

KULTUR SEL OTAK DAN MATA IKAN KERAPU (*Chromileptes altivelis*) UNTUK REPLIKASI VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN)¹ [Cell line *Chromileptes altivelis* from Encephalon and Retina for Viral Nervous Necrosis (VNN) Replication]

Sumaryam^{2KI1}, Kusyairi², Sri Oetami², Hari Suprpto³, Garry Cores de Vries³

Takultas Pertanian Universitas Dr. Soetomo, Jin Semolowaru, Surabaya 60118

³Fakultas Perikanan Universitas Airlangga, Jin Mulyorejo Kampus C, Surabaya 60115

•email: maryqu63@yahoo.co.id

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini untuk pembuatan kultur sel otak dan mata ikan kerapu *Chromileptes altivelis*. Metode yang digunakan dalam pembuatan kultur seperti yang dilakukan oleh Chen *et al.* (1982) dari sirip ikan mas dan crussian carp. Kultur jaringan otak dan mata ikan kerapu yang dilakukan menghasilkan kultur sel yang sehat dan proliferasinya sangat baik dalam media L-15. Kultur jaringan tersebut juga dapat digunakan untuk replikasi virus VNN, dan hasilnya tetap mempunyai patogenitas yang tinggi karena ikan kerapu yang diinfeksi mati dalam waktu yang singkat. Hasil kultur sel disimpan pada deep freezer menggunakan glycerol 10 % pada suhu -80 oC selama 1 tahun dengan thawing tiap 3 bulan untuk mengetahui apakah sel masih hidup.

Kata kunci: *Chromileptes altivelis*, Kultur sel otak, Viral Nervous Necrosis

ABSTRACT

The experiment was deal with propagat cell line from encephalon and retina of grouper *Chromileptes altivelis*. The cell was isolate propagation of method described following by Chen *et al.* (1982) from carp and crussian carp fin. The cell line from encephalon and retina of grouper grew very fast and heavy in medium L-1S. The cell line were then used for viral replication giving, isolated virus with high pathogenicity indicated by mortal effect in short time after administration. The preservation of cell line is in 10% glycerol under -80°C for one year. Thawing will be done every 3 months to ensure the viability of the cell.

Keywords: *Chromileptes altivelis*, Cell line, Viral Nervous Necrosis

PENDAHULUAN

Penelitian ini dilakukan untuk menanggulangi masalah kematian yang sangat tinggi (97-98%) pada ikan kerapu (*Chromileptes altivelis*) di panti pembenihan akibat VNN (viral nerveous necrosis). VNN adalah penyakit yang sangat berbahaya karena menimbulkan kematian yang tinggi pada stadia larva dan juvenile, disebut juga fish encephalitis (Breuil, *et al.*, 1991) atau viral encephalopathy and retinopathy atau VER (Munday *et al.*, 1992). Diduga penyakit VNN pada ikan kerapu disebabkan oleh penurunan daya tahan karena adanya gangguan produksi antibodi dan aktifitas phagocytosis.

Ikan kerapu termasuk ikan perairan tropis dengan suhu pemeliharaan optimal 20-30°C mampu hidup pada air payau dan laut. Indonesia adalah negara produsen kerapu terbesar di dunia. Berdasarkan data Departemen Kelautan dan Perikanan, produksi ikan kerapu Indonesia pada tahun 2004 sebanyak 6.552 ton sedangkan pada tahun 2006 diperkirakan mencapai 12

ribu ton dan pada 2009 diproyeksikan naik menjadi 30 ribu ton (<http://rn.antaranews.com>). Salah satu cara untuk mendapatkan panen kerapu yang banyak dalam jangka waktu singkat adalah memakai teknik budidaya intensif dengan padat tebar tinggi, tetapi mudah memicu munculnya serangan penyakit di antaranya adalah VNN.

Kelemahan penelitian virus pada ikan kerapu adalah karena tidak adanya kultur sel dari ikan tersebut sehingga studi untuk patogenitas, replikasi dan lainnya sangat sulit dilakukan. Saat ini ikan kerapu telah diekspor sehingga kelangsungan pengiriman ikan harus dijaga, oleh sebab itu kegagalan budidaya yang disebabkan oleh penyakit harus dicegah.

Dalam rangka memecahkan masalah pada pembenihan kerapu maka sangat dibutuhkan penyediaan sel kultur untuk penelitian VNN. Penelitian ini bertujuan untuk mengkultur sel otak dan retina ikan kerapu untuk replikasi VNN.

BAHANDANMETODE

Petnbuatan kultur sel dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Program Studi Perikanan dan Uji Tantang pada ikan kerapu dilakukan di Laboratorium Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Dr. Soetomo Surabaya.

Kultur Sel Primer (Primary Cell Culture)

Kerapu dengan berat minimal 20 g dibeli dari BBAP Situbondo, Jawa Timur dipelihara beberapa minggu dalam kolam berukuran 1 X 1 X 0,8 m³ yang dilengkapi aerasi di Laboratorium Perikanan Fakultas Pertanian, Universitas Dr. Soetomo Surabaya. Ikan yang digunakan dipilih yang sehat dan gesit kemudian dibius dengan MS-222.

Kerapu dilap dengan kapas beralkohol 70%, kemudian mata dan otak diambil dengan cara menggunting organ tersebut dan secepatnya dimasukkan kedalam L-15 yang mengandung suplemen 2,5% (w/v) NaCl, 10% fetal bovine serum, 1% yeast solution, 1% lipid concentrate, 100 Iu/ml penicillin dan 50 (Jg/ml) kanamycin sulfate, kemudian diamati dibawah mikroskop. Jaringan otak dan mata dalam medium L-15 kemudian disimpan dalam inkubator. Untuk melihat perkembangbiakan sel, dilakukan pengamatan setiap hari.

Sub Kultur Sel

Sel hasil kultur biasanya akan mati setelah usia empat hari, karena itu perlu dilakukan sub kultur untuk mendapatkan sel baru hasil dari pembiakan sel. Setelah dilakukan sepuluh kali sub kultur, hasil sub kultur ditransfer ke media yang mengandung 0,1 % trypsin dalam EDTA/PBS dan kemudian dilakukan sub kultur setiap minggu pada split ratio 1:2 dalam L-15.

Untuk mendapatkan kondisi pertumbuhan sel yang optimal dilakukan pengaturan pemberian konsentrasi FCS (fetal bovine serum) yang diikuti dengan pengaturan suhu kultur jaringan pada kisaran 20-30°C sesuai kondisi lingkungan hidup ikan kerapu.

Penyimpanan Kultur Sel

Kultur jaringan yang sudah jadi akan disimpan untuk dipergunakan suatu-waktu dalam penelitian. Sel hasil kultur disimpan dibawah suhu -80°C dalam larutan gliserol 10% selama satu tahun.

Isolasi Virus

Kerapu yang terinfeksi VNN setelah disterilkan dengan alkohol 70% diambil mata dan otaknya, kemudian organ tersebut ditimbang dan digerus dengan mortar. Hasil penggerusan dilarutkan dalam L-15 yang mengandung Fetal bovine serum (FBS) dengan ratio 9:1, dipusingkan pada 2,000 rpm selama 10 menit. Supernatant yang diperoleh difilter dengan kertas saring 0.45µm. Selanjutnya sediaan virus disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Pemurnian Virus

Pemurnian virus dikerjakan menurut metode Oh (1995) sebagai berikut, supernatant diencerkan dengan TE buffer disentrifuse pada 4,000 rpm selama 20 menit, kemudian disentrifuse lagi 80,000 rpm selama 120 menit. Pellet (endapan) yang didapatkan diencerkan dengan TE buffer dan dipisahkan dengan no linear sucrose gradient 10 dan 50% pada 100,000 rpm selama 120 menit. Virus yang didapatkan diencerkan dengan TE buffer dan dilakukan dialisa semalam terhadap TE buffer.

Replikasi Virus

Replikasi virus dilakukan untuk mengetahui bahwa kultur sel kerapu tersebut dapat digunakan untuk memperbanyak jumlah virus. Pengamatan terhadap sel monolayer dilakukan untuk mengecek keadaan sel, jika sel sehat kemudian dicuci dengan HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) untuk mengambil sel yang mati. Selanjutnya ke dalam sel monolayer dimasukkan 0,5 ml dari 10³ VNN dan diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah beberapa menit sambil digoyang untuk meratakan penyerapan virus, dilakukan pencucian sebanyak 3 kali dengan HBSS. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C dalam inkubator. Pengamatan dilakukan setiap hari, pada saat CPE (cytopathic effect) telah sempurna. Pengambilan dilakukan dengan tube untuk disimpan pada suhu -70°C sampai waktu pemanenan.

Uji Tantang Terhadap Kerapu

Dua puluh ekor ikan kerapu uji disuntik dengan 0.1 ml larutan VNN untuk mengetahui tingkat patogenitas virus. Setelah penyuntikan, kerapu dipelihara dalam akuarium selama 14 hari dan dicatat mortalitasnya. Kerapu yang mati diadakan reisolasi dari mata dan otak untuk memastikan bahwa kematian ikan

disebabkan oleh VNN dan dianalisis dengan PCR.

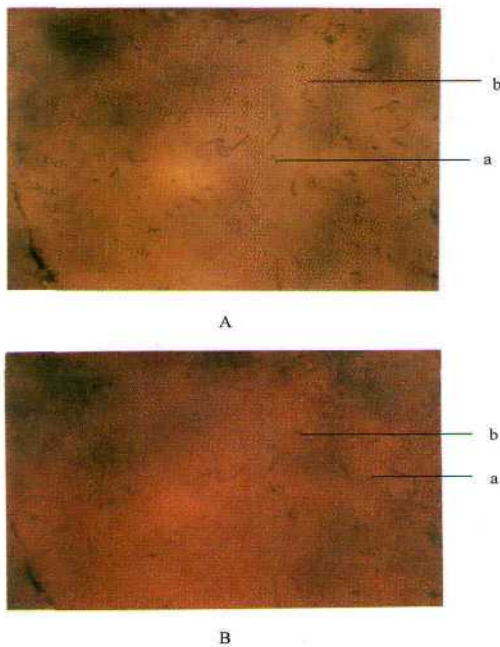
Cytopathic Effects (CPE)

Untuk mengetahui bahwa VNN dapat menginfeksi kultur sel kerapu dilakukan pengamatan CPE. Lima puluh mikroliter dari sediaan virus diinokulasikan pada 96 well plate yang berisi kultur cell monolayer yang telah dipersiapkan 24 jam sebelumnya. Kemudian diinkubasikan pada suhu 25°C dan diamati sampai CPE terlihat.

HASIL

Kultur sel didapatkan setelah dilakukan kultur otak dan mata pada medium L-15, dan replikasi terjadi dalam waktu 24 jam. Pengamatan terhadap sub kultur setiap dua minggu dilakukan sampai 4 minggu dan sel masih dalam keadaan baik. Setelah empat kali dilakukan subkultur semua sel tumbuh dengan baik dan sudah tidak berkelompok. Untuk mengatasi sel yang masih berkelompok dengan kepadatan tinggi dilakukan trypsinasi agar sel terpisah satu dengan lainnya dan membentuk monolayer.

Hasil kultur jaringan kerapu setelah 24 jam dan

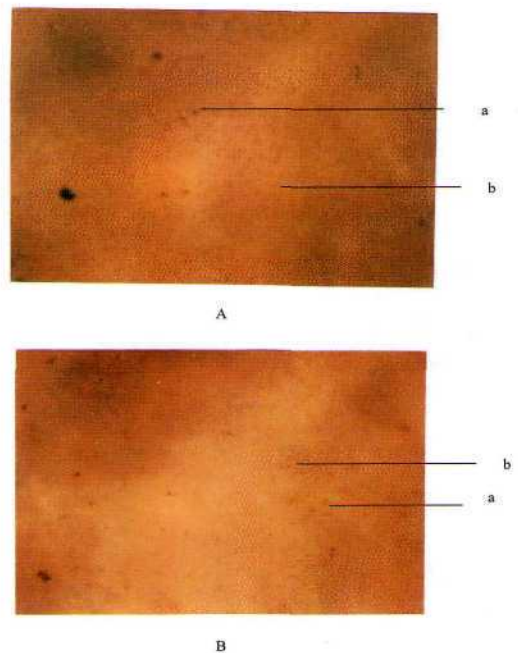


Gambar 1. Foto A. Kultur primer sel otak pada usia 24 jam. Foto B. Kultur primer sel mata ikan kerapu pada usia 24 jam. Sel tumbuh dengan baik tetapi masih sedikit. a. sel yang mati, b. sel yang hidup.

sub kulturnya ditampilkan pada Gambar 1 dan 2. Sampai pada 72 jam setelah sub kultur, sel tumbuh sangat banyak. Sel tersebut mengelompok dengan kepadatan tinggi hingga bertumpuk satu dengan lainnya hingga keluar medium.

Untuk membuktikan apakah sel yang dihasilkan dari kultur jaringan dapat digunakan untuk percobaan patogenitas VNN, dilakukan ujiantang dengan virus tersebut yang dihasilkan dari proses isolasi virus VNN.

Hasil isolasi VNN yang dikembangkan pada kultur jaringan kerapu setelah dipanen disuntikan secara intramuscular pada ikan kerapu uji untuk mengetahui kemampuan virus berkembang pada kultur jaringan. Hasil penyuntikan ditampilkan pada Tabel 1. Setelah penyuntikan ikan yang mati tidak menunjukkan gejala klinis seperti pada infeksi alami, kemungkinan disebabkan karena infeksi dilakukan menggunakan jumlah virus yang banyak sehingga gejala klinis tidak bisa berkembang sebagai mestinya pada infeksi alami. Pada umumnya gejala klinis terjadi dalam waktu yang lama sehingga bisa menampakkan gejala khas, misalnya *white spot* pada udang yang terinfeksi dengan SEMBV.



Gambar 2. Foto A. Kultur sel otak ikan kerapu, setelah 72 jam sub kultur pertama. Foto B. Kultur sel mata ikan kerapu, setelah 72 jam sub kultur pertama. Sel sudah mulai tumbuh lebat dan bagus.

Tabel 1. Hasil uji infeksi buatan VNN terhadap20 ekor ikan kerapu menggunakan virus hasil pengembangbiakan dalam kultur sel.

Metode infeksi	Jumlah ikan (mati/hidup)	Lama kematian (hari)
Suntik intramuscular	20(18/2)	4

Data yang diperoleh memperlihatkan bahwa sel dapat tumbuh dan virus dapat mengadakan replikasi dengan baik pada kultur jaringan. Analisis menggunakan PCR (Gambar 3) nampak bahwa VNN yang diisolasi dari kerapu yang terinfeksi alami, dan infeksi buatan. Infeksi buatan ditandai dengan jumlah virus yang banyak sehingga memberikan pita yang tebal pada hasil elektroforesis hasil PCR.

PEMBAHASAN

Sejak Wolf dan Quimby (1962) sukses mengkultur jaringan ikan pertamakali, sampai sekarang kira-kira lebih dari 80 kultur jaringan ikan yang telah bisa dikultur. Kultur jaringan adalah media yang sangat penting untuk penelitian beberapa disiplin ilmu biologi sel (Silverstein, 1989). Nagai *et al.* (1998) berhasil mengisolasi dan mengkultur sel *black abalone* primer menggunakan medium L-15.

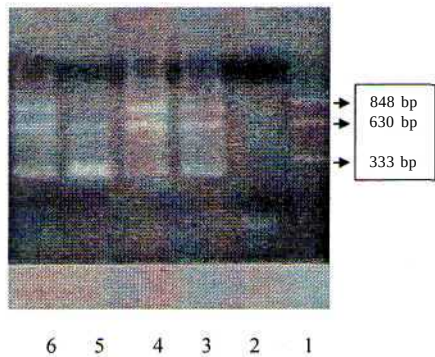
VNN dapat dikultur pada SSN-1 *cell line*, tetapi harga kultur jaringan tersebut mahal sehingga membuat kultur jaringan sendiri merupakan pilihan. Terlebih lagi

apabila harus melakukan kultur setiap hari maka biayanya akan sangat besar. Walaupun kultur jaringan kerapu belum diketahui sampai berapa lama bisa disimpan, keberhasilan kultur jaringan kerapu memberikan harapan baru tentang penelitian virus kerapu di laboratorium yang kita kembangkan.

Ada 3 teknikyng dikembangkan untuk isolasi jaringan dari beberapa organ yang dapat dikelompokkan menjadi 1). mekanis, 2). kimia, 3). enzim digestif. Pada proses pembuatan kultur jaringan biasanya dipakai kombinasi ketiga teknik di atas untuk membuat kultur jaringan secara baik. Pemakaian metode mekanis yang tidak tepat dapat menyebabkan rusaknya sel/pecah dan metode ini biasanya dipakai padatahap awal pembuatan kultur jaringan (Burleson *et al*, 1992). Kultur jaringan yang sebenarnya adalah untuk memaksa sel menjadi individual dan bersifat monolayer. Kultur jaringan kerapu ini mempunyai berbagai macam kegunaan, antara lain untuk studi penyakit ikan khususnya virus yang menyerang kerapu. Kultur jaringan dari sirip ikan Crussian carp dapat digunakan untuk studi *adoptive transfer* dan *graft rejection* (Hasegawa *etal.*, 1997). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Muhajir *et al.* (1996) yang melakukan kultur sel dari sirip ekor ikan kerapu menunjukkan bahwa walaupun sel yang dihasilkan dari kultur jaringan dapat disimpan selama beberapa waktu tetapi temyata tidak dapat digunakan untuk percobaan patogenitas VNN, karena jaringan sirip ikan kerapu tidak sesuai untuk pertumbuhan VNN. Karena itu kultur jaringan yang berasal dari otak dan mata ikan kerapu ini sangat berguna sekali untuk penelitian virus karena ternyata VNN dapat tumbuh dan berkembang biak didalamnya.

VNN adalah penyakit yang sangat berbahaya karena menimbulkan kematian yang tinggi pada stadia larva dan juvenile, disebut juga fish encephalitis (Breuil *et al.*, 1991) atau viral encephalopathy and retinopathy atau VER (Munday *et al.*, 1992).

Deteksi dengan PCR pada ikan yang terinfeksi selama kurun waktu tahun 1998-2000 adalah VNN. Ikan yang mudah terserang adalah grouper yang berumur 10 hari - 4 bulan, tetapi kematian massal terjadi pada umur 20-30 hari. Kematian menurun setelah ikan berumur 1 tahun. VNN diketahui mempunyai inang yang sangat luas tetapi usia ikan yang terinfeksi adalah



Gambar 3. Produk PCR dari ikan kerapu yang terinfeksi alami dan buatan dengan VNN. Lajur 1: Marker, Lajur: 2 Kontrol negatif, Lajur 3: Kontrol positif, Lajur 4: Sampel terinfeksi berat (infeksi buatan pada *C. altivelis*), Lajur 5 : Sampel terinfeksi menengah (infeksi buatan pada *E. fuscognittatus*) Lajur 6 : Sampel terinfeksi berat alamiah.

spesifik. Ada 9 spesies yang rentan terhadap terhadap infeksi VNN. Hal ini menunjukkan bahwa grouper sensitif terhadap nodavirus. Karena itu VNN menjadi penyakit utama dalam produksi benih grouper, karena ikan yang mudah terserang adalah larva dan juvenile (Mori *et al.*, 1991).

Sebelum usia 20 hari, ikan yang terserang VNN tidak menunjukkan gejala apapun kecuali hilangnya nafsu makan. Hilangnya nafsu makan akan mempengaruhi asupan nutrisi pada ikan sehingga jika terlalu lama akan menjadi sangat lemah dan cepat terinfeksi oleh VNN. Pada usia 20-45 hari ikan yang terinfeksi terlihat lemah dan sering terlihat berenang di dekat permukaan air, dan mulailah terjadi kematian ikan sedikit demi sedikit atau dalam jumlah yang banyak. Sesudah 45 hari sampai 4 bulan, ikan yang sakit akan berada di dasar kolam yang kemudian diikuti dengan kematian yang tinggi. Setelah usia ikan 4 bulan, ikan yang terinfeksi berada di dekat permukaan air, karena kemungkinan terjadi kelainan pada ikan dan kerusakan pada gelembung renang sehingga ikan sulit untuk beradaptasi terhadap kedalaman air. Kebanyakan ikan yang terinfeksi adalah larva dan juvenil dan menimbulkan kematian yang tinggi, juga sekarang pada ikan dewasa dan siap panen, khususnya grouper (Fukuda *et al.*, 1996) walaupun tidak menyebabkan kematian yang tinggi. Khusus untuk grouper dan sea bass di Eropa penyakit tersebut lebih akut jika suhu air meningkat (Tanaka *et al.*, 1998).

Kultur jaringan memerlukan biaya yang mahal karena medium harus diganti setiap 7 hari. Kultur jaringan tersebut sebaiknya disimpan pada suhu rendah untuk memperlambat metabolisme. *Tissue passage* dapat dilakukan dua kali dalam setahun, sehingga dapat menghemat anggaran. Jika kultur jaringan pada suhu -80°C, proses metabolisme sel akan berhenti walaupun tidak total. Kultur jaringan dapat disimpan pada suhu -70 sampai dengan -80°C dengan campuran 10 persen gliserol, pemberian gliserol adalah untuk melapisi sel dari pembekuan yang cepat sehingga sel tidak rusak.

KESIMPULAN

Kultur jaringan ikan otak dan mata kerapu menghasilkan kultur sel yang sehat dan proliferasinya

sangat baik menggunakan L-15. Kultur jaringan tersebut juga dapat digunakan untuk memperbanyak VNN, dan hasil replikasi virus tersebut tetap mempunyai patogenitas yang tinggi. Kultur jaringan dapat disimpan dengan kriopreservasi menggunakan 10% glycerol pada suhu -80°C selama 1 tahun.

UCAPAN TERMAKASIH

Artikel ini merupakan Laporan Penelitian Hibah Pekerti yang didanai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional tahun 2009. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih atas kesempatan yang diberikan. Terima kasih juga disampaikan kepada Prof. Dr. Ir. Hari Suprpto, M. Agr. atas semua bimbingan dan masukannya dalam penulisan proposal, penelitian sampai penulisan artikel ini,

DAFTAR PUSTAKA

- Breuil G, JR Bonami, JF Pepin and Y Pichot. 1991. Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass *Dicentrarchus labrax* larvae and juvenile. *Aquaculture* 97, 109-116.
- Burleson FG, TM Chambers and DL Wiedbrauk. 1992. *Virology: A Laboratory Manual*, 25-32. Academic Press.
- Fukuda Y, HD Nguyen, M Furuhashi and T Nakai. 1996. Mass mortality of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis (VNN). *Fish Pathology* 31, 165-170.
- Hasegawa S, T Somamoto, C Nakayasu, T Nakanishi and N Okamoto. 1997. A cell line (CFK) from fin of isogenic Ginbuana Crussian carp. *Fish Pathology* 32, 127-128.
- <http://rn.antaranews.com>. 2011. *Produksi Kerapu Indonesia Diperkirakan Geser China*.
- Mori K, T Nakai, M Nagahara, K Muroga, T Mekuchi and T Kanno. 1991. A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspot grouper. *Fish Pathology* 26, 209-210.
- Munday BL, JS Langdon, A Hyatt and D Humphrey. 1992. Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates carcarifer* Bloch. *Aquaculture* 103, 197-211.
- Muhajir dkk. (2006). *Pembuatan Kultur Sel Kerapu (Chromileptes altivelis) untuk Replikasi Viral Nervous Necrosis (VNN) dan Penyimpanan dengan Cryopreservasi*. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Indonesia, Jakarta.
- Nagai T, T Nakatsugawa, T Nishizawa and K Muroga. 1998. Primary culture of hemocyte from Japanese Black Abalone *Nordotis discus discus*. *Fish Pathology* 33, 147-148.
- Silverstein AM. 1989. *A History Of Immunology*. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publisher. New York.

Tanaka S, K Mori, M Arimoto and T Nakai. 1998. Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *Journal of Fish Diseases* 24, 75-85.

Wolf K and MC Quimby. 1962. Establishment of eurythermic line of fish cell line *in vitro*. *Science* 135, 1065-1066.