

Potensi Antivirus *Viral Nervous Necrosis* Ekstrak Metanol *Amphora* sp. pada Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.)

Potential Antivirus Viral Nervous Necrosis Methanol extract of Amphora sp. in Cantang Grouper (Epinephelus sp.)

Ach. Khumaidi¹, Astik Umiyah²

¹)Departemen Akuakultur, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ibrahimy, Situbondo.

²)Departemen Kebidanan, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Ibrahimy, Situbondo.

Penulis korespondensi : email : ach.khumaidi@gmail.com

(Diterima September 2019/Disetujui Oktober 2019)

Abstract

Grouper hybrid "Cantang" gets more serious attention than the grouper fish farmers because of high export interest, but an attack of viral nervous necrosis (VNN) is the main obstacle in cultivation. This study aims to explore the antiviral potential of diatom Amphora sp. to counter the VNN attack on Cantang groupers. The method used is the extraction of Amphora sp with methanol p.a. solvent. The extraction results were tested in vivo by giving Amphora sp. with different concentrations are: 17 µg/ml, 33 µg/ml, 50 µg/ml, and the challenge test the extract with 17 µg/ml + VNN, 33 µg/ml + VNN, 50 µg/ml + VNN. Fish treated with Amphora sp. extract were also challenged by giving VNN Positive fish meat. During the period of rearing fish observed clinical behavior and symptoms. After the fish were reared for 15 days, the fish harvested were analyzed using histology, RT-PCR, and immunohistochemical (IHC) methods to see the HSP immune response obtained from the administration of Amphora sp. extract to determine its potential as a natural antiviral. From several test parameters, the concentration of extract 50 µg/ml + VNN was given to give the best response in the IHC analysis with a DAB value (61.3%). These results indicate that the methanol extract of Amphora sp. has the potential to be used as an antiviral candidate in Cantang grouper.

Keywords: grouper, hybrid, diatoms, VNN, aquaculture, disease.

Abstrak

Kerapu hybrid "Cantang" mendapat perhatian yang lebih serius dari para pembudidaya ikan Kerapu karena minat ekspor yang tinggi, namun serangan *viral nervous necrosis* (VNN) menjadi kendala utama dalam budidayanya. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi antivirus diatom *Amphora* sp. untuk mengangguni serangan VNN pada ikan Kerapu Cantang. Metode yang digunakan yaitu ekstraksi *Amphora* sp. dengan pelarut metanol absolute. Hasil ekstraksi diuji in vivo dengan memberikan ekstrak metanol *Amphora* sp. dengan konsentrasi yang berbeda yaitu: 17 µg/ml, 33 µg/ml, 50 µg/ml, dan pemberian ekstrak dengan uji tantang 17 µg/ml + VNN, 33 µg/ml + VNN, 50 µg/ml + VNN. Ikan dengan perlakuan ekstrak *Amphora* sp. juga diuji tantang dengan memberikan daging ikan Positif VNN. Selama masa pemeliharaan ikan diamati tingkah laku dan gejala klinis. Setelah ikan dipelihara selama 15 hari kemudian ikan dipanen dianalisis menggunakan metode histologi, RT-PCR, dan IHC untuk melihat respon imun HSP yang diperoleh dari pemberian ekstrak *Amphora* sp. untuk mengetahui potensinya sebagai antivirus alami. Dari beberapa parameter uji yang dilakukan memperlihatkan konsentrasi ekstrak 50 µg/ml + VNN memberikan respon terbaik pada analisis IHC dengan nilai DAB (61.3%). Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Amphora* sp. memiliki potensi untuk dijadikan sebagai kandidat antivirus pada ikan Kerapu Cantang.

Kata kunci: kerapu, hybrid, diatom, VNN, akuakultur, penyakit.

PENDAHULUAN

Ikan Kerapu hybrid menjadi primadona baru para pengusaha budidaya ikan. Kelebihan ikan Kerapu *hybrid* jika dibandingkan dengan benih kerapu yang lain adalah pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan pertumbuhan benih Kerapu lain, kecepatan pertumbuhan Kerapu Cantang mencapai 724% sedangkan *E. fuscoguttatus* hanya 295% (Sutarmat dan Yudha 2013). Selain itu, Kerapu hybrid merupakan komoditas yang diminati pasar ekspor (Raihan Othman *et al.*, 2015).

Namun dalam proses budidaya terdapat kendala yang cuup serius yaitu serangan penyakit dengan tingkat mortalitas sangat tinggi mencapai 100%. Hasil penelitian Khumaidi *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa mortalitas yang tinggi dan kematian massal pada budidaya ikan Kerapu Cantang disebabkan oleh serangan penyakit *viral nervous necrosis* (VNN) di sentra budidaya ikan Kerapu Kabupaten Situbondo dengan gejala ikan berenang berputar atau berenang abnormal, nafsu makan menurun, warna tubuh menjadi gelap, berdiam diri di dasar, sampai menyebabkan kematian serta diperkuat hasil histologi dan RT-PCR (data belum dipublikasikan). Menurut Yuwanita dan Yanuhar (2013), serangan penyakit VNN dapat berdampak tingginya mortalitas ikan pada stadia larva dan juvenil serta dapat mengakibatkan kerusakan struktur jaringan *C. altivelis*, seperti hiperlasia, necrosis, hipertrofi, vakuolasi.

Penanggulangan serangan virus pada ikan budidaya terus dilakukan dengan berbagai macam penelitian. Mustopa *et al.*, (2012) mengungkapkan bahwa ekstrak tanaman serta metabolit sekunder dari mikroalga memiliki kandungan senyawa kimia yang dapat menjadi inhibitor RNA helikase yang dapat menekan atau menghambat replikasi virus. *Amphora* sp. merupakan salah satu mikroalga dari kelompok *Bacillariophyceae* yang dimanfaatkan sebagai pakan alami pada budidaya juvenil Abalone (Viera *et al.*, 2005). Selain sebagai pakan alami, potensi pengembangan di bidang bahan obat alami menjadi fokus penelitian yang sangat penting. *Amphora* sp. yang dibudidayakan pada media dengan salinitas tinggi memiliki kandungan kandungan protein yang tinggi serta senyawa bioaktif seperti polifenol, klorofil a, karotenoid, dan asam lemak (Boukhris *et al.*, 2017). Menurut Katayama *et al.*, (2011) diatom memiliki pigmen fotosintesis seperti Klorofil a, Klorofil c, dan *fucoxanthin* (FUCO) yang memiliki peran penting dalam bidang biomedis. FUCO memiliki aktifitas biologis sebagai antioksidan, antiobesitas, antikanker, dan antimikroba (Heo *et al.*, 2008; Heo dan Jeon 2009).

Penelitian pemanfaatan ekstrak *Amphora* sp. akan dilakukan sebagai bahan imunostimulan dan bahan antivirus alami sebagai inducer molekul anti-inflamasi *heat shock protein* (HSP). Menurut Deane *et al.*, (2019) peningkatan ekspresi HSP70 dapat memberikan sitoproteksi dengan menghambat dan memblokir komponen jalur sinyal inflamasi, seperti faktor transkripsi NF- κ B. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui kandungan ekstrak kasar *Amphora* sp. yang berpotensi sebagai antivirus alami serta mengetahui manfaat ekstrak kasar *Amphora* sp. pada ekspresi HSP70 sebagai indikator meningkatnya sistem pertanian ikan terhadap VNN.

METODE

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: erlenmeyer bertutup 300 ml, 1000 ml dan 2000 ml, beaker glass 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml dan 1000 ml, erlenmeyer 250 ml, 500 ml dan 1000 ml, timbangan digital, oven, magnetik stirer, botol vial, corong dan *rotary vacuum evaporator*, akuarium 30x30x30, aerator, selang aerasi, batu aerasi, setio set, seser, toples plastik dan nampan. Sedangkan peralatan untuk mengamati kualitas air digunakan pH meter, thermometer dan DO meter, *electroforesis system*, *gel documentation*, *microcentrifuge tubes*, *micropipette*, *microtome*, *pellet pestle*, *thermalcycler*, *vortex*, lemari es, *olimpus digital camera*, refrigerator, SA-HRP dan *wax dispenser*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus* sp.), *Amphora* sp. Isolate Virus VNN berasal dari Balai Karantina Ikan Juanda, Surabaya, Jawa Timur. Metanol absolute, kertas label, serat fiber, kapas, aluminium foil, kertas saring Whatman No.42, pasir, silika gel 60 GF 254 dan silika gel (SiO₂)-254 (plat KLT). klorofom, isopropanol, alcohol 75%, alcohol 95%, ethanol, xylene, akuadest, formalin, DEPC, agarose, control positif vnn, control

negative vnn, TAE buffer, set primer, alkohol, dionize water, PBS pH 7,4, H₂O₂ 3%, Antibodi primer anti-mouse HSP 70, dan antibodi sekunder antimouse IgG conjugate.

Uji invivo ekstrak *Amphora* sp.

Prosedur penelitian diawali dengan ekstraksi *Amphora* sp. yang kemudian dilakukan analisa menggunakan LC-MS/MS. Hasil ekstraksi *Amphora* sp. diinduksikan pada *Epinephelus* sp. yang sebelumnya telah dilakukan aklimatisasi. Dosis ekstrak yang diperlakukan pada ikan 17 µg/mL, 33 µg/mL, dan 50 µg/mL. Ikan dengan perlakuan ekstrak *Amphora* sp. juga diuji tantang dengan memberikan daging ikan Positif VNN. Selama masa pemeliharaan ikan diamati tingkah laku dan gejala klinis. Setelah ikan dipelihara selama 15 hari kemudian ikan dipanen dianalisa menggunakan metode histologi, RT-PCR, dan IHK (menggunakan software imuno ratio) untuk melihat respon imun HSP yang diperoleh dari pemberian ekstrak *Amphora* sp. untuk mengetahui potensinya sebagai antivirus alami.

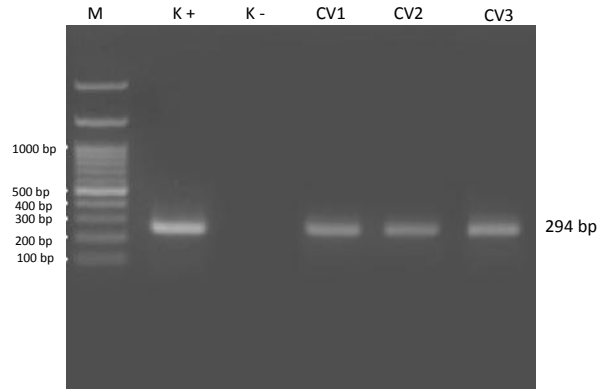
HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji In-vivo ekstrak metanol *Amphora* sp. pada ikan Kerapu Cantang

Perlakuan ekstrak kasar *Amphora* sp. dilakukan dengan Dosis yang berbeda-beda yaitu 17 µg/mL, 33 µg/mL, dan 50 µg/mL. Respon imun ikan terhadap pemberian ekstrak *Amphora* sp. dianalisa tingkah laku/gejala klinis, histologi, RT-PCR, dan ekspresi *Heat shock protein* dengan metode Immunohistokimia.

Tabel 2. Pengamatan tingkah laku ikan selama masa pemeliharaan

Perlakuan	Aktivitas	Respon	Keterangan
K+	Aktif berenang di seluruh bagian air (atas, tengah dan dasar)	Respon baik terhadap gerakan dan pakan	Teridentifikasi Normal
K-	Berenang di dasar wadah pemeliharaan, terkadang bergerombol dekat aerasi	Krespon terhadap gerakan dan pakan lemah, nafsu makan berkurang dan lebih banyak yang tidak respon.	Terjadi kematian pada hari ke-5 pemeliharaan
C1	Ikan Aktif berenang, terkadang bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Normal
C2	Aktif berenang, terkadang bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Normal
C3	Aktif berenang, terkadang bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan	Normal
CV1	Aktif berenang, terkadang bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan sedikit melemah, namun respon pakan masih baik	Terjadi kematian dibebberapa ikan pada hari ke-10 pemeliharaan
CV2	Aktif berenang, terkadang bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan baik	Tidak terjadi kematian pada ikan
CV3	Aktif berenang, terkadang bergerombol dekat aerasi	Respon terhadap gerakan dan pakan baik	Tidak terjadi kematian pada ikan

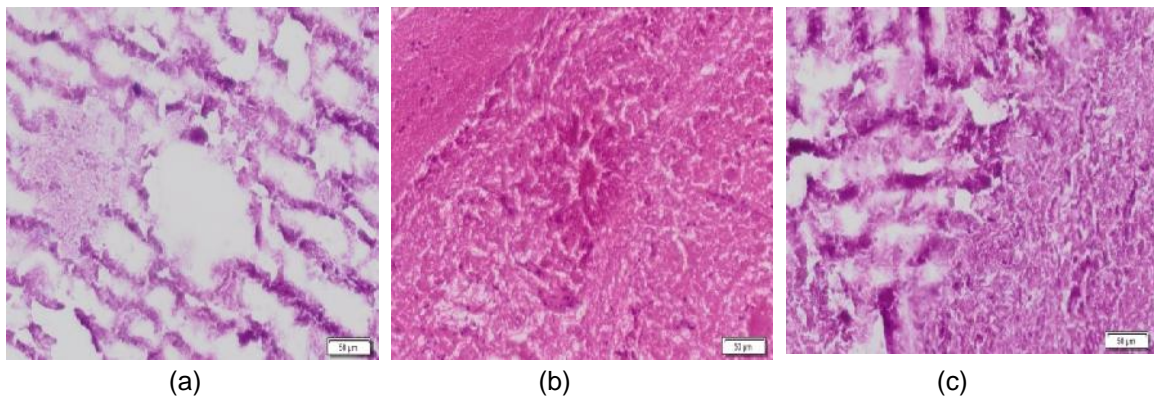


Gambar 3. Hasil amplifikasi nested RT-PCR perlakuan: Marker (M), Kontrol positif VNN (+), Kontrol negative VNN ikan dengan perlakuan ekstrak *Amphora* sp. dengan dosis 17 µg/mL dan penginfeksi VNN (CV1), (3) ikan dengan perlakuan ekstrak *Amphora* sp. dengan dosis 30 µg/mL dan penginfeksi VNN (CV2), dan (4) ikan dengan perlakuan ekstrak *C Amphora* sp. dengan dosis 50 µg/mL dan penginfeksi VNN (CV3).

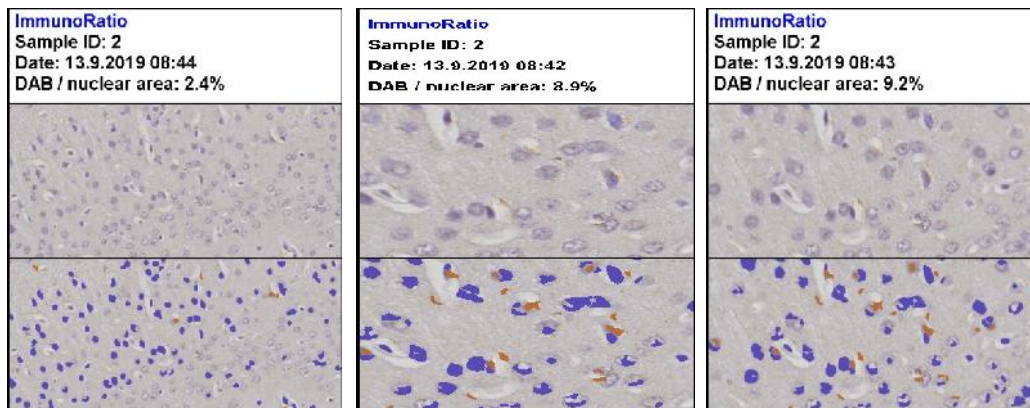
Pada gambar 3. memperlihatkan hasil analisis nested RT-PCR sebagai konfirmasi bahwa ikan dengan pemberian pakan daging ikan terinfeksi VNN dapat menginfeksi pada perlakuan kontrol (-), dan tiga perlakuan lain yaitu: CV1, CV2 dan CV3 dengan munculnya band 294 bp. Menurut Koesharyani dan Novita (2006) VNN muncul pada band 294 bp.

Analisis Histologi

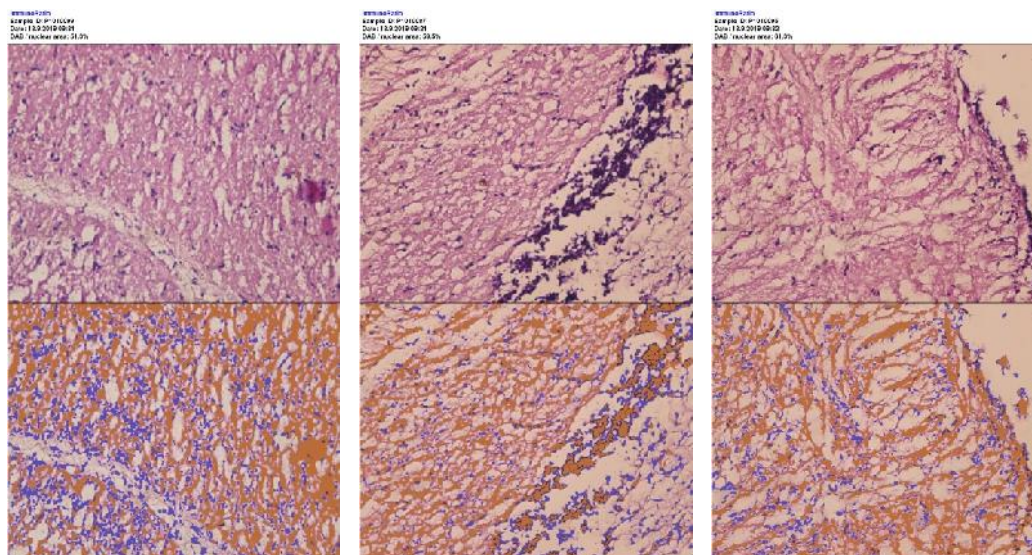
Untuk melihat dampak perlakuan pada penelitian ini, dilakukan analisis histologi pada organ otak ikan Kerapu Cantang. Masing-masing perlakuan memberikan dampak yang berbeda-beda. Secara umum, ikan dengan penginfeksi VNN saja (Kontrol +) memperlihatkan kerusakan jaringan yaitu nekrosis dan vakuolasi (gambar 4). Sedikit berbeda dengan perlakuan ikan dengan pemberian ekstrak *Amphora* sp. memperlihatkan kondisi organ normal. Sedangkan ikan Kerapu yang diberi perlakuan dengan ekstrak *Amphora* sp. dan diuji tantang dengan *Viral nervous necrosis* memperlihatkan kerusakan yang cenderung lebih sedikit dari ikan Kerapu yang hanya diinfeksi VNN. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Amphora* sp. dapat memberikan efek positif terhadap perlindungan ikan Kerapu dari serangan *viral nervous necrosis*.



Gambar 4. Hasil histologi otak ikan Kerapu Cantang: a) diinfeksi VNN, b) diberi perlakuan ekstrak *Amphora* sp., dan c) diberi perlakuan ekstrak *Amphora* sp. dan diuji tantang dengan VNN.



Gambar 5. Hasil immunoratio HSP70 pada organ otak ikan Kerapu Cantang: a) pemberian ekstrak *Amphora* sp. 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2,4%), b) pemberian ekstrak *Amphora* sp. 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (8,9%), dan c) pemberian ekstrak *Amphora* sp. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (9,2%).



Gambar 6. Hasil immunoratio HSP70 pada organ otak ikan Kerapu Cantang dengan uji tantang VNN: a) pemberian ekstrak *Amphora* sp. 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (51,3%), b) pemberian ekstrak *Amphora* sp. 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (59,5%), dan c) pemberian ekstrak *Amphora* sp. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (61,3%)

Analisis ekspresi HSP70 pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Amphora* sp. pada ikan Kerapu memberikan dampak terhadap persentase ekspresi HSP70. Pada gambar 4 diperlihatkan ekspresi tertinggi HSP70 diperlihatkan pada perlakuan ekstrak *Amphora* sp. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ yaitu 9,2%. Sedangkan pada ikan Kerapu dengan perlakuan ekstrak *Amphora* sp dan uji tantang dengan VNN nilai persentase tertinggi ekspresi HSP70 juga diperlihatkan pada perlakuan ekstrak *Amphora* sp. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ yaitu 61,3%. Peningkatan ekspresi dari HSP70 dipengaruhi oleh kandungan senyawa aktif pada ekstrak *Amphora* sp. yang dapat meningkatkan respon imun pada ikan Kerapu Cantang. Menurut Yanuhar *et al.*, (2019), pemberian ekstrak mikroalga *Chlorella* sp. dapat meningkatkan ekspresi protein HSP.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa tingkah laku, histologi dengan melihat normalitas jaringan otak ikan Kerapu Cantang dan ekspresi HSP70 melalui metode imunohistokimia mengungkapkan bahwa

ekstrak *Amphora* sp. dapat memberikan dampak positif dengan meningkatkan kelulus hidupan ikan, jaringan normal dan meningkatkan ekspresi HSP70 sebagai penanda respon imun semakin baik untuk menanggulangi serangan VNN pada ikan Kerapu Cantang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kemenristekdikti RI melalui Direktur Riset dan Pengabdian Masyarakat yang telah membiayai penelitian ini dengan nomor kontrak: 111/SP2H/PPM/DRPM/2019, serta beberapa pihak lain yang telah membantu atas terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Boukhris, S., Athmouni, K., Hamza-Mnif, I., Siala-Elleuch, R., Ayadi, H., Nasri, M., dan Sellami-Kamoun, A. 2017. The Potential of a Brown Microalga Cultivated in High Salt Medium for the Production of High-Value Compounds. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4018562>
- Deane, E. E., Woo, N. Y. S., Eddie, E., dan Woo, N. Y. S. 2019. Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (*Sparus sarba*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(5), 1054–1063. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00347.2004>.
- Heo, S.-J., Ko, S.-C., Kang, S.-M., Kang, H.-S., Kim, J.-P., Kim, S.-H., ... Jeon, Y.-J. 2008. Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H₂O₂-induced cell damage. *European Food Research and Technology*, 228, 145–151. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0918-7>
- Heo, S., dan Jeon, Y. 2009. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage C3-1 C3-2 C3-3. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 95(2), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.11.011>
- Katayama, T., Murata, A., dan Taguchi, S. 2011. Responses of pigment composition of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* to silicate availability during dark survival and recovery. *Plankton & Benthos Research*, 6(1), 1–11.
- Khumaidi, A., Fadjar, M., Iranawati, F., Kilawati, Y., dan Yanuhar, U. 2019. Mass mortality associated with viral nervous necrosis of hybrid grouper (*Epinephelus* sp.) cultured in city of grouper. In *International Conference on Biology and Applied Science (ICOBAS)* (Vol. 070007). <https://doi.org/10.1063/1.5115724>
- Koesharyani, I., dan Novita, H. 2006. Diagnosa “Nested Reverse Transcriptase - PCR” untuk “Viral Nervous Necrosis” pada Benih Ikan Kerapu Bebek, *Cromileptes altivelis* [in Indonesian]. *Jurnal Manusia Dan Lingkungan*, 1(3), 382–386. Retrieved from <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra/article/viewFile/2252/1829>
- Mustopa, A. Z., Susilaningsih, D., Sukmarini, L., Ridwan, M., Delicia, dan Hasim. 2012. Pengembangan polisakarida dari mikroalga btm 11 sebagai inhibitor rna helikase virus hepatitis c. *Prosiding InSINas*.
- Raihan Othman, A., Kawamura, G., Senoo, S., dan Fui, C. F. 2015. Effects of Different Salinities on Growth, Feeding Performance and Plasma Cortisol Level in Hybrid TGGG (Tiger Grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* x Giant Grouper, *Epinephelus lanceolatus*) Juveniles. *International Research Journal of Biological Sciences Int. Res. J. Biological Sci*, 4(3), 2278–3202.
- Sutarmat, T., dan Yudha, T. 2013. Analisis Keragaan Pertumbuhan Kerapu Hibrida Hasil Hibridisasi Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dengan Kerapu Kertang (*Epinephelus lanceolatus*) dan Kerapu Batik (*Epinephelus microdon*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 8(3), 363–

372. Retrieved from <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra/article/viewFile/483/490>

- Viera, M. P., Pincehetti, G. J. L., Vicoose, G. C., Suarez, S., Haroun, Ricardo, J., dan Izquierdo, M. S. 2005. Suitability of three red macroalgae as a feed for the abalone *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve. *Aquaculture*, 248(May 2014), 75–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.002>
- Yanuhar, U., Al-Hamidy, I., dan Caesar, N. R. 2019. Treatment of *Chlorella* sp . extract on heat shock cluster (HSC) response from the tissue and bloodcells proliferation of *Epinephelus fuscoguttatus - lanceolatus* infected by Viral Nervous Necrosis. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 236, p. 012100). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/236/1/012100>
- Yuwanita, R., dan Yanuhar, U. 2013. Pathognomonic of Viral Nervous Necrotic (VNN) Virulence on Larvae of Humpback, 7(6), 1074–1081.