

PERBANDINGAN PENGGUNAAN BERBAGAI PRESERVASI RNA JARINGAN DENGAN RNA LATER, ALKOHOL, DAN ALKOHOL-GLISEROL UNTUK DETEKSI IMNV DENGAN PCR

Hessy Novita, Tatik Mufidah, dan Isti Koesharyani

Pusat Riset Perikanan Budidaya
Jl. Ragunan 20, Pasar Minggu, Jakarta Selatan 12540
Email: *hesta_biotek@yahoo.com*

(Naskah diterima: 20 Agustus 2009; Disetujui publikasi: 29 September 2009)

ABSTRAK

Salah satu kunci keberhasilan pemeriksaan virus dan patogen lain pada udang dan ikan adalah penanganan sampel secara benar. Deteksi RNA untuk virus IMNV dengan PCR sangat dipengaruhi oleh proses preservasi, karena RNA cenderung tidak stabil dan mudah terdegradasi sehingga dapat mengurangi sensitivitas diagnosa dengan PCR. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui dan membandingkan penggunaan jenis-jenis preservasi RNA jaringan untuk keperluan diagnosa dengan PCR. RNA jaringan berasal dari jaringan udang yang terinfeksi IMNV. Insang atau pleopoda dari udang dipreservasi dengan tiga jenis bahan pengawet, yaitu alkohol 90%, alkohol - gliserol dengan perbandingan 80% dan 20%, dan RNA LATER, kemudian dilakukan pengamatan dengan deteksi PCR selama 1 tahun. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa jaringan yang dipresevasi dengan RNA LATER setelah diuji PCR menghasilkan band yang cenderung stabil dibandingkan dengan preservasi alkohol, dan alkohol-gliserol.

KATA KUNCI: preservasi, RNA, PCR, IMNV, RNA LATER, alkohol, gliserol

ABSTRACT: *Comparison of various RNA preservatives (RNA LATER, alcohol, and alcohol-glycerol) in detecting IMNV using PCR. By: Hessy Novita, Tatik Mufidah, and Isti Koesharyani*

One of the key success in detecting viruses and other pathogenic organisms in shrimp and fish is the correct handling of samples. RNA virus detection for IMNV with PCR process is strongly influenced by preservative process, because RNA is unstable and easily to degrade so that it can reduce the sensitivity of PCR diagnosis. The objective of this research was to determine and compare types of preservatives used for PCR diagnostic. RNA was derived from shrimp infected IMNV. Gill or pleopoda of shrimp was preserved with three types of preservative which were 90% Alcohol, alcohol - glycerol with ratio of 80% and 20%, and RNA LATER, and then observed using PCR analysis several times for over one year. The results of the research indicates that the tissue preserved in RNA Later, resulted more stable band compared to alcohol, and alcohol-glycerol in PCR analysis.

KEYWORDS: *preservation, RNA, PCR, IMNV, RNA LATER, alcohol, glycerol*

PENDAHULUAN

Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) merupakan virus baru yang menyerang *Penaeus vannamei*. Kasus penyakit IMNV pertama kali dilaporkan menyerang udang *P. vannamei* di Brazil pada tahun 2002 (Lightner, 2003, Lightner *et al.*, 2006, dan Paulos, *et al.*, 2006) yang menyebabkan kerugian lebih dari \$ 20 juta pada industri udang di Brazil. Saat ini kasus IMNV tidak hanya terjadi di Brazil tapi di negara-negara yang telah membudidayakan udang *P. vannamei*. Penyakit ini menyebabkan kematian massal pada *P. vannamei* sebelum udang tersebut mencapai dewasa. Di Indonesia IMNV pertama kali telah menyerang udang *vannamei* awal tahun 2006 (Senapin *et al.*, 2007) yaitu di Jawa Timur di daerah Situbondo (Nur'ani *et al.*, 2007).

IMNV merupakan penyakit akut dan menyebabkan kematian yang cukup tinggi, tetapi penyakit ini dapat juga berlanjut menjadi penyakit kronis dengan kematian yang rendah. Gejala penyakit yang paling sering terlihat adalah, kerusakan (nekrosa) berwarna putih keruh pada otot/daging, terutama pada otot perut bagian atas (punggung) dan ekor yang tampak berwarna putih opaque sampai kemerahan (Senapin *et al.*, 2007). IMNV adalah jenis virus dari famili Totiviridae, golongan *double-stranded RNA* berbentuk bola (*spheroid*) dengan diameter 40 nm, *non envelop* (Senapin *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006; Lightner, 2005).

Diagnosa konfirmatif dengan teknik PCR untuk deteksi IMNV telah banyak dikembangkan, seperti metode LAMP (Puthawibool *et al.*, 2009), dan *in situ hybridization* (Tang *et al.*, 2005). Saat ini juga sudah tersedia kit untuk deteksi penyakit IMNV dengan teknik PCR, salah satunya dari Farming Intelligene Technology Corporation, Taiwan yang memproduksi kit *IQ-2000* nested PCR untuk IMNV (Senapin *et al.*, 2007). Dalam persiapan diagnosa dengan PCR diperlukan prosedur kerja tahap demi tahap, mulai dari cara pengambilan sampel, penyimpanan sampel, ekstraksi DNA/RNA, serta proses amplifikasi DNA/RNA.

Organisme patogen penyebab penyakit, terutama virus hidup dalam sel inang. Agar proses amplifikasi dengan PCR dapat dilakukan, DNA atau RNA patogen terlebih dahulu harus dikeluarkan dari sel inangnya melalui ekstraksi DNA/RNA. Proses ekstraksi

RNA sangat dipengaruhi oleh penanganan sampel terutama pada saat pengawetannya, agar RNA yang dihasilkan tidak rusak/terdegradasi sehingga tidak mengurangi sensitivitas diagnosa dengan PCR. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui dan membandingkan jenis-jenis preservasi RNA jaringan untuk keperluan diagnosa dengan PCR yaitu dengan alkohol, campuran alkohol, dan gliserol, dan RNA Later.

BAHAN DAN METODE

Penanganan dan Penyimpanan Jaringan

Pengambilan sampel udang *vaname* dari daerah Banyuwangi, Jawa timur. Jaringan yang digunakan untuk preservasi ini adalah insang dan pleopoda (kaki renang) udang *vannamei* yang terinfeksi IMNV masing-masing diawetkan dalam tiga jenis larutan preservasi untuk RNA yaitu: dalam alkohol 90% (p.a), campuran alkohol dan gliserol dengan perbandingan 80 mL : 20 mL dan dengan RNA Later®. Jaringan insang dan pleopoda yang sudah diawetkan masing-masing disimpan pada -20°C. Kemudian dilakukan proses ekstraksi RNA dan amplifikasi RNA dengan PCR secara periodik selama 1 tahun yaitu mulai dari: 1 hari, 1 bulan, 2 bulan, 6 bulan, dan 12 bulan, untuk melihat perubahan apakah RNA mengalami degradasi atau stabil.

Isolasi RNA dari Jaringan

Untuk mengisolasi RNA dari jaringan digunakan kit IQ-2000 (Farming Intelligene Technology Corporation). Jaringan insang yang digunakan sebanyak setengah lembar *lamella* insang atau setengah bagian pleopoda lalu dimasukkan ke dalam mikrotube 1.5 mL steril, kemudian ditambah 500µL larutan *RNA extraction* dan dihancurkan dengan pastel sampai jaringan terlarut, didiamkan selama 5 menit, dan ditambahkan 100µL *chloroform*, setelah itu dicampur dengan menggunakan *vortex* selama 20 detik dan didiamkan selama 3 menit pada suhu kamar (25°C). Kemudian jaringan yang sudah hancur dalam larutan *RNA extraction* disentrifuse selama 15 menit pada 12000 rpm dan setelah itu supernatan diambil sebanyak 200 µL dan dipindahkan dalam mikrotube baru. Pada mikrotube baru ditambahkan isopropanol sebanyak 200 µL, lalu divortex selama 30 detik dan disentrifuse 12000 rpm selama 10 menit. Setelah proses

sentrifikasi, isopropanol dibuang menggunakan mikropipet. Kemudian pelet RNA yang menempel di dasar tabung dicuci dengan menambahkan 500 μ l alkohol 75% dan disentrifuse dengan kecepatan 9000 rpm selama 5 menit. Kemudian alkohol dibuang dengan hati-hati, tabung diletakkan di atas tissue bersih dengan tutup terbuka dan posisi miring pada suhu kamar selama 5-10 menit. Setelah itu pelet RNA dilarutkan dengan DEPC ddH₂O sebanyak 200 μ l dan divortex sampai pellet terlarut secara homogen, dan RNA siap diamplifikasi/diperbanyak dengan mesin PCR.

Amplifikasi RNA

Amplifikasi RNA dilakukan dengan menggunakan kit IQ-2000 (Farming Intelligene Technology Corporation). Persiapan reaksi untuk RT-PCR : RT-PCR Premix (7 μ l), IQzyme DNA Polymerase 2 unit/ μ l (0,5 μ l) dan RT Enzyme Mix (0,5 μ l) dan *template* RNA 2 μ l dan ditambahkan 15 μ l mastermix Nested PCR dengan komposisi *Nested* PCR (14 μ l) dan

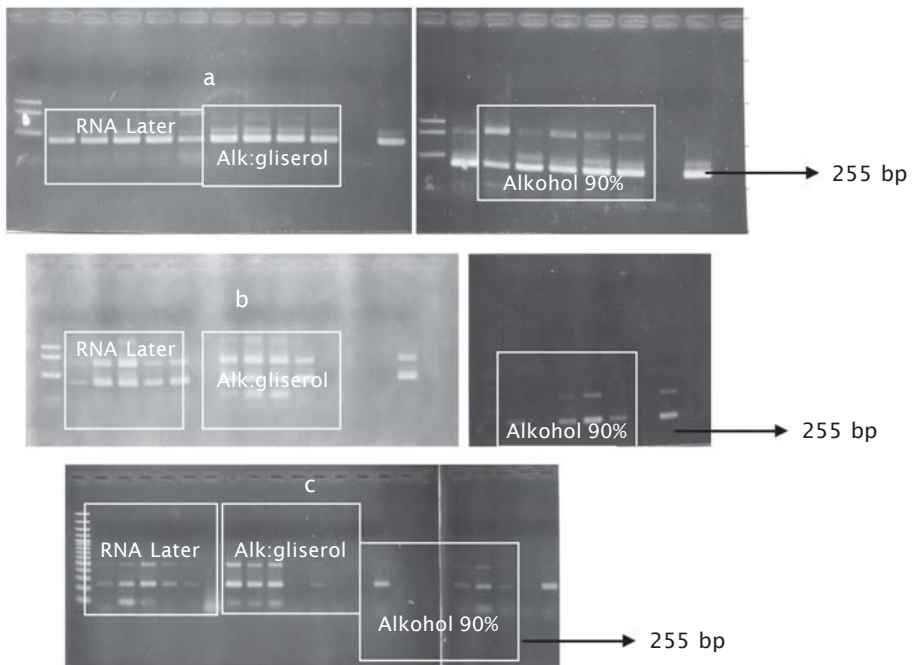
IQzyme DNA Polymerase 2 units/ μ l (1 μ l). Reaksi kondisi RT-PCR *profile* adalah: 42°C ; 30 menit, 94°C; 2 menit, 94°C; 20 detik, 62°C; 20 detik, 72°C; 30 detik, diulang sebanyak 20 siklus dan ditambah 72°C; 30 detik, 20°C; 30 detik. Sedangkan untuk *Nested* PCR dengan reaksi PCR *profile*: 94°C; 20 detik, 62°C; 20 detik, 27°C; 30 detik, diulang sebanyak 30 siklus, dan ditambah 72°C; 30 detik, 20°C; 30 detik. Target *band* untuk IMNV adalah 255 bp dan dibandingkan positif kontrol pada 10³.

Elektroforesis

Hasil amplifikasi (*amplicon*) dielektroforesis dengan menggunakan *agarose* 2% dan didokumentasikan dengan kamera Polaroid.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil presevasi RNA dengan RNA Later, Alkohol: Gliserol dan Alkohol 90% dan hasil pengujian dengan kit IQ-2000 dapat dilihat pada Lampiran 1 dan Lampiran 2.



Gambar1. Hasil amplifikasi PCR dengan preservasi RNA Later, Alkohol: Gliserol dan Alkohol 90% dan hasil pengujian dengan kit IQ-2000, a. preservasi 1 bulan; b. preservasi 2 bulan; dan c. preservasi 6 bulan

Figure 1. Result of PCR amplification with RNA Later, Alcohol-Glycerol dan Alcohol 90% and test result of IQ-2000 kit , a. 1 month preservation; b. 2 months preservation; and c. 6 months preservation

Hasil dari Lampiran 1 dan Lampiran 2 merupakan hasil visualisasi PCR yang dapat dilihat dari hasil amplifikasi pada Gambar 1.

Pada semua sampel yang disimpan selama 1 bulan, dalam masing-masing preservasi masih menghasilkan kualitas RNA yang stabil baik dengan RNA Later maupun dengan alkohol, dan alkohol:gliserol pada -20°C. Tapi pada 2 bulan, 6 bulan, dan 1 tahun, untuk preservasi dengan alkohol;gliserol telah mengalami penurunan, dengan kestabilan RNA mencapai 60%-80%. Preservasi dengan alkohol, RNA mulai mengalami degradasi dimana kestabilan RNA hanya mencapai 20%-40% dari masa penyimpanan 2 bulan, 6 bulan, dan 1 tahun. Sedangkan preservasi jaringan dengan RNA Later®, kestabilan RNA mencapai 100% dari masa penyimpanan 1 bulan, 2 bulan, 6 bulan, dan 1 tahun, dimana RNA tidak mengalami degradasi (Lampiran 1 dan 2). Dari hasil pengujian selanjutnya, setelah masa penyimpanan lebih dari satu tahun (1,5 tahun) RNA tetap tidak mengalami degradasi dengan RNA Later® dan hasil pengujian dengan PCR, *band* (pita-pita) masih terlihat jelas.

Terjadinya penurunan kestabilan RNA yang dihasilkan dari jaringan yang disimpan dalam larutan preservasi sangat tergantung pada jenis jaringannya, lama waktu penyimpanan, dan jenis preservasinya (Rolfs *et al.*, 1992). Pada masa penyimpanan 2 bulan dengan alkohol, RNA sudah mengalami penurunan, karena alkohol tidak mampu mempertahankan integritas RNA dalam jaringan. Selain itu agar proses preservasi jaringan tetap terjaga larutan garam sulfat (amonium sulfate) yang ada dalam RNA Later®, akan masuk ke dalam jaringan melewati difusi pasif dengan syarat jaringan harus terendam dengan larutan RNA Later® (Mutter *et al.*, 2004).

Proses preservasi RNA sangat penting sekali karena sangat mempengaruhi kualitas RNA dalam deteksi dengan PCR, karena RNA cenderung labil dan mudah terdegradasi. Selama ini proses penyimpanan RNA hanya menggunakan alkohol dan alkohol-gliserol. Dengan penggunaan larutan yang dapat menjaga stabilitas RNA yaitu RNA Later® (ambion, Austin, TX, USA) yang telah tersedia secara komersial dan sudah banyak digunakan oleh laboratorium (Grotzer *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Rodrigo *et al.*, 2002; Mutter *et al.*, 2004). RNA Later® juga memungkinkan penyimpanan jaringan pada suhu yang relatif tinggi, serta menjaga RNA tetap stabil.

KESIMPULAN

Dengan metode preservasi RNA dengan menggunakan RNA Later® yang disimpan pada suhu pada -20°C dapat menyimpan jaringan dalam jangka waktu lama (1 tahun) dan RNA tetap stabil.

DAFTAR ACUAN

- Grotzer, M.A., Patti, R., Georger, B., Eggert, A., Chou, T.T., & Phillips, P.C. 2000. Biological stability of RNA isolation from RNA Later-treated brain tumor and neuroblastoma xenografts. *Med. Pediatr. Oncol.*, 34: 438-442.
- Lightner, D.V. 2003. The Penaeid Shrimp Viral Pandemics due to IHNV, WSSV, TSV and YHV: History in the Americas and Current Status. *Aquaculture and Pathobiology of Crustacean and other Species: Proceedings of The thirty Second UNJR Aquaculture Panel Syposium*, p.1-20.
- Lightner, D.V. 2005. Biosecurity in Shrimp Farming: Pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36: 229-248.
- Lightner, D.V., Pantoja, C.R., Poulos, B.T., Tang-Nelson, K.F.J., Redman, R.M., Nunan, L.M., Navaaro, S.A., Noble, B.L., & Mohny, L.L. 2006. Old and emerging disease of *Litopenaeus vannamei* in 2004-2005 in Americas. *Aquaculture America meeting abstract*. <http://www.was.org/meeting/Abstractdata>. Diakses tanggal 20 Juli 2007.
- Mutter, G.L., Zahrieh, D., Liu, C., Neuberg, D., Finkelstein, D., Baker, H.E., & Warrington, J.A. 2004. Comparison of frozen and RNA Later solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. *BMC Genomics*, 5: 88.
- Nur'ani, L.T., Hanggono, B., subyakto, S., & Triastuti, G. 2007. Survalen aktif myonecrosis virus (IMNV) pada udang *vannamei*(*Litopenaeus vannamei*) di kawasan tambak Jawa Timur dan Bali. *J. Perikanan IX*(1): ISSN: 0853-6384, hlm. 1-8.
- Paulos, B.T., Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Bananmi, J.B., & Lightner, D.V. 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *J.Gen. Virol.*, 87: 987-996.
- Puthawibool, T., Senapin, S., Kiatpathomchai, W., & Flegel, T.W. 2009. Detection of Shrimp infectious myonecrosis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal

- amplification combined with a lateral flow lipstick. *J. Virol Methods*. Elsevier, 156(1-2): 27-31.
- Rodrigo, M.C., Martin, D.S., Redetzke, R.A., & Eyster, K.M. 2002. A method for the extraction of high-quality RNA and protein from single small samples of arteries and veins preserved in RNA Later. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 47: 87-92.
- Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U., & Weber, R. 1992. *PCR: Clinical diagnostics and research*. Springer Laboratory. Springer-Verlag. Berlin heiderbrg, p. 68-69.
- Senapin, S., Kornsunee, P., Matthew, B., & Flegel, T.W. 2007. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *J. Aquaculture*, 266: 32-38.
- Tang, K.F., Pantoja, C.R., Poulos, B.T., Redman, R.M., & Lightner, D.V. 2005. In situ Hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. Stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Dis. Aquatic.Org.*, 63: 261-265.
- Wang, W.H., McNatt, L.G., Sherpard, A.R., Jacobson, V.C., & Clark, A.F. 2001. Optimal procedure for extracting RNA from human ocular tissues and expression profiling of the congenital glaucoma gene FOXC1 using quantitative RT-PCR. *Mol. Vis.*, 7: 89-94.

Lampiran 1. Hasil presevasi RNA dengan RNA Later, alkohol: gliserol dan alkohol 90% dan hasil pengujian dengan kit IQ-2000 Appendix 1. Result of RNA preservation using RNA Later, alcohol-glycerol and alcohol 90% and test result with IQ-2000 kit

No.	Jenis sampel Kind of sample	Organ	Asal sampel Sample origin	Jenis presevasi Kinds of preservative	Hasil pengujian dengan Kit IQ-2000 IMNV Result of test with IQ-2000 kit for IMNV			
					1 Bulan 1 Months	2 Bulan 2 Months	6 Bulan 6 Months	12 Bulan 12 Months
1.	<i>L.vannamei</i> 12	Gill	Pakem	RNA Later	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
2.	<i>L.vannamei</i> 18	Gill	Pakem	RNA Later	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
3.	<i>L.vannamei</i> 21	Pleopoda	Pakem	RNA Later	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
4.	<i>L.vannamei</i> 24	Pleopoda	Pondok Nongko II1	RNA Later	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
5.	<i>L.vannamei</i> 33	Pleopoda	Pondok Nongko I1	RNA Later	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
Persentase Presistensi RNA					100%	100%	100%	100%
6.	<i>L.vannamei</i> 6	Pleopoda	Pake mII1	Alkohol/glisierol	(+++)	(+++)	(+++)	(-)
7.	<i>L.vannamei</i> 17	Pleopoda	Pake m 3	Alkohol/glisierol	(+++)	(+++)	(+++)	(++)
8.	<i>L.vannamei</i> 22	Pleopoda	Pake m 4	Alkohol/glisierol	(+++)	(+++)	(+++)	(++)
9.	<i>L.vannamei</i> 32	Gill	Pondok Nongko I.1	Alkohol/glisierol	(+++)	(+++)	(+++)	(++)
10.	<i>L.vannamei</i> 45	Pleopoda	Petak A situbondo	Alkohol/glisierol	(+++)	(-)	(-)	(-)
Persentase Presistensi RNA					100%	80%	80%	60%
11.	<i>L.vannamei</i> 9	Pleopoda	Pake mII4	Alkohol 90%	(+++)	(+)	(+/-)	(+)
12.	<i>L.vannamei</i> 7	Pleopoda	Pake mII3	Alkohol 90%	(+++)	(-)	(+/-)	(-)
13.	<i>L.vannamei</i> 26	Pleopoda	Pondok Nongko II2	Alkohol 90%	(+++)	(++)	(+/-)	(+)
14.	<i>L.vannamei</i> 37	Pleopoda	Pondok Nongko I.3	Alkohol 90%	(+++)	(++)	(+/-)	(+)
15.	<i>L.vannamei</i> 40	Pleopoda	Pondok Nongko I.4	Alkohol 90%	(+++)	(+)	(+/-)	(+)
Persentase Presistensi RNA					100%	40%	40%	20%

(+++): tingkat serangan virus berat; (++) : tingkat serangan virus sedang; (+) : tingkat serangan virus ringan; (-) : Negatif

Lampiran 2. Hasil presevasi RNA dengan RNA Later, alkohol: gliserol dan alkohol 95% dan hasil pengujian dengan kit IQ-2000 Appendix 2. Result of RNA preservation using RNA Later, alcohol-glycerol and alcohol 95% and test result with IQ-2000 kit

Metode preservasi Preservation method	Periode penyimpanan (Storage period)			
	1 bulan 1 month	2 bulan 2 months	6 bulan 6 months	12 bulan 12 months
RNA Later -20°C	----- (100%)	----- (100%)	----- (100%)	----- (100%)
Alkohol : Gliserol -20°C	----- (100%)	↓ -80%	↓ -80%	↓ -60%
Alkohol -20°C	----- (100%)	↓ -40%	↓ -40%	↓ -20%

----- : Tidak ada perubahan (No change)

↓ : Penurunan (Declined)