

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

UJI KINERJA ALAT *THERMALCYCLER* DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* PADA IDENTIFIKASI *KOI HERPES VIRUS* PADA IKAN MAS, *Cyprinus carpio*

Dini Sahfitri Lubis dan Supriyanto

Balai Riset Pemuliaan Ikan

Jl. Raya 2 Sukamandi, Subang, Jawa Barat 41263

E-mail: bpsukamandi@kkp.go.id

ABSTRAK

Polymerase chain reaction (PCR) adalah metode untuk amplifikasi (perbanyak) primer *oligonukleotida* secara enzimatik berdasarkan urutan DNA spesifik. Teknik ini mampu memperbanyak sebuah urutan 105-106 kali lipat dari jumlah nanogram DNA *template*. Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk mengetahui apakah alat *thermal cyclers* tersebut dapat digunakan dengan baik untuk memperoleh hasil yang valid dalam melakukan pengujian deteksi KHV. Deteksi virus KHV dilakukan pada genom DNA hasil ekstraksi yang diamplifikasi dengan menggunakan *Maxima hot start green PCR master mix* dan diamplifikasi dengan *thermal cyclers* PCR (*Bio Rad*). Primer yang digunakan adalah F:5' –GAC ACC ACA TCT GCA AGG AG-3' dan R:5' –GAC ACA TGT TAC AAT GGT CGC-3' dengan ukuran fragmen 290 bp. Uji kinerja pada alat *thermal cyclers* (*Bio Rad*) menunjukkan performa hasil yang baik. Hasil visualisasi fragmen DNA KHV pada keseluruhan *well* teramplifikasi sempurna.

KATA KUNCI: KHV; PCR; DNA; uji kinerja alat *thermal cyclers*

PENDAHULUAN

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan salah satu metode deteksi cepat *koi herpes virus* (KHV). Metode PCR ini sangat sensitif. Sensitivitas tersebut membuatnya dapat digunakan untuk melipat gandakan satu molekul DNA. Konsentrasi dan kualitas DNA dipengaruhi oleh keberhasilan pada saat melakukan ekstraksi DNA. Kegiatan uji kinerja alat ini bertujuan untuk mengetahui hasil amplifikasi pada 96 *well* sampel yang sama dan melihat konsistensi amplikon (produk PCR) masing-masing *well*, di mana konsistensi amplikon dipengaruhi oleh fluktuasi suhu. Jika pola pita DNA pada 96 *well* tampak jelas pada ukuran 290 bp berarti dapat diasumsikan bahwa alat *thermal cyclers* masih dalam kondisi baik dan layak pakai.

Virus KHV dideteksi menggunakan metode PCR sesuai dengan SNI 7547:2009 (BSN, 2009). Konsentrasi DNA sampel sebesar 0,01-0,1 µg di mana setiap µL 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. Keberhasilan analisis PCR sangat dipengaruhi oleh karakteristik DNA genom yang meliputi kemurnian, konsentrasi, dan ukuran *template*. Menurut Weeden *et al.* (1992), konsentrasi DNA cetakan yang terlalu kecil sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup/tidak jelas. Jumlah dan kuantitas DNA dapat diketahui dengan menggunakan alat spektrofotometer atau

dengan melihat intensitas molekul DNA di dalam gel. Keberadaan DNA dalam suatu organisme dapat diketahui dengan dua cara yaitu secara kualitatif dengan metode elektroforesis gel agarose dan secara kuantitatif dengan metode spektrofotometri (Larasati, 2011).

Pengujian deteksi virus KHV pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) di laboratorium Balai Riset Pemuliaan Ikan adalah parameter yang telah diakreditasi oleh Komite Akreditasi Nasional (KAN) dengan menggunakan metode PCR. *Thermal cyclers* merupakan alat utama yang digunakan untuk mendeteksi virus KHV sehingga uji kinerja alat harus dilakukan secara rutin untuk mengetahui kepastian bahwa kondisi alat saat dilakukan pengujian dalam kondisi baik dan layak uji. Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk mengetahui apakah alat *thermal cyclers* tersebut dapat digunakan dengan baik untuk memperoleh hasil yang valid dalam melakukan pengujian deteksi KHV.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan pada kegiatan uji kinerja alat *thermal cyclers* ini adalah sampel positif KHV, primer KHV F:5' –GAC ACC ACA TCT GCA AGG AG-3 dan R:5' –GAC ACA TGT TAC AAT GGT CGC-3 (OIE, 2009), *Maxima hot start green PCR master mix* (Thermo Scientific), *Nuclease free water* (Applichem), *agarose gel 2%* (*ivantis*), *gel red* (*biotium*), TAE (*Tris*

Acid EDTA) 10x (Vivantis), dan *Vivantis VC 100 bp DNA Ladder Plus* (Vivantis).

Alat-alat yang digunakan pada kegiatan identifikasi virus KHV ini adalah *thermal cycler* (Bio Rad), *micro pipet*, *microtip*, *vortex*, *mini horisontal elektroforesis*, dan *gel doc UV transilluminator*.

Metode

PCR

Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan mengikuti prosedur deteksi KHV SNI 7547:2009 (BSN, 2009). Deteksi virus KHV dilakukan pada genom DNA hasil ekstraksi yang diamplifikasi dengan menggunakan *Maxima hot start green PCR master mix* dan diamplifikasi dengan *thermal cycler PCR* (Bio Rad). Komposisi larutan yang digunakan untuk proses amplifikasi PCR adalah 8,5 μ L *Maxima hot start green PCR master mix*, 1 μ L primer (20 pmol/ μ L), 2 μ L DNA masing-masing sampel dan ditambahkan *nuclease free water* sehingga mencapai total volume 25 μ L. Primer yang digunakan adalah F:5' –GAC ACC ACA TCT GCA

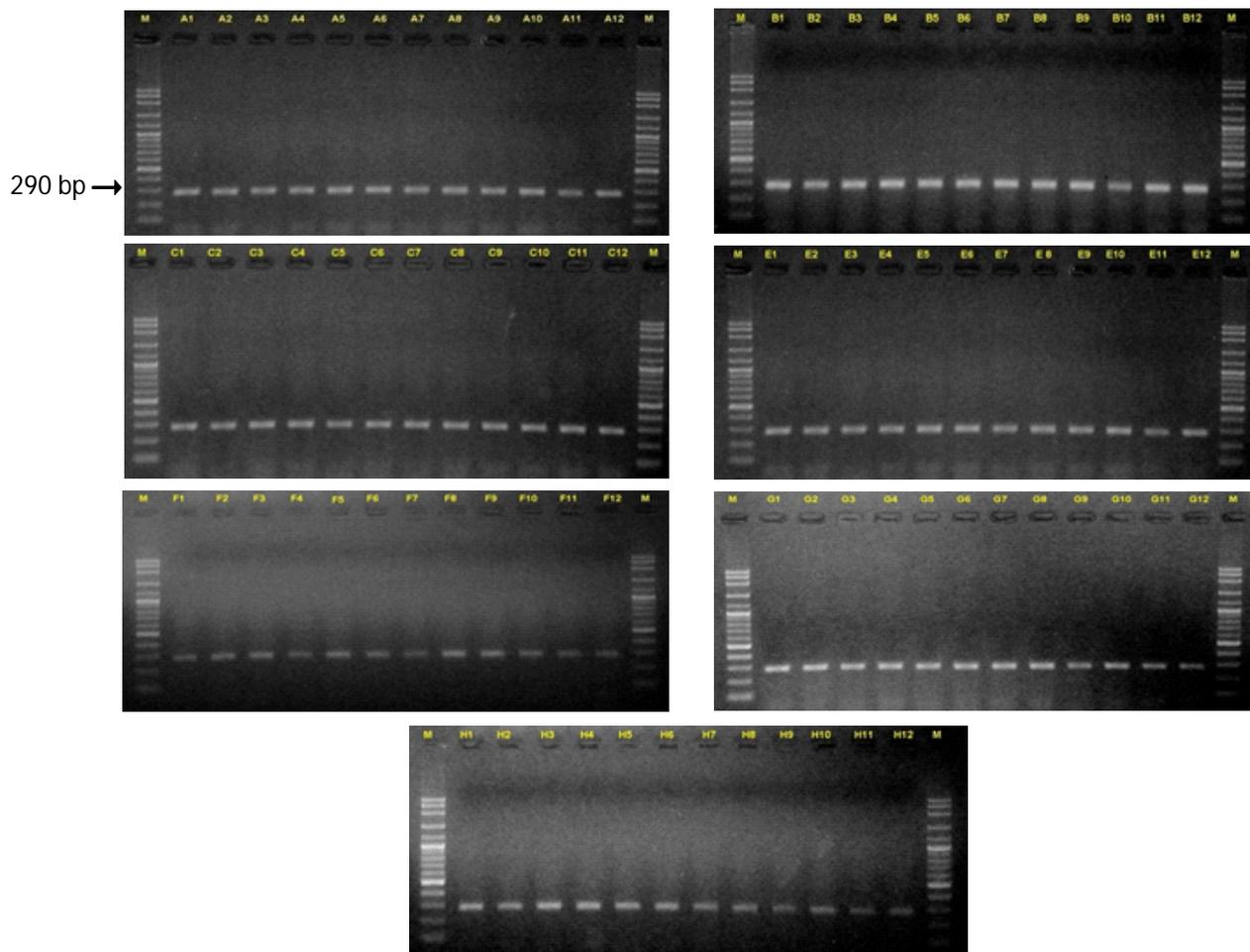
AGG AG-3' dan R:5' –GAC ACA TGT TAC AAT GGT CGC-3' dengan ukuran fragmen 290 bp (OIE, 2009). Proses amplifikasi PCR dilakukan dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 55°C selama 30 detik dan pemanjangan pada suhu 72°C selama tujuh menit, sebanyak 40 siklus.

Elektroforesis

Amplikon (produk hasil PCR) dapat divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis pada gel agarose (Vivantis) 2,0% dalam larutan TAE 1x selama 35 menit pada tegangan 100 V. Sebanyak 6 μ L volume amplikon dimasukkan ke dalam sumur-sumur media agar. Sebagai penanda (*marker*) digunakan *Vivantis VC 100 bp DNA Ladder Plus* (Vivantis) sebanyak 2 μ L. Gel diberi pewarna gel red (*Biotium*) dengan volume 2 μ L. Hasil elektroforesis DNA divisualisasi menggunakan *gel doc UV transilluminator*.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil uji kinerja alat *thermal cycler* (Bio Rad) disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji kinerja alat *thermal cycler* merk Bio Rad pada 96 well (A1–A12, B1–B12, C1–C12, D1–D12, E1–E12, F1–F12, G1–G12, dan H1–H12) menggunakan metode PCR dari sampel positif (+) KHV ikan mas. M merupakan DNA *marker* (100–3.000 bp, Vivantis). Ukuran fragmen virus KHV 290 bp.

Dari rangkaian kegiatan uji kinerja alat yang dilakukan telah didapatkan hasil yang jelas pada 96 *well*. Laboratorium yang pernah melakukan uji performa alat *thermal cyclor* dengan menggunakan sampel positif mendapatkan hasil produk PCR 100% sama jelas dari keseluruhan *well*. Di mana uji performa yang dilakukan pada enam buah alat *thermal cyclor* menunjukkan hasil produk PCR yang jelas, konsisten dan tidak ada variasi produk PCR pada masing-masing *well* (Saunders *et al.*, 2001; Orlando *et al.*, 2006).

KESIMPULAN

Uji kinerja pada alat *thermal cyclor* (Bio Rad) menunjukkan performa hasil yang baik. Hasil visualisasi fragmen DNA KHV pada keseluruhan *well* teramplifikasi sempurna. DNA fragmen muncul pada ukuran 290 bp dan menunjukkan hasil yang sama jelas satu sama lain, sehingga dapat disimpulkan bahwa 96 *well* pada alat ini masih layak digunakan dan menghasilkan data yang valid dalam melakukan pengujian deteksi virus KHV pada ikan mas (*Cyprinus carpio*).

DAFTAR ACUAN

Badan Standarisasi Nasional [BSN]. (2009). SNI 7547:2009. Deteksi Virus KHV dengan menggunakan metode PCR.

Larasati, P. (2011). Quantifikasi DNA dan analisis kualitas. <http://puspalarasati.wordpress.com>. Diakses: 19 Mei 2021.

OIE. (2009). Manual of diagnostic test for aquatic animals. Koi Herpes Virus Disease. Paris.

Orlando, C., Verderio, P., Maatman, R., Dannenberg, J., Ramsden, S., Neumaier, M., Domenica Taruscio, D., Falbo, V., Jansen, R., Casini-Raggi, C., Malentacchi, F., Marubini, E., Pizzamiglio, S., Libeer, J. C., Palicka, M., & Pazzagli, M. (2007). *EQUAL-qual*: A European program for external quality assessment of genomic DNA extraction and PCR amplification. *Clinical Chemistry*, 53(7), 1349-1357.

Saunders, G.C., Dukes, J., Parkers, C.H., & Cornett, J.K. (2001). Interlaboratory study on thermal cyclor performance in controlled PCR and random amplified polymorphic DNA analyses. *Clinical Chemistry*, p. 147-155.

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.