

TUGAS AKHIR

**TEKNIK DIAGNOSA IRIDOVIRUS
DENGAN METODE HISTOLOGI DAN METODE POLYMERASE CHAIN
REACTION (PCR) PADA KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus*)
DI BALAI BESAR RISET PERIKANAN BUDIDAYA LAUT
GONDOL – BALI**



Oleh :
SUSY HANDAYANI
Banyuwangi – Jawa Timur

**PROGRAM STUDI DIPLOMA TIGA
BUDIDAYA PERIKANAN (TEKNOLOGI KESEHATAN IKAN)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2003

**TEKNIK DIAGNOSA IRIDOVIRUS
DENGAN METODE HISTOLOGI DAN METODE POLYMERASE CHAIN
REACTION (PCR) PADA KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus*)
DI BALAI BESAR RISET PERIKANAN BUDIDAYA LAUT
GONDOL – BALI**

Tugas akhir sebagai salah satu syarat untuk memperoleh sebutan

AHLI MADYA

Pada

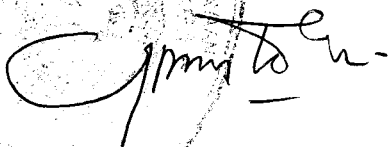
Program Studi Diploma Tiga
Budidaya Perikanan (Teknologi Kesehatan Ikan)
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Surabaya

Oleh :

Susy Handayani
NIM.060010214 T

Mengetahui

Ketua Program Studi Diploma Tiga
Budidaya Perikanan
(Teknologi Kesehatan Ikan)



Ir. Gunanti Mahasri, M.Si
NIP.131 620 274

Menyetujui

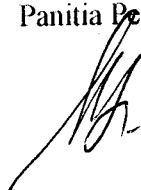
Pembimbing



Ir. Sudarno, M.Kes
NIP. 131 570 350

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai Tugas Akhir untuk memperoleh sebutan Ahli Madya

Mengetahui
Panitia Penguji



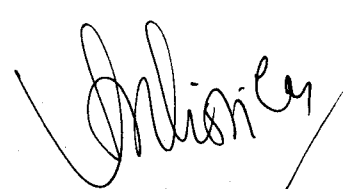
Ir. Sudarno, M. Kes

Ketua



Nunuk Dyah Retno L, MS, Drh

Sekretaris



Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP

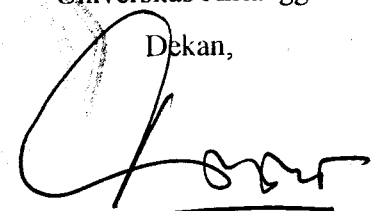
Anggota

Surabaya, 15 Juli 2003

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, MS, Drh

NIP. 130 687 297

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT karena atas berkat rahmat dan karunia-Nya pulalah, penulis dapat menyelesaikan penulisan Laporan Praktek Kerja Lapangan yang berjudul Teknik Diagnosa Iridovirus dengan Metode Histologi dan Polymerase Chain Reaction (PCR) pada Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya laut Gondol – Bali

Laporan Tugas Akhir Praktek Kerja lapangan disusun berdasarkan Praktek Kerja di Laboratorium Patologi di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya laut Gondol – Bali dan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh sebutan AHLI MADYA

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada yang terhormat :

1. Bapak Prof. Dr. Ismudiono, MS, Drh, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR Surabaya.
2. Ibu Ir. Gunanti Mahasri, M.Si, selaku Ketua Program Studi D-3 Budidaya Perikanan.
3. Bapak Ir. Sudarno, M.Kes, selaku dosen pembimbing dalam penyusunan laporan tugas akhir.
4. Bapak Dr. Adi Hanafi, selaku kepala Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol – Bali.
5. Ibu Ir. Titiek Aslianti, MP, selaku kepala teknis pelayanan Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol – Bali.
6. Bapak Ir. Zafran Jamaris, MSc, selaku pembimbing lapangan dalam penyusunan laporan.
7. Bapak Drh. Ketut Mahardika, Drh. Fris Johnny, ibu Ir. Des Roza dan seluruh staff BBRPBL Gondol – Bali

8. Untuk orangtuaku, adik dan kakakku tercinta yang telah memberikan dukungan baik moral, material, dan spiritual.
9. Untuk Mama', Abah, kakak Hana & Hani, Titin "TOENG" , mas Trio, mas Sapto "NGIMPIL", Alif, Reifan, Raka, Rizki (keponakanku yang lucu- lucu).
10. Untuk Letda (Mar) Suroso tercinta yang selalu setia memberikan doa, dukungan, perhatian, dan, kasih sayang dari medan tugas.
11. Untuk mas Wawan, Riska, Tri, Inneke, Iswi, Retno, Aarsal, Wayan, Wiwid, Desak, Alam dkk STP, David Hang Tuah, Shanti dan seluruh rekan- rekan D-3 TKI 2000 atas kerjasamanya.

Surabaya, 1 Juli 2003

PENULIS

DAFTAR ISI

	HALAMAN
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
 I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	
1.2 Tujuan PKL	1
1.3 Manfaat PKL	2
1.4 Perumusan Masalah	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	2
2.1 Taksonomi dan Morfologi	
2.2 Penyebaran dan Habitat	3
2.3 Sifat Kerapu Macan	4
2.4 Iridovirus	4
2.5 Gejala Klinis	4
2.6 Pengobatan	5
2.7 Diagnosa Iridovirus dengan metode PCR.....	5
2.8 Diagnosa Iridovirus dengan metode histologi.....	5
III. PELAKSANAAN	6
1.1 Waktu dan Tempat Praktek Kerja Lapangan	
1.2 Kondisi Umum Lokasi Praktek Kerja Lapangan	9
3.2.1 Sejarah berdirinya Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL) Gondol, Bali.	
3.2.2 Lokasi BBRPBL Gondol Bali	9
3.2.3 Struktur Organisasi dan Tata Kerja	10

3.2.3	Struktur Organisasi dan Tata Kerja	11
3.2.4	Sarana dan Prasarana	12
3.3	Kegiatan di Lokasi PKL	
3.3.1	Pembuatan Media Isolasi	15
3.3.2	Sterilisasi air laut	16
3.3.3	Penghitungan Bakteri dari sampel air pemeliharaan kerapu bebek	17
3.3.4	Penghitungan jumlah bakteri	19
3.3.5	Purifikasi.....	20
3.3.6	Pembuatan Inokulum VNN.....	20
3.4	Kegiatan Khusus sesuai Judul	
3.4.1	Diagnosa Iridovirus dengan Metode Histologi	21
3.4.2	Diagnosa Iridovirus dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)	27
IV	PEMBAHASAN	
4.1	Diagnosa Penyakit Iridovirus	31
4.1.1	Diagnosa Iridivirus dengan Metode Histologi	31
4.1.2	Diagnosa Iridovirus dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)	32
V	KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1	Kesimpulan	34
5.2	Saran	34
	DAFTAR PUSTAKA.....	35
	LAMPIRAN.....	38

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Tabel Fasilitas Utama di BBRPBLG	12
2. Tabel Fasilitas Penunjang dan Pelengkap di BBRPBLG	13
3. Tabel Bahan Baku dan Dosis Pembuatan Media Isolasi	15
4. Tabel Penghitungan Bakteri.....	19
5. Tabel Bahan Kimia dan Dosis untuk Amplikasi	29

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Gambar Ikan Kerapu Macan	4
2. Gambar Isolasi Bakteri Air Pemeliharaan K. Bebek	18
3. Gambar Alat Tissue Processor	23
4. Gambar Alat Ultraviolet Transsiluminator	30
5. Gambar Histopathologi Jaringan Hati dan Limpa dari Ikan yang terserang Iridovirus	31
6. Gambar Deteksi Virus dengan PCR pada Kerapu Macan	32

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Peta Lokasi BBRPBLG	38
2. Tata Letak Bangunan di BBRPBLG Bali	39
3. Larutan Fiksasi dan Larutan Dekalsifikasi	41
4. Daftar Waktu Amplifikasi untuk Iridovirus	42
5. Komposisi dari 1,5% Agarose untuk Elektroporesis	42
6. Gambar Alat Pemotong Jaringan atau Mikrotom	43
7. Gamabar Larutan untuk Pewarnaan Preparat Histologi	43
8. Gambar Alat Amplifikasi	44
9. Gambar Alat Elektroporesis	45
10. Gambar Pembuatan Inokulum VNN.....	45
11. Gambar Alat dan Bahan Sterilisasi Air Laut	46
12. Gambar Alat dan Bahan Isolasi Bakteri	46
13. Gambar Cleanbench	47
14. Gambar Alat Colony Counter	47

BAB I

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Sumber daya perikanan yang ada di Indonesia sebagian besar pemanfaatannya masih dititik beratkan pada kegiatan penangkapan dari alam. Salah satu jenis ikan yang banyak ditangkap adalah ikan kerapu (*Epinephelus sp*) yang merupakan jenis ikan laut yang banyak diminati di dalam maupun di luar negeri serta memiliki nilai ekonomis yang penting khususnya di Asia Tenggara (Mayunar, dkk, 1991 dalam Susanto, 2002). Ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) saat ini merupakan ikan budidaya yang sedang dikembangkan sebagai komoditas unggulan untuk ekspor dengan nilai yang cukup tinggi dengan harga di pasaran sekitar \$11-19/kg (Anonim, 1991).

Dalam usaha pembenihan ikan kerapu khususnya kerapu macan secara intensif dan terkontrol di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol – Bali selalu dicemaskan akan hadirnya kendala berupa penyakit virus pada ikan khususnya infeksi Iridovirus yang dapat berdampak buruk bagi usaha pembenihan. Karena akhir – akhir ini di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol – Bali, virus ini ditemukan pada ikan kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*) dan kerapu duskytail (*Epinephelus bleekery*). Infeksi Iridovirus diketahui sebagai suatu penyakit yang mematikan pada budidaya jaring apung ikan laut. Kerugian ekonomi yang disebabkan oleh penyakit ini sangat tinggi, karena virus menginfeksi pada stadia fingerling sampai ukuran konsumsi (Koesharyani dkk, 2001).

Oleh karena itu untuk mengetahui secara pasti penyebab penyakit yang menimbulkan kematian ikan tersebut maka dilakukan pemeriksaan virus menggunakan metode histologi dan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk

mendapatkan hasil yang cepat dan akurat sehingga penyebaran dapat dicegah secara dini.

2. Tujuan Praktek Kerja Lapangan

Tujuan Praktek Kerja Lapangan di Laboratorium Parasitologi Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL), gondol Yaitu :

1. Meningkatkan pengetahuan dan keterampilan dalam teknik diagnosa penyakit virus pada ikan.
2. Mengetahui secara jelas proses dalam mendiagnosa penyakit virus pada ikan.

1.3 MANFAAT PKL

Adapun manfaat yang didapat dalam PKL adalah mampu mengetahui secara langsung teknik yang digunakan dalam mendiagnosa penyakit virus pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dari hasil sampel uji tantang laboratorium.

1.4 PERUMUSAN MASALAH

Salah satu penyebab kematian dan kegagalan budidaya ikan kerapu dikarenakan adanya infeksi virus dari Iridovirus. Apabila virus ini sudah ada dalam budidaya ikan kerapu, maka dalam beberapa minggu, dengan kepadatan tebar yang tinggi, seluruh ikan kerapu yang dibudidayakan akan terjangkit dan diakhiri dengan kematian apabila tidak mendapatkan penanganan lebih lanjut.

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka permasalahan yang dapat diajukan sebagai berikut :

1. Bagaimanakah tanda – tanda yang ditunjukkan melalui pemeriksaan histopatologi ?
2. Bagaimanakah pendiagnosaan Iridovirus pada ikan kerapu macan dengan metode PCR ?

BAB II

TINJAUAN PUSAKA

2.1 Taksonomi dan Morfologi

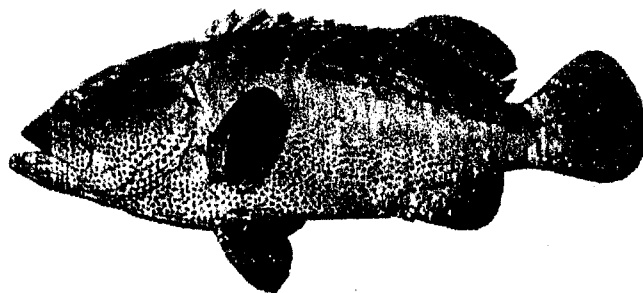
Sistematika Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscoguttatus*) adalah sebagai berikut :

Phylum	: Chordata
SubPhylum	: Vertebrata
Class	: Osteichthyes
Subclass	: Actinopterygi
Ordo	: Perciformes
Subordo	: Percoidae
Familia	: Serranidae
Genus	: <i>Ephinephelus</i>
Spesies	: <i>Ephinephelus fuscoguttatus</i>

Ikan kerapu Macan mempunyai bentuk badan yang memanjang gepeng (compressed) agak membulat, mulut lebar serong ke atas dengan bibir bawah menonjol ke atas, rahang bawah dan atas dilengkapi dengan gigi-gigi geratan yang berderet 2 baris, lancip dan kuat serta ujung luar bagian depan adalah gigi-gigi yang terbesar. Sirip-sirip ekor umumnya membulat, sirip punggung memanjang dengan bagian jari-jari keras berjumlah kurang lebih sama dengan jari lunaknya jari-jari keras berjumlah 6 – 8 buah. Sedangkan sirip dubur berjumlah 15 – 17 buah, warna dasar sawo matang, perut bagian bawah agak keputihan dan pada badannya terdapat titik berwarna merah kecoklatan. Badan ditutupi oleh sisik kecil, mengkilat, dan mempunyai ciri loreng (Direktorat Jenderal Perikanan, 1998).

2.2 Penyebaran dan Habitat

Daerah penebaran Ikan Kerapu Macan di Indonesia banyak ditemukan di perairan pulau Sumatera, Jawa, Sulawesi, Pekanbaru, dan Ambon. Sedangkan habitat favorit larva dari kerapu Macan muda adalah perairan pantai dekat muara sungai dengan dasar pasir berkarang dengan banyak ditumbuhi padang lamun (Direktorat Jenderal Perikanan, 1998).



Gambar 1. Ikan kerapu macan

2.3 Sifat Kerapu Macan

Adapun sifat-sifat kerapu Macan adalah :

- Telur dan larva bersifat pelagis
- Kerapu muda hingga dewasa bersifat demersal.
- Nokturnal, pada siang hari berkumpul di tiap-tiap karang, sedangkan malam hari aktif mencari makan.
- Bersifat hermaprodit protoginuous yang berarti setelah mencapai ukuran tertentu akan berganti kelamin dari betina dewasa menjadi jantan.

2.4 Iridovirus

Infeksi Iridovirus diketahui sebagai suatu penyakit yang sangat mematikan pada budidaya jaring apung ikan laut. Kerugian ekonomi yang disebabkan oleh penyakit ini bernilai sangat tinggi, karena virus ini menginfeksi pada stadia fingerling sampai ukuran konsumsi. Di Indonesia penyakit ini pertama kali ditemukan pada ikan kerapu lumpur di Sumatera Utara pada tahun 2000 dengan kematian mencapai lebih dari 80%. Akhir-akhir ini di Balai Penelitian Gondol, virus ini ditemukan pada kerapu

lumpur (*Ephinephelus Coioides*) dan kerapu (*Ephinephelus Bleekeri*) dimana kematian mencapai 100% dalam waktu 2 minggu dari awal terjadinya kematian (Koesharyani *et. al.*, 2000).

Iridovirus termasuk virus DNA Sitoplasmik dengan bentuk Icosahedral yang digolongkan dalam kelompok Iridoviridae. DNA virus ini dapat diperbanyak dengan PCR menggunakan sepasang primer yang digunakan untuk Iridovirus pada kakap merah (RSIV).

2.5 Gejala Klinis

Ikan yang terinfeksi terlihat berenang di permukaan air atau diam di dasar bak. Ikan terlihat berwarna lebih gelap dan ditandai dengan anemia berat yang dilihat dari warna insangnya dan hematokrit. Kandungan sel darah merah <25%. Hati kegelapan oleh pendarahan berat. Pembengkakan disertai warna pucat pada limpa, ginjal, dan hati. Pembengkakan monosit yang mengandung sel asing (IB) yang ditemukan pada limpa, ginjal dan hati melalui pemeriksaan Histologi (Koesharyani *et. al.*, 2001).

2.6 Pengobatan

Yang penting adalah mengurangi stress selama pengangkutan dan pemeliharaan ikan dengan kepadatan rendah. Di Jepang penggunaan vaksin sudah terbukti keefektifannya dalam mengurangi kematian yang disebabkan oleh Iridovirus (Koesharyani *et. al.*, 2001).

2.7 Diagnosa Iridovirus dengan metode PCR

Metode untuk mendeteksi virus yang telah dikembangkan di beberapa negara, yaitu dengan analisis gen menggunakan PCR (Reaksi Polimerase Berantai). Prinsip PCR ini pertama kali ditemukan oleh Khorana pada tahun 1971. Kemudian metode PCR ini dikembangkan oleh Mullis pada tahun 1983 yang merupakan ilmuwan Cetus Corporation di California Utara (Suharsono, 2000; Bloom, 2001).

PCR merupakan suatu teknik amplifikasi DNA yang spesifik dengan cara melakukan proses pemanjangan nukleotida dari primer yang merupakan pasangan komplemen dari utas DNA yang simultan (Suharsono, 2000).

PCR sangat sensitif sehingga mampu mengamplifikasi lebih dari sejuta kali sehingga dapat menghasilkan DNA dalam jumlah yang sangat besar dengan DNA cetakan (template) yang sedikit. Sedangkan komponen –komponen yang dibutuhkan dalam PCR antara lain DNA cetakan, dioksinukleotida (dNTP), primer, DNA Polimerase dan larutan penyangga (buffer).

DNA cetakan digunakan sebagai cetakan untuk mensintesa DNA yang baru berdasarkan kaidah komplementasi Chargaff (A-T; G-C). Bahan yang digunakan untuk menyusun polimer DNA diperlukan dNTP sedangkan oligomer DNA merupakan pasangan komplemen dari DNA cetakan adalah primer. Dengan adanya primer DNA polimerase akan mensintesa DNA dan reaksi akan berlangsung bila di dalam larutan penyangga terdapat ion Mg^{2+} .

Proses PCR ada tiga langkah dasar pada setiap siklusnya, yaitu denaturasi, renaturasi (annealing) dan ekstensi (extension). Tahap pertama adalah denaturasi DNA cetakan dengan menggunakan panas yang tinggi ($93^{\circ}C - 95^{\circ}C$). Untuk pra PCR, denaturasi biasanya berlangsung selama 5 - 10 menit dan setelah terjadi reaksi, denaturasi berikutnya dilakukan selama 1 menit. Tahap kedua adalah renaturasi, terjadi penurunan suhu supaya primer dapat menempel pada utas DNA cetakan yang telah terdenaturasi menjadi utas tunggal. Suhu renaturasi adalah $57^{\circ}C$. Waktu yang dibutuhkan untuk penempelan primer juga tergantung dari panjang primer. Langkah selanjutnya setelah selesai renaturasi adalah ekstensi. Pada proses ekstensi ini terjadi sintesa DNA atau pemanjangan primer yang dilakukan dengan suhu yang cukup tinggi, yaitu $72^{\circ}C$ agar tahap berikutnya (denaturasi DNA) lebih mudah. Ketiga tahap ini berulang kali dilakukan sehingga amplifikasi DNA dapat terjadi (25 – 50 siklus). Pada tahap akhir biasanya ditambahkan perlakuan pasca PCR pada suhu $72^{\circ}C$ selama 5 menit. Dengan 30 siklus diperkirakan dapat menyalin sejuta kopian DNA dengan waktu sekitar 3 jam yang dibutuhkan (National Center for Human Genome

Reasearch, 1992; Aquaculture News, 1995; Coelen, 1999; Suharsono, 2000; Bloom, 2001).

Dengan semakin berkembangnya metode PCR maka metode ini tidak hanya digunakan untuk mendeteksi virus-virus pada manusia saja. Metode ini juga telah diterapkan di bidang perikanan antara lain telah digunakan untuk mendeteksi dan mengetahui transmisi virus ke udang dan ikan seperti WSSV pada udang dan Viral Nervous Necrosis serta Irdovirus pada kerapu dan kakap (Koesaryani *et.al.*, 2001; Yuasa *et.al.*, 2001).

PCR primer yang digunakan dalam amplifikasi adalah hasil sekuensing dari genom DNA Red Sea Bream Iridovirus (RSIV) dengan menggunakan dua pasangan primer, yaitu (1F : '5 - CTCAAACACTCTGGCTCATC'3 dan 1R : '5 - GCACCAACACATCTCCTATC '3 dengan target berat molekul 570 bp) dan (2F : '5 - TACAACATGCTCCGCCAAGA'3 dan 2R : '5 - GCGTTAAAGTAGTGAGGGCA'3 dengan target berat molekul 564 bp) (Kurita *et.al.*, 1998). Dari pemeriksaan juga diketahui bahwa dengan 2 - step PCR dinyatakan lebih sensitif 10^4 kali daripada dengan 1 - step PCR (Maeda *et.al.*, 1998^a).

2.8 Diagnosa Iridovirus dengan metode histologi

Teknik histologi merupakan ilmu atau seni mempersiapkan organ, jaringan atau bagian jaringan untuk dapat diamati dan ditelaah. Penelaahan umumnya dilakukan dengan bantuan mikroskop, karena struktur jaringan secara terperinci pada galibnya terlalu kecil untuk dapat dilihat dengan mata telanjang. Selain dilekatkan pada kaca preparat, spesimen tadi umumnya dilindungi dengan kaca, yaitu sepotong kaca yang sangat tipis ataupun plastik yang tembus pandang yang direkatkan di atas spesimen tersebut. Terdapat 5 langkah penting penanganan jaringan sebelum proses pewarnaan dimulai, yaitu : fiksasi yang diikuti dengan pencucian, dehidrasi, clearing, embeding dan blocking, dan sectioning dan perlekatan pada kaca. Jaringan yang dapat diambil dari ikan dalam keadaan hidup maupun yang baru mati dan sesegera

mungkin dimasukkan dalam larutan fiksatif. Untuk organ seperti tulang, insang perlu direndam dalam larutan dekalsifikasi agar jaringan menjadi lunak (Gunarso, 1989).

Penanganan jaringan untuk mendiagnosa Iridovirus dimulai dengan tahap fiksasi yang merupakan perlakuan mengawetkan untuk mencegah terjadinya kerusakan jaringan. Clearing (penjernihan) ini erat kaitannya dengan jaringan yang akan menjadi jernih atau transparan. Embeding untuk memudahkan pemotongan atau pengirisan jaringan pada tahap sectioning. Sectioning digunakan untuk memperoleh jaringan histologik yang tipis agar dapat dilihat strukturnya di bawah mikroskop setelah dipertajam elemen atau jaringannya melalui proses pewarnaan (Sugama *et.al.*, 2000).

Jaringan ikan yang akan difiksasi meliputi limpa, ginjal, jantung, hati, sistem pencernaan, pankreas, insang, gelembung renang, tulang, daging, cairan dan choroidal mata, dan selaput otak karena virus ini umumnya menyerang sistem sirkulasi tubuh ikan yang ditandai dengan adanya pembesaran jaringan tersebut (Jung *et.al.*, 1997 dan Mahardika *et.al.*, 2001 un publish). Ada beberapa metode atau cara yang dapat dilakukan untuk mengetahui infeksi Iridovirus, yang termudah adalah dengan preparat ulas yang diwarnai dengan Giemsa (Inouye *et.al.*, 1992) ; dengan teknik immunofluorescence (Nakajima *et.al.*, 1995) ; histologi dengan pewarnaan H&E dan mikroskop elektron.

BAB III

PELAKSANAAN

3.1 Waktu dan Tempat Praktek Kerja Lapangan

Praktek Kerja Lapangan (PKL) ini dilaksanakan pada tanggal 21 April 2003 sampai dengan 31 Mei 2003 yang berlokasi di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL) Gondol, Bali.

3.2 Kondisi Umum Lokasi Praktek Kerja Lapangan

3.2.1 Sejarah Berdirinya Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut (BBRPBL) Gondol, Bali.

Balai Besar Riset ini merupakan lembaga penelitian yang berada dalam lingkup Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian. Sebelumnya lembaga ini bernama Sub Balai Penelitian Perikanan Budidaya Pantai (Sub Balikandita) berdirinya lembaga ini melalui tahapan.

Berdasarkan Surat Keputusan Menteri Pertanian No. 361 / KPTS / 12 / 1980 tanggal 2 Desember 1980, Balai Penelitian Perikanan Darat dibagi menjadi tujuh unit struktural yaitu : Sub Bagian Tata Usaha, Sub Balai Penelitian Depok, Jatiluhur, Jepara, Palembang, Maros dan Samarinda. Selanjutnya Balai Penelitian Perikanan Darat dibagi menjadi Balai Penelitian Perikanan Air Tawar (Balitkanwar) dan Balai Penelitian Budidaya Pantai (Balitdita), berdasarkan Surat Kepres No. 214 / 1983 dan Surat Keputusan Menteri Pertanian RI No. 613 / KPTS / OT210 / 8 / 1984 tanggal 10 Agustus 1984 dengan surat keputusan ini, Sub Balitkandita Gondol menjadi bagian dari Balitdita yang berpusat di Maros, Sulsel.

Dalam perkembangan selanjutnya Sub Balitkandita – Gondol berubah nama menjadi Lolitkanta Gondol. Perubahan nama ini didasarkan pada Surat Keputusan Menteri Pertanian No. 787 / KPTS / 05.210 / 12 / 1994 yang berlaku mulai 1 April

1995. Berdasarkan surat keputusan tersebut, kedudukan Lolitkanta berada langsung di bawah Pusat Penelitian Pengembangan Perikanan Jakarta. Dalam waktu dekat Lolitkanta – Gondol akan disiapkan menjadi salah satu Pusat Pelatihan Regional Perikanan Pantai dan selanjutnya pada tahun 2000 menjadi Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol di bawah Departemen Kelautan dan Perikanan.

Dalam pengembangan, Balai Besar Riset ini melaksanakan kerjasama dengan Pemerintah Jepang sejak tahun 1988 melalui JICA (Japan International Cooperation Agency). Kerjasama yang dilakukan adalah penelitian terhadap pembenihan Udang Windu. Pada tahun 1994, kerjasama ini diperluas menjadi proyek penelitian pembenihan Multispecies. Spesies-spesies yang diteliti, antara lain : Kerapu (*Epinephelus* sp, *Cromileptes altivelis* dan *Cheilinus undulatus*), Teripang (*Holothuria* sp), Kepiting bakau (*Scylla serrata*) dan Bandeng (*Chanos chanos*).

Penelitian tentang pembenihan kerapu sudah berlangsung sejak tahun 1994. Spesies-spesies kerapu yang diteliti, antara lain : Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), Kerapu Lumpur (*E. coioides*), Kerapu Batik (*E. Microdon*), Kerapu Malabar (*E. malabaricus*), Kerapu Bintik (*E. bontoides*), kerapu bebek/tikus (*Cromileptes altivelis*) dan Kerapu Alis (*Cheilinus undulatus*).

3.2.2 Lokasi BBRPBL Gondol – Bali

Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol terletak di dusun Gondol, Desa Penyabangan Gerokgak, Kabupaten Buleleng Propinsi Bali. Lokasi ini Berjarak 30 Km dari Pelabuhan Gilimanuk dan 50 Km dari arah Singaraja serta berbatasan langsung dengan laut Bali Utara. Balai Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol berada pada ketinggian 2 m di atas permukaan laut dengan suhu 30 – 40 °C dan salinitas berkisar 30 – 34 ‰. Luas total Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol adalah 6,7 Ha. Penempatan sarana dan prasarana ditempatkan dalam satu area berdasarkan fungsinya. Komponen yang mempunyai fungsi sama ditempatkan dalam satu area dengan komponen lain yang menunjang kegiatan tersebut.

3.2.3 Struktur Organisasi dan Tata Kerja

Sesuai SK Menteri Kelautan dan Perikanan No. KEP. 26 A / MEN / 2001 Struktur organisasi Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol, terdiri dari :

1. Bidang Program dan kerjasama, mempunyai tugas melaksanakan penyusunan program dan anggaran serta kerjasama riset, dan berfungsi penyusunan program dan anggaran pemantauan dan evaluasi riset. Bidang program dan kerjasama riset. Bidang Program dan Kerjasama terdiri dari : Seksi Program dan Seksi Kerjasama
 - Seksi program mempunyai tugas melakukan penyiapan bahan penyusunan program dan anggaran, pemantauan dan evaluasi riset.
 - Seksi kerjasama mempunyai tugas melakukan penyiapan bahan penyusunan riset.
2. Bidang pelayanan teknik, mempunyai tugas melaksanakan pengelolaan sarana riset dan penyebarluasan hasil riset. Dalam melaksanakan tugas sebagaimana yang dimaksud di atas bidang pelayanan jasa dan informasi hasil riset. Bidang pelayanan teknik terdiri dari seksi sarana dan seksi pelayanan jasa dan informasi.
 - Seksi sarana mempunyai tugas melakukan pengelolaan dan pemeliharaan sarana lapangan dan laboratorium.
 - Seksi pelayanan jasa dan informasi mempunyai tugas melakukan penyiapan bahan dokumentasi, promosi, dan komunikasi hasil riset, pelayanan jasa riset dan informasi serta pengelolaan perpustakaan.
3. Bagian Tata usaha, mempunyai tugas melaksanakan administrasi Keuangan, Kepegawaian, Persuratan, Perlengkapan, dan Rumah Tangga serta Pelaporan. Dalam melaksanakan tugas sebagaimana dimaksud di atas bagian tata usaha menyelenggarakan fungsi : Pengelolaan Administrasi Keuangan dan Kepegawaian, Persuratan, Perlengkapan,

dan Rumah Tangga serta Pelaporan. Bagian Tata Usaha terdiri dari : Sub Bagian Keuangan dan Sub Bagian Umum.

- Sub bagian keuangan mempunyai tugas melakukan pengelolaan administrasi keuangan.
- Sub bagian umum mempunyai tugas melakukan urusan Persuratan, Perlengkapan, dan Rumah Tangga serta Pelaporan.

4. Kelompok Jabatan Fungsional mempunyai tugas melaksanakan kegiatan riset dan kegiatan lain yang sesuai dengan tugas masing-masing Jabatan Fungsional berdasarkan peraturan perundangan yang berlaku.

Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol memiliki karyawan sebanyak 88 orang, terdiri atas peneliti 22 orang, teknisi 38 orang dan administrasi 28 orang. Menurut jenjang pendidikan S3 (3 orang), S2 (6 orang), S1 (26 orang), Sarjana Muda (6 orang), SLTA (37 orang), SLTP (2 orang) dan SD (2 orang).

3.2.4 Sarana dan Prasarana

Fasilitas utama BBRPBL Gondol memiliki 14 unit fasilitas utama seperti yang disajikan pada tabel berikut ini :

Tabel 1. Fasilitas Utama di BBRPBL Gondol

Sarana	Jumlah (Unit)
• Pompa air laut	3
• Sumur bor	4
• Blower	4
• Pipa pemasukan air laut	1
• Pipa pemasukan air tawar	1
• Saluran Pengeluaran	1
• Pipa Aerasi	4

Sarana	Jumlah (Unit)
• Ikan Kerapu Bebek	99 ekor
• Ikan Kerapu Lumpur	48 ekor
• Ikan Kerapu Macan	32 ekor
• Ikan Kerapu Batik	49 ekor
• Bandeng	121 ekor
• Napoleon	61 ekor
• Kakap Putih	50 ekor
• Hatchery Udang	2
• Hatchery Teripang	1
• Hatchery Kepiting Bakau	1
• Hatchery Kerapu	1
• Multy Species Hatchery (MSH)	1
• Instalasi Tambak	2
• Jaring Apung	1

Sumber : Data Sekunder, (2002)

Fasilitas penunjang dan pelengkap di BBRPBL Gondol Bali disajikan pada tabel 2 berikut ini :

Tabel 2. Fasilitas Penunjang dan Pelengkap BBRPBL., Gondol

Sarana	Jumlah (Unit)
A. Bangunan	
• Kantor	1
• Lab Penyakit Lingkungan dan Gizi	1
• Lab. Kimia dan Analisis	1

Sarana	Jumlah (Unit)
• Lab. Produksi Makanan Campuran • Lab. Biologi • Lab. Bioteknologi • Tempat Kultur Pakan Alami • Perpustakaan • Rumah Tamu • Asrama • Rumah Jaga • Bengkel	1 1 1 beberapa 1 2 1 1 1
B. Sumber Tenaga Listrik • Generator 100 Kw • Generator 200 Kw • PLN 197 Kw	1 1 1
C. Alat Transportasi • Kendaraan roda 4 • Kendaraan Roda 2 • Speed Boat	11 4 1

3.3 Kegiatan di Lokasi PKL

Selain kegiatan pendiagnosaan Iridovirus dengan metode histology dan PCR, lab. Patologi juga melakukan kegiatan di luar judul tersebut, antara lain :

3.3.1 Pembuatan Media Isolasi

Alat :

- Tabung Erlenmeyer - Cleanbeanch
- Cawan Petri - Autoclave
- Alluminium Foil

Tabel 3. Bahan baku dan dosis penggunaannya

Media	Bahan Baku	Dosis (gram/ml)			Sterilisasi	
		100 ml	300 ml	500 ml	^o C	Menit
TCBS	TCBS	8.90	26.70	44.50	105	10
TSA	TSB	3.02	9.06	15.10	121	15
	NaCl	2.00	6.00	10.00		
	BA	1.50	4.50	7.50		
MA	MA	5.51	16.53	27.55	121	15
	BA	0.30	0.90	1.50		
PYGSA	Pepton	0.125	0.375	0.625	121	15
	Yeast extract	0.125	0.375	0.625		
	Glukose	0.30	0.90	1.50		
	BA	1.50	4.50	7.5		
Cyt – A	Sea Water	100	300	500		
	Bact Trypton	0.05	0.15	0.25	121	15
	Yeast Extract	0.05	0.15	0.25		
	Sodium Act	0.02	0.06	0.10		
	Beef Extract	0.02	0.06	0.10		

Media	Bahan Baku	Dosis (gram/ml)			Sterilisasi	
		100 ml	300 ml	500 ml	^o C	Menit
	BA	1.50	4.5	7.5		
	Sea Water	100	300	500		

Keterangan : TCBS : Thiosulfat Citrat Bile Sucrose

TSA : Trypticase Soy Agar

MA : Marine Agar

BA : Bacto Agar

Cara Kerja :

1. Siapkan tabung erlenmeyer dan masukkan bahan- bahan yang telah ditimbang
2. Tuangkan aquades sedikit demi sedikit ke dalam tabung sambil digoyang-goyang agar tercampur rata
3. Setelah tercampur semua maka tutup bagian mulut erlenmeyer dengan alumunium foil hingga rapat
4. Sterilisasi dalam autoclave dengan suhu 121^oC selama 15 menit, kecuali pada pembuatan media TCBS cukup dipanaskan di atas api suhu 105^oC selama 10 menit
5. Tuang agar pada tiap-tiap cawan petri yang telah disiapkan di dalam cleanbench untuk menjaga keadaan steril hingga kering
6. Setelah semua cawan terisi maka nyalakan ultraviolet cleanbench selama 15 menit
7. Setelah selesai, simpan media tersebut di dalam almari pendingin sebagai stock.

3.3.2 Sterilisasi Air Laut

Tujuan :

- Mensterilkan air laut
- Persiapan pengenceran sampel air

Alat :

- Tabung reaksi - Rak tabung reaksi
- Digipet - Autoclave
- Penyumbat

Bahan :

- Air Laut

Cara Kerja :

1. Isi tiap-tiap tabung reaksi dengan air laut dengan volume 9 ml
2. Kemudian tutup tabung reaksi dengan penyumbat
3. Untuk selanjutnya tabung-tabung reaksi disterilisasi dengan memasukkan pada autoclave selama 15 menit dengan suhu 121°C
4. Setelah selesai tunggu hingga dingin
5. Simpan dalam almari pendingin sebagai stock.

3.3.3 Penghitungan Bakteri dari Sampel Air Pemeliharaan Kerapu Bebek

Alat :

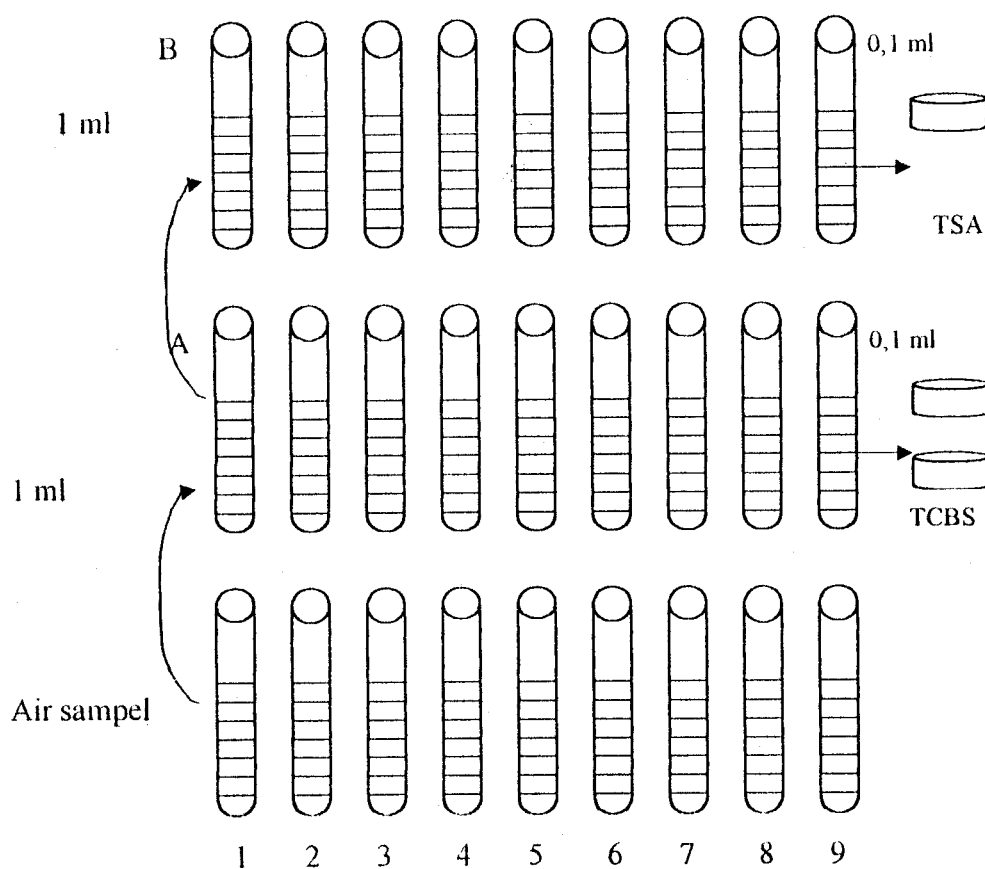
- 9 buah tabung reaksi volume 5 ml (air sampel)
- 18 buah tabung reaksi volume 9 ml (air steril)
- rak tabung reaksi
- pipet
- mixer
- parafilm

bahan :

- Media TSA
- Media TCBS
- Air sampel
- Air laut steril

Cara Kerja :

1. Isi Tiap-tiap tabung reaksi volume 5 ml dengan air sampel kerapu bebek
2. Lakukan pengenceran sampel air dengan memindahkan 1 ml air sampel pada tabung reaksi (A) kemudian Mixer, Pengenceran dilakukan secara seri dari tabung A sampai tabung B dengan memindahkan masing-masing sebanyak 1 ml.



Gambar 2. Isolasi bakteri air pemeliharaan K. Bebek

3. Dari masing-masing tabung reaksi, kemudian diambil 0.1 ml untuk diinokulasi pada media isolasi (tabung reaksi B diinokulasi pada media TSA dan tabung Reaksi A diinokulasi pada media TCBS).

4. Setelah kering, tutup bagian tepi cawan petri dengan menggunakan parafilm
5. Inkubasi pada temperatur 27°C selama 24 jam (TCBS) dan 25°C selama 24 jam (TSA)
6. Lakukan penghitungan kuman dengan menggunakan alat penghitungan koloni (Colony counter).

3.3.4 Penghitungan Jumlah Bakteri

Penghitungan kuman dilakukan dengan menggunakan alat penghitungan koloni (colony counter). Jumlah kuman = jumlah koloni dikalikan besarnya pengenceran. Dari hasil isolasi bakteri dari sampel air kerapu bebek didapatkan perhitungan sebagai berikut :

Sampel	Total bakteri	vibrio spp cfu / ml	Vibrio Harveyi cfu / ml
	TSA cfu / ml		
Air Kerapu Bebek	1.564×10^1	$6 (g) + 489 (y) \times 10^1$	-
	199×10^2	$8 (g) + 30 (y) \times 10^2$	-
	24×10^3	$2 (g) + 4 (y) \times 10^3$	-
Dengan pembulatan didapatkan	1.6×10^4	$495 \times 10^1 = 5.0 \times 10^3$	
	2.0×10^4	$38 \times 10^2 = 3.8 \times 10^3$	
	2.4×10^4	$6 \times 10^3 = 6.0 \times 10^3$	

Keterangan : g : green

y : yellow

cfu/ml : colony forming unit per mililiter

Ambang batas untuk pertumbuhan koloni bakteri pada media TSA = 10^6 sedangkan untuk media TCBS = 10^4 , dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa kepadatan bakteri di bak pemeliharaan kerapu bebek dalam keadaan normal.

Jika jumlah bakteri telah melampaui ambang batas maka dibutuhkan sirkulasi sebanyak-banyaknya.

3.3.5 Purifikasi

Tujuan : memurnikan bakteri

Alat :

- Ose
- Pembakar bunsen
- Cleanbench
- Alkohol absolut
- Cawan petri
- Parafilm
- Alkohol 70 %

Bahan :

- bakteri vibrio (dalam media TCBS)
- bakteri (dalam media TSA)
- media MA

Cara Kerja :

1. Bakar Ose dengan api bunsen. Dinginkan dengan cara mencelupkan pada alkohol absolut. Bakar sebentar di api bunsen untuk menghilangkan pengaruh alkoholnya.
2. Ambil bakteri pada media TSA atau TCBS dengan ose kemudian inokulasi pada media MA dengan cara menggoreskan (streak)
3. Bakar ose kembali untuk sterilisasi.
4. Tutup bagian tepi cawan petri dengan parafilm.
5. Semua kegiatan (no 1 sampai dengan 4) dilakukan di dalam cleanbench untuk menjaga sterilisasi.
6. Simpan bagian media dalam inkubator selama 1 minggu pada suhu 27° C.

3.3.6 Pembuatan Inokulum VNN (Viral Nervous Necrosis)

Alat :

- Penyaring milipore
- Timbangan digital
- Srynge 2 ml
- mikrotube volume 1,5 ml

- Mortir
- Digipet
- Pembakar bunsen
- Parafilm
- Gunting
- Pinset

Bahan :

- Ikan yang positif terserang VNN
- PBS (Pepton Buffer Saline)
- Es
- Alkohol

Cara kerja :

1. Sterilisasi seluruh alat dan tempat yang akan digunakan dengan menggunakan alkohol.
2. Timbang ikan sampel yang positif VNN sesuai kebutuhan. Dengan perbandingan bobot ikan : volume PBS = 1 : 9.
3. Gerus bagian organ mata dan otak ikan sampai halus dalam kondisi dingin kemudian ditambah larutan PBS, misalkan bobot ikan 10 gr berarti dilarutkan ke dalam 90 ml PBS.
4. Pindahkan ke dalam mikrotube 1,5 ml dengan menggunakan digipet.
5. Sentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 – 30 menit dengan suhu 4°C.
6. Terbentuk 2 lapisan, ambil lapisan teratas (supernatan) dengan digipet kemudian saring dengan penyaring milipore ke dalam mikrotube 1,5 ml baru.
7. Simpan dalam lemari pendingin dengan suhu -85°C.

3.4 Kegiatan Khusus Sesuai Dengan Jadwal

3.4.1 Diagnosa Iridovirus dengan Metode Histologi

Dalam melakukan diagnosa Iridovirus dengan metode Histologi, jaringan atau bagian jaringan dari ikan yang dibutuhkan, antara lain ; hati, limpa, lambung, jantung, insang, rektum, ginjal bagian belakang dan ginjal bagian depan. Jaringan ini

dapat diambil dari ikan dalam keadaan hidup maupun yang baru mati dan sesegera mungkin dimasukkan dalam larutan Fiksatif.

Terdapat 5 langkah penting penanganan jaringan sebelum proses pewarnaan dimulai, yaitu :

1. Fiksasi, diikuti dengan pencucian
2. Dehidrasi
3. Clearing
4. Embedding dan Blocking
5. Sektioning dan Perlekatan pada gelas obyek

TAHAP PEMBUATAN PREPARAT HISTOLOGI

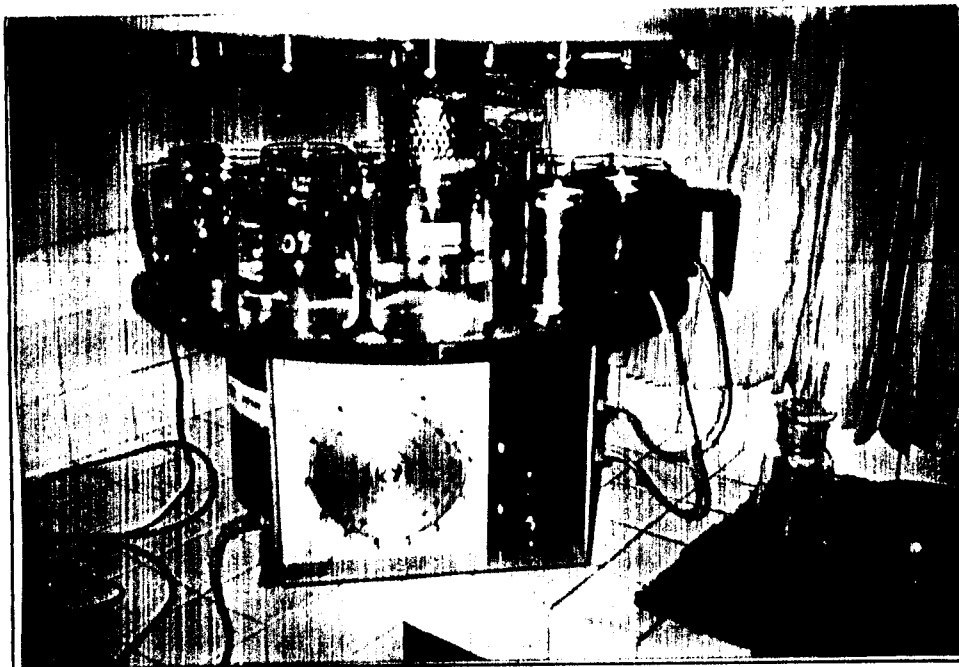
1. Fiksasi

- Tujuan : untuk mempertahankan elemen-elemen sel atau jaringan agar tetap pada tempatnya dan tidak mengalami perubahan bentuk maupun ukuran.
- Cara Kerja :
 - Masukkan ikan atau jaringan yang telah dipotong ke dalam Larutan fiksasi (Formalin 10% atau Buffer Formalin) agar mengeras.
 - Material dalam larutan fiksasi dibiarkan menjadi keras dan kaku
 - Setelah difiksasi, jaringan perlu dicuci dengan air selama ± 30 menit untuk menghilangkan sisa-sisa formalin sebelum proses dehidrasi

2. Dehidrasi

- Tujuan : menarik molekul air dari dalam jaringan
- Cara Kerja :

- Alat yang digunakan dalam proses dehidrasi disebut Tissue Processor yang bekerja secara otomatis. Kerjanya meliputi proses dehidrasi sampai clearing.
- Jaringan yang telah kaku akibat proses fiksasi dimasukkan ke dalam tissue teck atau plankton net agar jaringan tidak jatuh dan alkohol dapat keluar masuk dalam dehidrasi.
- Jaringan yang sudah pada tempatnya dimasukkan secara berurutan masing-masing ke dalam :
 1. Alkohol 70% Selama 2 jam
 2. Alkohol 80% Selama 2 jam
 3. Alkohol 90% Selama 2 jam
 4. Alkohol 95% Selama 2 jam
 5. Alkohol Absolut I Selama 1,5 jam
 6. Alkohol absolut II Selama 1,5 jam
 7. Alkohol Absolut III Selama 1,5 jam



Gambar 3. alat tissue processor

3. Clearing (Penjernihan)

- Proses penjernihan ini erat kaitannya dengan jaringan yang akan menjadi jernih atau transparan.
- Cara kerja :
Dengan cara yang sama seperti pada proses dehidrasi, jaringan yang masih pada tempatnya dimasukkan ke dalam :
 1. XYLOL selama 1,5 jam
 2. XYLOL selama 2 jam
 3. XYLOL selama 2 jam

4. Embeding (Penanaman Jaringan) dan Blocking

- Tujuan : untuk mengeraskan atau memadatkan jaringan agar memudahkan alat pemotongan atau pengirisan jaringan pada tahap sektioning.
- Cara Kerja
 - Parafin I dicairkan dahulu sampai bening dengan cara dipanaskan kemudian suhunya di turunkan sampai 60°C . Jaringan yang masih pada tempatnya direndam dalam parafin I selama 1,5 jam.
 - Dengan cara yang sama, setelah parafin I jaringan tadi dimasukkan ke dalam parafin II selama 1,5 jam (kedua proses ini terdapat dalam tissue processor)
 - Alat-alat blok, hot plate dengan suhu $\pm 70^{\circ}\text{C}$ dan parafin dalam wax dispenser yang telah dicairkan disiapkan.
 - Jaringan diambil dari tempatnya dan ditata pada tempat pemblokkan di atas hot plate dengan pinset.
 - Diberi tanda atau keterangan pada masing masing blok atau jaringan agar mudah mengenalinya.
 - Setelah ditata, parafin cair dituangkan dari wax dispenser ke tempat pemblokkan.

- Parafin blok ditempatkan pada bantalan es agar cepat membeku dan padat serta tidak pecah pada saat pemotongan.

5. Sektioning (pemotongan) dan Perlekatan pada Gelas Obyek

- Tujuan : untuk memperoleh jaringan histologik yang tipis agar dapat dilihat strukturnya di bawah mikroskop.
- Cara kerja :
 - Waterbath dengan suhu 40 - 50°C, baskom dengan air dingin, mikrotom dengan pisaunya, gelas obyek, hot plate dengan suhu 30 - 35°C, dan lain-lain yang perlu disiapkan.
 - Blok jaringan ditempatkan pada mikrotom dan skalanya diatur agar jaringan terpotong $\pm 3 - 5$ mikron.
 - Pemotongan dilakukan dengan pelan. Bila irisan dianggap baik, irisan jaringan dipindahkan ke dalam baskom yang berisi air dingin dan ditempelkan pada gelas obyek yang telah diberi kode, kemudian dicelupkan ke dalam waterbath agar jaringan mengembang.
 - Dengan cara yang sama, blok jaringan lainnya diiris dan ditata pada gelas obyek.
 - Preparat di atas dikeringkan pada hot plate (untuk waktu lama disimpan dalam inkubator dengan suhu 27°C)

6. Staining (pewarnaan) dan Mounting

- Tujuan : untuk mempertajam dan memperjelas berbagai elemen jaringan, terutama sel-selnya sehingga dapat dibedakan dan ditelaah dengan mikroskop.
- Mounting maksudnya agar preparat histologi bertahan lama
- Cara Kerja :
 - satu seri tempat pewarnaan, cover glass, bioleit dan kertas penghapus atau tissue disiapkan.

- Di sini digunakan pewarnaan H&E (Hematoxylin & Eosin) formula Harris.
- Preparat histologi yang telah kering ditempatkan pada keranjang pewarnaan dan dimasukkan secara berurutan ke dalam tempat pewarnaan sebagai berikut :

1. XYLOL	Selama : 10 Menit
2. XYLOL	Selama : 10 Menit
3. Alkohol absolut I	Selama : 5 Menit
4. Alkohol absolut II	Selama : 3 Menit
5. Alkohol 90%	Selama : 3 Menit
6. Alkohol 80%	Selama : 3 Menit
7. Alkohol 70%	Selama : 5 Menit
8. Cuci dengan Aquades	Selama : 4 – 5 kali celupan
9. Hematoxylin	Selama : 3 Menit
10. Cuci dengan air mengalir	Selama : 15 Menit
11. Eosin	Selama : 5 – 15 Menit
12. Alkohol 70%	Selama : 5 Detik
13. Alkohol 80%	Selama : 5 Detik
14. Alkohol 90%	Selama : 3 Menit
15. Alkohol 95%	Selama : 5 Menit
16. Alkohol absolut I	Selama : 5 Menit
17. Alkohol absolut II	Selama : 10 Menit
18. XYLOL	Selama : 20 Menit
19. XYLOL	Selama : 20 Menit
- Angkat dan bersihkan zat warna atau kotoran pada gelas obyek, selain preparat histologi yang dikehendaki. Jika kira-kira cairan zat warna sudah menghilang tetapi belum kering segera tetesi jaringan histologi pada gelas obyek tadi dengan biolelit secukupnya.

- Preparat histologi tadi ditutup dengan cover glass
- Keringkan dan siap diperiksa di bawah mikroskop

7. Pemeriksaan di bawah mikroskop

- Menggunakan mikroskop sebaiknya dibersihkan dahulu badan maupun lensa okuler dan obyektif.
- Digunakan pembesaran terkecil dahulu, baru yang lebih besar, misalnya 5x, 10x, 40x dan 100x menggunakan minyak emersion.

3.4.2 Diagnosa Iridovirus dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Target organ yang digunakan dalam mendeteksi adanya Iridovirus adalah limpa atau ginjal. Sebanyak 50 – 100 mg organ tersebut ditempatkan dalam mikrotube dan ditambahkan bahan lisis Isogen. Isogen ini biasanya digunakan dalam mengekstrak DNA virus pada udang (Kimura *et al*, 1996 ; Momoyama *et al.*, 1997) adapun tahapan ekstraksi asam nukleat (Iridovirus) adalah :

1. Ekstraksi Asam Nukleat Iridovirus menggunakan Isogen

- Ambil sampel bagian limpa dan ginjal ditempatkan dalam 1,5 ml mikrotube. Kemudian dihancurkan dengan menggunakan gunting atau pounder.
- Tambahkan 400µl / 0,4 ml ISOGEN dan hancurkan menggunakan pounder.
- Tambahkan lagi 0,4 ml ISOGEN
- Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm, selama 10 menit dengan suhu 4°C
- Diamkan beberapa menit (2 – 5 menit) dalam suhu ruangan.
- Tambahkan 200 µl/0,2 ml chloroform, campurkan dengan baik dan diamkan kembali pada suhu ruang selama 3 menit.
- Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm, selama 15 menit dengan suhu 4°C maka akan terbentuk 3 lapisan

- Buang lapisan teratas, tambahkan 300 µl Ethanol absolut campurkan dengan cara membolak-balik.
- Sentrifugasi dengan kecepatan 2.000 rpm, selama 5 menit dengan suhu 4°C
- Buang supernatannya dan yang tersisa hanya DNA pellet saja.
- Pellet tersebut kemudian dibilas dengan 1500 µl Ethanol 75% campurkan perlahan dengan baik.
- Sentrifugasi dengan kecepatan 2.000 rpm, selama 5 menit dengan suhu 4°C
- Buang Ethanolnya dan keringkan dalam desikator selama 15 menit
- Setelah kering ditambahkan dengan 50 sampai 200 µl aquades steril. DNA siap digunakan untuk proses selanjutnya.

Primer yang digunakan adalah hasil sekuensing dari genom DNA Red Sea Bream Iridovirus (RSIV), dengan susunan forward primer 1F : '5 – CTCAAACACTCTGGCTCATC – '3 dan reverse primer 1R : '5 – GCACCAACACATCTCCTATC – '3. Dengan target berat molekul 570 bp (Kurita *et al.*, 1998).

Pada saat pellet dikeringkan, maka hal yang harus dilakukan adalah mempersiapkan campuran bahan kimia untuk Amplifikasi. Amplifikasi dilakukan dengan mencampur beberapa bahan atau reagen dari DNA kit dan templet DNA sampel. Bahan dan dosis yang digunakan disesuaikan dengan jumlah sampel setelah ditambah dengan kontrol negatif dan kontrol positif (tabel 4).

Tabel 4. Bahan Kimia dan Dosis untuk Amplifikasi

No. sampel	Campuran				
	mms – DNA	Primer 1	Primer 2	Taq. Polimerase	Tem DNA
3	72	0,75	0,75	0,5	0,5
4	95,5	1	1	0,5	0,5
5	119,5	1,25	1,25	0,5	0,5
6	143,5	1,5	1,5	0,5	0,5
7	167	1,75	1,75	0,5	0,5
8	191	2	2	0,5	0,5
9	215	2,25	2,25	0,5	0,5
10	239	2,5	2,5	0,5	0,5
11	263	2,75	2,75	0,5	0,5
12	286,5	3	3	0,5	0,5
13	311	3,25	3,25	0,5	0,5

2. Amplifikasi atau Penggandaan DNA

Amplifikasi dilakukan dengan mencampur DNA kit dengan templet DNA sampel. Kemudian campuran tersebut diinkubasi pada alat thermal cycler takara berturut-turut dengan suhu 94°C selama 30 detik, 58°C selama 1 menit dan 72°C selama 1 menit, proses ini dilakukan sebanyak 30 kali. Proses Inkubasi berikutnya adalah pada suhu 94°C selama 30 detik, 58°C selama 1 menit dan 72°C selama 5 menit dan suhu 4°C sampai akan digunakan dalam proses elektrophoresis (Kurita *et.al*, 1998).

3. Persiapan Agarose Gel

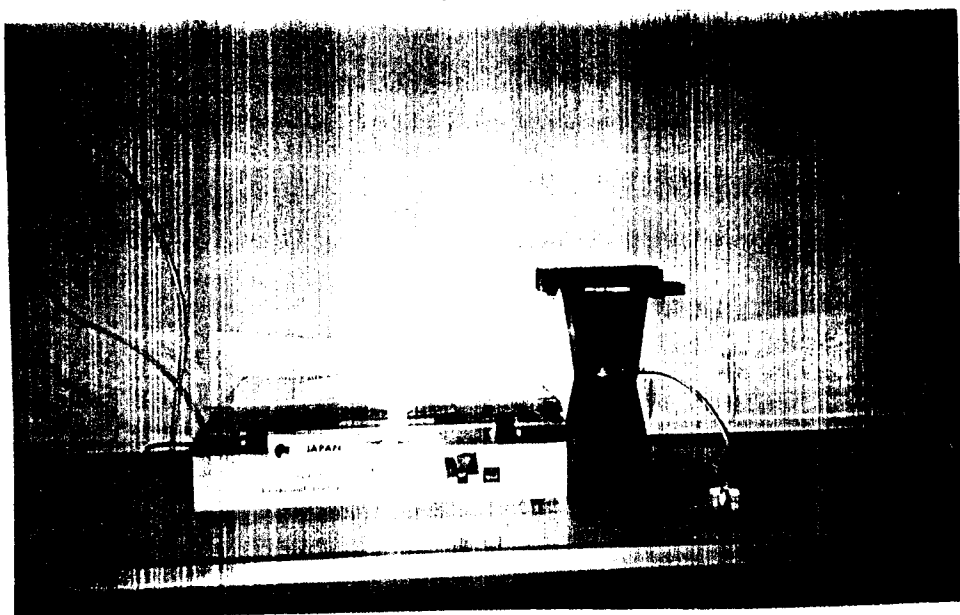
- 1,5 – 2% (W/V) Agarose Gel yang dilarutkan dengan buffer TAE 20X
- Panaskan sampai dengan larut dan jernih
- Tempatkan dalam cetakan Agarose Gel
- Simpan dan tutup dengan baik sampai akan digunakan

4. Elektrophoresis hasil PCR

Campurkan 2 μ l Loading buffer 6x dalam 10 μ l sampel (hasil amplifikasi) sebagai marker, campurkan loading dye dan marker λ Hind III, kemudian disuntikkan ke agarose gel dalam dapar TAE 20X. Aliri pada 100 Volt atau sampai garis biru berjalan 50 – 80% (selama 20 – 30 menit).

5. Pewarnaan dan Pengamatan Hasil Elektrophoresis

Hasil elektrophoresis selanjutnya akan distaining menggunakan Ethidium Bromide 0,5 μ g/ml dalam TAE 20X. Terakhir dilakukan pembacaan untuk menentukan ada atau tidaknya infeksi oleh virus pada alat ultraviolet Transs – illuminator. Dan di dokumentasikan menggunakan Polaroid gel kamera.



Gambar 4. Alat Ultraviolet Transsilluminator

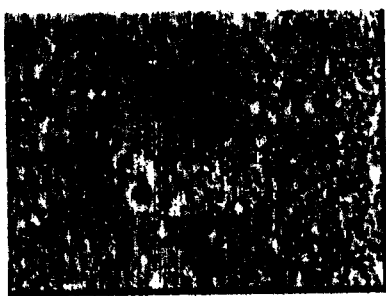
BAB IV

PEMBAHASAN

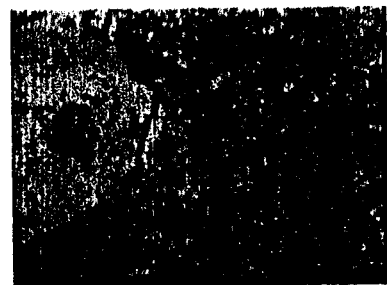
4.1 Diagnosa Penyakit Iridovirus

4.1.1 Diagnosa Iridovirus dengan Metode Histologi

Dalam pemeriksaan secara histopatologi, terlihat adanya haemorrhagi pada jaringan hati dan limpa. Dan pada beberapa ekor ikan ditemukan sel-sel yang membesar atau giant cells pada organ limpa, ginjal depan dan ginjal belakang terlihat adanya nekrosis sel dan sel-sel yang membesar atau giant cells. Selain itu, ditemukan pula sel-sel yang membesar dengan intranuclear inclusion body (Jung *et al.*, 1997 ; Danayadol *et al.*, 1997 ; Chua *et al.*, 1994). Sel-sel yang membesar pada limpa, jantung, ginjal, hati dan insang merupakan ciri khas dari infeksi Iridovirus (Inouye *et al.*, 1992; Chou *et al.*, 1998). Sel-sel yang membesar disebut ballooned cells atau heteromorphic balloon cells, bathophilic enlarged cells, productively infected cells. Organ target dari iridovirus adalah jaringan hematopoetik yaitu ginjal dan limpa (Danayadol *et al.*, 1997). Virus ini umumnya menyerang sistem sirkulasi pada tubuh ikan yang ditandai adanya pembesaran sel pada limpa, ginjal, jantung, hati, sistem pencernaan, pankreas, insang, gelembung renang, tulang, daging, cairan dan choroidal mata dan selaput otak (Jung *et al.*, 1997 dan Mahardika *et al.*, 2001 unpublished).



A



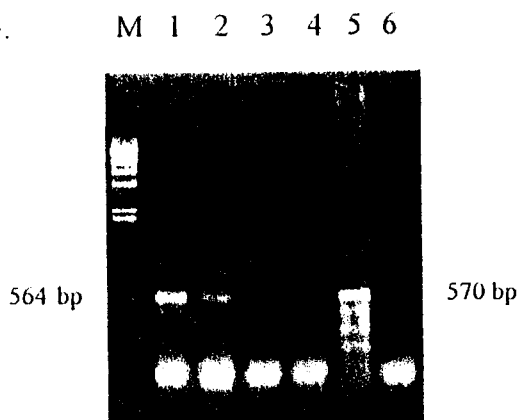
B

Gambar 5. Histopatologi jaringan hati dan limpa dari ikan yang terserang Iridovirus. A) haemorrhagi pada jaringan hati (tanda panah), B) sel-sel yang membesar (tanda panah) (pewarnaan H&E, 20 X).

Sebelumnya kejadian iridovirus dilaporkan pada *Pagrus major* (Inouye *et al.*, 1992; Nakajima dan Sorimachi., 1994; Nakajima *et al.*, 1995). Menurut Nakajima dan Sorimachi (1994), iridovirus dapat berkembang pada suhu 15, 20, 25 dan 30 °C, tetapi tidak dapat berkembang pada suhu 37 °C. sedangkan suhu pertumbuhan optimum dari virus ini adalah 20 atau 30 °C dan biasanya infeksi iridovirus ini terjadi pada wadahi budidaya yang bersuhu antara 25 – 30 °C. Pada ikan yang terinfeksi sedikit menunjukkan gejala klinis. Biasanya gejala yang ditunjukkan adalah berenang lemah atau diam di dasar bak. Setelah dilakukan pembedahan akan terlihat limpa membesar dua sampai tiga kali ukuran normal (splenomegaly), insang pucat, pembesaran pada ginjal cepat dan hati berwarna pucat atau membesar (Chua *et al.*, 1994; Danayadol *et al.*, 1997; Inouye *et al.*, 1992). Tidak ada perubahan pada organ thymus, kulit dan otak pada pemeriksaan histopatologi.

4.1.2 Diagnosa Iridovirus dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Hasil deteksi iridovirus dengan tehnik Polymerase Chain Reaction (PCR) menggunakan spesifik primer (RSIV), dari juvenil ikan kerapu macan terdeteksi infeksi iridovirus dan ini dapat dilihat dari gambaran hasil elektroporesis yaitu garis band di 570 bp pada gel agarose. Hasil analisis elektroporesis untuk virus ini dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Deteksi virus dengan PCR pada juvenil kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) dari hasil elektrophoresis pada gel agarose. 1) marker λ Hind III, 2) perlakuan A, 3) perlakuan B, 3) perlakuan C, 4) ikan uji sebelum digunakan, 5) kontrol positif dan 6) kontrol negatif.

Iridovirus digolongkan kedalam DNA Virus dan diklasifikasikan kedalam Family Iridoviridae, dan pengamatan menggunakan Elektron Mikroskop virus ini berbentuk Heksagonal atau Icosahedral dengan diameter yang bervariasi yaitu sekitar 120 – 230 nm (Inouye *et al.*, 1992; Chou *et al.*, 1998; Danayadol *et al.*, 1997; Kasorncandra *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 1997).

Metode deteksi virus menggunakan teknik PCR ini selain cepat juga mempunyai tingkat akurasi yang sangat tinggi, selain itu pengelolaan sampel yang akan digunakan cukup diawetkan dalam alkohol 70% sehingga bila terjadi kasus kematian di lokasi yang jauh, petani masih mungkin mengirimkan sampel ke laboratorium dan segera dapat dilakukan analisa untuk mengetahui penyebab kematiannya secara lebih pasti.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Infeksi Iridovirus pada ikan kerapu macan dapat didiagnosa dengan metode histologi dan dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR).
2. Dengan metode histologi, jaringan yang terinfeksi iridovirus ditandai dengan adanya sel-sel yang membesar atau Giant Cells pada jaringan Haematopoetik, yaitu ginjal dan limpa.
3. Dengan metode PCR, sampel yang positif terinfeksi iridovirus menunjukkan garis band di 570 bp pada gel agarose. Pemeriksaan dengan teknik PCR memberikan hasil yang lebih cepat dibanding histologi.

5.2 Saran

Di dalam budidaya ikan laut, khususnya infeksi iridovirus merupakan salah satu kendala utama yang tidak bisa diabaikan. Sangat diperlukan solusi terbaik dari usaha pencegahan dan penanganan infeksi iridovirus secara cepat untuk mencegah meluasnya penyebaran mengingat penyakit ini dapat menyerang beberapa jenis ikan kerapu dengan angka kematian yang tinggi. Salah satu upaya untuk mencegah infeksi iridovirus adalah meningkatkan kekebalan ikan melalui vaksinasi. Oleh karena itu peningkatan kekebalan ikan melalui vaksinasi perlu ditingkatkan.

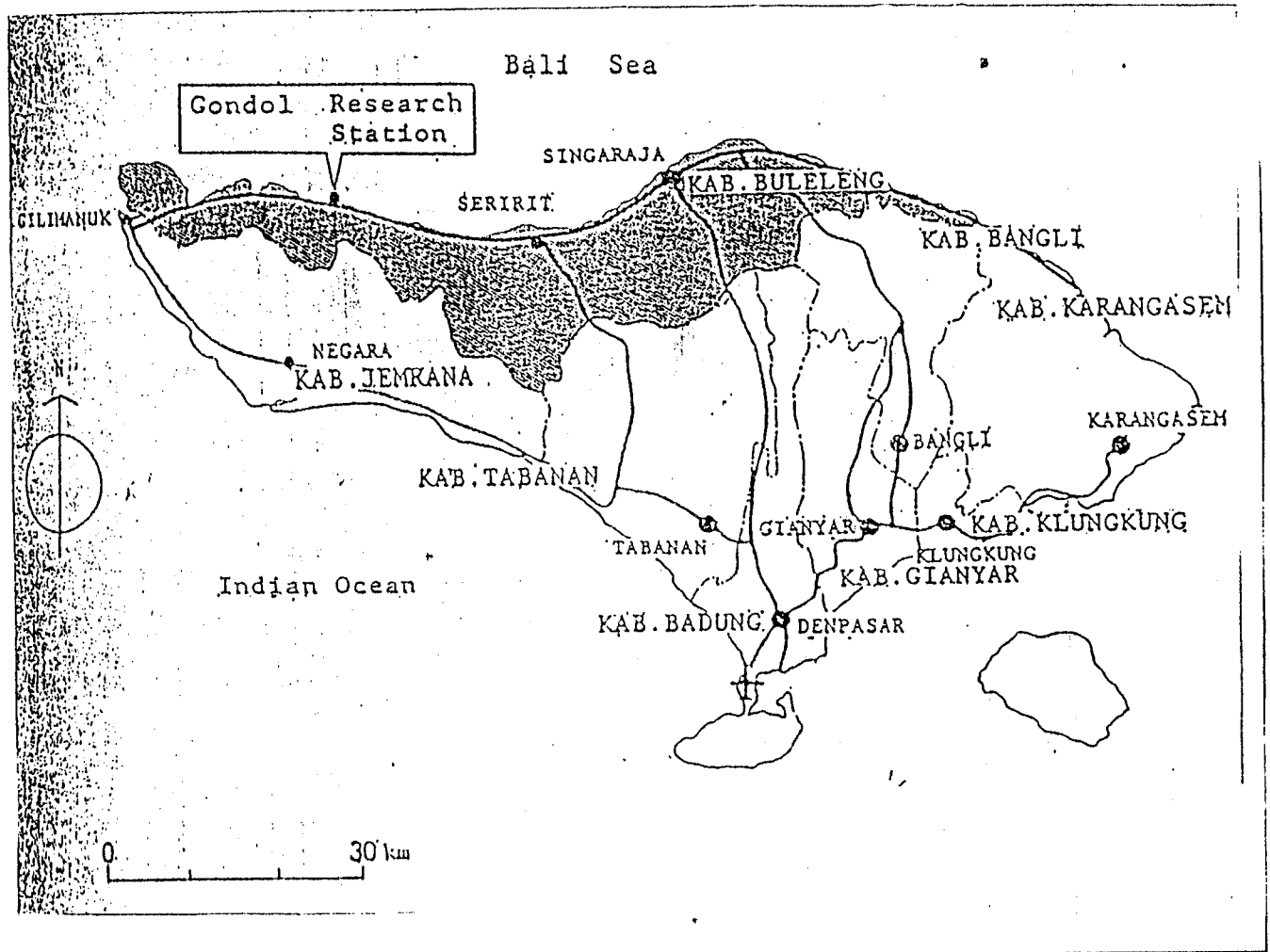
DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 1991. Operasional Pembesaran Ikan Kerapu dalam Keramba Jaring Apung. Balai Penelitian Perikanan Budidaya Pantai Maros. Badan Litbang Pertanian Jakarta.
- Aquaculture News. 1995. Molecular Genetics in aquaculture and the population structure of finfish and shrimps. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling Fkg 4 LA, Scotland. Aquaculture News, Number 19, May. Pp. 20-21.
- Bloom, M.V. 2001. Polymerase Chain Reaction. DNA Learning Center, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 9 pp.
- Chou H.Y., Hsu C.C., and Peng T.Y. 1998. Isolation and Characterization of a Pathogenic Iridovirus from Cultured Grouper (*Epinephelus sp*) in Taiwan. Fish Pathol., 33, 201 – 206.
- Chua F.H.C., Ng K.L., Loo I.J., and Wee J.Y. 1994. Investigation of Out Breaks of a Novel Disease, 'Sleepy Grouper Disease', Affecting the Brown – Spotted Grouper. *Epinephelus tui* Forskal. J. Fish Dis., 17, 417 – 427.
- Coelen, R. 1999. Molecular Diagnostics for Shrimp Viruses in The Asian Region : Methods for The Detection and Diagnosis of Pathogen Specific Nukleic Acids. 10 – 13th Feb. Mahidol University, Salaya Campus. Thailand. 5 pp.
- Danayadol Y., S. Direkbusarakom, S. Boonyaratpalin, T. Miazaki and M. Miyata (1997). Iridovirus Infection in Brown – Spotted Grouper (*E. malabaricus*) Cultured in Thailand. Diseases. in Asian Aquacultured III. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila. 67 – 72.
- Direktorat Jenderal Perikanan. 1998. Pembesaran Kerapu Macan. Balai Budidaya Laut Lampung. 85 hal.

- Gunarso W. 1989. Mikroteknik. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat antar Universitas Ilmu Hayat Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Inouye K., Yamano K., Maeno Y., Nakajima K., Matsuoka M., Wada Y., and Sorimachi M. 1992. Iridovirus Infection of Cultured Red Sea Bream, *Pagrus major*. Fish Pathol., 27, 19 – 27. (in Japanese with English Summary).
- Jung S., Miyazaki T., Miyata M., Danayadol Y., and Tanaka S. 1997. Pathogenicity of Iridovirus from Japan and Thailand for the Red Sea Bream *Pagrus major* in Japan, and Histopathology of Experimentally Infected Fish. Fisheries Science. 63, 735 – 740.
- Koesharyani I., Des Roza., Mahardika K., Jhonny F., Zafran., Yuasa K. 2001. Penuntun Diagnosa Ikan II. Penyakit Ikan Laut dan Crustacea di Indonesia. Balai Penelitian Perikanan Laut Gondol. Singaraja.
- Koeshariyani I., K. Mahardika, K. Sugama dan K. Yuasa. 2001. Iridovirus Penyebab Kematian pada Budidaya Ikan Kerapu Lumpur *Epinephelus coioides* : Deteksi menggunakan Polymerase Chain Reaction. Teknologi Budidaya Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia. Departemen Kelautan dan Perikanan.
- Kurita J., Nakajima K., Hirono I., and Aoki T. 1998. Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of DNA of Red Sea Bream Iridovirus (RSIV). Fish Pathol., 33, 17 – 23.
- Maeda, M., J., Kasornchandra, T., Itami, N., Suzuki, O., Hennig, M., Kondo, J.D. Albaladejo and Y., Takahashi. 1998^b. Effect of various Treatments on White Spot Syndrome Virus (WSSV) from *Penaeus japonicus* (Japan) and *Penaeus monodon* (Thailand). Fish Pathology, 33 (4), 381 – 387. 10.
- Mahardika K., Des Roza., I. Koesharyani., F. Jhonny., Zafran., K. Yuasa. 2000. Tehnik Histologi. Textbook for the Training Course on Fish Disease Diagnosis. Gondol Research Station for Coastal Fisheries. Singaraja.

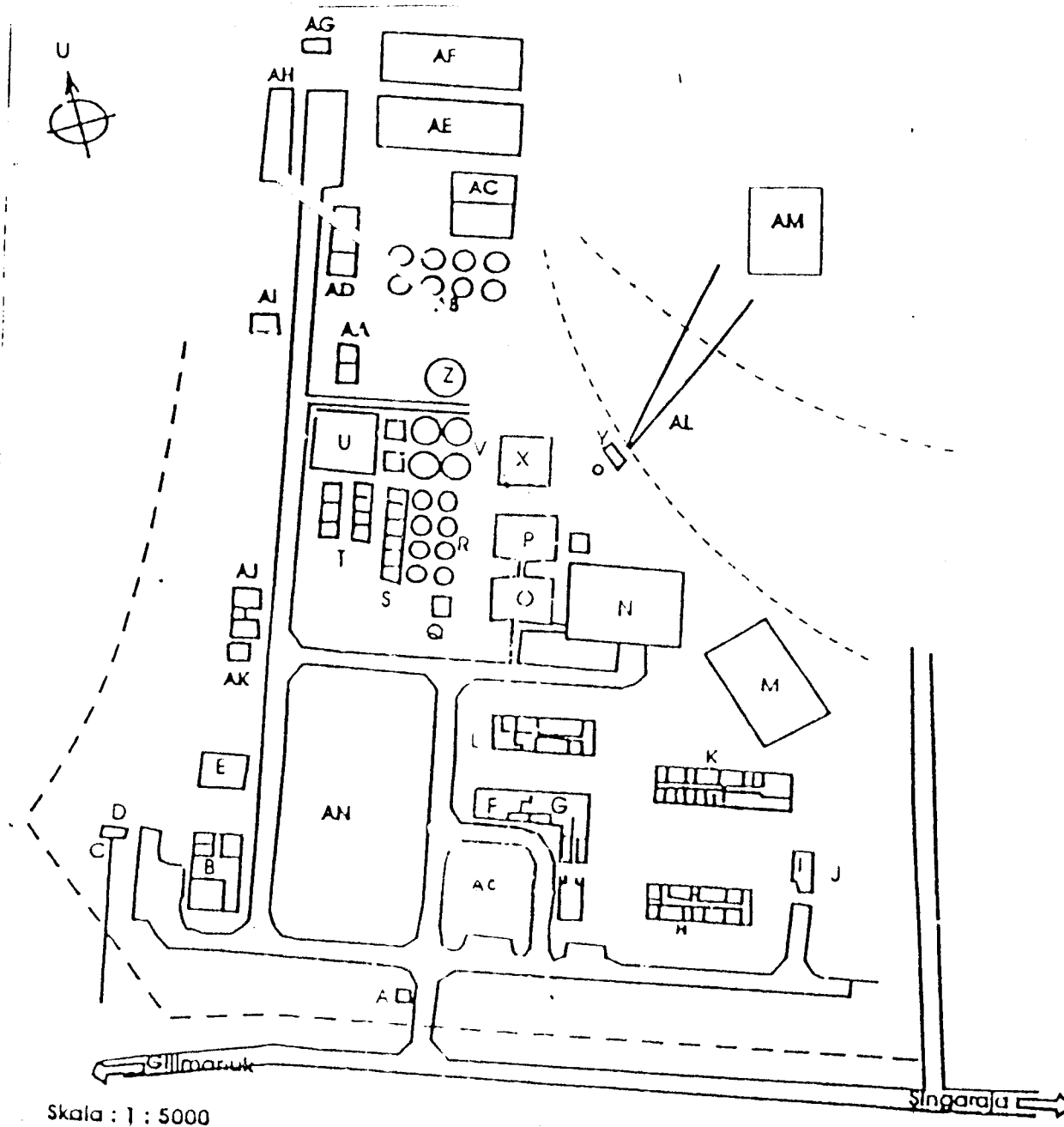
- Mayunar, Redjeki. S., dan Murtiningsih. S. 1991. Pemeliharaan Larva Kerapu Macan (*Epinephealus fuscoguttatus*) dengan berbagai frekuensi Pemberian Ransum Rotifer. *Penel. Budidaya Pantai*, 7 (2) : 67 – 72.
- National Center for Human Genome Research. 1992. Polymerase Chain Reaction – Xeroxing. Departement of Health and Human Services. [URL: http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/rdna/pcr.html](http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/rdna/pcr.html)
- Sugama K., I. Koesharyani., Des Roza., F. Jhonny., K. Mahardika., K. Yuasa. 2000. Prosedur Teknik PCR. Textbook for the training Course on Fish Disease Diagnosis. Gondol Research Station for Coastal Fisheries. Singaraja.
- Suharsono, S. 2000. Prinsip Amplifikasi DNA dengan PCR. Pelatihan Teknik Pengklonan gen dan Pengurutan DNA. Bogor, 14 – 24 Feb. 2000. Proyek Pembinaan Kelembagaan Penelitian dan Pengembangan, Badan Litbang Pertanian, Departemen Pertanian dan PAU Bioteknologi IPB. 9 hlm.
- Susanto B. 2002. Analisa 16s rDNA-mtDNA sebagai Marka Genetik Variabilitas Ikan Kerapu Macam melalui Metode PCR RFLP. Tesis Pasca Sarjana.
- Yuasa, K. D. Roza., I. Koesharyani, F., Johnny and K. Mahardika. 2001. The Importance of Fish Pathology on Mariculture in Indonesia and the role of fish pathologist in sustainable aquaculture. *Teknologi Budidaya Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia*. Departemen Kelautan dan Perikanan. pp. 219 – 227.

Balai Penelitian Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol



Sumber : Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol

Lampiran 2. Tata Letak Bangunan di BBRPBL Gondol Bali



Sumber : Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol

Lampiran 2 (lanjutan)

Keterangan :

A	= Rumah jaga
B	= Bengkel
C	= Panel listrik/jalur PLN
D	= Ruang mesin pembangkit
E	= Feed Processing Room
F	= Perpustakaan
G	= Ruang administrasi
H	= Lab. Pathologi
I	= Gudang
J	= Bak penampungan air tawar
K	= Lab. Kimia
L	= Lab Biologi
M	= Lapangan tennis
N	= Ruang kultur plankton
O	= Lab. Bioteknologi dan ruang pemeliharaan kerapu
P	= Hatchery kepiting
Q	= Tanki air laut
R	= Bak induk bandeng ukuran 20 ton
S	= Bak kultur masal rotifera
T	= Bak pemeliharaan larva bandeng
U	= Unit pembenihan udang
V	= Bak kultur masal Nannochloropsis ukuran 15 ton
W	= Bak induk bandeng ukuran 100 ton
X	= Hatchery Teripang
Y	= Rumah pompa air laut
Z	= Bak kultur masal Nannochloropsis ukuran 360 ton
AA	= Bak kultur masal Nannochloropsis ukuran 55 ton
AB	= Bak induk bandeng ukuran 360 ton
AC	= Extention Room
AD	= Kolam penampungan air
AE	= Multi sp Hatchery
AF	= Bak kultur plankton
AG	= Gudang bahan kimia
AH	= Asrama
AI	= Koperasi
AJ	= Guest House
AK	= Musolla
AL	= Pipa penyedot air laut
AM	= Karamba jarring apung
AN	= Lapangan olah raga
AO	= Taman

Lampiran 3.

Larutan Fiksasi

a. Buffer Formalin 10 %

Acid Sodium Phosphate Monohydrate ($\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)..... 4,0 grAnhydrous Disodium Phosphate ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4$)..... 6,5 gr

Formalin

Aquadest

b. Larutan Dekalsifikasi

5% Formic Acid dalam buffer formalin 10 %

atau

Formic Acid.....50 ml

Formalin.....50 ml

Aquadest.....900ml

Lampiran 4

DAFTAR WAKTU AMPLIFIKASI UNTUK IRIDOVIRUS

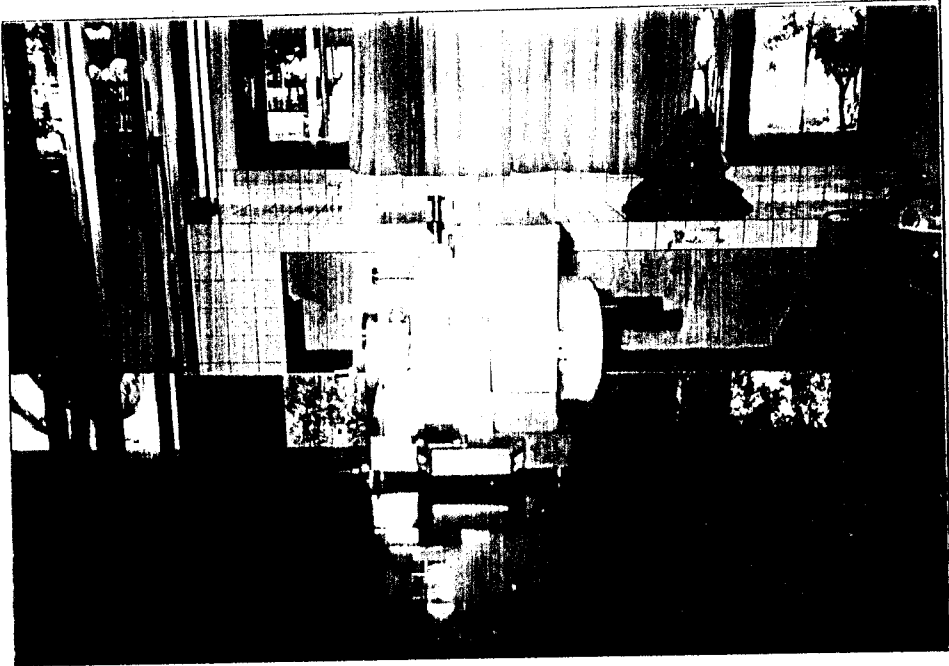
Reaksi	Waktu Pengulangan	Suhu	Waktu reaksi
PCR	30 kali	94°C	30 detik
		58°C	1 menit
		72°C	1 menit
	1 kali	94°C	30 detik
		58°C	1 menit
		72°C	5 menit
Preservation	1 kali	4°C	99,99 detik

Komposisi dari 1,5 % Agarose untuk Elektroporesis

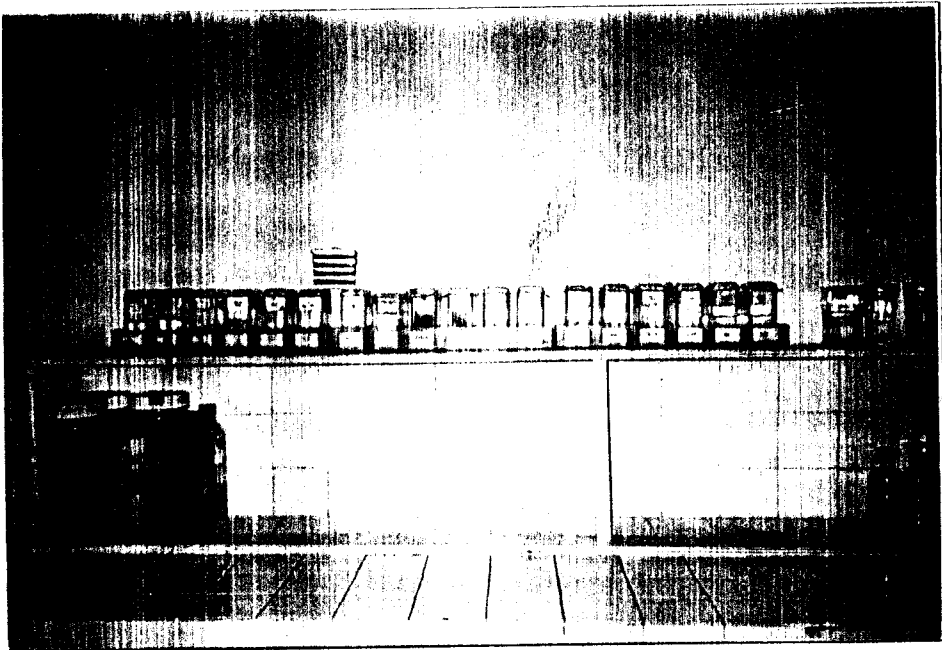
Bahan	Ukuran Besar	Ukuran Kecil
Agarose	0,45 gr	0,225 gr
20 x TAE Buffer	1,5 ml	0,75 ml
Destiled Water (DW)	28,5 ml	14,25 ml

Keterangan : DW = Aquadest

Lampiran 5

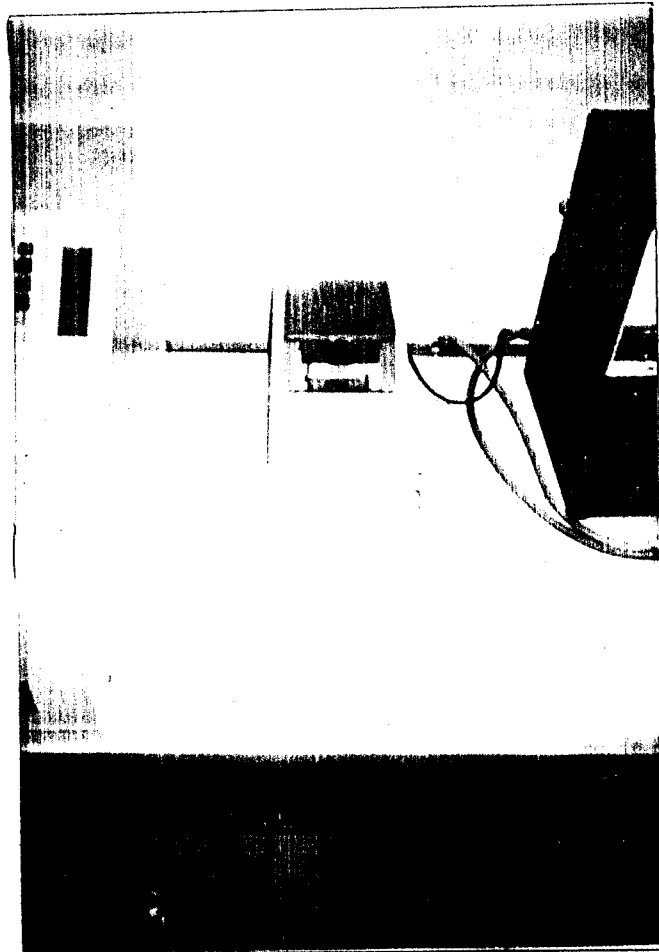


Gambar. Alat pemotong jaringan atau Mikrotom



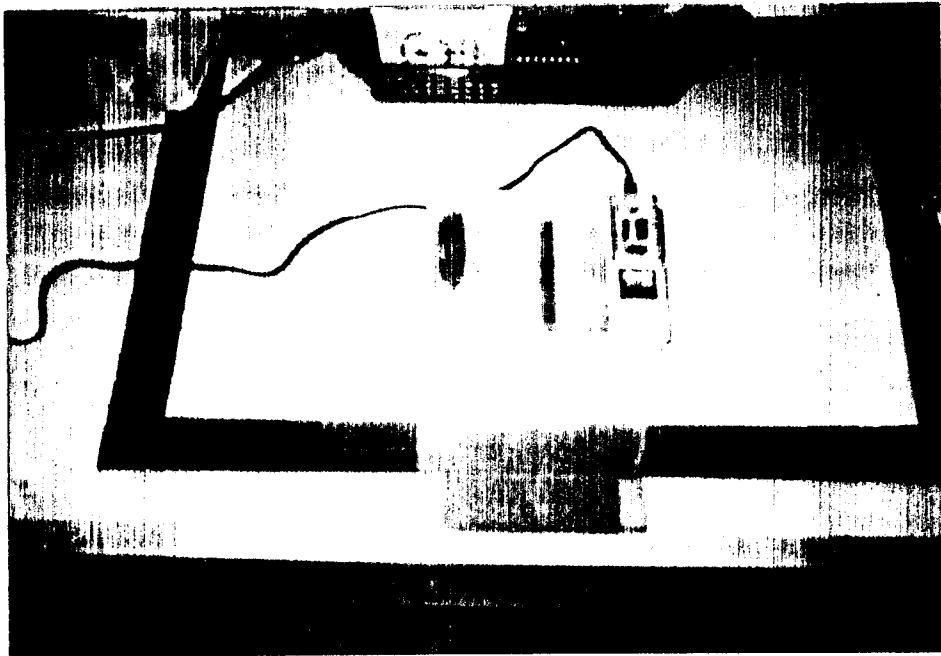
Gambar. Larutan untuk pewarnaan preparat histologi

Lampiran 6

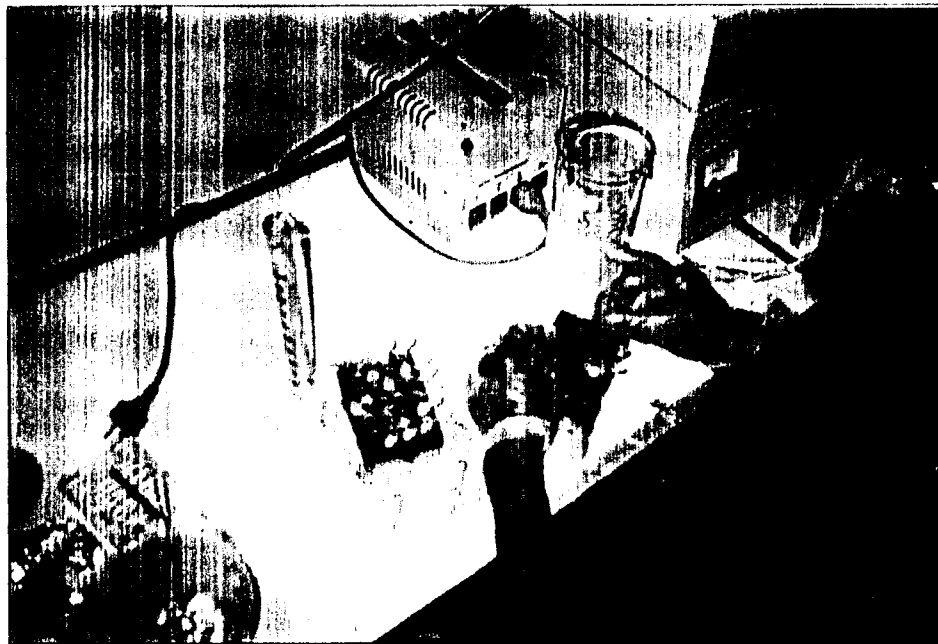


Gambar. Alat Amplifikasi

Lampiran 7

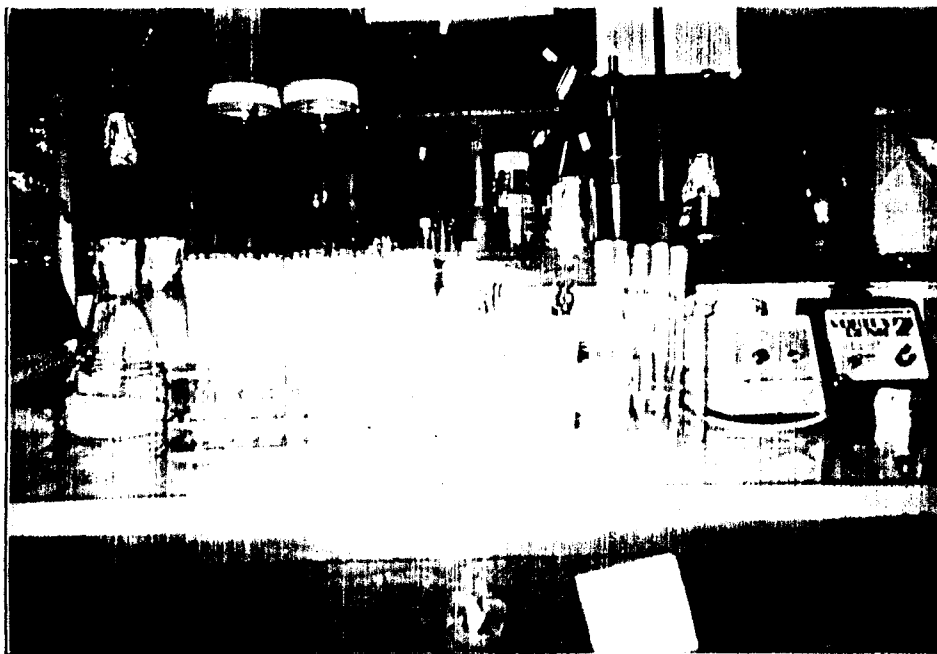


Gambar. Alat Elektroporesis



Gambar. Pembuatan Inokulum VNN

Lampiran 8

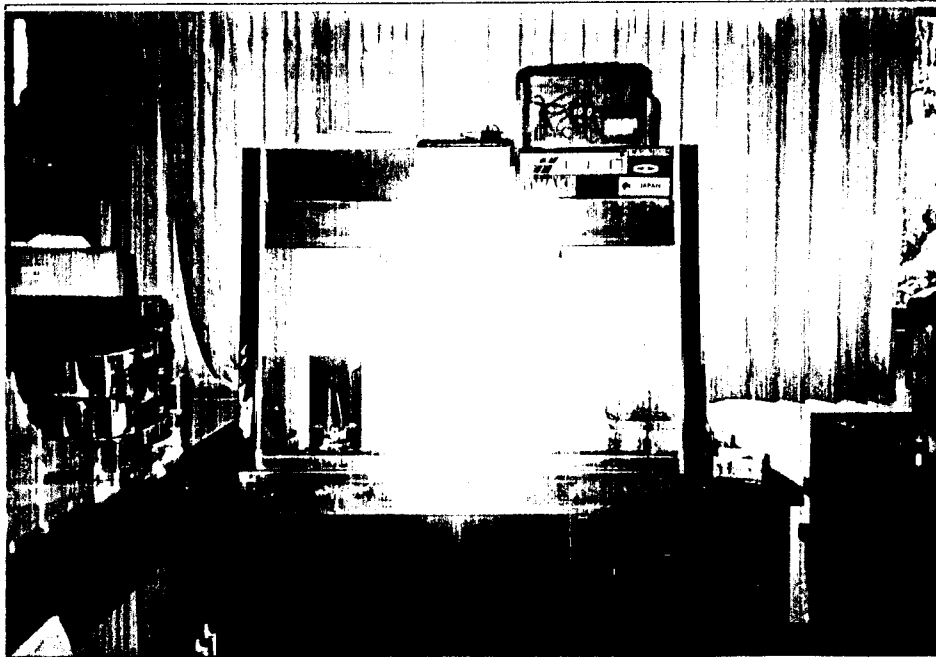


Gambar. Alat dan bahan sterilisasi air laut



Gambar. Alat dan bahan Isolasi bakteri

Lampiran 9



Gambar. Cleanbench



Gambar. Alat Colony Counter