

**PERBANDINGAN BEBERAPA METODE ISOLASI DNA
UNTUK DETEKSI DINI *KOI HERPES VIRUS* (KHV)
PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L.)**

Oleh :

Yuniar Mulyani, Agus Purwanto, dan Isni Nurruhwati
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran
Jatinangor, UBR 40600

ABSTRACT

This study was conducted in laboratory of Fisheries Biotechnology, Faculty of Fisheries and Marine Science, Padjadjaran University. The aim of this study is to determine the concentration effectiveness, purity of DNA and time efficiency of DNA isolation methods by comparing four isolation methods (DNA extraction with Kit (Promega), CTAB with phenol, modification of CTAB, and extraction of DNA with thermal lysis). The parameters observed in this study are the value of DNA purity, concentration, and the of processing time. The samples which are processed were gill and fin tissues of common carp. DNA concentration and purity were measured by spectrophotometric method, while the visualization of the isolated DNA were used electrophoresis method and the presence of KHV was detected by PCR with spesific KHV detection primer. This study used the survey method and qualitative descriptive analysis in laboratory. The results of the study showed that CTAB modification method provides the isolated DNA with the highest concentration of 70.10 $\mu\text{g/ml}$ with purity values ranging from 1.9 to 2.0. However, the time required for the process is quite long. The DNA extraction method with thermal lysis is the shortest in process, but the concentration of DNA obtained was quite low at 9.25 $\mu\text{g/ml}$ with purity values ranging from 1.6 to 1.8.

Key Words : DNA Isolation, Early detection, KHV, Common carp

ABSTRAK

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas dalam memperoleh konsentrasi dan kemurnian DNA serta efisiensi waktu pengerjaan dari metode isolasi DNA dengan membandingkan beberapa metode isolasi DNA diantaranya ekstraksi DNA dengan Kit (Promega), CTAB dengan phenol, modifikasi CTAB, dan ekstraksi DNA dengan *thermal lysis*. Parameter yang digunakan adalah nilai kemurnian dan kualitas DNA hasil isolasi yang diperoleh dari analisis spektrofotometri dan

analisis elektroforesis serta efisiensi waktu pengerjaan. Sampel yang digunakan adalah jaringan insang dan sirip ikan mas. Konsentrasi DNA dan kemurniannya diukur dengan metode spektrofotometri, sedangkan untuk visualisasi DNA hasil isolasi menggunakan metode elektroforesis serta pengujian keberadaan KHV dideteksi dengan bantuan PCR dengan menggunakan Primer pendeteksi KHV. Penelitian ini menggunakan metode survei dengan analisis deskriptif kualitatif. Hasil penelitian secara umum menunjukkan bahwa metode modifikasi CTAB memberikan hasil isolasi DNA dengan konsentrasi yang tertinggi yaitu 70,10 µg/ml dengan nilai kemurnian berkisar antara 1,9-2,0. Namun waktu yang dibutuhkan untuk pengerjaannya cukup lama. Metode ekstraksi DNA dengan *thermal lysis* memiliki waktu pengerjaan yang singkat. Namun konsentrasi DNA yang diperoleh cukup rendah yaitu 9,25 µg/ml dengan nilai kemurnian berkisar antara 1,6-1,8.

Kata Kunci : Isolasi DNA, Deteksi Dini, KHV, Ikan Mas

I. PENDAHULUAN

Kematian masal yang terjadi pada ikan mas dan koi telah dikonfirmasi disebabkan oleh serangan virus. Upaya penanggulangan yang efektif terhadap *Koi Herpes Virus* (KHV) masih belum diketahui selain memusnahkan ikan yang mati. Maka dari itu, langkah-langkah yang perlu diambil lebih mengarah pada upaya pencegahan. Upaya pencegahan antara lain dengan mengurangi penyebab stres, meningkatkan daya tahan ikan terhadap serangan penyakit dan pengelolaan wadah budidaya (Direktorat Kesehatan Ikan dan Lingkungan 2003).

Menurut Tauhid dkk. (2004) upaya mendiagnosis keberadaan KHV dapat dilakukan secara langsung. Salah satunya dengan bantuan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk mendeteksi keberadaan DNA virus. Namun sebelum melakukan identifikasi dengan PCR, DNA genom harus diisolasi terlebih dahulu.

Isolasi DNA genom ikan mas yang terserang KHV merupakan tahap awal dalam pendeteksian KHV. Tingkat serangan KHV yang ringan memungkinkan hasil isolasi yang dihasilkan kurang optimal. Untuk dapat mendeteksi keberadaan KHV dengan tingkat serangan ringan maka dibutuhkan metode isolasi yang dapat mengisolasi DNA dengan konsentrasi yang tinggi. Hal ini dikarenakan jumlah

DNA KHV yang ikut terisolasi dengan berat sampel jaringan yang sama menjadi lebih besar.

Dalam penelitian ini ada beberapa metode yang digunakan untuk isolasi DNA ikan, yaitu Metode dengan menggunakan kit ekstraksi DNA (*Wizard Genomic DNA Purification*, Promega), Metode CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) dengan Phenol (Suharsono 2000 dalam Yustiati 2006), metode modifikasi CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) (Rogers dkk. 1997 dalam Mulyani 2003), dan metode ekstraksi DNA dengan *thermal lysis* (Buwono dan Rosidah 2010).

Beberapa metode ini merupakan metode umum yang digunakan untuk isolasi DNA yang mengalami modifikasi sehingga dapat digunakan untuk mengisolasi DNA ikan. Oleh karena itu, di dalam penelitian ini beberapa metode tersebut diuji tingkat efektifitasnya dalam mengisolasi DNA untuk mendapatkan hasil yang terbaik secara kuantitas dan kualitas DNA yang dihasilkan serta efisiensi waktu dalam pengerjaannya dalam mengisolasi DNA ikan mas untuk mendeteksi serangan dini dari *Koi Herpes Virus*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mencari metode isolasi DNA yang terbaik untuk deteksi dini penyakit *Koi Herpes Virus* (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi sebagai langkahantisipasi mengenai metode isolasi DNA yang terbaik untuk keperluan deteksi dini *Koi Herpes Virus* (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) sehingga upaya pencegahan terhadap penyebaran *Koi Herpes Virus* (KHV) dapat dilakukan.

II. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran, Jatinangor. Metode penelitian ini termasuk dalam metode survei dengan analisis data secara deskriptif kualitatif. Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap meliputi pengambilan

sampel, pengerjaan di laboratorium, dan analisis data. Tempat pengambilan sampel ikan yang terinfeksi KHV dilakukan di Waduk Cirata Kabupaten Cianjur.

Isolasi DNA Ikan Mas yang Terinfeksi KHV

Metode isolasi DNA yang digunakan diantaranya :

- Metode dengan menggunakan kit ekstraksi DNA (*Wizard Genomic DNA Purification*, Promega). Metode ini merupakan metode yang dikeluarkan oleh Promega Corporation dan telah teruji hasilnya, namun disisi lain biaya yang dibutuhkan cukup besar.
- Metode CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) dengan Phenol (Suharsono 2000 dalam Yustiati 2006). Metode ini memiliki waktu pengerjaan cukup singkat dimana pada proses presipitasinya digunakan penambahan P : C : I untuk memisahkan DNA dengan materi ikutan lainnya.
- Metode modifikasi CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) (Rogers dkk. 1997 dalam Mulyani 2003). Metode ini memaksimalkan presipitasi DNA dengan menggunakan C : IAA secara berulang yakni dua kali untuk mendapatkan DNA yang bebas dari pengotor. Nilai konsentrasi DNA yang didapat relatif tinggi namun di dalam pengerjaannya dibutuhkan waktu yang relatif lebih lama.
- Metode ekstraksi DNA dengan *thermal lysis* (Buwono dan Rosidah 2010). Metode ini memiliki waktu pengerjaan yang sangat singkat. Namun dalam pengerjaannya tidak melibatkan proses presipitasi dan pencucian DNA melainkan hanya melakukan proses ekstraksi DNA saja.

DNA hasil isolasi dari keempat metode tersebut kemudian diukur konsentrasi dan kemurniannya dengan menggunakan spektrofotometer. Kemudian dielektroforesis untuk melihat kualitas DNA hasil isolasi.

Deteksi *Koi Herpes Virus* dengan Metode PCR

Pada tahap selanjutnya setelah masing-masing jaringan sirip dan insang diisolasi dengan menggunakan keempat metode di atas, maka DNA hasil isolasi

dideteksi dengan menggunakan PCR. Adapun tahapan deteksi KHV meliputi amplifikasi DNA dengan teknik PCR dan visualisasi dengan elektroforesis.

Pada proses amplifikasi digunakan sepasang primer khusus pendeteksi KHV yang dikembangkan oleh Gray dkk. (2002). Urutan primer, komponen reaksi dan pengaturan program PCR yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1, Tabel 2, dan Tabel 3.

Tabel 1. Primer Pendeteksi KHV

Asal	Sequence Primer	Amplicon	Referensi
SphI-5 USA	F290 : 5`- GACACCACATCTACAAGGAG -3` R290 : 5`- GACACATGTTACAATGGTGGC-3`	290 bp	Gray dkk. 2002

Tabel 2. Komponen reaksi PCR

Komponen PCR	Konsentrasi		Volume Reaksi
	Awal	Akhir	
▪ Master Mix	2 X	1 X	12,5 µl
▪ Primer KHV-F	25 pmol/ µl	1 pmol/ µl	1 µl
▪ Primer KHV-R	25 pmol/ µl	1 pmol/ µl	1 µl
▪ DNA Template		150 ng/ µl	@ 1 µl
▪ <i>Nuclease free water</i>		(ditambahkan hingga 25 µl)	9,5 µl

Tabel 3. Pengaturan Program PCR

Siklus	Suhu	Waktu	Siklus
Pra Denaturasi	94 °C	00:01:00	1
▪ Denaturasi	94 °C	00:01:00	29
▪ Annealing	55 °C	00:02:00	
▪ Ekstensi	72 °C	00:03:00	
Final Ekstensi	72 °C	00:07:00	1

Visualisasi Hasil Amplifikasi dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Pada proses elektroforesis DNA virus yang terdapat pada inang dapat dideteksi. Sampel yang positif terinfeksi KHV akan terbentuk pita pada posisi 290 bp. Gel agarosa yang telah melalui proses elektroforesis diwarnai dalam larutan *Ethidium*

Bromide (EtBr). Pengamatan hasil elektroforesis dilakukan dibawah lampu UV dengan panjang gelombang $\lambda = 312$ nm dan difoto menggunakan kamera digital.

Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif kualitatif. Data diperoleh dari hasil isolasi DNA dengan menggunakan beberapa metode isolasi DNA dan hasil ampifikasi dengan menggunakan primer untuk mendeteksi KHV. Dari penelitian ini pita yang dihasilkan dari masing-masing metode isolasi yang berbeda akan dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif untuk mendapatkan hasil terbaik berdasarkan kualitas DNA, kuantitas DNA, sensitivitas dalam mendeteksi dini KHV dan efisiensi waktu. Secara kualitas DNA dilihat dengan menggunakan spektrofotometer kemudian dihitung nilai kemurnian dan konsentrasinya dengan menggunakan rumus (Sambrook dkk. 1989):

$$\text{Konsentrasi } (C) = [\text{Absorbansi pada } \lambda A_{260} \times \text{Faktor } C]$$

$$\text{Rasio Kemurnian DNA} = \frac{(\text{Abs pada } \lambda A_{260} - \text{Abs pada } \lambda A_{320})}{(\text{Abs pada } \lambda A_{280} - \text{Abs pada } \lambda A_{320})}$$

Keterangan : Faktor C = 50 $\mu\text{g/ml}$ (konversi unit dari DNA untai ganda)

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi DNA

Beberapa metode isolasi DNA yang dilakukan pada penelitian ini memungkinkan hasil isolat DNA yang berbeda. Hal ini bergantung pada efektifitas metode tersebut dalam menghasilkan isolat DNA baik dari segi kualitas maupun kuantitasnya serta efisiensi waktu pengerjaan. Hasil yang diperoleh tergantung pada teknik isolasi yang digunakan dan ketelitian cara pengerjaan. Teknik molekuler bervariasi dalam cara pelaksanaan untuk mendapatkan data, baik tekniknya maupun tingkatan target data yang diinginkan sesuai kemudahan pelaksanaan, ketersediaan sumber daya manusia, fasilitas, dan dana (Karp dkk. 1997 dalam Ardiana 2009).

Penggunaan sampel jaringan yang digunakan dalam penelitian ini adalah insang dan sirip. Insang merupakan salah satu organ target bagi KHV (Dishon

dkk. 2005). Sedangkan sirip merupakan salah satu organ terluar yang dapat diserang oleh KHV. Karena sirip melakukan kontak secara langsung dengan lingkungan disekitarnya.

Hasil kuantifikasi dengan menghitung konsentrasi dan tingkat kemurnian menggunakan alat spektrofotometer dapat dilihat pada Tabel 4.

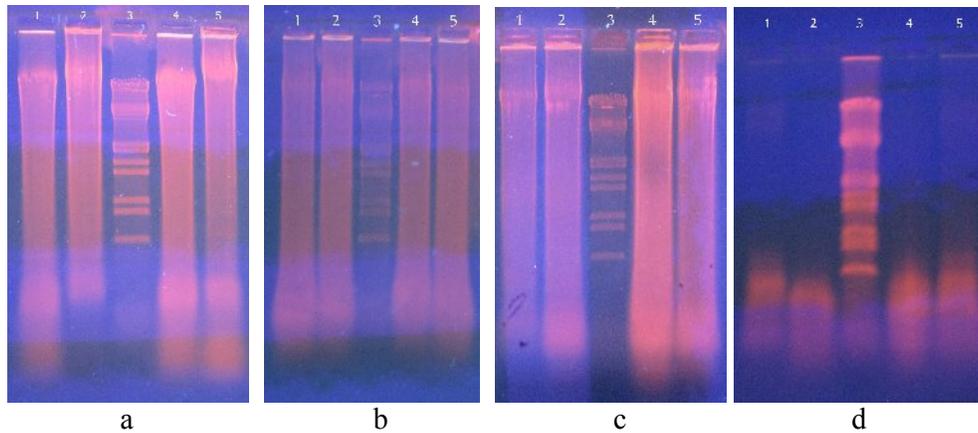
Tabel 4. Nilai kuantitas DNA genom

Metode	Sampel	Panjang Gelombang			Konsentrasi C ($\mu\text{g/ml}$)	Rasio absorbansi (R)
		A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀		
Kit ekstraksi DNA (Promega)	Sirip ikan Jatinengah	0,479	0,277	0,060	23,95	1,93
	Sirip ikan Ciputri	0,520	0,301	0,063	26,00	1,92
	Insang ikan Jatinengah	1,073	0,557	0,037	53,65	1,99
	Insang ikan Ciputri	0,920	0,481	0,025	46,00	1,96
CTAB dengan Phenol	Sirip ikan Jatinengah	0,591	0,294	0,031	29,55	2,10
	Sirip ikan Ciputri	0,605	0,317	0,027	30,25	1,99
	Insang ikan Jatinengah	0,828	0,422	0,025	41,40	2,00
	Insang ikan Ciputri	0,867	0,432	0,034	43,35	2,09
Modifikasi CTAB	Sirip ikan Jatinengah	0,168	0,096	0,020	8,350	1,95
	Sirip ikan Ciputri	0,354	0,186	0,019	17,70	2,00
	Insang ikan Jatinengah	1,437	0,706	0,025	71,10	2,00
	Insang ikan Ciputri	0,697	0,351	0,018	34,85	2,00
Ekstraksi DNA dengan <i>thermal lysis</i>	Sirip ikan Jatinengah	0,090	0,059	0,016	6,65	1,72
	Sirip ikan Ciputri	0,113	0,077	0,025	4,50	1,69
	Insang ikan Jatinengah	0,152	0,096	0,027	7,60	1,81
	Insang ikan Ciputri	0,185	0,135	0,062	9,25	1,71

Kemurnian DNA dapat dilihat dari rasio absorbansi DNA ($A_{260} : A_{280}$). Dimana nilai rata-rata kemurnian (R) DNA yang diperoleh dari hasil penelitian ini berkisar antara 1,7-2,1. Menurut Sambrook dkk. (1989) hasil isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio $A_{260/280}$ antara 1,8 hingga 2,0. Pada penelitian ini nilai konsentrasi DNA yang diperoleh relatif tinggi yakni mencapai 71,05 $\mu\text{g/ml}$.

Metode ekstraksi DNA dengan menggunakan Kit (Promega) merupakan metode yang dikeluarkan oleh Promega Corporation beserta Kit ekstraksinya. Metode ini sudah teruji hasilnya dalam mengisolasi DNA baik secara kuantitas dan kualitas DNA yang dihasilkan. Namun kekurangan dari penggunaan Kit (Promega) dan metode ini adalah biaya yang dibutuhkan cukup besar.

Hasil isolasi DNA dengan menggunakan Kit Ekstraksi DNA (Promega) mampu menghasilkan isolat DNA genom yang berukuran besar dan berkualitas baik (Gambar 1a). Namun selain DNA juga masih terdapat *smear* yang nampak di atas dan di bawah pita DNA genom.



Gambar 1. Elektroforesis hasil isolasi DNA genom

Keterangan :

Sumur ke-1 = Sampel sirip ikan Jatinengah (Sr1)

Sumur ke-2 = Sampel sirip ikan Ciputri (Sr2)

Sumur ke-3 = marker DNA lambda

Sumur ke-4 = Sampel insang ikan Jatinengah (Ins1)

Sumur ke-5 = Sampel insang ikan Ciputri (Ins2)

Nilai kemurnian DNA yang diperoleh pada masing-masing sampel dapat dilihat pada Tabel 4. Hasil tersebut menunjukkan bahwa masing-masing sampel telah murni. Isolat DNA dapat dikatakan murni bila nilainya berkisar 1,8-2,0 dan telah memenuhi persyaratan yang dibutuhkan dalam analisis molekuler (Sambrook dkk. 1989). Dari gambar 1a terlihat ketebalan pita DNA yang beragam hal ini disebabkan oleh konsentrasi DNA yang dihasilkan pada tiap-tiap sampel berbeda.

Metode isolasi CTAB dengan phenol merupakan metode yang menggunakan CTAB sebagai *buffer* lisis yang berperan untuk memecah membran sel inang untuk mengeluarkan DNA genom. Pada tahap pemurnian DNA dilakukan penambahan phenol : kloroform : isoamil alkohol (P : C : I) yang berfungsi untuk menghilangkan senyawa-senyawa yang dapat mengkontaminasi

DNA. Hasil isolasi DNA menggunakan metode CTAB dengan phenol dapat menghasilkan DNA yang berkualitas baik yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA genom (Gambar 1b). Namun hasil elektroforesis menunjukkan masih adanya materi ikutan lain yang terisolasi sehingga mengakibatkan *smear*.

Hasil kuantitas DNA menunjukkan bahwa nilai kemurnian pada masing-masing sampel berbeda dan tingkat konsentrasi DNA yang diperoleh berbeda-beda pula (Tabel 4), hal ini mengakibatkan ketebalan pita yang beragam. Perbedaan konsentrasi DNA yang diperoleh pada masing-masing sampel dapat ditentukan oleh perlakuan fisik yang diberikan serta kemampuan *buffer* ekstraksi dalam memecah sel. Proses perusakan sel secara fisik dengan penggerusan sampel yang sempurna dapat mempermudah *buffer* ekstraksi dalam memecah sel. Disamping itu *buffer* ekstraksi yang digunakan dapat menentukan konsentrasi DNA yang dihasilkan.

Metode CTAB dengan phenol secara umum telah mampu melisis sel dalam menghasilkan DNA genom. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan CTAB 2% sebagai *buffer* ekstraksi telah mampu memecah sel dan menghasilkan DNA genom dengan tingkat konsentrasi DNA yang diperoleh cukup tinggi.

Isolasi DNA dengan metode modifikasi CTAB telah mengalami modifikasi pada berbagai tahap yaitu proses penghomogenan dengan *vortex mixer* untuk membantu proses lisis sel. Inkubasi pada suhu 65 °C selama 90 menit dan setiap 30 menit sampel dibolak-balik hal ini bertujuan agar larutan *buffer* dapat melisis sel secara sempurna karena larutan menjadi homogen. Pemisahan DNA dengan materi lainnya dilakukan dengan penambahan Chloroform : IAA (C : I) proses ini diulang sebanyak dua kali agar pemisahan DNA dengan komponen lainnya menjadi lebih baik.

Hasil isolasi DNA dengan menggunakan metode modifikasi CTAB mampu mengisolasi DNA genom ikan mas dengan kualitas baik yang ditunjukkan pada hasil elektroforesis (Gambar 1c). Namun selain DNA, materi ikutan lain (*smear*) yang tidak diketahui pun masih terbawa. *Smear* tersebut bisa merupakan sisa dari

larutan-larutan yang masih terbawa selama proses isolasi atau juga dapat berupa DNA yang terdegradasi pada proses isolasi. Karena pada proses ekstraksinya setelah digerus dalam *buffer* CTAB (65 °C) kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer* yang bertujuan untuk membantu proses lisis, tapi proses ini mengakibatkan sebagian DNA akan keluar dan akan terpotong-potong oleh enzim endonuklease sehingga mengakibatkan *smear* ketika dielektroforesis (Anam 2010).

Pada tahap presipitasi protein, lemak, dan polisakarida yang masih tersisa dapat dihilangkan dengan menggunakan garam, pada penelitian ini digunakan Na acetate 3M. Tahap akhir dari isolasi DNA ialah tahap pencucian DNA. Pencucian DNA dilakukan untuk memisahkan senyawa lain seperti larutan CTAB dan garam-garam yang ikut mengendap bersama DNA. Proses pencucian DNA dilakukan dengan penambahan etanol (Roger dan Bendich 1994).

Tingkat kemurnian DNA yang diperoleh dengan menggunakan metode ini telah baik (Tabel 4). Nilai pada masing-masing sampel telah murni dan bebas dari pengotor RNA dan protein karena nilainya berkisar antara 1,8-2,0 (Sambrook dkk. 1989). Penggunaan CTAB 2% telah mampu memecah sel dan menghasilkan konsentrasi DNA genom yang tinggi yaitu mencapai 70,10 µg/ml. Pengambilan lapisan air yang mengandung DNA pada saat penambahan C : I yang telah disentrifugasi ikut menentukan jumlah DNA genom yang terambil. Disamping itu proses pengambilan DNA tersebut ikut menentukan kualitas DNA hasil isolasi yang ditunjukkan pada proses elektroforesis.

Metode ekstraksi DNA dengan *thermal lysis* merupakan metode ekstraksi yang menggunakan suhu panas pada proses pemecahan selnya. Penggunaan suhu tinggi ini bertujuan untuk memaksimalkan pemecahan sel (pada suhu 99 °C), dengan waktu yang relatif singkat yaitu 2 menit agar DNA tidak mengalami kerusakan. Serta penambahan PBS (pH konstan 7,4) yang berfungsi menjaga DNA agar tetap utuh dan mencegah proses osmosis selama inkubasi (Martin dkk. 2006).

Hasil isolasi DNA dengan menggunakan metode ekstraksi DNA dengan *thermal lysis* menghasilkan DNA genom dengan jumlah yang relatif sedikit. Hasil

elektroforesis menunjukkan kenampakan pita genom yang tipis (Gambar 1d). Hal ini disebabkan karena penggunaan PBS (*Phospat buffer saline*) yang dikombinasikan dengan suhu tinggi dapat mengisolasi DNA virus (Siwicki dkk. 2006).

Nilai kemurnian DNA yang rendah (Tabel 4) disebabkan karena metode ekstraksi dengan *thermal lysis* memotong proses isolasi dengan tidak melibatkan tahap pemurnian dan pencucian DNA pada proses isolasinya. Tahap pemurnian DNA dapat menghasilkan DNA yang bebas dari pengotor. Sedangkan tahap pencucian DNA dengan penambahan ethanol dapat mengendapkan DNA karena asam nukleat akan mengendap dan sukar larut dalam etanol sedangkan pengotor dapat larut dalam etanol. Sehingga hasil kualitas DNA dengan elektroforesis menunjukkan adanya *smear*. Nilai konsentrasi DNA yang dihasilkan relatif lebih kecil bila dibandingkan dengan ketiga metode sebelumnya. Sehingga pada proses elektroforesis pita genom tidak tampak jelas (Gambar 1d).

Konsentrasi DNA genom yang rendah dapat disebabkan karena pada proses ekstraksi tidak dilakukan penambahan *buffer lysis*. Pemecahan sel dilakukan dengan menggunakan suhu tinggi yaitu 99 °C. Selain itu penggunaan PBS yang berfungsi untuk mengisolasi DNA virus memungkinkan DNA genom yang terisolasi dalam jumlah yang sedikit sehingga konsentrasi yang diperoleh rendah.

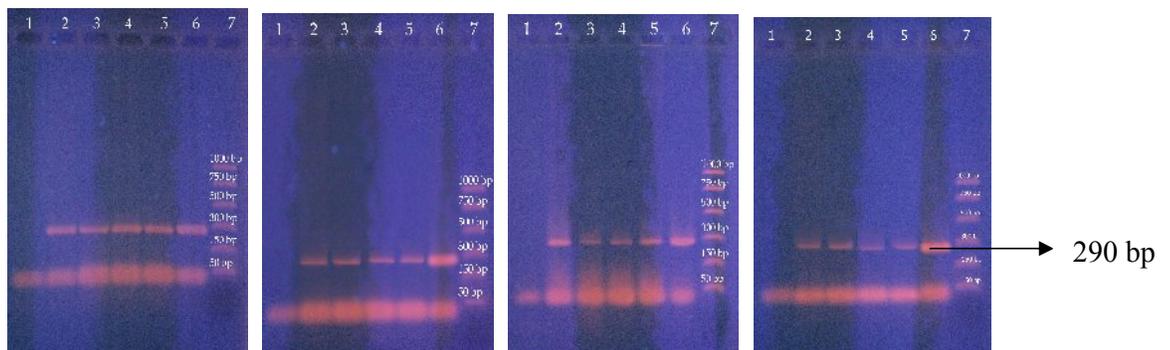
Pengujian dengan Teknik PCR

Isolat DNA yang telah diisolasi dengan menggunakan keempat metode tersebut kemudian diamplifikasi untuk mendeteksi keberadaan KHV dari masing-masing metode yang digunakan. Pada penelitian ini digunakan DNA *template* dengan konsentrasi 150 ng/μl, jumlah ini sesuai dengan konsentrasi DNA *template* yang dipakai oleh Gray dkk. (2002). Konsentrasi DNA *template* yang tepat akan menghasilkan produk amplifikasi yang baik.

Pada penelitian ini nilai konsentrasi DNA yang diperoleh relatif tinggi yakni mencapai 71,05 μg/ml (Tabel 4). Sedangkan menurut Wilkerson dkk. (1993) bahwa konsentrasi (C) yang baik untuk PCR berkisar antara 0,5 sampai 6,5

$\mu\text{g}/\text{ml}$. Sehingga isolat DNA yang memiliki nilai konsentrasi yang tinggi diencerkan sampai konsentrasi tertentu agar dapat digunakan untuk proses PCR. Pengenceran konsentrasi DNA dilakukan sampai konsentrasi isolat DNA mencapai $5 \mu\text{g}/\text{ml}$. Berdasarkan nilai kemurnian dan konsentrasi DNA di atas maka hasil isolasi DNA dapat digunakan untuk proses amplifikasi dengan menggunakan primer pendeteksi KHV.

Keseluruhan komponen PCR tersebut kemudian diamplifikasi berdasarkan siklus yang telah disesuaikan (Tabel 6). Kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 1 %. Elektroforesis hasil PCR dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Elektroforesis Produk PCR

(a. Jaringan Insang Ikan Jatinengah, b. Jaringan Sirip Ikan Jatinengah, c. Jaringan Insang Ikan Ciputri dan d. Jaringan Sirip Ikan Ciputri)

Keterangan :

Sumur 1 : Kontrol negatif (-)

Sumur 2 : Kit Promega

Sumur 3 : Suharsono

Sumur 4 : Rogers

Sumur 5 : PBS

Sumur 6 : Kontrol positif (+)

Sumur 7 : PCR Marker (M)

Elektroforesis produk PCR pada Gambar 2 menampilkan kemunculan fragmen DNA yang sejajar dengan kontrol positif. Dimana kontrol positif (sumur ke-6) pada masing-masing gambar berada pada posisi 290 bp. Sumur ke-7 pada

masing-masing gambar adalah PCR Marker yang berfungsi sebagai penanda berat molekul DNA. Hasil pengujian isolat DNA dari beberapa metode dengan bantuan teknik PCR menunjukkan adanya fragmen DNA dari masing-masing sampel yang berada pada kisaran 290 bp. Hal tersebut sesuai dengan produk *amplicon* dari primer KHV yang dikembangkan oleh Gray dkk. (2002) (Tabel 1).

Kemunculan pita DNA yang sejajar dengan kontrol positif menunjukkan bahwa keberadaan KHV yang telah diisolasi pada masing-masing metode isolasi DNA dapat terdeteksi dan menandakan bahwa metode isolasi DNA yang digunakan telah mampu menghasilkan DNA KHV yang terdapat dalam DNA genom dengan tingkat serangan yang ringan pada ikan mas.

Perbandingan Metode Isolasi DNA Terhadap Sensitifitas Deteksi Dini KHV

Isolasi DNA genom ikan mas yang terinfeksi *Koi Herpes Virus* (KHV) dengan menggunakan beberapa metode isolasi DNA menunjukkan hasil yang berbeda baik dari segi kuantitas maupun kualitas DNA yang dihasilkan. Perbandingan isolasi DNA dalam mendeteksi serangan KHV secara dini dapat dilihat pada Tabel 5 .

Tabel 5. Perbandingan Efektifitas dan Sensitifitas Isolasi DNA

No	Metode yang digunakan	Efektifitas mendeteksi KHV				
		Efisiensi Waktu	Konsentrasi DNA	Kemurnian DNA	Amplifikasi	Biaya
1.	Kit ekstraksi DNA (Promega)	++	++	+++	++	+
2.	CTAB dengan Phenol	++	++	++	++	++
3.	Modifikasi CTAB	+	+++	+++	++	++
4.	Ekstraksi DNA dengan <i>thermal lysis</i>	+++	+	+	++	+++

Keterangan :

+ : Kurang baik

++ : Baik

+++ : Sangat baik

Dari keempat metode tersebut nilai konsentrasi DNA yang paling tinggi diperoleh dari sampel yang diisolasi dengan menggunakan metode modifikasi CTAB yakni mencapai 70,10 $\mu\text{g/ml}$. Kemudian metode kit ekstraksi DNA (Promega) mencapai 53,65 $\mu\text{g/ml}$. Metode CTAB dengan phenol mencapai 43,35 $\mu\text{g/ml}$. Kemudian metode Ekstraksi DNA dengan *thermal lysis* dengan nilai konsentrasi yang diperoleh mencapai 9,25 $\mu\text{g/ml}$. Pada penelitian ini secara keseluruhan nilai kemurnian DNA yang diisolasi oleh masing-masing metode cukup baik, karena nilai kemurnian DNA yang diperoleh berkisar antara 1,8-2,0, namun ada beberapa isolat DNA yang masih belum murni (Tabel 4).

Berdasarkan Tabel 5 maka metode yang paling sensitif dalam mengisolasi DNA genom ikan mas yang terinfeksi KHV adalah metode modifikasi CTAB. Karena metode ini menghasilkan nilai kemurnian DNA yang baik dengan konsentrasi DNA tertinggi. Hal tersebut memungkinkan DNA KHV yang ikut terisolasi menjadi lebih besar pada ikan mas dengan tingkat serangan yang ringan. Namun metode ini kurang efektif dan efisien dari segi waktu dan cara pengerjaannya dalam mendeteksi serangan KHV secara dini.

Metode yang memiliki efisiensi waktu serta cara pengerjaan yang cepat dan mudah adalah metode ekstraksi DNA dengan *thermal lysis* dengan lama pengerjaan sekitar dua jam dan cara pengerjaan yang mudah. Kemudian metode Kit ekstraksi DNA (Promega) dengan lama pengerjaan sekitar enam jam dan cara pengerjaan yang cukup mudah namun biaya yang dibutuhkan cukup besar. Metode CTAB dengan phenol membutuhkan waktu pengerjaan sekitar enam jam dengan pengerjaan cukup mudah. Sedangkan waktu pengerjaan untuk metode modifikasi CTAB cukup lama yaitu sekitar 10 jam dengan membutuhkan tenaga yang lebih besar dalam pengerjaannya.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Metode yang sensitif dalam mengisolasi DNA genom ikan mas adalah metode modifikasi CTAB karena metode ini mampu menghasilkan nilai kemurnian dan konsentrasi DNA tertinggi.
2. Metode yang efektif dan efisien dari segi waktu, pengerjaan, dan biaya adalah metode ekstraksi DNA dengan *thermal lysis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anam, Khairul. 2010. *Isolasi DNA Genom*. Bioteknologi Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Ardiana, Dwi W. 2009. *Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Pepaya Dan Jeruk Dengan Menggunakan Modifikasi Bufur CTAB*. Buletin Teknik Pertanian Vol. 14 No. 1. Hal 12-16.
- Buwono, Ibnu Dwi., dan Rosidah. 2010. *Uji Sensitifitas Metode One Step Dan Nested PCR Terhadap Deteksi Penyakit KHV pada Ikan Mas (Cyprinus carpio)*. Lembaga Penelitian dan Pengembangan Masyarakat Universitas Padjadjaran. 51 hlm.
- Direktorat Kesehatan Ikan dan Lingkungan. 2003. *Prosedur PCR Untuk Diagnosa Cepat Bercak Putih pada Udang*. Direktorat Jendral Perikanan Budidaya. 17 hlm.
- Dishon, A., A. Perelberg, J. Bishara-Shieban, M. Ilouze, M. Davidovich, S. Werker and M. Kotler. 2005. *Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings*. Applied and Environmental Microbiology 71(11):7285-7291.
- Gray, W.L., L. Mullis, S.E. LaPatra, J.M. Groff, and A. Goodwin. 2002. *Detection of Koi Herpes Virus DNA in Tissue of Infected Fish*. Journal of Fish Disease, (25) : 171-178.
- Martin, N.C. Pirie, A.A. Ford, L.V. Callaghan, C.L. McTurk, K. Lucy, D & Scrimger, D.G. 2006. *The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs*. Science & Justice, 46 (3);179:184.
- Mulyani, Yuniar. 2003. *Isolasi dan Karakterisasi Mikrosatelit pada Mangga*. Thesis. Jurusan Biologi. Institut Teknologi Bandung.

- Ornamental Aquatic Trade Association (OATA). 2001. *Koi Herpes Virus*. Ornamental Aquatic Trade Association (OATA). Inggris. 33 hlm.
- Perelberg, A., M. Smirnov, M. Hutoran, A. Diamant, T. Bejerano, and M. Kotler. 2003. *Epidemiological of a New Viral Disease Afflicting Cultured Cyprinus carpio in Israel*. The Israeli Journal of Aquaculture, 55 (1) : 5-12.
- Porebski, S., Bailey, L.G. and Baum, B.R. 1997. *Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components*. Plant. Mol. Biol. Rep. 15(1): 8-15.
- Roger, S. O. dan A. J. Bendich. 1994. *Extraction of Total Cellular DNA from Plant, Algae, and Fungi*. Molecular Biology Manual.
- Sachlan, M. 1972. *Penyakit Ikan*. Direktorat Jendral Perikanan Departemen Pertanian. Bogor. 61 hlm.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F, dan Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Press. University of Texas South Western Medical Centre, Texas. I.47 hlm.
- Tauhid, A. Sunarto, I. Koesharyani, H. Supriyadi, dan L. Gardenia. 2004. *Strategi Pengendalian Penyakit Koi Herpesvirus (KHV) pada Ikan Mas dan Koi*. Makalah pada Workshop Pengendalian Penyakit Koi Herpes Virus (KHV) pada Budidaya Ikan Air Tawar, Bogor 28 September 2004. 18 hlm.
- Yustiati, A. 2006. *Karakteristik Genetik dan Morfologi Klon Ginogen Ikan Komet (Carasius auratus)*. Program Pasca Sarjana Universitas Padjadjaran. 98 hlm.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Andi. Yogyakarta. 240 hlm.