsi

Provinsi	Kabupaten/Kota	Jenis sampel ikan air laut	Jenis sampel ikan air tawar	Total jumlah sampel (ekor)
Sumatera Utara	Medan	Kerapu (5) *	Nila (5) *	10
Sumatera Barat	Pariaman	-	Gurami	10
Kepulauan Riau	Batam	Kerapu	-	5
	Tanjungpinang	Kerapu	-	8
	Bintan	Kakap	-	5
Lampung	Pesawaran	Kerapu	-	10
		Bawal bintang	-	5
Banten	Serang	-	Ikan hias tawar	5
DKI Jakarta	Kepulauan Seribu	Kerapu	-	5
Jawa Barat	Cirebon	-	Gurami	5
	Tasikmalaya	-	Gurami	5
Jawa Tengah	Jepara	Kerapu	-	5
Jawa Timur	Situbondo	Kerapu	-	5
Bali	Singaraja	Kerapu	-	5
Nusa Tenggara Barat	Lombok Barat	Kerapu	-	3
		Bawal bintang	-	2
Maluku	Ambon	Kakap putih	-	10
Total				103



Gambar 1. Hasil uji koaglutinasi terhadap *Megalocytivirus*, A dan C sampel positif *Megalocytivirus* yang ditandai dengan aglutinasi; B dan D sampel negatif *Megalocytivirus*.

antibodi terhadap *Megalocytivirus* dan protein A dari *Staphylococcus aureus* yang berikatan dengan bagian *fragment crystalizable* (FC) dari imunoglobulin G anti *Megalocytivirus*. Reaksi aglutinasi terjadi karena adanya ikatan antara *fragment antigen binding* (FAB) dari imunoglobulin G anti *Megalocytivirus* dengan bagian dari *Megalocytivirus* (antigen homolog) (Amanu *et al.*, 2016). Kit koaglutinasi ini merupakan metode pengembangan dalam mendiagnosis penyakit ikan terutama yang disebabkan oleh bakteri dan virus, seperti untuk deteksi *Vibrio fulnificus* (Simonson dan Siebeling, 1986), *Infectious hematopoietic necrosis virus* (IHNV) (Bootland dan Leong, 1992), *Pseudomonas fluorescens* (Saharia dan Prasad, 2001), *Viral nervous necrosis* (VNN) (Amanu *et al.*, 2015a) dan *Iridovirus* (Amanu *et al.*, 2015b).

Deteksi *Megalocytivirus* dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Deteksi *Megalocytivirus* dilakukan pada semua sampel ikan dengan target gen MCP pada panjang amplicon 777 bp. Pada Tabel 4 ditampilkan hasil uji deteksi *Megalocytivirus* yang berasal dari 12 Provinsi. Seluruh sampel (10) dari Provinsi Sumatera Utara menunjukkan hasil negatif dengan uji koaglutinasi dan PCR, meskipun sampel yang diambil merupakan ikan sakit dengan gejala klinis yang diduga karena infeksi *Megalocytivirus*. Hasil ini mengindikasikan bahwa infeksi yang terjadi pada seluruh sampel dari Provinsi Sumatera Utara bukan disebabkan oleh infeksi *Megalocytivirus*.

Seluruh sampel asal Provinsi Jawa Tengah dan Jawa Timur menunjukkan hasil positif pada uji PCR yang sejalan dengan hasil uji koaglutinasi. Hasil deteksi *Megalocytivirus*

Tabel 3. Hasil uji koaglutinasi *Megalocytivirus*

Provinsi	Kabupaten/Kota	Jumlah sampel	Hasil uji koaglutinasi		Persentase positif
			Positif	Negatif	
Sumatera Utara	Medan	10	0	10	0%
Sumatera Barat	Pariaman	10	3	7	30%
Kepulauan Riau	Batam	5	4	1	80%
	Tanjungpinang	8	5	3	62,5%
	Bintan	5	5	0	100%
Lampung	Pesawaran	15	9	6	60%
Banten	Serang	5	3	2	60%
DKI Jakarta	Kepulauan Seribu	5	1	4	20%
Jawa Barat	Cirebon	5	2	3	40%
	Tasikmalaya	5	2	3	40%
Jawa Tengah	Jepara	5	5	0	100%
Jawa Timur	Situbondo	5	5	0	100%
Bali	Singaraja	5	5	0	100%
Nusa Tenggara Barat	Lombok Barat	5	5	0	100%
Maluku	Ambon	10	5	5	50%
Total		103	59	44	

Tabel 4. Deteksi *Megalocytivirus* dengan *polymerase chain reaction* (PCR)

Provinsi	Kabupaten/Kota	Jumlah sampel	Positif koaglutinasi	PCR	
				Positif	Negatif
Sumatera Utara	Medan	10	0	0	10
Sumatera Barat	Pariaman	10	3	3	7
Kepulauan Riau	Batam	5	4	4	1
	Tanjungpinang	8	5	5	3
	Bintan	5	5	4	1
Lampung	Pesawaran	15	9	7	8
Banten	Serang	5	3	2	3
DKI Jakarta	Kepulauan Seribu	5	1	1	4
Jawa Barat	Cirebon	5	2	1	4
	Tasikmalaya	5	2	2	3
Jawa Tengah	Jepara	5	5	5	0
Jawa Timur	Situbondo	5	5	5	0
Bali	Singaraja	5	5	3	2
Nusa Tenggara Barat	Lombok Barat	5	5	4	1
Maluku	Ambon	10	5	5	5
Total		103	59	51	52

dengan PCR pada sampel ikan asal Provinsi Sumatera Barat, DKI Jakarta, Maluku dan Kepulauan Riau (Batam dan Tanjungpinang) juga menunjukkan hasil yang sama dengan hasil uji koaglutinasi. Sampel dari Provinsi Lampung, Banten, Jawa Barat, Bali, NTB dan Kepulauan Riau (Bintan) yang menunjukkan

hasil positif pada uji koaglutinasi tetapi tidak semuanya menunjukkan hasil yang positif terhadap *Megalocytivirus* dengan PCR.

Hal ini mengindikasikan adanya reaksi silang terhadap antibodi *Megalocytivirus* pada uji koaglutinasi dan kemungkinan antigen ini bukan termasuk genus *Megalocytivirus*,

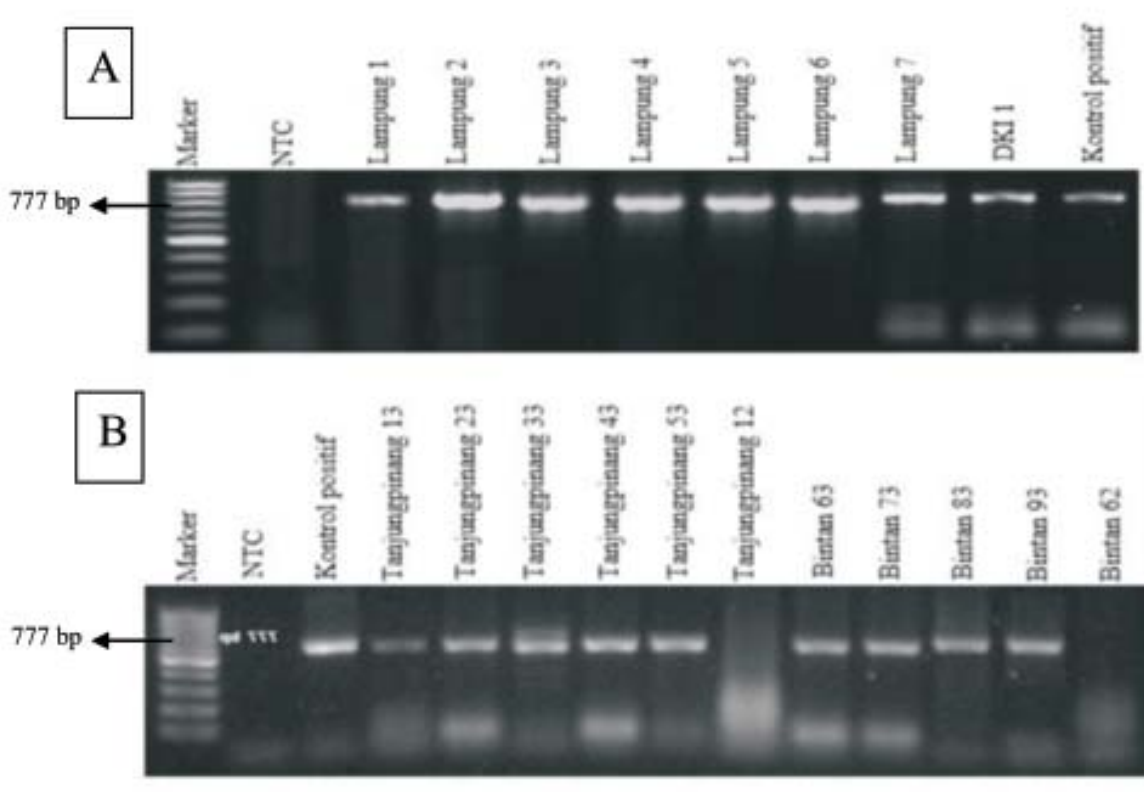
sehingga gejala klinis dan lesio yang ditemukan kemungkinan disebabkan oleh agen penyakit lainnya. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa uji koaglutinasi menggunakan antibodi *Megalocytivirus* dapat digunakan sebagai uji *screening* terhadap infeksi oleh genus *Megalocytivirus*, namun uji ini tidak dapat digunakan sebagai uji konfirmasi karena terdapat reaksi silang terhadap virus yang bukan termasuk genus *Megalocytivirus*. Berdasarkan laporan penelitian yang dilakukan Amanu *et al.* (2015) dan (2016) menyatakan bahwa sensitivitas uji koaglutinasi sangat tinggi untuk deteksi RSIV. *Polymerase Chain Reactio* (PCR) dapat digunakan untuk mendeteksi *Megalocytivirus* karena mempunyai spesifisitas 100% dan sensitivitas yang sangat tinggi (Rimmer *et al.*, 2012). Hasil amplifikasi PCR ditampilkan pada Gambar 1 (A dan B).

Deteksi *Megalocytivirus* yang sudah dilaporkan sebagian besar menggunakan sampel ikan budidaya yang menunjukkan gejala klinis adanya infeksi. Tanda klinis lebih sering terlihat pada ikan dengan kondisi di bawah tekanan dan pemeliharaan dengan kepadatan yang tinggi (Lafferty *et al.*, 2015). Infeksi

Megalocytivirus juga dapat menginfeksi ikan yang tidak dibudidayakan (kerapu kayu, kerapu kertang, bawal putih, ikan pipih, ikan kuro, ikan buntal dan beberapa jenis ikan lainnya). Hal ini dilaporkan oleh Wang *et al.* (2007) yang menguji 86 spesies ikan yang tidak dibudidayakan dengan hasil 39 spesies ikan positif terhadap ISKNV.

Kisaran inang *Megalocytivirus* relatif sangat luas pada jenis ikan air laut, air tawar dan air payau (Kurita dan Nakajima, 2012). Wabah *Megaocytivirus* telah dilaporkan terjadi pada ikan hias air tawar di Jerman dan Australia (Jung *et al.*, 2016; Nolan *et al.*, 2015), pada ikan nila (Subramaniam *et al.*, 2016), kakap merah di Jepang (Inouye *et al.*, 1992), dan pada ikan kakap putih di Vietnam (Dong *et al.*, 2017). Pada penelitian ini *Megalocytivirus* menginfeksi ikan kerapu, bawal bintang, kakap, gurami dan ikan hias air tawar.

Megalocytivirus dapat menginfeksi berbagai jenis ikan air laut dan ikan air tawar dan hampir menyebar di seluruh Provinsi di Indonesia. Penyebaran *Megalocytivirus* telah dilaporkan di beberapa negara antara lain Tiongkok, Hongkong, Korea Selatan, Malaysia, Philipina



Gambar 1. Amplifikasi deteksi *Megalocytivirus* menggunakan gen MCP pada panjang amplicon 777 bp A) Lampung dan DKI Jakarta, B) Kepulauan Riau

dan Thailand (OIE 2012), Australia (Go *et al.*, 2006), Indonesia (Mahardika *et al.*, 2009, Murwantoko *et al.*, 2018), Jerman (Jung *et al.*, 2016), dan Amerika Utara (Waltzek *et al.*, 2012). Infeksi *Megalocytivirus* dilaporkan pertama kali pada ikan kakap merah (*Pagrus major*) di Jepang (Inouye *et al.*, 1992), dan meyebar luas ke seluruh Asia (Kurita dan Nakajima, 2012).

Gen *Major Capsid Protein* (MCP) merupakan gen yang penting dalam menentukan analisis kekerabatan virus antara *family* Iridoviridae (Go *et al.*, 2006), sehingga gen MCP banyak digunakan oleh peneliti dalam mendesain primer untuk mendeteksi *Megalocytivirus*. Gen MCP mengkode protein kapsid yang merupakan komponen utama *Megalocytivirus*, meliputi 40–45% dari polipeptida partikel virus dan berukuran sekitar 50 kDa. Sekuen protein kapsid banyak digunakan untuk klasifikasi taksonomi karena relatif stabil, tetapi memiliki variasi basa yang dapat membedakan antar isolat virus yang dekat kekerabatannya. Kemiripan gen penyandi protein kapsid *Megalocytivirus* isolat Indonesia sangat tinggi, yaitu 99,8% pada level nukleotida dan 99,4% pada level asam amino (Murwantoko *et al.*, 2009).

Deteksi Spesies dari genus *Megalocytivirus* dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sebanyak 51 sampel yang positif terhadap genus *Megalocytivirus* selanjutnya dilakukan identifikasi spesies. Primer yang digunakan merupakan primer yang spesifik terhadap masing-masing spesies (ISKNV, RSIV, dan TRBIV). Spesifisitas primer ISKNV dan RSIV telah direkomendasikan oleh OIE (Kurita dan Nakajima, 2012). Hasil identifikasi spesies ISKNV, RSIV, dan TRBIV ditampilkan pada Tabel 5.

Hasil uji identifikasi spesies pada semua ikan air tawar yang positif *Megalocytivirus* dari Provinsi Sumatera Barat, Banten, dan Jawa Barat menunjukkan positif terhadap ISKNV. Pada sampel ikan air laut yang positif *Megalocytivirus* dari Provinsi Kepulauan Riau, DKI Jakarta, Jawa Timur, Bali dan Maluku hasil identifikasi spesiesnya menunjukkan semua sampel positif terhadap ISKNV. Tujuh sampel ikan air laut dari Provinsi Lampung menunjukkan lima sampel ikan bawal bintang positif ISKNV, dan dua sampel ikan kerapu positif RSIV. Semua sampel ikan air laut dari Provinsi Jawa Tengah dan Nusa Tenggara Barat menunjukkan positif RSIV.

Tabel 5. Deteksi spesies ISKNV, RSIV dan TRBIV dengan metode PCR

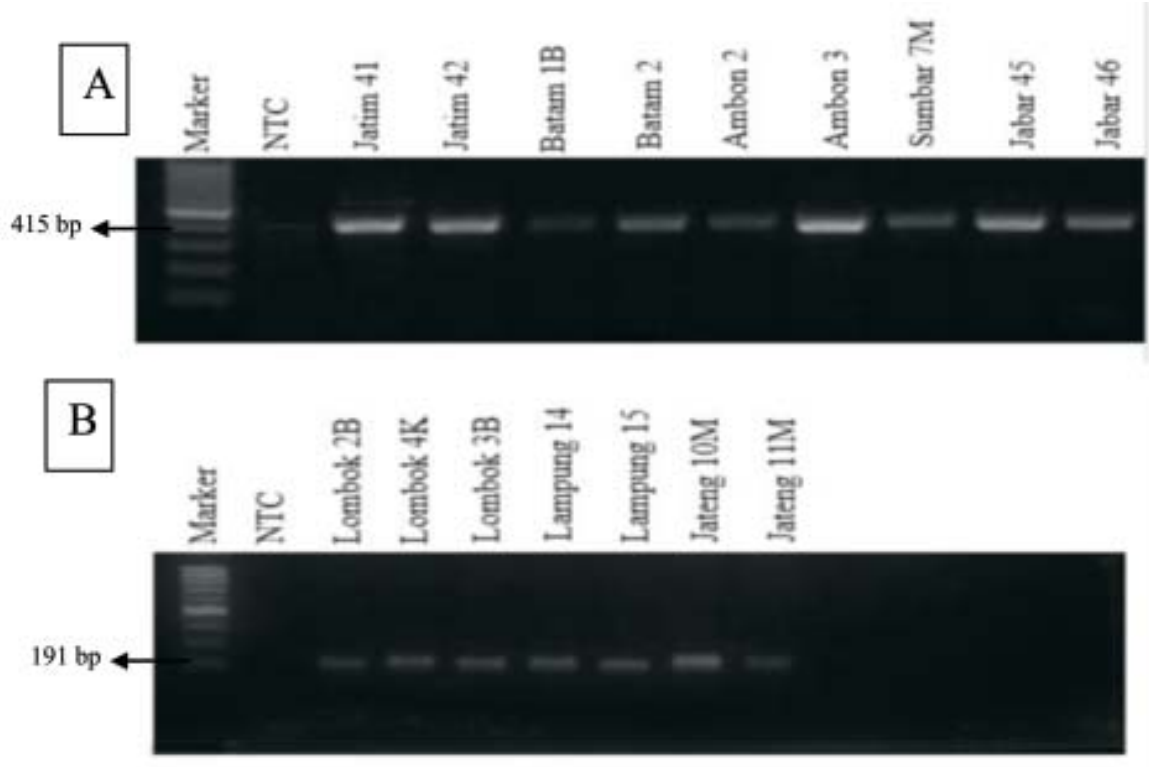
Provinsi	Kabupaten/Kota	Sampel positif <i>Megalocytivirus</i>	Spesies		
			ISKNV	RSIV	TRBIV
Sumatera Utara	Medan**	-	-	-	-
Sumatera Barat	Pariaman*	3	3	0	0
Kepulauan Riau	Batam**	4	4	0	0
	Tanjungpinang**	5	5	0	0
	Bintan**	4	4	0	0
	Pesawaran**	7	5	2	0
Lampung					
Banten	Serang*	2	2	0	0
DKI Jakarta	Kepulauan Seribu**	1	1	0	0
Jawa Barat	Cirebon*	1	1	0	0
	Tasikmalaya*	2	2	0	0
Jawa Tengah	Jepara**	5	0	5	0
Jawa Timur	Situbondo**	5	5	0	0
Bali	Singaraja**	3	3	0	0
Nusa Tenggara Barat	Lombok Barat**	4	0	4	0
Maluku	Ambon**	5	5	0	0
Total		51	40	11	0

Keterangan: * ikan air tawar ** ikan air laut - tidak dilakukan pengujian ISKNV, RSIV dan TRBIV; ISKNV: *Infectious Spleen and Kidney necrosis Virus*; RSIV: *Red Sea Bream Iridovirus*; TRBIV: *Turbot Reddy Body Iridovirus*.

Berdasarkan hasil identifikasi spesies *Megalocytivirus* pada sampel ikan air tawar menunjukkan sebanyak delapan dari 25 sampel yang diperoleh dari tiga provinsi yaitu tiga sampel dari Provinsi Sumatera Barat, dua sampel dari Banten, dan tiga sampel dari Jawa Barat terinfeksi ISKNV. Sampel ikan air laut sebanyak 32 sampel dari 72 sampel yang diperoleh dari enam provinsi antara lain 13 sampel dari Provinsi Kepulauan Riau, lima sampel dari Lampung, satu sampel dari DKI Jakarta, lima sampel dari Jawa Timur, tiga sampel dari Bali, dan lima sampel dari Maluku yang terinfeksi ISKNV. *Red Sea Bream Iridovirus* (RSIV) terdeteksi pada ikan air laut di tiga provinsi antara lain Provinsi Lampung sebanyak dua sampel, Jawa Tengah sebanyak lima sampel, dan di NTB sebanyak empat sampel. Virus ISKNV tidak hanya menginfeksi ikan air tawar, tetapi juga dapat menginfeksi ikan air laut. Menurut Abidin (2013) *Megalocytivirus* dapat dideteksi pada ikan air laut dan ikan air tawar. Virus RSIV pada penelitian ini hanya ditemukan pada ikan kerapu dan ikan bawal bintang yang merupakan ikan air laut di Propinsi Lampung, Jawa Tengah dan Nusa Tenggara Barat. Penelitian yang

dilakukan oleh Murwantoko *et al.* (2018) yang menyatakan bahwa ISKNV terdeteksi di Lampung, Jepara, Karimun Jawa dan Bali, sedangkan RSIV terdeteksi di Batam, Situbondo dan Karimun Jawa.

Berdasarkan hasil identifikasi spesies *Megalocytivirus* sampel ikan air tawar terinfeksi ISKNV, sedangkan sampel ikan air laut terinfeksi ISKNV dan RSIV. Virus ISKNV tidak hanya menginfeksi ikan air tawar, tetapi juga dapat menginfeksi ikan air laut. Menurut Abidin (2013) *Megalocytivirus* dapat dideteksi pada ikan air laut dan ikan air tawar. Virus RSIV pada penelitian ini hanya ditemukan pada ikan kerapu dan bawal bintang yang merupakan ikan air laut di Provinsi Lampung, Jawa Tengah dan Nusa Tenggara Barat. Sampel yang berasal dari ikan air laut dan ikan air tawar pada penelitian ini menunjukkan hasil negatif TRBIV. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menemukan TRBIV hanya menyerang spesies ikan *flatfish* di Korea dan Cina (Jing *et al.*, 2018). Di Indonesia TRBIV belum pernah dilaporkan baik pada ikan air laut maupun ikan air tawar. Penyebaran TRBIV sampai saat ini masih di Korea dan Cina, meskipun TRBIV dapat menyebar ke wilayah



Gambar 2. Amplifikasi deteksi spesies *Megalocytivirus* menggunakan gen MCP pada panjang amplicon 777 bp A) *Infectious Spleen Necrosis Virus* Jawa Timur, Kepulauan Riau, Maluku, Sumatera Barat dan Jawa Barat, B) *Red Sea Bream Iridovirus* Nusa Tenggara Barat, Lampung dan Jawa Tengah.

Asia termasuk Indonesia. Hasil amplifikasi PCR spesies *Megalocytivirus* ditampilkan pada Gambar 2 (A dan B).

Hasil dari penelitian ini menunjukkan sebaran infeksi *Megalocytivirus* lebih luas dibandingkan dengan data/informasi sebaran penyakit menurut surat keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan nomor 81 tahun 2015. Beberapa Provinsi yang tidak termasuk dalam daftar sebaran penyakit *Megalocytivirus* antara lain Banten, DKI Jakarta, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, NTB, dan Maluku. Propinsi Sumatera Utara sebelumnya dinyatakan positif terinfeksi *Megalocytivirus*, namun hasil penelitian ini menunjukkan sampel ikan dari Kota Medan menunjukkan negatif *Megalocytivirus*. Hasil ini belum bisa menunjukkan status Provinsi Sumatera Utara bebas terhadap *Megalocytivirus* karena pengambilan sampel hanya pada satu daerah, untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menambah lokasi pengambilan sampel di Provinsi Sumatera Utara.

SIMPULAN

Megalocytivirus dideteksi di Provinsi Sumatera Barat, Kepulauan Riau, Lampung, Banten, DKI Jakarta, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Bali, NTB dan Maluku. Sampel ikan dari Provinsi Sumatera Utara menunjukkan hasil negatif *Megalocytivirus*. Virus ISKNV menginfeksi ikan air laut dan ikan air tawar, sedangkan RSIV hanya menginfeksi ikan air laut di Provinsi Lampung, Jawa Tengah, dan NTB.

SARAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, perlu dilakukan deteksi infeksi *Megalocytivirus* di daerah Kalimantan dan Papua.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pimpinan dan staf Balai Uji Standar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Jakarta dan Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Batam yang telah

memberikan izin atas penggunaan fasilitas laboratorium selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin LOB. 2013. Deteksi molekuler *Megalocytivirus* pada ikan budidaya dengan metode polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism [Tesis]. Yogyakarta (ID): Universitas Gajah Mada.
- Adams A, Thompson KD. 2006. Biotechnology offer revolution to fish health management. *Trend Biotech.* 24 (5): 201-205.
- Amanu S, Rifai AB, Syarif A, Fikar M. 2015a. Development of co-agglutination method for viral nervous necrosis from grouper (*Epinephelus sp.*) in Batam. *J Agricul Scien Technol* 5 (6): 502-505.
- Amanu S, Rifai AB, Yulianah L, Dwiwahyu P. 2015b. Evaluation of co-agglutination test kit for red sea bream Iridovirus. *J Agricul Scien Technol* 5 (6): 437-440.
- Amanu S, Sulistiyono D, Suardana I. 2016. Detection of fish disease caused by iridovirus on grouper (*Epinephelus sp.*) and pomfret star (*Trachinotus blochii*) with co-agglutination method in Tanjungpinang, Indonesia. *J Agricul Scien Technol* 6: 121-128.
- Bootland LM, Leong JA. 1992. *Staphylococcal* co-agglutination, a rapid method of identifying infectious hematopoietic necrosis virus. *Appl Environ Microbiol* 58(1): 6-13.
- Dong HT, Jitrakorn S, Kayansamtuaj P, Pirarat N, Rodkum C, Rattanajpong T, Senapin S, Saksmerprom. 2017. Infectious spleen and kidney necrosis disease (ISKND) outbreaks in farmed barramundi (*Lates calcarifer*) in Vietnam. *Fish Shellfish Immunol* 68: 65-73.
- 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: 140-149.
- Go J, Lancaster M, Deece K, Dhungyel O, Whittington R. 2006. The molecular epidemiology of Iridovirus in murray cod

- (*Maccullochella pealii pealii*) and dwarf gourami (*Colisa lalia*) from distant biogeographical regions suggests a link between trade in ornamental fish and emerging Iridoviral diseases. *Mol Cell Probes* 20: 212–222.
- He JG, Zeng K, Weng SP, Chan SM. 2000. Systemic disease caused by an Iridovirus like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basillewsky) in China. *J Fish Dis* 23: 219–222.
- He JG, Zeng K, Weng SP, Chan SM. 2002. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture* 204: 11–24.
- 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 Pathol* 27 (1): 19–27.
- Irianto A. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Yogyakarta. UGM. Hlm. 256.
- Jing YS, Hong JR, Ku CC, Wen CM. 2018. Complete genome sequence and phylogenetic analysis of Megalocytivirus rsiv ku: a natural recombination infectious spleen and kidney necrosis virus. *Arch Virol* 163: 1037–1042.
- Jung SV, Adamek M, Wohlsein P, Wolter J, Wedekind H, Steinhagen D. 2016. First outbreak of an infection with infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in ornamental fish in Germany. *Dis Aquat Organ* 119: 239-244.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2015a. Keputusan menteri KKP no 81 tentang penetapan area yang tidak bebas penyakit ikan karantina, golongan, dan media pembawa di dalam wilayah negara Republik Indonesia. Jakarta (ID): KKP.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2015b. Keputusan menteri KKP no 80 tentang penetapan jenis hama dan penyakit ikan karantina, golongan, media pembawa, dan sebarannya. Jakarta (ID): KKP.
- Kurita J, Nakajima K. 2012. Megalocytiviruses. *Viruses* 4: 521-538.
- Lafferty KD, Harvell CD, Conrad JM, Friedman CS, Kent ML, Kuris AM, Saksida SM. 2015. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Ann Rev Marine Sci* 7: 471-496.
- Mahardika K, Zafran, Yamamoto A, Miyazaki T. 2004. Susceptibility of juvenile humpback grouper *Cromileptes altivelis* to grouper sleepy disease Iridovirus (GSDIV). *Dis Aquat Organ* 59: 1-9.
- Mahardika K, Muzaki A, Suwirya K. 2009. Pathogenicity of Grouper Sleepy Disease Iridovirus (GSDIV: Megalocytivirus, Family Iridoviridae) to Coral Trout Grouper *Plectrophomus leopardus*. *Indonesian Aquacult J* 4: 121-130
- Murwantoko, Handayani CR, Pratiwi R. 2009. Cloning and sequence analysis of capsid protein gene of Iridovirus Indonesian isolates. *The Indonesian Journal of Biotechnology* 14(1): 1117-1123.
- Nolan D, Stephens F, Crockford M, Jones JB, Snow M. 2015. Detection and characterization of viruses of the genus Megalocytivirus in ornamental fish imported into an Australian border quarantine premises: an emerging risk to national biosecurity. *J Fish Dis* 38: 187–195.
- [OIE] Office International des Epizooties. 2012. *Manual diagnostic test for aquatic animals*. chapter 2.3.7 red sea bream iridoviral disease. Hlm. 345-356.
- Rimmer AE, Becker JA, Tweedie A, Whittington RJ. 2012. Development of a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay for the detection of dwarf gourami iridoviruses (DGIV) and other megalocytiviruses and comparison with the Office International des Epizooties (OIE) reference protocol. *Aquaculture* 155: 358-359.
- Saharia PK, Prasad KP. 2001. Development of co-agglutination kit for the diagnosis of *Pseudomonas fluorescens* infection in fishes. *Asian Fish Scien* 14: 293-300.
- Simonson J, Siebeling R J. 1986. Rapid serological identification of *Vibrio vulnificus* by anti-h co-agglutination. *Ap Environ Microbiol* 52(6): 1299-1304.
- Subramaniam K, Shariff M, Omar AR, Bejo MH. 2012. Megalocytivirus infection in fish. *Rev Aquat* 4(4): 221–233.

- Subramaniam K, Gotesman M, Smith CE, Steckler NK, Kelley KL, Groff JM, Waltzek TB. 2016. Megalocytivirus infection in cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Dis Aquat Organ* 119: 253–258.
- Sudthongkong C, Miyata M, Miyazaki T. 2002. Viral dna sequences of gene encoding the atpase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South Cina Sea and Southeast asian Countries. *Arch Virol* 147: 2089-2109.
- Sung C, Chi S, Huang K, Lu J. 2010. Rapid detection of the grouper of iridovirus by loop-mediated isothermal amplification. *J Marine Sci Technol* 18(4): 568-573.
- Waltzek TB, Marty GD, Alfaro ME, Bennett WR. 2012. Systemic iridovirus from threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* represents a new megalocytivirus species (family *iridoviridae*). *Dis Aquat Org* 98: 41"56.
- Wang CS, Shih H H, Ku CC, Chen SN. 2003. Studies on epizootic Iridovirus infection among red sea bream, *Pagrus major* (temmink and schlegel), cultured in Taiwan. *J Fish Dis* 26(6): 127-133.
- Wang YQ, Lu L, Weng SP, Huang JN, Chan SM, He JG. 2007. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus. *Arch Virol* 152(4): 763-773.