
OPTIMASI EKSTRAKSI DNA KOI HERPESVIRUS DARI AIR BUDIDAYA (*Optimum Koi Herpesvirus DNA Extraction from the Aquaculture Water*)

Ishaaq Saputra^{1*} dan Khumaira Puspasari¹

¹Balai Besar KIPM Jakarta I
Gd. Karantina Hewan, Ikan dan Tumbuhan Bandara Int'l Soekarno Hatta, 19210
Tangerang – Banten
Corresponding author: isaputra.6m2@gmail.com

Diterima : 25 September 2021 / Disetujui : 25 Maret 2022

ABSTRAK

Koi Herpesvirus (KHV) merupakan salah satu jenis penyakit yang menjadi kendala dalam kegiatan budidaya ikan mas. Pengujian KHV dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) namun ekstraksi DNA virus dari sampel lingkungan menghadapi dua masalah yaitu: inhibitasi pada proses ekstraksi dan amplifikasi serta jumlah virus yang sangat kecil. Kandungan virus yang sangat kecil dalam air memerlukan proses konsentrasi sebelum dilakukan analisis molekuler. Penelitian ini membandingkan sensitifitas tiga metode ekstraksi dan permurnian materi genetik virus dari air yaitu presipitasi dengan PEG, filtrasi-elusi, dan flokulasi dengan antibodi untuk deteksi KHV dari air dengan metode PCR. Flokulasi organik tidak dapat dilakukan karena antibodi anti KHV tidak dapat diproduksi yang disebabkan oleh rendahnya jumlah virus dalam sampel yang dijadikan vaksin. Metode presipitasi dengan PEG tidak dapat menghasilkan DNA hasil ekstraksi yang jumlah dan kemurniannya cukup baik untuk diamplifikasi. Metode filtrasi-elusi-dengan atau tanpa proses rekonsentrasi, menghasilkan pita DNA yang jelas setelah amplifikasi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari beberapa metode yang dilakukan, metode filtrasi-elusi merupakan metode yang lebih baik dalam memperoleh DNA KHV yang diambil dari sampel air.

Kata kunci : ekstraksi, filtrasi-elusi, KHV

ABSTRACT

Koi Herpesvirus (KHV) is one of the viral fish disease in the common carp aquaculture. At present, KHV diagnoses is performed using Polymerase Chain Reaction (PCR) method. However, the effort to extract DNA viruses from environmental samples depend on two fundamental problems: inhibition of the extraction and amplification processes and a very small number of viruses. The small amount of virus load in the water requires a concentration process before further molecular analysis. In this study, the sensitivity of three methods of extraction and purification of viral genetic material from the water, namely deposition with PEG, filtration-elution, and flocculation with antibodies for the detection of KHV from the water with the PCR method was performed. Water samples were collected from Cirata reservoir, West Java which is a site location for carp aquaculture. The organic flocculation cannot be carried out in the present study because anti-KHV antibodies cannot be produced. This is because the amount of virus in the sampel used by the vaccine is low. Meanwhile, the precipitation method with PEG cannot produce DNAextract's although quantity and purity are good enough to be amplified. For the filtration-elution method, both with and without the reconcentration process, a clear band of DNA can be produced after amplification. In conclusion, the filtration-elution

method is considered as the most suitable method in obtaining KHV DNA's taken from the water samples.

Keywords : *extraction, methods, KHV*

PENDAHULUAN

Koi Virus Herpes (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) merupakan salah satu penyebab penyakit ikan yang sulit ditanggulangi, cepat menyebar di lingkungan, serta menyebabkan kerugian ekonomi dan sosial yang sangat besar (Sunarto *et al.*, 2005). Penyakit KHV tidak hanya mengancam budidaya perikanan tetapi juga kelestarian sumberdaya alam (Aoki *et al.*, 2007). Sampai saat ini, *Polymerase Chain Reaction (PCR)* merupakan teknik yang diakui cepat, akurat, dan sensitif dalam mendeteksi keberadaan KHV dalam suatu sampel (Matsui *et al.*, 2008).

Deteksi KHV dengan PCR sering kali mengalami dua kendala yang berhubungan dengan sampel uji. Kendala pertama adalah sulitnya memperoleh sampel uji pada ikan yang nilai estetika tinggi seperti koi. Hal tersebut terutama terjadi di pintu-pintu keluar masuk karantina ikan Indonesia misalnya bandara atau pelabuhan. Kendala kedua adalah sulitnya memperoleh sampel jika populasi ikan yang diperiksa sangat besar, misalnya saat pemantauan. Hal ini dikarekankan dalam kegiatan pemantauan sampel diambil dari beberapa lokasi budidaya dengan jumlah titik lokasi yang banyak. Berdasarkan hal tersebut, perlu dicari sumber sampel uji alternatif tanpa menyentuh ikan serta mampu mewakili jumlah sampel dalam jumlah besar. Pada skala laboratorium, diketahui KHV dapat bertahan hidup di air hingga empat jam setelah keluar dari tubuh inang (Perelberg *et al.*, 2003). Selain itu telah diketahui pula bahwa KHV dapat menular melalui air (Sunarto *et.al* 2005). Kedua penelitian tersebut menjadi dasar bahwa air pemeliharaan atau media transportasi berpotensi menjadi sampel dalam deteksi KHV dengan metode PCR.

Air pemeliharaan atau media transportasi yang dijadikan sampel uji memiliki kendala antara lain mengandung inhibitor berupa senyawa-senyawa fenolik (phenolic compound), asam humus (humic acid), logam berat, protein atau karbohidrat. Bahan-bahan tersebut berikatan dengan nukleotida atau ion magnesium sehingga menghalangi ikatan nukleotida dan ion magnesium dengan enzim polimerase DNA seperti Taq atau *reverse transcriptase*, urea, dan haemoglobin yang memiliki kelarutan sama dengan DNA. Inhibitor tersebut juga tidak dapat dihilangkan dengan metode-metode ekstraksi biasa, seperti dengan detergen, protease maupun fenol-kloroform, dan tetap ada bersama DNA setelah ekstraksi selesai (Moreira, 1998; Queiroz *et al.*, 2001; Schwab *et al.*, 1996). Selain masalah inhibitor, kandungan virus dalam air juga sangat kecil (Gilad *et al.*, 2004).

Virus dalam sampel lingkungan dapat dikonsentrasikan dengan metode Presipitasi Polyethylene Glycol (PEG). Metode PEG merupakan teknik yang efektif dan dapat meningkatkan kesempatan mendeteksi virus dari berbagai sampel lingkungan (Lewis & Metcalf, 1988; Schwab *et.al* 1996). Proses konsentrasi virus dapat juga dilakukan dengan metode flokulasi dengan antibodi poliklonal anti KHV. Pada proses flokulasi, virus KHV dalam air akan dikenali dan diikat oleh antibodi anti KHV sehingga membentuk padatan. Padatan tersebut dapat dipisahkan dengan sentrifugasi. Metode-metode presipitasi, konsentrasi, dan flokulasi terhadap sampel lingkungan awalnya dibuat untuk mendeteksi virus-virus enterik atau dalam aktifitas mikrobiologi kelautan (Matsui *et.al* 2008). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efektifitas 3 metode ekstraksi dan permurnian materi genetik virus dari air yaitu presipitasi dengan PEG, adsorpsi-elusi,

dan flokulasi dengan antibodi untuk deteksi KHV dari air dengan metoda PCR. Keberhasilan aplikasi salah satu metode untuk mendeteksi KHV dari air pemeliharaan atau media transportasi akan dapat digunakan sebagai dasar pengembangan metode deteksi virus KHV dalam jumlah kecil dari media air. Sehingga dapat diperoleh DNA sebagai bahan uji PCR untuk digunakan sebagai alat untuk mendeteksi dan mengendalikan KHV secara tepat dan akurat.

METODE PENELITIAN

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni-September tahun 2017. Air sampel berasal dari Waduk Cirata, Jawa Barat. Pengujian sampel dilakukan di Balai Uji Standar Karantina Ikan, Cilangkap – Jakarta Timur.

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam uji coba adalah: akuarium dan aerator, mortar dan pestle, pasir steril, syringe ukuran 1; 5; 10; dan 20 cc, mikropipet ukuran 10; 20; 100; dan 1000 μ L; alat bedah, *hot plate with stirrer*, timbangan digital, erlenmeyer 1000 mL, tabung bijou, refrigerator (suhu 4°C), peralatan untuk peralatan ekstraksi dan PCR DNA KHV, GeneQuantTM.

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah: organ sampel berupa ginjal ikan mas positif KHV, ikan mas sampel sebanyak 24 ekor, akuades bebas pyrogen, syringe 1 cc, akuades, ethanol PA, Agarosa, TE buffer 50 \times , SYBR Safe, PEG, *Phospat-Buffered Saline* (PBS), NaCl, NaOH, HCl, KCl, *Beef Extract* (BE), Glycine (G), mikrotube 0,2; 0,5 dan 1,5 mL mikrotips 10; 200; 1000 μ L tabung sentrifugasi 150 mL, object glass, alkohol teknis, formaldehyde, *Freund's Adjuvant Complete*, *Freund's Adjuvant Incomplete*, DNazol, glycogen, bahan-bahan ekstraksi dan PCR DNA KHV IQ2000, glucose powder, HEPES buffer solution, Penicillin-streptomycin, gentamicin reagen solution, MEM with Earle's salt, distilled dan deionized water, fetal bovine serum, L-glutamin, DMSO, filter membran 0,45 μ m, pakan ikan dan pakan kelinci, sarung tangan, masker, primasept, label dan alat tulis.

Prosedur penelitian

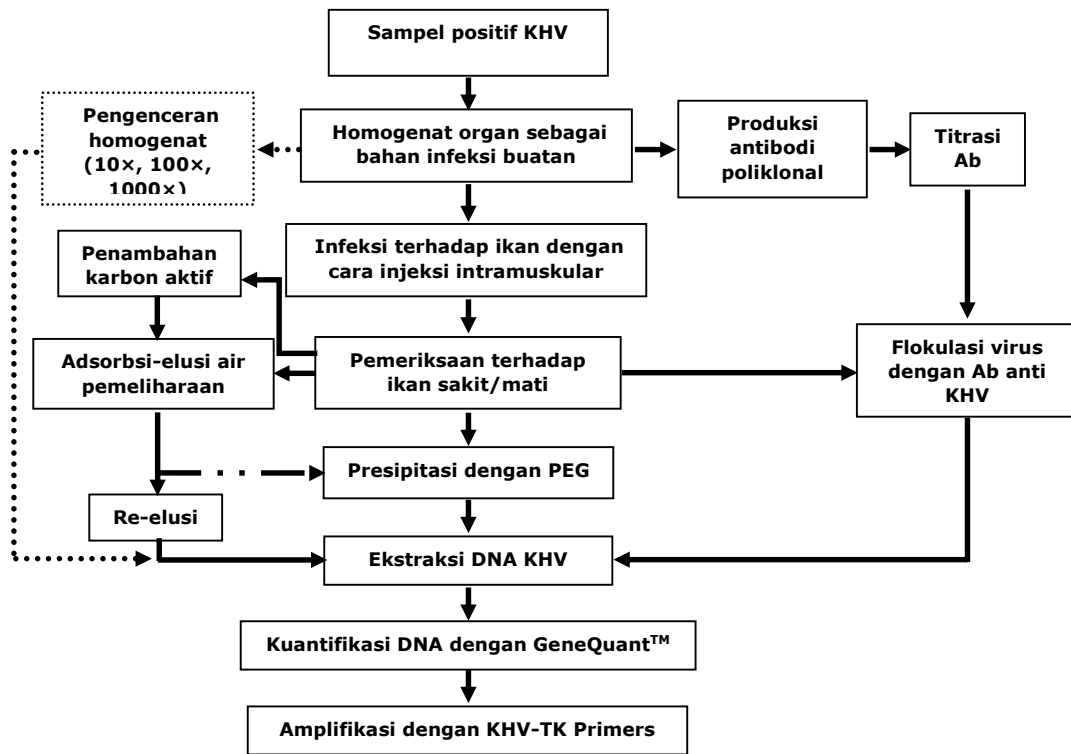
Penelitian dilakukan dengan menggunakan ikan mas yang positif KHV yang diperoleh dari Waduk Cirata. Homogenat organ dari ikan tersebut diinjeksikan pada ikan-ikan sehat yang dipelihara di laboratorium. Air pemeliharaan ikan di laboratorium tersebut menjadi subjek penelitian dengan metode presipitasi, adsorpsi-elusi, dan flokulasi organik (

Gambar 1).

Infeksi Buatan Terhadap Sampel Ikan

Sumber virus yang digunakan dalam infeksi buatan KHV berasal dari Waduk Cirata. Ikan mas yang tidak menunjukkan gejala dikumpulkan lalu dinekropsi, selanjutnya diambil jaringan insang, limpa, dan ginjal. Sampel jaringan selanjutnya dibawa ke laboratorium dalam kondisi beku. Saat nekropsi, sebagian jaringan insang difiksasi di dalam alkohol 95 p.a. % untuk pemeriksaan apakah terinfeksi KHV dengan PCR menggunakan primer KHV Thymidine Kinase (KHV-TK) (Bercovier *et al.*, 2005). Pembuatan homogenat organ yang akan diinjeksikan ke ikan mas dilakukan berdasarkan percobaan yang dilakukan (Sunarto *et.al* 2005). Organ dari ikan yang positif KHV digerus menggunakan mortar steril dingin, diencerkan 10× menggunakan PBS, lalu disentrifugasi pada 3.000 rpm selama 10 menit. Supernatan difilter menggunakan membran filter 0,45 µm, lalu digunakan untuk infeksi ikan sampel. Setiap satu ekor ikan berukuran 200 g diinjeksi pada bagian intramuskular dengan dosis 0,1 cc.

Ikan dipelihara dalam akuarium yang diisi air sebanyak 10 L dan diberi aerasi. Kepadatan ikan dalam satu akuarium adalah 20 ekor. Pemeliharaan dilakukan sampai ikan menunjukkan gejala khas KHV yaitu (nekrosis di jaringan insang) atau sampai mati. Insang ikan selanjutnya diperiksa dengan PCR menggunakan primer KHV-TK untuk determinasi serangan serangan KHV.



Gambar 1 Proses kegiatan penelitian pengujian KHV dengan berbagai metode

Presipitasi Virus dari Air Pemeliharaan Menggunakan PEG

Air pemeliharaan dicampurkan dengan 64,6 gr PEG/L hasil elusi, dan 17,53 g NaCl/L hasil elusi lalu pH segera disesuaikan menjadi 7,2. Campuran kemudian diaduk menggunakan stirer sampai homogen lalu diinkubasi pada 4°C selama 12 jam. Campuran kemudian disentrifugasi 13.500 rpm selama 20 menit. Pelet diekstraksi DNANYa, diperiksa jumlah dan kemurniannya menggunakan GeneQuant™ dan diamplifikasi dengan Primer KHV-TK.

Adsorpsi-Elusi Virus dari Air

Sebanyak 1 L air pemeliharaan (dari akuarium yang sama) ditambahkan AlCl_3 sampai konsentrasi AlCl_3 menjadi 0,0015N, lalu disesuaikan pH-nya sampai 3,5. Larutan tersebut kemudian difilter dengan kertas filter no 40 (Whatman) untuk menjernihkan. Filtrat kemudian difilter menggunakan membrane filter 0,45 μm . Setelah selesai, filter dicuci dengan NaCl 0,14N lalu dielusi dengan cara direndam dalam 28 ml 0,05M Glycine-NaOH (pH 11,5) sambil di aduk menggunakan stirer perlahan pada suhu 4°C selama 15 menit dalam buffer tersebut. Membran filter kemudian dikeluarkan dari Glycine buffer. Sebagian buffer hasil elusi tersebut direkonsentrasi dengan cara dielusi ulang dengan cara menambahkan 0,28 ml AlCl_3 0,15N lalu disesuaikan pH-nya menjadi 3,5 kemudian langsung disentrifugasi pada 13.500 rpm. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan peletnya diekstraksi.

Sebagian buffer hasil elusi kemudian direkonsentrasi kandungan virusnya dengan menambahkan 64,6 gr PEG/L hasil elusi, dan 17,53 g NaCl /L hasil elusi lalu pH segera disesuaikan menjadi 7,2. Campuran kemudian distirer sampai homogen lalu diinkubasi pada 4°C selama 12 jam. Setelah inkubasi akan terbentuk dua fasa, dan pada fasa bawah ditambahkan NaCl sampai 1 M sambil dihomogenkan, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.500 rpm selama 20 menit. Pelet kemudian diekstraksi DNANYa dan DNA hasil ekstraksi tersebut kemudian diperiksa jumlah dan kemurniannya menggunakan GeneQuantTM dan diamplifikasi dengan Primer KHV TK.

Flokulasi Virus dari Air Menggunakan Antibodi Poliklonal Anti KHV

Homogenat organ yang berasal dari infeksi buatan ditambahkan formaldehyde (0,4%) lalu di stirer pada 4°C selama 24 jam. Homogenat dicampur dengan *Freund's Adjuvant Complete* (1:1) kemudian disuntikkan subkutan pada kelinci. Setelah tiga minggu kelinci kembali disuntik dengan vaksin yang dicampur dengan *Freund's Adjuvant Incomplete* (1:1), dan injeksi diulang seminggu sekali selama 3 minggu. Seminggu setelah injeksi terakhir serum di panen dari kelinci. Titrasi antibodi dilakukan menggunakan *Agar Gel Precipitation Test* (AGPT), dengan homogenat organ berisi virus aktif sebagai antigen KHV. Jumlah antibodi yang optimal berikatan dengan antigen kemudian digunakan dalam proses flokulasi. Sebanyak 1.000 mL air pemeliharaan dijernihkan dengan sentrifugasi. Flokulasi dilakukan dengan mengaduk air pemeliharaan yang sudah dijernihkan tersebut pada 4°C dengan stirer. Pada air tersebut ditetaskan antibodi anti KHV perlahan-lahan sampai air menjadi keruh dan terbentuk butiran yang sangat kecil. Setelah flokulasi, padatan yang terbentuk dipisahkan dari air dengan disentrifugasi pada 7.000 rpm selama 30 menit pada 4°C. Pelet yang terbentuk diekstraksi DNA KHV. DNA hasil ekstraksi lalu diperiksa jumlah dan kemurniannya menggunakan GeneQuantTM dan diamplifikasi dengan Primer KHV-TK.

Kontrol Positif Pengujian

Kontrol positif pengujian menggunakan homogenate organ yang diencerkan bertingkat 10x, 100x , dan 1.000x menggunakan air kolam steril. Campuran tersebut kemudian ditambahkan 64,6 g PEG/L hasil elusi, dan 17,53 g NaCl /L hasil elusi lalu pH segera disesuaikan menjadi 7,2. Campuran kemudian diaduk menggunakan stirer sampai homogen lalu diinkubasi pada 4°C selama satu malam. Campuran kemudian disentrifugasi 13.500 rpm selama 20 menit. Pelet diekstraksi DNANYa, diperiksa jumlah dan kemurniannya menggunakan GeneQuantTM dan diamplifikasi dengan Primer KHV-TK.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa DNA KHV dapat diekstraksi langsung dari air pemeliharaan. Penelitian ini menggunakan tiga metode utama, yaitu presipitasi menggunakan PEG, flokulasi organik, dan adsorpsi-elusi. Metode adsorpsi-elusi dilakukan dengan tiga variasi perlakuan berbeda, yaitu *pre-treatment* dengan karbon aktif, rekonsentrasi dengan presipitasi PEG dan rekonsentrasi dengan re-elusi. Dari dua metode yang dapat dilaksanakan, presipitasi menggunakan PEG dan adsorpsi-elusi, metode yang berhasil memurnikan DNA KHV dari air adalah metode adsorpsi-elusi. Virus KHV hasil dari adsorpsi-elusi direkonsentrasi dengan dua cara, yang pertama dengan re-elusi dan yang kedua dengan menggunakan PEG (Bagan 1). Kedua langkah lanjutan tersebut memberikan hasil yang sama berupa pita DNA KHV sebesar 409 bp pada amplifikasi menggunakan primer KHV-TK. Perbedaan pita DNA dari kedua metode rekonsentrasi tersebut adalah hasil amplifikasi DNA virus yang direkonsentrasi dengan re-elusi tampak lebih tipis dibandingkan hasil rekonsentrasi dengan presipitasi menggunakan PEG (Gambar 4).

Mekanisme deteksi KHV dari sampel jaringan ikan sudah sangat berkembang; mulai dari PCR (Bercovier *et.al* 2005; Dishon *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 2002), ELISA (Adkison *et al.*, 2005), LAMP (Gunimaladevi *et al.*, 2004; Soliman & El-Matbouli, 2005) dan Real-time PCR (Gilad *et.al* 2004). Meskipun demikian, mekanisme deteksi keberadaan KHV dari sampel lingkungan belum berkembang dengan baik. Hal ini disebabkan kurang-berkembangnya metode yang stabil untuk deteksi KHV dari sampel lingkungan (Matsui *et.al* 2008). Metode isolasi dan deteksi virus dari air pada awalnya berkembang untuk deteksi virus-virus enterik yang patogen bagi kesehatan manusia (Hill *et al.*, 1976). Metode adsorpsi-elusi berhasil diaplikasikan untuk deteksi KHV dari air sungai di Jepang untuk deteksi dengan Real-time PCR (Haramoto *et al.*, 2007). Penelitian saat ini berhasil mendeteksi KHV dari air dengan teknik PCR yang lebih sederhana, dengan cara menambahkan metode rekonsentrasi untuk memperbesar kesempatan menangkap partikel virus. Selain itu, hasil penelitian saat ini menunjukkan bahwa teknik isolasi yang dikembangkan untuk jenis virus yang tidak memiliki selubung (*non-enveloped viruses*) termasuk KHV.

Tabel 1 Pengukuran DNA Hasil Ekstraksi dengan GeneQuant™

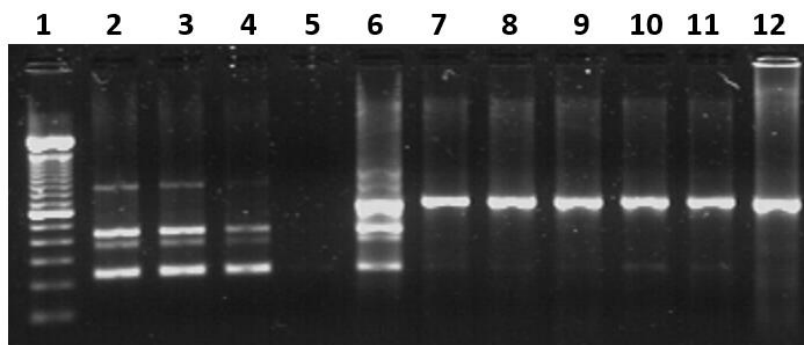
Sampel	Hasil Pengukuran		
	$\lambda_{260/280}$	$\lambda_{260/230}$	($\mu\text{g/mL}$)
Pemurnian air Waduk Cirata (rekonsentrasi PEG).	0,418	0 ^a	68,3
Pemurnian air Waduk Cirata (rekonsentrasi PEG).	1,077	0,621	18,2
Pemurnian air media transportasi (rekonsentrasi PEG).	1,714	0,673	4,2
Pemurnian air media transportasi (rekonsentrasi PEG).	0,936	5,193	5,66
Pemurnian air Waduk Cirata (<i>pre-treatment</i> karbon aktif/ rekonsentrasi PEG).	1,827	0,325	6,85
Pemurnian air media transportasi (rekonsentrasi re-elusi).	1.383	0,683	13,55
Pemurnian air pemeliharaan (rekonsentrasi re-elusi).	1,165	1,066	51,59
Pemurnian air Waduk Cirata (<i>pre-treatment</i> karbon aktif/ rekonsentrasi re-elusi).	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Pemurnian air Waduk Cirata (rekonsentrasi PEG).	1,714	0 ^a	88,1

Pemurnian air pemeliharaan dengan dengan PEG	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Kontrol positif (10 ⁻¹), pengenceran 2×.	1,163	1,09	35,1
Kontrol positif (10 ⁻¹), pengenceran 4×.	1,345	0,478	11,3
Kontrol positif (10 ⁻¹), pengenceran 6×.	1,194	1,00	3,7
Sampel positif KHV	1,321	0 ^a	105

Keterangan: ^a tidak terbaca oleh GeneQuant™

Berdasarkan pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dengan GeneQuant™, tebal atau tipisnya pita DNA hasil amplifikasi dapat berhubungan dengan kemurnian dan konsentrasi DNA hasil ekstraksi (Tabel 1). Kemurnian dan jumlah DNA KHV hasil rekonsentrasi dengan PEG lebih baik daripada yang direkonsentrasi dengan re-elusi. Hal tersebut disebabkan pada proses rekonsentrasi dengan re-elusi terlalu banyak partikel virus yang bebas dalam buffer, sehingga sentrifugasi yang hanya 13.500 rpm tidak mampu mengendapkan partikel virus tersebut. Sementara pada proses adsorpsi-elusi yang diikuti rekonsentrasi menggunakan PEG partikel-partikel virus yang bebas diikat oleh PEG dan menghasilkan partikel yang berukuran lebih besar dan sanggup diendapkan oleh kecepatan sentrifugasi 13.500 rpm. Metoda adsorpsi-elusi mampu mengurangi atau menghilangkan inhibitor proses amplifikasi sehingga DNA hasil ekstraksi dapat diamplifikasi dan menghasilkan pita yang jelas. Hal tersebut terjadi karena filter membran yang bermuatan negatif secara selektif berikatan dengan virus dalam kondisi reaksi kaya Al³⁺ dan lingkungan yang asam (Haramoto *et.al* 2007), sehingga saat filter dielusi tidak ada inhibitor yang terikat dalam proses tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebanyak 5 sampel dari 24 sampel yang dikumpulkan di Cirata menderita infeksi sangat ringan, 1 sampel menderita infeksi berat, dan sisanya negatif KHV. Satu minggu setelah infeksi, ikan mas percobaan disampling masing-masing dua ekor dari 1 akuarium percobaan dan diperiksa menggunakan PCR IQ2000 KHV dan KHV-TK (Bercovier *et.al* 2005). Semua ikan yang diperiksa positif KHV dengan tingkat infeksi sangat ringan menurut IQ2000 KHV dan negatif KHV menurut primer KHV-TK (Gambar 2).

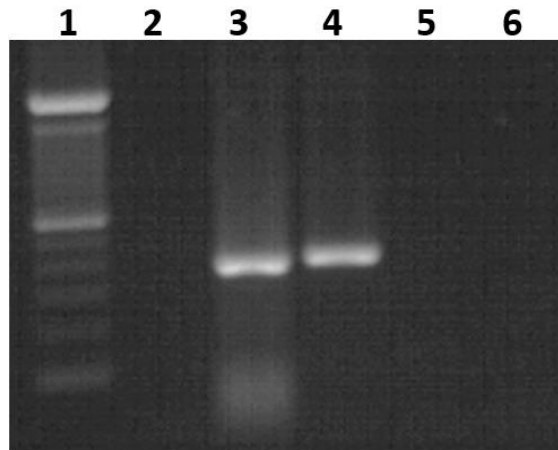


Gambar 2 KHV-infected DNA documentation. (Line 1 : Marka DNA 100 bp Ladder, 2 : Kontrol positif 10³, 3 : Kontrol positif 10², 4 : Kontrol positif 10¹, 5 : Kontrol negatif, 6 : Sampel positif, 7-12 : Ikan hasil infeksi)

Presipitasi Virus dari Air Pemeliharaan Menggunakan PEG

Hasil DNA yang dimurnikan dari air pemeliharaan menggunakan PEG tidak teramplifikasi. Konsentrasi DNA memang tinggi tetapi kandungan pengotor juga sangat tinggi sehingga nilai kemurnian DNA tidak dapat terbaca oleh GeneQuant™ (Tabel 1). Metode ekstraksi DNA dari air langsung menggunakan PEG tidak berhasil memberikan DNA yang kualitasnya baik untuk diamplifikasi. Meskipun pada pengukuran

menggunakan GeneQuant™ konsentrasi DNA hasil ekstraksinya sangat tinggi (123,5µg/mL), bahkan lebih tinggi dibandingkan konsentrasi DNA pada sampel yang positif KHV (105 µg/mL), tetapi kemurnian DNA hasil ekstraksi tersebut sangat buruk (dibawah kemampuan membaca GeneQuant™).

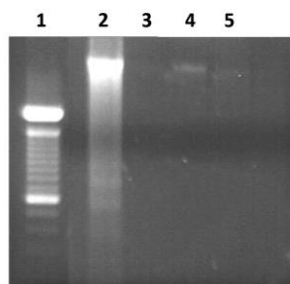


Gambar 3. DNA hasil Presipitasi air dengan PEG (Lane 1: Marka DNA 100 bp Ladder, 2: Kontrol negatif (ddH₂O), 3: Sampel positif KHV, 4: DNA dari metode adsorbsi-elusi, 5 & 6: DNA dari metode presipitasi dengan PEG).

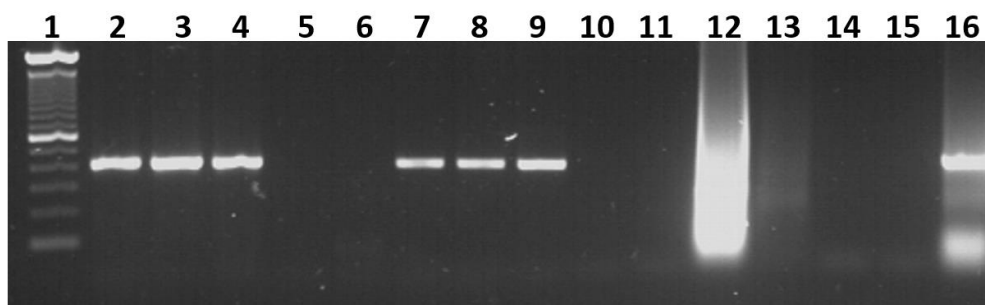
PEG merupakan polimer yang dapat berikatan dengan protein dan biasanya dapat mempresipitasi virus dalam medium kultur. Tetapi medium kultur jauh lebih bersih dibandingkan air pemeliharaan. Ketika presipitasi dengan PEG diaplikasikan terhadap air pemeliharaan yang memiliki pengotor sangat besar, terlalu banyak protein non-virus yang ikut terikat. Hal tersebut menyebabkan kuantitas dan kualitas DNA hasil ekstraksi sangat buruk dan pada akhirnya menyebabkan gagalnya proses amplifikasi. Gagalnya proses amplifikasi terhadap DNA hasil presipitasi langsung juga dapat disebabkan masih adanya inhibitor setelah proses ekstraksi.

Adsorbsi-Elusi

DNA hasil ekstraksi dari pemurnian air pemeliharaan menghasilkan pita DNA pada posisi yang sama dengan sampel positif KHV ketika dielektroforesis tanpa diamplifikasi sebelumnya (Gambar 3). Selain terhadap air pemeliharaan, adsorbsi-elusi juga dilakukan terhadap air yang diambil dari Waduk Cirata dan menghasilkan pita DNA berukuran 409 bp (Gambar 4). Pada sebagian air yang diambil dari Cirata dilakukan *pre-treatment* yaitu dengan penambahan karbon aktif untuk mengikat inhibitor yang biasa ditemukan dalam sampel-sampel lingkungan. Tidak ada pita DNA yang dihasilkan dari amplifikasi terhadap sampel yang di *pre-treatment* tersebut (Gambar 4). Sebagian air yang difiltrasi-elusi direkonsentrasi dengan re-elusi sementara sisanya menggunakan PEG. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pita DNA hasil rekonsentrasi dengan PEG lebih jelas dibandingkan yang direkonsentrasi dengan re-elusi (Gambar 4).



Gambar 3. Elektroforesis DNA hasil ekstraksi (tanpa amplifikasi) (1 : Marka DNA 100 bp Ladder, 2 : Sampel positif KHV, 3 : Hasil ekstraksi dari pemurnian air pemeliharaan, 4 & 5 : Hasil ekstraksi dari pemurnian air pemeliharaan)



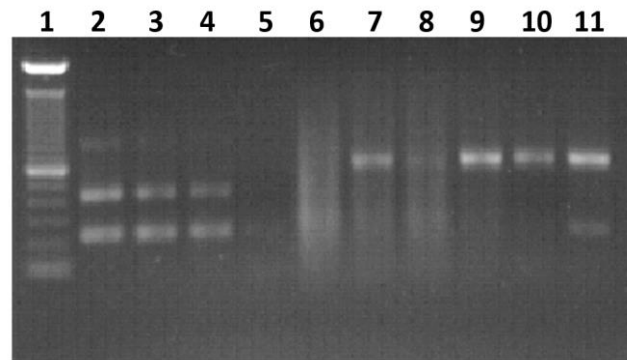
Gambar 4. DNA Hasil adsorbsi-elusi (Primer KHV-TK). Keterangan gambar : 1 : Marka DNA 100 bp Ladder, 2 & 3 : Pemurnian air Waduk Cirata (rekonsentrasi PEG), 4 & 5 : Pemurnian air media transportasi (rekonsentrasi PEG), 6 : Pemurnian air Waduk Cirata (pre-treatment karbon aktif/rekonsentrasi PEG), 7 & 8 : Pemurnian air media transportasi (rekonsentrasi re-elusi), 9 : Pemurnian air pemeliharaan (rekonsentrasi re-elusi), 10: Pemurnian air Waduk Cirata (pre-treatment karbon aktif/ rekonsentrasi re-elusi), 11: Pemurnian air Waduk Cirata (rekonsentrasi re-elusi), 12: Kontrol positif penelitian (10^{-1}), 13: Kontrol positif penelitian (10^{-2}), 14: Kontrol negatif PCR (reagen), 15: Kontrol negatif PCR (ddH₂O), 16: Sampel positif KHV.

Flokulasi Virus dari Air Menggunakan Antibodi Poliklonal Anti KHV

Pembuatan antibodi anti-KHV yang dilakukan dengan menyuntikkan vaksin KHV yang dibuat dari homogenat yang sama untuk infeksi buatan pada ikan tidak berhasil menghasilkan antibodi anti KHV. Setelah masa inkubasi dalam tubuh kelinci selama satu bulan, serum yang dihasilkan dari tubuh kelinci sama sekali tidak bereaksi terhadap antigen KHV yang digunakan dalam Agar-gel Precipitation Test (AGPT). Booster terhadap kelinci juga tidak dapat menghasilkan antibodi anti KHV. Oleh karena tidak ada ikatan antigen-antibodi dari serum kelinci, maka flokulasi organik menggunakan antibodi anti KHV tidak dapat dilakukan.

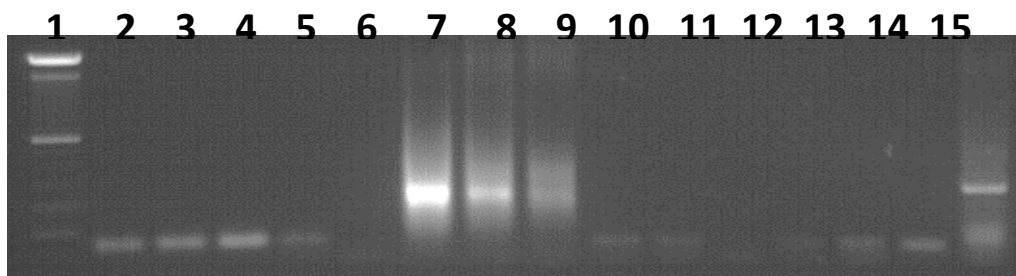
Kontrol Positif Penelitian

Pada amplifikasi menggunakan primer KHV-TK IQ2000 KHV, hanya pengenceran $10\times$ yang menghasilkan *smear* tebal (Gambar 4). Hasil amplifikasi menggunakan IQ2000 menghasilkan pita yang cukup jelas. Pada pengenceran yang lebih besar, DNA inang terlihat jelas, tetapi DNA virus hilang (Gambar 5).



Gambar 5. DNA Hasil amplifikasi kontrol positif (1 : Marka DNA 100 bp Ladder, 2 : Kontrol positif 10³, 3 : Kontrol positif 10², 4 : Kontrol positif 10¹, 5 : Kontrol negatif, 6 : Pengenceran 2x, 7 : Pengenceran 4x, 8 : Pengenceran 6x, 9 : Pengenceran 10x, 10 : Pengenceran 100x, 11 : Sampel positif)

Amplifikasi lalu diulang terhadap DNA hasil ekstraksi yang diencerkan 2X, 6X dan 10X menggunakan primer Gray untuk memastikan ada tidaknya DNA virus. Amplifikasi menggunakan primer Gray menghasilkan pita berukuran 290 bp (Gambar 6) dan sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya (Gray et al., 2002).



Gambar 6. DNA hasil amplifikasi kontrol positif penelitian menggunakan primer Gray (Gray *et al.*, 2002). Keterangan gambar 1 : Marka DNA 100 bp Ladder, 2 & 3 : Pemurnian air media transportasi, 4 : Pemurnian air pemeliharaan, 5 & 6 : Pemurnian air Waduk Cirata, 7 : Kontrol positif penelitian (10⁻¹, diencerkan 2x), 8 : Kontrol positif penelitian (10⁻¹, diencerkan 4x), 9 : Kontrol positif penelitian (10⁻¹, diencerkan 6x), 10: Pemurnian air pemeliharaan, 11: Pemurnian air pemeliharaan, 12 & 13 : Pemurnian air media transportasi, 14: Kontrol negatif PCR (reagen), 15: Kontrol negatif PCR (ddH₂O), 16: Sampel positif KHV.

KESIMPULAN

Koi Herpesvirus yang ada di air dapat diekstraksi untuk dideteksi dengan metode PCR. Metode adsorpsi-elusi adalah yang paling efektif dalam mengkonsentrasikan dan memurnikan DNA KHV sehingga dapat di amplifikasi. Penggunaan metode tersebut dapat menghilangkan inhibitor dalam sampel sehingga tidak menghambat proses ekstraksi dan amplifikasi. Metode presipitasi dengan PEG tidak dapat diaplikasikan langsung terhadap air karena tidak mampu menghilangkan inhibitor.

DAFTAR PUSTAKA

- Adkison, M., Gilad, O., & Hedrick, R. (2005). An Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of Antibodies to the Koi Herpesvirus (KHV) in the Serum of Koi *Cyprinus carpio*. *Fish Pathology*, *40*, 53-62. doi: 10.3147/jsfp.40.53
- Aoki, T., Hirono, I., Kurokawa, K., Fukuda, H., Nahary, R., Eldar, A., Davison, A., Waltzek, T., Bercovier, H., & Hedrick, R. (2007). Genome Sequences of Three Koi Herpesvirus Isolates Representing the Expanding Distribution of an Emerging Disease Threatening Koi and Common Carp Worldwide. *Journal of Virology*, *81*, 5058-5065. doi: 10.1128/JVI.00146-07
- Bercovier, H., Fishman, Y., Nahary, R., Sinai, S., Zlotkin, A., Eyngor, M., Gilad, O., Eldar, A., & Hedrick, R. (2005). Cloning of the Koi Herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiology*, *5*, 13. doi: 10.1186/1471-2180-5-13
- Dishon, A., Perelberg, A., Bishara-Shieban, J., Ilouze, M., Davidovich-Cohen, M., Werker, S., & Kotler, M. (2005). Detection of Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus in Fish Droppings. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 7285-7291. doi: 10.1128/AEM.71.11.7285-7291.2005
- Gilad, O., Yun, S., Zagmutt, F., Leutenegger, C., Bercovier, H., & Hedrick, R. (2004). Concentration of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, *60*, 179-187. doi: 10.3354/dao060179
- Gray, W., Mullis, L., LaPatra, S., Groff, J., & Goodwin, A. (2002). Detection of Koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *Journal of Fish Diseases*, *25*, 171-178. doi: 10.1046/j.1365-2761.2002.00355.x
- Gunimaladevi, I., Kono, T., Venugopal, M., & Sakai, M. (2004). Detection of koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio* L., by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Fish Diseases*, *27*, 583-589. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00578.x
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., & Ohgaki, S. (2007). Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *Journal of Fish Diseases*, *30*, 59-61. doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00778.x
- Hill, W., Jakubowski, W., Akin, E., & Clarke, N. (1976). Detection of virus in water: sensitivity of the tentative standard method for drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, *31*, 254-261. doi: 10.1128/AEM.31.2.254-261.1976
- Lewis, G., & Metcalf, T. (1988). Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*, 1983-1988. doi: 10.1128/AEM.54.8.1983-1988.1988
- Matsui, K., Honjo, M. I. E., Kohmatsu, Y., Uchii, K., Yonekura, R., & Kawabata, Z. I. (2008). Detection and significance of koi herpesvirus (KHV) in freshwater environments. *Freshwater Biology*, *53*(6), 1262-1272. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01874.x>
- Moreira, D. (1998). Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Research*, *26*(13), 3309-3310. doi: 10.1093/nar/26.13.3309
- Perelberg, A., Smirnov, R., Hutorian, M., Diamant, A., Bejerano, Y., & Kotler, M. (2003). Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus Carpio* in Israel. *The Israeli journal of aquaculture = Bamidgeh*, *55*, 5-12.

- Queiroz, A. P. S., Santos, F. M., Sassaroli, A., Hársi, C., Monezi, T., & Mehnert, D. (2001). Electropositive Filter Membrane as an Alternative for the Elimination of PCR Inhibitors from Sewage and Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4614-4618. doi: 10.1128/AEM.67.10.4614-4618.2001
- Schwab, K., Leon, R., & Sobsey, M. (1996). Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric virus for detection by reverse transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2086-2094. doi: 10.1128/AEM.62.6.2086-2094.1996
- Soliman, H., & El-Matbouli, M. (2005). An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal*, 2(1), 83. doi: 10.1186/1743-422X-2-83
- Sunarto, A., Rukyani, A., & Itami, T. (2005). Indonesian Experience on the Outbreak of Koi Herpesvirus in Koi and Carp (*Cyprinus carpio*). *Bull Fish Res Agency Suppl*, 2.