

Pengembangan dan Aplikasi *Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification* untuk Peneguhan Diagnosa *Infectious Myonecrosis Virus* pada Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*)

The Development and Application of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for The Diagnosis of Infectious Myonecrosis Virus in the White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

**Zakiah Widowati¹, Firma¹, Dita Rustianti¹, M. Tony Wartono Silaban¹,
 Freddy Riatmono¹, Sulistia Trikora Astuti¹, Nurlaila¹,
 Asep Dadang Koswara¹, Hastari Wuryastuti²**

¹Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan, Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan, Kementerian Kelautan dan Perikanan,

²Bagian Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
 Email: zakiahwidowati@yahoo.co.id

Abstract

Infectious myonecrosis virus (IMNV) is one of the shrimp viral diseases caused by a double-stranded RNA virus, non-enveloped, and belongs to the family group Totiviridae. Weakness diagnosis of RNA viral diseases due to the RNA viruses are unstable and highly reactive. So far the diagnostic methods for detecting IMNV with high accuracy is based on biomolecular test, such as reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The RT PCR generally requires 4-8 hours of testing time, and also requires thermal cycler with a commercial kit materials which is relatively expensive. The purpose of the present study is to find and determine an alternative isolation of RNA from the samples and to determine whether the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method based on biomolecular approach can be an alternative testing method for diagnosis of IMNV in the white shrimps (*L. vannamei*). The RT-LAMP is more simple, straightforward, but it has a high sensitivity. Direct and indirect RNA extraction methods from samples and FTA cards give good results as a template in RT-PCR and RT-LAMP IMNV. The FTA card as one of the RNA samples of storage media provides an alternative storage method that is easy, simple and has a shelf life of RNA in the long term (up to 6 months). Incubation time of RT-LAMP IMNV at 40°C is between 15-30 minutes. Amplification time of RT-LAMP IMNV at 56°C is between 70-110 minutes. In the present study, the white shrimps (*L. vannamei*) that are positive IMNV-RT-LAMP provides 100% compliance results when tested by the RT-PCR method. The time of RT-LAMP amplification IMNV ranged from 70-110 minutes shorter than that of conventional PCR (180-240 minutes). Overall the RT-LAMP method for IMNV can be applied as a method of testing for confirmative IMNV diagnosis in the white shrimps (*L. vannamei*).

Keywords: IMNV, RT-LAMP, RNA, FTA cards, white shrimp (*L. Vannamei*)

Abstrak

Infeksi *myonecrosis virus* (IMNV) adalah salah satu penyakit viral pada udang yang disebabkan oleh virus RNA untai ganda, tanpa amplop, dan termasuk dalam kelompok famili *Totiviridae*. Kelemahan diagnosis penyakit virus RNA adalah sifat RNA yang tidak stabil dan sangat reaktif. Sejauh ini metode untuk mendeteksi penyakit IMNV yang memiliki akurasi tinggi adalah metoda pengujian berbasis biomolekuler, seperti *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR). Pada umumnya, untuk uji RT-PCR diperlukan waktu pengujian 4-8 jam dan alat *thermal cycler*, serta bahan PCR komersial yang relatif mahal. Tujuan penelitian ini adalah untuk mencari alternatif isolasi RNA dari sampel, dan mengetahui dan menentukan apakah metoda RT-LAMP dapat menjadi salah satu alternatif metoda pengujian berbasis biomolekuler yang lebih sederhana, mudah tetapi memiliki sensitifitas tinggi untuk IMNV pada udang putih (*L.vannamei*). Hasil penelitian ini membuktikan, bahwa metoda ekstraksi RNA langsung organ dan ekstraksi tidak langsung FTA *card* memberikan hasil yang baik sebagai cetakan pada RT-PCR maupun RT-LAMP IMNV. FTA *card* sebagai salah satu media penyimpanan sampel RNA memberikan alternatif cara penyimpanan yang mudah, sederhana dan memiliki daya simpan RNA dalam jangka waktu panjang (6 bulan). *Reverse transcription* pada RT-LAMP IMNV dapat dilakukan pada suhu 40°C dengan kisaran waktu inkubasi antara 15-30 menit. Waktu amplifikasi RT-LAMP IMNV pada suhu 56° C adalah ± 70-110 menit. Pada penelitian ini, semua sampel udang putih (*L.vannamei*) yang teridentifikasi positif terinfeksi IMNV dengan metoda RT-LAMP, memberikan kesesuaian hasil 100% saat dilakukan pengujian dengan metoda RT-PCR. Waktu amplifikasi RT-LAMP IMNV ± 70-110 menit adalah lebih singkat jika dibandingkan dengan PCR konvensional yang diperlukan waktu ± 3-4 jam. Secara keseluruhan metoda RT-LAMP IMNV ini dapat diaplikasikan sebagai metoda pengujian untuk peneguhan diagnosa penyakit IMNV pada udang putih (*L.vannamei*).

Kata kunci: IMNV, RT-LAMP, RNA, FTA *cards*, udang putih (*L. Vannamei*) Zakiah Widowati *et al.*
Pengembangan dan Aplikasi *Reverse Transcription Loop-Mediated*

Pendahuluan

Indonesia memiliki perairan yang berpotensi menjadikannya sebagai produsen ikan dan udang dengan produksi perikanan mencapai 1,2 juta ton atau senilai Rp. 15 trilyun pada tahun 2003 (DKP, 2006). Ekspor produk perikanan mencapai 219.850 ton atau senilai US\$ 760 juta dengan nilai ekspor terbesar berasal dari udang sebesar 100.200 ton senilai US\$ 630.380 (Dahuri, 2004).

Produksi udang nasional terus menurun sejak awal tahun 2009 akibat serangan virus yang menurunkan produksi udang hingga 40-70%. Menurunnya pasokan udang nasional menjadi pemicu harga udang Indonesia tidak kompetitif dan sulit bersaing dengan produk Thailand. *Infectious myonecrosis virus* (IMNV) adalah salah satu infeksi

virus yang mematikan benur dan induk udang (OIE, 2009). Infeksi IMNV dilaporkan pertama kali menyerang budidaya udang putih (*Litopenaeus vannamei*) di Brazil tahun 2004, dan pada tahun 2006 IMNV ini menjadi penyebab tingginya kematian udang putih (*L. vannamei*) pada budidaya udang di Indonesia dengan gejala mirip dengan yang dilaporkan di Brazil (Senapin *et al.*, 2007).

Penyakit IMNV muncul pertama kali di Situbondo pada tahun 2006, dalam kurun waktu Januari-Desember 2009 telah menyebar ke Jawa Timur, Bali, Lombok dan Lampung. Jawa Barat dan Banten positif IMNV pada bulan November – Desember 2009 (Sutanto, 2010). Penyebaran IMNV terjadi secara vertikal dan horisontal. Penyebaran IMNV dimulai dari benur yang terinfeksi IMNV dari induknya dan menyebar secara horisontal di perairan

melalui distribusi antar area induk dan PL udang putih untuk keperluan budidaya.

Metoda pengujian yang digunakan untuk diagnosis penyakit IMNV adalah dengan melihat lesi patologis yang menciri infeksi IMNV, dilanjutkan dengan pemeriksaan histopatologik untuk melihat kerusakan jaringan udang akibat infeksi virus IMN. Peneguhan diagnosa dilakukan dengan *nested reverse transcription polymerase chain reaction (nested RT-PCR)* yang umumnya memerlukan waktu pengujian 4-8 jam. Meskipun metoda nested RT-PCR ini memiliki kelebihan relatif lebih cepat dan akurat, aplikasi metoda ini dirasakan masih relatif mahal karena memerlukan peralatan khusus berupa *thermal cycler (PCR machine)* dan bahan uji berupa kit komersial *nested RT-PCR* IMNV yang relatif mahal.

Oleh karenanya diperlukan metoda deteksi penyakit IMNV yang cepat, tepat, akurat, dengan biaya yang relatif rendah, serta mudah diaplikasikan untuk peneguhan diagnosa penyakit IMNV, sebagai upaya tindakan pencegahan awal terhadap penyebaran penyakit IMNV.

Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) merupakan salah satu metoda deteksi penyakit IMNV berbasis biomolekuler yang dapat diaplikasikan sebagai metoda diagnosa cepat, tepat, akurat dan relatif murah karena tidak memerlukan mesin *thermal cycler (PCR machine)*.

Materi dan Metode

Penelitian ini berlangsung dari April sampai September 2010 di laboratorium Balai Uji Standar

Karantina Ikan (BUSKI). Sampel berupa udang putih (*L.vannamei*) yang positif IMNV dan berasal dari tambak di Lampung. Ekstraksi RNA langsung dari organ menggunakan Trizol™ (Invitrogen). Sedangkan untuk ekstraksi RNA tidak langsung digunakan FTA card sebagai bahan untuk menyimpan sampel RNA dalam bentuk kering. Selanjutnya RNA yang tersimpan didalam kertas FTA dipurifikasi dengan menggunakan *Mag Max Viral RNA isolation kit* (Ambion™). Bahan amplifikasi RT-PCR sebanyak 25 µl berisikan 12,5 µl Access quick, AMV 0,2 U µl⁻¹, 0,4 µM primer 4587F; 0,4 µM primer 4914R; 1-50 ng total RNA, dan *nuclease free water* hingga volume 25µl. Profil amplifikasi *first step* RT-PCR IMNV adalah 60°C selama 30 menit, 95°C selama 2 menit. Dilanjutkan 95°C selama 45 detik, 60°C selama 45 detik dan keduanya diulang sebanyak 39 kali. Ekstensi akhir 60°C selama 7 menit. Formulasi *nested* PCR untuk reaksi 25 µl berisi 12,5 µl Go taq Green Mastermix (Promega™); 0,4 µM primer 4725 NF; 0,4 µM primer 4863 NR; 2 µl *amplicon first step* dan *nuclease free water* hingga total volume 25 µl. Adapun profil amplifikasi nested adalah 1 siklus pada suhu 95°C selama 2 menit. 39 siklus pada suhu 95°C selama 30 detik, 65°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik. Ekstensi akhir 2 menit pada suhu 72°C. Positif IMNV ditandai dengan munculnya pita di 328 bp dan 139 bp atau hanya satu diantara 2 pita tersebut yang muncul (OIE, 2009)..

Formulasi RT-LAMP IMNV dengan total 25µl berisi 8 U Bst DNA polimerase, 0,25 U AMV, buffer AMV 2,5 µl; *buffer thermopol* 1x; 1,4 mM dNTP mix (Promega™), 1,6 M Betaine, konsentrasi FIP dan BIP masing-masing 1,6 mM, 0,2 mM untuk

masing-masing B3 dan F3, 2 ng RNA target dan ditambahkan *nuclease free water* hingga volume 25 µl (Puthawibool *et al.*, 2008). Deteksi PCR produk RT-LAMP IMNV dilakukan dengan 2 cara yaitu pembacaan dengan gel elektroforesis dan dengan penambahan SYBR Green I yang telah diencerkan 10 kali. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna pada SYBR green I dari warna jingga menjadi hijau kekuningan (hijau pupus) diamati di bawah sinar UV (Kono *et al.*, 2004)

Primer RT-PCR IMNV 4587F 5'CGAC GCTGCTAACCATACAA3' dan 4914R 5'ACTCGG CTGTTTCGATCAAGT3' untip produk 328 bp. . *Primer nested* PCR 4725 NF 5'GGCACATG CTCAGAGACA3' dan 4863 NR 5'AGCGCTGAGTCCAGT CTTG3' produk 139 bp. (OIE, 2009).

Primer RT-LAMP IMNV terdiri dari 4 buah primer yaitu IMNV F3-682-706 5'GGTTTTAAGAATACTTTGGAGTGA3'; B3-878-856 5'ACT TGACTAACTACAAT TTCTCC3'; FIP(774-750/TTTT/707-724) 5'TCCAGCTTGTAGTTTCTCAATCATTT TTTCGCTTGACGAAAATGCACT3'; BIP (780-804/TTTT/854-835) 5' TGGATTAC CATTGACTATGCATCATTTTACTCTTCTCAC CATTGTCTT3' (Puthawibool *et al.*, 2009).

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini, sampel udang putih (*L.vannamei*) berasal dari tambak udang di Lampung diduga terinfeksi IMNV. Lesi patologis anatomis yang menyertai terlihat patognomonik untuk penyakit *infectious myonecrosis virus*

(IMNV). Pada segmen abdominal ke-6 menciri IMNV yang terlihat berwarna putih pada otot daging yang menyerupai warna udang yang direbus (udang yang dimasak). Selain itu pada segmen abdominal ke-5 tersebut terlihat ada warna kemerahan (Senapin *et al.*, 2007) (Gambar 1).



Gambar 1. Lesi patologis anatomis udang (*L.vannamei*) diduga terinfeksi IMNV. Segmen abdominal ke-6 terlihat berwarna keputihan.

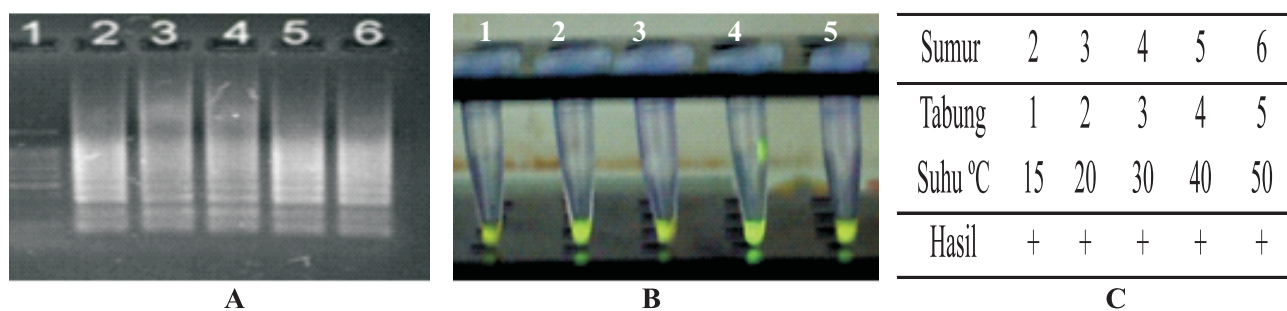
Hasil pengukuran konsentrasi RNA dari ekstraksi langsung (Trizol) dan tidak langsung (FTA) dengan organ : bagian segmen abdominal ke-6 udang dengan lesi patologis anatomis keputihan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengukuran konsentrasi RNA dari FTA card dan konsentrasi RNA dari segmen abdominal ke-6

GENQUANT	Segmen Abdominal ke-5 (50 mg)	FTA CARD (10Disc)
A.230	1,897	2,288
A.260	0,545	1,223
A.280	0,251	1,182
A.320	0,077	0,957
A.260/280	1,896	1,182
A.260/230	0,348	0,200
Concentration (ng/µl)	49,8	21,3

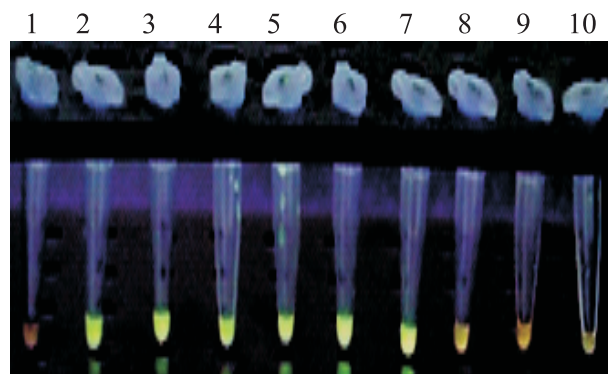
Pengukuran konsentrasi dan kemurnian RNA hasil ekstraksi menunjukkan kemurnian (A.260/A.280) RNA yang berasal dari FTA card 1,182 dan ekstrak RNA dari segmen abdominal ke-6 (Trizol) adalah 1,896. Konsentrasi RNA FTA card adalah 21,3 ng/μl dan RNA segmen abdominal ke-6 (Trizol) adalah 49,8 ng/μl.

Pada penelitian ini, dilakukan optimasi suhu pada tahapan *reverse transcription* LAMP IMNV, yaitu pada suhu 15°, 20°, 30°, 40° dan 45°C (kontrol) dan menunjukkan, bahwa enzim AMV (*avian myeloblastosis virus*) yang digunakan pada RT-LAMP mampu bekerja pada kisaran suhu 15-45° C (Gambar 2)

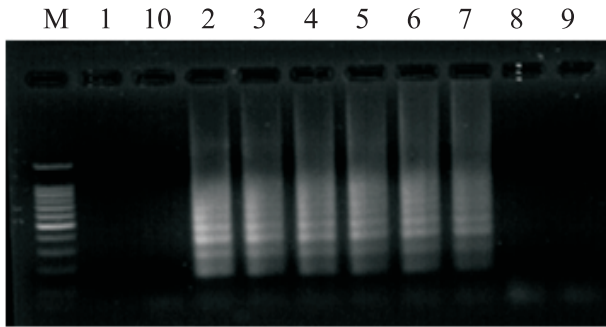


Gambar 2. Hasil uji elektroforesis, tabung no. 1-5 (A) dan produk LAMP digunakan pewarna *SYBR green I*, sumur no 2-6 positif IMNV (B). Hasil optimasi suhu *reverse transcription* LAMP IMNV (c)

Amplifikasi RT-LAMP IMNV dapat dilakukan pada kisaran suhu 53,3°C sampai dengan suhu 65,2°C. Suhu diatas 65,2°C menjadikan proses amplifikasi RT-LAMP tidak dapat berjalan sempurna yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna orange ke hijau pada pewarnaan dengan *SYBR green I* (Gambar 3) dan tidak adanya pita DNA pada gel agar (Gambar 4). Hal tersebut dimungkinkan mengingat, bahwa aktifitas enzim Bst optimum pada suhu 65° C dan menjadi tidak aktif saat diinkubasi pada suhu $\geq 67,4^\circ\text{C}$ selama 15 menit (Gambar 5). Pada kisaran suhu diatas 60,3° C pita DNA yang dihasilkan kurang jelas, sehingga suhu optimum untuk amplifikasi RT-LAMP IMNV adalah pada kisaran suhu 53,3°C- 58,0°C.



Gambar 3. Hasil amplifikasi RT-LAMP menggunakan pewarna *SYBR green I*. Produk amplifikasi pada tabung 1, 8, 9 dan 10 berwarna *orange* menandakan negatif IMNV. Produk amplifikasi pada tabung 2 s.d 7 berwarna hijau menandakan positif IMNV.

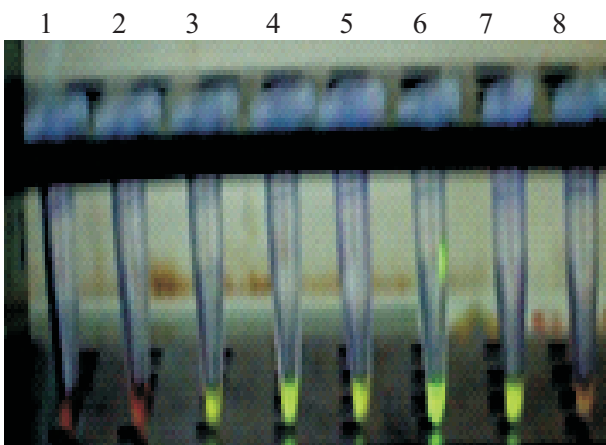


Gambar 4. Hasil elektroforesis produk RT-LAMP menunjukkan positif pita DNA IMNV pada sumur no. 2 s.d 7 dan negatif IMNV pada sumur 1, 10, 8 dan 9.

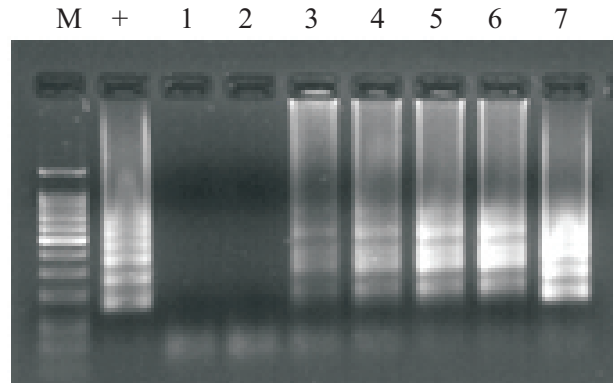
	1 (-)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Suhu°C	65,2	53,3	55,9	58,0	60,3	62,8	65,2	67,4	69,3	70,7
Hasil	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Gambar 5. Hasil Amplifikasi RT- LAMP IMNV berdasar kisaran suhu.

Untuk optimasi waktu, pada penelitian ini terbukti, bahwa kisaran waktu *reverse transcription* pada suhu 40°C adalah ± 15-30 menit. Kisaran waktu amplifikasi RT-LAMP IMNV pada suhu 56°C adalah ± 70-110 menit. Jika amplifikasi tersebut dilaksanakan kurang dari 70 menit maka amplifikasi tidak dapat terjadi secara optimal (Gambar 6). Kisaran waktu optimum amplifikasi RT-LAMP IMNV adalah 90 menit.



A



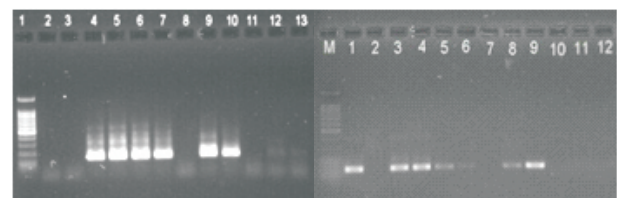
B

	1	2	3	4	5	6	7	8(-)
Waktu menit	50	60	70	80	90	100	110	90
Hasil	-	-	+	+	+	+	+	-

C

Gambar 6. Pewarnaan SYBR Green I (A), Gel elektroforesis (B), dan kisaran waktu amplifikasi (c).

Hasil uji sensitifitas pada metoda RT-LAMP IMNV dan RT-PCR IMNV tidak menunjukkan adanya perbedaan. Penggunaan Trizol (49,8 ng/μl) untuk ekstraksi RNA dengan organ abdominal segmen ke-6 terbukti menghasilkan konsentrasi RNA secara optimal sampai diperoleh pengenceran 10⁻³. Sedangkan, konsentrasi RNA FTA *card* (7,0 ng/μl) teramplifikasi dengan baik sampai dengan pengenceran 10⁻¹ (Gambar 7).

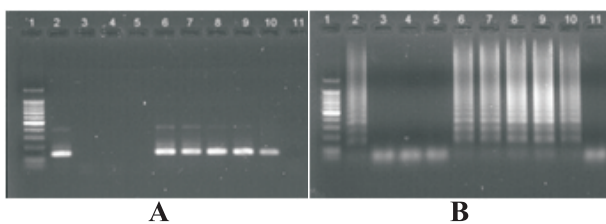


A

B

Gambar 7. Gel elektroforesis RT-LAMP: Line 4-8 Trizol 10⁰-10⁻⁴, Line 9-13 FTA 10⁰-10⁻⁴ (A) dan RT-PCR : Line 3-7 Trizol 10⁰-10⁻⁴, Line 9-13 FTA 10⁰-10⁻⁴ (B).

Untuk menentukan apakah RT-LAMP IMNV merupakan uji yang sesuai dengan standar uji *nested* RT-PCR IMNV (OIE, 2009), maka dilakukan pengujian terhadap sampel yang sama dengan kedua metoda uji tersebut. Hasil pengujian *nested* RT-PCR dan RT-LAMP IMNV terhadap ke-6 sampel udang dengan kode 33 (b,c,d,f) dan sampel 32 (a,b), dan sampel dalam FTA card (1,2) yang disimpan pada suhu (2-8⁰C) dalam waktu 6 bulan menunjukkan hasil yang tidak berbeda (100% sesuai) (Gambar 8). Berdasarkan rekomendasi OIE (2009 dan 2010) untuk peneguhan diagnosis IMNV antara lain dilakukan dengan *nested* RT-PCR. Terbukti, pada penelitian ini, hasil *nested* RT-PCR adalah sama dengan hasil RT-LAMP. RT-LAMP merupakan uji pendekatan molekuler yang sederhana dan singkat waktu pengujiannya (Puthawibool *et al.*, 2009).



Gambar 8. Gel elektroforesis RT-PCR : Line 4-5 sampel 32(a,b), Line 6-9 sampel 33(b,c,d,f), Line 10-11 FTA(1,2) (A) dan RT-LAMP PCR Line Line 4-5 sampel 32(a,b), Line 6-9 sampel 33(b,c,d,f), Line 10-11 FTA(1,2) (B)

Metoda RT-LAMP IMNV dapat menjadi salah satu alternatif metoda pengujian berbasis biomolekuler yang lebih sederhana, mudah tetapi memiliki sensitifitas yang tinggi. Untuk sampling terkait dengan pendekatan uji molekuler di lapangan, metoda RT-LAMP IMNV sangat tepat untuk diaplikasikan sebagai peneguhan diagnosa terkait dengan program rutin nasional dalam kontrol

dan pencegahan, termasuk eradikasi *infectious myonecrosis virus* di Indonesia.

Daftar Pustaka

- Dahuri, R. (2004) Perkembangan dan Inovasi Ilmu dan Teknologi Akuakultur. Simposium Nasional MAI, Semarang 27–29 Januari 2004.
- DKP (Departemen Kelautan dan Perikanan). (2006) Statistik Perikanan Budidaya Indonesia Jakarta: Departemen Kelautan dan Perikanan, Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya.
- Sutanto, Y.D.R. (2010) Penyakit IMNV (Mio) di Indonesia dan antisipasinya. Aquatic Health Center. PT.CPP., Workshop MAI, Lampung, 20 Januari 2010.
- Senapin, S., Phewsaiya, K., Briggs, M. and Flegel, T. (2007) Outbreaks of *infectious myonecrosis virus* (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture* 266: 32–38.
- OIE., 2009. *Infectious myonecrosis (IMNV)*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals chapter 2.2.3. Paris, France.
- OIE., 2010. *Infectious myonecrosis (IMNV)*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals chapter 2.2.3. Paris, France.
- Puthawibool, T., Senapin, S., Kiatpathomchaia, W. and Flegel, T. (2009) Detection of shrimp infectious myonecrosis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J. Virol. Methods* 156: 27–31.
- Zakiah Widowati *et al.* Pengembangan dan Aplikasi *Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification*.