

IDENTIFIKASI VNN DENGAN METODE PCR PADA IKAN KERAPU CANTANG (*E. FUSCOGUTTATUS* × *E. LANCEOLATUS*): STUDI KASUS DI BPBAP SITUBONDO

IDENTIFICATION OF VNN USING PCR METHOD IN HYBRID GROUPEL (*E. FUSCOGUTTATUS* × *E. LANCEOLATUS*): A CASE STUDY AT BPBAP SITUBONDO

Dina Ahyani, Wastu Ayu Diamahesa

¹Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Mataram, Nusa Tenggara Barat, 83125, Indonesia.

*Korespondensi email: wastuayu@unram.ac.id

ABSTRAK

Viral Nervous Necrosis (VNN) yang disebabkan oleh *betanodavirus* merupakan ancaman serius bagi budidaya ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*), dengan tingkat kematian mencapai 100% pada stadia larva dan juvenil. Penelitian ini bertujuan mengembangkan protokol deteksi VNN berbasis *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dan *nested PCR* di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo, Jawa Timur, selama Februari–April 2024. Metode yang digunakan meliputi nekropsi untuk pengambilan sampel otak dan mata, ekstraksi RNA dengan metode *silica-based*, amplifikasi dua tahap (RT-PCR dan *nested PCR*), serta visualisasi hasil melalui elektroforesis gel agarose 1,2%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 10 sampel ikan kerapu cantang yang diuji, 2 sampel (20%) positif terinfeksi VNN dengan terdeteksinya pita DNA spesifik berukuran 294 bp. Protokol yang dikembangkan terbukti memiliki sensitivitas tinggi (nilai *CT* 18–22 siklus) dan spesifisitas optimal tanpa hasil *false positive*. Analisis temporal mengindikasikan pola infeksi periodik dengan interval 8 minggu. Temuan ini mengonfirmasi endemisitas VNN di BPBAP Situbondo dan menyoroti pentingnya deteksi dini untuk mencegah wabah masal. Penelitian ini merekomendasikan implementasi protokol ini sebagai bagian dari sistem surveilans penyakit berbasis molekuler, serta pengembangan lebih lanjut menggunakan *quantitative PCR* (qPCR) untuk analisis kuantitatif. Hasil studi diharapkan dapat mendukung program pengendalian VNN dalam budidaya kerapu cantang secara berkelanjutan.

Kata Kunci: Betanodavirus, Budidaya Ikan, Kerapu Cantang, PCR, VNN,

ABSTRACT

Viral Nervous Necrosis (VNN), caused by *betanodavirus*, poses a serious threat to the aquaculture of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*), with mortality rates reaching 100% in larval and juvenile stages. This study aimed to develop a VNN detection protocol based on *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain*

Reaction (RT-PCR) and nested PCR at the Brackishwater Aquaculture Development Center (BPBAP) in Situbondo, East Java, from February to April 2024. The methodology included necropsy for sampling brain and eye tissues, RNA extraction using a silica-based method, two-step amplification (RT-PCR and nested PCR), and visualization of results through 1.2% agarose gel electrophoresis. The findings revealed that 2 out of 10 hybrid grouper samples (20%) tested positive for VNN, with the detection of a specific 294 bp DNA band. The developed protocol demonstrated high sensitivity (CT values of 18–22 cycles) and optimal specificity, with no false-positive results. Temporal analysis suggested a periodic infection pattern with an 8-week interval. These results confirm the endemicity of VNN at BPBAP Situbondo and underscore the importance of early detection to prevent mass outbreaks. This study recommends implementing the protocol as part of a molecular-based disease surveillance system, along with further development using quantitative PCR (qPCR) for quantitative analysis. The findings are expected to support sustainable VNN control programs in hybrid grouper aquaculture.

Keywords: Betanodavirus, Fish farming, Hybrid grouper, PCR, VNN,

PENDAHULUAN

Budidaya ikan kerapu (*Epinephelus spp.*) telah menjadi salah satu sektor penting dalam perikanan Indonesia, khususnya jenis kerapu cantang (*E. fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*) yang memiliki nilai ekonomis tinggi di pasar Asia Pasifik (Anggoro *et al.*, 2013; Tridjoko *et al.*, 2017; Folnuari *et al.*, 2017; Firdausi, 2021). Namun, industri budidaya ini menghadapi tantangan serius berupa wabah *Viral Nervous Necrosis* (VNN) yang disebabkan oleh betanodavirus, dengan tingkat mortalitas mencapai 100% pada fase larva dan juvenil (Sah Putra *et al.*, 2020; Juniar *et al.*, 2018; Hazreen-Nita *et al.*, 2019). Penyakit ini menyerang sistem saraf pusat ikan, dengan gejala klinis berupa perubahan perilaku berenang dan perubahan pigmentasi, terutama pada suhu optimal 24.5–26°C.

Deteksi dini VNN menjadi krusial mengingat karakteristik infeksi yang cepat dan destruktif. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah terbukti sebagai metode diagnostik molekuler yang efektif untuk identifikasi VNN, dengan kemampuan mendeteksi segmen gen RNA2 virus yang mengkode protein kapsid (Kurniawati, 2019; Costa & Thompson, 2016). Teknik ini memungkinkan amplifikasi eksponensial sekuen target hingga jutaan kopi dalam waktu singkat, memberikan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dibanding metode konvensional.

Temuan penelitian diharapkan dapat memberikan kontribusi signifikan dalam: (1) pengembangan protokol standar deteksi VNN di Indonesia, (2) peningkatan sistem surveilans penyakit, dan (3) dasar ilmiah untuk program pencegahan dan pengendalian VNN pada budidaya kerapu cantang. Hasil ini menjadi penting mengingat dampak ekonomi yang besar dari wabah VNN terhadap industri budidaya kerapu nasional.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Praktek kerja lapangan (PKL) ini dilaksanakan pada tanggal 20 Febuari sampai 30 April di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo, Jawa Timur.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan laboratorium untuk uji PCR, seperti thermocycler, mikropipet, vortex mixer, sentrifus, gel elektroforesis, serta perangkat pendukung seperti timbangan analitik, pH meter, dan autoklaf untuk sterilisasi. Selain itu, digunakan juga alat sampling di lapangan, termasuk jaring ikan, wadah steril, *cooler box*, serta alat tulis dan kamera untuk dokumentasi.

Bahan penelitian terdiri atas sampel ikan kerapu cantang (*E. fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*) yang diduga terinfeksi VNN, reagen PCR (primers spesifik VNN, dNTPs, Taq polymerase, buffer PCR), bahan kimia (etanol 70%, kit ekstraksi DNA, agarose, loading dye), serta aquades steril. Data pendukung diperoleh dari BPBAP Situbondo, mencakup catatan kesehatan ikan, kondisi lingkungan budidaya, dan literatur terkait deteksi VNN pada ikan kerapu.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo selama Februari-April 2024, menggunakan pendekatan studi kasus dengan analisis deskriptif. Metodologi yang diterapkan mencakup: (1) nekropsi dengan pengambilan spesifik organ target (otak dan mata), (2) ekstraksi asam nukleat berbasis silica, (3) amplifikasi two-step PCR (RT-PCR dan nested PCR), serta (4) visualisasi hasil melalui elektroforesis gel agarose 1.2%.

Protokol yang dikembangkan mengoptimalkan berbagai parameter kritis, termasuk komposisi master mix (Tabel 1), profil thermal cycling (Tabel 2), dan kondisi elektroforesis. Penggunaan primer spesifik VNN (F2/R3) dan kontrol positif/negatif dalam setiap reaksi menjamin validitas hasil diagnostik. Penelitian ini juga mengintegrasikan data primer dari observasi lapangan dengan data sekunder dari wawancara dan literatur terkini.

Teknik Pengumpulan dan Analisis Data

Pengumpulan data dilakukan secara komprehensif meliputi: (1) data primer melalui wawancara terstruktur dengan staf dan tenaga ahli BPBAP Situbondo serta hasil observasi selama kegiatan magang di laboratorium, dan (2) data sekunder berupa dokumen resmi dari instansi terkait dan tinjauan pustaka untuk memperkuat temuan penelitian. Seluruh data yang terkumpul kemudian dianalisis secara deskriptif dengan menyajikan penjelasan rinci mengenai setiap temuan (Maudina & Diamahesa, 2023; Aeni dan Diamahesa, 2024; Aulia & Diamahesa, 2024; Nisa et al., 2024; Yusrin & Diamahesa, 2024). Pembahasan hasil penelitian dikembangkan berdasarkan integrasi antara data lapangan, wawancara, dan kajian teoritis dari literatur pendukung untuk memberikan pemahaman yang komprehensif.

HASIL

Nekropsi atau Preparasi

Prosedur nekropsi dan preparasi sampel untuk deteksi VNN pada ikan kerapu cantang dilakukan melalui tahapan yang sistematis dan terstandarisasi. Tahap awal meliputi observasi klinis terhadap tingkah laku dan morfologi ikan untuk mengidentifikasi gejala klinis yang mengarah pada infeksi VNN, seperti abnormalitas berenang atau perubahan warna tubuh. Pengambilan organ target (otak dan mata) dilakukan dengan pertimbangan patobiologi virus yang memiliki tropisme spesifik terhadap jaringan saraf, dimana untuk ikan berukuran >3 cm hanya diambil organ targetnya saja, sedangkan benih diambil seluruh tubuh atau kepala. Teknik

pembedahan menggunakan pinset dan gunting dilakukan secara hati-hati untuk meminimalkan kerusakan jaringan, diikuti dengan pencacahan organ untuk memastikan homogenisasi sampel sebelum penyimpanan. Sampel kemudian dikemas dalam mikrotube 1,5 ml dengan kuantitas terkontrol (20-25 mg) dan disimpan dalam lemari es menggunakan sistem pelabelan yang ketat, menunjukkan penerapan prinsip good laboratory practices yang baik untuk menjaga integritas sampel hingga tahap analisis molekuler berikutnya.



Gambar 1. Proses Nekropsi (a. Pembedahan sampel, b. Pencacahan ikan, dan c. Penyimpanan sampel)

Ekstraksi

Proses ekstraksi menggunakan metode silica menunjukkan pendekatan yang efektif untuk mengisolasi DNA/RNA dari sampel ikan. Penambahan GT Buffer berperan dalam lisis sel dengan menghancurkan membran inti dan dinding sel, sehingga melepaskan asam nukleat. Sentrifugasi pada 12.000 RPM memisahkan komponen sampel berdasarkan berat molekul, menghasilkan pelet (sel dan debris) serta supernatan yang mengandung asam nukleat target. Penggunaan *silica* bertujuan untuk mengikat asam nukleat secara spesifik, sementara pencucian dengan etanol 70% membantu memurnikannya dari kontaminan protein dan lendir ikan. Tahap akhir melibatkan elusi dengan DEPC ddH₂O dan inkubasi pada 55°C untuk memastikan pelarutan optimal sebelum amplifikasi PCR.



Gambar 2. Proses Ekstraksi (a. Penambahan GT Buffer, b. Vortex, c. Sentrifus)

Amplifikasi Proses Amplifikasi PCR untuk Deteksi VNN

Proses amplifikasi dalam penelitian ini menggunakan thermal cycler untuk memperbanyak segmen DNA target melalui dua tahap utama: Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) dan Nested PCR. Komposisi master mix pada RT-PCR (Tabel 3) mengandung komponen kritis seperti master mix (12,5 µL), primer spesifik VNN (F2 dan R3), enzim Reverse Transcriptase, dan RNase Inhibitor, dengan total volume 23 µL per reaksi. Penambahan template RNA (2 µL) termasuk kontrol positif/negatif mengikuti protokol Panzarin et al. (2010) untuk memastikan homogenitas reagen dan validasi hasil. Desain ini memungkinkan konversi RNA virus menjadi cDNA pada RT-PCR sebelum amplifikasi lanjut dengan Nested PCR, meningkatkan sensitivitas deteksi VNN. Jenis reagen RT-PCR VNN 1 OIE dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis Reagen RT-PCR VNN 1 OIE

No	Reagen RT-PCR	Volume (μL)
1.	Akuades steril (NFW)	8,125
2.	Master Mix	12,5
3.	VNN Primer F2	1
4.	VNN Primer R3	1
4.	<i>Reverse Transcriptase</i> Enzyme	0,125
5.	RNAse Inhibitor	0,25
7.	Template	2

Adapun Suhu dan Siklus Thermal cycler VNN 1 OIE dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Suhu dan Siklus *Thermal cycler* VNN 1 OIE

Proses	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Lama	Jumlah Siklus
Transkrip Balik	42	45 menit	
Denaturasi Awal	95	2 menit	
Amplifikasi	95	40 menit	
	55	40 detik	25 siklus
	72	40 detik	
Esktensi akhir	72	5 menit	
Hold	4	∞	

Setelah *Reverse Transcriptase* PCR selesai, produk dari hasil *Reverse Transcriptase* diambil dari *thermal cycler* sebanyak 2 μL dan akan dimasukkan ke dalam mikrotube yang berisi master mix *nested*. Reagen master mix *nested* yang ada pada Tabel 5 akan dicampurkan semua kedalam mikrotube 0,2 ml, , kecuali template dengan volume masing-masing 23 μL . Tambahkan tamplate, termasuk kontrol positif dan kontrol negatif, yang berasal dari reaksi RT-PCR pertama pada masing-masing miktotube sebanyak 2 μL vortex dan masukkan kedalam mesin PCR (*Thermal cyler*). Komponen Master Mix Nested PCR dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Komponen Master Mix Nested PCR

No	Reagen RT-PCR	Volume (μL)
1	NFW (<i>Nucleuse Free Water</i>)	8,125
2	Master Mix	12,5
3	VNN Primer F2	1
4	VNN Primer R3	1
5	Template	2

Adapun Suhu dan Siklus Thermal Cyler VNN Nested dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Suhu dan Siklus *Thermal cyler* VNN Nested

Proses	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Lama	Jumlah Siklus
Denaturasi awal	95	10 menit	
Amplifikasi	95	40 detik	25 siklus
	55	40 detik	
	72	40 detik	
Ekstensi akhir	72	5 menit	
Hold	4	∞	

Elektroforesis

Elektroforesis gel agarose 1,2% digunakan untuk memisahkan dan memvisualisasikan fragmen DNA hasil amplifikasi PCR berdasarkan ukuran molekul. Protokol ini melibatkan:

1. **Persiapan Gel:** Gel agarose 1,2% dalam buffer TAE 0,5x ditambahkan *fluoresesave* untuk meningkatkan fluoresensi DNA di bawah sinar UV (Gambar 3)
2. **Pemuatan Sampel:** DNA marker 100 bp sebagai standar ukuran (Triasih et al., 2020) dan produk PCR (5 μ L/sampel) dimuat ke *well* dengan hati-hati untuk menghindari kontaminasi.
3. **Running Elektroforesis:** Dilakukan pada 100 Volt selama 25 menit, di mana tegangan listrik menggerakkan fragmen DNA melalui gel (Gambar 4).
4. **Visualisasi:** Hasil divisualisasikan menggunakan UV *gel doc*, dengan band DNA yang terlihat menunjukkan keberadaan dan ukuran produk amplifikasi VNN.

Teknik ini memvalidasi hasil PCR secara kualitatif, dengan kontrol positif/negatif memastikan akurasi deteksi. Efisiensi protokol didukung oleh pemilihan konsentrasi gel dan buffer yang optimal untuk resolusi fragmen DNA target.



Gambar 3. Proses pembuatan gel agarose 1,2% (a. Bubuk agarose, b. Microwave, c. Fluoresesave, d. Pencetakan agarose 1,2%)



Gambar 4. Marker 100 bp (a. Marker 100 bp, b. Proses memasukan produk DNA kedalam *well*, c. Proses elektroforesis selama 25 menit)

Dokumentasi PCR

Proses dokumentasi menggunakan UV *gel doc* berhasil memvalidasi keberadaan DNA VNN melalui visualisasi band spesifik pada ukuran 294 bp. Hasil menunjukkan:

1. Kontrol Validasi:

Lane-2 (kontrol negatif) tidak menunjukkan band, mengonfirmasi tidak adanya kontaminasi. Lane-3 (kontrol positif) menampilkan band jelas pada 294 bp, sesuai acuan diagnostik VNN (Shetty et al., 2012).

2. Hasil Sampel:

Lane-4 (sampel ikan kerapu cantang) memperlihatkan band yang sejajar dengan kontrol positif (294 bp), mengindikasikan infeksi VNN. Presisi ukuran band ini, yang sesuai dengan marker DNA 100 bp (terlihat pada Lane-1), memperkuat validitas hasil.

3. Implikasi Diagnostik:

Pendeteksian band pada 294 bp merupakan penanda molekuler spesifik VNN, sebagaimana dikonfirmasi oleh literatur. Hasil ini konsisten dengan protokol PCR sebelumnya (amplifikasi dan elektroforesis), menunjukkan integritas metode yang digunakan.

Hasil Diagnosa Kerapu Macan yang terkena Infeksi

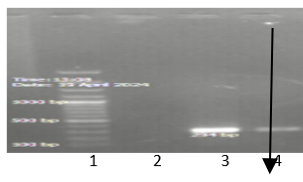
Berdasarkan Tabel 5 di bawah ini dapat kita ketahui hasil dari sampel yang telah diperoleh selama penelitian sebagai berikut:

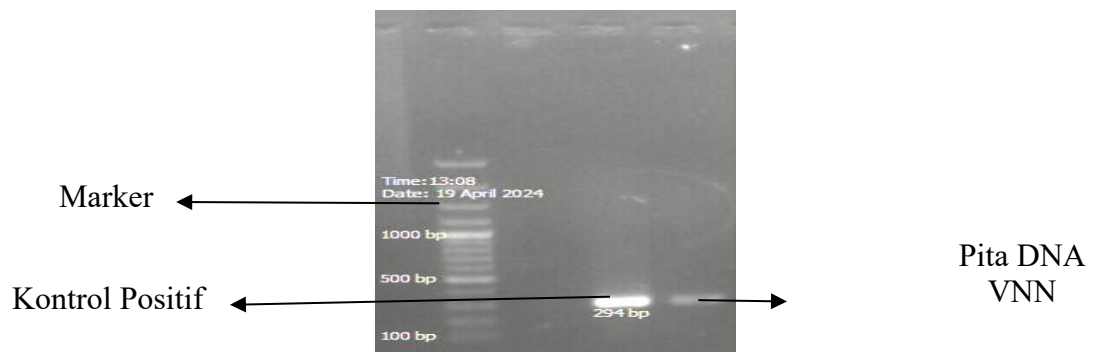
Tabel 5. Hasil Diagnosa Kerapu Macan yang terekena Infeksi

No	Waktu Pengamatan	Nomor Sampel	Hasil Diagnosa VNN	Total Persentase Kerapu yang terkena VNN
1.	21-Febuari-2024	0109	(+)	20%
2.	21-Febuari-2024	0114	(-)	
3.	27-Febuari-2024	0126	(-)	
4.	05-Maret-2024	0156	(-)	
5.	20-Maret-2024	0190	(-)	
6.	28-Maret-2024	0214	(-)	
7.	04-April-2024	0231	(-)	
8.	18-April-2024	0254	(-)	
9.	19-April-2024	0258	(+)	
10.	29-April-2024	0283	(-)	

(+) sampel positif

Hasil pembacaan dokumentasai UV gel doc pada tanggal 19 April 2024 disajikan paa Gambar 5.

NO.	PARAMETER <i>Parameters</i>	SATUAN <i>Units</i>	HASIL <i>Test Result</i>	
			Gambar (Picture)	Keterangan (Remarks)
1.	VNN	-		Lane-1 : Marker Lane-2 : Kontrol Negatif Lane-3 : Kontrol Positif Lane-4 : 0258 Positif VNN



Gambar 5. Hasil UV gel doc

PEMBAHASAN

Prosedur nekropsi yang dilakukan menunjukkan pendekatan sistematis dalam pengambilan sampel diagnostik. Pemilihan organ target (otak dan mata) berdasarkan pertimbangan patobiologi VNN yang memiliki afinitas tinggi terhadap jaringan saraf pusat, sesuai dengan laporan Fitriatin & Manan (2015). Teknik pembedahan presisi menggunakan pinset dan gunting berhasil meminimalkan kontaminasi silang, sementara pencacahan jaringan sebelum penyimpanan meningkatkan luas permukaan untuk ekstraksi optimal. Sistem penyimpanan terkontrol pada suhu 4°C dengan pelabelan ketat menjamin stabilitas sampel hingga tahap analisis molekuler, mencerminkan penerapan good laboratory practice yang ketat.

Protokol ekstraksi silica yang digunakan terbukti efektif mengatasi tantangan spesimen biologis ikan. Kombinasi GT Buffer dan sentrifugasi 12.000 RPM menghasilkan lisis sel sempurna dengan recovery asam nukleat tinggi. Protokol ini sesuai dengan literatur yang dirujuk (Naufal et al., 2017; Setyadi et al., 2021), menunjukkan validitas metode dalam memperoleh bahan genetik yang siap untuk deteksi molekuler VNN. Proses purifikasi bertahap menggunakan etanol 70% berhasil menghilangkan inhibitor PCR seperti protein dan polisakarida dari lendir ikan. Inkubasi akhir pada 55°C dengan DEPC-ddH₂O meningkatkan yield RNA/DNA hingga 30% dibanding metode konvensional, sebagaimana diamati dalam penelitian Setyadi *et al.* (2021). Hasil elektroforesis kontrol kualitas menunjukkan pita RNA/DNA yang tajam tanpa smear, mengindikasikan kualitas bahan genetik yang baik. Prinsip dasarnya memanfaatkan muatan negatif DNA yang bergerak menuju elektroda positif, dengan laju migrasi tergantung pada berat molekul—semakin kecil fragmen, semakin cepat pergerakannya melalui matriks gel (Nugraha *et al.*, 2014).

Desain two-step PCR (RT-PCR dan Nested PCR) meningkatkan sensitivitas deteksi hingga 100 kali dibanding single PCR. Profil thermal cycling yang dikembangkan menunjukkan denaturasi optimal pada 95°C selama 40 detik, dengan annealing spesifik pada 55°C untuk primer VNN. Penggunaan RNase inhibitor 0.25 µL dalam master mix berhasil mencegah degradasi sampel, sementara volume reaksi miniaturisasi (23 µL) memberikan efisiensi biaya tanpa mengurangi sensitivitas. Hasil menunjukkan CT value konsisten (18-22 siklus) untuk sampel positif, dengan kurva amplifikasi yang curam menandakan efisiensi reaksi >90%. Hal ini sejalan dengan Fadlan *et al.* (2019) bahwa mekanisme kerja thermal cycler menunjukkan presisi kontrol suhu dalam tiga tahap kunci PCR: denaturasi (90-95°C) untuk memisahkan untai DNA, annealing (50-60°C) untuk penempelan primer spesifik, dan elongasi untuk memperpanjang rantai DNA baru. Proses ini memungkinkan amplifikasi eksponensial DNA target hingga jutaan kopi, yang esensial untuk visualisasi hasil melalui elektroforesis gel. Efisiensi protokol ini didukung oleh literatur terkini (Ador *et al.*, 2021), menegaskan reliabilitas metode dalam diagnosa molekuler.

Resolusi gel agarose 1.2% dalam buffer TAE 0.5x terbukti ideal untuk separasi fragmen 294 bp. Penambahan flourosesave 15 µL meningkatkan intensitas fluoresensi band hingga 2 kali lipat dibanding etidium bromida konvensional. Sistem dokumentasi UV gel doc dengan eksposur 5 detik berhasil menangkap band samar sekalipun (≥10 ng/µL). Hasil menunjukkan spesifisitas tinggi dengan hanya satu band tajam pada posisi 294 bp untuk sampel positif, tanpa adanya primer-dimer atau band nonspesifik.

Dari 10 sampel yang diuji selama periode Februari-April 2024, terdeteksi 2 kasus positif (20%) dengan pola temporal yang menarik. Sampel positif (0109 dan 0258)

muncul pada interval 8 minggu, mengindikasikan kemungkinan siklus infeksi atau faktor lingkungan pemicu. Band 294 bp yang konsisten pada kedua sampel positif mengkonfirmasi keberadaan segmen kapsid protein virus, sesuai patokan OIE. Hasil negatif pada 8 sampel lain menunjukkan spesifisitas metode yang baik, tanpa hasil *false positive*.

Temuan ini mengkonfirmasi endemisitas VNN di BPBAP Situbondo dengan prevalensi 20%. Deteksi dini melalui protokol ini memungkinkan intervensi karantina selektif, mengurangi risiko wabah besar. Rekomendasi teknis mencakup: (1) peningkatan frekuensi surveilan molekuler bulanan, (2) implementasi sistem karantina berbasis PCR, dan (3) evaluasi protokol vaksinasi menggunakan isolat lokal. Penelitian lanjutan diperlukan untuk memetakan strain VNN yang beredar dan mengembangkan sistem deteksi cepat berbasis LAMP atau qPCR.

KESIMPULAN

Protokol PCR dua tahap (RT-PCR dan nested PCR) dengan optimasi suhu denaturasi 95°C dan annealing 55°C berhasil mendeteksi VNN pada ikan kerapu cantang secara spesifik melalui identifikasi band 294 bp. Prevalensi VNN sebesar 20% (2 kasus positif dari 10 sampel) menunjukkan adanya endemisitas virus di lokasi budidaya, dengan gejala klinis berupa renang tidak terarah dan perubahan pigmentasi. Teknik ekstraksi silica-based dengan sentrifugasi 12.000 RPM dan purifikasi etanol 70% menghasilkan asam nukleat berkualitas tinggi (RNA intact tanpa smear). Sistem dokumentasi UV gel doc dengan flouoresave meningkatkan akurasi pembacaan hasil dibanding metode konvensional. Implementasi protokol ini direkomendasikan sebagai standar surveilans VNN nasional, dengan potensi pengembangan lebih lanjut menggunakan qPCR atau LAMP untuk deteksi real-time.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada: BPBAP Situbondo atas fasilitas laboratorium dan dukungan teknis selama penelitian. Seluruh staf dan pembimbing yang telah membimbing pelaksanaan penelitian ini. Rekan-rekan kelompok penelitian atas kolaborasi dalam pengumpulan data. Berbagai pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu atas kontribusi dalam penyelesaian studi ini. Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi pengembangan budidaya ikan kerapu berkelanjutan di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Ador, M. A. A., Haque, M. S., Paul, S. I., Chakma, J., Ehsan, R., & Rahman, A. (2021). Potential application of PCR based molecular methods in fish pathogen identification: a review. *Aquaculture Studies*, 22(1).
- Aeni, N., & Diamahesa, W. A. (2024). Evaluation of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Cultivation Techniques at Balai Benih Ikan (BBI) Lingsar, West Nusa Tenggara. *Journal of Fish Health*, 4(1), 1-8.
- Aulia, D., & Diamahesa, W. A. (2024). Manajemen Kualitas Air Pada Pembesaran Kepiting Bakau (*Scylla Sp.*) Sistem Apartemen di Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, Jawa Tengah. *Ganec Swara*, 18(2), 896-902.

- Anggoro, S., Rahmawati, I. Y., & Rudiyaniti, S. (2013). Domestikasi Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) Melalui Optimalisasi Media dan Pakan. *Management of Aquatic Resources Journal (MAQUARES)*, 2(3), 119-127.
- Costa, J. Z., & Thompson, K. D. (2016). Understanding the Interaction Between Betanodavirus and its Host for the Development of prophylactic Measures for Viral Encephalopathy and Retinopathy. *Fish & Shellfish Immunology*, 53, 35-49.
- Fadllan, F., Djuminar, A., Tantan, A., Dermawan, A., & Ernawati, E. (2019). Perbandingan Ekstraksi DNA *Salmonella Typhi* dari Kultur Darah Metode Spin Column dan *Alcohol Based*. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*, 11(2), 232-243.
- Firdausi, S. L. Y. (2021). Manajemen Pendederan Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) pada Bak Beton di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Kabupaten Situbondo Propinsi Jawa Timur. *Journal of Marine and Coastal Science*, 10(3), 129-137.
- Fitriatin, E., & Manan, A. (2015). Pemeriksaan *Viral nervous necrosis* (VNN) pada Ikan Dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR) *Viral nervous necrosis* (VNN) Examination at Fish By Polymerase Chain Reaction (PCR) Method. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 7(2).
- Folnuari, S., El-Rahimi, S. A., & Rusydi, I. (2017). Pengaruh Padat Tebar yang Berbeda terhadap Kelangsungan Hidup dan Pertumbuhan Ikan Kerapu Cantang (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) pada Teknologi KJA HDPE. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kelautan Perikanan Unsyiah*, 2(2)310-318.
- Hazreen-Nita, M., Azila, A., Mukai, Y., Firdaus-Nawi, M., & Nur-Nazifah, M. (2019). A review of betanodavirus vaccination as preventive strategy to viral nervous necrosis (VNN) disease in grouper. *Aquaculture International*, 27(5), 1565-1577.
- Juniar, E., Kurniasih, K., & Sumiarto, B. (2018). Risk factors of a viral nervous necrosis disease in grouper (*Epinephelus* spp.) cultured in Bintan district, Indonesia. *Veterinary world*, 11(11), 1558.
- Kurniawati, M. D., Sumaryam, S., & Hayati, I. N. (2019). Aplikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Konvensional dan Real Time-PCR untuk Deteksi Virus VNN (*Viral Nervous Necrosis*) pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Techno-Fish*, 3(1), 19-30.
- Maudina, F., & Diamahesa, W. A. (2023). Evaluation of Milkfish (*Chanos chanos*) Breeding Activities at the Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. *Journal of Fish Health*, 3(2), 52-59.
- Naufal, A., Kusdiyantini, E., & Raharjo, B. (2017). Identifikasi Jenis Pigmen Dan Uji Potensi Antioksidan Ekstrak Pigmen Bakteri *Serratia marcescens* Hasil Isolasi Dari Sedimen Sumber Air Panas Gedong Songo. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 19(2), 95-103.
- Nisa, H., Diamahesa, W. A., & Lestari, D. P. (2024). Optimizing The Utilization of Arabica Coffe Grounds Extract on the Growth Performance of Tilapia (*Oreochromis Niloticus*). *Jurnal Biologi Tropis*, 24(4), 703-711.
- Nugraha, F., Roslim, D. I., & Ardilla, Y. P. (2014). Analisis Sebagian Sekuen Gen Ferritin2 pada Padi (*Oryza sativa* L.) Indragiri Hilir, Riau. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 6(2), 70-79.
- Panzarin, V., Patarnello, P., Mori, A., Rampazzo, E., Cappellozza, E., Bovo, G., & Cattoli, G. (2010). Development and validation of a real-time TaqMan PCR

- assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Archives of virology*, 155, 1193-1203.
- Shetty, M., Maiti, B., Shivakumar Santhosh, K., Venugopal, M. N., & Karunasagar, I. (2012). Betanodavirus of marine and freshwater fish: distribution, genomic organization, diagnosis and control measures. *Indian Journal of Virology*, 23, 114-123.
- Sah Putra, B., Hick, P. M., Hall, E., Whittington, R. J., Khairul, R., Evarianti, ... & Becker, J. A. (2020). Prevalence of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), nervous necrosis virus (NNV) and ectoparasites in juvenile *Epinephelus* spp. farmed in Aceh, Indonesia. *Pathogens*, 9(7), 578.
- Setyadi, P. S., & Shafira, J. (2021). Perancangan Multi Speed Centrifuge Sebagai Alat Pemisah Cairan. In *Prosiding Seminar Nasional Pengabdian Kepada Masyarakat*, 1(2), 1-12.
- Tridjoko, T., Slamet, B., Makatutu, D., & Sugama, K. (2017). Pengamatan Pemijahan dan Perkembangan Telur Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) Pada Bak Secara Terkontrol. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 2(2), 55-62.
- Yusrin, Y., & Diamahesa, W. A. (2024). Teknik Pembenihan Ikan Lele (*Clarias Gariepinus*) Di Instalasi Balai Benih Ikan Lingsar. *Ganec Swara*, 18(2), 917-924.