

## PENENTUAN KONSENTRASI MINIMAL DNA UNTUK MENDETEKSI KOI HERPES VIRUS (KHV) DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

Diah Artati

Balai Penelitian Pemuliaan Ikan, Sukamandi

### ABSTRAK

Koi herpes virus (KHV) adalah virus yang menginfeksi ikan mas dan koi yang dapat menyebabkan kematian massal. Kerugian ekonomi yang diakibatkan kematian massal ikan dapat dihindari apabila serangan KHV dapat dideteksi sedini mungkin. Metode deteksi KHV dilakukan dengan mengikuti prosedur yang tertuang dalam SNI 7547:2009. Salah satu metode deteksi cepat koi herpes virus adalah dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Keberhasilan analisis PCR sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya adalah karakteristik DNA genom yang meliputi kemurnian, konsentrasi, dan ukuran *template*. Konsentrasi dan kualitas DNA dipengaruhi oleh keberhasilan pada saat melakukan ekstraksi DNA. Kegiatan percobaan ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi minimal yang masih terdeteksi dengan metode PCR. Pengukuran konsentrasi minimal dilakukan dengan menguji sampel DNA genom yang konsentrasinya diencerkan secara bertingkat, mulai dari  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  sampai dengan  $10^{-5}$ . Hasil analisis PCR menunjukkan konsentrasi DNA minimal yang masih dapat mendeteksi virus KHV adalah  $10^{-3}$  (0,15 µg/mL).

**KATA KUNCI:** KHV, konsentrasi DNA, PCR

### PENDAHULUAN

Koi herpes virus (KHV) merupakan nama virus yang menyebabkan penyakit koi herpes. Penyakit ini menyerang ikan koi dan ikan mas, bersifat akut, dan ganas, serta dapat menyebabkan kematian secara massal dalam waktu yang relatif singkat. Penyebaran KHV di Asia antara lain: menyerang ikan mas dan koi pada tahun 2002 di Indonesia, awal tahun 2003 di Taiwan dan terakhir di Jepang pada akhir tahun 2003 (Haenen, 2003). Di Indonesia, KHV menyerang ikan mas dan koi pertama kali di Blitar pada bulan Maret 2002, terus menyebar ke Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Bali pada bulan April 2002. Pada bulan Februari 2003, penyakit ini menyebar ke Pulau Sumatera. Pada bulan September 2004 penyakit ini mewabah di Kalimantan. Tahun 2005, KHV menyerang ikan mas di Danau Toba (Sunarto *et al.*, 2002). Penyebaran KHV yang semakin meluas ini akibat adanya pengiriman ikan antar daerah/pulau yang sudah terjangkit KHV.

Menurut Hendrick *et al.* (2000), penyakit KHV menyebabkan kematian yang besar dan

bersifat sporadis pada ikan mas dan koi. Suhu optimal virus KHV yang menyebabkan kematian adalah 18°C–27°C. Kematian ikan akan menurun bahkan berhenti bila suhu air berada di atas atau di bawah kisaran optimal. Serangan penyakit ini menunjukkan kematian yang sangat cepat, dengan gejala klinis antara lain pendarahan pada insang, bercak pucat pada insang, mata cekung, dan ikan gelisah (kadang tidak aktif berubah menjadi sangat aktif atau sebaliknya) (OATA, 2001) dan akhirnya mati dalam waktu 24–48 jam.

Salah satu cara yang dapat digunakan untuk deteksi KHV adalah dengan teknik PCR, untuk uji positif terhadap adanya virus melalui reaksi berantai suatu primer dari sekuens DNA dengan bantuan enzim polimerase, sehingga terjadi amplifikasi DNA target secara *in vitro*. Keunggulan metode PCR adalah mempunyai kemampuan dalam melipatgandakan suatu fragmen DNA, sehingga kontaminasi fragmen DNA dalam jumlah sangat sedikit sekalipun dapat menyebabkan terjadinya kesalahan yaitu dengan didapatkannya produk amplifikasi yang tidak diinginkan atau bahkan tidak

spesifik. Salah satu hal yang menentukan keberhasilan PCR adalah konsentrasi dan kualitas DNA. Tujuan percobaan ini adalah untuk mengetahui konsentrasi minimal KHV yang masih terdeteksi menggunakan metode PCR. Dengan menggunakan PCR maka dapat mendeteksi infeksi pada tahap yang paling dini atau awal. Sehingga bisa sesegera mungkin diambil tindakan pencegahan agar penyakit tidak semakin parah dan kerugian bisa ditekan seminim mungkin.

## METODOLOGI

### Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Genomic DNA Isolation Reagent (DNAzol) dari invitrogen. Sampel sebanyak 25-50 mg ditambahkan 1.000  $\mu$ L larutan DNAzol, kemudian dihancurkan menggunakan *pestle*. Setelah hancur, larutan disentrifuse pada kecepatan 10.000 x g selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil sebanyak 700  $\mu$ L dan dipindahkan dalam mikrotube baru. Alkohol absolut sebanyak 500  $\mu$ L dicampurkan ke dalam larutan. Sampel diinkubasi pada suhu 25°C-30°C selama 3 menit, kemudian disentrifuse 5.000 x g selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang, sedangkan pelet yang terbentuk dicuci dengan menambahkan 1.000  $\mu$ L alkohol 75%. Setelah itu, sampel disentrifuse 7.000 rpm selama 1-2 menit, kemudian alkohol dibuang dan sampel dikeringkan selama 5-15 detik. Langkah pencucian tersebut diulang sebanyak 2 kali. DNA segera dilarutkan menggunakan campuran 8 mM NaOH dan HEPES sebanyak 200  $\mu$ L.

### Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Konsentrasi dan kemurnian DNA diukur secara spektrofotometer dengan menggunakan *GeneQuant DNA calculator*. Pengukurannya dilakukan dengan *Dilution factor* 40 dan total volume reaksi 80  $\mu$ L. Dari hasil pengukuran didapatkan hasil konsentrasi sebesar 150  $\mu$ g/mL dengan kemurnian 1,8.

### Pengenceran

Dilakukan pengenceran bertahap mulai dari  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  sampai dengan  $10^{-5}$ . Untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-1}$  (15  $\mu$ g/mL) dilakukan dengan cara menambahkan 10

$\mu$ L genom dari konsentrasi awal (150  $\mu$ g/mL) dengan 90  $\mu$ L *Nuclease Free Water*. Selanjutnya, untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$  (1,5  $\mu$ g/mL) dilakukan dengan cara menambahkan 10  $\mu$ L genom dari hasil pengenceran  $10^{-1}$  (15  $\mu$ g/mL) dengan 90  $\mu$ L *Nuclease Free Water*, begitu seterusnya sampai didapatkan pengenceran  $10^{-5}$ .

### Proses PCR

PCR dilakukan dengan mengikuti prosedur deteksi KHV SNI 7547:2009. Amplifikasi DNA dilakukan dalam volume 25  $\mu$ L yang berisi *Maxima Hot start Green-Fermentas* sebanyak 8,5  $\mu$ L; 12,5  $\mu$ L  $H_2O$ , 1  $\mu$ L Primer SPHL-5 R:5',GACACATGTTACAATGGTCGC-3, 1  $\mu$ L Primer SPHL-5 F:5'GACACCACATCTGCAAGGAG-3 dan 2  $\mu$ L DNA *Template*. Tahap amplifikasi meliputi proses, *initial PCR activation step* pada suhu 95°C selama 5 menit. Tahapan selanjutnya untuk setiap siklus terdiri atas denaturasi selama 30 detik pada suhu 94°C, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik dan *extension* pada suhu 72°C selama 30 detik. Jumlah siklus yang diperlukan adalah 40 siklus. *Extended extension* selama 7 menit pada suhu 72°C merupakan tahap akhir dari proses PCR.

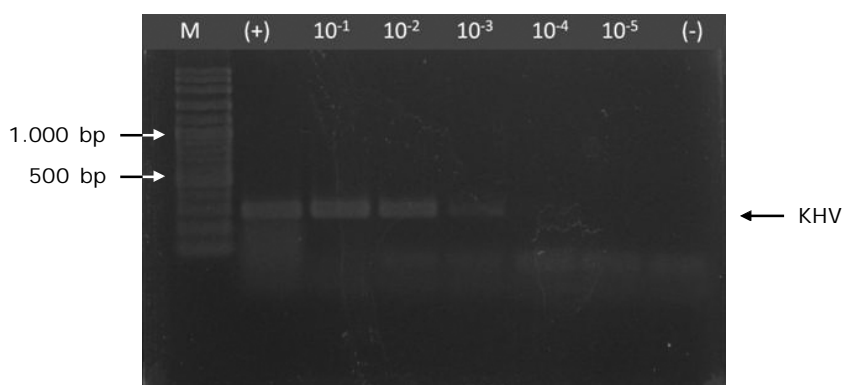
### Proses Elektroforesis

Pemeriksaan hasil PCR dilakukan dengan cara memasukkan campuran 6  $\mu$ L sampel DNA dan 2  $\mu$ L *6 x loading dye* ke dalam sumur-sumur agarose gel 1,5%. Sebagai penanda (*marker*) digunakan Vivantis VC 100 bp DNA Ladder Plus, RTU, 50  $\mu$ g sebanyak 4  $\mu$ L. Setelah itu, dilakukan elektroforesis 60 volt, 400 mA selama 45 menit. Agarose gel diwarnai dengan etidium bromida selama 10 menit kemudian dibilas menggunakan akuades dan difoto dengan pencahayaan ultraviolet menggunakan transiluminator.

## HASIL DAN BAHASAN

Hasil analisis PCR menunjukkan fragmen DNA virus KHV terdeteksi pada ukuran 290 bp. Virus KHV terdeteksi pada pengenceran  $10^{-1}$  (15  $\mu$ g/mL) sampai  $10^{-3}$  (0,15  $\mu$ g/mL). Elektroforesis hasil PCR disajikan pada Gambar 1.

Keberhasilan analisis PCR sangat dipengaruhi karakteristik DNA genom yang meliputi kemurnian, konsentrasi, dan ukuran *template*. Menurut Weeden *et al.* (1992), konsentrasi DNA cetakan yang terlalu kecil



Gambar 1. Deteksi virus KHV pada berbagai tingkat pengenceran (M = *Marker*; (+) = kontrol positif;  $10^{-1}$  = 15  $\mu\text{g/mL}$ ;  $10^{-2}$  = 1,5  $\mu\text{g/mL}$ ;  $10^{-3}$  = 0,15  $\mu\text{g/mL}$ ;  $10^{-4}$  = 0,015  $\mu\text{g/mL}$ ;  $10^{-5}$  = 0,0015  $\mu\text{g/mL}$ )

sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup atau tidak jelas. Jumlah dan kualitas DNA dapat diketahui dengan menggunakan alat spektrofotometer atau dengan melihat intensitas molekul DNA di dalam gel. Keberadaan DNA dalam suatu organisme dapat diketahui dengan 2 cara yaitu secara kualitatif dengan metode elektroforesis gel agarose dan secara kuantitatif dengan metode spektrofotometri. Uji kuantitatif DNA adalah analisis untuk menentukan kandungan/jumlah DNA yang terdapat dalam suatu zat atau komponen zat yang sebelumnya telah diketahui keberadaan DNA plasmidnya dalam larutan contoh dengan cara uji kualitatif (Larasati, 2011).

Hasil pengukuran konsentrasi awal DNA (sebelum pengenceran) yang didapat adalah 150  $\mu\text{g/mL}$  dengan kemurnian 1,8. Hasil ini menunjukkan bahwa kualitas DNA yang didapat baik. Tingkat kemurnian DNA berkorelasi dengan kualitas DNA. Sesuai dengan pernyataan Muladno (2002), bahwa kualitas DNA dapat ditentukan dengan cara menghitung rasio antara nilai OD260 dan nilai OD280 pada sampel DNA yang diukur melalui spektrofotometer. DNA dinyatakan murni jika memiliki nilai rasio OD260/OD280 (*optical density*) berkisar antara 1,8-2,0. Sambrook *et al.* (1989) menjelaskan bahwa rasio OD akan lebih besar atau lebih kecil dari nilai 1,8-2,0 jika ditemukan kontaminasi dari protein atau fenol di dalam larutan. DNA dikatakan terkontaminasi RNA jika memiliki rasio OD260/OD280 lebih dari dua (Khosravinia *et al.*, 2007).

Berdasarkan analisis hasil amplifikasi (elektroforesis dengan agarose gel 1,5%,

pewarnaan etidium bromida) didapatkan bahwa fragmen hasil amplifikasi KHV yang ditentukan dengan menggunakan petanda Vivantis VC 100 bp DNA Ladder Plus, RTU, 50  $\mu\text{g}$  menunjukkan panjang 290 pasangan basa (base pairs/bp) muncul pada pengenceran  $10^{-1}$  (15  $\mu\text{g/mL}$ );  $10^{-2}$  (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ); dan  $10^{-3}$  (0,15  $\mu\text{g/mL}$ ). Sedangkan pada pengenceran  $10^{-4}$  (0,015  $\mu\text{g/mL}$ ) dan  $10^{-5}$  (0,0015  $\mu\text{g/mL}$ ) pita spesifik KHV (290 bp) sudah tidak nampak. Hal ini menunjukkan metode PCR dengan menggunakan kit PCR *Maxima Hot start Green-Fermentas* yang di-*running* menggunakan *thermal cycler* dari BIO-RAD memiliki sensitivitas  $10^{-3}$  (0,15  $\mu\text{g/mL}$ ). Dalam kegiatan percobaan ini yang dimaksud dengan sensitivitas adalah konsentrasi DNA terkecil yang masih memberikan pita spesifik DNA KHV pada pemeriksaan elektroforesis.

Konsentrasi DNA sebesar 0,01-0,1  $\mu\text{g}$  setiap  $\mu\text{L}$  larutan *template* sudah cukup baik untuk PCR namun yang paling penting adalah DNA harus bebas dari pengotor seperti protein atau bahan-bahan yang tersisa saat purifikasi seperti fenol atau alkohol. Purifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan GFX DNA Column. DNA yang digunakan sebagai cetakan dapat berupa rantai tunggal maupun rantai ganda (Sambrook *et al.*, 1989).

#### KESIMPULAN

- Fragmen DNA virus KHV terdeteksi pada ukuran 290 bp.
- Konsentrasi DNA minimal untuk mendeteksi KHV adalah  $10^{-3}$  (0,15  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### DAFTAR ACUAN

- Haenen, O. 2003. Global Occurance of KHV. Modified Abstract of Lecture at The Institut fur Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten, University of Munich, Germany, 5 pp.
- Hendrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., & Spangenberg, J.V. 2000. A Herpes Virus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. *J. Aquatic Animal Health*, 12: 44-57.
- Khosravinia, H., Narasimha Murthy, H.N., Parasad, D.T., & Pirany, N. 2007. Optimizing factors influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. *African J. of Biotech.*, 6(4): 481-486.
- Larasati, P. 2011. Quantifikasi DNA dan Analisis Kualitas. <http://puspalarasati.wordpress.com> [Diakses tanggal 23 Oktober 2012].
- Muladno. 2002. Seputar Teknologi Rekayasa Genetika. Pustaka Wirausaha Muda, Bogor.
- Ornamental Aquatic Trade association (OATA). 2001. Koi Herpes Virus (KHV). United Kingdom, 33 pp.
- Sambrook, J., Fritsch & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbour: Laboratory Press.
- Sunarto, A., Taukhid, Rukyani, A., Koesharyani, I., Supriyadi, H., Huminto H., Agungpriyono, D.R., Pasaribu, F.H., Widodo, Herdikiawan, D., Rukmono, D., & Prayitno, S.B. 2002. Field investigations on a serious disease outbreak among koi and common carp (*Cyprinus carpio*) in Indonesia. Paper presented in 5th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 24-28 November 2002, Gold Cost, Australia.
- Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Kneen, B.E., & Lodhi, M.A. 1992. Inheritance and Reliability of RAPD Markers. In *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding, Symposium Proceedings*. Crop Science Society of Amerika, Madison, W.I., p. 12-17.