

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

DETEKSI KOI HERPES VIRUS DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION

Dini Sahfitri Lubis dan Diah Artati

Balai Penelitian Pemuliaan Ikan

Jl. Raya 2 Sukamandi, Patokbeusi, Subang, Jawa Barat 41263

E-mail: publikasi.bppi@gmail.com

ABSTRAK

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 melipatgandakan satu molekul DNA. Konsentrasi dan kualitas DNA dipengaruhi oleh keberhasilan pada saat melakukan ekstraksi DNA. Kegiatan percobaan ini bertujuan untuk mengetahui hasil deteksi virus KHV dengan metode PCR. Keberhasilan analisis PCR sangat dipengaruhi karakteristik DNA genom yang meliputi kemurnian, konsentrasi dan ukuran *template*. Virus KHV dideteksi menggunakan metode PCR sesuai dengan SNI 7547:2009. Hasil kegiatan deteksi virus KHV menggunakan PCR dari sampel kode I.230–I.286 dapat memvisualisasikan hasil PCR dengan positif KHV dengan ukuran fragmen DNA 290 bp dengan baik. Dapat dilihat dari 57 sampel yang telah diuji memiliki hasil yang berbeda-beda. Hasil uji yang diperoleh yaitu 32 sampel ikan positif terinfeksi KHV dan 25 sampel negatif KHV.

KATA KUNCI: koi herpes virus; *deoxyribo nucleic acid*; *polymerase chain reaction*

PENDAHULUAN

Koi herpes virus (KHV), merupakan penyakit infeksi yang menyerang populasi ikan mas dan koi. Wabah ini berlangsung mulai awal tahun 2002, dan berkembang menjadi *epizootik* ketika terjadi wabah penyakit di Blitar pada bulan Maret 2002 dan berlangsung hingga beberapa bulan kemudian. Wabah KHV telah menghancurkan budidaya ikan mas dan koi di Indonesia terutama Jawa, Bali, dan Sumatera bagian Selatan, karena menyebabkan kematian hingga 100% dalam masa satu minggu setelah muncul gejala klinis. Nilai kematian tersebut jauh di atas rata-rata kematian yang disebabkan oleh wabah penyakit yang pernah terjadi sebelumnya (Irianto, 2005).

Dari hasil pengamatan diagnosa tingkah laku ikan yang terinfeksi KHV, terlihat ikan megap-megap dan berenang di permukaan, pergerakan ikan tidak terkoordinasi, sangat lamban, dan terpisah dari kelompok ikan sehat lainnya. Gejala klinis ikan yang terinfeksi pun akan terlihat, menunjukkan tanda-tanda seperti, produksi lendir yang berlebih sebagai respons fisiologis hadirnya patogen, insang ikan yang berwarna pucat dan akan terdapat bercak putih atau coklat, selanjutnya menjadi rusak, geripis pada ujung tapis insang dan akhirnya membusuk, akan menyebabkan kerusakan jaringan yang serius, serta kematian sel yang berat. Terjadinya pendarahan di sekitar pangkal

dan ujung sirip, serta permukaan badan lainnya. Sering pula ditemukan adanya kulit yang melepuh dan bahkan luka yang diikuti infeksi sekunder oleh bakteri, jamur dan parasit. Hati dan ginjal berwarna pucat dan mengalami kerusakan selanjutnya mengalami kematian (Taukhid *et al.*, 2003)

Pada awalnya, pemeriksaan terhadap ikan yang sakit atau mati tidak dapat mengisolasi virus dan dengan pemeriksaan menggunakan mikroskop elektron juga tidak mampu melihat adanya *virion*. Tetapi, pemeriksaan lanjut menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*), dari sampel yang ada dapat diketahui kehadiran KHV yang menyebabkan kematian massal tersebut (Irianto, 2005). Hasil diagnosa KHV lebih difokuskan pada penggunaan PCR, dikarenakan teknik PCR memiliki sensitivitas yang tinggi dan sudah dapat dilakukan lebih dari 10 laboratorium. Dengan mendiagnosa menggunakan teknik PCR dapat diketahui dalam waktu yang relatif singkat, dan kesimpulannya mudah diinterpretasikan secara visual. Metode ini biasa digunakan 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*. Selain itu, PCR juga memiliki kemampuan dalam melipatgandakan suatu fragmen DNA. Namun demikian, teknik ini juga memiliki kekurangan, teknik PCR memiliki sensitivitas yang tinggi, maka

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/RNA (Tauhid *et al.*, 2003). Tujuan kegiatan ini adalah untuk mengetahui kondisi ikan terinfeksi virus KHV lebih awal agar dapat segera diambil tindakan untuk pencegahan penyebaran virus KHV kepada ikan lainnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

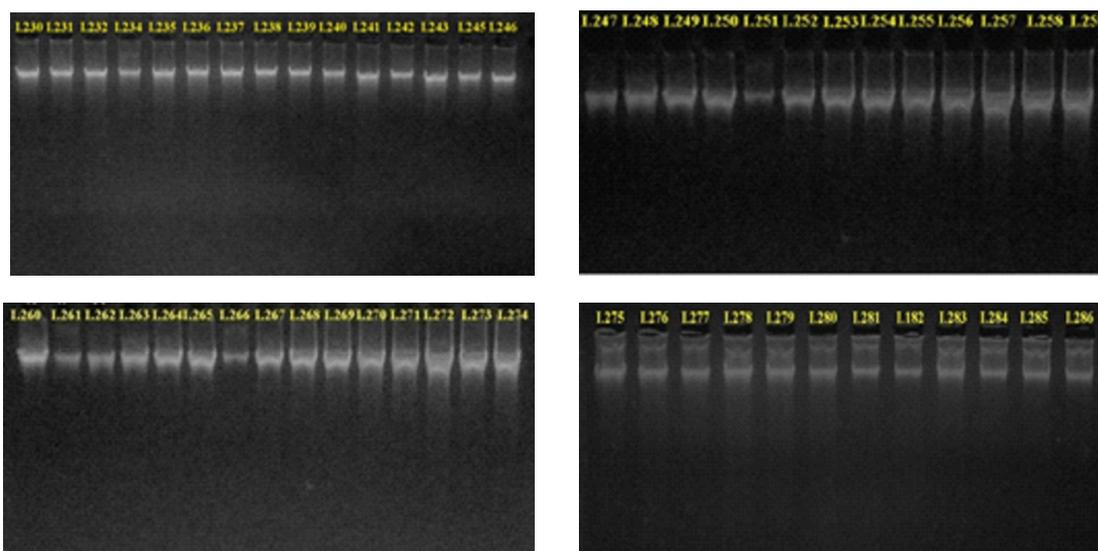
Bahan-bahan yang digunakan pada kegiatan deteksi identifikasi KHV ini adalah: sampel uji (insang ikan mas), kit ekstraksi DNA *gene JET genomic DNA purification* (thermo scientific), alkohol 50% (Merck), primer KHV F:5' –GAC ACC ACA TCT GCA AGG AG-3 dan R:5' –GAC ACA TGT TAC AAT GGT CGC-3 (OIE, 2009), *maxima hot start green* (thermo scientific), *nuclease free water* (Applichem), *agarose gel 2%* (vivantis), *gel red* (biotium), TAE (*Tris Acid EDTA*) 10x (vivantis), *loading dye* (vivantis), dan *vivantis VC 100 bp DNA Ladder Plus* (Vivantis). Alat-alat yang digunakan pada kegiatan identifikasi virus KHV ini adalah: timbangan analitik, gunting, 1,5 mL *microcentrifuge tube*, *collection tube*, *Gene JET genomic DNA purification columns*, micropipets, microtips, vortex, centrifuge, *waterbath/oven*, *thermal cycler*, perangkat elektroforesis, dan UV transilluminator.

Metode

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan kit *gene JET genomic purification* (thermo scientific) sesuai protokol yang tersedia. Protokol meliputi tahapan lisis sel, presipitasi DNA, pengikatan DNA pada *column*, pencucian, dan elusi DNA. Secara singkat, insang ikan mas sebanyak 20 mg dimasukkan ke dalam tabung *microcentrifuge tube* 1,5 mL dan ditambahkan 180 μ L *digestion solution* dan 20 μ L proteinase-K. Sampel diinkubasi pada suhu 56°C selama tiga jam. RNase ditambahkan sebanyak 20 μ L dalam larutan, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Sampel kemudian ditambahkan 200 μ L *lysis solution* dan divortex sampai homogen selama 15 detik. Sebanyak 400 μ L etanol 50% ditambahkan ke dalam sampel, selanjutnya sampel dipindahkan ke dalam *column*, disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 x g selama satu menit. DNA yang mengikat pada *column* dicuci sebanyak dua kali dengan 500 μ L larutan *wash buffer* dan disentrifugasi pada 8.000 x g selama tiga menit (pencucian pertama) dan 12.000 x g selama tiga menit untuk pencucian kedua. DNA dilarutkan dengan menambahkan 50-200 μ L *elution buffer*, dan disentrifugasi 8.000 x g selama satu menit.

Kualitas Genom DNA yang diperoleh dicek dengan menggunakan gel agarose 2% dengan metode elektroforesis. Genom DNA dikatakan murni dari pengotor secara kualitas, dapat dilihat dari hasil



Gambar 1. Kualitas genom hasil ekstraksi DNA dengan elektroforesis (sampel 1.230-1.286)

elektroforesis genom yang bersih dan bebas dari pengotor seperti pada Gambar 1.

Proses 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 *kit gene JET genomic purification* (thermo scientific) dan diamplifikasi dengan *mycycler PCR* (biorad). Komposisi larutan yang digunakan untuk proses amplifikasi PCR adalah 8,5 µL master kit PCR, 1 µL primer (20 pmol/µL), 2 µL DNA genom dan ditambahkan *nuclease free water* sehingga mencapai total volume 25 µL. Primer yang digunakan adalah F:5' –GAC ACC ACA TCT GCA AGG AG-3, 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

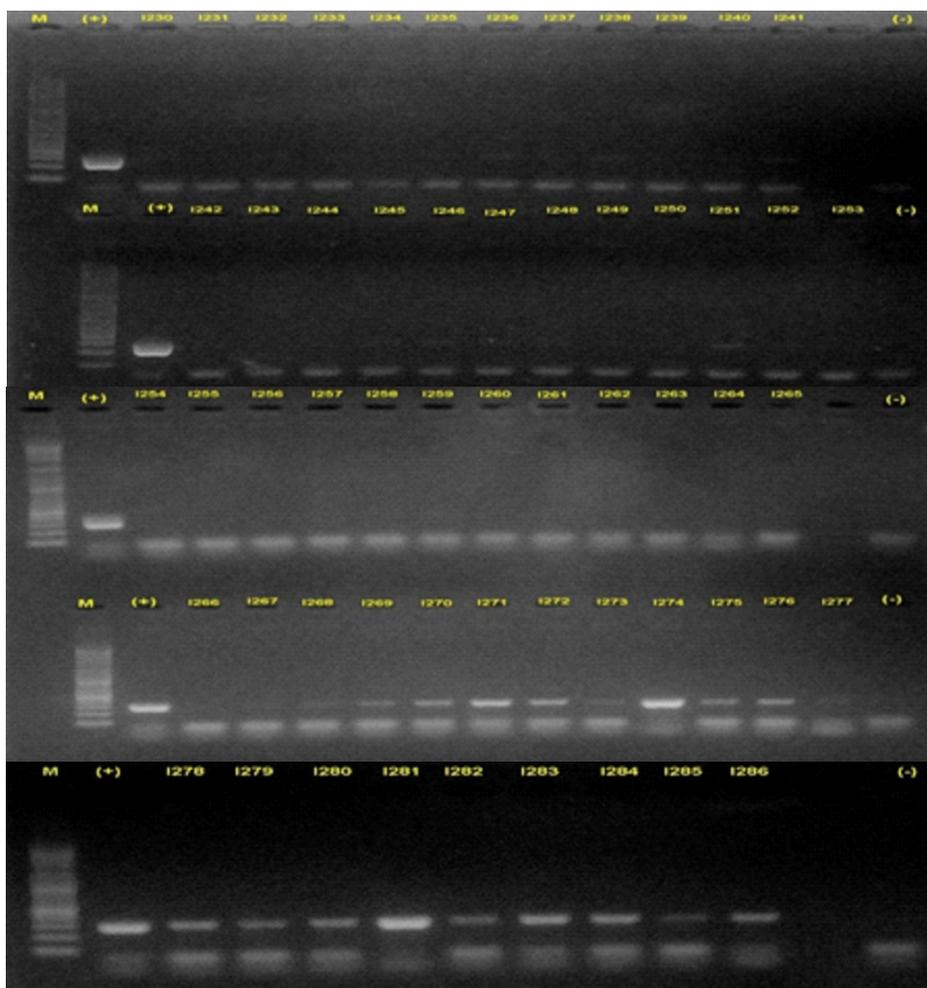
55°C selama 30 detik dan pemanjangan pada suhu 72°C selama tujuh menit, sebanyak 40 siklus.

Proses Elektroforesis

Hasil PCR dipisahkan dengan menggunakan elektroforesis pada gel agarose (*vivantis*) 2,0% dalam larutan TAE 1x selama 60 menit pada tegangan 60 volt, 400 mA selama 35 menit. Sebanyak 6 µL volume ampikon dimasukkan ke dalam sumur-sumur media agar. Sebagai penanda (*marker*) digunakan *vivantis VC 100 bp DNA ladder plus* (*vivantis*). Diberikan Gel diberi pewarna gel red (*biotium*) dengan konsentrasi 2 µL. Hasil elektroforesis DNA divisualisasi menggunakan UV transilluminator.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil kegiatan ini menunjukkan virus KHV dapat dideteksi dengan metode PCR, dengan ukuran fragmen DNA 290 bp. Terlihat dari 57 sampel yang dideteksi



Gambar 2. Deteksi virus KHV dengan menggunakan metode PCR (sampel 1.230-1.286 = individu dari ikan mas; (+) adalah kontrol positif; (-) adalah kontrol negatif; M merupakan DNA marker (100-3.000 bp)) ukuran fragmen virus KHV 290 bp

memiliki hasil 32 sampel yang positif (+) terinfeksi virus KHV (56%) dan 25 sampel yang negatif (-) tidak terinfeksi virus KHV (44%).

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 sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup atau 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). Deteksi virus KHV yang dilakukan pada kegiatan ini hanya bersifat sebagai uji kualitatif, untuk mengetahui suatu sampel terinfeksi virus KHV atau tidak, tidak untuk mengetahui konsentrasi DNA sampel seperti yang dilakukan Larasati (2011).

Konsentrasi DNA sebesar 0,01-0,1 μg setiap μL larutan *template* sudah cukup baik untuk PCR namun yang terpenting 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).

Metode PCR ini sensitif sehingga dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA. Metode ini juga sering digunakan untuk memisahkan gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuen genom. Dengan menggunakan metode PCR, dapat diperoleh melipatgandakan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^{-19} mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit. Hal ini menunjukkan

bahwa melipatgandakan suatu fragmen DNA dapat dilakukan secara cepat. Kelebihan lain metode PCR adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, misalnya dengan DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5 μL , oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM dan reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50-100 μL . DNA cetakan yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan sekuen DNA dalam genom bakteri dengan mencampurkan kultur bakteri di dalam tabung PCR (Yuwono, 2006).

KESIMPULAN

Penyakit koi herpes virus dapat dideteksi virus KHV dengan baik menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode PCR sensitif dan efektif digunakan untuk deteksi virus KHV. Produk PCR dapat dikonfirmasi melalui pita DNA pada berat molekul 290 bp. Terdapat 32 sampel terinfeksi virus KHV dari 57 sampel yang telah diuji.

DAFTAR ACUAN

- Irianto, A. (2005). Patologi ikan teleostei. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta, 122-123 hlm.
- Larasati, P. (2011). Quantifikasi DNA dan analisis kualitas. <http://puspalarasati.wordpress.com>. Diakses tanggal 23 Oktober 2012.
- Sambrook, J., Fritsch, J., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbour: Laboratory Press.
- Taukhid, D., Rukmono, & Mujiutami, E. (2003). Kematian massal ikan mas di Waduk Jatiluhur. Laporan Teknis. Jakarta, 30 Juli 2003.
- Yuwono, T. (2006). Teori dan aplikasi PCR. Penerbit Andi. Yogyakarta.