

PERBANDINGAN METODE PCR KONVENSIONAL DENGAN METODE PCR PORTABLE KIT UNTUK DETEKSI WSSV PADA UDANG VANNAMEI

*COMPARISON OF CONVENTIONAL PCR METHODS WITH PORTABLE KIT PCR
METHODS FOR DETECTION OF WSSV IN VANNAMEI SHRIMP.*

Rr. Amaliah Fitri¹, Farida^{2*}, Eko Prasetyo²

1. Staff SKIPM Pontianak, Jl. Arteri Supadio, Km.18, Kab.Kubu Raya
 2. Staff Pengajar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, UM Pontianak
- *Email: farida11zf@gmail.com

Abstrak

Udang vannamei merupakan komoditi yang mendominasi pertambakan dipesisir wilayah Kalimantan Barat. Usaha budidaya tersebut tumbuh pesat dengan resiko penyebaran penyakit yang juga tinggi. Serangan penyakit yang paling umum dan sering ditemukan pada budidaya udang vannamei adalah WSSV (*White spot Syndrome Virus*) Identifikasi penyakit virus WSSV di SKIPM Pontianak dilakukan dengan dua metode yang berbeda yaitu metode PCR Konvensional dan Portable Kit PCR. Metode PCR konvensional merupakan salah satu alternatif untuk deteksi penyakit virus yang cukup akurat dan relatif lebih murah, jika dibandingkan dengan metode lain yang sedang berkembang saat ini seperti metode *PCR Portable Kit* yang proses deteksi lebih singkat karena tidak memerlukan tahap elektroforesis. Melihat dari kelebihan dan kekurangan masing- masing metode tersebut, sehingga menimbulkan alasan untuk mengetahui lebih lanjut tentang presisi dan akurasi sensitivitas dari kedua metode tersebut dalam mendeteksi infeksi virus WSSV pada udang vannamei. Pengamatan dilakukan pada variabel plasmid kontrol (+) masing – masing kit uji, plasmid DNA sampel dan plasmid DNA virus WSSV dengan indikator hasil pemeriksaan positif, negatif, terdeteksi maupun tidak terdeteksi. Setiap hasil pemeriksaan variabel pengamatan akan diberi nilai pembobotan tertentu, untuk mengetahui presisi dan akurasi sensitivitas dari kedua metode PCR dalam mendeteksi infeksi virus WSSV pada udang vannamei.

Kata kunci: deteksi WSSV; PCR IQ 2000; PCR Portabel Kit; perbandingan metode; nilai pembobotan

Abstract

The cultivation business is growing rapidly with a high risk of spreading the disease. The most common disease attack and often found in vannamei shrimp farming is WSSV (*White spot Syndrome Virus*). WSSV virus disease identification in SKIPM Pontianak was carried out by two different methods namely Conventional PCR and Portable PCR methods. The conventional PCR method is an alternative for the detection of viral diseases that is quite accurate and relatively inexpensive, compared to other methods that are currently developing, such as the PCR Portable Kit method, which has a shorter detection process because it does not require electrophoretic stages. Seeing the advantages and disadvantages of each of these methods, giving rise to reasons to find out more about the precision and accuracy of the two methods in detecting WSSV virus infections in vannamei shrimp. Observations were made on the control plasmid variables (+) of each test kit, plasmid DNA samples and DNA plasmids with WSSV virus with positive, negative, detectable or undetectable test indicators. Each examination result of the observation variable will be given a certain weighting value, to determine the precision and accuracy of sensitivity of the two PCR methods in detecting WSSV virus infections in vannamei shrimp.

Keywords: WSSV detection; IQ 2000 PCR; Portable PCR Kit; method comparison; weighting value

1. PENDAHULUAN

Udang vannamei merupakan komoditi yang mendominasi pertambakan dipesisir wilayah Kalimantan Barat. Usaha budidaya tersebut tumbuh pesat dengan resiko penyebaran penyakit yang juga tinggi. Serangan penyakit yang paling umum dan sering ditemukan pada budidaya udang vannamei adalah WSSV (*White spot Syndrome Virus*). Penyakit WSSV adalah penyakit yang menyerang pada udang. Penyakit ini disebabkan oleh virus spesies WSSV, famili Nimaviridae. Tingkat kematian akibat infeksi virus ini mencapai 100% dalam waktu 3-19 hari post infeksi. Penyakit ini dikenal dengan nama penyakit bintik putih pada udang. Virus ini bereplikasi di nukleus, berbentuk ellipsoid sampai basil, memiliki ekor di salah satu kutub partikel virus. Organ target dari WSSV pada udang penaeid adalah jaringan ektodermal (epidermis kutikuler, saluran pencernaan depan dan belakang, insang dan jaringan saraf) dan mesodermal (organ limfoid, glandula antenna, jaringan ikat dan jaringan hematopoietik). Gejala klinis pada fase akut muncul bintik-bintik putih pada lapisan dalam eksoskeleton dan epidermis. Gejala lainnya adalah lethargi, tidak mau makan, lemah, berenang ke permukaan dan terjadi diskolorasi kemerahan pada tubuh (Mahardika, et.al., 2004).

Identifikasi penyakit virus WSSV di SKIPM Pontianak dilakukan dengan dua metode yang berbeda yaitu metode PCR Konvensional dan Portable Kit PCR. Metode PCR konvensional merupakan salah satu alternatif untuk deteksi penyakit virus yang cukup akurat dan relatif lebih murah, jika dibandingkan dengan metode lain yang sedang berkembang saat ini seperti metode *PCR Portable Kit* yang proses deteksi lebih singkat karena tidak memerlukan tahap elektroforesis. Melihat dari kelebihan dan kekurangan masing-masing metode tersebut, sehingga menimbulkan alasan untuk mengetahui lebih lanjut tentang presisi dan akurasi sensitivitas dari kedua metode tersebut dalam mendeteksi infeksi virus WSSV pada udang vannamei.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode yang lebih baik dalam pengujian PCR konvensional maupun portable kit untuk identifikasi penyakit WSSV.

2. BAHAN DAN ALAT

Penelitian ini dilaksanakan selama lebih kurang enam bulan untuk memenuhi keterwakilan dari musim kemarau hingga musim penghujan. Dan pengamatan dilakukan di Laboratorium SKIPM Pontianak.

Sampel uji berasal dari udang vannamei yang diterima di Laboratorium SKIPM Pontianak. Sampel udang yang diterima terlebih dahulu dicuci dengan air bersih. Sampel yang berjumlah lebih dari satu harus dihomogenkan kemudian sampel disiapkan sesuai dengan organ target yang akan diperiksa yaitu insang, karapas, kaki renang dan hepatopankreas.

Sesuai dengan acuan yaitu PCR Konvensional menggunakan kit IQ 2000TM-WSSV, meliputi:

Tabel 1. Bahan PCR Konvensional IQ 2000TM-WSSV

No.	Nama Bahan	Jumlah	Keterangan
1.	KIT Extraction DNA (200 reaksi/kit) :		
	DTAB solution	125ml/btl	simpan disuhu ruang
	CTAB solution	25ml/btl	simpan disuhu ruang
	Dissolving solution	30ml/btl	simpan disuhu 4°C
	Lysis Buffer	100ml/btl	simpan disuhu ruang
2.	WSSV Amplifikasi Kit (200 reaksi/kit) :		simpan disuhu -20°C
	First PCR PreMix	4 vials 450µl/vial	
	Nested PCR PreMix	4 vials 840 µl/vial	
	P(+) standard	1vial100µl/vial	10 ⁴ copies/µl
	Yeast tRNA	1 vial 500 µl/vial	40ng/µl
	Iqzyme DNA Polymerase	1 vial 2U/µl	360µl/vial
	6x Loading dye	1 vial 1500 µl/vial	
	DNA Marker	1 vial 100µl/vial	(848 bp, 630 bp & 333 bp)

Untuk metode PCR Portable Kit, menggunakan acuan IQ PlusTMWSSV Kit with POCKIT Manual, bahan yang digunakan meliputi:

Tabel 2. Bahan IQ PlusTMWSSV Portable Kit

Component	Komposisi	Jumlah
WSSV Premix Pack	Pellet kering yang mengandung dNTPs, primer WSSV, pewarna DNA, dan enzyme.	6 kemasan (8 mikrotube /pack)
Premix Buffer B	Pelarut premix WSSV.	2 vials(1.3ml/vial)
WSSV P(+) Control	Plasmid pellet kering WSSV squence positif.	1 vial
P(+) Control Buffer	Pelarut Plasmid kontrol (+)	1 vial(110 ul/vial)
Loop inokulasi		3 packs(20 loop/pack)
Panduan Manual		1 buku

Sesuai dengan acuan yaitu IQ-2000TM – WSSV, peralatan yang digunakan adalah: Thermal cycler dengan ukuran block sampel untuk tube 0,2ml, Microcentrifuge (12000 rpm, d=5 to 8cm), Kotak Electrophoresis, UV transilluminator, Vortex mixer, Heating block, Micropipette dan Kamera polaroid dengan system photo digital.

Sedangkan metode PCR Portable Kit, menggunakan acuan IQ Plus™ WSSV Kit with POCKIT Manual, alat yang digunakan meliputi, POCKIT™ Nucleic Acid Analyzer:iiPCR - Portable instrument untuk IQ Plus™ Detection Kit, cubee™ Mini -Centrifuge, Micropipette dan filter tips.

Prosedur identifikasi virus WSSV pada udang vannamei dengan PCR konvensional melalui tiga tahapan kegiatan Yaitu: ekstraksi, amplifikasi dan elektroforesis.

Adapun prosedur kerja ekstraksi adalah pertama tempatkan sampel kedalam tube ukuran 1,5ml yang berisi 600ul DTAB solution. Kemudian hancurkan sampel didalam tube dengan menggunakan pastel sekali pakai. Inkubasi sampel pada suhu 75°C selama 5 menit, kemudian dinginkan pada suhu ruang. Vortex dan endapkan cairan, kemudian tambahkan 0,7ml chloroform, vortex lebih kurang 20 detik dan sentrifuge 12.000g (12.000rpm =5~7cm) selama 5 menit. Pindahkan 200µl cairan pada bagian atas kedalam tube 1,5ml yang baru, tambahkan 100µl CTAB solution dan 900µl ddH₂O, vortex, kemudian inkubasi pada suhu 75°C selama 5 menit. Selanjutnya Dinginkan disuhu ruang dan sentrifuge 12.000g selama 10 menit. Pindahkan supernatan secara hati-hati, tambahkan 150 µl Dissolve Solution, inkubasi pada suhu 75°C selama 5 menit, kemudian dinginkan pada suhu ruang. Sentrifuge 12.000g selama 5 menit. Pindahkan cairan bening kedalam tube 1.5ml yang baru, dan tambahkan 300 µl ethanol 95%. Vortex, sentrifuge 12000g selama 5 menit, kemudian bilas pellet dengan 200µl etanol 75%, endapkan, keringkan pellet dan tambahkan ddH₂O atau TE buffer.

Sedangkan prosedur kerja PCR IQ 2000TM Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan Thermal cycler. Reagen First PCR Kit IQ 2000 disiapkan dan dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 ml dengan komposisi 7,5 µl First PCR Premix, 0,5 µl IQzyme, 2 µl DNA template (sampel, kontrol +, kontrol -). Proses amplifikasi dimulai pada tahap 1 (First PCR) dengan suhu 94°C, 62°C, 72°C, dan 20°C. Setelah First PCR, ditambahkan Nested PCR yaitu sebanyak 14 µl Nested PCR Premix dan 1 µl IQzyme. Amplifikasi tahap 2 (PCR Nested) pada suhu: 94°C, 62°C, 72°C, dan 20°C.

Prosedur kerja elektroforesis yang digunakan adalah sampel atau DNA template hasil amplifikasi sebanyak 8 µl ditambahkan dengan 2 µl 6x Loading dye, kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarose 2% yang direndam dengan TAE buffer dengan kekuatan listrik 110- 125 V selama 35-45 menit. Setelah elektroforesis, agarose direndam dalam larutan Ethidium Bromide (10 µl EtBr dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest) selama 10 menit, kemudian agarose direndam dengan aquadest selama 10 menit (pencucian berulang). Agarose hasil pencucian diamati pada UV tansilluminator dan dilakukan analisis.

Prosedur kerja identifikasi virus WSSV pada udang vannamei dengan PCR POCKIT melalui dua tahapan kegiatan yaitu: ekstraksi dan amplifikasi.

Adapun prosedur kerja ekstraksi dengan PCR POCKIT yang digunakan adalah pertama ekstraksi asam nukleat berupa DNA dilakukan dengan teknik spin column secara bersamaan (simultaneous), asam nukleat berupa campuran DNA dan RNA selanjutnya digunakan dalam proses amplifikasi. Sampel organ bisa berupa pleopod (50 mg) atau 10 ekor untuk ukuran PL atau 20 mg hepatopancreas. Sampel dimasukan dalam mikrotube 1,5 mL ditambahkan 500 µL larutan-1 (larutan lysis) kemudian dihancurkan dengan pestel. Setelah semua bahan uji lisis atau hancur ditambahkan 500 µL larutan-2 (larutan yang mengandung alkohol sebagai pengikat DNA) dan dicampurkan dengan baik dan diendapkan (spin) selama satu menit untuk memisahkan protein dan asam nukleat. Sebanyak 500 µL supernatan yang mengandung asam nukleat (DNA) dipindahkan ke dalam spin-column tube, kemudian diendapkan (spin) selama satu menit, lalu cairan yang ada di dalam tabung penampung dibuang, sedangkan asam nukleat berada pada bagian dasar spin column. Untuk pembilasan ditambahkan larutan-2 kembali sebanyak 500 µL pada spincolumn, diendapkan selama 3 menit lalu larutan yang tertampung pada tabung dibuang. Pindahkan spincolumn (yang mengandung asam nukleat DNA) pada 1,5 mL tabung mikro baru dan tambahkan pelarut/elution asam nukleat sebanyak 200 µL (untuk sampel jaringan) dan 400 µL (untuk sampel hepatopankreas) kemudian diendapkan (spin) selama satu menit. Selanjutnya asam nukleat yang didapat, digunakan untuk amplifikasi WSSV. Untuk jumlah sampel tersebut di atas akan menghasilkan konsentrasi DNA 10-100 ng/µL.

Adapun prosedur kerja amplifikasi adalah WSSV diamplifikasi menggunakan IQ Plus™ WSSV Kit dan IQ Plus™ IMNV Kit. Sebelumnya persiapkan Premix pack (dalam mikrotube) yang mengandung (dNTPs, spesifik primer WSSV, fluorescent probes dan enzim) dalam bentuk pelet kering kemudian ditambahkan 50 µL premix buffer sebagai pelarut premix (larutan yang telah dilarutkan harus segera digunakan dalam waktu kurang dari satu jam) dan dilanjutkan pada proses berikutnya. Ambil atau tambahkan 1 loop (loop plastik tersedia dalam kit) asam nukleat DNA uji ke dalam larutan premix. Selanjutnya semua premix dan DNA di masukkan ke dalam R-Tube, kemudian R-tube diletakkan pada holder yang telah tersedia dengan posisi baik dan benar dengan menggunakan sarung tangan, karena bagian bawah R-tube berupa tabung gelas optikal yang berpengaruh dalam proses deteksi/membaca dengan bantuan fluorescent. Bagian atas R-tube diberi label kemudian setelah tertutup dengan baik, rangkaian R-tube dimasukkan ke dalam mesin Pockit. Pada alat dipilih panjang gelombang 520 nm + 550 nm, selanjutnya mesin dijalankan dengan menekan tombol "Run" sesuai dengan petunjuk.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Gejala Klinis

Menurut Subyakto Slamet, *et.al.* (2009), bahwa WSSV merupakan virus yang menyerang sistem organ krustasea yang menyebabkan bercak putih pada permukaan eksternal udang sehingga menyebabkan kerugian berupa kematian yang tinggi (mortalitas) mencapai 100% dalam waktu 3-19 hari post infeksi. Tetapi rata – rata sampel yang diterima di SKIPM Pontianak tidak menunjukkan gejala klinis kearah diagnosa terinfeksi virus WSSV. Sehingga hal ini dapat memberikan diagnosa awal pada kesimpulan gejala klinis sampel uji bersifat sehat dan normal. Namun demikian, selama penelitian dijumpai beberapa sampel yang tidak menunjukkan gejala klinis terinfeksi virus WSSV pada diagnosa awal, namun teridentifikasi positif terinfeksi virus WSSV. Secara fisik hampir semua sampel uji tidak menunjukkan gejala klinis terserang penyakit *White Spot Syndrome Virus* (WSSV), karena tidak terlihat adanya bercak putih pada tubuh udang.

Hal tersebut dapat terjadi, dikarenakan tingkat virulensi virus yang rendah, sehingga kerusakan yang muncul pada udang tidak dapat terdiagnosa secara makroskopis. Rendahnya tingkat virulensi virus tersebut dapat disebabkan oleh faktor salinitas perairan. Menurut Hardyta (2014), semakin rendah salinitas air pada media pemeliharaan udang, maka semakin rentan udang terhadap infeksi WSSV. Hal ini ditandai dengan tingkat mortalitas yang semakin tinggi saat salinitas semakin rendah. Fakta lain dikemukakan oleh Edison (2009), menyebutkan bahwa infeksi WSSV pada udang penaeid ada 3 jenis. Tipe I infeksi akut atau sub akut, tingkat keparahan jaringan adalah sedang sampai tinggi, kematian terjadi dalam waktu 7 – 10 hari, dan udang memiliki bintik putih pada karapas. Tipe II (parachute) udang tampak memerah, tingkat keparahan jaringan yang terinfeksi sangat tinggi dan terjadi kematian masal dalam waktu 2 – 3 hari. Tipe III (kronis) dimana infeksi yang dialami oleh jaringan rendah sehingga bintik putih dan kemerahan pada udang tidak tampak. Kemudian disebutkan pula bahwa kematian akan terjadi lebih lama yaitu 15-28 hari.

Sehingga fase penyerangan virus WSSV yang masih berada pada tahap awal (III), tidak menunjukkan gejala bintik putih yang terbentuk dari penumpukkan garam-garam mineral pada lapisan epitel karapas. Selain itu udang juga tidak menunjukkan perubahan tingkah laku yang mengarah pada gejala klinis serangan WSSV, seperti yang dikemukakan oleh Amrillah, *et.al.* (2015), jika udang terinfeksi WSSV akan mengalami perubahan tingkah laku yaitu menurunnya aktifitas berenang, kurangnya keseimbangan dalam berenang, dan tidak terarah. Selain itu udang lebih sering berenang bergerombol di tepi tambak dan berenang ke permukaan.

B. Pemeriksaan Organ Target

Organ target utama yang diinfeksi oleh virus WSSV yaitu epitel kulit (kutikula), insang, dan jaringan ikat. Tetapi WSSV cenderung menginfeksi dengan frekuensi yang kecil pada hepatopankreas, kelenjar epitel antenna, sel organ limfoid, syaraf, dan fagosit pada hati (Edison, 2009).

Selama penelitian pemeriksaan organ target dari karapas, kaki jalan dan insang tidak menunjukkan adanya tanda gejala klinis dari infeksi virus *Vannamei*. Karapas dan insang sampel uji tidak mengalami perubahan warna, tekstur daging juga masih kenyal dan utuh. Demikian pula dengan organ target hepatopankreas sampel uji masih berwarna

merah, tidak mengeluarkan bau menyengat dan tidak terjadi kerusakan jaringan secara makroskopis. Hepatopankreas yang terindikasi terinfeksi virus vannamei, biasanya akan menunjukkan perubahan warna dari merah menjadi kehijauan, selain itu juga terdapat kerusakan jaringan yang terlihat secara makroskopis. Apabila dilihat dengan bantuan elektro mikroskop, pada lapisan inti sel virus penyebab WSSV terlihat jelas berupa titik-titik berwarna hitam pekat. Pada gejala yang lebih parah inti sel akan membengkak dan menekan cairan sel, karena penekanan inti sel ini melebihi toleransi elastisitas dinding sel, maka sel pun pecah (Rohman, 1995).

Namun terdapat beberapa organ target sampel uji yang tidak menunjukkan gejala klinis terinfeksi virus WSSV, tetapi hasil identifikasinya menunjukkan positif virus WSSV. Hal tersebut dapat disebabkan oleh tingkat virulensi virus yang tidak terlalu ganas, sehingga dampak kerusakan atau abnormalitas dari sampel uji tidak terlihat secara signifikan.

Sampel uji yang telah diregistrasi langsung didistribusikan ke ruang virologi kemudian memulai proses ekstraksi sesuai dengan prosedur identifikasi PCR konvensional IQ 2000 maupun prosedur IQ Plus. Beberapa sampel yang tidak di ekstraksi pada hari yang sama, akan diawetkan dengan fiksasi larutan alkohol 60%.

Menurut Zulda (2018), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dan metanol (CH_3OH) adalah fiksatif koagulan yang mendenaturasi protein. Mereka mengganti ikatan air pada jaringan sehingga mengganggu ikatan hidropobik dan hidrogen kemudian mengekspos bagian hidropobik internal dari protein dan mengganggu struktur tersiernya dan solubilitasnya di air. Metanol berinteraksi lebih kuat pada area hidropobik daripada etanol. Fiksasi dimulai dari konsentrasi 50-60% untuk etanol dan >80% untuk metanol.

C. Prevalensi Virus WSSV

Dalam penelitian prevalensi dilakukan terhadap jumlah sampel uji yang teridentifikasi positif virus WSSV, dengan perhitungan sebagai berikut :

Tabel 3. Prevalensi Serangan Virus WSSV

no.	Bulan (th.2018)	Σ Sampel	Σ sampel	Prosentase
			terinfeksi penyakit	Prevalensi
1	April	14	2	0,14 %
2	Mei	14	0	-
3	Juni	14	0	-
4	Juli	14	1	0,07%
5	Agustus	14	1	0,07%
6	September	14	0	-

Nilai dari prevalensi diatas menunjukkan angka tertinggi pada 0,14% yaitu pada bulan April 2018, hal ini dapat diartikan bahwa tingkat virulensi virus WSSV masih berada pada ambang batas bawah (2%) menurut BUSKIPM, 2013. Tinggi atau rendahnya prosentase prevalensi dari tingkat serangan penyakit biasanya dipengaruhi oleh sifat keganasan (virulensi) dari suatu penyakit. Semakin ganas suatu penyakit maka tingkat prevalensi serangannya akan semakin tinggi. Selain itu menurut Granja et al. (2003) dalam Edison (2009), suhu tinggi berperan penting terhadap menurunnya prevalensi WSSV. Di Ekuador dan Thailand, prevalensi WSSV di tambak serta pembibitan menurun seiring dengan datangnya musim yang lebih hangat, hal ini berpengaruh terhadap replikasi WSSV yang tidak optimal pada suhu tinggi.

D. Perbandingan Interpretasi Pemeriksaan PCR

Data hasil interpretasi pemeriksaan PCR disajikan dalam bentuk tabel yang berisi data rekapitulasi pengamatan harian dan grafik data rekapitulasi pengamatan harian. Pengamatan dilakukan pada variabel plasmid kontrol (+) masing – masing kit uji, plasmid DNA sampel dan plasmid DNA virus WSSV dengan indikator hasil pemeriksaan positif, negatif, terdeteksi maupun tidak terdeteksi.

Interpretasi Pemeriksaan PCR konvensional

Dari hasil penelitian, pengujian PCR konvensional plasmid DNA ditentukan secara kualitas dengan visualisasi pada elektroforesis gel agarose. Hasil proses elektroforesis akan menampilkan pita-pita DNA yang letaknya tersebar, tergantung pada berat molekulnya. Pita-pita DNA kemudian dibandingkan dengan posisi pita-pita pada lajur penanda DNA (DNA marker). Dari hasil proses elektroforesis ini dapat disimpulkan status sampel, terinfeksi virus atau bebas dari virus (Genereach Biotechnology Corp. 2013). Selama penelitian, plasmid DNA kontrol positif dari IQ 2000 dapat terlihat pada gel agarose. Dari hasil pemeriksaan virus WSSV yang dilakukan, terdapat beberapa pita DNA mengalami smear pada visualisasi agarose elektroforesis. Banyak sedikitnya DNA yang

dihasilkan atau baik buruknya kualitas DNA hasil ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu pada saat ekstraksi dan kondisi sampel. Anam (2010) dalam Mulyani *et al.* (2011) menyebutkan bahwa proses homogenasi menggunakan vortex mix dapat membantu proses pelisisan, namun dapat menyebabkan DNA terpotong-potong sehingga menyebabkan terbentuknya beberapa pita DNA (*smear*) ketika di elektroforesis.

Tabel 4. Data Pengamatan Hasil Interpretasi PCR konvensional

no	Bulan	Plasmid (+)		Plasmid DNA Virus	Plasmid DNA Virus	Plasmid DNA WSSV		Tidak terdeteksi
		520 nm	550 nm	Terdeteksi	Tidak terdeteksi	Terdeteksi (+)	Terdeteksi (-)	
1	April	14	14	2	14	2	12	0
2	Mei	14	14	0	14	0	14	0
3	Juni	14	14	0	13	1	13	1
4	Juli	14	13	1	14	1	13	0
5	Agustus	14	14	1	14	1	13	0
6	September	14	14	0	14	1	13	0

Interpretasi Pemeriksaan PCR Portable Kit

Data hasil interpretasi pemeriksaan PCR Portable Kit disajikan dalam bentuk tabel yang berisi data rekapitulasi pengamatan harian dan grafik data rekapitulasi pengamatan harian. Pengamatan dilakukan pada variabel plasmid kontrol (+) IQ Plus (520nm dan 550nm), plasmid DNA sampel (550nm) dan plasmid DNA virus WSSV (520nm) dengan indikator hasil pemeriksaan positif, negatif, terdeteksi maupun tidak terdeteksi.

Pengujian menggunakan Pockit Nucleic Acid Analyzer pada mobile-PCR ini berdasarkan pada prinsip multiplex iiPCR untuk mendeteksi virus pada udang. Penambahan primer spesifik dan probe hidrolisis berfluorescent digunakan untuk menghasilkan sinyal yang akan berpadar pada saat berikatan dengan DNA virus yang terdapat pada sampel. Primer dan probe tersebut akan berikatan dengan virus target (pada urutan asam nukleat tertentu), namun tidak akan bereaksi dengan DNA genom udang dan asam nukleat dari patogen lain. Primer dan probe untuk internal kontrol akan berikatan dengan gen “house keeping” dari udang (IQ+ user manual, 2012).

Analisis dengan PCR Pockit tidak memerlukan tahapan sebelum amplifikasi untuk pengecekan DNA/RNA hasil ekstraksi. Selain itu, kondisi sampel dan kualitas DNA/RNA hasil ekstraksi yang telah dilakukan dapat sekaligus langsung terlihat secara kualitatif pada display mesin PCR Pockit. Indikator tersebut menjadi sangat penting untuk mengurangi kemungkinan kesalahan analisis akibat “false negatif” yang disebabkan kualitas DNA/RNA yang kurang baik.

Tabel 5. Data Pengamatan Hasil Interpretasi PCR Portable Kit

no	Bulan	Plasmid (+)	Plasmid DNA Sampel		Plasmid DNA WSSV		
			Terdeteksi i	Tidak terdeteksi i	Terdeteksi i(+)	Terdeteksi i(-)	Tidak terdeteksi i
1	April	14	13	2	2	10	0
2	Mei	14	14	0	0	14	0
3	Juni	14	12	2	0	12	2
4	Juli	14	13	1	1	12	1
5	Agustus	14	13	1	1	12	1
6	September	14	13	1	0	13	1

Hasil Pembobotan PCR Konvensional dan PCR Portable Kit

Data hasil interpretasi pemeriksaan PCR Konvensional dan PCR Portable Kit dirangkum dalam bentuk tabel yang berisi data rekapitulasi pengamatan setiap bulan dan grafik (prosentase) data rekapitulasi pengamatan setiap bulan. Pembobotan dilakukan dengan memberikan nilai tertentu pada setiap deteksi variabel DNA yang diamati yaitu plasmid DNA sampel, plasmid DNA kontrol positif dan plasmid DNA virus WSSV, dengan nilai bobot sebagai berikut:

- Nilai 1, artinya 1 plasmid DNA terdeteksi dan 2 plasmid DNA tidak terdeteksi.
- Nilai 2, artinya 2 plasmid DNA terdeteksi dan 1 plasmid DNA tidak terdeteksi
- Nilai 3, artinya 3 plasmid DNA terdeteksi dan 0 plasmid DNA tidak terdeteksi.

Nilai yang didapatkan kemudian dijumlahkan tiap bulannya untuk mengetahui jumlah total Plasmid kontrol positif, DNA sampel dan DNA virus WSSV, yang mampu terdeteksi oleh metode pemeriksaan PCR Konvensional maupun PCR Portable Kit. Selama penelitian data harian yang diamati berjumlah 14 sampel uji setiap bulannya, jumlah tersebut merujuk pada data selama masa observasi yang dilakukan tiga bulan sebelum penelitian. Berdasarkan laporan rekapitulasi IKM/5.4.5/SKI-SPO(IQ 2000TM-WSSV) bulan April, Mei dan Juni tahun 2018, rata-rata setiap bulan di Laboratorium SKIPM Pontianak menerima sampel uji WSSV berkisar antara 14 sampel hingga 16 sampel uji setiap bulannya.

Data bulanan tersebut kemudian dikompilasi untuk mengetahui lebih lanjut tentang presisi dan akurasi sensitivitas dari kedua metode PCR dalam mendeteksi infeksi virus WSSV pada udang vannamei. Berikut data tabel rekapitulasi pembobotan selama enam bulan penelitian:

Tabel 6. Rekapitulasi Data Pengamatan Pemeriksaan PCR Konvensional dan PCR Portable Kit.

Bulan	Pembobotan	
	Konvensional	Pocket
April	40	42
Mei	42	42
Juni	38	40
Juli	40	42
Agustus	40	42
September	40	42
Total	240	250

Selama 6 bulan penelitian, total jumlah sampel yang diamati adalah sebanyak 84 sampel uji udang vannamei. Jika nilai total pembobotan dari masing-masing metode menunjukkan nilai 252, maka dapat dinyatakan bahwa kedua metode pemeriksaan identifikasi virus WSSV tersebut memiliki tingkat akurasi dan presisi yang baik karena semua variabel pengamatan plasmid DNA dapat terdeteksi.

PCR Konvensional menunjukkan nilai total pembobotan 240, artinya terdapat variabel pengamatan yang tidak dapat terdeteksi. Nilai total tersebut didapat dari lembar pengamatan harian yang diisi berdasarkan variabel pengamatan, seperti pada salah satu contoh lembar pengamatan di gambar berikut :

No.	Tanggal	kode sampel	organ target	Plasmid (+)*	Plasmid DNA sampel**	Plasmid DNA wssv***	Hasil (+/-) WSSV
1	02.04.18	dk.009/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	-	-
2	03.04.18	dk.019/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	-	-
3	05.04.18	dk.020/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	-	-
4	06.04.18	dk.024/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	-	-
5	10.04.18	dk.028/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	-	-
6	11.04.18	dk.034/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	v	-
7	12.04.18	dk.035/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	-	-
8	16.04.18	dk.036/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	-	-
9	17.04.18	dk.039/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	-	-
10	20.04.18	dk.041/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	?	v	-	-
11	23.04.18	dk.043/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	-	-
12	24.04.18	dk.050/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	-	-
13	24.04.18	dk.051/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	v	-
14	27.04.18	dk.053/V/IV	penopoda, plinopoda, otot daging	v	v	-	-

Gambar 1. Lembar Pengamatan Harian PCR Konvensional Bulan April

Pada gambar (1) terlihat ada tanda ‘?’ pada kolom nomor sampel dk.041/V/IV, hal tersebut menandakan adanya DNA sampel yang tidak terdeteksi oleh metode PCR Konvensional. Jika DNA sampel uji tidak dapat dideteksi, secara otomatis DNA plasmid dari virus WSSV juga tidak dapat dideteksi oleh metode PCR Konvensional, karena pada dasarnya DNA virus WSSV menginfeksi didalam DNA inang sampel uji.

Banyak sedikitnya DNA yang dihasilkan atau baik buruknya kualitas DNA hasil ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor pada saat ekstraksi dan kondisi sampel. Menurut Pranawaty (2012), menyatakan bahwa konsentrasi hasil ekstraksi DNA dipengaruhi

oleh dua faktor yaitu kecepatan ekstraksi pada waktu ekstraksi dan komposisi penambahan reagen CTAB-DTAB Solution.

Anomali data (‘?’) yang terjadi karena kerusakan DNA sampel uji akan berpengaruh terhadap nilai pembobotan, seperti pada salah satu contoh lembar pengamatan di gambar berikut :

No.	kode sampel	Plasmid (+)		Plasmid wssv		Pembobotan	
		Konven	Pocket	Konven	Pocket	Konven	Pocket
1	dk.009/V/IV	v	v	v	v	-	-
2	dk.019/V/IV	v	v	v	v	-	-
3	dk.020/V/IV	v	v	v	v	-	-
4	dk.024/V/IV	v	v	v	v	-	-
5	dk.028/V/IV	v	v	v	v	-	-
6	dk.034/V/IV	v	v	v	v	v	v
7	dk.035/V/IV	v	v	v	v	-	-
8	dk.036/V/IV	v	v	v	v	-	-
9	dk.039/V/IV	v	v	v	v	-	-
10	dk.041/V/IV	v	v	?	v	-	-
11	dk.043/V/IV	v	v	v	v	-	-
12	dk.050/V/IV	v	v	v	v	-	-
13	dk.051/V/IV	v	v	v	v	v	v
14	dk.053/V/IV	v	v	v	v	-	-
TOTAL						40	42

Gambar 2. Lembar Pengamatan Pembobotan Bulan April

DNA sampel yang tidak terdeteksi sehingga menyebabkan DNA virus WSSV juga ikut tidak dapat terdeteksi oleh metode PCR Konvensional menyebabkan pembobotan sampel uji nomor sampel dk.041/V/IV mendapatkan nilai (1). Nilai 1 (C) pada tabel pembobotan artinya, 1 plasmid DNA terdeteksi dan 2 plasmid DNA tidak terdeteksi. Dua Plasmid DNA yang tidak terdeteksi tersebut adalah plasmid DNA sampel (A) dan plasmid DNA virus WSSV (B) pada sampel uji, sedangkan yang terdeteksi oleh metode PCR Konvensional adalah plasmid kontrol positif dari primer IQ-2000TM – WSSV PCR Konvensional.

Sedangkan pada contoh lembar pembobotan bulan April 2018 (gambar 17), untuk PCR Pocket dengan nomor sampel dk.041/V/IV mendapatkan nilai (3). Nilai 3 (D), artinya 3 plasmid DNA terdeteksi dan 0 plasmid DNA tidak terdeteksi. Metode PCR Portable Kit mampu mendeteksi keberadaan DNA sampel nomor dk.041/V/IV, yang mana DNA sampel uji tersebut tidak dapat terdeteksi oleh metode PCR konvensional.

Berdasarkan laporan rekapitulasi IKM/5.4.5/SKI-SPO (IQ 2000TM-WSSV) bulan April, Mei dan Juni tahun 2018, rata-rata setiap bulan di Laboratorium SKIPM Pontianak menerima sampel uji WSSV berkisar antara 14 sampel uji setiap bulannya. Sedangkan nilai pembobotan tertinggi adalah 3, yang berdasarkan kepada variabel pengamatan berupa plasmid DNA sampel, plasmid DNA kontrol positif dan plasmid DNA virus wssv. Nilai score lengkap merupakan akumulasi nilai sampel uji dikalikan banyaknya sampel setiap bulan, hasilnya akan dijadikan indikator untuk mendapatkan hasil

persentase terhadap kedua metode PCR yang dibandingkan.

Tabel 7. Prosentase Pembobotan Metode PCR Konvensional dan PCR Portable Kit.

Bulan	Pembobotan		Skor	Prosentase %	
	Konvensional	Pocket	Lengkap	Konvensional	Pocket
April	40	42	42	95,24	100
Mei	42	42	42	100	100
Juni	38	40	42	90,48	95,24
Juli	40	42	42	95,24	100
Agustus	40	42	42	95,24	100
September	40	42	42	95,24	100
	Rata-rata			95,24	99,21

Dari prosentase diatas, metode PCR Konvensional mampu mengidentifikasi virus WSSV pada udang vannamei sebanyak 95,24 % pada bulan April, sedangkan metode PCR Portable Kit mengidentifikasi virus WSSV pada udang vannamei sebanyak 100 % pada bulan April. Hal ini menunjukkan bahwa nilai akurasi metode PCR Portable Kit lebih baik dari PCR Konvensional dalam kemampuan deteksi keberadaan plasmid DNA sampel, plasmid DNA kontrol positif dan plasmid DNA virus wssv. Selain itu, angka prosentase untuk PCR Portable Kit berada pada angka 99,21% sedangkan PCR Konvensional berada pada angka 95,24%. PCR Portable Kit menunjukkan nilai yang sangat baik dari prosentase pembobotannya, karena ketepatan pengujiannya lebih akurat. Koesharyani (2015) menyatakan, metode Extraction Kit (IQ Plus™ Portable Kit) dengan teknik spin column menghasilkan asam nukleat DNA dan RNA yang lebih bersih dan berkualitas tinggi. Dengan demikian kemungkinan terjadinya “false negatif” akibat kualitas DNA/RNA yang buruk dapat dihindari. Teknik ekstraksi pada kit ini dapat mengekstraksi DNA dan RNA secara bersamaan sehingga menghemat waktu dan hasil analisis dapat lebih cepat diperoleh.

Sedangkan deteksi secara PCR Konvensional merupakan metode deteksi yang sangat sensitif dan spesifik, dimana prosedur analisisnya mulai dari ekstraksi DNA/RNA, amplifikasi dan elektroforesis harus dikerjakan secara aseptis di dalam laboratorium yang terkontrol dan memerlukan alat laboratorium yang khusus dan rumit. (Koesharyani, 2015).

Dari data dan ulasan tersebut dapat disimpulkan bahwa metode identifikasi virus WSSV dengan PCR Portable Kit (IQ Plus™WSSV) lebih tinggi tingkat keberhasilannya dalam mengidentifikasi keberadaan plasmid DNA sampel, plasmid DNA virus WSSV dan plasmid kontrol positif WSSV dibandingkan dengan metode PCR konvensional (IQ-2000™ – WSSV), yang selama ini telah diterapkan di SKIPM Pontianak.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian terhadap perbandingan metode PCR Konvensional dengan Metode PCR Portable Kit untuk deteksi White spot syndrome virus (WSSV) pada udang Vannamei, yang dilaksanakan di Laboratorium SKIPM Pontianak selama enam bulan, dapat disimpulkan bahwa Metode identifikasi virus WSSV dengan PCR Portable Kit (IQ Plus™WSSV) lebih tinggi tingkat keberhasilannya dalam mengidentifikasi keberadaan plasmid DNA sampel, plasmid DNA virus WSSV dan plasmid kontrol positif WSSV dibandingkan dengan metode PCR konvensional (IQ-2000™ – WSSV), yang selama ini telah diterapkan di SKIPM Pontianak.

DAFTAR PUSTAKA

- Amrillah. 2015. Dampak Stres Salinitas Terhadap Prevalensi White Spot Syndrome Virus (WSSV) dan Survival Rate Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) pada Kondisi Terkontrol. *Research journal of life science e-issn: 2355-9926 april-2015 volume 02 no. 01*. Universitas Brawijaya.
- BUSKIPM. 2013. Instruksi Manual Pemeriksaan Virus Dengan Metode PCR. *Juknis PHPI. Latihan Dasar Penjenjangan PHPI*. Jakarta.
- Edison, D.P. 2009. Pengaruh Suhu, pH, dan Salinitas yang Berbeda terhadap Aktifitas Biologis Immunoglobulin Y Anti WSSV (IgY Anti-WSSV) [Skripsi]. *Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor*. 23 hlm
- Genereach Biotechnology Corp. 2013. IQ 2000™ WSSV Intruccion Manual. *Central Taiwan Science*. Taiwan.
- Genereach Biotechnology Corp. 2014. IQ Plus™ WSSV Kit with PCKIT(Portable) System Intruccion Manual. *Central Taiwan Science*. Taiwan.
- Koesharyani Isti dan Lila Gardenia. 2015. Metode deteksi cepat white spot syndrome virus (wssv) dan infectiuos myonecrosis virus (imnv) menggunakan portabel/mobile Polymerase chain reaction. *Media Akuakultur Vol. 10 No. 1 Tahun 2015: 43-49*. Pusat Penelitian Pengembangan Perikanan Budidaya.
- Mahardika, K.,Zafran, I. Koesharyani. 2004. Deteksi white spot syndrome virus (WSSV) pada udang windu (*Penaeus monodon*) di Bali dan Jawa Timur menggunakan polymerase chain reaction

- (PCR). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*.
- Mulyani Y, Purwanto A, Nurruhwati I, 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*, 8(11): 1-16
- Pranawaty., 2012. Aplikasi Polymerase Chain Reaction (PCR) Konvensional Dan Real Time PCR Untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus Pada Kepiting. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. Vol.3, No.4, Desember 2012. ISSN : 2088-3137.
- Rohman K., 1995. Mengamati White Spot Secara Seluler. *Techner*, Edisi 18, Jakarta, Hal.7-9.
- Subyakto Slamet., 2009. Budidaya Udang *Vannamei* (*Litopenaeus Vannamei*) Semiintensif Dengan Metode Sirkulasi Tertutup Untuk Menghindari Serangan Virus. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* Vol. 1, No. 2, November 2009. Balai Budidaya Air Payau (BBAP)