

Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

*Comparative Analysis of DNA Isolation Methods for Detection White Spot Syndrome Virus (WSSV)
in White Shrimp (Litopenaeus vannamei)*

Muhammad Iqbal, Ibnu Dwi Buwono, dan Nia Kurniawati
Universitas Padjadjaran

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis metode isolasi DNA terbaik yang sensitif mendeteksi keberadaan WSSV dengan gejala klinis tingkat serangan ringan yang menginfeksi udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan metode *thermal lysis*, *lysis buffer* dan Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) serta amplifikasi WSSV menggunakan IQ 2000 WSSV. Penelitian ini menggunakan metode survei eksploratif dan analisis deskriptif. Isolasi DNA metode Kit Wizard Genomic DNA Purification sangat sensitif dalam deteksi WSSV pada sampel udang vaname asal Karangsong dan Pangandaran dengan nilai konsentrasi DNA tertinggi (1,870 µg/µL) serta nilai kemurnian 1,671 dibanding dua metode lain. Metode isolasi DNA yang efektif dan efisien dari segi waktu dan pengerjaan dalam deteksi WSSV adalah metode *lysis buffer*. Hasil deteksi WSSV menunjukkan dari 12 sampel yang diuji terdapat 2 sampel udang vaname asal Pangandaran dan 1 sampel asal Karangsong terinfeksi sangat ringan dengan kit Wizard Genomic DNA Purification serta 1 sampel asal Karangsong terinfeksi ringan dengan *lysis buffer*.

Kata Kunci: Isolasi DNA, Deteksi, WSSV, Udang Vaname

Abstract

This research aimed to analyze a method of isolation DNA best sensitive detect the presence of WSSV by symptoms clinical level strike lightly that infected white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with the methods *thermal lysis*, *lysis buffer* and Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) along with amplification WSSV used IQ 2000 WSSV. This research used a method of survey explorative and descriptive analysis. A method of isolation DNA Kit Wizard Genomic DNA Purification very sensitive in the detection of WSSV in samples of white shrimp origin Karangsong and Pangandaran with a value of the concentration of DNA highest (1,870 µg/µL) and value purity 1,671 compared to two other methods. DNA isolation methods are effective and efficient in terms of time and workmanship in WSSV detection is a method of *lysis buffer*. The results showed that WSSV detection of 12 samples tested contained 2 white shrimp samples from Pangandaran and Karangsong very lightly infected with Wizard Genomic DNA Purification kit, and 1 sample origin Karangsong lightly infected with *lysis buffer*.

Keywords : DNA Isolation, Detection, WSSV, White Shrimp

Pendahuluan

Produksi budidaya udang selama satu dasawarsa terakhir, 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). Dampak serangan virus tersebut menyebabkan petambak udang membudidayakan jenis udang baru yaitu udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Peralihan komoditas ini didukung oleh SK Menteri Kelautan dan Perikanan No. 41/2001 tanggal 12 Juli 2001 yang secara resmi melepas udang vaname sebagai varietas unggul.

WSSV ini menjadi hal yang harus diperhatikan untuk pengembangan budidaya udang dalam upaya meningkatkan hasil produksi sehingga tidak terjadi kegagalan panen pada udang selama masa budidaya. Untuk mengantisipasi penyebaran virus dan mengurangi resiko kegagalan produksi diperlukan usaha pencegahan yaitu dengan peringatan awal dan pemantauan virus patogen tersebut. Diagnosa virus dapat dilakukan dengan histopatologi, mikroskop elektron, ELISA atau PCR (Gray *et al.* 2002).

Pemantauan keberadaan patogen WSSV ini dapat dideteksi melalui teknik *polymerase chain reaction* (PCR) yang bekerja secara spesifik dan sensitif. Teknik PCR memberikan tawaran metode cepat dan sensitif untuk mendiagnosa penyakit diakibatkan virus yang dapat menangani kesulitan dari metode diagnosa biasa. Uji PCR melewati pemisahan fragmen DNA virus dan tidak dibutuhkan untuk pengambilan partikel virus untuk isolasi pada kultur sel (Koutna *et al.* 2003; Novita dan Koesharyani 2009).

Teknik PCR yang ditemukan oleh Dr. Kary Mullis pada tahun 1985 dapat digunakan sebagai deteksi dini virus pada udang yang dibudidayakan. Teknik ini mampu mengisolasi keberadaan virus sebelum penyakit menunjukkan gejala klinis (Yowledge 2003). Untuk melakukan teknik PCR diperlukan DNA genom udang yang telah terinfeksi WSSV sebagai cetakan (*template*) untuk proses perbanyakan atau penggandaan DNA virus.

Isolasi DNA menjadi bagian penting dalam deteksi WSSV karena merupakan tahap awal dimana adanya pemisahan dari kontaminan lain seperti protein dan RNA sehingga didapat DNA murni. Mendeteksi WSSV harus dilakukan sejak dini sehingga dapat meminimalisir dan mencegah WSSV pada udang. Tingkat serangan

WSSV yang ringan menunjukkan penggandaan virus masih sedikit.

Berdasarkan hal ini maka untuk dapat mendeteksi keberadaan WSSV dengan tingkat infeksi ringan dibutuhkan metode isolasi yang sensitif sehingga dapat mengisolasi DNA dengan kualitas dan kuantitas yang tinggi. Untuk menunjang pengkajian deteksi dini udang yang terinfeksi ringan maka perlu adanya pengkajian berbagai metode isolasi DNA.

Bahan Dan Metode

Pengambilan Sampel Udang Vaname

Pengambilan sampel udang diambil di daerah pesisir Indramayu berdekatan dengan daerah Karangsong dan Pangandaran. Sampel yang telah diambil dimasukkan kedalam botol film yang berisi campuran alkohol 95% dan gliserin dengan perbandingan 4:1 (Novita *et al.* 2009). Sampel kemudian disimpan dalam termos yang telah berisi es curai untuk menjaga agar DNA tidak rusak.

Isolasi DNA Metode Siwicki et al. (2006)

Isolasi metode *thermal lysis* dilakukan melalui beberapa tahap. Tahap pertama sampel jaringan dipotong dan digerus sampai halus lalu dimasukkan dalam mikrotube steril ukuran 1,5mL dan dihomogenisasikan dengan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) sebanyak 500 μ L. Disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 4 menit kemudian supernatan dipindahkan kedalam mikrotube baru 1,5 mL steril serta ditambahkan TE buffer sebanyak 500 μ L. Dipanaskan selama 2 menit pada suhu 99⁰ C di *dry bloxk heating thermostat* lalu disentrifugasi selama 3 menit pada 10.000 rpm, *template* DNA siap digunakan untuk proses selanjutnya.

Isolasi DNA Metode lysis Buffer

Isolasi metode *lysis buffer* dilakukan melalui beberapa tahap, pertama sampel dipotong dimasukkan dalam mikrotube steril ukuran 1,5 mL lalu tambahkan *lysis buffer* 500 μ L ke dalam mikrotube, sampel dipotong-potong dengan gunting atau pestel hingga benar-benar halus. Sampel yang telah halus diinkubasi selama 10 menit pada suhu 95⁰C kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 menit. Sentrifugasi menghasilkan pelet dan supernatan, supernatan dipindahkan 200 μ L kedalam mikrotube baru yang

steril ukuran 1,5 mL lalu ditambahkan 400 µL alkohol 95%. Setelah penambahan alkohol mikrotube divortex serta disentrifugasi selama 5 menit pada 12.000 rpm. cairan alkohol dibuang dan pellet mikrotube dikeringkan dengan tutup terbalik pada tisu bersih. Pellet dilarutkan dengan menambahkan TE Buffer sesuai dengan ketentuan maka *template* DNA siap digunakan untuk proses selanjutnya.

Isolasi DNA Metode Kit Wizard Genomic DNA

Purification (Promega 2010)

Isolasi metode kit Wizard Genomic DNA *Purification* (Promega) dilakukan melalui beberapa tahap, pertama potongan sampel dimasukkan dalam mikrotube steril ukuran 1,5mL lalu ditambahkan 120 µL EDTA 0,5 M (pH 8), 500 µL *Nuclei Lysis Solution*, dan 17,5 µL Proteinase K. Sampel dikubasi selama 45 menit pada suhu 65⁰C, kemudian ditambahkan 3 µL *RNase solution* dan dibolak-balik. Sampel diinkubasi kembali selama 20 menit pada suhu 37⁰C dan ditambahkan 200 µL *protein precipitation solution*. Setelah penambahan larutan presipitasi, sampel divortex 20 detik lalu didinginkan diatas es selama 5 menit. Sampel disentrifugasi 4 menit pada 13.000 rpm, kemudian

supernatan dipindahkan ke mikrotube baru serta tambah 600 µL isopropanol dan dibolak-balik. Sentrifugasi 10 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Supernatan dibuang dan ditambahkan 600 µL etanol 70%. Sentrifugasi kembali untuk yang terakhir selama 10 menit pada 13.000 rpm. Supernatan dibuang dan ditambahkan 100 µL DNA *rehydration solution*. Tahap terakhir sampel diinkubasi selama 60 menit pada suhu 65⁰C, *template* DNA siap digunakan untuk proses selanjutnya.

Amplifikasi IQ 2000

Proses amplifikasi menggunakan kit IQ 2000 yaitu amplifikasi yang dilakukan dengan 2 tahap, tahap pertama dapat disebut dengan *First* PCR dan tahap kedua disebut juga *Nested* PCR. Tahapan pertama atau *First* PCR yaitu mikrotube 0,2 mL disiapkan sesuai jumlah sampel dengan tambahan 2 buah mikrotube untuk kontrol positif dan kontrol negatif. Mikrotube amplifikasi diberi label atau nomor dan diletakkan di rak mikrotube.

Reagen yang akan dicampur dengan *template* DNA disiapkan untuk proses PCR pertama dengan perhitungan reagen masing-masing seperti berikut:

Tabel 1. Formulasi *First* PCR

No	Komponen	Volume Reagen (µL)
1	<i>First</i> PCR PreMix	7,5
2	DNA Polymerase	0,5
3	Template DNA/Kontrol positif (+)/Kontrol negatif (-)	2,0
Jumlah Reagen		10

Reagen yang telah dicampur dengan *template* DNA, kontrol positif dan kontrol negatif divortex. Pengaturan mesin PCR (*thermal cycler*) tipe “*Mastercycler Personal*” dengan program PCR yang tahapannya denaturasi pada suhu 94⁰C selama 30 detik, *annealing* pada 62⁰C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72⁰C, 30 detik dengan jumlah siklus/ulangan 5. Denaturasi pada suhu 94⁰C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 62⁰C

selama 15 detik dan ekstensi pada suhu 72⁰C selama 20 detik dengan jumlah siklus/ulangan 15. Ektensi akhir pada 72⁰C selama 30 detik dan 20⁰C selama 30 detik dan “*End Hold*” pada suhu 4⁰C.

Tahapan kedua atau *Nested* PCR dilakukan dengan melanjutkan *First* PCR. Reagen yang dibuat untuk *Nested* PCR perhitungannya sebagai berikut:

Tabel 2. Formulasi *Nested* PCR

No	Komponen	Volume Reagen (µL)
1	<i>Nested</i> PCR PreMix	14
2	DNA Polymerase	1
Jumlah Reagen		15

Reagen Nested PCR ditambahkan masing-masing ke mikrotube termasuk kontrol positif dan kontrol negatif. Pengaturan mesin PCR untuk Nested PCR dengan tahapan denaturasi pada suhu 94°C selama 20 detik, *annealing* pada suhu 62°C selama 20 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 30 detik dengan jumlah siklus/ulangan 25. Ekstensi akhir pada 72°C selama 30 detik dan 20°C selama 30 detik dengan siklus/ulangan 1 dan diakhir "End Hold" pada suhu 4°C. Sampel yang telah diamplifikasi siap digunakan untuk uji selanjutnya atau disimpan pada suhu -20°C.

Elektroforesis

Visualisasi DNA genom udang hasil isolasi dan DNA WSSV amplifikasi maka dilanjutkan elektroforesis (Sambrook *et al.* 1989). Bahan elektroforesis disiapkan terlebih dahulu. Pertama agarose ditimbang sebesar 0,375 gram (1,5%) dan dimasukkan kedalam erlenmeyer lalu tambah 25 mL TAE 1x dan dipanaskan dengan microwave. Agarose didiamkan hingga hangat-hangat kuku ($\pm 50^\circ\text{C}$) setelah itu agarose dituangkan kedalam elektroforesis chamber, sisir dipasang dan dibiarkan mengeras ± 20 menit. Setelah agarose mengeras sisir dilepaskan, direndam dengan TAE 1x dan agarose siap digunakan.

Tahap kedua adalah pembuatan reagen elektroforesis yang dikerjakan diatas parafilm. *Sybr[®]Green* (2 μL) dicampurkan *loading dye* (2 μL) didalam mikrotube 0,2 mL, sesuaikan dengan jumlah ampikon ditambah 1 buah untuk marker. Marker 5 μL dan hasil amplifikasi 6 μL diambil dan disimpan diatas parafilm, masing-masing dicampurkan dengan campuran *Sybr[®]Green* dan *loading dye* 4 μL serta dibuat hingga homogen dengan cara pipeting. Reagen yang telah homogen dimasukkan kedalam sumuran/lubang dengan urutan lubang : marker, kontrol positif, kontrol negatif, dan seterusnya ampikon secara perlahan dan hati-hati. Tutup alat elektroforesis tersebut hingga rapat, dan power suplai dihidupkan dan diatur untuk *running* dengan kekuatan listrik 110 volt, 100 mA selama 50 menit. Setelah selesai *running*, agarose dicuci dengan aquades. Agarose

dimasukkan ke dalam UVI Gel Doc (UVIDOC) untuk visualisasi.

Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometri. Langkah pertama menghubungkan spektrofotometri dengan sumber tenaga dan tombol power ditekan, tampilan spektrofotometri ditunggu hingga menjadi "smart start menu", blanko aquades (bagian bening menghadap kedepan) dimasukkan ke spektrofotometri. Dipilih "test DNA", enter, dipilih "run test", tombol c ditekan, dipilih "measure blank", tekan tombol a, blanko aquades dikeluarkan dan blanko sampel dimasukkan. Dipilih "measur sample" nilai yang muncul pada monitor dicatat, esc (2x) sampai tampilan kembali ke "smart start menu". Blanko sampel dikeluarkan bila pengukuran sudah selesai dan alat dimatikan. Menurut Barbas *et all* (2001) untuk perhitungan konsentasi DNA menggunakan rumus :

$$\text{Konsentrasi DNA (ng/}\mu\text{L)} \\ = A_{260} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{L} \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan :

A_{260} = Nilai Absorbansi pada λ 260 nm

50 = Larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 50ug untai ganda DNA per mL

Catatan :

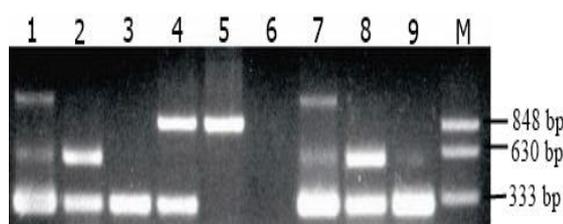
- Blanko aquades terdiri dari 250 μL aquades
- Blanko sampel terdiri dari 5 μL sampel ditambah 245 μL aquades

Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian adalah efisiensi waktu pengerjaan, kemudahan, kualitas dan kuantitas DNA.

Analisis Data

Data hasil uji WSSV dianalisis secara deskriptif kualitatif. Hasil dari proses elektroforesis dihubungkan dengan metode isolasi DNA yang dilakukan.



Gambar 1. Standar Hasil Elektroforesis WSSV IQ 2000

Keterangan :

- Lane 1 : Sampel positif WSSV berat
- Lane 2 : Sampel positif WSSV sedang
- Lane 3 : Sampel positif WSSV ringan
- Lane 4 : Sampel positif WSSV sangat ringan
- Lane 5 : Sampel positif WSSV negatif
- Lane 6 : ddH₂O
- Lane 7 : Standar 1, 2000 copy/reaksi
- Lane 8 : Standar 1, 200 copy/reaksi
- Lane 9 : Standar 1, 20 copy/reaksi
- Lane M: Marker DNA 848 bp, 630 bp dan 333 bp

Sampel negatif hanya terlihat satu pita DNA pada 848 bp, yaitu DNA udang (*home keeping gene*). WSSV dikatakan positif (+) apabila terbentuk pita pada 296 bp dan/atau 550 bp dan hasil dikatakan negatif (-) apabila pita DNA hanya terdapat di 848 bp. Jika tidak terdapat pita DNA berarti kualitas DNA jelek atau negatif (IQ2000).

Hasil Dan Pembahasan

Kuantitas DNA yang telah diisolasi dapat diuji secara kuantitatif dengan spektrofotometer.

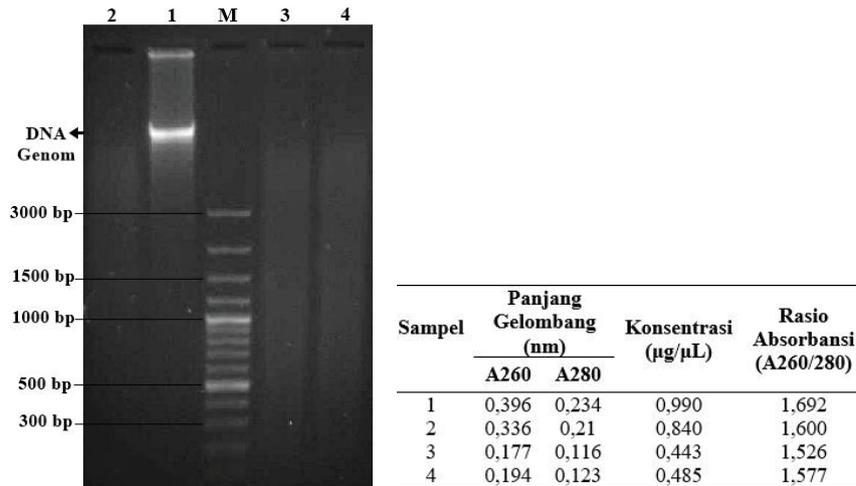
Prinsip pengukuran jumlah DNA menggunakan spektrofotometer didasarkan bahwa iradiasi sinar ultra violet (UV) diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Penyerapan iradiasi sinar UV secara maksimal oleh DNA dicapai pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan penyerapan maksimal oleh protein dicapai pada panjang gelombang 280 nm (Muladno 2002 dalam Saili 2010). Tabel 3 dibawah menunjukkan konsentrasi dan kemurnian isolasi DNA genom sampel uji.

Tabel 2. Nilai Konsentrasi Dan Kemurnian DNA Genom

Metode	Sampel (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Panjang Gelombang (nm)		Konsentrasi/ C(µg/µL)	Rasio Absorbansi (A260/280)
		A260	A280		
Thermal Lysis (Siwicki <i>et al</i> 2006)	Karangsong (K1S)	0,396	0,234	0,990	1,692
	Karangsong (K2S)	0,336	0,21	0,840	1,600
	Pangandaran (P1S)	0,177	0,116	0,443	1,526
	Pangandaran (P2S)	0,194	0,123	0,485	1,577
Lysis Buffer	Karangsong (K1L)	0,057	0,034	0,143	1,676
	Karangsong (K2L)	0,042	0,027	0,105	1,556
	Pangandaran (P1L)	0,076	0,048	0,190	1,583
	Pangandaran (P2L)	0,069	0,045	0,173	1,533
Kit Wizard Genomic DNA Purification	Karangsong (K1K)	0,748	0,506	1,870	1,478
	Karangsong (K2K)	0,338	0,229	0,845	1,476
	Pangandaran (P1K)	0,38	0,247	0,950	1,538
	Pangandaran (P2K)	0,396	0,237	0,990	1,671

Selain hasil dari spektrofotometer, untuk melihat kualitas isolat DNA dilakukan elektroforesis pada konsentrasi gel agarose 1,5%. Hasil elektroforesis DNA genom menunjukkan hasil pita DNA dengan ketebalan yang beragam

dan terdapat pula yang tidak terlihat pita DNA (Gambar 2, Gambar 3 dan Gambar 4). Elektroforesis DNA genom menggunakan marker 100 bp dengan tampilan pita rentang 100 – 3000 bp.



Gambar 2. Elektroforesis DNA Genom Metode Thermal Lysis Siwicki et al. (2006)

Keterangan :

Sumur M = Marker DNA Ladder 100 bp

Sumur 1 = Sampel Karangsong Metode *Thermal Lysis* (K1S)

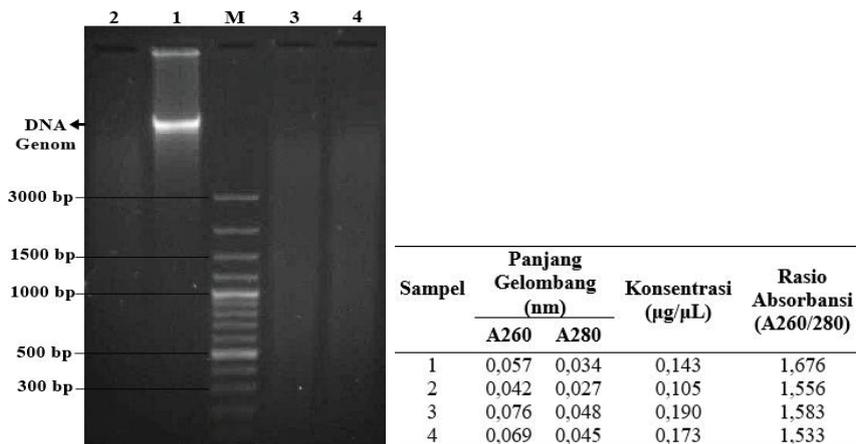
Sumur 2 = Sampel Karangsong Metode *Thermal Lysis* (K2S)

Sumur 3 = Sampel Pangandaran Metode *Thermal Lysis* (P1S)

Sumur 4 = Sampel Pangandaran Metode *Thermal Lysis* (P2S)

Hasil isolasi DNA dengan menggunakan metode isolasi DNA *thermal lysis* menghasilkan jumlah DNA genom yang relatif sedikit. Elektroforesis DNA genom *thermal lysis* menunjukkan hasil pita genom tipis dan terlihat samar-samar seperti tidak ada pita genom yang terbentuk (Gambar 2). Hal ini karena penggunaan PBS (*Phospat Buffer saline*) dan kombinasi inkubasi suhu tinggi dapat mengisolasi DNA virus (Siwicki et al. 2006).

Konsentrasi pita DNA genom terlihat pada hasil elektroforesis (Gambar 2), yaitu sumur K2S (sumur 2) dengan nilai konsentrasi 0,840 membentuk pita DNA genom dan tidak memiliki banyak *smear* atau tipis meskipun pita genomnya hanya berbentuk seperti bulatan kecil. K1S (sumur 1), P1S (sumur 4) dan P2S (sumur 5) memiliki konsentrasi DNA dibawah K2S (sumur 2) menunjukkan adanya *smear* yang lebih tebal



Gambar 3. Elektroforesis DNA Genom Metode *Lysis Buffer*

Keterangan :

Sumur M= Marker DNA Ladder 100 bp

Sumur 1 = Sampel Karangsong Metode *Lysis Buffer* (K2L)

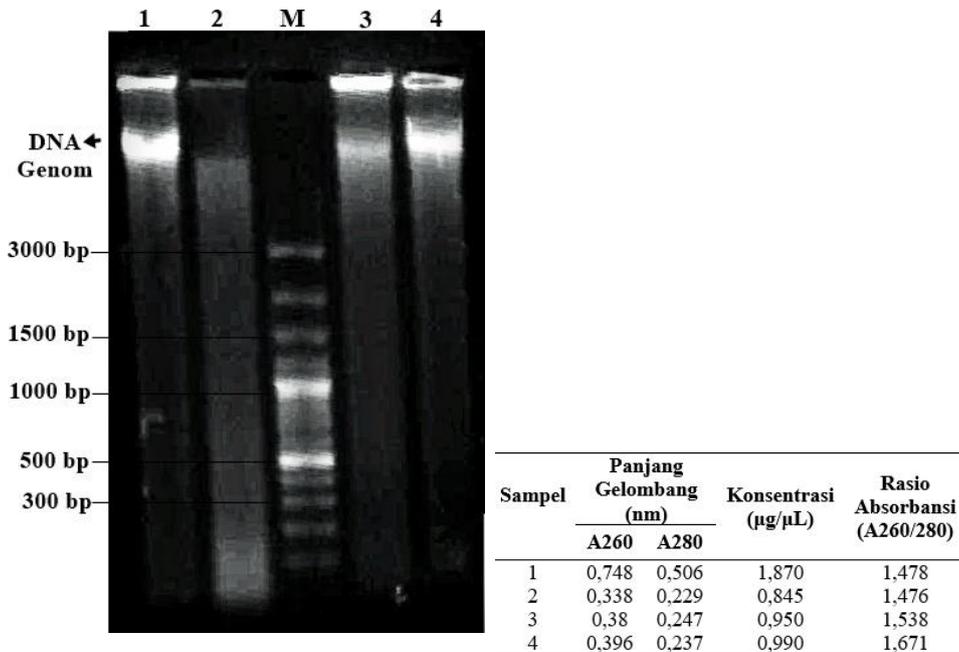
Sumur 2 = Sampel Karangsong Metode *Lysis Buffer* (K1L)

Sumur 3 = Sampel Pangandaran Metode *Lysis Buffer* (P1L)

Sumur 4 = Sampel Pangandaran Metode *Lysis Buffer* (P2L)

Metode isolasi DNA menggunakan *lysis buffer* merupakan metode isolasi yang menggunakan larutan buffer untuk proses pemecahan selnya. Penggunaan larutan buffer pada proses isolasi menggunakan Tris HCl dengan pH 8. Fungsi larutan buffer adalah untuk menjaga struktur DNA selama proses lisis dan pemurnian. Pada tahap akhir pemberian buffer TE untuk menjaga DNA terjaga selama penyimpanan.

Hasil isolasi DNA dengan menggunakan metode isolasi *lysis buffer* menghasilkan DNA genom dengan jumlah yang tidak terlalu banyak. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa pita DNA genom yang nampak tipis walaupun ada satu pita DNA genom yang terlihat jelas dan tebal. Pita DNA genom pada K1L (sumur 2) jelas dan tebal menunjukkan bahwa konsentrasi DNA sangat baik.



Gambar 4. Elektroforesis DNA Genom Metode Kit Wizard Genomic DNA Purification

Keterangan :

- Sumur M = Marker DNA Ladder 100 bp
- Sumur 1 = Sampel Karangsong Metode Kit (K1K)
- Sumur 2 = Sampel Karangsong Metode Kit (K2K)
- Sumur 3 = Sampel Pangandaran Metode Kit (P1K)
- Sumur 4 = Sampel Pangandaran Metode Kit (P2K)

Hasil isolasi DNA menggunakan Kit Wizard Genomic DNA Purification mampu menghasilkan DNA genom yang tebal atau berukuran besar (Gambar 4). Pita DNA genom yang terbentuk sangat jelas dibanding metode yang sebelum-sebelumnya. Meskipun pita DNA genom terbentuk dengan baik tetapi masih terdapat *smear* yang terlihat diatas dan dibawah pita DNA genom.

Proses isolasi menggunakan Kit Wizard Genomic DNA dilakukan penambahan EDTA dan Proteinase-K. Proteinase-K secara enzimatik membantu melisiskan membran pada sel darah (Khosravinia *et al.* 2007) serta mendegradasi protein globular maupun rantai polipeptida dalam komponen sel (Surzycki 2000). EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*) (EDTA) yang

berperan menginaktivasi enzim DNase yang dapat mendenaturasi DNA yang diisolasi, EDTA menginaktivasi enzim nuklease dengan cara mengikat ion magnesium dan kalsium yang dibutuhkan sebagai kofaktor enzim DNase (Corkill dan Rapley 2008).

Nilai konsentrasi DNA menggunakan Kit Wizard Genomic DNA Purification memiliki nilai konsentrasi paling tinggi dibanding dengan metode lainnya yaitu 1,870. Nilai 1,870 ini dipertegas dengan pita DNA genom yang sangat tebal pada K1K (sumur 1) dibanding sampel lainnya. Nilai konsentrasi DNA yang tinggi ini dihasilkan karena proses isolasi menggunakan Kit Wizard Genomic DNA Purification melibatkan tahapan pemurnian dan pencucian DNA.

Berdasarkan Gambar 4 konsentrasi DNA K1K (sumur 1) terlihat pita tebal yang tegas dengan *smear* yang sedikit dibawahnya. Nilai A260 K1K yaitu 0,748 dan nilai A280 yaitu 0,506 yang mana nilai A260 ini akan mempengaruhi nilai konsentrasi DNA sedangkan nilai A280 merupakan nilai yang menandakan kontaminan. Nilai A260 yang tinggi membuat pita DNA terlihat tebal (Gambar 4) sedangkan nilai A280 yang nilainya lebih rendah dibanding A260. Hal ini membuat pita DNA hasil elektroforesis terlihat jelas pada untuk sampel K1K (sumur 1) karena nilai A280 yang menunjukkan kontaminan memiliki perbedaan nilai yang cukup jauh dengan nilai A260 sampel K1K. Nilai A280 (kontaminan) inilah yang menjadi tanda adanya *smear* pada sampel K1K (Gambar 4).

Sampel K2K memiliki nilai A260 terendah yaitu 0,338 sehingga membuat nilai konsentrasi DNA sampel K2K menjadi nilai yang terendah dengan nilai konsentrasi 0,845 untuk metode Kit. Hal ini karena nilai A260 merupakan nilai yang menyatakan nilai DNA yang diserap oleh panjang gelombang 260 nm. Oleh karena itu, tinggi rendahnya nilai A260 akan berpengaruh pula pada nilai konsentrasi dan kemurnian. Hasil elektroforesis menunjukkan sampel K2K (sumur 2) pita DNA genom terlihat tipis dan samar-samar dan diikuti *smear*.

Berdasarkan Tabel 4 nilai konsentrasi sampel P1K yaitu 0,950 dengan nilai kemurnian 1,538. Hasil elektroforesis Gambar 4 menunjukkan pita DNA genom sampel P1K (sumur 3) yang tebal tetapi agak samar diikuti *smear* dibawah pita DNA. *Smear* yang terdapat pada hasil elektroforesis DNA genom menandakan adanya kontaminan yang nilainya merupakan nilai A280. Nilai A260 sampel P1K (sumur 3) yaitu 0,380 diikuti nilai A280 yaitu 0,247 yang menunjukkan nilai kontaminan pada sampel. Sampel P1K masih lebih baik dan bagus kualitas dibanding sampel K2K

Sampel P2K berdasarkan Tabel 4 memiliki nilai konsentrasi 0,990 yang merupakan nilai konsentrasi kedua tertinggi serta nilai kemurnian

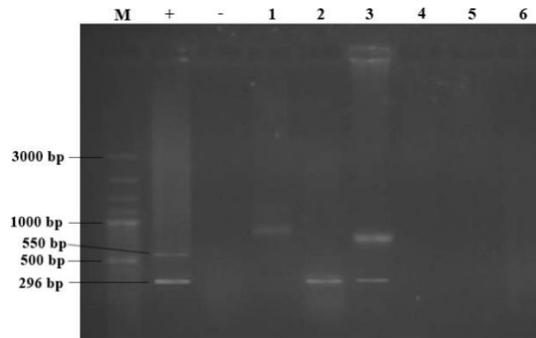
tertinggi yaitu 1,671 untuk metode Kit. Nilai konsentrasi yang tinggi membuat pita DNA genom (Gambar 4) sampel P2K (sumur 4) terlihat tebal dan jelas meskipun tidak sejelas sampel K1K (sumur 1) yang memiliki nilai konsentrasi yang lebih tinggi. *Smear* yang terlihat pada sampel P2K (sumur 4) tidak tebal seperti sampel K2K (sumur 2) dan P1K (sumur 3). Nilai A260 lebih besar dari nilai A280 membuat pita DNA sampel terlihat tebal.

Berdasarkan Tabel 4 nilai konsentrasi tinggi belum tentu nilai kemurniannya tinggi. Jika nilai A260 yang merupakan nilai untuk DNA tinggi maka nilai konsentrasi akan tinggi dan sebaliknya. Tetapi untuk nilai kemurnian meskipun nilai konsentrasi tinggi bukan berarti nilai kemurnian akan tinggi juga. Hal ini karena nilai nilai kemurnian dipengaruhi oleh nilai A280 (nilai kontaminan).

Hasil elektroforesis DNA genom secara keseluruhan selain terlihat pita DNA menunjukkan adanya *smear* yang terbawa dan terlihat tebal. *Smear* dapat disebabkan karena masih terdapatnya kontaminan seperti protein atau terbawanya sisa larutan pada proses isolasi. Menurut Mulyani *et al.* (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.

Elektroforesis Hasil PCR (Polymerase Chain Reaction) IQ 2000 WSSV

Isolat DNA yang diamplifikasi menggunakan IQ 2000 WSSV merupakan prosedur dua tahap yaitu *First* PCR dan Nested PCR. Amplifikasi *First* PCR dan Nested PCR mempunyai siklusnya masing-masing tetapi merupakan satu rangkaian untuk Amplifikasi menggunakan IQ 2000 WSSV. Isolat DNA yang sudah diamplifikasi kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 1,5%. Elektroforesis hasil PCR dapat dilihat pada Gambar 5 dan Gambar 6.



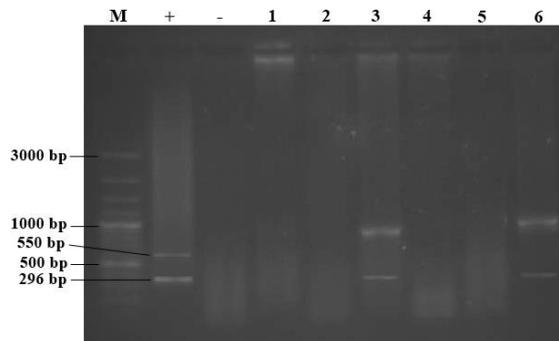
Gambar 5. Hasil Amplifikasi IQ 2000 Sampel Udang Karangsong

Keterangan :

- Sumur M= Marker Ladder 100 bp
- Sumur + = Kontrol positif (296 bp dan 550 bp)
- Sumur - = Kontrol negatif
- Sumur 1 = Sampel Karangsong Metode *Thermal Lysis* (K1S)
- Sumur 2 = Sampel Karangsong Metode *Lysis Buffer* (K1L)
- Sumur 3 = Sampel Karangsong Metode Kit (K1K)
- Sumur 4 = Sampel Karangsong Metode *Thermal Lysis* (K2S)
- Sumur 5 = Sampel Karangsong Metode *Lysis Buffer* (K2L)
- Sumur 6 = Sampel Karangsong Metode Kit (K2K)

Berdasarkan Gambar 5 dapat dilihat bahwa hasil pengujian isolat DNA menggunakan beberapa metode dengan teknik PCR dari 6 sampel Karangsong yang diperiksa, 2 sampel menunjukkan hasil positif (+) WSSV. Dua sampel positif WSSV ini terdiri adalah K1L (sumur 2) dan K1K (sumur 3) yang ditunjukkan terdapatnya pita DNA yang sejajar dengan kontrol positif (sumur +)

pada masing-masing berada pada 296 bp. Sampel lain yang tidak memunculkan pita DNA atau muncul diluar 296 bp dan 550 bp menandakan sampel tersebut negatif . Sumur M pada masing-masing gambar (Gambar 5) merupakan PCR Marker yang berfungsi sebagai penanda berat molekul DNA.



Gambar 6. Hasil Amplifikasi IQ 2000 Sampel Udang Pangandaran

Keterangan :

- Sumur M= Marker Ladder 100 bp
- Sumur + = Kontrol positif (296 bp dan 550 bp)
- Sumur - = Kontrol negatif
- Sumur 1= Sampel Pangandaran Metode *Thermal Lysis* (P1S)
- Sumur 2= Sampel Pangandaran Metode *Lysis Buffer* (P1L)
- Sumur 3= Sampel Pangandaran Metode Kit (P1K)
- Sumur 4= Sampel Pangandaran Metode *Thermal Lysis* (P2S)
- Sumur 5= Sampel Pangandaran Metode *Lysis Buffer* (P2L)
- Sumur 6= Sampel Pangandaran Metode Kit (P2K)

Berdasarkan Gambar 6 dapat dilihat bahwa hasil pengujian isolat DNA menggunakan beberapa metode dengan teknik PCR dari 6 sampel Pangandaran yang diperiksa, 2 sampel menunjukkan hasil positif (+) WSSV. Dua sampel positif WSSV ini terdiri adalah P1K (sumur 3) dan P2K (sumur 6) yang ditunjukkan kemunculan pita DNA yang sejajar dengan kontrol positif (sumur +) yang berada pada 296 bp. Sampel lain yang tidak memunculkan pita DNA atau muncul diluar 296 bp dan 550 bp menandakan sampel tersebut negative.

Pita DNA genom yang muncul sejajar dengan kontrol positif menunjukkan keberadaan

WSSV yang telah diisolasi pada masing-masing metode isolasi DNA dapat terdeteksi dan menandakan bahwa metode isolasi DNA yang digunakan mampu mengisolasi DNA WSSV. Sampel yang positif WSSV dibandingkan dengan Standar Hasil Elektroforesis WSSV IQ 2000 (Gambar 3) terdapat 4 sampel yang terkena serangan WSSV sangat ringan yaitu sampel K1K, P1K dan P2K. Sedangkan sampel yang terkena serangan WSSV ringan yaitu sampel K1L. Hasil amplifikasi menggunakan IQ 2000 WSSV selengkapnya dapat dilihat di Tabel 4.

Tabel 3. Hasil Ampilifikasi IQ 2000 dan Tingkat Serangan WSSV

Sampel	Ukuran Fragmen	Tingkat Serangan
K1S	-	-
K2S	-	-
P1S	-	-
P2S	-	-
K1L	+ (296 bp)	Ringan
K2L	-	-
P1L	-	-
P2L	-	-
K1K	+ (296 bp dan 848 bp)	Sangat ringan
K2K	-	-
P1K	+ (296 bp dan 848 bp)	Sangat ringan
P2K	+ (296 bp dan 848 bp)	Sangat ringan

Keterangan :
 + = Positif terserang WSSV
 - = Tidak terserang WSSV

Efisiensi Waktu

Waktu pengerjaan sampel pada tahap awal yaitu isolasi DNA menjadi penting untuk mengetahui lebih awal suatu penyakit. Oleh karena itu, waktu yang diperlukan untuk isolasi DNA perlu diperhatikan. Setiap metode isolasi berbeda prosedur maka berbeda pula waktu pengerjaan. Untuk tahapan persiapan dapat tidak dimasukkan kedalam perhitungan waktu pengerjaan.

Proses awal isolasi masing-masing metode sama yaitu pemotongan sampel jaringan dapat diestimasi waktu yang diperlukan sama. Begitu pula proses penambahan-penambahan larutan yang digunakan selama proses isolasi. Untuk proses inkubasi dan sentrifugasi dapat dimasukkan menjadi perhitungan khusus karena tiap-tiap metode isolasi mempunyai waktunya tersendiri.

Isolasi DNA metode *thermal lysis* berdasarkan prosedur diperlukan ± 40 menit untuk mengerjakan proses isolasi dari awal hingga akhir. Metode isolasi DNA kedua yaitu metode *lysis buffer* perlu ± 50 menit waktu pengerjaan dari awal hingga selesai. Sedangkan untuk metode Kit waktu yang diperlukan untuk pengerjaannya ± 180 menit.

Perbandingan Metode Isolasi DNA Terhadap Sensitifitas Deteksi WSSV

Isolasi DNA genom udang vaname yang terinfeksi WSSV menggunakan beberapa metode isolasi DNA menunjukkan hasil yang berbeda baik dari segi kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan. Perbandingan efektifitas dan sensitifitas isolasi DNA untuk mendeteksi serangan WSSV dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 4. Perbandingan Efektifitas dan Sensifitas Isolasi DNA

Metode	Efektifitas Deteksi WSSV			
	Efisiensi Waktu	Konsentrasi DNA	Kemurnian DNA	Amplifikasi
Thermal Lysis (Siwicki <i>et al</i> 2006)	+++	++	++	+
Lysis Buffer	+++	++	++	+++
Kit Wizard Genomic DNA Purification	++	+++	++	+++

Keterangan :

+ = Kurang Baik

++ = Baik

+++ = Sangat Baik

Berdasarkan ketiga metode tersebut nilai konsentrasi DNA yang tertinggi diperoleh dari sampel yang diisolasi menggunakan metode Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) yaitu mencapai 1,870 µg/µL. Kemudian metode *thermal lysis* Siwicki *et al.* (2006) dengan nilai konsentrasi mencapai 0,990 µg/µL dan yang terakhir metode *lysis buffer* dengan nilai konsentrasi mencapai 0,190 µg/µL. Untuk nilai kemurnian DNA hasil isolasi masing-masing metode secara keseluruhan sudah cukup baik dengan kisaran nilai 1,476-1,692 (Tabel 3).

Berdasarkan Tabel 5 metode yang memiliki efisiensi waktu dan cara pengerjaan yang cepat serta mudah adalah metode isolasi *thermal lysis* dan *lysis buffer* dengan waktu pengerjaan isolasi ± 40 menit dan ± 50 menit. Akan tetapi *lysis buffer* lebih baik karena hasil amplifikasinya menunjukkan positif WSSV dengan tingkat serangan ringan sedangkan *thermal lysis* menunjukkan hasil negatif WSSV. Metode Kit kurang baik dalam segi efisiensi waktu dan cara pengerjaannya karena menghabiskan waktu ± 180 menit yang cukup membutuhkan usaha yang lebih besar dalam pengerjaannya. Meskipun waktu pengerjaan yang cukup lama tapi bagi perusahaan atau pembudidaya besar, hal ini tidak menjadi masalah yang besar selama hasil yang diperoleh baik.

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Metode Kit Wizard Genomic DNA Purification sensitif dalam deteksi WSSV pada sampel udang vaname asal Karangsong dan Pangandaran dengan nilai konsentrasi DNA tertinggi (1,870 µg/µL) serta nilai kemurnian 1,671.

2. Metode isolasi DNA yang efektif dan efisien dari segi waktu dan pengerjaan dalam deteksi WSSV adalah metode *lysis buffer*.
3. Hasil deteksi WSSV menunjukkan sebanyak 2 sampel udang vaname asal Pangandaran dan 1 sampel asal Karangsong terinfeksi sangat ringan dengan kit Wizard Genomic DNA serta 1 sampel asal Karangsong terinfeksi ringan dengan *lysis buffer*.

Saran

Saran yang dapat disampaikan yaitu untuk deteksi WSSV yang tidak menunjukkan gejala klinis disarankan penggunaan metode Kit Wizard Genomic DNA Purification khusus untuk udang vaname asal Karangsong dan Pangandaran serta perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai deteksi WSSV menggunakan metode lainnya.

Daftar Pustaka

- Barbas, C.F., D.R. Button, J.K. Scott, and G.J. Silverman. 2001. *Quantitation of DNA dan RNA. Adapted from "General Procedure" appendix 3.* Cold Spring Harbor, NY. USA.
- Corkill, G., R. Rapley. 2008. *The Manipulation of Nucleic Acids: Basic Tools and Techniques. In: Molecular Biotechnology Handbook Second Edition.* Ed: Walker, J.M., Rapley, R. Humana Press, NJ, USA
- Gray, W., L. Mullis, S. Lapatra, J. Groff, and A. Goldwin. 2002. *Detection of koi herpesvirus in tissues of infected fish. J. Fish. Dis., 25 : 171 – 178.*
- IQ2000™.
http://www.iq2000kit.com/products_2.php?bgid=1&gid=1&sgid=1.

- Khosravinia, H., H.N.N. Murthy, D.T. Parasad, & N. Pirany. 2007. *Optimizing Factors Influencing DNA Extraction from Fresh Whole Avian Blood*. African Journal of Biotechnology. 6 (4): 481-486
- 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.)*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran. Jurnal Akuatika Vol. II No. 1/Maret Tahun 2011.
- Novita, H., T.Mufidah, I. Koseharyani. 2009. *Perbandingan Penggunaan Berbagai Preservasi RNA Jaringan Dengan RNA LATER, Alkohol, Dan Alkoholgliserol Untuk Deteksi IMNV Dengan PCR*. Pusat Riset Perikanan Budidaya. Jakarta Selatan.
- Sahana, C. 2010. *Produksi Udang Turun Akibat Serangan Virus*. <http://techno.okezone.com/read/2010/09/22/373/374602/produksi-udang-turun-akibat-serangan-virus>. Diunduh pada tanggal 1 Februari 2015 pukul 23.03
- Saili, T., E.T. Margawati., Muladno. 2010. *Analisis Molekuler Tingkat Kekerabatan Babi Hutan dan Babi Rusa*. Diakses dari <http://takdirsaili.wordpress.com/2010/02/03/analisis-molekuler-tingkat-kekerabatan/> pada tanggal 1 Desember 2015 pukul 20:53.
- Siwicki, A.K. A. Lepa, J. Malaczewska, B. Kazun, K. Kazun, and E.T. Majewska. 2006. *Isolation and identification of Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis (CNGV) in fingerling common carp (Cyprinus carpio L.)*. Arch.Pol.Fish. 14 (2) : 157 – 167.
- Yowledge, T.M. 2003. *The Polymerase Chain Reaction*. www.faseb.org/opa.bloosuply/pcr.html diakses pada tanggal 25 Juli 2013.