

APLIKASI *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) KONVENSIONAL DAN *REAL TIME* PCR UNTUK DETEKSI *WHITE SPOT SYNDROME VIRUS* PADA KEPING

Rina Novita Pranawaty*, Ibnu Dwi Buwono** dan Evi Liviawaty**

*) Alumni Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Unpad

**) Staf Dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Unpad

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mencari metode deteksi *White Spot Syndrome Virus* yang terbaik pada kepiting sebagai *carrier* WSSV yang menginfeksi udang windu dengan menggunakan PCR Konvensional dan *Real Time* PCR. Penelitian ini menggunakan metode survei dengan analisis deskriptif kualitatif. Sampel kepiting diperoleh dari tambak udang windu di Kecamatan Pasekan dan Karangsong, Kabupaten Indramayu. Isolasi DNA menggunakan Kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), yang dilanjutkan dengan amplifikasi dan elektroforesis (PCR konvensional) serta kuantifikasi amplifikasi tanpa elektroforesis (*real time* PCR). Hasil penelitian menunjukkan 12 sampel positif WSSV terdeteksi dengan *real time* PCR, dibandingkan dengan PCR konvensional yang hanya mendeteksi 7 sampel positif WSSV dari total 14 sampel uji. Hal ini membuktikan *Real Time* PCR lebih mampu mendeteksi keberadaan WSSV pada kepiting tanpa gejala klinis dibandingkan dengan PCR konvensional.

Kata kunci : Kepiting, PCR Konvensional, Real Time PCR, WSSV

ABSTRACT

APPLICATION OF CONVENTIONAL POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND REAL TIME PCR FOR DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN CRAB

This study aimed to find the best White Spot Syndrome Virus detection methods in crabs as a carrier of WSSV that infect shrimps using conventional PCR and Real Time PCR. This study used survey methods with qualitative descriptive analysis. Crab samples were obtained from shrimp ponds at subdistrict of Pasekan and Karangsong, Indramayu regency. DNA isolation using *Wizard Genomic DNA Purification* Kit (Promega), followed by amplification and electrophoresis (conventional PCR) and method of amplification and quantification without electrophoresis (*real time* PCR). The results were 12 positive samples with WSSV detected with *real time* PCR method compared to conventional PCR which detected only 7 positive samples of WSSV from 14 test samples. This proves *real time* PCR was better to detect the presence of WSSV in crabs without clinical symptoms compared to conventional PCR.

Key words : Conventional PCR, Crab, Real Time PCR, WSSV

PENDAHULUAN

Selama satu dasawarsa terakhir, produksi budidaya udang windu secara nasional mengalami penurunan menjadi 70 ribu ton per tahun. Penurunan produksi udang windu dalam kurun sepuluh tahun terakhir disebabkan oleh serangan penyakit pada udang terutama oleh *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) (Burhaidin 2010 dalam Sahana 2010).

Serangan virus *white spot* dapat menyebabkan udang menjadi lemah dan gejala klinis yang nampak antara lain usus kosong, tubuh pucat, dan kemerah-merahan serta muncul bercak putih dengan diameter 0,5-2 mm pada bagian *cephalotorax* sampai menyebar keseluruh tubuh. Virus ini biasanya menyerang udang windu pada tahap pembesaran yaitu pada umur 1-2 bulan dan virus dapat menyebar ke seluruh udang yang terdapat dalam tambak hanya dalam waktu 2 hingga 7 hari dan dapat menyebabkan kematian 70% hingga 100% (Tompo dkk 2002 dalam Octaviana 2005).

Penularan atau penyebaran penyakit WSSV dapat disebabkan oleh adanya organisme *carrier*, yaitu organisme pembawa penyakit yang dapat menularkan penyakit pada organisme lainnya, tetapi organisme *carrier* tersebut tidak menunjukkan gejala klinis penyakitnya. Penularan penyakit secara horizontal pada udang windu melalui organisme *carrier* seperti rebon, udang putih, kepiting dan udang windu itu sendiri (Sumawidjadja 2001 dalam Apriliza 2010).

Diagnosa suatu penyakit dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain dengan isolasi *agent* penyebab penyakit tersebut dan analisa morfologinya, deteksi antibodi yang dihasilkan dari infeksi dengan teknik *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), dan deteksi gen dari *agent* pembawa penyakit tersebut dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Aprijani dan Elfaizi 2004).

Salah satu teknik yang banyak diaplikasikan dan telah berkembang saat ini adalah PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan alat *Thermal Cycler* PCR yang mampu mengamplifikasi fragmen DNA secara *in vitro*. Dalam perkembangannya, telah dikembangkan teknik Realtime PCR yang mampu mengevaluasi dan melakukan kuantifikasi

secara langsung. Teknik ini dilakukan dengan mengintegrasikan teknik PCR dengan komputer dan perangkat lunak.

Hasil amplifikasi DNA dengan PCR konvensional, pengamatan keberadaan DNA dilakukan pada akhir reaksi dengan menggunakan gel agarose setelah dilakukan proses elektroforesis. Sedangkan analisa menggunakan *Real Time* PCR memungkinkan untuk dilakukan pengamatan pada saat reaksi berlangsung, keberadaan DNA hasil amplifikasi dapat diamati pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi dari *probe* (penanda). Pada *Real Time* PCR pengamatan hasil tidak lagi membutuhkan tahap elektroforesis, sehingga tidak lagi dibutuhkan gel agarose dan penggunaan *Ethidium Bromide* (EtBr) yang merupakan senyawa karsinogenik (Fatimi 2010).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mencari metode deteksi *White Spot Syndrome Virus* yang terbaik pada kepiting sebagai *carrier* WSSV yang menginfeksi udang windu dengan menggunakan PCR Konvensional dan *Real Time* PCR.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan yaitu kepiting yang diperoleh dari tambak udang windu yang berasal dari Pasekan dan Karangsong, Kabupaten Indramayu. Jumlah sampel yang diambil sebanyak 14 ekor kepiting.

Isolasi DNA Kepiting

Sampel kepiting yang akan diisolasi adalah bagian insang. DNA sampel diisolasi dengan menggunakan Kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega) (2010).

Insang kepiting dipotong dan diambil sebanyak 20 mg, kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 ml. Sampel digerus sampai lembut dengan sumpit plastik steril yang dilakukan diatas permukaan es curai. Ditambahkan 120 μ L EDTA 0,5 M (pH 8,0) dan 500 μ L *Nuclei Lysis Solution*, kemudian digerus kembali di atas es dan ditambah 17,5 μ L Proteinase K. Diinkubasi didalam waterbath pada suhu 65°C selama 1 jam.

Ditambah 3 μl RNase Solution, kemudian dicampur dengan diflick. Diinkubasi kembali didalam waterbath pada suhu 37°C selama 30 menit. Dinginkan selama 5 menit pada suhu ruang. Ditambahkan 200 μl *Protein Precipitation Solution*, divortex selama 20 detik dan didinginkan diatas es selama 5 menit. Disentrifugasi pada 13000 rpm selama 4 menit. Hasil dari sentrifugasi diperoleh dua lapisan, lapisan paling atas adalah supernatant yang mengandung DNA dan lapisan kedua berupa endapan protein. Supernatant yang mengandung DNA dipindahkan ke dalam mikrotube baru yang sebelumnya telah dimasukkan 600 μl Isopropanol. Larutan dicampur dengan cara membolak-balikan tube. Disentrifugasi pada 13000 rpm selama 10 menit. Hasil dari sentrifugasi akan terbentuk supernatant dan endapan berwarna putih (pellet). Supernatant dibuang dengan hati-hati agar endapan peletnya tidak terbuang, kemudian pellet dikeringkan dengan tissue. Ditambahkan 600 μl Ethanol 70% dan bolak-balikkan tube beberapa kali untuk mencuci DNA. Disentrifugasi pada 13000 rpm selama 5 menit dan ethanol dikeluarkan dengan mikropipet. Kemudian pellet dikeringkan dengan membalikkan tube diatas tissue selama 15 menit. Pellet dilarutkan dengan ditambahkan 100 μl DNA Rehydration Solution. Disimpan pada suhu 4°C selama satu malam. Setelah disimpan selama satu malam, sampel siap digunakan untuk tahap berikutnya.

Pemeriksaan dengan Metode PCR Konvensional

➤ Tahap Amplifikasi DNA

Amplifikasi atau perbanyak DNA target dimaksudkan untuk meningkatkan jumlah DNA target yang ada, sehingga

dapat dideteksi dengan elektroforesis. Amplifikasi DNA dilakukan dengan bantuan *thermocycler* atau yang lebih dikenal dengan alat PCR. Proses amplifikasi metode konvensional selalu menyertakan sampel positif yang diketahui mengandung virus WSSV dan kontrol negatif. Formulasi PCR mix disajikan pada Tabel 1.

Campuran reaksi dibuat dengan komposisi untuk satu reaksi seperti pada Tabel 1 yang terdiri dari 6,25 μl Promega *Go Taq® Green Master Mix*, 0,5 μl primer WSSV270, 0,5 μl primer WSSV345, 4,25 μl NFW. Campuran reaksi dihomogenkan dengan disentrifugasi. Kemudian sebanyak 11,5 μl dari campuran reaksi didistribusikan ke masing-masing mikrotube ukuran 0,2 ml yang terdiri dari tube sampel, tube kontrol positif, dan kontrol negatif. Mikrotube yang berisi sampel negatif ditambahkan 1 μl NFW, sedangkan mikrotube sampel ditambahkan 1 μl template DNA sampel sesuai dengan kodenya masing-masing, begitu juga dengan mikrotube kontrol positif ditambahkan 1 μl DNA positif WSSV. Seluruh tube divortex dan dihomogenkan dengan disentrifugasi, kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR dan mesin dijalankan dengan pengaturan suhu yaitu pre amplifikasi denaturasi 94°C (4 menit), annealing 55°C (1 menit), ekstensi 72°C (2 menit) sebanyak 1 siklus. Kemudian denaturasi lagi 94°C (1 menit), annealing 55°C (1 menit), ekstensi 72°C (2 menit) sebanyak 30 siklus. Selanjutnya ekstensi akhir 72°C (5 menit) sebanyak 1 siklus dan end hold pada suhu 4°C .

Tabel 1. Formulasi PCR Mix

No.	Komponen	Konsentrasi Akhir	Volume 1x PCR (12,5 μl)
1	Promega <i>Go Taq® Green Master Mix</i>	1X	6,25
2	Primer WSSV270 (5-ACCATGGAGAAGATATGTACAAGCA-3)	0,8 μM	0,5
3	Primer WSSV345 (5-GGCATGGACAGTCAGGTCTTT-3)	0,8 μM	0,5
4	NFW (Nuclease Free Water)		4,25
5	Template DNA sampel/ Plasmid (+) sebagai kontrol positif white spot	$\leq 500 \text{ ng/ } \mu\text{l}$	1
Total Volume			12,5

Setelah program PCR selesai, hasil amplifikasi disimpan pada suhu -20°C untuk kemudian dianalisa dengan elektroforesis.

Tahap Elektroforesis

DNA hasil amplifikasi belum bisa dilihat dengan mata telanjang. Untuk melihatnya, DNA hasil amplifikasi ini perlu dianalisa lebih lanjut dengan elektroforesis. Hasil amplifikasi diperiksa menggunakan gel agarosa 1,5%. Gel dibuat dengan melarutkan 0,75 gram bubuk agarosa dalam 50 ml TAE buffer 0,5X untuk kemudian dihomogenkan dan dipanaskan dengan microwave hingga mendidih. Setelah agarose larut, ke dalam botol Scott ditambahkan 4 μl Sybr Safe, kemudian kocok sebentar. Selanjutnya dituangkan pada cetakan gel yang sebelumnya telah ditempatkan *comb* (sisir) untuk membuat lubang/sumur dan didiamkan hingga gel mengeras.

Gel agarose yang sudah beku direndam secara *sub marine* atau direndam dalam *running buffer* yaitu TAE. Setiap sumur diisi 5 μl DNA hasil PCR dan penanda berat molekul di satu sumur lainnya diisi dengan 5 μl DNA *Ladder* 100bp. Setelah lubang-lubang pada gel selesai diisi, tangki elektroforesis diberi aliran listrik. Sisi yang berisi hasil amplifikasi diberi arus negatif. Proses elektroforesis dijalankan selama 30 menit pada voltase antara 100-150 volt. Setelah proses running selesai, gel diamati di atas UV trans - illuminator dan di dokumentasikan dengan kamera digital.

Pemeriksaan dengan Real Time PCR Tahap Pengenceran Standar Kurva

Plasmid WSSV yang telah diketahui konsentrasinya dibuat tiga tingkat pengenceran berturut-turut yaitu 10^5 , 10^4 , dan 10^3 untuk kemudian diamplifikasi. Amplifikasi beberapa

tingkat pengenceran secara otomatis oleh software *Rotor Gene Q Series* akan digambarkan dalam bentuk kurva standar. Kurva standar merupakan hubungan antara log konsentrasi plasmid dan *threshold cycle* (Ct). Kurva standar ini digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel (Angelia 2009).

Pengenceran standar kurva dimulai dengan mengambil sebanyak 1 μl P(+) Standar 10^5 (stok) dipindahkan ke dalam tube dengan kode 10^4 , kemudian ditambahkan 9 μl *Nuclease Free Water*. Sebanyak 1 μl P(+) Standar 10^4 dipindahkan ke dalam tube dengan kode 10^3 , kemudian ditambahkan 9 μl *Nuclease Free Water*. Setelah pengenceran kurva standar selesai, tube-tube yang berisi P(+) Standar disimpan didalam *freezer*.

Tahap Preparasi Reagen PCR

Campuran reaksi dibuat dibuat dengan komposisi untuk satu reaksi seperti pada Tabel 2. PCR mix dicampurkan sesuai dengan jumlah reaksi yang dibutuhkan. PCR mix dimixing dengan filtertips yang sama, diusahakan tidak terbentuk buih, kemudian sebanyak 23 μl PCR mix didistribusikan ke semua tube 0,2 ml baru. Mikrotube NTC (kontrol negatif) ditambahkan 2 μl NFW, sedangkan mikrotube sampel ditambahkan 2 μl template DNA sampel sesuai dengan kodenya masing-masing, begitu juga dengan mikrotube positif standar ditambahkan 2 μl positif standar dari hasil pengenceran standar kurva pada tahap sebelumnya.

Semua tube PCR 0,2 ml dispin 1 detik, kemudian ditempatkan pada 36-Well *Rotor*. Pasangkan 36-Well *Rotor Locking Ring* ke dalam 36-Well *Rotor* dengan benar. Masukkan 36-Well *Rotor* dan 36-Well *Rotor Locking Ring* ke dalam mesin

Tabel 2. Formulasi PCR Mix untuk Metode *Real Time*

No.	Komponen	Konsentrasi Akhir	Volume 1x Reaksi (µl)
1.	<i>Rnase-free water</i>		9
2.	<i>2x QuantiTect Probe PCR Master Mix</i>	1X	12,5
3.	Primer WSSV270 (5-ACCATGGAGAAGATATGTACAAGCA-3)	0,4 µM	0,5
4.	Primer WSSV345 (5-GGCATGGACAGTCAGGTCTTT-3)	0,4 µM	0,5
5.	Probe WSSV296T (5-FAM- TTACAGTGATGGAATTTTCGTTTATC- TAMRA	0,2 µM	0,5
6.	Template DNA/P(+) Standar	≤ 500 ng/ µl	2
Total Volume Reaksi		25	

Rotor Gene-Q. Tutup pintu dari mesin tersebut dan kemudian set up profil PCR sesuai dengan protokol yang digunakan dengan menggunakan *Rotor-Gene Q* software. Program mesin *real time* dengan pengaturan suhu yaitu PCR initial activation 95 °C (15 menit). Kemudian denaturasi 94°C (15 detik), 60°C (60 detik) sebanyak 40 siklus.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian akan dianalisis secara deskriptif kualitatif yaitu membandingkan hasil DNA WSSV yang terdeteksi dengan menggunakan metoda PCR Konvensional dan *Real Time* PCR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan Gejala Klinis

Berdasarkan hasil sampling yang dilakukan di 2 lokasi, yaitu tambak asal Pasekan dan Karangsong diperoleh 14 ekor kepiting masing-masing 7 ekor dari setiap lokasi yang terdiri dari 5 jenis kepiting. Adapun jenis kepiting yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 3.

Secara fisik, semua sampel kepiting yang diperoleh tidak menunjukkan gejala klinis terserang virus white spot, yaitu adanya bintik putih pada bagian tubuh. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sumawidjaja (2001) dalam Apriliza (2010) bahwa organisme *carrier* tidak menunjukkan gejala klinis penyakitnya tetapi dapat menularkan penyakit pada organisme lainnya.

Tabel 3. Jenis Kepiting yang Diperiksa

Lokasi	Organisme	Jumlah (ekor)
Pasekan	<i>Scylla serrata</i>	2
	<i>Helice tridens</i>	1
	<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	4
Karangsong	<i>Helice tridens</i>	4
	<i>Ocypode quadrata</i>	1
	<i>Uca minax</i>	2
Total		14

Pengukuran Kualitas dan Kuantitas DNA Genom

Kualitas dan kuantitas DNA yang telah diisolasi dapat diuji secara kualitatif dengan elektroforesis gel agarose dan kuantitatif dengan spektrofotometer. Pengukuran jumlah DNA melalui spektrofotometer didasarkan pada prinsip iradiasi sinar ultra violet (UV) yang diserap

oleh nukleotida dan protein dalam larutan (Tabel 4).

Kemurnian DNA diperoleh dari perbandingan absorbansi $A_{260/280}$. Molekul DNA dikatakan murni jika rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1,8 – 2,0. Menurut Sambrook *et al.* (2001), DNA dengan rasio pada kisaran angka tersebut telah memenuhi persyaratan kemurnian

yang dibutuhkan dalam analisis molekuler. Menurut Linacero *et al.*, (1998) dalam Tenriulo (2001), kontaminasi protein dan bahan organik lainnya ditandai dengan rendahnya nilai rasio $A_{260/280}$ ($< 1,8$),

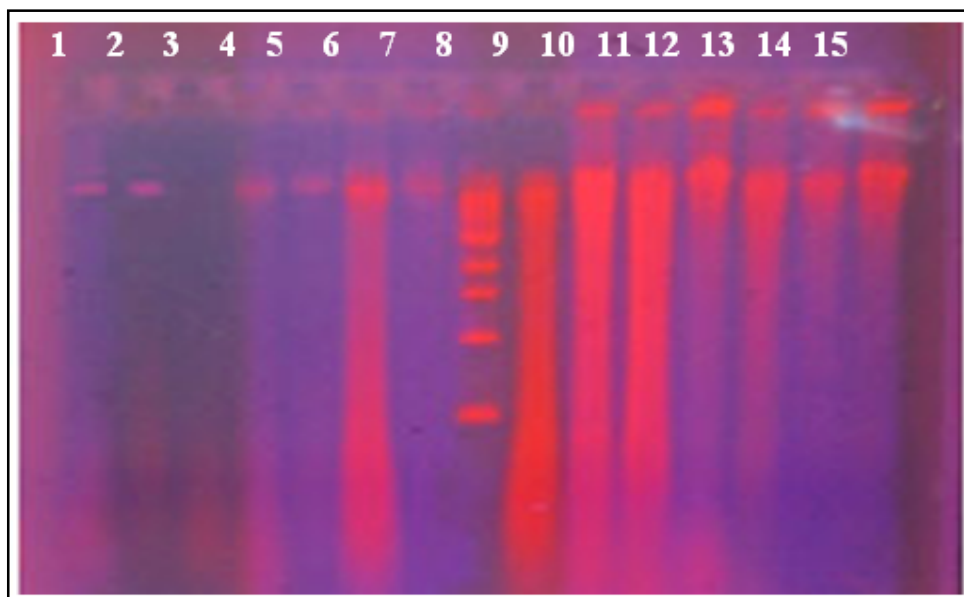
sebaliknya kontaminasi fenol ditandai dengan tingginya nilai rasio tersebut ($> 2,0$).

Tabel 4. Hasil Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Kepiting

Sampel	Panjang Gelombang (nm)		Konsentrasi/C (ng/ μ l)	Rasio Absorbansi (R)
	A260	A280		
<i>Pachygrapsus marmoratus</i> (A1)	0,031	0,012	160	2,583
<i>Pachygrapsus marmoratus</i> (A2)	0,039	0,018	185	2,167
<i>Pachygrapsus marmoratus</i> (A3)	0,001	0,009	5	0,111
<i>Pachygrapsus marmoratus</i> (A4)	0,133	0,074	665	1,797
<i>Scylla serrata</i> (B1)	0,021	0,007	105	3,000
<i>Scylla serrata</i> (B2)	0,067	0,035	330	1,914
<i>Helice tridens</i> (C1)	0,016	0,004	75	4,000
<i>Helice tridens</i> (D1)	0,200	0,111	1005	1,802
<i>Helice tridens</i> (D2)	0,109	0,050	540	2,180
<i>Helice tridens</i> (D3)	0,354	0,180	1765	1,967
<i>Helice tridens</i> (D4)	0,115	0,053	565	2,170
<i>Uca minax</i> (D5)	0,099	0,046	490	2,152
<i>Ocypode quadrata</i> (D6)	0,059	0,026	290	2,269
<i>Uca minax</i> (D7)	0,064	0,030	320	2,133

Selain menggunakan spektrofotometer, untuk melihat kualitas isolat DNA dilakukan dengan elektroforesis pada konsentrasi gel agarose 0,8%. Hasil elektroforesis DNA Genom (Gambar 1) menunjukkan seluruh sampel (kecuali sampel A3) menghasilkan pita DNA dengan ketebalan pita yang beragam. Ketebalan pita

yang beragam diakibatkan oleh nilai kemurnian pada masing-masing sampel berbeda dan nilai konsentrasi yang diperoleh berbeda-beda pula (Tabel 4). Sedangkan pada sampel A3 (sumur 3) pita DNA tidak nampak, hal ini dikarenakan nilai konsentrasi DNA yang dihasilkan relatif lebih kecil bila dibandingkan dengan yang lainnya.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis DNA Genom

Keterangan :

- | | |
|--|--|
| 1 = Sampel <i>Pachygrapsus marmoratus</i> (A1) | 9 = Sampel <i>Helice Tridens</i> (D1) |
| 2 = Sampel <i>Pachygrapsus marmoratus</i> (A2) | 10 = Sampel <i>Helice Tridens</i> (D2) |
| 3 = Sampel <i>Pachygrapsus marmoratus</i> (A3) | 11 = Sampel <i>Helice Tridens</i> (D3) |
| 4 = Sampel <i>Pachygrapsus marmoratus</i> (A4) | 12 = Sampel <i>Helice Tridens</i> (D4) |
| 5 = Sampel <i>Scylla serrata</i> (B1) | 13 = Sampel <i>Uca minax</i> (D5) |
| 6 = Sampel <i>Scylla serrata</i> (B2) | 14 = Sampel <i>Ocypode quadrata</i> (D6) |
| 7 = Sampel <i>Helice Tridens</i> (C1) | 15 = Sampel <i>Uca minax</i> (D7) |
| 8 = Marker DNA Ladder 1kb | |

Selain pita DNA, hasil elektroforesis DNA genom menunjukkan adanya materi ikutan lain (*smear*) yang masih terbawa dan nampak tebal seperti pada sampel B2 (sumur 6), D1 (sumur 9), D2 (sumur 10), D3 (sumur 11). *Smear* dapat disebabkan karena pada DNA masih terdapat protein dan RNA. Menurut Mulyani dkk., (2011), *smear* tersebut bisa merupakan sisa dari larutan-larutan yang masih terbawa selama proses isolasi atau juga dapat berupa DNA yang terdegradasi pada proses isolasi.

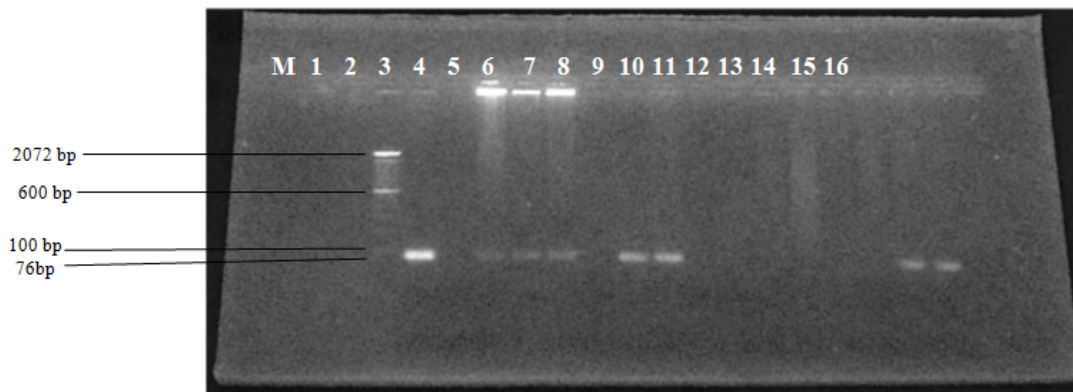
Hasil Deteksi WSSV dengan PCR Konvensional

Hasil deteksi terhadap serangan virus *white spot* pada kepiting dengan menggunakan uji PCR Konvensional nampak pita DNA WSSV pada beberapa sampel baik sampel kepiting asal Pasekan maupun Karangsong (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa PCR Konvensional mampu mendeteksi serangan virus WSSV.

Berdasarkan Gambar 11 diatas dapat dilihat bahwa dari 14 sampel yang diperiksa, 7 sampel menunjukkan hasil positif WSSV yaitu dengan nampaknya pita DNA WSSV sesuai dengan positif standar (sumur ke-1) pada ukuran fragmen 76 bp. Positif standar WSSV yang digunakan sebagai

kontrol positif merupakan stok kontrol positif WSSV Laboratorium Biologi Molekuler BUSKI. Dari 7 sampel yang menunjukkan hasil positif, 5 sampel berasal dari tambak asal Pasekan (sumur ke-3, sumur ke-4, sumur ke-5, sumur ke-7, dan sumur ke-8) dan 2 sampel berasal dari tambak asal Karangsong (sumur ke-15 dan sumur ke-16). Hal ini menandakan bahwa 7 sampel tersebut positif membawa penyakit WSSV. Sedangkan pada sumur ke-6, sumur ke-9 sampai sumur ke-14 tidak menunjukkan adanya pita pada ukuran fragmen 76 bp, hal ini menandakan bahwa sampel A4, C1, D1, D2, D3, D4, dan D5 negatif membawa penyakit WSSV.

Keberadaan WSSV ditentukan oleh desain primer yang digunakan, karena ukuran DNA genom WSSV berukuran besar maka didesain fragmen dengan ukuran tertentu untuk mendeteksi keberadaan WSSV. Pada penelitian ini untuk mengamplifikasi sekuen DNA WSSV digunakan 1 pasang primer yang berbeda urutan nukleotidanya. Primer yang digunakan yaitu WSSV270 (5'ACCATGGAGAAGATATGTACAAGCA 3') dan primer WSSV345 (5'GGCATGGACAGTCAGGTCTTT3') akan menghasilkan ukuran produk ampikon 76 bp.



Gambar 2. Hasil Elektroforesis Sampel Kepiting

Keterangan :

- | | |
|--|--|
| M = Marker 100 bp DNA Ladder | 9 = Sampel C1 <i>Helice Tridens</i> |
| 1 = Kontrol Positif (76 bp) | 10 = Sampel D1 <i>Helice Tridens</i> |
| 2 = Kontrol Negatif | 11 = Sampel D2 <i>Helice Tridens</i> |
| 3 = Sampel A1 <i>Pachygrapsus marmoratus</i> (76 bp) | 12 = Sampel D3 <i>Helice Tridens</i> |
| 4 = Sampel A2 <i>Pachygrapsus marmoratus</i> (76 bp) | 13 = Sampel D4 <i>Helice Tridens</i> |
| 5 = Sampel A3 <i>Pachygrapsus marmoratus</i> (76 bp) | 14 = Sampel D5 <i>Uca minax</i> |
| 6 = Sampel A4 <i>Pachygrapsus marmoratus</i> | 15 = Sampel D6 <i>Ocypode quadrata</i> (76 bp) |
| 7 = Sampel B1 <i>Scylla serrata</i> (76 bp) | 16 = Sampel D7 <i>Uca minax</i> (76 bp) |
| 8 = Sampel B2 <i>Scylla serrata</i> (76 bp) | |

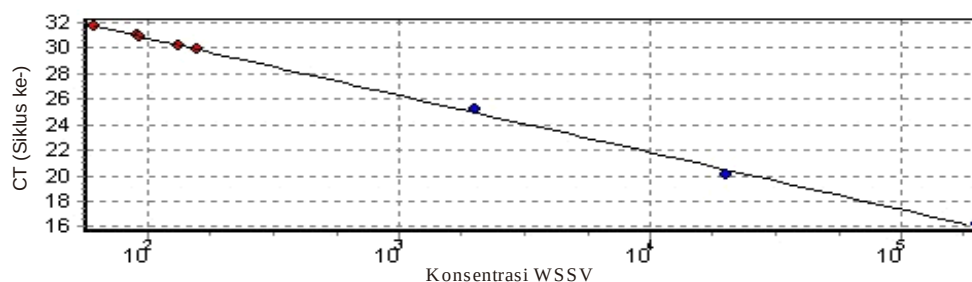
Hasil Deteksi WSSV dengan Real Time PCR

➤ Pengenceran Standar Kurva

Amplifikasi yang dijalankan dalam Rotor Gene Q ditampilkan dalam bentuk grafik pada layar komputer dengan software Rotor Gene Q Series. Grafik-grafik yang ditampilkan berupa grafik sampel kontrol positif WSSV (grafik kurva standar) dan grafik amplifikasi sampel uji. Amplifikasi beberapa tingkat pengenceran kontrol positif WSSV (hasil kloning) secara otomatis oleh software Rotor Gene Q Series akan digambarkan dalam bentuk kurva standar, selain grafik amplifikasi sampel uji. Tiga titik pada kurva standar

(Gambar 3 dan Gambar 4) menunjukkan terdapat tiga tingkat pengenceran yang masing-masing memiliki nilai Ct. Kurva ini akan memplotkan log dari konsentrasi tiga atau lebih sampel yang telah diketahui nilai konsentrasinya, sehingga kurva standar ini dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel.

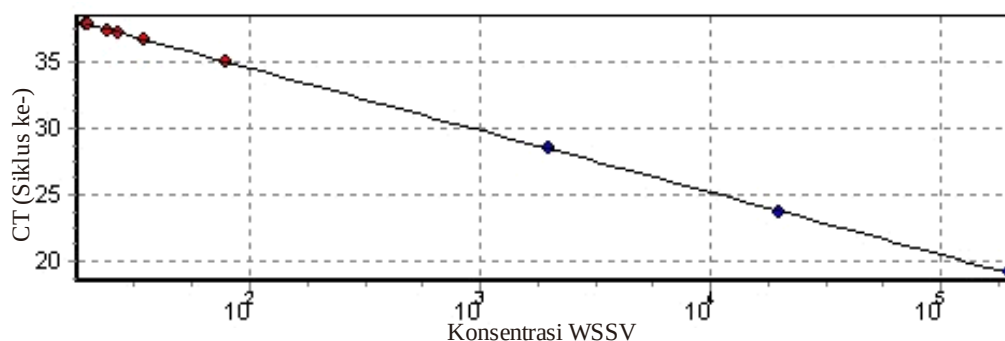
Kurva standar sampel asal tambak Pasekan memiliki nilai *slope* -4,45724, nilai efisiensi 67,63% dan nilai R^2 mencapai 0.99398. Adapun persamaan garis dari kurva standar (Gambar 3) yaitu $y = -4.457x + 39.629$ dengan y adalah nilai Ct dan x adalah log konsentrasi virus yang diuji.



Gambar 3. Kurva Standar antara Konsentrasi WSSV dan Nilai CT Sampel Asal Tambak Pasekan

Kurva standar sampel asal tambak Karangsong memiliki nilai *slope* -4.64589, nilai efisiensi 64,15% dan nilai R^2 mencapai 0.99941. Sedangkan

persamaan garis dari kurva standar (Gambar 4) yaitu $y = -4.646x + 43.805$ dengan y adalah nilai C_t dan x adalah log konsentrasi virus yang diuji.



Gambar 4. Kurva Standar antara Konsentrasi WSSV dan Nilai CT Sampel Asal Tambak Karangsong

Nilai *slope* kedua kurva standar tersebut tidak berada dalam selang *slope* yang diharapkan, sehingga nilai efisiensi yang diperoleh tidak bagus yaitu kurang dari 100%. Menurut Pestana *et al.* (2010) sebuah kurva standar dengan standar positif harus memiliki kriteria nilai efisiensi

>80%, nilai *slope* diantara -3.1 sampai -3.8, dan nilai $R^2 > 0.980$.

Amplifikasi Sampel Uji

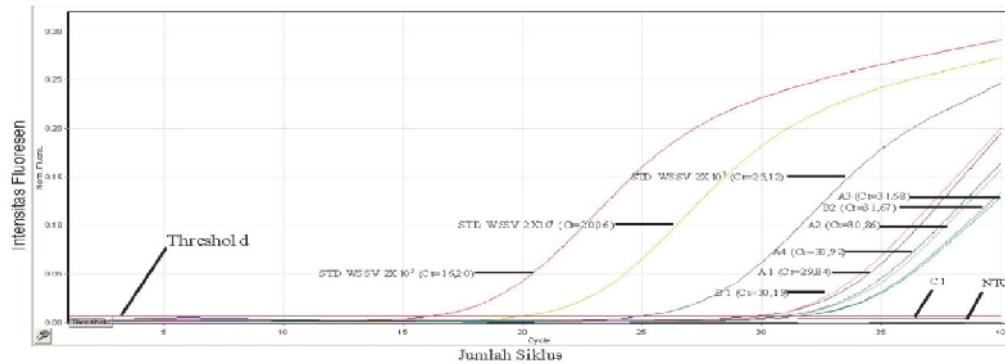
Hasil deteksi sampel asal tambak Pasekan dengan real time PCR menunjukkan dari 7 sampel yang diperiksa, terdapat 6 sampel memberikan hasil yang positif WSSV (Tabel 5).

Tabel 5. Hasil Deteksi Sampel asal Tambak Pasekan dengan *Real Time* PCR

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1	Red	Std wssv 2×10^5	Standard	16.20	200,000.0	180,335.5	9.8%
2	Yellow	Std wssv 2×10^4	Standard	20.06	20,000.0	24,599.6	23.0%
3	Blue	Std wssv 2×10^3	Standard	25.12	2,000.0	1,803.4	9.8%
4	Purple	A1	Unknown	29.84		157.0	
5	Pink	A2	Unknown	30.86		92.5	
6	Light Blue	A3	Unknown	31.68		60.8	
7	Teal	A4	Unknown	30.92		89.9	
8	Light Red	B1	Unknown	30.19		131.2	
9	Green	B2	Unknown	31.67		61.0	
10	Magenta	C1	Unknown				
11	Black	NTC	NTC				

Apabila dilihat pada grafik amplifikasi positif kontrol WSSV (kurva standar) dan grafik amplifikasi sampel, hasil positif ditandai dengan adanya akumulasi pada signal fluorezen dan melintasi *base line threshold*. Sedangkan sampel C1 dan NTC tidak melintasi *base*

line threshold sehingga menunjukkan hasil negatif. Grafik amplifikasi sampel uji dan kurva standar berbentuk sigmoid yang terdiri atas beragam warna yang masing-masing menunjukkan fragmen DNA WSSV sampel uji yang teramplifikasi (Gambar 5).



Gambar 5. Grafik Amplifikasi Sampel Asal Tambak Pasekan

Keterangan :

STD = Standar Pengenceran WSSV 2×10^5

STD = Standar Pengenceran WSSV 2×10^4

STD = Standar Pengenceran WSSV 2×10^3

A1 = *Pachygrapsus marmoratus*

A2 = *Pachygrapsus marmoratus*

A3 = *Pachygrapsus marmoratus*

A4 = *Pachygrapsus marmoratus*

B1 = *Scylla serrata*

B2 = *Scylla serrata*

C1 = *Helice Tridens*

NTC = No Template Control

Hasil deteksi sampel asal tambak Karangsong menunjukkan dari 7 sampel yang diperiksa, terdapat 6 sampel

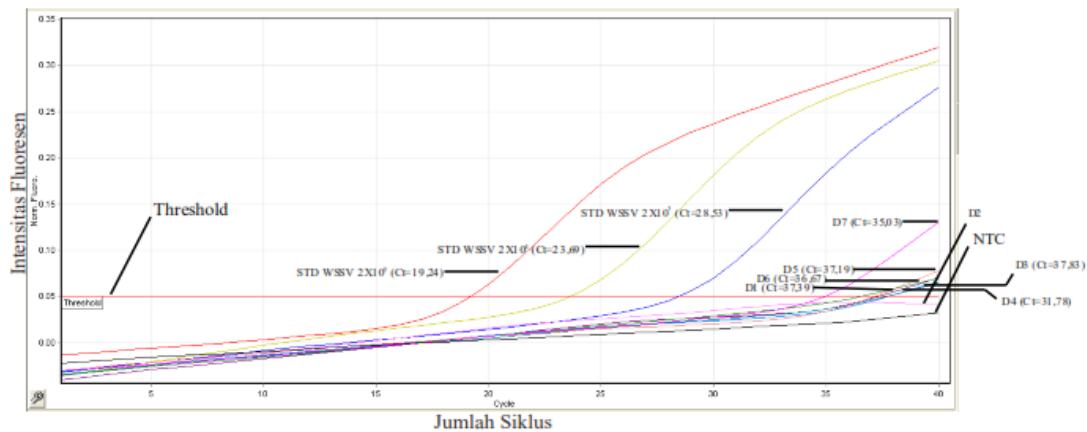
memberikan hasil yang positif WSSV (Tabel 6).

Tabel 6. Hasil Deteksi Sampel asal Tambak Karangsong dengan *Real Time PCR*

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1	Red	Std WSSV 2×10^5	Standard	19.24	200,000.0	193,634.5	3.2%
2	Yellow	Std WSSV 2×10^4	Standard	23.69	20,000.0	21,336.6	6.7%
3	Blue	Std WSSV 2×10^3	Standard	28.53	2,000.0	1,936.3	3.2%
4	Purple	D1	Unknown	37.39		24.1	
5	Pink	D2	Unknown				
6	Light Blue	D3	Unknown	37.83		19.3	
7	Teal	D4	Unknown	37.78		19.8	
8	Light Red	D5	Unknown	37.19		26.5	
9	Light Green	D6	Unknown	36.67		34.3	
10	Magenta	D7	Unknown	35.03		77.6	
11	Black	NTC	NTC				

Apabila dilihat pada grafik amplifikasi positif kontrol WSSV (kurva standar) dan grafik amplifikasi sampel, hasil positif ditandai dengan adanya akumulasi pada signal fluorezen dan melintasi *base line threshold*. Sedangkan sampel D2 dan NTC tidak melintasi *base*

line threshold sehingga menunjukkan hasil negatif. Grafik amplifikasi sampel uji dan kurva standar berbentuk sigmoid yang terdiri atas beragam warna yang masing-masing menunjukkan fragmen DNA WSSV sampel uji yang teramplifikasi (Gambar 6)



Gambar 6. Grafik Amplifikasi Sampel Asal Tambak Karangsong

Keterangan :

STD = Standar Pengenceran WSSV 2 X 10^5 D4 = *Helice Tridens*STD = Standar Pengenceran WSSV 2 X 10^4 D5 = *Uca minax*STD = Standar Pengenceran WSSV 2 X 10^3 D6 = *Ocypode quadrata*D1 = *Helice Tridens*D7 = *Uca minax*D2 = *Helice Tridens*

NTC = No Template Control

D3 = *Helice Tridens*

Amplifikasi DNA menggunakan mesin *real time* PCR selain mengamplifikasi sampel dan standar positif juga disertakan kontrol negatif atau NTC (*No Template Control* = tidak disertakan template). Kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui apakah saat mencampurkan mix reagen ke dalam sampel terdapat kontaminasi atau tidak. Kontrol negatif akan tetap negatif setelah pembacaan jika tidak terdapat kontaminasi atau dalam arti lain bahwa pengerjaan dari mixing reagen berhasil dan hasil PCR dianggap layak dan dapat dipercaya. Hal tersebut berlaku sebaliknya yakni jika kontrol negatif menjadi positif maka dapat diperkirakan telah terjadi kontaminasi dan hasil dari pembacaan

dianggap tidak dapat dipercaya untuk selanjutnya pemeriksaan akan diulang (Kartikasari 2008).

Perbandingan Hasil Deteksi PCR Konvensional Dan Real Time

Pemeriksaan kepiting yang diduga sebagai *carrier* WSSV dari 14 sampel yang diuji, dengan menggunakan PCR konvensional 7 sampel menunjukkan hasil positif WSSV, sedangkan dengan menggunakan Real Time PCR 12 sampel menunjukkan hasil positif WSSV.

Adapun perbandingan hasil deteksi sampel uji kepiting asal tambak Pasekan dan tambak Karangsong dengan PCR konvensional dan *real time* PCR disajikan pada Tabel 7 berikut ini.

Tabel 7. Perbandingan Hasil Deteksi WSSV pada PCR Konvensional dan *Real Time* PCR

No.	Kode Sampel	Spesies	PCR Konvensional*	Real Time PCR	Nilai Ct	Jumlah Kopi WSSV
1.	Kontrol +	Std wssv 2×10^5			16.20	180,335.5
2.	Kontrol +	Std wssv 2×10^4			20.06	24,599.6
3.	Kontrol +	Std wssv 2×10^3			25.12	1,803.4
4.	A1	<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	Positif	Positif	29.84	157.0
5.	A2	<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	Positif	Positif	30.86	92.5
6.	A3	<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	Positif	Positif	31.68	60.8
7.	A4	<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	Negatif	Positif	30.92	89.9
8.	B1	<i>Scylla serrata</i>	Positif	Positif	30.19	131.2
9.	B2	<i>Scylla serrata</i>	Positif	Positif	31.67	61.0
10.	C1	<i>Helice tridens</i>	Negatif	Negatif	-	-
11.	D1	<i>Helice tridens</i>	Negatif	Positif	37.39	24.1
12.	D2	<i>Helice tridens</i>	Negatif	Negatif	-	-
13.	D3	<i>Helice tridens</i>	Negatif	Positif	37.83	19.3
14.	D4	<i>Helice tridens</i>	Negatif	Positif	37.78	19.8
15.	D5	<i>Uca minax</i>	Negatif	Positif	37.19	26.5
16.	D6	<i>Ocypode quadrata</i>	Positif	Positif	36.67	34.3
17.	D7	<i>Uca minax</i>	Positif	Positif	35.03	77.6

Keterangan : *) Deteksi dengan PCR Konvensional menggunakan 1 kontrol Positif

Berdasarkan Tabel 7 dapat dilihat bahwa *real time* PCR lebih sensitif daripada PCR konvensional dengan persentase yang terdeteksi positif mencapai 85,71%. Hal ini terlihat dari dengan menggunakan primer yang sama, PCR konvensional hanya mampu mendeteksi 7 sampel positif dari 14 sampel yang diperiksa, sedangkan *real time* PCR mampu mendeteksi 12 sampel positif dari 14 sampel yang diperiksa. Pada sampel A4, D1, D3, D4, dan D5 PCR konvensional menunjukkan hasil negatif palsu karena pemeriksaan sampel-sampel tersebut dengan *real time* PCR menunjukkan hasil positif WSSV. Hasil negatif palsu yang ditunjukkan PCR konvensional dilihat berdasarkan jumlah kopi WSSV yang dihasilkan sampel D1, D3, D4, dan D5 oleh *real time* PCR menghasilkan jumlah kopi dengan kisaran 19 – 27 kopi yang tergolong relatif sangat sedikit sehingga tidak dapat dideteksi oleh PCR konvensional. Hal ini dibuktikan dari hasil elektroforesis Gambar 2 pada sumur ke-10, sumur ke-12, sumur ke-12, dan

sumur ke-14 yang tidak menunjukkan fragmen DNA WSSV. Menurut Dwinanti (2006), pada PCR konvensional hasil negatif yang salah dapat disebabkan karena jumlah kopian DNA yang tidak mencukupi dan tingkat infeksi yang terlalu rendah sehingga pita DNA berpendar redup atau bahkan tidak berpendar. Sampel C1 asal tambak Pasekan dan D2 asal tambak Karangsong baik pada pemeriksaan dengan PCR konvensional maupun dengan *real time* PCR sama-sama menunjukkan hasil negatif yaitu pada spesies *Helice tridens*. Sehingga sampel C1 dan D2 dapat dikatakan bebas WSSV.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

- Real Time* PCR lebih mampu mendeteksi keberadaan WSSV pada kepiting tanpa gejala klinis

- dibandingkan dengan PCR konvensional.
- b. Kepiting yang berpotensi sebagai *carrier* WSSV diantaranya adalah *Pachygrapsus marmoratus*, *Scylla serrata*, *Helice tridens*, *Ocypode quadrata*, dan *Uca minax*.
 - c. Deteksi dengan PCR konvensional tujuh sampel kepiting positif WSSV pada ukuran fragmen 76 bp, terdiri dari 3 sampel *Pachygrapsus marmoratus* dan 2 sampel *Scylla serrata* asal Kecamatan Pasekan, sedangkan sampel *Ocypode quadrata* dan *Uca minax* asal Karangsong, Kecamatan Indramayu.
 - d. Deteksi dengan *real time* PCR menunjukkan 12 sampel positif WSSV yang ditandai dengan adanya akumulasi pada signal fluoresen. Dua belas sampel positif terdiri dari 4 sampel *Pachygrapsus marmoratus* dan 2 sampel *Scylla serrata* asal Kecamatan Pasekan, 3 sampel *Helice tridens*, 1 sampel *Ocypode quadrata* dan 2 sampel *Uca minax* asal Karangsong, Kecamatan Indramayu.

DAFTAR PUSTAKA

- Angelia, Tri Octora. 2009. Kajian Metode Deteksi Bakteri Patogen Penyebab Penyakit Asal Pangan Di Pusat Riset Obat Dan Makanan Badan POM RI. *Skripsi*. Bogor : Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Aprijani, Dwi Astuti., Elfaizi, M. Abdushshomad. 2004. *Bioinformatika : Perkembangan, Disiplin Ilmu dan Penerapannya di Indonesia*.
- Aprilliza, Eka. 2010. Potensi Udang Rebon (*Carrier*) Dalam Penularan WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) Pada Udang Vannamei Yang Dipelihara Dengan Berbagai Teknologi Budidaya Di Tambak Kabupaten Indramayu. *Skripsi*. Jatinangor : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran.
- Dwinanti, Sefti Heza. 2006. Keberadaan *White Spot Syndrome Virus* (WSSV), *Taura Syndrome Virus* (TSV) Dan *Infectious Hypodermal Haematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV) Di Tambak Intensif Udang Vannamei *Litopenaeus vannamei* Di Bakauheni, Lampung Selatan. *Skripsi*. Bogor : Program Studi Teknologi dan Manajemen Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Fatimi, Humairah. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Palembang : Program Studi Ilmu Biomedik, Program Pasca Sarjana, Universitas Brawijaya.
- Kartikasari, D.S. 2008. Perbandingan Tingkat Sensitivitas dan Spesifisitas Pada Pemeriksaan Influenza A Dengan Menggunakan Rapid Tes dan *Real Time-Reverse Transcriptase* PCR (Rrt-PCR). *Artikel Karya Tulis Ilmiah*. Semarang : Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro.
- Mulyani, Y., A. Purwanto., I. Nurruhwati. 2011. Perbandingan Beberapa Metode Isolasi DNA untuk Deteksi Dini *Koi Herpes Virus* (KHV) Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). Jatinangor : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran. *Jurnal Akuatika* Vol. II No. 1/Maret Tahun 2011.
- Octaviana, Rany Surya. 2005. Diagnosa Tingkat Serangan Virus White Spot Pada Benur Udang Windu di Hatchery dan Tambak Tradisional Desa Karanganyar Kecamatan Bangil. *Skripsi*. Jatinangor : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran.

- Pestana, E.A., S. Belak., A. Diallo., J.R. Crowther., G.J. Viljoen. 2010. *Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics - Real Time PCR Applications*. Springer. Dordrecht Heidelberg London New York.
- Promega. 2010. Technical Manual Wizard Genomic DNA Purification Kit. USA.
- Sahana, Cuk. 2010. Produksi Udang Turun Akibat Serangan Virus. Diakses dari <http://techno.okezone.com/read/2010/09/22/373/374602/produksi-udang-turun-akibat-serangan-virus> pada tanggal 15 Januari 2012 pukul 16:29.
- Sambrook, J., dan D. W. Russel. 2001. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* (Third Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Tenriulo, A., E. Suryati., A. Parenrengi., Rosmiat. 2001. Ekstraksi DNA Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dengan Metode Fenol Kloroform. Makassar : Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Vol. 2 No. 2 ISSN 1411-2132.