

DETECTION OF SPIRORCHIID OVA IN BLOOD SAMPLES FROM GREEN SEA TURTLES BY REALTIME POLYMERASE CHAIN REACTION**Deteksi Ova Spirorchid Dalam Sampel Darah Penyu Hijau Dengan Realtime Polimerase Chain Reaction****Ida Ayu Dian Kusuma Dewi**

Laboratorium Diagnosa Klinik, Patologi Klinik, dan Radiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. Raya Kampus Unud Jimbaran, Badung, Bali

Corresponding author email: iadiankusuma@unud.ac.idHow to cite: Dewi IADK. 2025. Detection of *Spirorchiid* ova in blood samples from green sea turtles by Realtime Polymerase Chain Reaction. *Bul. Vet. Udayana*. 17(3): 976-982.DOI: <https://doi.org/10.24843/bulvet.2025.v17.i03.p44>**Abstract**

Parasite infection has become one of many important pathological conditions contributing to high morbidity and chronic debilitating disease in green sea turtles (*Chelonia mydas*). Of many identified parasites in green turtles, spirorchiid flukes are one of the most frequent groups identified from stranding cases worldwide with relatively high morbidity ranging from 75%-98%. This study aimed to perform molecular assays on blood samples using filtered blood to concentrate the parasite DNA contained in the circulating ova. A total of nine blood samples were collected during the study; one from a captive green turtle with suspect positive spirorchiidiosis, and eight from wild turtles caught around the Moreton Bay area. The blood filtration resulted in a remarkably low DNA quantity and poor quality which later lead to a lack of positives on PCR assay. The DNA yield from unfiltered blood samples (68.2–374.3 ng/μL; mean = 16.7 ± 110.0 ng/μL) was significantly higher than that from filtered samples (0.95–7.92 ng/μL; mean = 8.02 ± 8.00 ng/μL). Additionally, DNA purity based on the 260/280 ratio was more consistent in unfiltered samples (1.64–2.13; mean = 1.94 ± 0.13), while filtered samples showed highly variable and unreliable purity values (-7.04 to 84.67; mean = 9.19 ± 28.5). The low quality and quantity of DNA may be caused by the parasite's life stage, which affects the level of infection and parasite load in the host, as well as DNA denaturation during the extraction process using the bead-beating method. Future research should focus on optimizing DNA extraction methods, particularly the duration of bead-beating and the use of effective buffers like sorbitol or SDS. Additionally, regular administration of anthelmintic treatment is recommended in clinical settings to help control Spirorchiid infections in green turtles.

Keywords: Spirorchiid, DNA, green turtle

Abstrak

Infeksi parasit adalah salah satu kondisi patologis penting yang menyebabkan tingkat morbiditas yang tinggi dan penyakit debilitasi kronis pada penyu hijau (*Chelonia mydas*). Dari banyaknya parasit yang telah teridentifikasi pada penyu hijau, spirorchid dari famili trematoda adalah salah satu kelompok cacing yang paling sering ditemukan pada penyu hijau yang

terdampar, tidak hanya di perairan Queensland bagian tenggara, namun juga di habitat utama diseluruh dunia. Tingkat morbiditas akibat infeksi Spirorchid berkisar antara 75-98%. Studi ini bertujuan untuk melakukan uji molekuler pada sampel darah yang telah difiltrasi dengan tujuan untuk mendapatkan DNA ova spirorchid yang bersirkulasi dalam darah. Sebanyak sembilan sampel darah dikumpulkan selama studi; satu sampel terkonfirmasi positif spirorchidiois dan delapan diantaranya didapatkan dari penyu hijau yang ditangkap saat pemeriksaan klinis regular di Moreton Bay. Proses filtrasi darah menghasilkan kuantitas DNA yang sangat rendah dengan kualitas yang buruk, yang kemudian berdampak pada kurangnya hasil positif pada uji PCR. Hasil ekstraksi DNA dari sampel darah yang tidak disaring ($68,2\text{--}374,3\text{ ng}/\mu\text{L}$; rerata = $16,7 \pm 110,0\text{ ng}/\mu\text{L}$) secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan sampel yang disaring ($0,95\text{--}7,92\text{ ng}/\mu\text{L}$; rerata = $8,02 \pm 8,00\text{ ng}/\mu\text{L}$). Selain itu, kemurnian DNA berdasarkan rasio 260/280 lebih konsisten pada sampel yang tidak disaring ($1,64\text{--}2,13$; rerata = $1,94 \pm 0,13$), sedangkan sampel yang disaring menunjukkan nilai kemurnian yang sangat bervariasi dan tidak stabil ($-7,04$ hingga $84,67$; rerata = $9,19 \pm 28,5$). Rendahnya kualitas serta kuantitas DNA dapat disebabkan oleh fase hidup parasite yang mempengaruhi tingkat infeksi dan beban parasite pada inang, serta denaturasi DNA selama proses ekstraksi dengan metode *beadbeating*. Studi dimasa depan dapat difokuskan untuk optimisasi metode ekstraksi DNA, terutama dalam menentukan durasi *bead-beating* dan menggunakan *buffer* alternative seperti sorbitol atau SDS. Selain itu, pemberian anthelmintic secara regular juga dapat menekan infeksi spirorchiid pada penyu hijau.

Kata kunci: Spirorchiid, DNA, penyu hijau

PENDAHULUAN

Penyakit infeksius merupakan salah satu penyebab signifikan kematian penyu-penyu yang terdampar (Flint, Patterson-Kane, Limpus, & Mills, 2010). Dari banyaknya penyakit infeksius yang ada, spirorchidiosis adalah salah satu yang paling sering ditemukan pada individu yang sakit. Prevalensi spirorchidiosis pada penyu di Queensland tenggara tercatat amat tinggi, dengan kisaran 75-98% (Flint et al., 2010). Infeksi spirorchiid menyebabkan klinis yang bervariasi mulai dari gangguan neurologis, sistem pencernaan, dan pernafasan (Flint et al., 2010; Gordon, 2005; Jacobson et al., 2006). Infeksi derajat ringan sering kali bersifat asimtomatis dan seiring dengan berjalannya waktu dapat berkembang menjadi infeksi yang parah dengan lesi dalam bentuk agregasi parasite jumlah besar di banyak organ (Gordon, 2005). Meskipun infeksi ini memiliki prevalensi yang tinggi dan tanda klinis yang spesifik hingga asimtomatis, informasi tentang infeksi spirorchiid pada penyu masih belum banyak dipelajari sehingga menjadi hambatan dalam proses diagnostiknya.

Sebagai salah satu upaya untuk mempelajari biologi dari infeksi spirorchiid, beberapa teknik laboratorium telah dikembangkan untuk mendiagnosa penyakit ini. Salah satu teknik yang paling sering digunakan yakni nekropsi, histologi, dan uji molekuler. Necropsi dan histologi adalah cara yang sangat efektif, namun aplikasinya terbatas hanya pada individu yang sudah mati. Hal ini dikarenakan oleh pengambilan sampelnya yang bersifat invasif. Disisi lain, uji molekuler telah berhasil digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkonfirmasi beberapa genus seperti *Haplotrema*, *Neosporichis*, *learedius*, dan *Caretta* and tropisme jaringan pada setiap genus tersebut (Chapman, et al., 2016; Stacy, et al., 2010). Uji molekuler dengan pendekatan baru lainnya juga telah berhasil membedakan ova spirorchiid berdasarkan genusnya, yang berpredileksi pada berbagai organ pada penyu dari kelas umur dan jenis kelamin yang berbeda. Namun demikian, uji ini juga memiliki keterbatasan yakni jenis sampel yang digunakan adalah sampel organ yang mengandung ova, sehingga belum bisa diaplikasikan pada individu yang masih hidup. Adanya pertimbangan etika penggunaan hewan juga terutama penyu sebagai satwa yang dilindungi menyebabkan terbatasnya jenis dan jumlah

sampel yang dapat dikumpulkan. Sampel uji PCR yakni organ yang mengandung ova, hanya dapat dikoleksi dari individu yang mati secara alami atau dari proses euthanasia. Hal ini berdampak pada periode studi yang panjang akibat jumlah sampel yang tidak dapat diprediksi.

Berdasarkan paparan latar belakang diatas, pengujian molekuler dengan menggunakan sampel yang didapat secara non-invasif harus dikembangkan demi keberhasilan diagnosis penyakit spirorchiidiosis. Penelitian pada paper ini dilakukan sebagai sebuah percobaan untuk menilai kapasitas uji molekuler untuk mendeteksi infeksi spirorchiid pada sampel darah. Tujuan lainnya yakni untuk melihat apakah darah yang terfiltrasi dengan metode *bead-beating* dapat dijadikan sampel untuk uji realtime PCR (qPCR) pada penyu yang hidup. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat membantu deteksi infeksi parasite secara dini pada populasi penyu. Metode ini, jika berhasil diterapkan, akan menjadi metode yang efisien dan akurat untuk mengukur tingkat infestasi spirorchiid pada populasi yang hidup. Lebih jauh lagi, penelitian ini dapat membantu proses *monitoring* penyakit pada populasi penyu yang hidup di habitat alamnya, serta menentukan penanganan dan proses rehabilitasi penyu yang sakit.

METODE PENELITIAN

Kelaikan etik hewan coba

Penelitian ini tidak memerlukan uji kelaikan etik hewan coba karena menggunakan sampel darah yang dikoleksi sesuai prosedur standard dan telah melalui perijinan dengan nomor SVS/037/11/ARC/DERM/AUSTZOO yang dikeluarkan oleh Komite Etik Hewan Coba The University of Queensland dan ijin nomor QS2011/CVL1414 yang dikeluarkan oleh Queensland State Marine Parks.

Objek Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada delapan ekor penyu yang ditemukan di area Moreton Bay dan satu ekor penyu di Australia Zoo.

Rancangan Penelitian

Sampel darah dibagi menjadi sampel yang terfilter (*filtered*) dan tidak terfilter (*non-filtered*). Metode *bead-beating* diaplikasikan kepada kedua kelompok sampel untuk mengekstraksi DNA ova spirorchiid. Kedua kelompok sampel kemudian diuji secara molekuler dan jumlah DNA serta hasil uji qPCRnya dibandingkan.

Variabel Penelitian

Variabel bebas dari penelitian ini adalah penyu-penyu yang ditangkap secara acak di area Moreton Bay. Penyu-penyu ini memiliki ukuran tubuh yang beragam. Sedangkan variable kontrolnya yakni volume darah serta perlakuan pada sampel yakni *filtered* dan *unfiltered*. Variabel terikat yang dihasilkan yakni berupa konsentrasi DNA ova, serta hasil amplifikasi DNA melalui qPCR.

Metode Koleksi Data

Sampel darah ini diambil dengan menggunakan syringe dari sinus dorsal-cervical, kemudian disimpan dalam tabung EDTA sebanyak 7ml. Ova dikonsentrasikan dari sampel darah utuh menggunakan uji Knott yang dimodifikasi seperti dijelaskan oleh Dickerson et al.(1990). Sampel darah dibagi menjadi sampel yang difiltrasi dan yang tidak difiltrasi. Sampel yang telah difiltrasi diproses dalam mesin bead beating setelah proses filtrasi selesai. Prosedur ini sedikit berbeda untuk sampel yang tidak difiltrasi, di mana proses bead beating dilakukan di antara tiga langkah pertama ekstraksi DNA. Protokol ekstraksi DNA dilakukan sesuai dengan petunjuk perusahaan untuk kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hiden, Jerman) dan metode

bead beating menggunakan Biospec Mini-Beadbeater. Sampel yang sudah diproses, akan diuji qPCR yang menggunakan metode yang ditunjukkan oleh Chapman et al., dengan menargetkan 28S rRNA dari *Neospororchis* spp (Chapman et al., 2016). Sampel akan dibuat dalam duplikat dan kit Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (VIC/MGB – Applied Biosystems) akan digunakan untuk memastikan kualitas DNA yang memadai untuk proses amplifikasi. Seluruh reaksi akan dijalankan menggunakan thermal cycler Qiagen Rotor-Gene 6000, dengan prosedur berturut-turut sebagai berikut: aktivasi awal Taq Polymerase (5 menit pada 95°C), 40 siklus denaturasi (15 detik pada 95°C), dan annealing (1 menit pada 60°C). Kuantifikasi PCR hasil pemurnian dari rDNA kontrol positif akan dilakukan menggunakan spektrofotometri (NanoDrop – Delaware, USA), dan dilusi sepuluh kali lipat akan dilakukan untuk menghasilkan kurva standar.

Analisis data

Seluruh data numerik jumlah DNA dari kedua kelompok kemudian ditabulasi dalam tabel. Kedua kelompok ini kemudian dibandingkan dengan dianalisis menggunakan T-test pada Microsoft excel dan perbandingannya disajikan dalam bentuk diagram box plot.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Filtrasi darah dan ekstraksi DNA

Kelompok sampel darah yang tidak disaring menghasilkan lebih banyak DNA daripada sampel yang disaring (Grafik 1). DNA yang berhasil diekstraksi pada kedua kelompok sampel berbeda nyata secara statistik dengan jumlah berkisar antara 68.2 - 374.3 ng/ μ L (mean = 16.7 ± 110.0 ng/ μ L) dan 0.95-7.92 ng/ μ L (mean = 8.02 ± 8.00 ng/ μ L) secara berturut-turut pada darah yang tidak disaring dan yang disaring. Selain itu nilai rasio 260/280 yang merupakan indikator kemurnian DNA pada darah yang disaring memiliki variasi yang sangat signifikan yakni -7.04 - 84.67 (mean = 9.19 ± 28.5), sedangkan sampel darah yang tidak disaring memiliki nilai rasio yang lebih konsisten yakni berkisar antara 1.64 - 2.13 (rerata = 1.94, SD = 0.13). Tabel lengkap jumlah DNA dari masing-masing sampel ditampilkan pada Tabel 1 (lampiran).

Real-time PCR (qPCR)

Dari seluruh sampel, darah yang tidak disaring memiliki lebih banyak DNA dengan kualitas yang lebih baik jika dibandingkan dengan darah yang disaring. Delapan dari sembilan darah yang tidak difilter mengamplifikasi control internal 18S RNA. Sampel tersebut adalah QA53892, QA519113, QA64196, QA53957, QA39451, QA65281, QA53955, dan K55519. Sementara itu, sampel yang difilter tidak memiliki jumlah DNA yang cukup baik untuk proses amplifikasi control. Namun demikian, tidak satupun sampel dari kedua kelompok perlakuan menghasilkan hasil positif pada uji qPCR terhadap sampel *Neospororchis* spp. Hasil lengkap qPCR ditampilkan pada Tabel 2 (lampiran).

Pembahasan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi infeksi spirorchiid dengan mengukur DNA parasit melalui tes qPCR pada sampel darah. Darah dipilih menjadi sampel karena dapat dengan mudah didapat dari individu yang masih hidup, tidak seperti sampel jaringan, terutama jaringan otak yang sering kali digunakan untuk mendeteksi spirorchiid terutama golongan *Neospororchis* (Chapman et al., 2016; Stacy et al., 2010). Salah satu permasalahan yang muncul saat uji berlangsung yakni DNA yang dapat diekstraksi tergolong sedikit. Salah satu upaya yang dilakukan untuk “memperbanyak” jumlah DNA yang bisa diekstraksi, penyaringan dilakukan pada sampel darah. Jika hal ini berhasil dilakukan, maka studi ini akan menghasilkan satu inovasi teknik untuk

mendiagnosa infeksi spirorchiid pada populasi penyu yang masih hidup dialam liar.

Sayangnya, tidak adak hasil positif yang didapat saat seluruh sampel diuji dengan DNA *Neospororchis* sp, walaupun kelompok sampel darah yang disaring memiliki cukup DNA yang berkualitas untuk proses amplifikasi. Hal ini kemudian divalidasi oleh control positif *Neospororchis*. Tidak munculnya hasil positif kemungkinan akibat: 1) fase hidup parasite terutama saat fase non-menular/ dorman yang mempengaruhi klinis serta tingkat infeksi pada inang dan 2) buruknya kualitas DNA yang didapat saat proses filtrasi dan ekstraksi. Infeksi yang ringan hingga tidak ada infeksi sama sekali atau fase dorman (non siklik) dari parasite dapat menjadi alasan rendahnya jumlah ova yang beredar dalam darah (Jarquín-Díaz et al., 2022). Menurunnya derajat infeksi bisa terjadi jika individu mendapat penanganan berupa pemberian anthelminthic. Hal ini terjadi pada sampel yang diambil dari sampel FRD, yang merupakan penyu yang ditangkarkan di Australian Zoo dan telah mendapatkan pengobatan anti parasite selama kurun waktu yang tidak diketahui.

Kegagalan proses amplifikasi dapat juga terjadi akibat buruknya kualitas atau absennya DNA dalam darah. Hal ini terlihat jelas pada kelompok sampel darah yang disaring, dimana jumlah dan kualitas DNA nya secara signifikan lebih rendah dari sampel yang tidak disaring. Penurunan jumlah dan kualitas DNA ini dapat disebabkan oleh denaturasi yang terjadi saat proses *bead-beating*. Keberhasilan metoda *bead-beating* ini untuk mengekstraksi DNA bergantung pada durasi dan jenis buffer yang digunakan. Semakin lama *bead-beating* dilakukan, maka jumlah DNA yang dihasilkan cenderung lebih sedikit (Fujimoto, Nakagami, & Kojima, 2004). Oleh karenanya, menemukan durasi yang tepat menjadi salah satu kunci keberhasilan ekstraksi DNA. Selain durasi, penggunaan buffer jenis sorbitol atau high sodium dodecyl sulfat (SDS) daripada aquades dapat menghasilkan DNA yang lebih banyak dan berkualitas (Griffiths et al., 2006; Wehausen, Ramey, & Epps, 2004; Yu & Morrison, 2004). Penggunaan buffer ini dapat melindungi DNA dari panas yang diciptakan saat proses *bead-beating* (Yu & Morrison, 2004).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Studi ini menunjukkan bahwa deteksi DNA *Neospororchis* spp. melalui sampel darah menggunakan qPCR belum berhasil dilakukan, baik pada darah yang disaring maupun tidak disaring. Sampel darah yang tidak disaring menghasilkan DNA dalam jumlah dan kualitas yang lebih tinggi dibandingkan yang disaring, dan lebih konsisten dalam mengamplifikasi kontrol internal. Gagalnya deteksi DNA target kemungkinan disebabkan oleh tidak adanya infeksi, rendahnya tingkat infeksi, atau kualitas DNA yang buruk akibat proses filtrasi dan *bead-beating*. Oleh karena itu, optimalisasi metode ekstraksi DNA—termasuk durasi *bead-beating* dan penggunaan jenis buffer yang sesuai—menjadi penting untuk meningkatkan keberhasilan deteksi molekuler parasit spirorchiid pada darah.

Saran

Penelitian selanjutnya disarankan untuk mengevaluasi dan mengoptimalkan metode ekstraksi DNA, khususnya dengan memperhatikan durasi *bead-beating* dan pemilihan jenis buffer yang digunakan, seperti sorbitol atau SDS, guna meminimalkan denaturasi dan meningkatkan kualitas serta kuantitas DNA yang dihasilkan. Pengembangan teknik alternatif untuk memperkaya DNA parasit dalam darah tanpa menyebabkan degradasi, serta mempertimbangkan penggunaan jenis sampel lain seperti jaringan perlu diupayakan untuk meningkatkan keberhasilan deteksi molekuler. Saran lainnya yang penting, terutama dalam bidang klinis, yakni pemberian obat antihelminthik secara regular dilakukan untuk menekan infeksi *Spirorchiid* pada penyu hijau.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Paul Mills dan Dr. Phoebe Chapman sebagai peneliti utama sekaligus pembimbing yang telah memberikan kesempatan untuk mengambil bagian dari penelitian ini sekaligus memberikan dukungan dan arahan saat studi dan proses penulisan berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

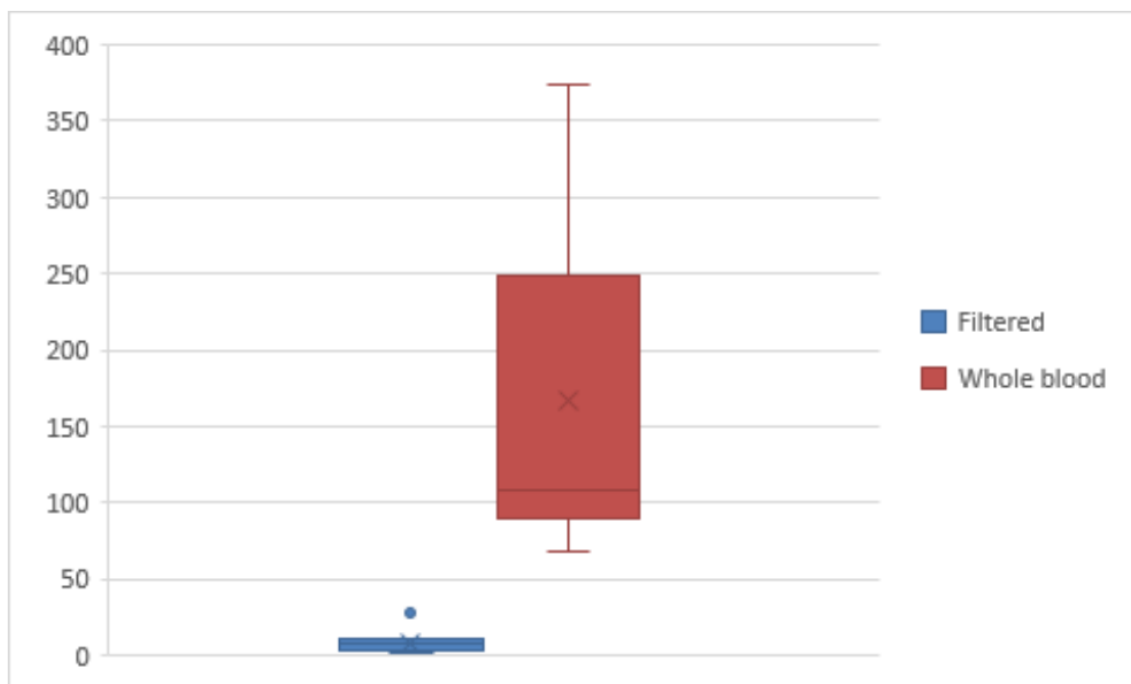
- Chapman, P. A., Traub, R. J., Kyaw-Tanner, M. T., Owen, H., Flint, M., Cribb, T. H., & Mills, P. C. (2016). Terminal restriction fragment length polymorphism for the identification of spirorchiid ova in tissues from the green sea turtle, *Chelonia mydas*. *PLoS One*, 11(8), e0162114. doi:10.1371/journal.pone.0162114
- Dickerson, J. W., Eberhard, M. L., & Lammie, P. J. (1990). A technique for microfilarial detection in preserved blood using nuclepore filters. *The Journal of parasitology*, 829-833. doi:10.2307/3282801
- Flint, M., Patterson-Kane, J. C., Limpus, C. J., & Mills, P. C. (2010). Health surveillance of stranded green turtles in Southern Queensland, Australia (2006–2009): an epidemiological analysis of causes of disease and mortality. *EcoHealth*, 7, 135-145. doi:10.1007/s10393-010-0300-7
- Fujimoto, S., Nakagami, Y., & Kojima, F. (2004). Optimal bacterial DNA isolation method using bead-beating technique. *Memoirs Kyushu Univ Dep Of Health Scis Of Medical Sch*, 3, 33-38.
- Gordon, A. N. (2005). A necropsy-based study of green turtles (*Chelonia mydas*) in south-east Queensland. Retrieved from <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:158740>
- Griffiths, L. J., Anyim, M., Doffman, S. R., Wilks, M., Millar, M. R., & Agrawal, S. G. (2006). Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *Journal of Medical microbiology*, 55(9), 1187-1191. doi:10.1099/jmm.0.46510-0
- Jacobson, E. R., Homer, B. L., Stacy, B. A., Greiner, E. C., Szabo, N. J., Chrisman, C. L., . . . Landsberg, J. H. (2006). Neurological disease in wild loggerhead sea turtles *Caretta caretta*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 70(1-2), 139-154. doi:10.3354/dao070139
- Jarquín-Díaz, V. H., Balard, A., Ferreira, S. C. M., Mittné, V., Murata, J. M., & Heitlinger, E. (2022). DNA-based quantification and counting of transmission stages provides different but complementary parasite load estimates: an example from rodent coccidia (*Eimeria*). *Parasites & vectors*, 15(1), 45. doi:<https://doi.org/10.1186/s13071-021-05119-0>
- Stacy, B. A., Foley, A. M., Greiner, E., Herbst, L. H., Bolten, A., Klein, P., . . . Jacobson, E. R. (2010). Spirorchiidiasis in stranded loggerhead *Caretta caretta* and green turtles *Chelonia mydas* in Florida (USA): host pathology and significance. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89(3), 237-259. doi:10.3354/dao02195
- Wehausen, J., Ramey, R. n., & Epps, C. (2004). Experiments in DNA extraction and PCR amplification from bighorn sheep feces: the importance of DNA extraction method. *Journal of Heredity*, 95(6), 503-509. doi:10.1093/jhered/esh068
- Yu, Z., & Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*, 36(5), 808-812. doi:10.2144/04365ST04

Tabel

Tabel 1. Data pengukuran kualitas DNA pada sampel darah menggunakan

Sample ID	260/280		ng/U	
	Disaring	Tidak disaring	Disaring	Tidak disaring
QA53957	-7.0455	2.01	3.2	102.3
K5551912	2.475	2	27.2	90.5
QA64196	-0.27	1.91	0.95	176.1
QA519113	3.23	1.64	8.8	174.6
QA39413	-4.07	2.13	4.15	68.2
QA65281	84.67	1.97	7.8	107.5
QA53892	-0.375	1.92	1.19	374.3
QA53955	4.99	1.92	11	322.3
FRD	-0.875	2	7.9	88.65

Grafik



Grafik 1. Diagram Boxplot menunjukkan perbedaan signifikan jumlah DNA spirorchiid pada sampel yang filtrasi (biru); kisaran jumlah DNA 68.2 - 374.3 ng/ μ L (mean=16.7 $\pm$ 110.0 ng/ μ L) dan yang tidak difiltrasi (merah); kisaran jumlah DNA 95-7.92 ng/ μ L (mean = 8.02 $\pm$ 8.00ng/ μ L)