

APLIKASI *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) KONVENSIONAL DAN *REAL TIME-PCR* UNTUK DETEKSI VIRUS VNN (*Viral Nervous Necrosis*) PADA IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus*)

Made Devi Kurniawati, Sumaryam*, Nurul Hayati

Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Dr. Soetomo, Surabaya

*e-mail: sumaryam63@gmail.com

ABSTRAK

Viral Nervous Necrosis (VNN) adalah virus nodaviridae yang menyerang ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), terutama pada fase larva dan benih sehingga dapat menyebabkan kematian massal. Pengujian penyakit virus yang paling sering digunakan adalah dengan metode PCR Konvensional dan Real Time-PCR. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui metode manakah yang paling tepat dalam mendeteksi virus VNN pada ikan kerapu macan di Balai KIPM Denpasar, Bali. Metode penelitian yang digunakan yaitu metode penelitian deskriptif observasional. Metode penghitungan data yang digunakan ialah menentukan penghitungan prevalensi. Dari keseluruhan ikan kerapu macan yang diidentifikasi VNN menunjukkan jumlah prevalensi yang hampir sama antara menggunakan identifikasi dengan metode uji PCR Konvensional sebesar 10,30% dan dengan uji Real Time PCR sebesar 10% yang menunjukkan bahwa kedua metode tersebut sama-sama bisa digunakan sebagai metode untuk uji virus VNN, tetapi metode PCR Konvensional membutuhkan waktu lebih lama (waktu pengujian 5 jam) dibandingkan metode Real Time-PCR (waktu pengujian 2,5 jam).

Kata Kunci : *Viral Nervous Necrosis* (VNN), PCR Konvensional, *Real Time* PCR, *Epinephelus fuscoguttatus*

ABSTRACT

Viral Nervous Necrosis (VNN) is a virus Nodaviridae that attacks tiger groupers, especially in the larval and seed phases so that it can cause mass death. The most frequently used testing for viral diseases is testing using Conventional PCR and Real-Time PCR methods. The purpose of this study was to see and find out which method was the best in speed in detecting the VNN virus in tiger grouper (Balai KIPM) Denpasar, Bali. The results of the study revealed the prevalence of the number of samples using Conventional PCR test of 10.30% while for the Real Time-PCR method of 10%. Where both methods can be used together in the VNN Virus test. The Real Time PCR method is the best method for detecting VNN viruses compared to using conventional PCR. Where Conventional PCR takes 5 hours in a single VNN Virus test while Real Time PCR only takes 2.5 hours in a single VNN Virus test.

Keywords : *Viral Nervous Necrosis* (VNN), Conventional PCR, *Real Time* PCR, *Epinephelus fuscoguttatus*

PENDAHULUAN

Ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) merupakan salah satu komoditas unggulan ekspor hasil perikanan dengan potensi pengembangan yang masih cukup besar. Ikan ini merupakan salah satu jenis ikan yang memiliki nilai ekonomis tinggi baik di pasaran dalam negeri maupun luar negeri. Namun, dalam pemeliharannya masih terdapat kendala, diantaranya adalah tingkat kematian yang masih relatif tinggi akibat infeksi penyakit viral VNN (*Viral Nervous Necrosis*) (Balai Budidaya Laut Lampung, 2002).

Viral Nervous Necrosis (VNN), adalah virus *Nodaviridae* yang menyerang ikan kerapu, terutama pada stadia larva dan benih. *Nodaviridae* merupakan virus RNA, dengan diameter antara 20-25 nm. Penyakit ini paling umum menyerang larva pada umur kurang dari 20 hari. VNN dapat menyebabkan kematian massal hingga mencapai prevelensi 100% (Yuasa, dkk. 2003).

Pengujian penyakit viral dapat dilakukan dengan 4 metode yaitu menggunakan kultur jaringan, ICC (*immunochemistry*), metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) dan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Dari keempat metode tersebut yang paling sering digunakan adalah metode PCR (OIE, 2003).

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) atau reaksi berantai polimerase adalah metode enzimatik untuk melipatgandakan (*amplification*) secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu secara *in vitro*. Dengan metode ini dapat diperoleh pelipatgandaan suatu sekuen DNA dalam genom virus yang mana hanya dengan mencampurkan kulturnya di dalam tabung *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sehingga dari jaringan tubuh ikan yang sakit dapat diketahui jenis organisme patogen yang menyerangnya (Yuwono, 2006).

Selain PCR secara konvensional pada masa kini sudah terdapat PCR modern yang bernama Real Time-PCR. *Real Time* PCR adalah teknik yang digunakan untuk memonitor progress reaksi PCR pada waktu yang sama (Biosoft, 2007). RT-PCR juga dikenal sebagai *quantitative PCR* (qPCR). Jumlah produk PCR (DNA, cDNA atau RNA) yang relatif sedikit, dapat dihitung secara kuantitatif (Buski, 2018).

Analisis menggunakan Real time PCR memiliki sensitivitas tinggi dan lebih spesifik oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui perbedaan antara metode PCR Konvensional dengan Real Time. Untuk produk PCR tertentu. Real time PCR juga meliputi Real Time-RT PCR dimana PCR dilakukan secara Real Time menggunakan enzim *Reverse*

Transcriptase secara langsung pada waktu yang bersamaan. Real Time-RT PCR memiliki tambahan siklus *Reverse Transcription* yang memacu perubahan molekul DNA dari molekul RNA. Real Time-RT PCR diperlukan karena RNA kurang stabil dibandingkan dengan DNA.

METODOLOGI PENELITIAN

Tempat penelitian dilaksanakan di Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (Balai KIPM) Denpasar, Bali pada bulan Oktober 2018.

Dari hasil intersepsi HPI / HPIK diperoleh bahwa jenis ikan kerapu yang dominan diperiksa di Balai KIPM Denpasar selama penelitian ialah ikan kerapu macan yang berasal dari kabupaten Buleleng dengan ukuran 5-8 cm untuk kepentingan domestik dengan tujuan makassar, Tanjung Pandan, dan ekspor dengan tujuan Vietnam, Malaysia, Singapura, Hongkong, Taiwan, Thailand.

Metode yang digunakan pada Penelitian ini yaitu metode penelitian deskriptif observasional. Metode penelitian deskriptif adalah penyelidikan untuk memperoleh fakta dari gejala yang ada dan mencari keterangan secara faktual serta memaparkan tentang objeknya (Nazir 1999).

Metode penghitungan data yang digunakan ialah menentukan penghitungan prevalensi. Prevalensi adalah gambaran tentang frekuensi ikan terinfeksi lama dan baru yang ditemukan pada suatu jangka waktu tertentu di tempat tertentu.

Pengukuran prevalensi VNN menggunakan rumus:

$$\text{Prevalensi penyakit} = \frac{\sum \text{sampel ikan yang terinfeksi virus (ekor)}}{\sum \text{sampel yang diamati (ekor)}} \times 100\%$$

Ekstraksi pada metode PCR Konvensional dan Real Time adalah sama dimana merupakan proses pemisahan asam nukleat (DNA/RNA) patogen dari sel inangnya. Hal ini sesuai dengan pendapat Sulandari (2003), yang menyatakan bahwa prinsip dasar ekstraksi DNA/RNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA/RNA dari komponen-komponen lainnya yaitu penghancuran dinding sel, penghilangan protein dan pengendapan asam nukleat.

Ekstraksi RNA yang dilakukan di Balai Karantina Ikan Pengendali Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (Balai KIPM) Denpasar mengacu pada RNA Ekstraktion sehingga menggunakan bahan dari larutan *RNA Extraction Solution*.

Tahapan dari Ekstraksi RNA adalah sebagai berikut :

a. Homogenisasi

Proses pertama adalah penyiapan atau preparasi sampel. Target virus VNN organ target yang diambil adalah bagian mata dan otak ikan kerapu macan. Setelah itu organ target dipotong kecil-kecil menggunakan gunting yang steril, kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 ml dengan menambahkan larutan RNA *Extraction Solution* sebanyak 500 μ l.

Dalam rangka memaksimalkan kerja dari RNA *extraction Solution* ditambahkan larutan *Chloroform* sebanyak 100 μ l. *Chloroform* berfungsi sebagai pelarut organik.

Campuran larutan dari RNA *extraction Solution* dan *chloroform* selanjutnya di vortex dengan kecepatan tinggi karena chloroform sulit larut dalam air. Selanjutnya larutan dimasukkan kedalam *microcentrifuge* selama 15 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 2 – 8°C untuk menghasilkan *supernatant*.

b. Presipitasi RNA

Presipitasi ini merupakan suatu proses koagulasi atau penggumpalan RNA yang larut dalam fase air menjadi padat. Hasil larutan yang terbagi menjadi tiga lapisan, diambil *supernatant* atau lapisan paling atas sebanyak 200 μ l, kemudian dipindahkan ke dalam mikrotube baru yang telah diberi tanda berupa kode sampel dan tanggal ekstraksi, kemudian ditambahkan

isopropanol sebanyak 200 μ l. Selanjutnya dilakukan pengadukan, dan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm.

Pada tahapan pemberian isopropanol ini merupakan proses presipitasi RNA. Isopropanol akan mengikat RNA dan menggumpalkannya pada fase air menjadi padat atau terbentuk pellet yang menempel pada dinding mikrotube setelah dilakukan sentrifugasi. Isopropanol juga berfungsi untuk menghilangkan atau membersihkan residu *chloroform* yang tertinggal pada tahapan ekstraksi sebelumnya. Setelah proses sentrifugasi *supernatant* yang terdapat di mikrotube dibuang secara perlahan agar pelet RNA tidak ikut terbang.

c. Pencucian RNA

Tahapan dalam ekstraksi RNA selanjutnya adalah pencucian RNA yaitu dengan cara membuang *supernatant*, lalu mencuci pelet RNA dengan menambahkan sebanyak 500 μ l *ethanol 75%*, kemudian di sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 9000 rpm.

Setelah selesai di sentrifugasi maka larutan *ethanol 75%* dibuang kemudian mikrotube dikering anginkan, hal ini bertujuan untuk menghilangkan residu *ethanol* dari pelet RNA. Penghilangan residu *ethanol* dilakukan dengan cara evaporasi karena *ethanol* mudah menguap.

Setelah pellet RNA dikering-anginkan, tahap selanjutnya adalah penambahan buffer. Pellet RNA dilarutkan dalam DEPC ddH₂O sebanyak 200 µl dan disimpan dalam suhu -20 °C. DEPC juga digunakan untuk menonaktifkan kerja enzim RNAase sehingga tidak terjadi degradasi terhadap struktur RNA dan penyimpanan sampel pada suhu -20°C sehingga hasil ekstraksi dapat disimpan hingga waktu lama.

Amplifikasi Metode PCR Konvensional

Tahapan kedua setelah ekstraksi RNA adalah proses amplifikasi. Amplifikasi merupakan kegiatan melipat gandakan DNA. Virus VNN termasuk jenis virus RNA sehingga pada proses amplifikasi terlebih dahulu dilakukan proses transkripsi RNA, dimana RNA akan ditranskrip menjadi cDNA (*complemen DNA*).

Pada dasarnya proses amplifikasi yang diperbanyak adalah materi DNA. Virus VNN termasuk jenis virus RNA oleh karena itu untuk merubah menjadi DNA berantai ganda terlebih dahulu ditranskripsi menggunakan enzim *reverse transcription*. Amplifikasi virus RNA memiliki prinsip yang sama, dimana terdiri dari 4 tahapan yaitu *pre-denaturasi*, *denaturasi*, *annealing* dan *extension*.

Proses *pre-denaturasi*, merupakan proses transkripsi balik RNA. Transkripsi

balik (*Reverse transcription*) merupakan proses kebalikan transkripsi yaitu mengkopi RNA menjadi DNA, dimana untai tunggal RNA akan diubah menjadi DNA komplemen (cDNA) dengan pengaturan suhu 48⁰ C selama 30 menit untuk tahap pertama dan 94⁰ C selama 2 menit untuk tahap kedua sehingga berubah menjadi rantai ganda DNA proses ini di bantu dengan ezim *reverse transcriptase* AMV.

Proses amplifikasi terjadi beberapa tahapan yakni *denaturasi*, *annealing*, dan *extention*, dalam setiap proses tersebut dipengaruhi waktu dan suhu yang tepat. Pada suhu 94°C DNA mengalami denaturasi, artinya dari untai ganda akan dirubah menjadi untai tunggal. Denaturasi ini merupakan proses yang penting jika proses ini tidak lengkap akan menyebabkan denaturasi secara cepat, sedangkan waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mempengaruhi enzim yang terdapat dalam *master mix* dan mempengaruhi keberhasilan PCR. Selanjutnya ketika suhu mengalami penurunan 62°C ini merupakan proses penempelan primer pada DNA yang telah terbelah secara spesifik. Penurunan suhu (*annealing*) merupakan pelekatan primer pada DNA untai tunggal. Primer akan menempel pada pangkal (*forward*) dan ujung (*reverse*) masing-masing DNA tunggal. Kemudian ketika suhunya

dinaikkan sampai 72°C , maka primer dengan bantuan enzim yang terdapat didalam *master mix* akan membentuk atau pemanjangan (*extention*) untai DNA sesuai dengan runutan DNA yang terbelah, sehingga akan membentuk dua buah DNA tunggal yang baru;

Final extention pada suhu 72°C selama 10 menit untuk memberi kesempatan *enzyme* yang terdapat di dalam *master mix* yang belum menyelesaikan reaksinya sehingga tidak ada sintesa DNA baru yang belum selesai. Setelah proses amplifikasi selesai, sampel dapat disimpan dengan pengaturan suhu -20°C atau dapat juga langsung digunakan untuk proses elektroforesis.

Elektroforesis Metode PCR Konvensional

Elektroforesis pada prinsipnya merupakan perpindahan molekul negative ke kutub positif begitupun sebaliknya. Hal ini sesuai dengan pendapat Sulandri (2003) bahwa prinsip kerja elektroforesis gel dimulai saat makro molekul yang bermuatan listrik ditempatkan pada medium berisi tenaga listrik. Molekul-molekul tersebut akan bermigrasi menuju kutub positif atau kutub negatif berdasarkan muatan yang terkandung di dalamnya. Molekul-molekul yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak menuju kutub positif (anoda), sedangkan molekul-molekul yang bermuatan positif

(kation) akan bergerak menuju kutub negatif (katoda). Kecepatan migrasi ditentukan oleh panjang-pendek pita DNA. Semakin kecil molekul DNA maka semakin cepat migrasi molekul DNA melewati gel.

Pembuatan Gel Agarose

Sebelum melakukan elektroforesis terlebih dahulu membuat gel agarose dengan konsentrasi 1,5 % yaitu gel agarose 0,6 gr dilarutkan dengan 40 ml larutan (1 X TAE) dengan dipanaskan menggunakan *hot plate* dan memasukkan *magnetic stirrer* sebagai pengaduk. Setelah larutan tercampur dan mendidih kemudian dimasukkan ke dalam cetakan (*tray*) dengan pencetak sumur (sisir) yang disesuaikan dengan jumlah sampel yang diuji. Kemudian didinginkan hingga suhunya mencapai 50°C .

Agarose dituangkan langsung tanpa didinginkan terlebih dahulu untuk menghindari pengerasan pada gel agarose. Dalam menuangkan agarose harus dilakukan secara hati-hati supaya menghindari terbentuknya gelembung udara karena munculnya gelembung udara akan menghasilkan hasil yang tidak baik ketika proses elektroforesis.

Gel agarose mengeras maka *tray* diangkat kemudian menuangkan larutan TAE (1 X) ke dalam gel box hingga gel agarose terendam sampai tanda batas.TAE

berfungsi sebagai penghantar listrik yang baik. Setelah TAE dimasukkan ke dalam tray, dilakukan pemasangan (memasukkan hasil PCR) DNA ke dalam sumur. Jumlah DNA yang dimasukkan harus sesuai dengan besar sumur gel. Urutan pemasangan DNA ialah kontrol negatif, kontrol positif dan sampel. Hal ini dilakukan untuk menghindari kontaminasi saat proses elektroforesis.

Proses selanjutnya untuk *one step* RT-PCR siapkan loading dye masing-masing sebanyak 2 μ l. Campurkan dengan amplicon masing-masing sebanyak 6-8 μ l sebelum dimasukkan kedalam sumur. Untuk nested PCR tidak perlu ditambahkan loading dye. Masukkan secara berurutan marker/ ladder, amplicon sampel, kontrol +/- ke dalam sumur gel sebanyak 8-15 μ l secara perlahan. Volume disesuaikan dengan dalamnya lubang sumur.

Proses elektroforesis dijalankan dengan menghubungkan tank elektroforesis dengan sumber listrik. Kabel merah sebagai penghubung arus positive dihubungkan pada stop kontak negatif (katoda) dan kabel hitam sebagai penghubung arus negatif dihubungkan pada stop kontak positif (anoda). Tegangan listrik yang digunakan 100-150 volt dengan waktu \pm 30 menit. Dengan adanya arus listrik ini, membuat molekul DNA bermigrasi dari kutub negative ke kutub

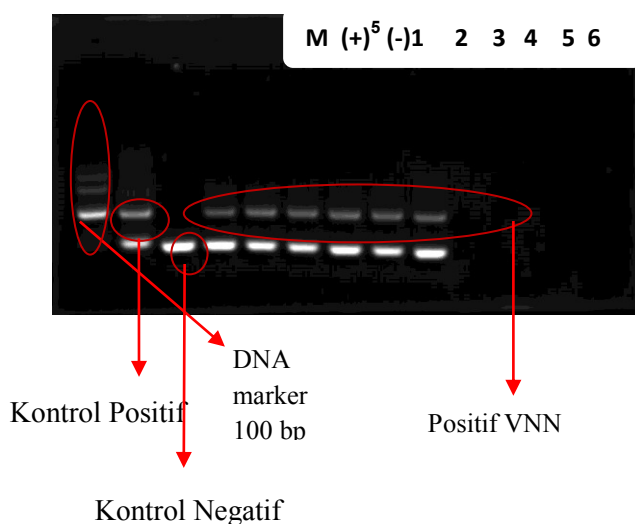
positif sesuai dengan ukuran pasangan basanya.

Prosedur Amplifikasi Metode Real Time PCR

Pada dasarnya proses amplifikasi menggunakan metode Real Time-PCR sama dengan konvensional yaitu berfungsi untuk memperbanyak materi DNA. Tahapannya pun juga sama yaitu terjadi proses Reverse transcription di awal proses yang berfungsi merubah virus RNA menjadi DNA berantai. Amplifikasi virus RNA menggunakan metode Real Time-PCR memiliki prinsip yang sama, dimana terdiri dari 4 tahapan yaitu *pre-denaturasi*, *denaturasi*, *annealing*, *extension*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pembacaan Pemeriksaan Virus VNN pada Ikan Kerapu Macan dengan Metode PCR Konvensional.



Gambar 1. Hasil Pengujian VNN dengan PCR Konvensional

Keterangan :

- 1 = Sampel positif VNN
- 2 = Sampel positif VNN
- 3 = Sampel positif VNN
- 4 = Sampel positif VNN
- 5 = Sampel positif VNN
- 6 = Sampel positif VNN
- M = Marker 100 bp
- (+)= Kontrol positif VNN
- (-) = Kontrol Negatif VNN

Dari hasil pengujian VNN diperoleh hasil positif pada seluruh sampel yang diuji. Hal ini dapat diketahui dari munculnya *band* yang sejajar dengan kontrol positif. Hasil uji VNN positif pada 230 bp, sehingga apabila suatu sampel muncul *band* dan terletak sejajar dengan garis kontrol positif berarti sampel dinyatakan positif terjangkit virus VNN, namun apabila tidak muncul *band* pada sampel yang diuji maka sampel dinyatakan negatif VNN. Dari gambar di atas dapat ditarik kesimpulan bahwa sampel yang diuji hasilnya positif VNN.

Pada gambar di atas DNA marker, kontrol positif terlihat jelas muncul adanya band, dan pada kontrol negatif tidak menunjukkan munculnya band, sehingga proses elektroforesis tersebut tidak mengalami kontaminasi. Hasil yang didapat kemudian dianalisis untuk dibuat Laporan Hasil Pemeriksaan. Golongan penyakit virus merupakan Golongan Hama Penyakit Ikan Karantina I.

Berdasarkan hasil pemeriksaan virus pada saat penelitian pada bulan Oktober 2018 disimpulkan bahwa sampel

yang diuji dengan metode PCR Konvensional berjumlah 388 sampel ikan kerapu macan.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Penyakit Viral VNN pada Ikan Kerapu Macan menggunakan metode PCR Konvensional.

| No. | Jenis Penyakit Viral | Hasil Pemeriksaan Positif | Hasil Pemeriksaan Negatif |
|-----|----------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1. | VNN | 40 | 348 |

Berdasarkan data di atas, dapat diketahui data prevalensi penyakit viral VNN pada ikan kerapu macan yang dilulintaskan selama penelitian melalui perhitungan prevalensi.

$$\text{Prevalensi (+)} = \frac{\text{Jumlah sampel positif}}{\text{Jumlah sampel}} \times 100\%$$

$$\text{Prevalensi (+)} = \frac{40}{388} \times 100\%$$

$$= 10,30 \%$$

Hasil Pembacaan Pemeriksaan Virus VNN pada Ikan Kerapu Macan dengan Metode Real Time-PCR

Proses *pre-denaturasi*, merupakan proses transkripsi balik RNA. Transkripsi balik (*Reverse transcription*) merupakan proses kebalikan transkripsi yaitu mengkopi RNA menjadi DNA, dimana untai tunggal RNA akan diubah menjadi DNA komplemen (cDNA) dengan pengaturan suhu 50⁰ C selama 30 menit untuk tahap pertama dan dilanjutkan

dengan tahapan PCR *initial activation* dengan suhu 95⁰ C selama 15 menit.

Setelah proses RT-PCR dilanjutkan proses amplifikasi PCR dimana DNA komplemen (cDNA) akan diperbanyak menggunakan bantuan menggunakan dua pasang primer. Balai KIPM Denpasar menggunakan primer dari BUSKIM Jakarta yaitu primer RNA2 FOR dengan urutan basa CAA-CTG-ACA-RCG-AHC-ACA-C dan RNA2 REV dengan urutan basa CCC-ACC-AYT-TGG-CVA-C.







Alat PCR untuk metode Real Time-PCR memiliki prinsip memecah rantai ganda (*double-stranded*) menjadi rantai tunggal (*single-stranded*), proses tersebut dipengaruhi oleh suhu dan waktunya. Pembelahan untai ganda menjadi tunggal (*denatures*) memerlukan waktu 15 detik pada suhu 94°C. *Denaturasi* pada proses Real Time-PCR lebih cepat dibandingkan dengan proses pada PCR konvensional.

Penurunan suhu (*annealing*) merupakan proses penempelan primer pada DNA untai tunggal pada suhu 55°C dengan waktu 45 detik. Primer akan menempel pada pangkal (*forward*) dan ujung (*reverse*) masing-masing DNA tunggal.

Tahap selanjutnya merupakan proses pemanjangan (*ekstention*) DNA, suhu dinaikkan lagi hingga 55°C, 45 detik pengaturan suhu dan waktu yang sesuai merupakan suhu optimal untuk aktivitas enzim polymerase. Proses *denaturation*, *annealing* dan *extention* akan terjadi pada siklus yang berulang 40 kali. Pada proses amplifikasi dengan metode Real Time-PCR hasil uji virus VNN dapat secara langsung dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif.

Pada data Tabel 2 dapat dianalisa sampel yang positif virus VNN dan pada kopi beberapa virus VNN tersebut dinyatakan positif dengan melihat garis Threshold dan standar kurva.

Tabel 2. Analisa hasil Uji virus VNN dengan metode Real Time-PCR

| No. | Colour | Name | Type | Ct | Given Conc (Copies) | Calc Conc (Copies) | % Var |
|-----|---|---------------------|----------|-------|---------------------|--------------------|-------|
| 1 |  | NTC | NTC | | | | |
| 2 |  | VNN 10 ⁵ | Standard | 25,88 | 247.500 | 247.500 | |
| 3 |  | MMS 47 | Unknown | | | | |
| 19 |  | MJ 26 | Unknown | 27,83 | | 59.423 | |
| 20 |  | MJ 25 | Unknown | 39,08 | | 16 | |
| 21 |  | MJ 27 | Unknown | | | | |

Sumber : Data Sekunder (2018)

Apabila nilai Ct muncul pada table, hal tersebut menunjukkan sampel tersebut positif virus VNN, nilai CT adalah perpotongan antara garis threshold dengan standar kurva sampel yang di uji, sedangkan kopi adalah menunjukkan jumlah konsentrasi virus VNN pada sampel. contoh pada Tabel 2 sampel dengan nama MJ 26 Ct yang muncul berkisar diantara 27,83 dengan kopi 59.423 dan MJ 25 dengan Ct 39,08 dengan kopi 16. Hal tersebut menunjukan sampel dengan kode MJ 26 garis *Thresholdnya* berpotongan dengan standar kurva pada Ct antara 27,83 dengan jumlah kopi 59.423. Sedangkan apabila sampel negative maka nilai Ct dan Kopi tidak muncul, karena tidak terjadi perpotongan garis Threshold dengan standar kurva. *Sehingga pada proses amplifikasi dengan metode Real Time-PCR tidak perlu dilakukan proses elektroforesis* karena pada metode ini, menggunakan ,molekul probe yang dapat diukur setiap reaksinya.

Tabel 3. Hasil Pemeriksaan Penyakit Viral VNN pada Ikan Kerapu Macan menggunakan metode Real Time-PCR

| No. | Jenis Penyakit Viral | Hasil Pemeriksaan | |
|-----|----------------------|-------------------|---------|
| | | Positif | Negatif |
| 1. | VNN | 5 | 45 |

Berdasarkan hasil pemeriksaan virus pada saat penelitian pada bulan

Oktober 2018 disimpulkan bahwa sampel yang di uji dengan metode PCR Konvensional berjumlah 50 sampel ikan kerapu macan.

Berdasarkan data Tabel 3, dapat diketahui data prevalensi penyakit viral VNN pada ikan kerapu macan yang dilalulintaskan selama Penelitian melalui perhitungan prevalensi.

1. Prevalensi sampel positif VNN dengan metode Real Time-PCR (+)

$$\text{Prevalensi (+)} = \frac{\text{Jumlah sampel positif}}{\text{Jumlah sampel}} \times 100\%$$

$$\text{Prevalensi (+)} = \frac{5}{50} \times 100\%$$

$$= 10 \%$$

PEMBAHASAN

Perbedaan Waktu Identifikasi Pemeriksaan VNN pada Ikan Kerapu Macan

Tabel 4. Perbedaan waktu identifikasi pemeriksaan VNN pada kerapu macan

| Jumlah Sampel | PCR Konvensional (waktu) | Real Time-PCR (waktu) |
|------------------|--------------------------|-----------------------|
| Sampel 1 | 5 jam | 2,5 jam |
| Sampel 2 | 5 jam | 2,5 jam |
| Sampel 3 | 5 jam | 2,5 jam |
| Sampel 4 | 5 jam | 2,5 jam |
| Sampel 5 | 5 jam | 2,5 jam |
| Jumlah | 25 Jam | 12,5 jam |
| Rata-rata | 5 jam | 2,5 jam |

Tabel 4 menunjukkan bahwa 5 sampel yang sama-sama diuji menggunakan metode PCR Konvensional dan Real Time PCR menunjukkan perbedaan waktu yang berbeda. Sampel yang di uji menggunakan metode PCR Konvensional dilakukan dengan waktu rata-rata selama 5 jam, sedangkan sampel yang diuji menggunakan metode Real Time-PCR dengan waktu 2,5 jam. Sehingga dapat disimpulkan bahwa identifikasi VNN menggunakan metode Real Time-PCR lebih cepat dibandingkan dengan menggunakan metode PCR Konvensional. Hal tersebut dikarenakan pada saat pengujian dengan metode Real Time-PCR tidak adanya proses elektroforesis. Elektroforesis adalah teknik pemisahan komponen berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik. Metode elektroforesis ini dapat dikelompokkan menjadi tiga langkah. Pertama, persiapan gel agarose dengan konsentrasi agarose yang disesuaikan dengan ukuran DNA fragmen yang akan dipisahkan. Kedua gel agarose yg sudah mengeras diangkat dan dimasukkan kedalam alat elektroforesis kemudian masukan sampel yg telah di beri loading day yg ingin di uji, kedalam sumur gel agarose. Tahap ke 3 nyalakan mesin elektroforesis dg durasi waktu +- 30 menit.

Hasil Identifikasi Virus VNN pada Ikan Kerapu Macan dengan Metode PCR Konvensional dan Real Time-PCR.

Dari keseluruhan ikan yang di identifikasi VNN pada ikan kerapu macan menunjukkan jumlah prevalensi yang hampir sama antara menggunakan identifikasi dengan metode uji PCR Konvensional(sebesar 10%) dan dengan uji Real Time PCR sebesar 10% yang menunjukkan bahwa kedua metode tersebut sama-sama bisa digunakan sebagai metode untuk uji virus VNN.

PENUTUP

Kesimpulan

Jumlah prevalensi yang hampir sama antara menggunakan identifikasi dengan metode uji PCR Konvensional sebesar 10,30% dan dengan uji Real Time PCR sebesar 10 % yang menunjukan bahwa kedua metode tersebut sama-sama bisa digunakan sebagai metode untuk uji virus VNN.

Metode Real Time - PCR merupakan metode yang terbaik dan lebih efisien didalam kecepatan mendeteksi Virus VNN dibandingkan dengan menggunakan PCR Konvensional. metode PCR Konvensional dengan waktu 5 jam sedangkan pada metode Real Time-PCR dengan waktu 2,5 jam.

Saran

Berdasarkan Hasil penelitian di Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (Balai KIPM) Denpasar terdapat beberapa masukan berupa saran demi pengembangan kinerja dalam proses

identifikasi penyakit virus yakni:Sebaiknya dalam proses kegiatan ekstraksi dilaksanakan di *Laminary* untuk mencegah timbulnya kontaminasi pada saat pemeriksaan.

DAFTAR PUSTAKA

Balai Budidaya Laut Lampung. 2002. Pengelolaan Kesehatan Ikan Budidaya Laut. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Bandar Lampung.

Balai Uji Standar Karantina Ikan (BUSKI), 2008. Pengujian Virus Menggunakan Metode Uji PCR Konvensional dan Real Time-PCR. Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta.

Nazir, Moh. 1999. Metode Penelitian. Ghalia. Jakarta

OIE. 2003. *Manual for Diagnostic Test Aquatic Animals. Office International Des Epizootis*. Paris.

Premier Biosoft International. 2007. PCR primer design guidelines. 5 Juni 2007:5 hlm <http://www.premierbiosoft.com/tec>

hnotes/primerdesign.html , 2 September 2018 pk.13.00

Sulandari,S dan M.S.A. Zein. 2003. Panduan Praktis Laboratorium DNA. Bidang Zoologi Pusat Penelitian Biologi LIPI.hal 72-87

Suparmoko. 1991. Metode Penelitian Praktis. Fakultas Ekonomi Universitas. Yogyakarta. Yogyakarta.

Wasito H.1992. Pengantar Metodologi Penelitian. Gramedia Pustaka. Jakarta.

Yuasa, K., N, Panigoro., M, Bahman, dan E, K, Kholidin. 2003. Panduan Diagnosa Penyakit Ikan. Balai Budidaya Air Tawar Jambi, Ditjen Perikanan Budidaya, departemen Kelautan dan Perikanan dan JICA

Yuwono, Tribuwono. 2006. Teori dan Aplikasi *Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi. Yogyakarta.