

## DISTRIBUSI PATHOGNOMIK VIRULENSI VNN (*Viral Nervous Necrotic*) PADA BENIH NILA (*Oreochromis sp.*)

### PATHOGNOMIC DISTRIBUTION OF VIRULENCE VNN (*Viral Nervous Necrotic*) IN TILAPIA FRY (*Oreochromis sp.*)

Novia Christi Prihartini

Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya I

Penulis Korespondensi e-mail: [noviachristi2@gmail.com](mailto:noviachristi2@gmail.com)

(Diterima April 2016/Disetujui Juni 2016)

#### ABSTRAK

*Viral Nervous Necrosis* (VNN) merupakan virus yang banyak menyerang ikan budidaya laut terutama kakap dan kerapu. Beberapa penelitian yang sudah ada menyatakan bahwa VNN dapat juga menginfeksi beberapa spesies ikan air tawar maupun payau, salah satunya ikan nila. Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk menentukan genomik VNN pada benih nila dengan analisa histopatologi dan RT-PCR sehingga dapat menggambarkan distribusi pathognomik virulensi VNN secara kualitatif dan kuantitatif. Metoda penelitian yang digunakan adalah deskriptif kualitatif. Sampel benih nila ukuran 6-8 cm diambil pada beberapa lokasi budidaya nila dan merupakan daerah suspect VNN. Sampel diperiksa klinis dan dipilih yang menunjukkan hasil positif PCR terhadap VNN, selanjutnya diuji kerusakan organnya secara makroskopis (patologi anatomi) maupun mikroskopis (histopatologi) dan diuji distribusi virusnya dengan RT-PCR. Hasil pengamatan pada benih nila terinfeksi VNN menunjukkan perubahan dan kerusakan pada organ dan jaringan yang dapat dilihat dari pemeriksaan gejala klinis, patologi anatomi dan histopatologi. Benih nila secara kualitatif (histopatologi) memperlihatkan adanya vakuolisasi dan inclusion body pada organ otak dan mata, kerusakan lainnya juga ditemui pada hati, ginjal, limpa, insang, usus, dan otot; sedangkan secara kuantitatif (RT-PCR) hampir semua organ menghasilkan positif VNN, kecuali insang dan usus.

**Kata kunci:** VNN, Nila (*Oreochromis sp.*), pathognomik, histopatologi

#### ABSTRACT

*Viral Nervous Necrosis* (VNN) is a virus that attacks the many marine farmed fish, especially snapper and grouper. Some existing research stating that VNN can also infect several species of freshwater and brackish water fish, one of which tilapia (*Oreochromis sp.*). The purpose of this study was to determine the genomic VNN on tilapia fry with histopathological analysis and RT-PCR in order to illustrate the distribution of virulence VNN pathognomik qualitatively and quantitatively. The method used in this research is descriptive qualitative. Tilapia fry sample size of 6-8 cm were taken at several locations cultivation of tilapia and a suspect area VNN. Samples were examined clinically and were selected which showed positive PCR results on VNN, then tested its organ damage macroscopically (anatomic pathology) and microscopic (histopathological) and tested the distribution of the virus by RT-PCR. Observations on the tilapia fry infected with VNN indicate changes and damage to the organs and tissues that can be seen from the examination of clinical symptoms, anatomic pathology and histopathology. Tilapia fry qualitatively (histopathology) showed vacuolization and inclusion body in the organs of the brain and eyes, other damage is also found in liver, kidney, spleen, gills, intestines and muscles; whereas quantitative (RT-PCR) nearly every organ produces positive VNN, except gills and intestines.

**Keywords:** VNN, Tilapia (*Oreochromis sp.*), pathognomic, histopathology

## PENDAHULUAN

*Viral Nerveous Necrosis* (VNN), atau *Viral Ecephalopathy and Retinopathy* (VER) merupakan penyakit yang disebabkan betanodavirus dan telah mengakibatkan kematian massal ikan budidaya laut, terutama stadia larva dan juvenil (Bofo *et al.*, 1999). Kejadian penyakit VNN di Indonesia dilaporkan terjadi pertama kali pada tahun 1997, di daerah Banyuwangi, Jawa Timur pada budidaya Kakap Putih (*Lates calcaliver*) kemudian menyebar ke Bali pada tahun 1998, dan merambah ke pembenihan Kerapu di Bali yang menyebabkan kematian massal 100% (Zafran *et al.*, 2000).

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa infeksi virus ini terjadi pada lebih dari 40 jenis spesies ikan laut, terutama pada stadia larva dan juvenil yang bisa menyebabkan kematian hingga mencapai prevalensi 100% (Munday *et al.*, 2002) di hampir seluruh bagian dunia. Namun sekarang yang menjadi perhatian adalah kenyataan bahwa VNN bisa menyerang spesies ikan air tawar (Hedge *et al.*, 2003, Athanassopoulou *et al.*, 2004; Bigarre *et al.*, 2009; Jithendran *et al.*, 2011), bahkan baru-baru ini VNN menyebabkan kematian massal pada larva nila di Thailand (Keawcharoen *et al.*, 2015).

Dugaan bahwa VNN yang menginfeksi spesies air tawar berasal dari VNN yang menginfeksi spesies air laut (Hedge *et al.*, 2003) membuktikan bahwa ikan air tawar dapat berperan sebagai media pembawa virus dan bisa sebagai carrier. Gejala klinis yang ditimbulkan oleh VNN yang menginfeksi spesies air tawar dan spesies air laut relative cukup sama dan khas, diantaranya ikan menunjukkan perilaku berenang abnormal (memutar dan menabrak), mengapung dengan perut diatas, nafsu makan menurun dan warna tubuh lebih gelap (Furuzawa *et al.*, 2006). Ikan yang terinfeksi VNN menurut secara histopatologi memperlihatkan keadaan gangguan saraf dengan terbentuknya vakuolisasi pada otak dan retina. Gambaran infeksi virus di dalam sel maupun jaringan dapat mendeskripsikan secara spesifik adanya perubahan suatu gejala serta fungsi sel dan jaringan maupun sejauh mana virulensi virus berpengaruh terhadap tubuh inangnya, sehingga dapat dilakukan pemetaan distribusi pathognomik virulensi VNN pada inang.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan genomik VNN pada benih nila dengan analisa histopatologi dan RT-PCR sehingga dapat menggambarkan distribusi pathognomik virulensi VNN secara kualitatif dan kuantitatif, serta dapat dijadikan referensi untuk penelitian selanjutnya maupun upaya kontroling manajemen penyakit, khususnya mengenai infeksi VNN pada spesies ikan air tawar.

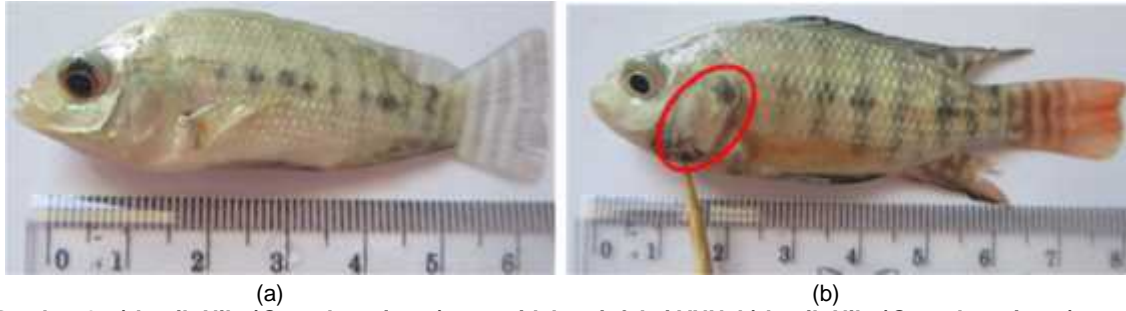
## MATERI DAN METODE

Sampel benih Nila ukuran 6-8 cm, diambil secara acak di beberapa sentra budidaya Nila di Jawa Tengah dan Jawa Timur pada bulan Desember 2014 – Desember 2015. Semua sampel dilakukan pengamatan gejala klinis. Sampel otak, mata, insang, ginjal, limpa, hati, usus dan otot masing-masing dibagi dua, untuk pengujian PCR dan histopatologi. Untuk sampel histopatologi setelah difiksasi dengan NBF 10%, dilakukan dehidrasi menggunakan larutan ethanol-xylene secara bertingkat dan diembeding menggunakan parafin. Selanjutnya sampel dipotong dengan ketebalan 5 µm dan diwarnai menggunakan haematoxylin dan eosin (H&E). Pengujian RT-PCR pada organ otak, mata, insang, ginjal, limpa, hati, usus dan otot dilakukan sebagai uji konfirmasi (data tidak ditampilkan). Metode yang digunakan metode deskriptif.

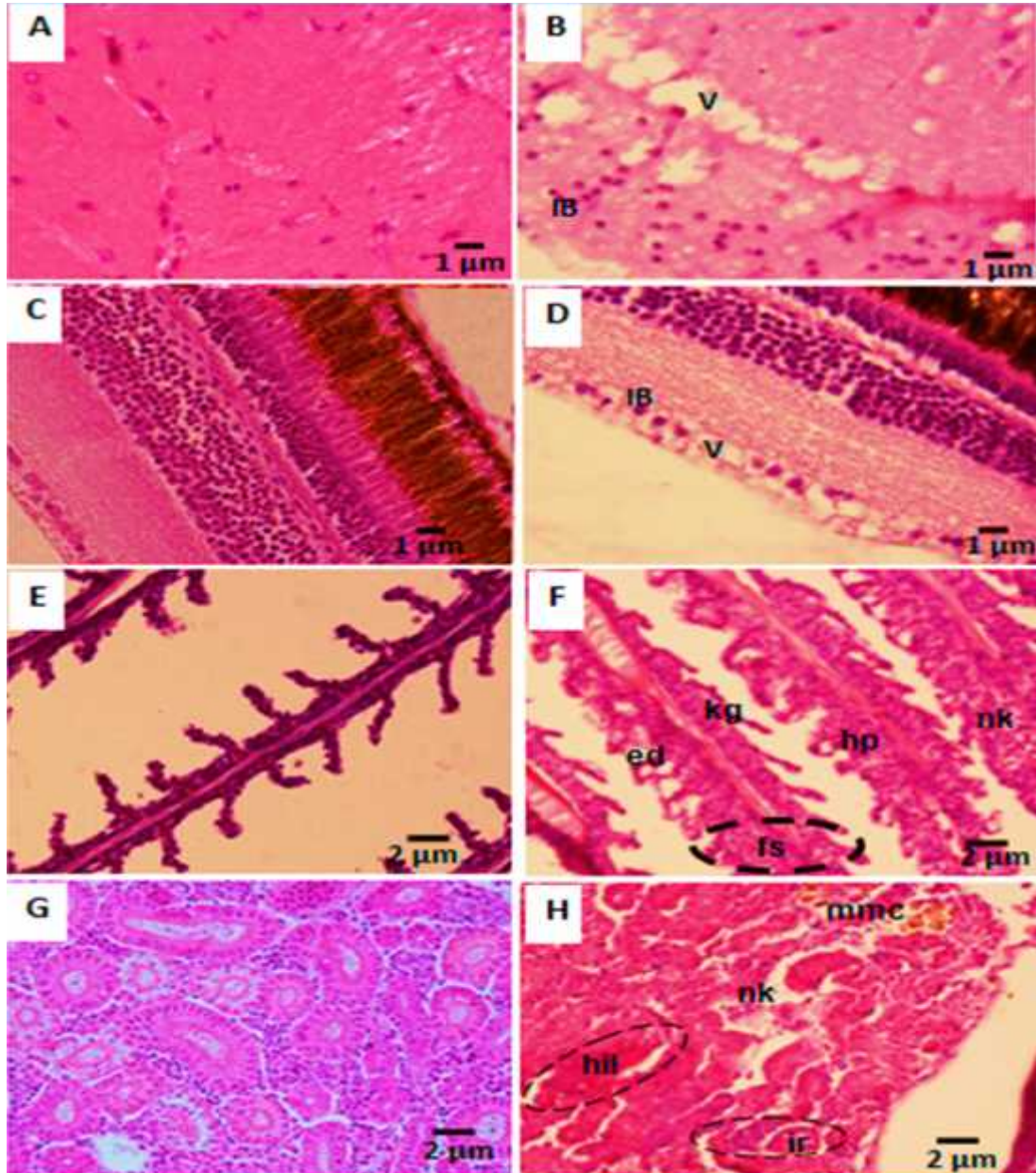
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang diambil dan diuji, tidak semua menunjukkan adanya gejala klinis seperti yang ditemui pada ikan yang terinfeksi VNN pada umumnya (Gambar 1). Berdasarkan hasil pemeriksaan sampel benih nila dengan menggunakan metode nested RT-PCR, menghasilkan sampel positif VNN dari organ otak dan mata (data tidak ditampilkan) baik untuk sampel benih nila yang mewakili Jawa Tengah maupun Jawa Timur.

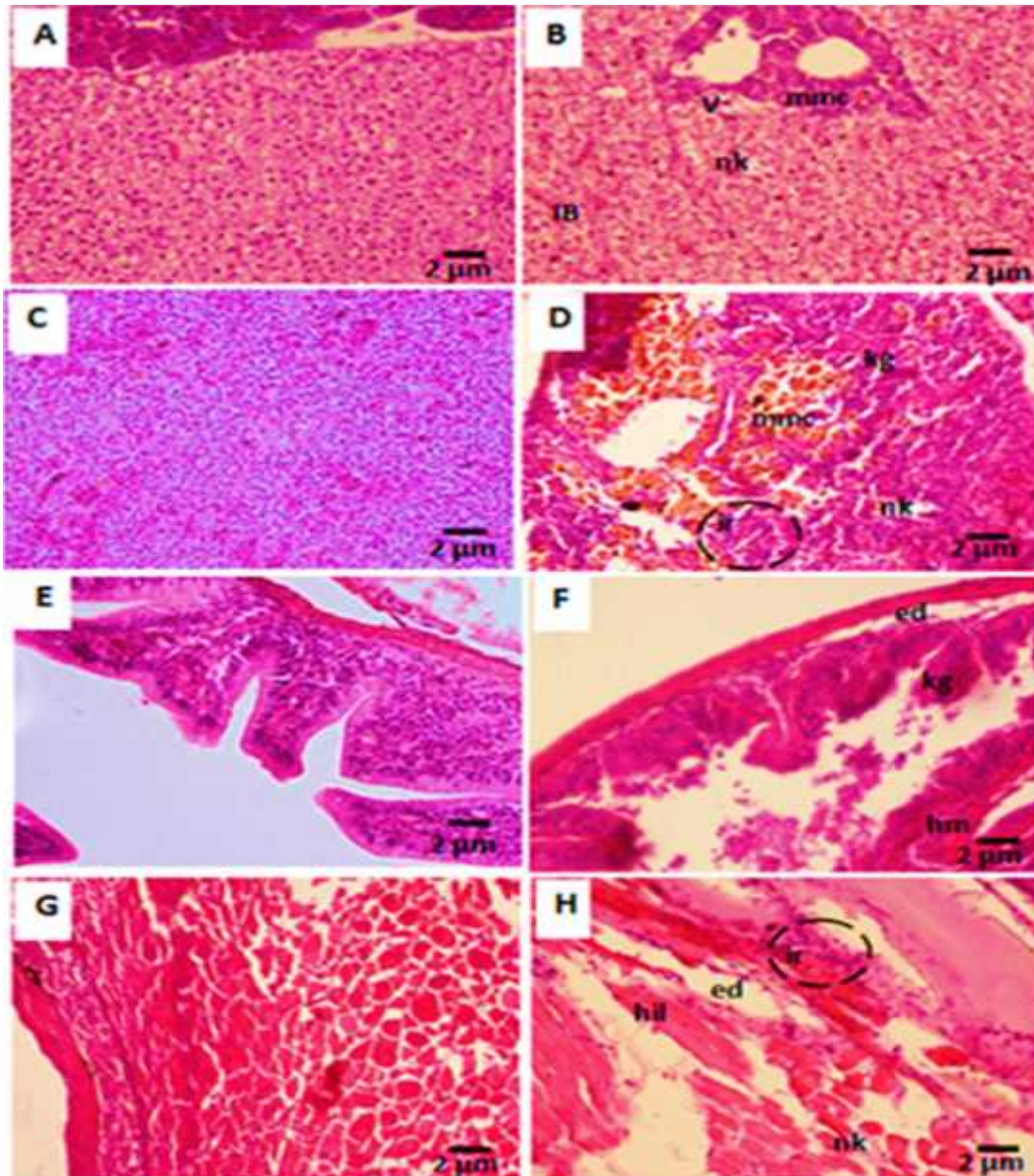
Hasil pemeriksaan histopatologi pada organ otak dan mata menunjukkan adanya vakuolasasi ringan dan inclusion body, sedangkan pada organ insang dan ginjal juga menunjukkan adanya perubahan patologi lain, namun tidak ditemukan vakuolasasi dan inclusion body (Gambar 2). Beberapa perubahan patologi juga ditemukan pada organ hati, limpa, usus, dan otot daging (Gambar 3). Distribusi pathognomik VNN pada benih nila yang diawali dengan pengujian klinis dan PCR sebagai uji konfirmasi, dapat dilihat pada Tabel.1



Gambar 1. a) benih Nila (*Oreochromis* sp.) yang tidak terinfeksi VNN, b) benih Nila (*Oreochromis* sp.) yang terinfeksi VNN terdapat bercak kehitaman (lingkaran merah).



Gambar 2. Histopatologi benih nila: normal (kiri) dan terinfeksi VNN (kanan) pada organ otak (A-B), mata (C-D), insang (E-F), dan ginjal (G-H). V = Vakuola IB = inclusion body, kg = Kongesti, ed = edema, hp = hiperplasi, nk = nekrosis, fs = fusi, ir = infiltrasi radang, hil = hialinasi dan mmc = melanomakrofaq. Pewarnaan HE.



**Gambar 3.** Histopatologi benih nila: normal (kiri) dan terinfeksi VNN (kanan) pada organ hati (A-B), limpa (C-D), usus (E-F), dan otot daging (G-H). kg = Kongesti, hm = hemoragi, ed = edema, hp = hiperplasi, nk = nekrosis, ir = infiltrasi radang, hil = hialinisasi dan mmc = melanomakrofaag. Pewarnaan HE.

Berdasarkan distribusi pathognomik VNN (Tabel 1) yang dibarengi dengan pemeriksaan klinis dan RT-PCR pada benih Nila, dapat diketahui bahwa benih nila yang diamati meskipun tidak banyak ditemukan gejala klinis, namun pada beberapa organ hasil PCR nya positif VNN, dan bukan hanya ditemui di organ otak dan mata, namun juga beberapa organ lainnya. Hal ini dapat diartikan telah terjadi interaksi antara virus dan reseptor pada organ benih Nila. Interaksi antara virus dan reseptor seluler merupakan suatu rantai proses dinamis yang memungkinkan masuknya virus ke dalam sel (Haywood, 1994). Begitu juga dengan hasil histopatologinya menunjukkan pathognomik VNN yang jelas, yaitu terbentuknya vakuolasasi pada organ otak dan mata, sama seperti pada infeksi VNN yang terjadi alami pada ikan kerapu (Maeno *et al.*, 2002). Hasil yang hampir sama juga ditunjukkan pada penelitian mengenai pemetaan pathognomik pada larva kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) (Yuwanita *et al.*, 2013).

Tabel 1. Distribusi virulensi VNN pada benih Nila

Organ target	Reseptor organ	Patologi anatomi	Konfirmasi genomik (RT-PCR)	Histopatologi	Gejala klinis yang tampak
Otak	CNS	Lembek, berair	(+) VNN 294 bp	Vakuolasasi, <i>Inclusion Body</i>	Berenang hiperaktif, sesekali menabrak
Mata	Sel batang Sel kerucut Sel kod	Eksophtalmia, kongesti	(+) VNN 294 bp	Vakuolasasi, <i>Inclusion Body</i>	Sedikit terjadi Eksophtalmia
Insang	Sel melanosit Sel goblet Sel chlorid	Normal	(-) VNN 294 bp	Fusi, odema, hiperplasi, Kongesti	-
Ginjal	Sel nefron glomerulus	Bengkak	(+) VNN 294 bp	Nekrosis mmc	-
Limpa	makrofag	Bengkak	(+) VNN 294 bp	Mmc, nekrosis, kongesti	-
Hati	Sel hepatosit	Pucat	(+) VNN 294 bp	Nekrosis, mmc, radang	-
Usus	Sel goblet Sel enterosit Sel mukosit	Normal	(-) VNN	Edema, kongesti, Hemoragi	-
Otot	Otot skelet	Ada bercak kehitaman	(+) VNN	Edema, radang, nekrosis, hialinisasi	Bercak kehitaman pada tubuh

Benih nila pada penelitian ini juga secara eksperimental dapat terinfeksi VNN dari nodavirus yang diisolasi dari kerapu tikus (data tidak ditampilkan). Meskipun belum banyak ditemukan kasus benih nila yang terinfeksi VNN, apalagi sampai menyebabkan kematian massal, namun penelitian ini telah menunjukkan bahwa benih nila dapat menjadi media pembawa virus (VNN), dan penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui epidemiologi maupun jalur infeksi penularannya (*role of transmission*) sehingga akan diperoleh data mengapa VNN dapat menginfeksi spesies ikan air laut dan spesies air tawar.

## KESIMPULAN

Dengan melihat distribusi pathognomik virulensi VNN pada benih nila membuktikan keberadaan VNN di benih nila merupakan salah satu permasalahan yang harus ditindaklanjuti. Fakta bahwa benih nila dapat membawa virus (VNN) tanpa menunjukkan gejala klinis yang spesifik akan menyulitkan pembudidaya, sehingga perlu kiranya dilakukan kontroling penyakit untuk mengetahui kondisi terkini mengenai keberadaan virus ini di benih nila maupun kemungkinan virus ini dapat menyebar ke spesies ikan air tawar lainnya.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si., dan Dr.Ir.Maftuch, M.Si. atas arahannya, serta Kepala dan Staf Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya I, yang telah membantu dan menyediakan fasilitasnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Athanassopoulou, F., Billinis, C., Prapas, T. 2004. Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp. *Dis Aquat Organ.* 60: 247-252.
- Bigarré, L., Cabon, J., Baud, M., Heimann, M., Body, A., Lieffrig, F., and Castric, J. 2009. Outbreak of betanodavirus infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L) in fresh water. *J. Fish Dis.*, 32: 667 – 673.

- Bovo, G., Nishizawa, T., Maltese, C., Borghesan, F., Mutinelli, F., Montesi F, and De Mas S. 1999. Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Res* 63: 143 – 146.
- Haywood, A. M. 1994. Virus receptors : binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *Journal of Virology* 68: 1 - 5.
- Hegde, A., The, H.C., Lam, T.J., and Sin, Y.M. 2003. Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poicelia reticulata* - comparative characterization and pathogenicity studies. *Arch. Virol.*, 148: 575 - 586.
- Jitheran, K.P., Shekhar, M.S., Kannappan, S., Azad I,S. 2011. Nodavirus infection in freshwater ornamental fishes in India: diagnostic histopathology and nested RT-PCR. *Asian fish Soc.*, 24: 12-19.
- Keawcharoen, J., Techangamsuwan, S., Ponpornpisit, A., Lombardini, E D, Patchimasiri, T., and Pirarat, N. 2015. Genetic characterization of a betanodavirus isolated from a clinical disease outbreak in farm-raised tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in Thailand. *J Fish Dis.* 38: 49-54.
- Maeno, Y., de la Pena, L.D., and cruz-lacierda, E.R. 2002. Nodavirus infection in hatchery-reared orange-spotted grouper *Ephinephelus coioides*: First record of viral nerveous necrosis in the Philippines. *Fish Pathol.*, 37: 87-89.
- Munday, B.L., Kwang, J., and Moody, N. 2002. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, 25: 127 - 142.
- Yuwanita, R., Yanuhar, U., Hardoko. 2013. Pathognomonic of Viral Nerveous Necrotic (VNN) virulence on larvae of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*). *Adv. Environ. Bio.*, 7(6): 1074-1081.