

AMPLIFIKASI RT-PCR NODAVIRUS DARI  
STOK IKAN LAUT  
MALAYSIA

CHARLIE FREDRICK

PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH  
DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI  
SEBAHAGIAN DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA  
MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN

PROGRAM BIOTEKNOLOGI  
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

APRIL 2007



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@**

JUDUL: AMPLIFIKASI RT-PCR NODAVIRUS DARI STOK IKAN LAUT MALAYSIA

Ijazah: SARJANA MUDA - SAINS DENGAN KEPUJIAN

SESI PENGAJIAN: 2004

Saya CHARLIE FREDRICK  
(HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)\* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. \*\*Sila tandakan ( / )

**PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

- SULIT
- TERHAD
- TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

*Charlie Fredrick*  
(TANDATANGAN PENULIS)

*Dr. Roziah Haji Kambol*  
(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

DR. ROZIAH HAJI KAMBOL  
Nama Penyelia

Alamat Tetap: BLOK 26, LOT 225, LORONG 2, TAMAN AIRPORT, BATU 7, JALAN AIRPORT, 90000 SANDAKAN, SABAH

Tarikh: 20 APRIL 2007

Tarikh: 20 APRIL 2007

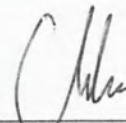
- CATATAN: \* Potong yang tidak berkenaan.  
 \*\* Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.  
 @ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



## PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

20 April 2007



---

CHARLIE FREDRICK

HS2004-3077

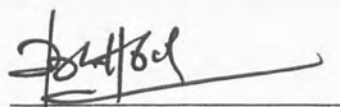
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH



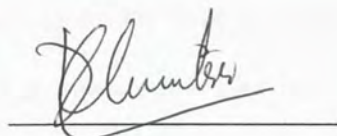
**DIPERAKUI OLEH**

Tandatangan

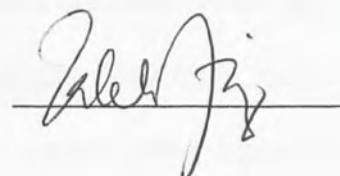
1. PENYELIA

**(DR. ROZIAH HAJI KAMBOL)**

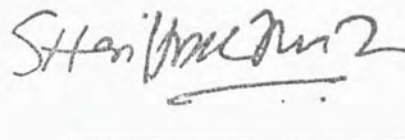
2. PEMERIKSA 1

**(DR. LEE PING CHIN)****PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

3. PEMERIKSA 2

**(DR. ZALEHA ABD AZIZ)**

4. DEKAN

**(SUPT/KS. PROF. MADYA DR.SHARIFF  
A.K. OMANG)**

## PENGHARGAAN

Pertama sekali saya ingin memenjatkan kesyukuran kepada Tuhan kerana dengan berkat limpah kurnianya, saya dapat menyempurnakan disertasi ini. Jutaan terima kasih saya tujukan khas kepada penyelia saya, iaitu Dr. Roziah Hj. Kambol. Tanpa beliau adalah sukar bagi saya untuk menyempurnakan disertasi ini. Dorongan dan bimbingan beliau amatlah saya hargai. Tidak dilupakan juga kepada kakitangan-kakitangan Pusat Penyelidikan Kesihatan Ikan Kebangsaan Pulau Pinang yang telah banyak memberikan tunjuk ajar dalam kerja-kerja di dalam makmal. Saya juga ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada rakan-rakan seperjuangan, yang secara langsung atau tidak langsung telah banyak membantu saya dalam pelbagai aspek. Nasihat serta tunjuk ajar yang diberikan amatlah saya hargai. Akhir sekali, setinggi-tinggi penghargaan saya tujukan khas kepada kedua ibu bapa saya kerana telah banyak memberikan semangat dan dorongan serta bantuan kewangan. Saya ingin meminta maaf sekiranya saya tidak menyertakan nama anda dalam ruangan penghargaan saya ini. Terima kasih.



## ABSTRAK

Kajian ini dilakukan bagi memencilkan RNA dari ikan yang dijangkiti Nodavirus. Pemencilan RNA Nodavirus membolehkan amplifikasi Nodavirus yang menjangkiti ikan laut Malaysia dilakukan melalui kaedah RT-PCR. Sampel spesies ikan dan bahagian organ ikan (ginjal dan hati) yang berlainan digunakan bagi tujuan pengekstrakan dan amplifikasi. Pengekstrakan dan amplifikasi RNA Nodavirus dilakukan menggunakan dua kaedah iaitu *Kit IQ2000 VNN* dan kaedah pengekstrakan TRIZOL diikuti RT-PCR manual. Bagi kaedah penggunaan *Kit IQ2000 VNN*, diagnosis kewujudan jangkitan dibahagikan kepada tiga tahap jangkitan iaitu berat, sederhana dan ringan. Keputusan yang diperolehi menunjukkan tahap atau kewujudan jangkitan VNN adalah sama bagi spesies ikan yang berlainan pada tahap jangkitan ringan pada kesemua bahagian organ. Kaedah pengekstrakan reagen TRIZOL diikuti RT-PCR manual menunjukkan kaedah ini tidak begitu sensitif jika dibandingkan dengan kaedah *Kit IQ2000 VNN* kerana kaedah ini tidak dapat mengesan kewujudan jangkitan yang telah dikenal pasti dalam *Kit IQ2000 VNN*.



## ABSTRACT

This study was carried out to isolate RNA from fish infected by Nodavirus. Isolation of the RNA enables the amplification of Nodavirus that infect marine fish in Malaysia to be done by using RT-PCR method. Different species and organ parts (kidney and liver) are used for extraction and amplification purpose. Extraction and amplification of Nodavirus RNA are carried out by using two method, *IQ2000 VNN Kit* and extraction with TRIZOL followed by manual RT-PCR. In *IQ2000 VNN Kit*, the detection of infection can be divided into three different degree of infection, which is severe, medium and light infection. From the obtained result, different fish species and different parts of fish organ shows same degree or existence of infection, with light degree infection. Compared to *IQ2000 VNN Kit* method, extraction with TRIZOL reagent followed by manual RT-PCR method shows that this method are not sensitive enough because it cant detect the existence of infection that detected in *IQ2000 VNN Kit*.



## KANDUNGAN

	Muka Surat
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI FOTO	xii
SENARAI SIMBOL, UNIT, SINGKATAN, DAN ISTILAH	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	<b>1</b>
1.1 Pengenalan	1
1.2 Objektif	2
<b>BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN</b>	<b>3</b>
2.1 Industri Penternakan Ikan Sangkar Di Malaysia	3
2.2 Jangkitan Virus Pada Ikan	6
2.2.1 Betanodavirus	8
2.2.2 Penyakit Viral Nekrosis Sistem Saraf (VNN)	9
2.3 Teknik Transkripsi Terbalik-Tindak Balas Rantai Polimerase (RT-PCR)	12
2.4 Kit <i>IQ2000VNN Detection and Prevention System</i>	14
<b>BAB 3 METODOLOGI</b>	<b>16</b>
3.1 Pengambilan Sampel Organ Ikan	16
3.2 Pengekstrakan RNA	21
3.2.1 Pengekstrakan RNA Menggunakan Kit <i>IQ 2000<sup>TM</sup> VNN Detection and Prevention System</i> .	23





3.2.2 Pengekstrakan RNA Menggunakan Kaedah TRIZOL, Invitrogen Life Technology.	26
3.3 Tindak Balas RT-PCR (Kit <i>IQ 2000<sup>TM</sup> VNN Detection and Preventio System</i> ).	29
3.4 Tindak Balas RT-PCR Kaedah Manual	32
3.5 Gel Elektroforesis	34
<b>BAB 4 KEPUTUSAN</b>	40
4.1 Keputusan RT-PCR dari Kaedah Kit IQ 2000 VNN.	42
4.2 Keputusan RT-PCR Dari Kaedah 2-Reagen TRIZOL dan Amplifikasi RT-PCR secara manual	46
4.3 Keputusan RT-PCR Berdasarkan Spesies Ikan yang Sama Tetapi Organ yang Berlainan.	48
4.4 Keputusan RT-PCR dari Spesies Ikan dari Lokasi Berbeza.	50
4.4.1 Jangkitan Secara Semulajadi	51
<b>BAB 5 PERBINCANGAN</b>	53
5.1 Keputusan RT-PCR dari Penggunaan <i>Kit IQ2000 VNN Detection and Prevention System</i>	53
5.2 Keputusan Pengekstrakan RNA dari kit TRIZOL dan RT-PCR manual.	54
5.3 Penggunaan Kit <i>IQ2000<sup>TM</sup> VNN Detection and Prevention System</i> .	55
5.4 Penggunaan Kaedah Pengekstrakan RNA dari TRIZOL dan RT- PCR manual.	56
5.5 Langkah Berjaga-jaga	58
<b>BAB 6 KESIMPULAN</b>	61
RUJUKAN	62
LAMPIRAN	66



## SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
2.1 Pengeluaran ikan dari industri akuakultur marin.	4
2.2 Penternak ikan sangkar mengikut daerah di Sabah pada tahun 1998	6
2.3 Spesies ikan marin di Malaysia yang kerap diternak oleh pengusaha ternakan ikan.	7
3.1 Komponen Sistem Kit <i>IQ 2000<sup>TM</sup> VNN Detection and Prevention System</i> ).	22
3.2 Campuran reagen untuk tindak balas RT-PCR dalam Kit <i>IQ 2000<sup>TM</sup> VNN Detection and Prevention System</i> .	30
3.3 Campuran reagen untuk tindak balas <i>nested</i> PCR dalam Kit <i>IQ 2000<sup>TM</sup> VNN Detection and Prevention System</i> .	30
3.4 Program suhu dan masa bagi tindak RT-PCR dalam Kit <i>IQ 2000<sup>TM</sup> VNN Detection and Prevention System</i> .	31
3.5 Program suhu dan masa bagi tindak <i>nested</i> PCR dalam Kit <i>IQ 2000<sup>TM</sup> VNN Detection and Prevention System</i> .	31
3.6 Campuran reagen untuk tindak balas RT-PCR kaedah manual.	33
3.7 Program suhu dan masa bagi tindak RT-PCR (tanpa penggunaan kit khas).	34
3.8 Isipadu sampel, pemuat turun pewarna ( <i>loading dye</i> ) dan penanda untuk telaga gel.	35
4.1 Ringkasan sampel ikan yang digunakan serta kawasan atau sumber ikan diperolehi.	41
4.2 Ringkasan Keputusan bagi Tahap Jangkitan VNN pada spesies ikan yang berbeza.	46



4.3 Ringkasan keputusan bagi tahap jangkitan VNN pada organ berlainan bagi spesies ikan yang sama.	50
--	----



## SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
2.1 Kawasan ternakan ikan sangkar dan yang berpotensi untuk dimajukan (Sumber daripada Laman web Jabatan Perikanan Sabah).	5
2.2 Anak-anak ikan yang dijangkiti <i>Betanodavirus</i> .	11
3.1 Anatomi luaran seekor ikan secara umumnya.	19
3.2 Anatomi dalaman seekor ikan secara umumnya.	19
3.3 Rajah rujukan gel bagi diagnosis terhadap jangkitan VNN.	36
4.1 Keputusan elektroforesis gel agaros bahagian organ ginjal ikan	43
4.2 Keputusan elektroforesis gel agaros bahagian organ hati ikan	44
4.3 Keputusan elektroforesis gel agaros bahagian organ otak ikan menggunakan reagen TRIZOL dan amplifikasi RT-PCR secara manual.	47
4.4 Keputusan elektroforesis gel agaros bagi dua organ ikan yang berbeza.	49
4.5 Keputusan elektroforesis gel agaros dari otak ikan Kerapu Botol yang diperolehi dari penternakan ikan sangkar dari Ban Merbuk (Sungai Petani, Kedah).	51



**SENARAI FOTO**

No. Foto	Muka Surat
3.1 Ikan Jenahak ( <i>Lutjanus johni</i> ).	16
3.2 Ikan Kerapu Botol ( <i>Epinephelus sexfasciatus</i> ).	17
3.3 Ikan Kerapu Pinang ( <i>Epinephelus coiodes</i> ).	17
3.4 Ikan Siakap ( <i>Lates calcarifer</i> ).	18
3.5 Langkah-langkah membuka bahagian perut ikan.	20
3.6 Cecair Pengekstrakan RNA (RNA Extraction Solution).	24



## SENARAI SIMBOL, UNIT, SINGKATAN, DAN ISTILAH

### Senarai Simbol dan Unit

/	Solidus
km	Kilometer
cm	Sentimeter
g	Gram
kg	Kilogram
RM	Ringgit Malaysia
m <sup>2</sup>	Meter persegi
nm	Nanometer
kDa	Kilo Dalton
°C	Suhu (darjah Celsius)
™	Lambang atau Jenama (“Trademark”)
%	Peratus
r.p.m	Putaran per minit
Abs	Serapan (Absorbance)
μl	Mikroliter
ml	Milimeter
V	Volt
μM	Mikromolar
bp	Pasangan bes



## Singkatan dan istilah perkataan

RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic acid</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
VNN	<i>Viral Nervous Necrosis</i>
VER	<i>Viral Encephalopathy and Retinopathy</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
dNTPs	<i>Deoxynucleotides phosphates</i>
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
TAE	<i>Tris Acetate EDTA</i>
EtBr	<i>Ethidium Bromide</i>
MMLV	<i>Moloney Murine leukemia virus</i>
ddH <sub>2</sub> O	<i>Double Distilled Water</i>



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Pengenalan

Nodavirus adalah famili virus yang mempunyai saiz yang kecil dengan diameter 30 nm, tanpa sampul virion dan mempunyai bentuk isohedron. Nodavirus mempunyai dua genus iaitu *Alphanodavirus* dan *Betanodavirus*. *Betanodavirus* mempunyai saiz genom yang kecil. Jujukan genom ini dapat dibahagikan kepada RNA 1 (3100 nukleotida) dan RNA 2 (1400 nukleotida). Ini menjadikan jumlah panjang genom nodavirus adalah 4500 nukleotida (jumlah panjang genom tanpa subgenom RNA 1, iaitu RNA3). RNA3 (389 nukleotida) adalah subgenom kepada RNA1 yang disintesis ketika replikasi RNA 1, semasa proses replikasi *Betanodavirus* di dalam perumah.

Jangkitan *Betanodavirus* yang biasanya berlaku pada anak-anak ikan akan menunjukkan beberapa simptom baik dari segi luaran mahupun dalaman pada ikan. Dari segi luaran, simptom seperti postur, serta perut yang abnormal akan menyebabkan cara berenang ikan yang tidak seimbang. Ikan yang dijangkiti juga akan mengalami pigmentasi atau penghitaman pada kulit. Dari segi dalaman, hati pada ikan yang dijangkiti biasanya akan menjadi pucat. Sistem usus pula biasanya akan





mengandungi cecair berwarna kehijauan atau coklat. Jangkitan yang merebak kepada otak dan retina juga akan menyebabkan ikan juvenil terapung di permukaan air dalam bentuk melengkung dan sesetengahnya dengan kepala menghala ke arah dasar air.

Bagi ujian pengenalpastian mahupun kajian yang mendalam terhadap jangkitan, kaedah RT-PCR (Transkripsi terbalik-Tindak balas rantai polimerase) biasanya digunakan kerana sensitiviti serta kekuatan teknik molekular ini. Teknik RT-PCR digunakan kerana sampel yang digunakan adalah dalam bentuk RNA, dan bukannya dalam bentuk asid deoksiribonukleik, DNA. Melalui teknik RT-PCR, amplikasi sampel RNA virus akan dilakukan dengan primer spesifik tertentu. Salinan jujukan gen dalam bentuk DNA komplementari, cDNA akan dihasilkan dan seterusnya kajian atau diagnosis yang mendalam boleh dilakukan.

## 1.2 Objektif Kajian

Dalam kajian ilmiah ini, beberapa objektif utama yang ingin disempurnakan adalah seperti berikut:

1. Memencilkan RNA dari ikan yang dijangkiti Nodavirus.
2. Amplifikasi Nodavirus yang menjangkiti ikan laut Malaysia melalui kaedah RT-PCR.



## BAB 2

### ULASAN LITERATUR

#### 2.1 Industri Penternakan Ikan Sangkar Di Malaysia

Ikan merupakan satu daripada sumber makanan dan protein yang penting bagi manusia. Projek ternakan ikan mendatangkan keuntungan yang besar bagi pengusaha ternakan ikan. Mengusahakan ternakan ikan bukanlah suatu kerja yang boleh dianggap remeh atau mudah. Pelbagai aspek perlu diberi perhatian terutamanya kesihatan ikan. Masalah yang kerap dihadapi adalah jangkitan bakteria dan juga virus.

Malaysia dengan iklim lembap sepanjang tahun mempunyai jumlah panjang pesisir pantai 4800 km. Iklim ini merupakan suatu kelebihan kepada perkembangan industri perikanan di Malaysia. Ikan merupakan sumber protein yang murah bagi penduduk tempatan dan purata pengambilan ikan dijangka akan meningkat dari 53 kg per kapita pada tahun 2005, kepada 56 kg per kapita pada tahun 2010 (Othman, 2006).

Sekitar tahun 1970-an, ternakan ikan sangkar di Malaysia telah dimulakan di Pulau Pinang. Berdasarkan statistik pengeluaran ikan dari industri akuakultur marin di Malaysia (Jadual 2.1), permintaan terhadap ikan marin adalah tinggi serta nilai pulangnya adalah lumayan. Pengeluaran yang mencecah ratusan ribu tan metrik



setahun mampu menjana pulangan ratusan juta ringgit. Pada tahun 2001 sahaja, pengeluaran ikan marin sebanyak 133,562 tan metrik telah menjana pulangan melebihi 950 juta ringgit.

**Jadual 2.1:** Pengeluaran Ikan dari industri akuakultur marin

Tahun	Jumlah (Tan metrik)	Nilai (RM juta)
2000	117,205.56	665.34
2001	133562.79	958.01
2002	145439.81	843.49
2003	146926.82	931.09
2004	146688.04	903.38

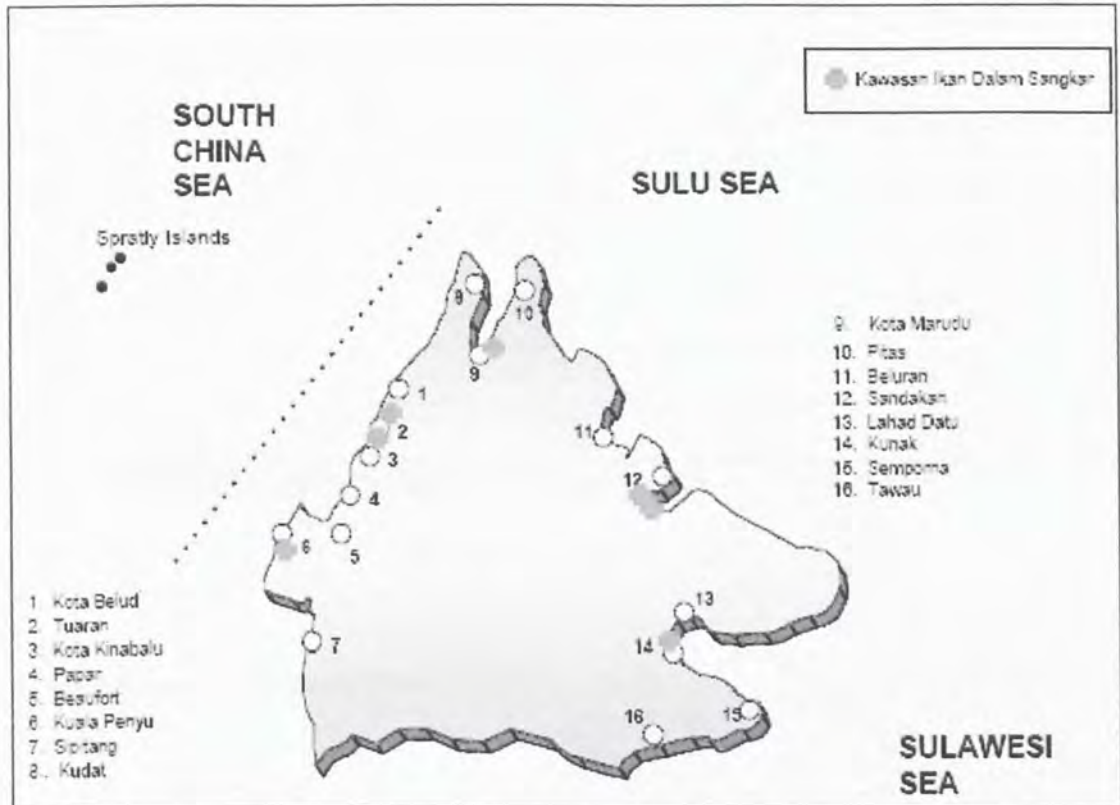
Sumber: (Mohd Fariduddin Othman, 2006)

Industri ternakan ikan sangkar di Malaysia melibatkan proses pemeliharaan ikan dari peringkat juvenil hinggalah ke ukuran pasaran di dalam satu isipadu air yang terkurung di semua permukaannya dengan jaring kasar, tetapi membenarkan aliran air melalui sangkar tersebut. Aktiviti ternakan ikan sangkar telah menyumbang kepada sumber pendapatan nelayan mahupun penternak meskipun dijalankan sebagai kegiatan sampingan. Pengeluaran ikan sangkar dapat membantu memenuhi keperluan pasaran tempatan dan juga permintaan bagi tujuan eksport.

Sabah dengan anggaran laut sebanyak 92000 batu nautika persegi, serta panjang garis pantai 1802 km berpotensi berkembang lebih maju dalam sektor industri perikanan ikan sangkar. Sejarah awal ternakan ikan sangkar di Sabah bermula pada tahun 1970 di Teluk Mengkabong. Usaha awal ini telah dilaksanakan oleh Jabatan Perikanan dan faktor seperti dasar laut yang berbatu karang, berpasir, berlumpur, terlindung dari ombak dengan terdapatnya beberapa buah pulau, kualiti air yang baik



merupakan beberapa faktor penyumbang dalam memajukan industri ternakan ikan sangkar. Berdasarkan Rajah 2.1, Sabah mempunyai potensi yang tinggi untuk ternakan ikan sangkar.



**Rajah 2.1:** Kawasan ternakan ikan sangkar dan yang berpotensi untuk dimajukan  
(Sumber daripada Laman web Jabatan Perikanan Sabah).

Daripada laporan sumber Jabatan Perikanan Sabah, tumpuan industri ikan sangkar lebih giat diusahakan di kawasan pantai Barat Sabah seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 2.2.

**Jadual 2.2:** Penternak ikan sangkar mengikut daerah di Sabah pada tahun 1998

Daerah	Bilangan penternak (orang)	Keluasan (m <sup>2</sup> )
Tuaran	51	130,836.72
Kota Kinabalu	6	21,644.76
Sandakan	111	283,610.24
Kuala Penyu	35	34,436.19
Kota Belud	12	5,621.09
Kudat	23	12,296.10
Lahad Datu	29	23,852.16
Semporna	8	8,275.26
Tawau	3	1,522.56
Jumlah	278	522,095.08

Sumber : Laman web Jabatan Perikanan Sabah

## 2.2 Jangkitan Virus Pada Ikan

Pada masa ini, pelbagai jenis penyakit ikan yang disebabkan virus telah dikenal pasti menyebabkan kematian pada ikan baik sama ada peringkat juvenil ataupun dewasa. Jangkitan virus juga menyebabkan keabnormalan pada ikan sama ada dari segi morfologi ataupun fisiologi. Pengenalpastian penyakit ikan yang disebabkan oleh virus boleh dibuat dengan pelbagai teknik diagnosis. Oleh sebab itu pelbagai kajian yang lebih meluas mengenai ciri-ciri virus serta teknik diagnosis dibuat bagi memastikan langkah membendung penularan virus boleh diambil.

Jadual 2.3 menunjukkan jenis ikan marin di Malaysia yang kerap ditenak oleh pengusaha ternakan ikan (Othman, 2006). Dari jadual ini, spesies ikan dari *Sea Bass*

(spesies ikan Siakap) dan *Grouper* (spesies ikan Kerapu) berpotensi diancam penyakit Viral Nekrosis Sistem Saraf (VNN) secara besar-besaran. Di negara jiran kita sendiri iaitu Filipina, kes Penyakit Viral Nekrosis Sistem Saraf telah dilaporkan seawal tahun 1991 lagi, namun kerana kaedah diagnosis masih belum membangun, ia tidak dapat dikenal pasti pada ketika itu (Maeno *et al.*, 2004).

**Jadual 2.3:** Spesies ikan marin di Malaysia yang kerap diternak oleh pengusaha ternakan ikan.

Nama umum kumpulan ikan ( <i>English Name</i> )	Nama saintifik ikan	Nama tempatan
1. <i>Sea Bass</i>	- <i>Lates calcarifer</i>	- Siakap
2. <i>Snapper</i>	- <i>Lutjanus lemniscatus</i> - <i>Lutjanus argentimaculatus</i> - <i>Lutjanus johni</i> - <i>Lutjanus erythropterus</i>	- Merah - Kakap Merah/Tambong - Jenahak - Merah pucat
3. <i>Grouper</i>	- <i>Epinephelus coiodes</i> - <i>Epinephelus malabaricus</i> - <i>Epinephelus sexfasciatus</i> - <i>Epinephelus fuscoguttatus</i> - <i>Epinephelus leopardus</i> - <i>Cromileptes altivelis</i>	- Kerapu Pinang - Kerapu - Kerapu/Kerapu Botol - Kerapu Harimau - Kerapu Merah/Kerapu Pisang/Kerapu Sunuh - Kerapu Tikus
4. <i>Threadfin</i>	- <i>Eleutheronema tetradactylum</i>	- Senangin
5. <i>Cobia</i>	- <i>Rachycentron canadum</i>	- Aruan
6. <i>Pompano</i>	- <i>Trachinotus blochii</i>	- Bawal emas

### 2.2.1 Betanodavirus

Famili Nodavirus boleh dibahagikan kepada dua genus iaitu *Alphanodavirus* dan *Betanodavirus*. Genus *Alphanodavirus* menjangkiti serangga, manakala genus *Betanodavirus* pula menjangkiti ikan. Secara umumnya Nodavirus adalah famili virus yang agak kecil saiznya dengan diameter 30 nm, tanpa sampul virion serta mempunyai bentuk isohedron. Nodavirus mempunyai saiz genom yang kecil. Jumlah panjang genom nodavirus adalah 4500 nukleotida (Dalla Valle et al., 2005).

Virion bagi Nodavirus secara umumnya mempunyai dua segmen daripada satu rantai RNA positif yang linear. (Gomez et al., 2004) Dalam segmen rantai RNA Nodavirus, RNA 1 mempunyai segmen yang terpanjang dengan 3100 nukleotida panjang. Ini diikuti dengan RNA 2, 1400 nukleotida panjang dan akhir sekali adalah RNA 3 dengan panjang segmen 389 nukleotida. Setiap segmen mempunyai fungsinya yang tersendiri dalam satu segmen rantai linear RNA positif genom Nodavirus. RNA 3 adalah subgenom daripada RNA 1. RNA 1 memainkan peranan penting dalam mengkodkan protein A (116 kDa) yang merupakan bahagian viral bagi polymerase RNA yang bergantung kepada RNA atau replikasi (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) yang memainkan peranan penting dalam replikasi genom virus ini (Johansen, 2004). RNA 2 pula mengkodkan protein 'coat'. RNA 3 yang disintesisikan oleh RNA 1 memainkan peranan dalam pembentukan kapsid dan replikasi RNA Nodavirus. RNA 3 yang mengkodkan protein B, memainkan peranan dalam mensintesisikan bebenang positif RNA. RNA 3 tidak disintesisikan di dalam virus tetapi ia hanya akan disintesisikan ketika replikasi RNA1, semasa proses replikasi RNA dalam perumah.



Secara umumnya *betanodavirus* mempunyai empat kumpulan utama iaitu *Striped jack nervous necrosis virus* (SJNNV), *Tiger puffer nervous necrosis virus* (TPNNV), *Barfin flounder nervous necrosis virus* (BFNNV) dan *Redspotted grouper nervous necrosis virus* (RGNNV) (Nishizawa et al., 1997).

Namun meskipun pengklasifikasian ini diterima pakai, kajian mengenai Nodavirus masih lagi dilakukan. Penemuan terbaru virus dalam udang gergasi yang menyebabkan penyakit keputihan pada ekor udang gergasi menimbulkan banyak persoalan kerana ujian serologi mengesahkan virus ini berbeza daripada *alphanodavirus* dan *betanodavirus*, meskipun cirinya menyerupai virus Nodavirus (Johansen, 2004). Kajian mengenai *Betanodavirus* masih lagi diperluaskan dan masih terdapat banyak jangkitan pada spesies ikan yang belum diberikan nama atau diklasifikasikan dengan spesifik (Thiéry et al., 2004).

### 2.2.2 Penyakit Viral Nekrosis Sistem Saraf (VNN)

*Betanodavirus* merupakan penyebab kepada penyakit viral nervous necrosis (VNN), atau dengan kata lain penyakit viral nekrosis sistem saraf. Penyakit ini juga lebih dikenali dengan viral encephalopati dan retinopati (VER). Daripada laporan mesyuarat ke lima *Asia Regional Advisory Group On Aquatic Animal Health*, yang berlangsung pada 22 hingga 24 November 2006 di Bangkok, penyakit VNN merupakan salah satu penyakit ikan utama yang telah dikenal pasti penting dan patut diberi perhatian serius berdasarkan kekerapan kes yang berlaku daripada laporan *Quarterly Aquatic Animal Disease Report (Asia-Pacific Region)*. Laporan *Quarterly Aquatic Animal Disease Report* diterbitkan bersama oleh *Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific*





## RUJUKAN

- Athanassopoulou, F., V. Ragiassa dan D. Tontisb, 2004. *Incidence of an intense Caligus minimus Otto 1821, C. pageti Russel, 1925, C. mugilis Brian, 1935 and C. apodus Brian, 1924 infection in lagoon cultured sea bass (Dicentrarchus labrax L.) in Greece*. *Akuakultur*, volume 242, 727-733.
- Breuil, G., Mouchel, O., Fauvel, C. dan Pepin, J.F., 2001. *Sea bass Dicentrarchus labrax nervous necrosis virus isolates with distinct pathogenicity to sea bass larvae*. *Disease Of Aquatic Organisms*, volum 45, 25– 31.
- Dalla Valle, L., V. Toffolo, M. Lampreht, C. Maltese, G. Bovo, P. Belvedere, L.Colombo, 2005. *Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real time-PCR*. *Veterinary Microbiology*, volum 110, 167-179.
- Dannevig, B. H., R. Nilsen, I. Modahl, M. Jankowska, T. Taksdal, C. McL. Press<sup>2</sup>, 2000. *Isolation in cell culture of nodavirus from farmed Atlantic halibut Hippoglossus hippoglossus in Norwa.y*. *Disease Of Aquatic Organisms*, volum 43, 183–189.



- David, C.S, 2005. *Freshwater Microbiology*. John Wiley and Son Ltd. England 339-345.
- Gomez, D. K., Sato J., Mushiake, K., Isshiki, T., Okinaka, O. dan Nakai, T. 2004. *PCR-based detection of betanodavirus from cultured and wild marine fish with no clinical signs*. Journal of Fish Disease. volum 27, 603-608.
- Hegde, A., Chen, C. L., Qin, Q. W., Lam, T. J. dan Sin, Y. M. 2002. *Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina*, in Singapore*. Aquaculture, Volum 213, 55-72.
- Hoadley, M. E., dan Hopkins, S. J. 2006. *Comparison of 'real-time' and immunometric RT-PCR: RNA interference of reverse transcriptase-PCR*. Journal of Immunological Methods. 40-44.
- Johansen, R., T. Ranheim, M. K. Hansen, T. Taksdal, dan G. K. Totland, 2002. *Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodaviru*. Disease Of Aquatic Organisms, volum 50, 161-169.
- Johansen, R., 2004. *Nodavirus infection of farmed marine fish with emphasis on subclinical and persistent infection*. Thesis for the Degree of Doctor Medicinæ Veterinaria Norwegian School of Veterinary Science. Oslo



- Kabata, Z., 1991. Parasit dan Penyakit Ikan Yang Diternak Di Kawasan Tropika. Dewan Bahasa dan Pustaka. Kuala Lumpur. 91-96
- Kendall, L.V., dan Lela K.Riley, 2000. *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*, American Association for Laboratory Animal Science, volum 49, 42.
- Maeno, Y., de la Pena, L. D. dan Cruz-Lacierda, E. R. 2004. *Mass Mortalities Associated with Viral Nervous Necrosis in Hatcheries-Reared Sea Bass *Lateolabrax calcarifer* in the Philipines*. JARQ, volum 38, 69-73.
- Fariduddin Mohd. Othman,, 2006. *Recent Report on Coastal/Marine Aquaculture Status in Malaysia*. Senior Research Officer Department Of Fisheries In Malaysia.
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai T. dan Muroga, K. 1997. *Genomic Classification of Fish Nodaviruses by Molecular Phylogenetic Analysis of the Coat Protein Gene*. Applied and Enviromental Microbiology, volum 63(4), 1633-1636.
- Sambrook, J., dan Russell, D.W. 2001 .*Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Edisi 3, Amerika Syarikat. ms 7.4-7.75



Starkey, W. G., J. H. Ireland, K. F. Muir, M. E. Jenkins, W. J. Roy, R. H. Richards H. W. Ferguson, 2001. *Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK*, Verteinary Record, volum 149, 179-181.

Thiery, R., Raymond, J. C., dan Castric, J. 1999. *Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, Dicentrarchus labrax: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Virus Research, volum 63, 11-17.

Thiery R., Cozien, J., de Boissésou, C., Kerbart-Boscher, S., dan Névarez, L., 2004. *Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity*. volum 85, 3079-3087.

Jabatan Perikanan Sabah, 2000, *Status Perkembangan Ternakan Ikan Dalam Sangkar Di Sabah*. <http://www.fishdept.sabah.gov.my/>

European Bioinformatics Institute, 2006. *Sequence Analysis*. <http://www.ebi.ac.uk/clustalW/>

*Farming Intelligence Technology Corporation; Your Partner for Viral Detection and Prevention*. 2006. <http://www.iq2000kit.com/VNN.htm>

