

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

DUPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION UNTUK DETEKSI SIMULTAN KOI HERPESVIRUS DAN *Aeromonas hydrophila* PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Hessy Novita, Tuti Sumiati, Desy Sugiani, dan Taukhid

Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan
Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan
Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154

(Naskah diterima: 16 September 2019; Revisi final: 10 Februari 2020; Disetujui publikasi: 10 Februari 2020)

ABSTRAK

Koi herpesvirus (KHV) dan *Aeromonas hydrophila* adalah patogen yang dapat menginfeksi ikan mas secara bersamaan. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode *duplex polymerase chain reaction* (dPCR), deteksi simultan untuk diagnosis KHV dan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas. Dua pasang primer yang menargetkan sekuens spesifik SphI dan gen aerolisin, yang sering digunakan untuk mendeteksi KHV dan *A. hydrophila* dalam uji reaksi tunggal PCR dan menghasilkan target pita PCR 290 bp dan 417 bp. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode *duplex* PCR dapat mendeteksi ganda infeksi KHV dan *A. hydrophila* pada ikan mas dan metode ini lebih efektif mendeteksi dua patogen secara bersamaan dalam satu reaksi PCR pada suhu pradenaturasi, 94°C selama dua menit, denaturasi pada suhu 95°C selama satu menit, *annealing* pada suhu, 55°C selama satu menit, dan 72°C selama satu menit, dengan 30 siklus amplifikasi dan *final extension* pada suhu 72°C selama lima menit. Metode dPCR untuk deteksi simultan kedua patogen adalah salah satu metode yang dapat diaplikasikan untuk deteksi koinfeksi virus dan bakteri dalam satu reaksi PCR.

KATA KUNCI: patogen; *duplex* PCR, KHV; *Aeromonas hydrophila*; SphI; gen aerolisin

ABSTRACT: *Duplex PCR for simultaneous detection of koi herpesvirus (KHV) and Aeromonas hydrophila in common carp (Cyprinus carpio). By: Hessy Novita, Tuti Sumiati, Desy Sugiani, and Taukhid*

Koi herpesvirus (KHV) and Aeromonas hydrophila are pathogens that can co-infect common carp. This study aimed to develop a duplex polymerase chain reaction (dPCR) method to detect KHV and Aeromonas hydrophila in common carp simultaneously. Two pairs of primers targeted the specific sequences of SphI and aerolysin genes, often used in detecting KHV and A. hydrophila, in a single PCR reaction test and produced target bands of PCR 290 bp and 417 bp. This proposed method was more effective in simultaneously detecting the two pathogens in one PCR reaction at pre-naturation temperature of 94°C for two minutes, denaturation at 95°C for one minute, annealing at temperature, 55°C for one minute, and 72°C for one minute, with 30 cycles of amplification and final extension at 72°C for five minutes. The findings showed that the duplex PCR method could be used to double detect KHV and A. hydrophila infection in common carp. The duplex PCR method for simultaneous detection of both pathogens is one method that can be applied for the detection of co-infection of viruses and bacteria in a PCR reaction.

KEYWORDS: patogen; *duplex* PCR; KHV; *Aeromonas hydrophila*; SphI; aerolysin gene

PENDAHULUAN

Koi herpesvirus (KHV) atau saat ini lebih tepat disebut sebagai *Cyprinid herpes virus-3* (CyHV-3) telah menimbulkan kerugian besar pada budidaya ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan ikan koi (*Cyprinus carpio koi*) di seluruh dunia dengan penularan yang sangat cepat dan

virulensi yang tinggi sehingga menyebabkan wabah penyakit dengan mortalitas tinggi (Ronen *et al.*, 2003). KHV dapat menyebabkan kematian massal dengan mortalitas 80%-95% dari ikan mas dan koi yang dibudidayakan sehingga menyebabkan kerugian ekonomi yang tinggi hampir di seluruh dunia antara lain di Jepang, USA, Israel, negara-negara di Eropa, Afrika, dan Indonesia. Kerugian yang sangat besar pada industri akuakultur ini dapat terjadi dikarenakan ikan mas dan koi merupakan komoditas utama ikan konsumsi dan ikan hias.

Korespondensi: Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan. Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154, Indonesia
Tel. + 62 251 8313200
E-mail: hestahamdani@gmail.com

Di Indonesia, penyebaran penyakit ini telah terjangkit hampir semua daerah yang membudidayakan ikan mas. Budidaya ikan secara intensif, pameran ikan koi dan perdagangan di dalam dan luar negeri tanpa peraturan dan pembatasan yang tegas dalam pemeriksaan dan penerapan program karantina merupakan penyebab cepatnya penyebaran penyakit ini secara global (Gilad *et al.*, 2003; Pikarsky *et al.*, 2004). Penyakit virus ini muncul pada saat suhu air berkisar antara 18°C-28°C atau pada *permissive temperature* (Gilad *et al.*, 2003; Perelberg *et al.*, 2003). Pada umumnya gejala klinis ikan mas yang terinfeksi KHV berupa kerusakan (nekrosis) parah pada insang. Kematian pada ikan yang terinfeksi teramati mulai terjadi pada hari ketujuh setelah infeksi dan kematian dapat terus terjadi hingga mencapai mortalitas di atas 90% dalam waktu 2-3 minggu (Hedrick *et al.*, 2000).

Infeksi KHV biasanya diikuti oleh adanya koinfeksi bakteri berupa luka atau bercak merah di permukaan tubuh yang disebabkan oleh bakteri seperti *Aeromonas hydrophila* (Ye *et al.*, 2013). Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu bakteri patogen yang membahayakan bagi budidaya perikanan air tawar karena dapat menginfeksi semua stadia. Bakteri *A. hydrophila* menyebabkan penyakit *motile aeromonas septicemia* (MAS) atau penyakit bercak merah dengan gejala klinis berupa luka di bagian tubuh ikan dan bercak merah pada bagian tubuh. Infeksi bakteri *A. hydrophila* dapat terjadi akibat perubahan kondisi lingkungan, stres, perubahan suhu, dan ketika inang tersebut telah terinfeksi oleh virus, bakteri atau parasit lainnya (infeksi sekunder), oleh karena itu bakteri ini disebut dengan bakteri yang bersifat patogen oportunistik (Dooley *et al.*, 1985).

Virus KHV yang menginfeksi ikan mas secara bersamaan dengan *A. hydrophila* sering ditemukan bila dilakukan deteksi secara tunggal dengan PCR. Dari masalah tersebut perlu dilakukan penelitian untuk dapat mendeteksi virus KHV dan *A. hydrophila* atau *double* infeksi dengan metode *duplex* PCR. Metode *duplex* PCR (dPCR) merupakan modifikasi dari PCR yang memungkinkan amplifikasi secara simultan dengan dua pasang primer untuk mengamplifikasi *template* DNA dalam satu reaksi tunggal untuk target yang berbeda. Teknik ini digunakan untuk diagnosis penyakit yang berbeda dalam sampel yang sama (Belak *et al.*, 2009). Metode *duplex* PCR lebih efisien, hemat waktu, dan biaya jika dibandingkan dengan *single* PCR atau *uniplex* PCR. Beberapa peneliti telah menggunakan teknik dPCR untuk deteksi patogen, Yasmon *et al.* (2010) telah mendeteksi secara simultan *Legionella species* dan *Legionella pneumophila* dengan dPCR pada sampel air di Jakarta. Thanananta & Thanananta (2008) mendeteksi *E. coli* yang berasal dari air menggunakan

dPCR dengan target gen *lacZ* dan *uidA*. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan deteksi simultan virus KHV dan bakteri *A. hydrophila* dalam satu reaksi PCR, sehingga nantinya metode ini dapat menjadi metode yang lebih efektif dan efisien dalam proses deteksi kedua patogen ini.

BAHAN DAN METODE

Tahap Persiapan

Sampling sampel ikan mas sakit dari sentra budidaya ikan mas yaitu dari daerah Sukabumi, Danau Maninjau, dan sampel koleksi IRP2I, untuk isolasi DNA virus KHV dan bakteri *A. hydrophila*, perbanyakkan dsDNA dengan metode PCR menggunakan spesifik primer dengan reaksi tunggal PCR dan *duplex* PCR.

Ekstraksi DNA KHV dan Bakteri *A. hydrophila*

DNA bakteri *A. hydrophila* dikultur pada media *trypticase soy broth* (TSB) kemudian digores ke media *trypticase soy agar* (TSA) dan inkubasi pada 28°C selama 18 jam, selanjutnya bakteri diekstraksi dengan metode perebusan. Satu lup koloni diencerkan dengan ddH₂O 500 µL dan diinkubasi pada suhu 100°C. Suspensi sel kemudian disentrifuse pada 10,000 x g selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan *pellet* dilarutkan dengan 50 µL ddH₂O, kemudian diukur konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh dengan *nannodrop*, dan disimpan pada suhu 20°C sampai DNA digunakan sebagai *template* PCR.

Ekstraksi DNA KHV dari jaringan yang terinfeksi KHV menggunakan (*gSYNC DNA extraction kit quick genoaid kit: geneaid*) dilakukan dengan menggunakan petunjuk ekstraksi DNA mengikuti prosedur yang tertulis dalam protokol dari kemasan kit. Sampel jaringan insang sebanyak 25 mg digerus sampai hancur menggunakan *pestle* lalu dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL. Hasil gerusan ditambahkan 200 µL GST Buffer dan 20 µL proteinase K, di-*vortex* dan selanjutnya mengikuti protokol yang telah tersedia pada kemasan kit. Hasil ekstraksi DNA kemudian disimpan dalam *freezer* -20°C sebelum diamplifikasi dengan mesin PCR.

Single PCR

DNA KHV dan bakteri *A. hydrophila* dari sampel ikan mas yang telah diekstraksi kemudian masing-masing diamplifikasi dengan PCR. Komposisi larutan PCR untuk deteksi KHV dan *A. hydrophila* pada 25 µL reaksi dengan mencampurkan *master mix* 12,5 µL (promega); *nuclease free water* 8,5 µL; primer 10 pmol untuk *forward* 1 µL; *reverse* 1 µL; dan *template* DNA 2 µL. Proses amplifikasi menggunakan masing-masing dua pasang primer yang spesifik untuk KHV dan *A. hydrophila*. Untuk mendeteksi KHV menggunakan

primer KHV yang dimodifikasi oleh Yuasa *et al.* (2005) dan standar OIE (2016), sedangkan primer yang untuk deteksi *A. hydrophila* berdasarkan rujukan literature (Nam & Joh, 2007) yang telah dimodifikasi, urutan primer, dan ukuran produk amplifikasinya dapat dilihat pada Tabel 1.

Optimasi Duplex PCR (dPCR)

Optimasi dPCR untuk simultan deteksi KHV dan *A. hydrophila* dalam reaksi PCR dilakukan berdasarkan Tabel 2. diketahui suhu setiap primer berbeda-beda sedangkan prinsip kerja dPCR yaitu menggunakan dua pasang primer dalam satu kali *running* PCR dengan suhu PCR yang sama. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi kondisi suhu PCR terlebih dahulu. Optimasi awal dilakukan dengan menggunakan *uniplex* PCR untuk menentukan suhu *annealing* optimum masing-masing primer kemudian dilanjutkan dengan optimasi dPCR. Kisaran gradien suhu yang digunakan dalam optimasi suhu *annealing* kedua pasangan primer adalah 55°C; 56°C; 60°C; 63°C; dan 67°C dengan reaksi PCR 30 siklus, 35 siklus, dan 40 siklus. Hasil optimasi suhu pada *single* kemudian digunakan dalam dPCR, faktor lain yang diperhatikan dalam dPCR adalah optimasi konsentrasi *master mix* dan primer. Komposisi dPCR untuk membuat campuran menggunakan *master mix* KAPA 2G *fast multiplex* dapat dilihat pada Tabel 3.

Running Elektroforesis

Agarose ditimbang 1,5%; kemudian dilarutkan dalam 100 mL TAE satu kali, agarose dipanaskan sampai

mendidih dengan *microwave*, larutan agar didinginkan hingga suhu 60°C selama kurang lebih 15 menit, kemudian dicetak dalam *tray agarose* yang telah dilengkapi dengan sisir untuk membentuk sumur-sumur gel. Gel didiamkan sampai mengeras (30-45 menit). Setelah mengeras, gel diambil dan diletakkan ke dalam bak elektroforesis yang berisi *buffer* TAE satu kali. Amplicon PCR sebanyak 10 µL diberi *loading dye* sebanyak 2 µL, di-*running* dalam gel elektroforesis bersama-sama dengan 5 µL DNA marker 100 bp. Setelah semua hasil PCR diinjeksikan ke dalam sumur-sumur gel elektroforesis, selanjutnya elektroforesis dijalankan dengan tegangan 100 volt, selama 25 menit.

Visualisasi Hasil Amplifikasi

Gel hasil elektroforesis direndam dalam larutan *ethidium bromida* (konsentrasi 10 µ/100 mL aquadest) selama 15 menit. Selanjutnya gel dibilas dengan aquadest selama 10 menit. Gel hasil elektroforesis diamati menggunakan *geldoc* yang sekaligus dilakukan pengambilan foto untuk dokumentasi dengan kamera digital dengan target pita PCR 417 bp untuk *A. hydrophila* dan KHV pada target pita PCR 290 bp.

Limit of Detection (LOD) dPCR KHV dan *A. hydrophila*

LOD (*limit of detection*) dari dPCR DNA KHV dan *A. hydrophila* adalah melakukan pengenceran serial DNA dengan konsentrasi yang digunakan untuk pengujian adalah 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/ml, 100 pg/mL, 10

Tabel 1. Reaksi PCR dan primer untuk mendeteksi KHV (OIE, 2016; Yuasa *et al.*, 2005) dan *A. hydrophila* (Nam & Joh, 2007)

Table 1. PCR reactions and primer for detecting KHV (OIE, 2016; Yuasa *et al.*, 2005) and *A. hydrophila* (Nam & Joh, 2007)

Sekuen Primer (5' ke 3') dan suhu PCR Primer sequence (5 'to 3') and PCR temperature	Target gen Gene target	Target spesifik Specific target	Produk PCR PCR product (bp)
F-5'GAC ACC ACA TCT GCA AGG AG3' R-5'GAC ACA TGT TAC AAT GGT CGC-3" Pradenaturasi (<i>Prdenaturation</i>) : 94°C; 30 detik (<i>seconds</i>) Denaturasi (<i>Denaturation</i>) : 94°C; 30 detik (<i>seconds</i>) <i>Annealing</i> : 63°C; 30 detik (<i>seconds</i>) <i>Extention</i> : 72°C; 30 detik (<i>seconds</i>) <i>Final-extention</i> : 72°C; 7 menit (<i>minute</i>) Jumlah siklus (<i>Number of cycles</i>) : 40 siklus (<i>cycle</i>)	SphI	KHV	290
F; 5'-GAG CGA GAA GGT GAC CAC CAA GAA C-3' R; 5'-TTC CAG TCC CAC CAC TTC ACT TCA C-3' Pradenaturasi (<i>Prdenaturation</i>) : 94°C; 2 menit (<i>minute</i>) Denaturasi (<i>Denaturation</i>) : 94°C; 1 menit (<i>minute</i>) <i>Annealing</i> : 56°C; 30 detik (<i>seconds</i>) <i>Extention</i> : 72°C; 45 detik (<i>seconds</i>) <i>Final-extention</i> : 72°C; 5 menit (<i>minute</i>) Jumlah siklus (<i>Number of cycles</i>) : 30 siklus (<i>cycle</i>)	Aerolisin	<i>A. hydrophila</i>	417

Tabel 2. Optimasi suhu dPCR berdasarkan modifikasi pada suhu *annealing single PCR*
 Table 2. *Optimization of dPCR temperature based on modification of a single PCR annealing temperature*

Tahapan PCR (PCR step)	Suhu PCR (PCR temperature)
Pradenaturasi	94°C selama 2-5 menit (94°C for 2-5 minute)
Denaturasi Denaturation	95°C selama 1 menit (95°C for 1 minute)
	55°C
Annealing	56°C
	60°C
	63°C
	67°C
	Selama 30 detik; satu menit (For 30 seconds; one minute)
Extention	72°C selama 30 detik; satu menit (72°C for 30 seconds; one minute)
Final Extention	72°C selama lima menit (72°C for five minute)
Siklus (Cycle)	30, 35, 40

Tabel 3. Optimasi konsentrasi *mastermix KAPA2G Fast Multiplex* berdasarkan modifikasi dari manual dari kit

Table 3. *The concentration optimization of KAPA2G Fast Multiplex mastermix modified from the kit manual*

Larutan PCR (PCR mix)	Jumlah (Amount) (µL)
Buffer	12.5
F/R primer KHV (10 pmol)	1; 1.5
F/R primer aerolisin (10 pmol)	1; 1.5
DNA KHV	2
DNA <i>A. hydrophila</i>	2
Nuclease free water	6.5; 5.5

pg/mL, 1 pg/mL, 100 fg/mL, 10 fg/mL, 1 fg/mL, dan 100 Ag/mL. Pengenceran dilakukan dengan menambahkan ddH₂O dan diamplifikasi menggunakan dPCR, selanjutnya dielektroforesis dan dokumentasi. Kode sampel untuk menghitung LOD adalah KHV2 dan AH.

HASIL DAN BAHASAN

Isolasi KHV dan *A. hydrophila* dari jaringan ikan mas diperoleh dari daerah budidaya ikan mas yaitu Sukabumi, Danau Maninjau, dan isolat koleksi Laboratorium Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I). Ikan mas yang diisolasi kedua patogen tersebut tidak semuanya menunjukkan terinfeksi oleh ko-infeksi KHV dan *A. hydrophila* yang bisa dilihat dari Tabel 4.

Gejala ikan yang terinfeksi ko-infeksi KHV dan *A. hydrophila* adalah pada insang ditemukan bercak putih, geripis di pinggir insang, adanya luka, dan

pembengkakan di hati dan ginjal (Gambar 1). Biasanya kondisi ini diikuti dengan infeksi sekunder bakterial seperti kulit melepuh maupun luka borok di permukaan tubuh, kadang-kadang disertai pendarahan pada sirip/badan. Koleksi sampel isolat tersebut dipreparasi dengan identifikasi uji PCR. Pada uji PCR menggunakan metode *single PCR* dan dilanjutkan dengan pengujian deteksi *duplex PCR*.

Single PCR

Hasil deteksi *single PCR*, DNA KHV dan *A. hydrophila* dari jaringan yang terinfeksi menunjukkan hasil PCR positif KHV dan *A. hydrophila*, pada pita DNA 290 bp. Sedangkan *A. hydrophila* terdeteksi pada pita DNA 417 bp. Hasil PCR pada kedua patogen yang menginfeksi ikan mas, memperlihatkan bahwa masing-masing patogen dapat dideteksi secara tunggal dengan menggunakan PCR. Sehingga dapat dikembangkan untuk uji dPCR, dengan optimasi suhu PCR, terutama

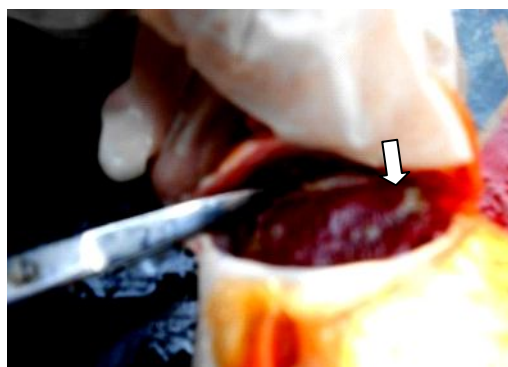
Tabel 4. Hasil skrining isolat KHV dan *A. hydrophila* dari daerah Sukabumi, Danau Maninjau, dan IRP2I

Table 4. Screening results of KHV and *A. hydrophila* isolates from Sukabumi, Maninjau Lake, and IRP2I

Asal daerah (Origin)	Koi Herpes Virus (KHV)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Sukabumi	Dua isolat (Two isolate)	Satu isolat (One isolate)
Danau Maninjau (Lake Maninjau)	Dua isolat (Two isolate)	-
IRP2I	Satu isolat (One isolate)	Satu isolat (One isolate)

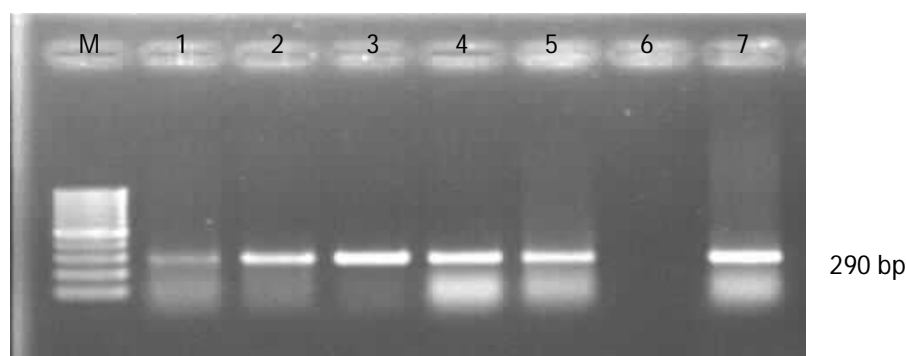
untuk masing-masing suhu *annealing* pada kedua patogen baik KHV dan *A. hydrophila* yaitu pada rentang suhu 63°C dan 56°C. Sampel ikan yang terdeteksi positif ko-infeksi KHV dan *A. hydrophila* digunakan sebagai sampel untuk uji optimasi *duplex* PCR yang bisa dilihat pada Gambar 4 dan 5.

Pada pengujian deteksi KHV dan *A. hydrophila* telah diketahui konsentrasi dan kemurnian dengan *nanodrop* yang bisa dilihat pada Tabel 5. Nilai kemurnian DNA dapat ditentukan dengan besarnya nilai rasio absorbansi $A_{260/280}$. Hasil pengukuran nilai kemurnian DNA sampel ikan mas yang terkena KHV (Tabel 4.)



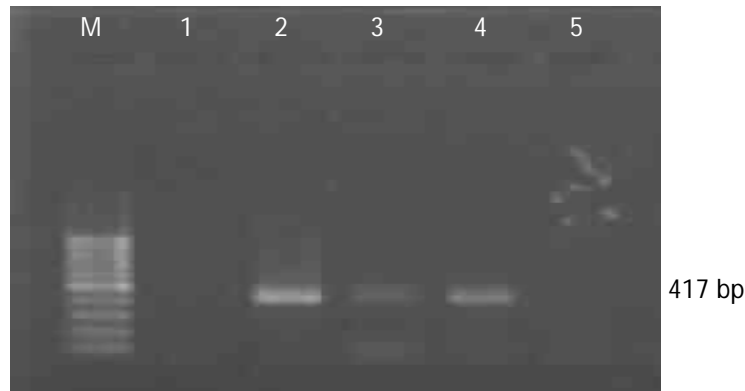
Gambar 1. Koleksi sample jaringan insang dari ikan yang terinfeksi KHV (tanda infeksi ditunjukkan dengan bercak putih pada insang).

Figure 1. Collection of gills' samples from KHV-infected common carp (sign of infection is shown by the appearance of white patches on the gills).



Gambar 2. Deteksi KHV dengan *single* PCR, dengan target pita DNA KHV pada 290 bp. M; marker 100 bp, (1) sampel Sukabumi-1, (2) sampel Sukabumi-2, (3) sampel Danau Maninjau-1, (4) sampel Danau Maninjau-2, (5) sampel IRP2I, (6) kontrol negatif, (7) kontrol positif.

Figure 2. Detection of KHV with a *single* PCR, targeting the DNA KHV band at 290 bp. M: marker 100 bp, (1) Sukabumi sample-1, (2) Sukabumi sample-2, (3) Maninjau Lake sample-1, (4) Maninjau Lake sample-2, (5) IRP2I sample, (6) negative control, (7) positive control



Gambar 3. Deteksi *A. hydrophila* dengan *single* PCR, dengan target pita DNA pada 417 bp. M: marker 100 bp, (1) kontrol negatif, (2) kontrol positif, (3) sampel Sukabumi, (4) sampel IRP21, (5) sampel Danau Maninjau-1.

Figure 3. Detection of *A. hydrophila* with a *single* PCR, targeting the DNA KHV band at 417 bp. M: marker 100 bp, (1) negative control, (2) positive control, (3) Sukabumi sample, (4) IRP21 sample, (5), Maninjau Lake-1 sample.

memberikan hasil berkisar antara 1,84-1,96 dan konsentrasi DNA-nya berkisar 99,5-197,6 ng/mL. Sedangkan untuk hasil pengukuran nilai kemurnian DNA *A. hydrophila* (Tabel 4) memberikan hasil berkisar antara 1,90-2,20 dan konsentrasi DNA nya berkisar 137,1-295,6 ng/mL. Menurut Sambrook *et al.* (2001), hasil isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio antara 1,8-2,0.

Optimasi Duplex PCR

Optimasi dilakukan untuk mendapatkan reaksi *duplex* PCR yang paling optimum dengan melakukan *single* PCR pada tahap awal. Adapun optimasi yang dilakukan meliputi konsentrasi *master mix* yang dipakai, suhu *annealing*, dan waktu/lama *extention*. Optimasi PCR dengan reaksi amplifikasi menggunakan dua pasang primer dengan variasi suhu *annealing*, agar mendapatkan kondisi PCR yang optimal dan

menghasilkan produk PCR spesifik atau terbentuk pita DNA dengan ukuran yang sesuai. Tidak terbentuk dimer primer, *smear* atau *multi band*, dan yang terpenting untuk mencari suhu *annealing* yang tepat agar semua primer dapat bekerja. Suhu optimal *annealing* untuk *duplex* PCR KHV dan *A. hydrophila* ditentukan dengan pemeriksaan visual dengan hasil pita DNA pada *gel agarose*. Suhu optimal *annealing* didefinisikan sebagai suhu *annealing* yang menghasilkan produk PCR spesifik tertinggi sesuai dengan target pita DNA KHV dan *A. hydrophila*. Pada suhu *annealing* 60°C dan 63°C, intensitas pita 290 bp DNA KHV masih terdeteksi dan DNA *A. hydrophila* pada 417 bp menunjukkan pita DNA negatif, dan pada suhu *annealing* dari 67°C kedua gen target negatif (Gambar 4). Sedangkan DNA KHV dan *A. hydrophila*, pita DNA spesifik menunjukkan DNA positif terdeteksi pada suhu *annealing* dari suhu 55°C dan 56°C.

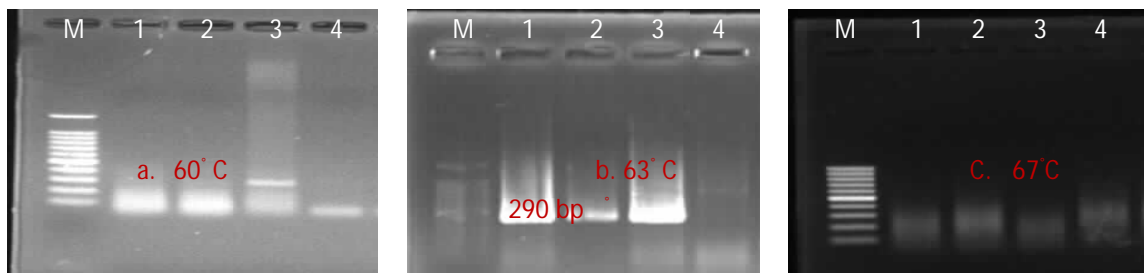
Tabel 5. Hasil pengukuran konsentrasi DNA isolat KHV dan *A. hydrophila* dari ikan mas
Table 5. The results of measurement of KHV and *A. hydrophila* DNA isolate concentrations from common carp

Isolat <i>Isolate</i>	Konsentrasi DNA <i>DNA concentration (ng/mL)</i>	Kemurnian DNA <i>DNA purity (280/260)</i>
KHV-1	99.5	1.85
KHV-2	130.8	1.88
KHV-3	98.2	1.96
KHV-4	97.3	1.83
KHV-5	197.6	1.84
AH-1	295.6	1.86
AH-2	206.9	2.20

Suhu *annealing* optimal dari primer yang digunakan untuk DNA KHV dan *A. hydrophila* adalah pada suhu 55°C (Gambar 5). Gambar 5 menunjukkan visualisasi DNA KHV *A. hydrophila* dari sampel yang terinfeksi ko-infeksi KHV dan bakteri *A. hydrophila*, pita DNA menunjukkan positif virus KHV dan bakteri *A. hydrophila* pada ukuran 290 bp dan 417 bp. Hasil optimasi untuk amplifikasi DNA dengan menggunakan *thermalcycler* dengan suhu dPCR sebagai berikut: pradenaturasi pada suhu 94°C selama dua menit, denaturasi pada suhu 95°C selama satu menit, *annealing* pada suhu, 55°C selama satu menit, dan *extention*

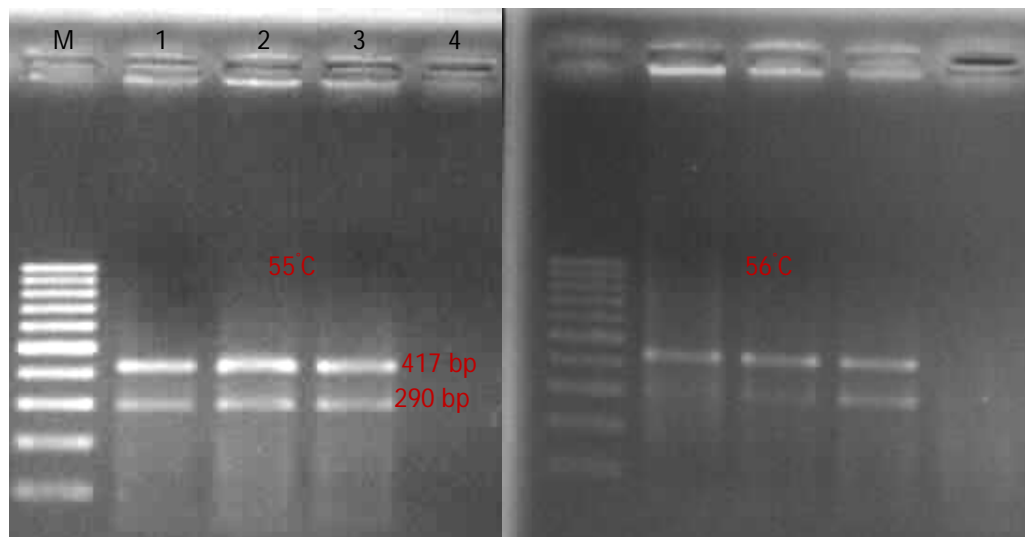
72°C selama satu menit, diikuti siklus amplifikasi 30 dan *final extention* pada suhu 72°C selama lima menit dengan komposisi *master mix* adalah untuk 25 µL/reaksi dengan *master mix* 12,5 µL; *nuclease free water* 6,5 µL; primer 10 pmol untuk *forward* 1 µL, *reverse* 1 µL, dan *template* DNA masing-masing 2 µL.

Pada proses optimasi telah berhasil dilakukan amplifikasi KHV dan *A. hydrophila* secara simultan menggunakan *duplex* PCR di dalam satu campuran reaksi yang sama sehingga akan muncul dua pita pada satu *lane*. Pada tahap ini tidak ditemukan pita non-



Gambar 4. Hasil deteksi *duplex* PCR KHV *A. hydrophila* pada suhu *annealing* (a) 60°C, (b) 63°C, dan (c) 67°C. M: marker (100 bp), (1) sampel-1, (2) sampel-2, (3) kontrol positif pada 290 bp, 417 bp, (4) kontrol negatif (-).

Figure 4. Results of detection of *duplex* PCR KHV *A. hydrophila* at *annealing* temperature (a) 60°C, (b) 63°C, and (c) 67°C. M: marker (100 bp), (1) sample-1, (2) sample-2, (3) positive control at 290 bp, 417 bp, (4) negative control (-).



Gambar 5. Hasil deteksi dPCR KHV *A. hydrophila* pada suhu *annealing* 55°C dan 56°C. M: marker (100 bp), (1) sampel-1, (2) sampel-2, dinyatakan positif (+) bila muncul pita PCR pada 290 bp, 417 bp, (3) kontrol positif pada 290 bp, 417 bp, (4) kontrol negatif (-), tidak menghasilkan pita.

Figure 5. Results of detection of dPCR of KHV *A. hydrophila* at *annealing* temperatures of 55°C and 56°C. M: marker (100 bp), (1) sample-1, (2) sample-2, stated of positive (+) if the PCR band appears at 290 bp, 417 bp, (3) positive control at 290 bp, 417 bp, (4) negative control (-), does not result of band.

spesifik yang berukuran kecil dan ukuran amplicon untuk masing-masing target sudah sesuai. Hasil ini disebabkan karena penurunan suhu *annealing*, kesesuaian konsentrasi primer, dan volume DNA *template*. Konsentrasi primer yang terlalu rendah atau yang terlalu tinggi dapat menyebabkan tidak terjadinya proses amplifikasi (Harini *et al.*, 2008). Selain itu, faktor utama yang membedakan antara PCR single dan *duplex* adalah penambahan jumlah primer dalam satu reaksi, yaitu satu pasang primer untuk PCR *single* dan dua pasang primer untuk *duplex* PCR (Rizal *et al.*, 2018). Metode deteksi PCR yang digunakan dalam pendeteksian keberadaan virus dan bakteri sangat berperan dalam melakukan pendeteksian dini dan cepat terhadap keberadaan lebih dari satu penyakit yang menyerang ikan mas. Deteksi ko-infeksi virus dan bakteri penyebab penyakit KHV-MAS pada ikan mas adalah dengan menggunakan PCR reaksi tunggal yang memerlukan waktu kurang lebih tiga jam dengan 40 siklus sedangkan dengan dPCR hanya membutuhkan waktu hanya dua jam dengan 30 siklus.

Limit Deteksi Duplex KHV *A. hydrophila*

Limit of detection (LOD) adalah nilai konsentrasi terendah deteksi yang dapat dilakukan. Nilai LOD ditentukan dengan melihat konsentrasi minimum DNA KHV dan *A. hydrophila* yang dapat tervisualisasi oleh elektroforesis dan menunjukkan band sepanjang 247 bp dan 290 bp. Hasil dari masing-masing konsentrasi DNA KHV *A. hydrophila* dengan mengencerkan konsentrasi DNA tersebut menjadi beberapa serial berikut; 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL, 100 pg/mL, 10 pg/mL, 1 pg/mL, 100 fg/mL, 10 fg/mL, 1 fg/mL, dan 100 Ag/mL. Sebagai target dPCR dalam menentukan batas deteksi dari pengujian yang akan dilakukan (Gambar 6).

Gambar 6 merupakan hasil visualisasi PCR dengan konsentrasi 100 ng/mL sampai 100 Ag/mL, menunjukkan bahwa band atau pita hasil amplifikasi dPCR yang masih terlihat tebal dan jelas terdeteksi pada konsentrasi 1 pg/mL.

KESIMPULAN

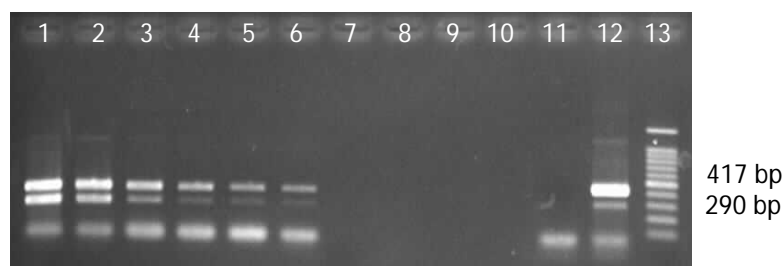
Ko-infeksi oleh KHV dan *A. hydrophila* penyebab penyakit KHV-MAS pada ikan mas dapat dideteksi simultan melalui pengujian menggunakan PCR dengan suhu optimasi pradenaturasi pada suhu 94°C selama dua menit, denaturasi pada suhu 95°C selama satu menit, *annealing* pada suhu, 55°C selama satu menit, dan 72°C selama satu menit, diikuti siklus amplifikasi 30 dan *final extention* pada suhu 72°C selama lima menit dengan komposisi *master mix* adalah untuk 25 μ L/reaksi dengan *master mix* 12,5 μ L; *nuclease free water* 6,5 μ L; primer 10 pmol untuk *forward* 1 μ L, *reverse* 1 μ L dan *template* DNA masing-masing 2 μ L. Metode *duplex* PCR untuk deteksi simultan kedua patogen adalah salah satu metode yang dapat diaplikasikan untuk deteksi ko-infeksi virus dan bakteri dalam satu reaksi PCR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian dibiayai oleh Anggaran Pendapatan Biaya Negara (APBN) 2016. Penulis ucapkan terima kasih kepada Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP21), Depok, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan (BRPBATPP), Bogor. Penulis juga mengucapkan terima kasih pada Muslikha, Ainin M., Ahmad Wahyudi, dan Johan Afandi yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

Belák, S., Thorén, P., LeBlanc, N., & Viljoen, G. (2009). Advances in viral disease diagnostic and molecu-



Gambar 6. Visualisasi DNA konsentrasi; (1) 100 ng/mL, (2) 10 ng/mL, (3) 1 ng/mL, (4) 100 pg/mL, (5) 10 pg/mL, (6) 1 pg/mL, (7) 100 fg/mL, (8) 10 fg/mL, (9) 1 fg/mL, (10) 100 Ag/mL, (11) kontrol negatif, (12) kontrol positif, (13) M; Marker 100 Bp.

Figure 6. Visualization of DNA concentration; (1) 100 ng/mL, (2) 10 ng/mL, (3) 1 ng/mL, (4) 100 pg/mL, (5) 10 pg/mL, (6) 1 pg/mL, (7) 100 fg/mL, (8) 10 fg/mL, (9) 1 fg/mL, (10) 100 Ag/mL. (11) negative control, (12) positive control. (13) M; Marker 100 Bp.

- lar epidemiological technologies. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 9(4), 367-381.
- Dooley, J., Lallier, R., Shaw, D.H., & Trust, T.J. (1985). Electrophoretic and immunochemical analyses of the lipopoly saccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.*, 164(1), 263-9.
- Gilad, O., Yun, S., Andree, K.B., Adkison, M.A., Way, K., Willits, N.H., Bercovier, H., & Hedrick, R.P. (2003): Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, the koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J. Gen. Virol.*, 84, 2661-2668.
- Harini, S.S., Leelombik, M., Kameshwari, M.N.S., & Sathyanarayana, N. (2008). Optimization of DNA isolation and PCR-RAPD methods for molecular analysis of *urginea indica* Kunth. *International Journal of Integrative Biology*, 2, 138-144.
- Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J.V., Marty, G.D., Nordhausen, R.W., Kebus, M.J., Bercovier, H., & Eldar, A. (2000). A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12, 44-57.
- Office International des Epizooties (OIE). (2016). Koi herpesvirus disease. 2 Maret 2016; 17 hlm. <http://www.oied.int>, diunduh 4 Agustus 2016.
- Nam, I.Y. & Joh, K. (2007). Rapid detection of virulence factor of *Aeromonas* isolate from a trout farm by hexaplex-PCR. Departements of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies, Young-In, Republic of Korea. *The Jurnal of Microbiology*, 4(45), 297-304.
- Pikarsky, E. (2004). Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J. Virol.*, 78, 9544-9551.
- Perelberg, A., Smirnov, M., Hutoran, M., Diamant, A., Bejerano, Y., & Kotler, M. (2003). Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 55(1), 5-12.
- Rizal, A.A., Risa, T., April, H.W., & Dyah, H.S. (2018). Deteksi parasit darah pada sapi perah berdasarkan analisis PCR Duplex. *Acta Vet. Indonesian*, 6(2), 48-55.
- Ronen, A., Perelberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Mand, S., & Kotler, M. (2003). Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine*, 21, 4677-4684.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. (2001). Molecular cloning; A laboratory manual. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, xxvii, Vol. 3.
- Thanananta, N. & Thanananta, T. (2008). Detection of *E. coli* in water using duplex polymerase chain reaction technique. *Thai Journal of Genetics*, 1(2), 109-113.
- Yasmon, A., Yusmania, Karuniawati, A., & Bela, B. (2010). Simultaneous detection of *Legionella* species and *Legionella pneumophila* by duplex PCR (dPCR) assay in cooling tower water samples from Jakarta, Indonesia. *Med. J. Indones.*, 19(4), 223-227.
- Ye, Y.W., Fan, T.F., Li, H., Lu, J.F., Jiang, H., & Hu, W. (2013). Characterization of *Aeromonas hydrophila* from hemorrhagic diseased freshwater fishes in Anhui Province, China. *Int. Food Res. J.*, 20, 1449-52.
- Yuasa, K., Motohiko, S., Jun, K., Takafumi, I., & Takaji, I. (2005). Improvement of a PCR method with the Sph I-5. Primer set for the detection of koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathology*, 40(1), 37-39.