



2023 LAPORAN PEMBUATAN BAHAN ACUAN TAURA *SYNDROME VIRUS (TSV)*

LEMBAR PENGESAHAN

**JUDUL : Pembuatan Bahan Acuan Pengujian Molekuler RT-
cPCR dan RT- qPCR Taura Syndrome Virus (TSV)**

Plt Kepala,



Ade Noor Kusumahati

Daftar susunan tim pelaksana pembuatan **Plasmid Taura Syndrome Virus (TSV)** untuk **Pengujian TSV pada Udang Menggunakan Metode cRT-PCR dan qRT-PCR** pada laboratorium molekuler tahun anggaran 2023:

Pengarah : Ade Noor Kusumahati

Penanggung Jawab : Zakiyah Widowati

Ketua : Dita Rustianti

Anggota : Firma

Tina Yunia Asri

Yuli Nurindah

Dini Fajriyani

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah Subhanahu wata'la atas rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua. Dalam rangka menerapkan metoda standar yang mengacu pada SNI 17025 dimana dalam melakukan pengujian laboratorium harus menyertakan standar atau bahan acuan sebagai salah satu pemenuhan syarat untuk jaminan mutu (*quality assurance*), tim pembuatan koleksi BUSKIPM menyusun laporan pembuatan koleksi standar Plasmid *Taura Syndrome Virus (TSV)* untuk Pengujian TSV pada Udang Menggunakan Metode cRT-PCR dan qRT-PCR tahun anggaran 2023. Salah satu tugas dan fungsi Balai Uji Standar KIPM berupa perancangan metoda standar pengujian karantina ikan, pengendalian mutu dan keamanan hasil perikanan maka koleksi standar atau bahan acuan positif ini sangat dibutuhkan bagi seluruh laboratorium penguji di lingkup BKIPM.

Hasil kegiatan pembuatan koleksi standar ini diharapkan dapat berguna bagi kita semua, sehingga kami mampu menyumbangkan suatu keberhasilan yang membanggakan bagi institusi BKIPM pada khususnya dan Kementerian Kelautan dan Perikanan pada umumnya. Besar harapan kami hasil kegiatan ini bermanfaat bagi kita semua, dan apabila dalam pelaksanaannya masih terdapat kekurangan kritik dan saran kami butuhkan untuk perbaikan kegiatan selanjutnya.

Jakarta, Desember 2023
Plt Kepala,

Ade Noor Kusumahati



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI.....	ii
DAFTAR GAMBAR	iii
DAFTAR TABEL.....	iii
1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan.....	2
2 TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 Penyakit Taura Syndrome Virus (TSV).....	3
2.2 Taura Syndrome Virus.....	3
2.3 Metode Standar Deteksi TSV	5
2.4 Persyaratan Koleksi Standar sebagai Bahan Acuan	5
2.4.1 Karakterisasi Koleksi Standar sebagai Bahan Acuan	6
2.4.2 Homogenitas Koleksi Standar sebagai Bahan Acuan.....	6
2.4.3 Sensitifitas Pengujian Terhadap Koleksi Standar sebagai Bahan Acuan	7
2.4.4 Stabilitas Koleksi Standar sebagai Bahan Acuan	7
3 METODOLOGI	8
3.1 Waktu dan Tempat	8
3.2 Sumber Koleksi Standar	8
3.3 Peralatan.....	8
3.4 Metode	9
3.4.1 Preparasi Koleksi Standar	9
3.4.2 Perbanyakkan Koleksi Standar Menggunakan cRT-PCR	10
3.4.3 Purifikasi Produk PCR	11
3.4.4 Distribusi Koleksi Standar pada Tabung Mikro.....	12
3.4.5 Karakterisasi parsial fragmen cDNA gen coat protein atau RNA2 TSV	12
3.4.6 Uji Homogenitas	13
3.4.7 Uji Stabilitas.....	14
3.4.8 Uji Sensitifitas untuk Menentukan Nilai LoD dari Berbagai Metode PCR terhadap Koleksi Standar.....	15
4 HASIL DAN PEMBAHASAN	16
4.1 Rekontruksi Fragmen TSV Untuk Kloning.....	16

4.2 Kloning TSV Untuk Bahan Acuan PCR dan <i>Time</i> PCR.....	18
4.3 Karakterisasi Referens Material	19
4.3.1 PCR Konvensional	19
4.3.2 q PCR	20
4.3.3 Sekuensing	21
4.3.4 Konsentrasi dan Kemurnian DNA.....	22
4.3.5 Uji Homogenitas.....	22
4.3.6 Uji Stabilitas Jangka Pendek (<i>Short Tern Stability</i> = STS).....	24
4.3.7 Uji Stabilitas Jangka Panjang (<i>Long Tern Stability</i> = LST).....	25
5 KESIMPULAN DAN SARAN	27
5.1 Kesimpulan.....	27
5.2 Saran.....	27
Daftar Pustaka	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Gejala Klinis Infeksi TSV	4
Gambar 2 Udang Yang Bertahan Hidup Dengan Kondisi Melanisasi	5
Gambar 3 Insert Fragment TSV Pada Vector.....	9
Gambar 4 Bagan Pengujian Homogenitas.....	13
Gambar 5 Hasil Uji Fragmen TSV Yang Akan di Kloning	16
Gambar 6 Hasil Uji TSV PCR Konvensional	17
Gambar 7 Hasil Uji TSV PCR Konvensional (OIE)	17
Gambar 8 Perbanyakan Plasmid TSV Untuk Bahan Acuan Pengujian PCR dan <i>Real Time</i> PCR	18
Gambar 9 Hasil Perbanyakan Plasmid TSV Pada Media Luria Bertani Agar.....	18
Gambar 10 Hasil Pengujian Referens Material TSV Menggunakan Dua Pasang Primer.....	20
Gambar 11 Hasil Real Time PCR Pengujian Kontrol Positif TSV	21
Gambar 12 Hasil Uji Homogenitas Plasmid TSV Dengan PCR, Positif di 341 Bp.....	23
Gambar 13 Hasil Uji Homogenitas Plasmid TSV Dengan Real Time PCR	24
Gambar 14 Hasil Elektroforesis Uji STS TSV Menggunakan PCR Konvensional	25
Gambar 15 Hasil Elektroforesis Uji LTS TSV Menggunakan PCR Konvensional Dengan 2 Pasang Primer Berbeda.....	26

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Primer RT-PCR	8
Tabel 2 Protocol PCR Product Cloning	10
Tabel 3 Nilai Hasil Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi Kontrol Positif TSV	22
Tabel 4 Hasil Pengukuran Konsentrasi TSV Untuk Uji Homogenitas	24
Tabel 5 Ringkasan Statistik Uji ANOVA Faktor Tunggal.....	24

1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang adalah komoditas perikanan andalan Indonesia yang menjadi komoditas ekspor, salah satu jenis yang paling dominan untuk di ekspor adalah udang vaname *Taura Syndrome* merupakan salah satu jenis penyakit viral pada udang yang disebabkan oleh infeksi *Taura Syndrome Virus* (TSV). *Taura syndrome virus* merupakan virus RNA yang menginfeksi udang vaname (*Penaeus vannamei*), *P. stylirostris*. Jenis udang lainnya yang rentan terhadap infeksi TSV adalah *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. monodon*, *P. chinensis*, *P. japonicus*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. indicus* dan *Metapenaeus ensis* (OIE, 2012).

Penyakit *Taura Syndrome* disebabkan oleh virus dari genus *Cricket parálalysis like virus*, famili Picornaviridae. Virus TS mempunyai bentuk *icosahedral*, dengan diameter 31-32 nm partikel, tidak mempunyai *envelop*, terdiri dari capsid protein yang mengandung 3 rangkaian polipeptida mayor yaitu 24, 40, 55 kDa dan satu rangkaian polipeptida minor yaitu 58 kDa. Virus TS ini mempunyai sifat fisik dan kimiawi sebagai berikut: *genome* berisi rangkaian tunggal (+) ss *ribonucleiic acid* (RNA) dengan polyadenylated 3' yang diperkirakan panjangnya 9 kb, dengan koefisien sedimentasi 140 – 165 S dan mempunyai *buoyant density* dalam CsCl 1.33 -1.45 g/ml (Walker, 2000 dan OIE, 2003). Virus ini juga mempunyai sifat stabil terhadap deterjen, bersifat variabel terhadap pH (Flegel, 2000). *Taura Syndrome Virus* merupakan RNA virus yaitu virus yang menggunakan RNA sebagai materi genetik untuk menyimpan informasi genetik pada organisme hidup atau virus yang materi genetiknya melalui tahap RNA *intermediate* selama proses replikasi. Semua virus RNA memiliki kemampuan bermutasi yang sangat tinggi bila dibanding dengan virus DNA (OIE, 2012). Salah satu metoda pemeriksaan TSV adalah dengan metoda *quantitative reverse transcription real time PCR* (RT-qPCR). Prinsip pengujian berbasis biologi molekuler ini adalah dengan melacak keberadaan DNA patogen pada jaringan udang. Metoda real time PCR memiliki kelebihan sentifitas yang tinggi dan waktu uji yang lebih cepat dibandingkan metoda PCR konvensional.

Sesuai tugas dan pokok fungsi Balai Uji Standar Karantina Ikan, Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BUSKIPM) adalah menjamin tidak tersebarnya TSV terhadap udang yang masuk dan keluar wilayah Indonesia, serta antar daerah dalam wilayah Indonesia. Untuk itu, diperlukan metode uji yang handal, cepat dan akurat dalam mendeteksi adanya virus TSV. Salah satu metode deteksi virus pada ikan yang direkomendasikan untuk uji screening maupun konfirmasi adalah pengujian berbasis biologi molekuler dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Namun dalam pengujian PCR diperlukan standar positif (koleksi standar) sebagai jaminan mutu (*quality assurance*) pengujian tersebut.

Koleksi standar atau bahan acuan merupakan bahan atau zat yang telah diuji karakter dan konsentrasinya melalui suatu proses yang dilakukan secara akurat. Menurut ISO Guide 35, bahan acuan (*reference material*) adalah bahan yang homogen dan stabil dalam satu atau lebih properti atau sifat yang spesifik, dan dibuat agar sesuai untuk penggunaan khusus dalam proses pengujian atau pengukuran. Properti bisa kuantitatif maupun kualitatif (seperti identitas dari sebuah bahan atau spesies). Penggunaan bahan acuan dapat meliputi kalibrasi dari sistem pengujian, penilaian dari prosedur pengujian, nilai pembanding terhadap bahan lain, dan kontrol kualitas. Persyaratan bahan untuk dijadikan koleksi standar atau bahan acuan adalah tertelusur, terkarakterisasi, terukur secara gravimetrik tertelusur ke dalam Satuan Internasional (SI), stabil dan homogen. Ketelusuran koleksi standar DNA suatu spesies dapat dilihat dari isolat (inang, matrik, asal, waktu, tipe molekuler dan daerah sekuen). Karakterisasi koleksi standar molekuler dilakukan dengan memverifikasi atau mengkonfirmasi daerah sekuen DNA menggunakan *Sanger sequencing*. Konsentrasi DNA (kopi per μL) dihitung menggunakan spektrofotometer.

Kesulitan dalam menyediakan koleksi standar dalam kegiatan pengujian virus dengan kultur sel mendorong dilakukannya pembuatan standar positif berupa pembuatan potongan fragmen cDNA virus target maupun pembuatan cDNA rekombinan dengan teknik kloning fragmen gen virus target. Kloning gen ini merupakan kumpulan sekuen (urutan) DNA organisme yang akan diklon dalam vektor tertentu untuk memudahkan pemurnian, penyimpanan dan analisisnya. Koleksi standar DNAny. TSV pada kegiatan ini berupa fragmen cDNA daerah coat protein atau RNA2 dari TSV. Fragmen cDNA coat protein atau RNA2 TSV digunakan sebagai koleksi standar untuk pengujian *reverse transcriptase polymerase chain reaction konvensional* (cRT-PCR) maupun *real time reverse transcriptase polymerase chain reaction* (qRT-PCR).

1.2 Tujuan

Tujuan kegiatan pembuatan koleksi standar plasmid *Taura Syndrome Virus* (TSV) untuk pengujian TSV pada udang untuk digunakan sebagai kontrol positif standar pada pengujian TSV menggunakan metode cRT-PCR dan qRT-PCR.

2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit *Taura Syndrome Virus* (TSV)

Infeksi TSV pertama kali masuk ke China Taipei pada tahun 1999 melalui udang vaname (*P.vannamei*) yang diimpor dari Amerika tengah dan Amerika selatan (Tu et al., 1999; Yu & Song, 2000). Sejak adanya importasi udang, penyebaran virus berbarengan dengan adanya penyebaran induk dan PL di China, Thailand dan Indonesia hingga menyebabkan masalah epizootic dengan tingginya mortalitas pada budidaya udang *P.indicus* di Saudi Arabia (Wertheim et al., 2009).

Taura Syndrome (TS), atau penyakit ekor merah bisa menginfeksi udang putih (*Penaeus vannamei*). Pada tahun 1994 terjadi wabah penyakit serius yang menyerang udang dan mengalami kematian sampai lebih dari 95 % pada daerah budidaya Kahuku, Hawai. Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang telah terinfeksi TSV dapat mengalami kematian 80-85% sehingga dapat menimbulkan kerugian dalam pembudidayaannya. Kerusakan (luka) yang disebabkan oleh virus tersebut dapat terlihat dari warna tubuh yang menjadi kemerahan, terutama pada ekor udang yang mati. Bercak hitam (melanisasi) yang tidak beraturan di bawah lapisan kutikula akan tampak pada udang yang masih bertahan hidup tetapi udang ini kemudian menjadi pembawa (*carrier*) virus tersebut (Rufiati, 2008).

2.2 *Taura Syndrome Virus*

Penyakit *Taura Syndrome* disebabkan oleh virus dari genus Cricket paralysis like virus, famili Picornaviridae atau Nodaviridae. Virus TS mempunyai bentuk icosahendral, dengan diameter 31-32 nm partikel, tidak mempunyai envelop, terdiri dari capsid protein yang mengandung 3 rangkaian polipeptida mayor yaitu 24, 40, 55 kDa dan satu rangkaian polipeptida minor yaitu 58 kDa. Virus TS ini mempunyai sifat fisik dan kimiawi sebagai berikut : genome berisi rangkaian tunggal (+) ss ribonucleic acid (RNA) dengan polyadenylated 3' yang diperkirakan panjangnya 9 kb, dengan koefisien sedimentasi 140 - 165 S dan mempunyai buoyant density dalam CsCl 1.33 - 1.45 g/ml (Walker, 2000 dan OIE, 2003). Virus ini juga mempunyai sifat stabil terhadap deterjen, bersifat variabel terhadap pH (Flegel, 2000). *Taura Syndrome Virus* merupakan RNA virus yaitu virus yang menggunakan RNA sebagai materi genetiknya melalui tahap RNA intermediate selama proses replikasi. Semua virus RNA memiliki kemampuan bermutasi yang sangat tinggi bila dibanding dengan virus DNA (OIE, 2003).

Infeksi *Taura syndrome Virus* parakut dan akut menyebabkan lemah, karapas lembek, lambung kosong dan nampak ekspansi kromatofor merah keseluruh badan dan pada bagian

anggota badan, khususnya urufod, telson dan pleopod nampak lebih merah. Kematian udang terjadi pada saat molting. Pada fase kronis atau masa penyembuhan selalu ditemukan lesi hitam (melamin) di daerah kutikula, multifokal dan berbentuk tidak teratur, berbintik-bintik.

Virus Taura Syndrorme (TS) umumnya menyebabkan kematin pada fase juvenile dengan ukuran 0,5 - 5 gram, atau selama masa pemeliharaan 2 sampai 4 minggu didalam kolam pembesaran. Ada tiga fase karateristik perkembangan penyakit TS yaitu 1) fase akut: kematian banyak terjadi, 2) fase transisi singkat, 3) fase kronis atau carries. Pada fase akut efitel kutikula terinfeksi berat. Pada fase kronis organ limpoid menjadi target utama dari infeksi berat. Pada fase kronis organ limpoid menjadi target utama dari infeksi. Udang yang terinfeksi TSV akan tampak sakit pada bagian epidermis dari kutikula atau eksoskeleton udang. Udang akan terlihat melayang pada dasar dan mati.

Beberapa gejala yang dapat digunakan sebagai indikator kemungkinan adanya infeksi TSV, antara lain :

- a. Pada infeksi berat (akut) sering mengakibatkan kematian massal, udang yang mengalami kematian didominasi oleh udang yang sedang/baru selesai proses pergantian kulit (*moulting*), saluran pencernaan kosong dan warna tubuh kemerahan. Warna merah yang lebih tegas dapat dilihat pada ekor kipas (*te/son*) seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Gejala klinis infeksi TSV

- b. Udang yang selamat dari fase akut, umurnnya mampu hidup dan tumbuh normal dengan tanda bercak hitam (melanisasi) yang tidak beraturan di bawah lapisan kutikula seperti terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Udang yang bertahan hidup dengan kondisi melanisasi

Penyakit TS mempunyai tingkat virulensi tinggi, tetapi akumulasi tingkat kematiannya dapat bervariasi mulai dari 5 sampai lebih dari 95 %, gejala mulai nampak pada saat periode pergantian kulit, (molting).

2.3 Metode Standar Deteksi TSV

Pengujian dengan PCR konvensional umumnya menggunakan primer 9992 F dan 9195R yang mengamplifikasi fragmen sepanjang 231bp (Nunan et al., 1998). Sampel jaringan (haemolymph, pleopod, dan seluruh jaringan stadia benih) dapat digunakan sebagai sampel uji TSV dengan reverse transcription PCR (RT-PCR). Pelacakan fragmen TSV terletak pada wilayah intergenic dan ORF2. Primer 9992 F terletak pada akhir 3' wilayah intergenic dan primer 9195R terletak pada wilayah ORF2 yang terletak didalam gen VP2 (=CP1) (Mari et al., 2002; Nunan et al., 1998). Desain primer terbaru yaitu (7171F dan 7511R) telah dikembangkan untuk meningkatkan sensitifitas deteksi TSV (Navarro et al., 2009). Primer ini menggantikan primer 9992F/9195R dimana pelacakan primer tersebut masih didalam ORF2.

Metoda *real time* RT-PCR telah dikembangkan untuk mendeteksi TSV. Metoda ini lebih memberikan keuntungan dari sisi sensitifitas dan spesifisitas. Sensitifitas *real time* RT-PCR hingga 100 copy dalam melacak sekuen genom TSV (Dhar et al., 2002; Tang et al., 2004). Metoda *real time* RT-PCR menggunakan hydrolysis probe (TaqMan probe™) sesuai dengan yang direkomendasikan Tang et al, (2004).

2.4 Persyaratan Koleksi Standar sebagai Bahan Acuan

Validitas data pengujian suatu metode dapat dipenuhi dengan salah satu persyaratan oleh laboratorium yaitu dengan merencanakan serta menerapkan jaminan mutu hasil pengujian. Jaminan mutu merupakan bagian dari manajemen mutu yang difokuskan pada pemberian keyakinan bahwa persyaratan mutu akan dipenuhi. Secara teknis jaminan mutu

pengujian dapat diartikan sebagai keseluruhan kegiatan yang sistematis dan terencana yang diterapkan dalam pengujian, sehingga memberikan keyakinan yang memadai bahwa data yang dihasilkan memenuhi persyaratan mutu sehingga dapat diterima oleh pengguna. Salah satu syarat untuk menjamin mutu hasil pengujian adalah dengan penggunaan kontrol positif atau bahan acuan molekuler pada setiap pengujiannya. Penggunaan kontrol positif atau bahan acuan molekuler bertujuan untuk mendapatkan keakurasian data hasil pengujian.

2.4.1 Karakterisasi Koleksi Standar sebagai Bahan Acuan

Kontrol positif atau bahan acuan merupakan bahan atau zat yang telah diuji karakter dan konsentrasinya melalui suatu proses yang dilakukan secara akurat. Menurut ISO Guide 35, bahan acuan (*reference material*) adalah bahan yang homogen dan stabil dalam satu atau lebih properti atau sifat yang spesifik, dan dibuat agar sesuai untuk penggunaan khusus dalam proses pengujian atau pengukuran. Properti bisa kuantitatif maupun kualitatif (seperti identitas dari sebuah bahan atau spesies). Penggunaan bahan acuan dapat meliputi kalibrasi dari sistem pengujian, penilaian dari prosedur pengujian, nilai pembandingan terhadap bahan lain, dan kontrol kualitas. Persyaratan bahan untuk dijadikan kontrol positif atau bahan acuan adalah tertelusur, terkarakterisasi, terukur secara gravimetrik tertelusur ke dalam Satuan Internasional (SI), stabil dan homogen. Ketelusuran kontrol positif DNA suatu spesies dapat dilihat dari isolat (inang, matrik, asal, waktu, tipe molekuler dan daerah sekuen). Karakterisasi kontrol positif molekuler dilakukan dengan memverifikasi atau mengkonfirmasi daerah sekuen DNA menggunakan *Sanger sequencing*. Konsentrasi DNA (kopi per μL) dihitung menggunakan spektrofotometer.

2.4.2 Homogenitas Koleksi Standar sebagai Bahan Acuan

Pengujian homogenitas diperlukan dalam proyek sertifikasi *batch* untuk menunjukkan bahwa setiap botol atau tabung (unit) dari sebuah *batch* adalah benar homogen. Aspek jaminan mutu (*quality assurance*) salah satunya ditentukan dari pentingnya menentukan variasi diantara botol atau tabung, dimana komponen ketidakpastian (*uncertainty*) harus disertakan dalam estimasi ketidakpastian nilai yang dimiliki oleh bahan acuan standar. Bahkan ketika bahan tersebut diharapkan homogen, seperti dalam kasus larutan, penilaian ketidakhomogenan diantara botol dibutuhkan. Apabila berhadapan dengan bahan acuan yang berbentuk padatan, seperti lumpur, pengujian homogenitas dalam botol diperlukan untuk menentukan asupan sampel minimum. Pada prinsipnya, pengujian homogenitas dapat menurunkan pertanyaan mengenai nilai properti yang dimiliki bahan acuan. Suatu bahan dikatakan homogen apabila perbedaan diantara satu unit (tabung) dengan unit yang lain dapat diabaikan ketika dibandingkan terhadap pengulangan metode.

2.4.3 Sensitifitas Pengujian Terhadap Koleksi Standar sebagai Bahan Acuan

Nilai sensitifitas (LoD) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi oleh metode uji yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko atau kontrol negatif. Sensitifitas merupakan parameter uji batas. Sensitifitas merupakan salah satu parameter pada pembuatan koleksi standar parsial fragmen cDNA TSV dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit yang masih dapat dibaca sebagai nilai positif.

2.4.4 Stabilitas Koleksi Standar sebagai Bahan Acuan

Pengujian stabilitas bertujuan untuk menentukan derajat ketidakstabilan yang tersisa dari kandidat kontrol positif atau bahan acuan setelah preparasi, atau untuk mengkonfirmasi stabilitas dari bahan acuan. Walaupun bahan acuan yang “stabil” dapat menunjukkan ketidakstabilan terhadap satu atau lebih nilai properti. Pengujian stabilitas dilakukan terhadap dua kondisi – kondisi penyimpanan (*long-term stability*), dan – kondisi transportasi (*transport conditions*).

3 METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat

Pembuatan koleksi standar dilaksanakan pada bulan September - Oktober Tahun 2023 di BUSKIPM.

3.2 Sumber Koleksi Standar

Organisme : *Taura Syndrome Virus (TSV)*
 Taksonomi : Virus; virus ssRNA; virus untai-positif ssRNA;
 tidak terdapat tahapan DNA; famili Picornaviridae atau Nodaviridae
 Tipe molekuler : Fragmen cDNA

Tabel 1. Primer RT-PCR :

• TSV 9195F	5'- TCAATGAGAGCTTGGTCC -3'	231bp	(Nunan et al., 1998).
• TSV 9992R	5'- AAGTAGACAGCCGCGCTT -3'		
• TSV 7171F	5'-CGACAGTTGGACATCTAGTG-3'	341bp	(Navarro et al., 2009).
• TSV 7511R	5'-GAGCTTCAGACTGCAACTTC-3'		

Primer Realtime RT- PCR

• TSV1004F	TTG-GGC-ACC-AAA-CGA-CAT-T	71	Tang et al., 2004
• TSV1075R	GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT	bp	
• TSV P1 probe	FAM- CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-TAMRA		

3.3 Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam pelaksanaan pembuatan koleksi standar Plasmid TSV adalah freezer -20°C dan -80°C, laminar air flow, microcentrifuge, mikropipet, mikrotube ukuran 0,2 ml dan 1,5 ml, pellet pestle, pinset dan gunting steril, rak blok es, satu set mesin PCR, mikro spindown. Tabung mikro (berukuran 200 µl, 500 µl, 1.5 ml), micro tips (berukuran 10 µl, 200 µl, 1000 µl), micro pippet (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl), tabung reaksi, plastik seal, gunting, pinset, label, laminar air flow, jarum ose, *microcentrifuge*, *vortex*, *incubator shaker*, tabung reaksi, PCR chamber, mesin PCR (mesin amplifikasi), alat elektroforesis, UV doc, genequant, microwave, refrigerator.

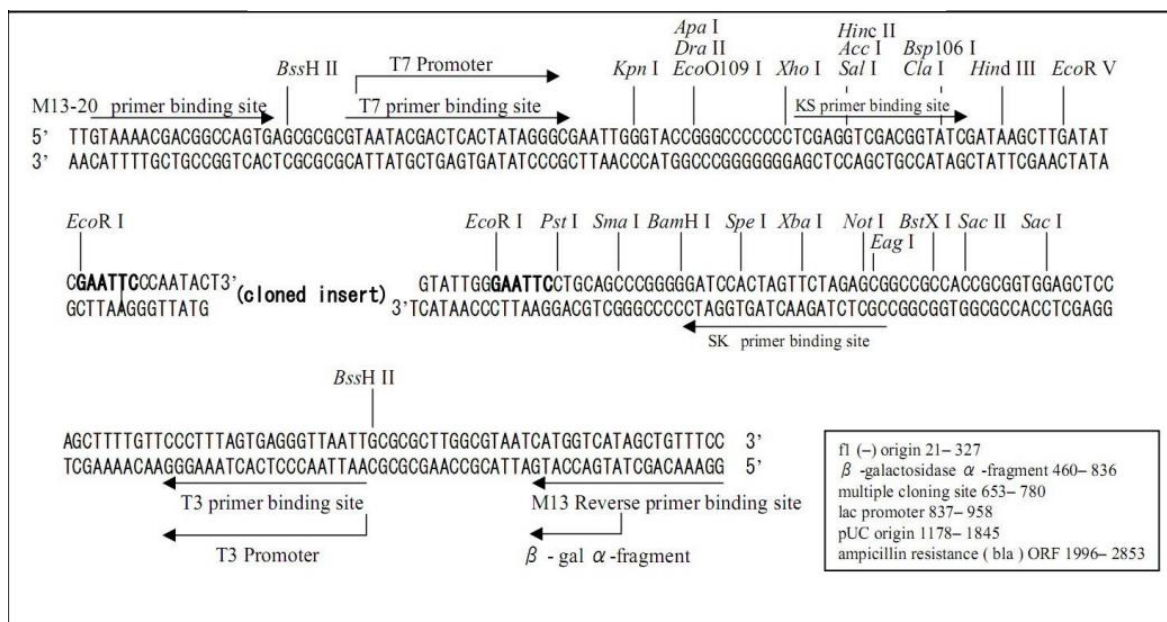
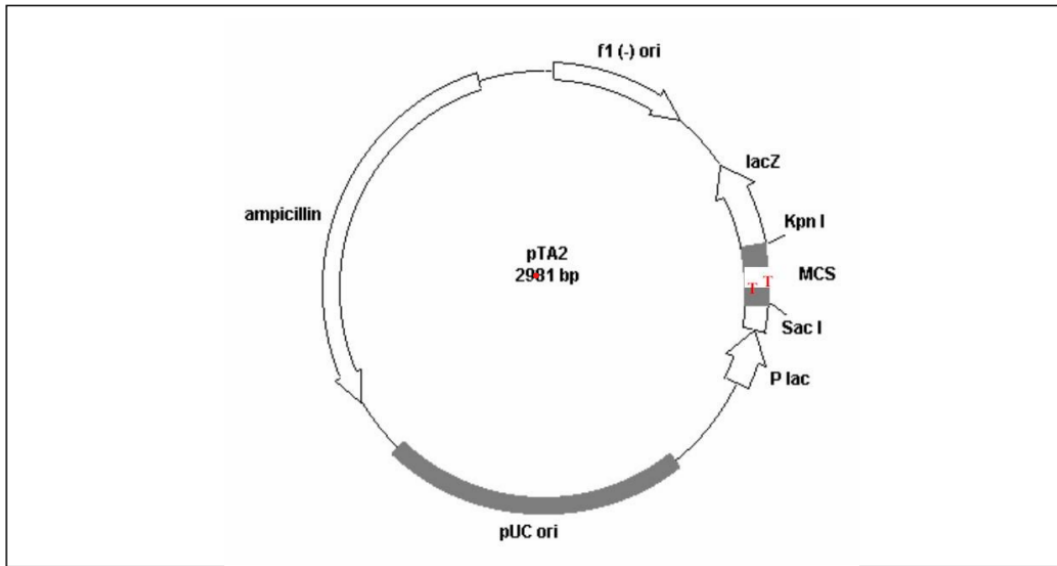
3.4 Metode

3.4.1 Preparasi Koleksi Standar

Sumber material dari koleksi standar Plasmid TSV berasal oligo sintesa yang dikloning

Kloning Plasmid Taura Syndrome Virus untuk bahan acuan pengujian PCR

Guidelines to Obtain Insert Sequence



Gambar 3. Insert fragment TSV pada Vector

Kloning produk PCR dilakukan dengan dengan proses ligasi dan transformasi atau menyisipkan ampikon TSV pada vektor dengan prosedur kerja sebagai berikut (tabel 2) :

Tabel 2. Protocol PCR Product Cloning

PROTOCOL PCR PRODUCT CLONING

PURIFICATION

PCR Product Purification using ZymoClean Gel DNA Recovery Kit Catalog No. **D4001**

LIGATION

Ligation Reaction using **TOYOBO Target Clone™** Catalog No. **TAK 201**.

Master Mix :

Komponen	10 µl rxn ¹
dd H ₂ O	0
2X ligation Buffer	5.0
pTA2 Vector (50 ng/µl)	1.0
PCR Product	3.0
T4 DNA ligase	1.0

TRANSFORMATION

Transformation to DH10B Competent Cells (Thermo Scientific, EC0113). Transformation Kit Catalog No. **EC0113**.

PCR COLONY

PCR Amplification using **(2X) MyTaq HS Red Mix** Catalog No. **Bioline, BIO-25048**

PCR Master Mix:

Komponen	10 (µl) x 8
dd H ₂ O	4.2
My Taq HS Red Mix (2X)	5
10 µM T3 Primer*	0.4
10 µM T7 Promoter Primer**	0.4

3.4.2 Perbanyak Koleksi Standar Menggunakan cRT - PCR

Kegiatan pembuatan koleksi standar Plasmid TSV untuk pengujian baik menggunakan cRT-PCR Pengujian dengan PCR konvensional umumnya menggunakan primer 9992 F dan 9195R yang mengamplifikasi fragmen sepanjang 231bp (Nunan et al., 1998), dan 7171F dan 7511R yang mengamplifikasi fragmen sepanjang 341bp (Navarro et al., 2009), dan Metoda real time RT-PCR menggunakan hydrolysis probe (TaqMan probe™) sesuai dengan yang direkomendasikan Tang *et al*, 2004

3.4.2.1 Amplifikasi PCR Konvensional (cPCR)

Pada proses amplifikasi PCR primer TSV, total volume reaksi dalam tabung mikro adalah sebanyak 25 µl yang berisi 12 µl Go Tag green, 1 µl primer F, 1 µl primer R, 3 µl DNA target, 0,25 RT enzym dan nucleus free water 7 µl. Siklus amplifikasi di mesin thermal cycler adalah 34 siklus. Proses RT PCR pada suhu 48°C selama 30 menit, pra denaturasi 2 menit pada suhu 94°C; denaturasi yang terdiri atas 45 detik pada suhu 94°C; Annealing 45 detik pada suhu 60°C dan ekstensi 7 menit pada suhu

60°C dan diikuti oleh ekstensi terakhir selama 1 menit pada suhu 4°C. Produk yang telah diamplifikasi dianalisa dengan gel elektroforesis dalam 1,5% gel agarose dengan pewarna SYBR Safe untuk mengetahui ukuran dan kemurniannya. Positif TSV primer 9992 F dan 9195R akan memunculkan pita DNA tunggal dengan ukuran **231 bp**, dan primer 7171F dan 7511R akan memunculkan pita DNA tunggal dengan ukuran **341 bp**

3.4.2.2 Real time PCR (qPCR)

Pada proses ini amplifikasi sekaligus deteksi secara bersamaan dalam satu mesin yang dapat dilihat langsung secara real atau sering disebut realtime PCR (qPCR) karna adanya penanda (probe) primer TSV, total volume reaksi dalam tabung mikro adalah sebanyak 25 µl yang berisi 12,5 µl mastermix PCR probe, 0.5 µl primer F, 0.5 µl primer R, 0.5 µM probe, 0.25 µl RT enzym dan 3 µl DNA target, dan nucleus free water 9 µl. Siklus amplifikasi di mesin realtime (Rotorgene) adalah 40 siklus. RT PCR 50°C selama 30 menit, pra denaturasi 15 menit pada suhu 95°C; denaturasi yang terdiri atas 15 detik pada suhu 94°C; Annealing/Extension 1 menit pada suhu 60°C. Analisa hasil realtime setelah proses selesai.

3.4.3 Purifikasi plasmid

Plasmid yang telah ditumbuhkan dalam media luria bertani broth kemudian dipurifikasi menggunakan QIAprep® Spin Miniprep Kit sesuai dengan instruksi pabrik. Purifikasi bertujuan mendapatkan plasmid TSV yang langsung dapat digunakan dalam proses amplifikasi PCR. Catatan: sebelum dilakukan purifikasi, Buffer PE ditambahkan dengan etanol (96 – 100%) sebelum digunakan (volume dapat dilihat pada label dari botol); semua langkah sentrifugasi dilakukan pada 17,900 x g (13.000 rpm) dalam mikrosentrifugasi. Pellet bakteri yang telah diinkubasi selama ±18 jam disentrifugasi selama 3 menit pada 8000rpm. Larutkan pellet dalam Buffer P1 sebanyak 250 µl dan pindahkan ke tabung mikro. Tambahkan 250 µl Buffer P2 dan campur dengan rata membulak balik tabung sebanyak 4-6 kali hingga larutan menjadi bening (lakukan prose ini kurang dari 5 menit). Tambahkan buffer N3 sebanyak 350 µl kemudian campur kembali sebanyak 4-6 kali, kemudian sentrifugasi selama 10 menit pada 13.000 rpm. Pindahkan supernatan sebanyak 800 µl ke dalam spin column dengan menggunakan pipet kemudian sentrifugasi selama 30-60 detik lalu buang cairan pada tabung bawah spin column tersebut. Kemudian cuci dengan menambahkan 500 µl Buffer PB dan sentrifugasi kembali selama 30-60 detik, buang kembali cairan pada tabung bawah spin column. Lakukan pencucian kembali dengan menambahkan Buffer PE sebanyak 750 µl lalu sentrifugasi selama 30-60 detik, buang tabung bawah pada spin column kemudian ganti menggunakan tabung

mikro ukuran 1,5 ml. Tambahkan buffer EB sebanyak 50 µl untuk melarutkan DNA pada spin column kemudian diamkan selama 1 menit lalu disentrifugasi selama 1 menit. Plasmid TSV dapat disimpan pada Frizzer -80 agar lebih tahan dan stabil sebelum di gunakan.

3.4.4 Distribusi Koleksi Standar pada Tabung Mikro

Semua hasil purifikasi Plasmid dicampur dan divorteks selama 5 menit sampai homogen dalam sebuah tabung mikrosentrifugasi 2 ml. Kemudian larutan DNA tersebut didistribusikan pada tabung mikro 0.5 ml bertutup ulir dengan volume 100 µl setiap tabung. Kemudian larutan koleksi standar parsial fragmen Plasmid TSV yang telah terdistribusi dilakukan pengujian karakterisasi DNA (menggunakan pengujian primer yaitu PCR dan dikonfirmasi dengan sekuensing), homogenitas dan stabilitas.

3.4.5 Karakterisasi Plasmid TSV

3.4.5.1 Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian Fragmen cDNA

Kemurnian dan kuantitas parsial fragmen cDNA gen coat protein atau RNA2 TSVV diukur menggunakan RNA/DNA nano spektrofotometer (Implent/Gemany) sesuai manual alat dengan lid factor 10. Konsentrasi (ng/µl) koleksi standar yang telah diukur menggunakan nano spektrofotomer dikonversi ke dalam kopi DNA menggunakan rumus di bawah ini:

$$\text{Massa produk} = \frac{(\text{panjang bp produk} \times \text{masa rata-rata nukleotida})}{\text{Bilangan Avogadro}}$$

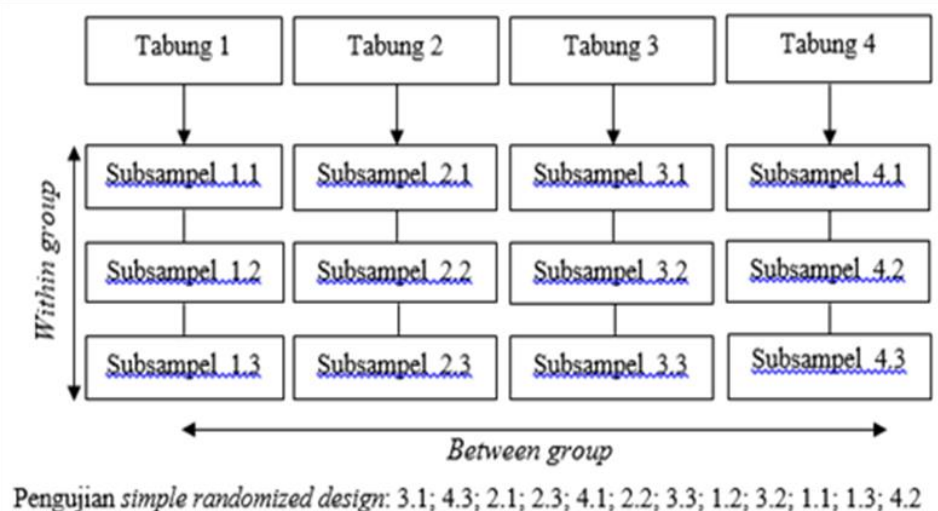
$$\text{Kopi DNA} = \frac{(1 \text{ kopi} \times \text{konsentrasi DNA})}{\text{Masa produk}}$$

3.4.5.2 Sekuensing Fragmen cDNA

Hasil amplifikasi PCR kemudian dipurifikasi menggunakan metode presipitasi etanol. Hasil purifikasi selanjutnya disekuens dua arah menggunakan BigDye® Terminator Cycle Sequencing (Applied BioSystem), sesuai dengan instruksi pabrik. Kondisi *cycle sequencing* adalah sebagai berikut 96°C selama 10 detik, 50°C selama 5 detik and 60°C selama 4 menit untuk 25 siklus. Purifikasi produk cycle sequencing menggunakan presipitasi etanol/EDTA. Denaturasi dilakukan pada suhu 95°C selama 5 menit dengan menambahkan Hi-Di formamide 1:1 ke dalam produk purifikasi. *Capillary electrophoresis* dilakukan dengan mesin sequencer Applied Biosystems 3130 DNA Analyser. Data sekuensing yang diperoleh selanjutnya dianalisa menggunakan Bioedit dan dilanjutkan dengan BLAST GenBank NCBI.

3.4.6 Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk memastikan bahwa koleksi standar yang diproduksi mempunyai karakterisasi (konsentrasi dan identitas) yang sama pada setiap tabung yang diproduksi (inter) dan titik-titik yang berbeda dalam tabung yang sama (intra). Pengujian homogenitas dalam ISO Guide 35 yaitu dengan cara membuat pengujian replikasi (lebih dari duplikasi) jumlah yang sama pada setiap unit. ISO Guide 35 klausul 5.8 menyebutkan bahwa jumlah minimal unit yang dipilih secara acak adalah antara 10 - 30, tetapi umumnya tidak kurang dari 10. Catatan: apabila jumlah dalam satu batch kurang dari 50 unit, pengujian homogenitas harus menggunakan > 3 unit atau 10% dari jumlah unit dalam satu batch. Pengujian homogenitas dalam pembuatan koleksi standar Plasmid TSV dilakukan hanya pada 10 unit yang diambil secara acak, dengan 3 replikasi (Gambar 4). Pengujian homogenitas dilakukan secara simple randomized design, yaitu pengujian tunggal terhadap semua unit yang diamati dan diambil secara acak. Pengujian yang dilakukan berupa pengukuran DNA untuk memastikan homogenitas dari konsentrasi bahan acuan dan uji cRT-PCR dan qRT-PCR untuk mengetahui identitas bahan acuan. Variasi konsentrasi DNA antar tabung dan dalam tabung dinilai menggunakan ANOVA. Unit dikatakan homogen apabila Fhitung lebih kecil dari Fkritis. Rumus statistik untuk penilaian homogenitas dapat dilihat pada ISO Guide 35.



Gambar 4. Bagan pengujian homogenitas

3.4.7 Uji Stabilitas

Pengujian stabilitas diperlukan untuk mengetahui perilaku bahan dalam rentang waktu tertentu dan dengan adanya efek kondisi tertentu. 2 jenis uji stabilitas yang harus dipertimbangkan dalam pembuatan bahan acuan, yaitu uji kestabilan jangka pendek (*short*

term stability = STS) dan uji kestabilan jangka panjang (*long term stability* = LTS). Pengujian stabilitas baik untuk STS maupun LTS dilakukan dengan cara isochronous stability, yaitu semua pengujian stabilitas dilakukan dalam kondisi pengulangan secara bersamaan (sekali pengujian dengan satu kali kalibrasi) untuk meminimalkan nilai ketidakpastian. Variasi konsentrasi DNA dan ketidakstabilan bahan selama pengiriman dan penyimpanan dihitung menggunakan statistik regresi dan dinilai menggunakan ANOVA. Unit dikatakan stabil apabila $|b_1|$ (nilai mutlak slope hasil perhitungan regresi) lebih kecil dari tabel dikalikan dengan standar deviasi dari slope ($S(b_1)$). Rumus statistik untuk penilaian stabilitas dapat dilihat pada ISO Guide 35. Uji stabilitas dilakukan untuk melihat kestabilan dari bahan acuan yang diproduksi. Uji stabilitas meliputi pengujian stabilitas jangka pendek untuk mengetahui suhu penyimpanan yang optimal, dan uji stabilitas jangka panjang untuk melihat waktu hidup (*expired date*) dari bahan acuan yang disimpan pada suhu optimum.

3.4.7.1 Stabilitas Jangka Pendek (Penyimpanan)

Pengujian STS adalah pengujian kestabilan perilaku dari suatu bahan di bawah kondisi transportasi. Suhu -20°C ditentukan sebagai kondisi referensi dimana material sangat diyakini stabil. Suhu 25°C dipilih sebagai suhu ekstrim pengiriman yang akan diuji, dimana pada suhu tersebut diyakini bahan masih dalam keadaan stabil. Tiga titik waktu pengujian (0 minggu, 1 minggu dan 3 minggu) dipilih sebagai waktu pengiriman. Jumlah replikasi tiap pengujian adalah 2 unit/waktu. Enam unit bahan acuan atau koleksi standar diambil secara acak untuk pengujian STS. Dua unit disimpan dalam kondisi suhu -20°C , sisanya disimpan pada suhu 35°C . Setelah 1 minggu, 2 unit koleksi standar yang disimpan pada suhu 35°C dipindahkan pada suhu -30°C . Setelah jangka waktu 3 minggu, 2 unit koleksi standar yang tersisa pada suhu 25°C dipindahkan ke suhu -30°C . Dalam jangka waktu 1 minggu berikutnya, pengujian cRT-PCR dan qRT-PCR, kemudian pengukuran konsentrasi DNA dilakukan terhadap keenam unit koleksi standar yang telah disimpan pada suhu -30°C secara bersamaan (*isochronous stability*). Penilaian dilakukan menggunakan analisa statistik regresi.

3.4.7.2 Stabilitas Jangka Panjang

Pengujian LTS adalah pengujian kestabilan dari suatu bahan di bawah kondisi penyimpanan jangka panjang. Suhu -30°C ditentukan sebagai kondisi referensi dimana material sangat diyakini stabil. Suhu -10°C dipilih sebagai suhu ekstrim penyimpanan jangka panjang yang akan diuji, dimana pada suhu tersebut diyakini bahan masih dalam keadaan stabil. Empat titik waktu pengujian (0 bulan, 3 bulan, 6 bulan dan 1 tahun) dipilih sebagai waktu penyimpanan. Jumlah replikasi tiap pengujian adalah 2 unit/waktu. Delapan unit bahan acuan

atau koleksi standar diambil secara acak untuk pengujian LTS. Dua unit disimpan dalam kondisi suhu -30 °C, sisanya disimpan pada suhu -10 °C. Setelah 3 bulan, 2 unit koleksi standar yang disimpan pada suhu -10 °C dipindahkan pada suhu -30 °C. Setelah jangka waktu 6 bulan, 2 unit koleksi standar yang masih tersimpan pada suhu -10 °C dipindahkan ke suhu -30 °C. Setelah satu tahun, 2 unit koleksi standar yang tersisa pada suhu penyimpanan -10 °C dipindahkan pada suhu -30 °C. Dalam jangka waktu 1 minggu berikutnya, pengujian cRT-PCR dan qRT-PCR serta pengukuran konsentrasi DNA dilakukan terhadap kedelapan unit koleksi standar yang telah disimpan pada suhu -30 °C secara bersamaan (*isochronous stability*). Penilaian dilakukan menggunakan analisa statistik regresi. Nilai intersep yang didapat merupakan batas waktu hidup (*expired date*) dari bahan acuan.

3.4.8 Uji Sensitifitas untuk Menentukan Nilai LoD dari Berbagai Metode PCR terhadap Koleksi Standar

Sensitivitas analitik berbagai metode pengujian TSV dilakukan untuk mengetahui nilai limit deteksi (LoD) dari masing-masing metode berbasiskan RT-PCR terhadap koleksi standar berupa fragmen cDNA daerah coat protein atau RNA2 TSV yang diproduksi BUSKIPM. Protokol pengujian TSV dalam pengujian sensitifitas analitik yang digunakan antara lain adalah pengujian baik menggunakan cRT-PCR dengan menggunakan primer 9992 F dan 9195R yang mengamplifikasi fragmen sepanjang 231bp (Nunan et al., 1998) dan Metoda real time RT-PCR menggunakan hydrolysis probe (TaqMan probe™) sesuai dengan yang direkomendasikan Tang *et al*, 2004. Kedua metode tersebut merupakan metode yang direkomendasikan oleh OIE dalam menentukan keberadaan *coat protein* atau RNA2 dari virus TSV dalam pengujian TSV pada udang. Pengujian sensitifitas analitik dilakukan terhadap pengenceran bertingkat dari koleksi standar, dimulai dari pengenceran ke-empat sampai pengenceran ke-delapan.

4 Hasil dan Pembahasan

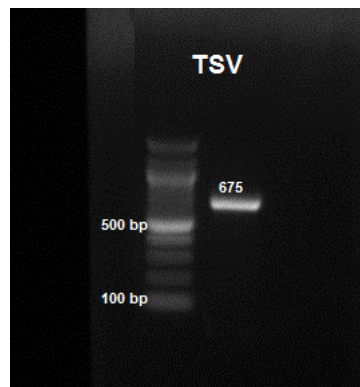
4.1. Rekontruksi fragmen TSV untuk kloning

Pembuatan fragmen TSV sebagai insert pada kegiatan kloning dalam pembuatan plasmid untuk kontrol positif pada pengujian TSV dengan metode PCR konvensional dan Realtime PCR. Adapun susunan basa fragmen TSV adalah sebanyak 675 bp dengan susunan sebagai berikut

```
TTGGGCACCAAACGACATTCCAGCACTGACGCACAATATTCGATCTTCACAGTGTGCCAGTTTAAGCT
CCCAAGTAGACAGCCGCGCTTGCCTGGTGGGACTTAATTAATGCCTGCTAACCAGTTGAAATTGATA
ATTTTGATACAACAACAGTGGAGGACTAATCCAGGAGGTAGCGTTACAAACAGTGAAGGTTCCACA
ATCTTGATGAATGATATCCAATCACTAATCAGAATGTAGTGCTGTCTAAGAATGTAACAGATAACCTGTT
TGAAGTCCAGGACCAAGCTCTCATTGAATCTCTCTCGCGACGTTTTACTTCATAACGACAGTTGGAC
ATCTAGTGATGATGAAATTGGCACAATATGACACAGGAACAGCTTGCAACAGAATTCAATCAGCCAC
ACTTATATGAAATTTCCCTACCCGATGATATTGTACGTAAATCACTGTTTATGTCTAATAAATTAGCGAATA
TTGCATATATGCGATGTGATTACGAGGTTACTGTACGAGTACAAGCCACGCCCTTTTACAAGGAGCAT
TGTGGCTGTGGAATAAGATGAATGCTAAGCAGACATCAATTATTCGACGCACTCTTACAGAACACCTAC
GCTCTATTACATCATTTCTGGCATTGAGATGAAGTTGCAGTCTGAAGCTCG
```

Total Panjang Fragmen DNA : 675 bp

Hasil dari uji pendahuluan pengujian PCR TSV yang akan digunakan sebagai insert pada kloning plasmid TSV dapat dilihat pada gambar dibawah ini



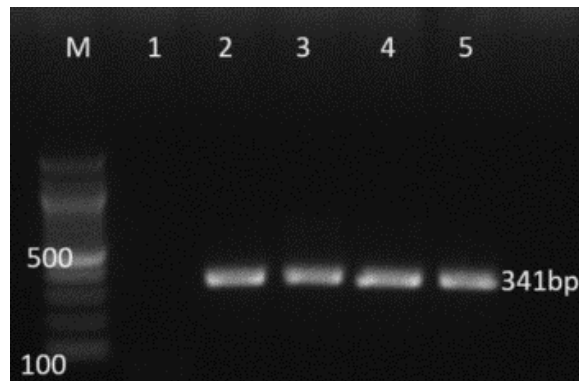
Gambar 5. Hasil uji fragmen TSV yang akan di kloning

Keterangan gambar:

Baris M : Marker 100 bp

Baris 1 : fragmen bahan acuan TSV

Uji PCR hasil gbloks TSV untuk pembuatan bahan acuan TSV dengan menggunakan primer 7171F dan 7511R.

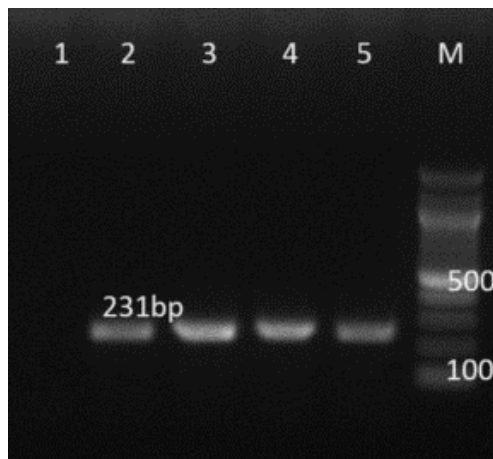


Gambar 6. Hasil uji TSV PCR konvensional

Keterangan gambar:

- Baris M : Marker 100 bp
- Baris 1 : Kontrol Negatif
- Baris 2 : TSV 1
- Baris 3 : TSV 2
- Baris 4 : TSV 3
- Baris 5 : TSV 4

Uji PCR hasil gbloks TSV untuk pembuatan bahan acuan TSV dengan menggunakan primer 9195F dan 9992R



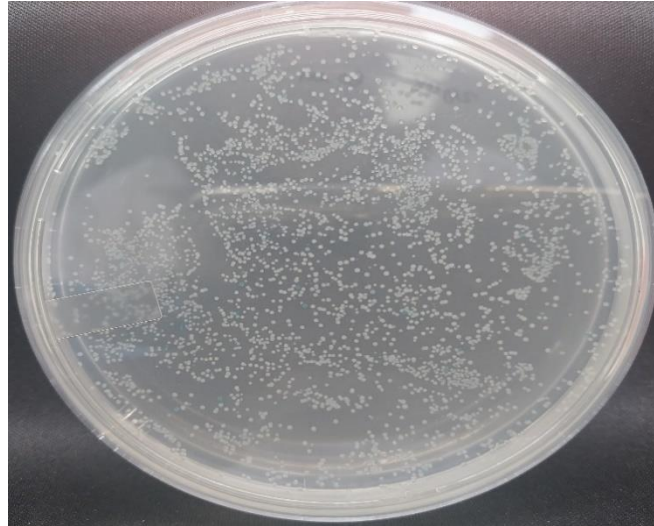
Gambar 7. Hasil uji TSV PCR konvensional (OIE)

Keterangan gambar:

- Baris 1 : Kontrol Negatif
- Baris 2 : TSV 1
- Baris 3 : TSV 2
- Baris 4 : TSV 3
- Baris 5 : TSV 4
- Baris M : Marker 100 bp

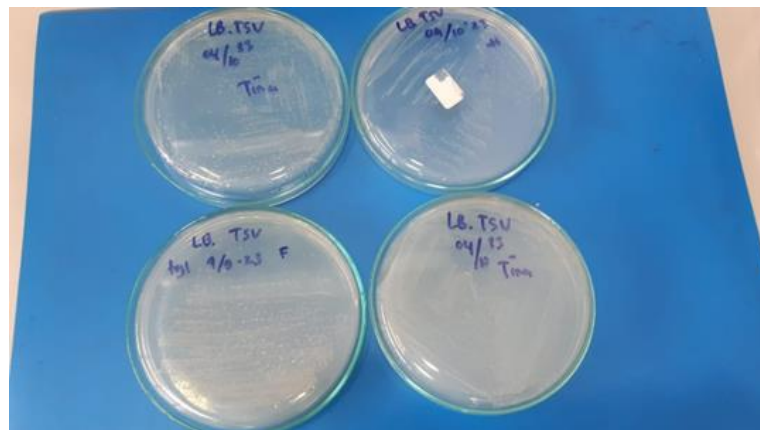
4.2 Kloning TSV untuk bahan acuan PCR dan *Real time* PCR

Setelah proses transformasi plasmid TSV di tumbuhan dalam media luria bertani agar untuk kemudian di amati pertumbuhannya. Dalam proses ini akan muncul isolat berwarna biru dan putih. Dan dari pertumbuhan bakteri ini dapat diperbanyak isolat yang berwarna putih yang menandakan bahwa plasmid TSV sudah masuk kedalam bakteri *E. coli* rekombinan tersebut.



Gambar 8. Perbanyak plasmid TSV untuk bahan acuan pengujian PCR dan *real time* PCR

Berdasarkan dari hasil kloning plasmid TSV didapatkan isolat bakteri *E. coli* rekombinan yang telah terinsertkan fragmen TSV yang dapat diperbanyak dalam media luria bertani (LB) agar dan LB broth. Setelah ditanam kembali pada media agar dan broth plasmid TSV tersebut dapat langsung di purifikasi untuk mendapatkan plasmid TSV yang siap untuk di uji dengan metode PCR dan Realtime PCR.



Gambar 9. Hasil perbanyak plasmid TSV pada media luria bertani agar

4.3. Karakterisasi Referens Material

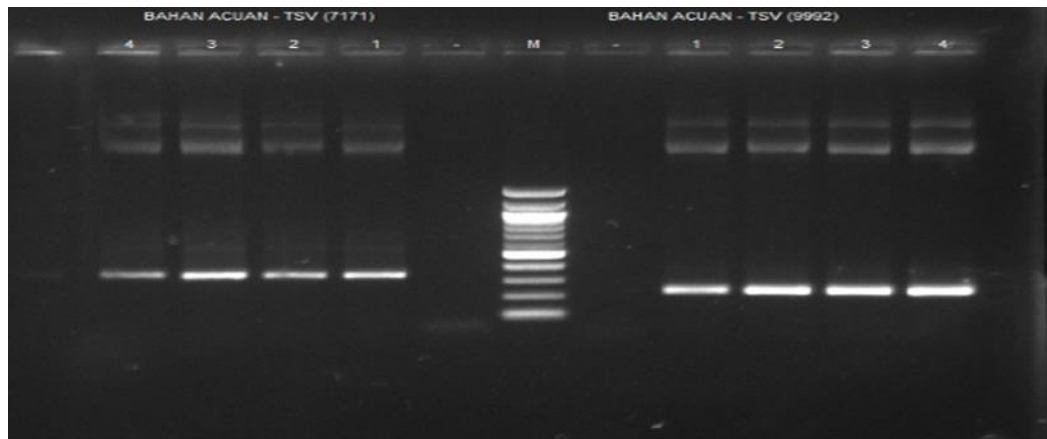
Pengujian *Taura Syndrome Virus* (TSV) dengan PCR konvensional umumnya menggunakan primer 9992F dan 9195R yang mengamplifikasi fragmen sepanjang 231 bp (Nunan et al., 1998). Sampel jaringan (*haemolymph*, *pleopod*, dan seluruh jaringan stadia benih) dapat digunakan sebagai sampel uji TSV dengan reverse transcription PCR (RT-PCR). Pelacakan fragmen TSV terletak pada wilayah intergenic dan ORF2. Primer 9992 F terletak pada akhir 3' wilayah intergenic dan primer 9195R terletak pada wilayah ORF2 yang terletak didalam gen VP2 (=CP1) (Mari et al., 2002; Nunan et al., 1998). Desain primer terbaru yaitu (7171F dan 7511R) telah dikembangkan untuk meningkatkan sensitifitas deteksi TSV (Navarro et al., 2009). Primer ini menggantikan primer 9992F/9195R dimana pelacakan primer tersebut masih didalam ORF2.

Metoda *real time* RT-PCR telah dikembangkan untuk mendeteksi TSV. Metoda ini lebih memberikan keuntungan dari sisi sensitifitas dan spesifisitas. Sensitifitas *real time* RT-PCR hingga 100 copy dalam melacak sekuen genom TSV (Dhar et al., 2002; Tang et al., 2004). Metoda *real time* RT-PCR menggunakan hydrolysis probe (TaqMan probe™) sesuai dengan yang direkomendasikan Tang et al, (2004).

Pada pembuatan bahan acuan plasmid TSV ini diharapkan dapat menyediakan kontrol positif untuk pengujian TSV yang dapat digunakan untuk pengujian konvensional PCR dan *real time* PCR, sehingga perlu di buat renkontruksi suatu fragmen yang didalamnya terdapat susunan basa yang dapat terbaca baik pada pengujian PCR konvensional ataupun *real time* PCR

4.3.1. PCR Konvensional

Penentuan karakteristik referens material TSV berupa potongan fragmen DNA dari daerah dsDNA menggunakan metode primer yaitu PCR diuji pada laboratorium biologi molekuler BUSKIPM. Gambar 10 menunjukkan hasil pengujian dari referens material. Adanya pita pada 341 bp menunjukkan referens material benar berisi potongan fragmen DNA dari TSV daerah DNA menggunakan pasangan primer TSV 9195F 5'- TCAATGAGAGCTTGGTCC -3' dan TSV 9992R 5'- AAGTAGACAGCCGCGCTT -3' pada 231 bp dan pasangan primer TSV 7171F 5'CGACAGTTGGACATCTAGTG-3' dan TSV 7511R 5'-GAGCTTCAGACTGCAACTTC-3' pada 341 bp.



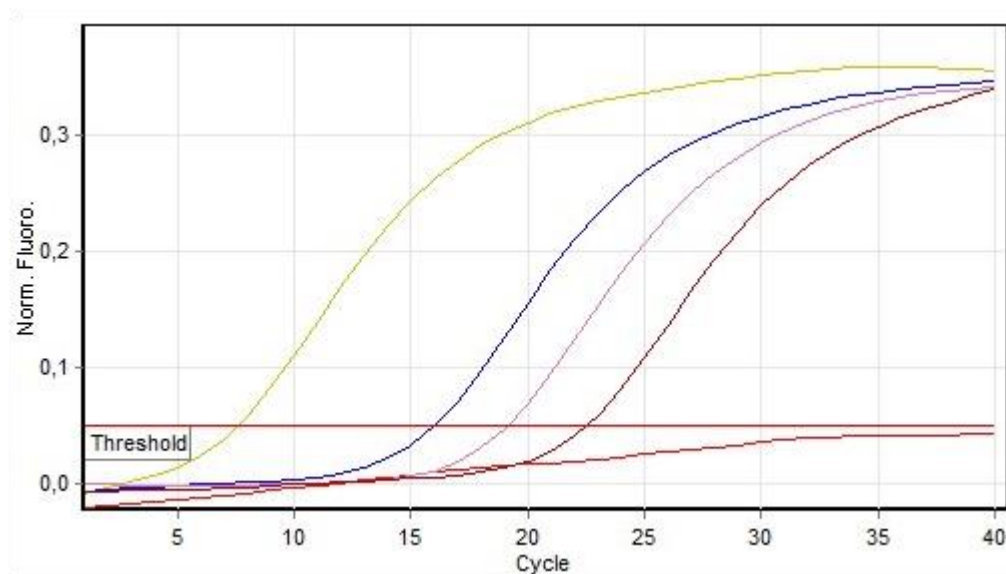
Gambar 10. Hasil pengujian referens material TSV menggunakan dua pasang primer

Keterangan gambar:

Baris 1 : -	Baris 7 : Marker
Baris 2 : TSV -1	Baris 9 : Kontrol Negatif TSV
Baris 3 : TSV -2	Baris 10: TSV -1
Baris 4 : TSV -3	Baris 11: TSV -2
Baris 5 : TSV -4	Baris 12: TSV -3
Baris 6 : Kontrol Negatif TSV	Baris 13: TSV -4

4.3.2. q PCR

Penentuan karakteristik referens material TSV berupa potongan plasmid menggunakan metode primer yaitu PCR diuji pada laboratorium biologi molekuler BUSKIPM. Gambar 11 menunjukkan hasil pengujian dari referens material. Adanya Ct ke 28 menunjukkan referens material benar berisi potongan fragmen DNA dari TSV daerah DNA menggunakan pasangan primer TSV1004F TTG-GGC-ACC-AAA-CGA-CAT-T, TSV1075R GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT, TSV P1 Probe FAM- CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-TAMRA



No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment
1	Red	Kontrol Negatif TSV	NTC		Negatif
2	Yellow	TSV-1	Unknown	7,58	Positif
3	Blue	TSV-2	Unknown	16,00	Positif
4	Pink	TSV-3	Unknown	19,10	Positif
5	Red	TSV-4	Unknown	22,49	Positif

Gambar 11. Hasil Real Time PCR pengujian kontrol positif TSV

4.3.3 Sekuensing

Sekuensing dilakukan untuk mengkonfirmasi karakter nukleotida dari referensi material yang diproduksi.

SEQUENCE OF INSERT 675bp

```

1      GAGCTTCAGA CTGCAACTTC ATCTCAATGC CAGGAAATGA TGTAATAGAG CGTAGGTGTT
61     CTGTAAGAGT GCGTCGAATA ATTGATGTCT GCTTAGCATT CATCTTATTC CACAGCCACA
121    ATGCTCCTTG TAAAAAGGGC GTGGCTTGTA CTCGTACAGT AACCTCGTAA TCACATCGCA
181    TATATGCAAT ATTCGCTAAT TTATTAGACA TAAACAGTGA TTTACGTACA ATATCATCGG
241    GTAGGGAAAT TTCATATAAG TGTGGCTGAT TGAATTCTGT TGCAAGCTGT TCCTGTGTCA
301    TAGTTGTGCC AATTCATCA TCACTAGATG TCCAACGTGC GTTATGAAGT AAAACGTCGC
361    GAGAGAGAGA TTCAATGAGA GCTTGGTCCT GGACTTCAAA CAGGTTATCT GTTACATTCT
421    TAGACAGCAC TACATTCTGA TTAGTGATTG GGATATCATT CATCAAGATT GTGGAACCTT
481    CACTGTTTGT AACGCTACCT CCTGGAATTA GTCCTCCACT GGTGTTGTGA TCAAAATTAT
541    CAATTTCAAC TGGGTTAGCA GGCATTAATT AAGTCCCACC ACGCAAGCGC GGCTGTCTAC
601    TTGGGAGCTT AAACCTGGACA CACTGTGAAG ATCGAATATT GTGCGTCAGT GCTGGAATGT
661    CGTTTGGTGC CAAA

```

Detail dari hasil seluruh konstruksi bahan acuan TSV (lampiran 1).

4.3.4. Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Nilai konsentrasi dan kemurnian DNA kontrol positif TSV yang diproduksi BUSKIPM diukur menggunakan nano spektrofotometer. Konsentrasi yang didapatkan adalah 220 ng/μl. Tabel 3 menunjukkan hasil pengukuran dan konsentrasi DNA kontrol positif TSV. Pengukuran dan perhitungan nilai konsentrasi kontrol positif TSV ini belum sesuai dengan ISO Guide 35, dikarenakan belum tersedianya neraca (untuk pengukuran gravimetrik) dalam skala mikro. Sehingga pencantuman konsentrasi DNA kontrol positif dihasilkan dari perhitungan statistik deskriptif yaitu nilai rata-rata (*mean*) konsentrasi DNA dari pengulangan ± standar deviasi.

Tabel 3. Nilai hasil pengukuran kemurnian dan konsentrasi kontrol positif TSV

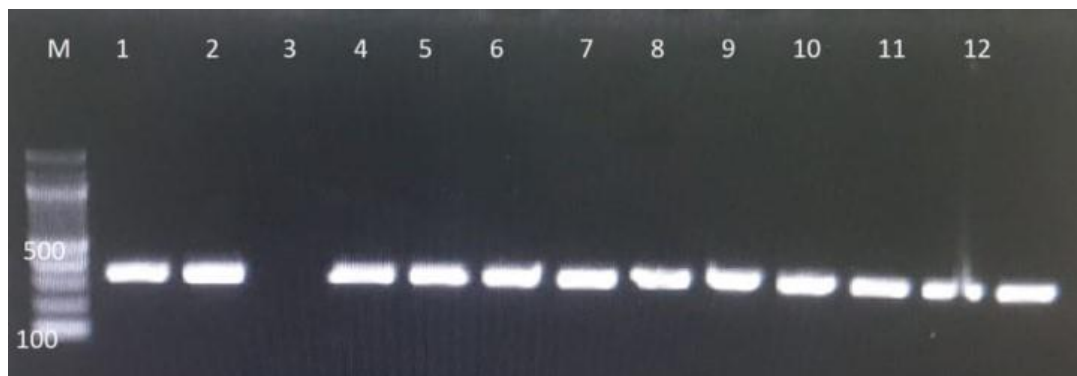
Ulangan	Konsentrasi (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	A230 (Å)	A260 (Å)	A280 (Å)
I	139	1.805	2.172	0.065	0.140	0.078
II	165	1.755	2.230	0.072	0.163	0.092
III	220	1.774	2.222	0.101	0.222	0.126
IV	209	1.786	2.223	0.096	0.211	0.119

4.3.5 Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas dari kontrol positif/ referensi material dilakukan hanya pada 3 unit yang diambil secara acak, dengan 3 replikasi. Hal ini sesuai dengan ISO Guide 35 klausul 5.8 yang menyebutkan bahwa jumlah minimal unit yang dipilih secara acak adalah antara 10 - 30, tetapi umumnya tidak kurang dari 10, catatan: apabila jumlah dalam satu *batch* kurang dari 50 unit, pengujian homogenitas harus menggunakan > 3 unit atau 10% dari jumlah unit dalam satu *batch*.

Uji homogenitas secara *simple randomized design* menggunakan metode PCR (sesuai 3.4.6) menunjukkan hasil yang baik. Semua replikasi dalam semua unit sampel yang diambil secara acak memperlihatkan adanya pita dengan ukuran 341 bp (Gambar 6) dengan kuantitas ketebalan pita yang kurang lebih sama. Hasil pengujian homogenitas dapat diasumsikan bahwa semua unit referensi material memiliki potongan fragmen DNA dari DNA TSV.

Berdasarkan uji homogenitas PCR sebanyak 10 tabung mikro didapatkan hasil yang homogen dengan semua pita DNA muncul di 341 bp. (Gambar 12).



Gambar 12. Hasil uji homogenitas plasmid TSV dengan PCR , positif di 341 bp

Keterangan gambar:

Baris M : Marker

Baris 1 : Kontrol Positif TSV

Baris 2 : Kontrol Positif TSV

Baris 3 : TSV -1

Baris 4 : TSV -2

Baris 5 : TSV -3

Baris 6 : TSV -4

Baris 7 : TSV -5

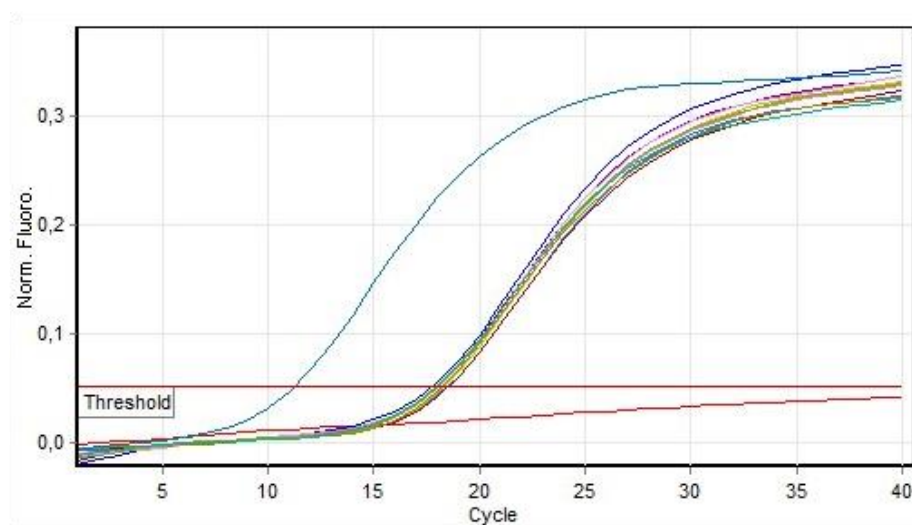
Baris 9 : TSV -6

Baris 10: TSV -7

Baris 11: TSV -8

Baris 12: TSV -9

Baris 13: TSV -10



No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment
1	Red	Kontrol Negatif TSV	NTC		Negatif
2	Yellow	1	Unknown	18,39	positif
3	Blue	2	Unknown	17,83	positif
4	Purple	3	Unknown	18,05	positif
5	Pink	4	Unknown	18,07	positif
6	Light Blue	5	Unknown	18,54	positif

No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment
19		6	Unknown	18,03	positif
20		7	Unknown	18,56	positif
21		8	Unknown	18,26	positif
22		9	Unknown	18,09	positif
23		10	Unknown	18,03	positif
24		Kontrol Positif TSV	Unknown	11,30	positif

Gambar 13. Hasil uji homogenitas plasmid TSV dengan *Real time* PCR

Uji homogenitas secara *simple randomized design* dengan mengukur konsentrasi DNA (sesuai 3.4.6) dapat dilihat pada tabel 4, hasil statistik uji Anova dapat dilihat pada tabel 5. Hasil statistik uji ANOVA menunjukkan $F_{hitung} = 0,9491$ lebih kecil dari F_{kritis} untuk $df_1 = 2$, $df_2 = 6$ dan $p = 0.95$ adalah 5,1433, sehingga dapat diasumsikan bahwa semua unit adalah homogen. Nilai S_{bb} yang diperoleh adalah 0,0213.

Tabel 4. Hasil pengukuran konsentrasi TSV untuk uji homogenitas

No. Unit	Konsentrasi (ng/μl)			Jumlah ulangan	Jumlah	Rata-rata	Varians
	I	II	III				
1	18,39	17,83	18,05	3	54,27	18,09	0,0619
2	18,07	18,54	18,03	3	54,64	18,21	0,1279
3	18,56	18,26	18,09	3	54,91	18,30	0,0009

Tabel 5. Ringkasan statistik uji ANOVA faktor tunggal

Source of variation	SS	df	MS	F	Fcrit
Between Groups	0,12	2	0,0603	0,9491	5,1433
Within Groups	0,38	6	0,0636		
Total	0,50	8			

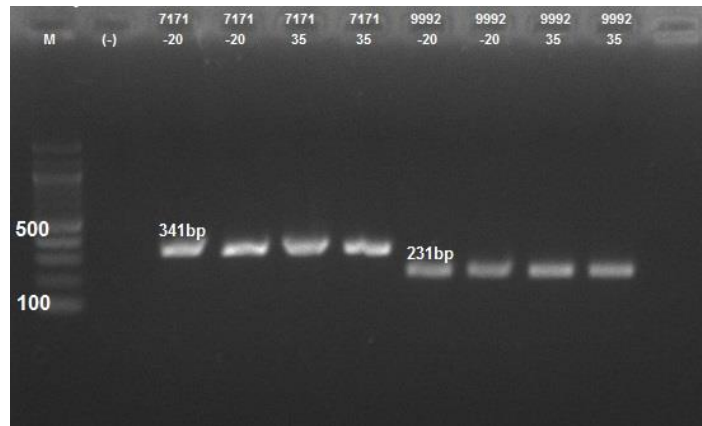
$$S_{bb} = \sqrt{MS_{within}/n \times \sqrt{2/df_{within}}}$$

$S_{bb} = 0,0213$

4.3.6. Uji Stabilitas Jangka Pendek (*Short Term Stability* = STS)

Pengujian STS dari kontrol positif TSV dilakukan pada tiga titik waktu pengujian (1 minggu dan 3 minggu) dipilih sebagai waktu pengiriman. Jumlah replikasi tiap pengujian adalah 2 unit/waktu. Pengujian dilakukan dengan secara *isochronous*. Suhu -20°C ditentukan sebagai kondisi referensi dimana material sangat diyakini stabil. Suhu 35 °C dipilih sebagai suhu ekstrim pengiriman yang akan diuji, dimana pada suhu tersebut diyakini bahan masih dalam keadaan stabil.

Uji STS secara *isochronous stability* menggunakan metode PCR konvensional (sesuai 3.3.1.2) menunjukkan hasil yang baik. Semua replikasi pada titik waktu 1 dan 3 minggu pengujian memperlihatkan pada primer 7171F dan 7511R terdapat pita band berukuran 341 bp dan pada primer 9195F dan 9992R terdapat pita dengan ukuran 231 bp dengan kuantitas ketebalan pita yang sama (Gambar 14). Hasil pengujian STS dapat diasumsikan bahwa waktu pengiriman 3 minggu dengan suhu pengiriman 35°C kontrol positif TSV yang diproduksi BUSKIPM stabil karena ketebalan pita sama.



Gambar 14. Hasil elektroforesis uji STS TSV menggunakan PCR konvensional

Keterangan:

Baris M – Marker 100 bp

Baris 1 – Non template DNA

Baris 2 – Titik uji -20 selama 1 minggu

Baris 3 – Titik uji -20 selama 3 minggu

Baris 4 – Titik uji -35 selama 1 minggu

Baris 4 – Titik uji 35 selama 3 minggu

Baris 5 – Titik uji -20 selama 1 minggu

Baris 6 – Titik uji -20 selama 3 minggu

Baris 7 – Titik uji 35 selama 1 minggu

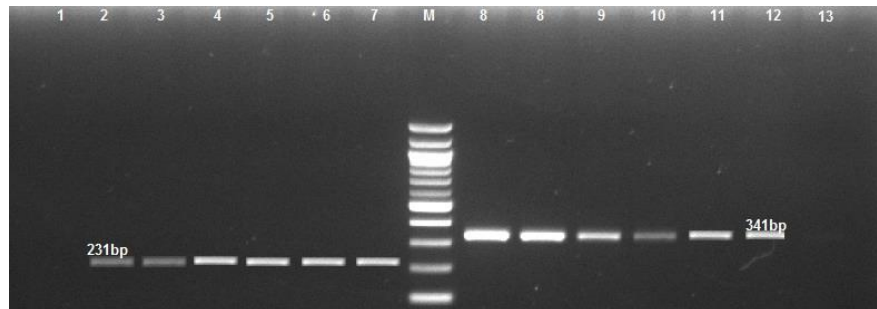
Baris 8 – Titik uji 35 selama 3 minggu

Positif ditunjukkan dengan adanya pita pada 231 bp dan 341bp

4.3.7. Uji Stabilitas Jangka Panjang (*Long Term Stability* = LTS)

Pengujian LTS dari referensi material TSV dilakukan pada tiga titik waktu pengujian (0 bulan, 2 bulan dan 4 bulan) dipilih sebagai waktu penyimpanan. Jumlah replikasi tiap pengujian adalah 2 unit/waktu. Pengujian dilakukan dengan secara *isochronous*. Suhu -80°C ditentukan sebagai kondisi referensi dimana referensi material sangat diyakini stabil. Suhu -30°C dipilih sebagai suhu ekstrim pengiriman yang akan diuji, dimana pada suhu tersebut diyakini bahan masih dalam keadaan stabil. Hasil pengujian stabilitas yang dapat dilaporkan adalah hasil pengujian 0 bulan, 2 bulan dan 4 bulan. Hasil pengujian menunjukkan bahwa dalam jangka waktu penyimpanan 0 sampai 4 bulan referensi material masih menunjukkan hasil yang baik. Untuk sementara waktu referensi material TSV dengan kondisi penyimpanan

-80°C, karena harus menunggu data intesept (β_0) dan slope (β_1) yang didapatkan dari persamaan regresi sesuai ISO 17034.



Gambar 15. Hasil elektroforesis uji LTS TSV menggunakan PCR konvensional dengan 2 pasang primer berbeda.

Keterangan:

Baris 1 – *Non template* DNA

Baris 2 – Titik uji 0 bulan, ulangan 1

Baris 3 – Titik uji 0 bulan, ulangan 2

Baris 4 – Titik uji 2 bulan, ulangan 1

Baris 5 – Titik uji 2 bulan, ulangan 2

Baris 6 – Titik uji 4 bulan, ulangan 1

Baris 7 – Titik uji 4 bulan, ulangan 2

M – Marker 100bp

Baris 8 – Titik uji 0 bulan, ulangan 1

Baris 9 – Titik uji 0 bulan, ulangan 2

Baris 10 – Titik uji 2 bulan, ulangan 1

Baris 11 – Titik uji 2 bulan, ulangan 2

Baris 12 – Titik uji 4 bulan, ulangan 1

Baris 13 – Titik uji 4 bulan, ulangan 2

Baris 6 – Titik uji 4 bulan, ulangan 1

Baris 7 – Titik uji 4 bulan, ulangan 1

Baris 12 – Titik uji 2 bulan, ulangan 2

5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- Kontrol Positif/ Referens material ini berasal dari plasmid TSV yang dikonfirmasi dapat menggunakan 2 pasang primer yang berbeda yaitu, Primer 9992F 5'-AAGTAGACAGCCGCGCTT -3', primer 9195R 5'- TCAATGAGAGCTTGGTCC -3' dan primer terbaru yaitu 7171F 5'-CGACAGTTGGACATCTAGTG-3' dan 7511R 5'-GAGCTTCAGACTGCAACTTC-3'
- Dikonfirmasi menggunakan qPCR dengan primer TSV1004F TTG-GGC-ACC-AAA-CGACAT-T, TSV1075R GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT dan TSV1 probe FAM-CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-TAMRA yang terdeteksi pada Ct 18 yang menunjukkan bahwa terdapat 10^6 copy DNA
- Kontrol Positif/ Referens Material TSV disimpan pada kondisi -80°C masih stabil (memberikan hasil positif pada uji PCR) sampai dengan minimal 4 bulan penyimpanan.

5.2 Saran

- Referens material TSV perlu dilakukan pengujian *Long Term Stability* (LTS) yang 1 tahun dan seterusnya dengan selang waktu 6 bulan untuk mengetahui masa kadaluarsa referens material tersebut.
- Perlu dilakukan pengujian pada kondisi penyimpanan *freeze dried* pada penyimpanan suhu ruang – 80°C untuk mengetahui kestabilan RM
- Perlu dilakukan pengujian pada kondisi suhu transportasi pada berbagai jarak transportasi untuk mengetahui kestabilan selama transportasi

Daftar Pustaka

- ACIAR, 2005. Applicatoin of for improved Management of Shrimp Disease in the Asian Region. PCR Workshop Laboratory prosedures. Research Instistute for Freshwater Fisheries, Bogor, INDOESIA
- BROCK J.A. (1997). Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas. *World J. Microbiol & Technol.*, **13**, 415–418.
- BROCK J.A., GOSE R., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1995). An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. *In*: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 84–94.
- BROCK J.A., GOSE R.B., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1997). Recent developments and an overview of Taura Syndrome of farmed shrimp in the Americas. *In*: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 275–283.
- FLEGEL, T. 2000. An Overview of PCR Probes For Shrimp diseases of *Penaeus monodon* in asia, with emphasis on thailand. Workshop II Molecular Epidomiology and Diagnostics of Shrimp Viruses In the Asian Region, Bangkok.
- FLEGEL, T. 2000. Overview of PCR Probes For Shrimp diseases in the AsianRegion in: Anonim, 2000. Molecular Diagnostics and Epidemilogy for shrimp Viruses in Asia. Institute of Molecular Biology and Genetics. Mahidol University, salaya Campus. Thailand. P 13 - 15
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MARI J., BONAMI J.R., POULOS B.T., MOHNEY L.L., REDMAN R.M. & BROCK J.R. (1999a). The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histology and *in situ* hybridization using TSV-specific cDNA probes. *Aquaculture*, **171**, 13–26.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T. & WHITE B.M. (1999b). Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis.Aquat. Org.*, **36**, 81–93.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L., BROCK J.A. & BONAMI J.R. (1995).Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 115–126.
- INTRIAGO P., JIMENEZ R., MACHUCA M., BARNIOL R., KRAUSS E. & SALVADOR X. (1997). Experiments on toxicosis as the cause of Taura Syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) in Ecuador.*In*: Diseases in Asian Aquaculture III. Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 365–379.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998a). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, **33**, 165–180.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998b). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201– 220.

- LIGHTNER D.V. (1995). Taura syndrome: an economically important viral disease impacting the shrimp farming industries of the Americas including the United States. *In: Proceedings of the 99th Annual Meeting US Animal Health Association*, Reno, Nevada, USA, 36–52.
- LIGHTNER D.V. (1996b). Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. sci. tech. Office int. Epiz.*, **15**, 579–601.
- LIGHTNER D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquaculture*, **9**, 27–52.
- LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.*, **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V. (2011). Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. *In: Diseases in Asian Aquaculture VII*, Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F. & Aoki T., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, 121–134.
- LIGHTNER D.V. (ED.) (1996a). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, 384–424.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., HASSON K.W. & PANTOJA C.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 53–59.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.
- MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1998). Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 11–17.
- MARI J., POULOS B.T., LIGHTNER D.V. & BONAMI J.R. (2002). Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses. *J. Gen. Virol.*, **83**, 915–926.
- MOSS S.M., ARCE S., ARGUE B.J., OTOSHI C.A., CALDERON F.R.O. & TACON A.G.J. (2001). *In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture*. Aquaculture 2001, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1–19.
- NAVARRO S.A., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2009). An improved Taura syndrome virus (TSV) RT-PCR using newly designed primers. *Aquaculture*, **293**, 290–292.
- NIELSEN L., SANG-OUM W., CHEEVADHANARAK S. & FLEGEL T.W. (2005). Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. *Dis Aquat. Org.*, **63**, 101–106.

- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 87–91.
- Office International Des Epizooties, 2019. Chapter 2.2.7. Infection with Taura Syndrome Virus (TSV).
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_taura_syndrome.pdf © OIE - *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* - 19/08/2019
- RUFATI, I. (2008) *Taura Syndrome Virus (TSV) dan Channel Catfish Disease Virus (CCDV)*. Panduan Mata Kuliah Parasit dan Penyakit Ikan, Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian
- SNI 7912:2013 Deteksi *Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (TSV)-Metoda quantitative (real time) – Polymerase Chain Reaction (qPCR) menggunakan hydrolysis probe*
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Phylogenetic analysis of Taura syndrome virus isolates collected between 1993 and 2004 and virulence comparison between two isolates representing different genetic variants. *Virus Research*, **112**, 69–76.
- TANG K.F.J., NAVARRO S.A., PANTOJA C.R., ARANGUREN F.L. & LIGHTNER D.V. (2012). New genotypes of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) from the Kingdom of Saudi Arabia. *Dis. Aquat. Org.*, **99**, 179–185.
- TANG K.F.J., WANG J. & LIGHTNER D.V. (2004). Quantitation of Taura syndrome virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. *J. Virol. Methods*, **115**, 109–114.
- TU C., HUANG H.T., CHUANG S.H., HSU J.P., KUO S.T., LI N.J., HUS T.L., LI M.C. & LIN S.Y. (1999). Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 159–161.
- VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.
- WERTHEIM J.O., TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2009). A quick fuse and the emergence of Taura syndrome virus. *Virology*, **390**, 324–329.
- YU C.I. & SONG Y.L. (2000). Outbreaks of Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.*, **35**, 21–24.

