

**Deteksi Penyakit WSSV (White Spot Syndrome Virus) pada Udang Vannamei
(*Litopenaeus vannamei*) dengan Metode PCR Konvensional dan Real Time PCR (qPCR)
Menggunakan Hydrolisis Probe**

Heppi Maryati, Sudarto, dan Reni Nurjasm

Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Respati Indonesia

Abstrak

Diagnosa WSSV yang menyerang udang vannamei dapat dilakukan secara dini menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) baik secara konvensional maupun real time PCR (qPCR), sehingga dapat diambil tindakan pencegahan khususnya pada benur udang yang akan ditebar. Kedua metode tersebut mampu mendeteksi virus melalui keberadaan DNA virus namun memiliki efektivitas yang berbeda, namun belum diketahui sejauh mana efektivitas kedua metode tersebut mampu mendeteksi virus khususnya penyebab WSSV. Tujuan penelitian adalah mengetahui efektivitas metode PCR konvensional dan Metode real time PCR (qPCR) menggunakan hydrolisis probe mendeteksi penyakit pada udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*).

Metode penelitian menggunakan metode eksperimen bersifat kualitatif dilaksanakan di Laboratorium Biomolekuler di Balai Uji Standar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BUSKIPM). Sampel udang vannamei diambil dari tambak udang di Kecamatan Blanakan Subang Jawa Barat yang terdiri atas masing-masing 6 ekor udang berumur 20 hari atau udang yang belum mengalami gejala klinis dan udang berumur 45 atau udang yang sudah mengalami gejala klinis, kemudian dilakukan ekstraksi DNA sampel udang. DNA udang diamplifikasi menggunakan metode konvensional PCR dan real time PCR. Data hasil amplifikasi dianalisis menggunakan metode deskriptif komparatif yaitu metode pembahasan yang memaparkan atau menggambarkan kegiatan yang dilakukan serta membandingkan dengan literatur. Analisis data sesuai dengan software real-time PCR yang digunakan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode konvensional PCR memberikan hasil negatif pada sampel udang berumur 20 hari dan positif pada udang berumur 45 hari sedangkan metode real time PCR memberikan hasil positif pada sampel udang berumur 20 hari dan 45 hari, sehingga dapat disimpulkan bahwa metode real time PCR (qPCR) lebih efektif mendeteksi penyakit WSSV pada udang vannamei dibandingkan metode PCR konvensional.

Kata kunci: udang vannamei, penyakit WSSV, PCR konvensional, real time PCR

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki garis pantai yang terpanjang di dunia, sehingga membuat budidaya udang menjadi mudah dikembangkan. Udang merupakan salah satu hasil budidaya perikanan yang mempunyai nilai ekonomis dan permintaan pasar yang tinggi. Produksi udang nasional pada tahun 2011 adalah 400.385 ton kemudian meningkat pada tahun 2012 menjadi 457.600 ton. Produksi udang pada tahun 2014 diharapkan naik 74,75% menjadi 699.000 ton. Dalam sektor ekspor perikanan, ekspor udang menyumbang devisa bagi negara sebesar 3,9 miliar dollar AS. Tahun 2013, kontribusi udang mencapai 40% dari total nilai ekspor perikanan yang ditargetkan mencapai 5 miliar dollar AS (Anonim, 2013).

Udang Vannamei mulai dibudidayakan secara intensif di Indonesia sejak tahun 2001 berdasarkan Surat Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No. 14/2001 tanggal 12 Juli 2001 (Adiwidjaya, 2008). Udang vannamei memiliki kelebihan yaitu memiliki pertumbuhan yang cepat, dapat dibudidayakan dengan kepadatan tinggi dan harga pasar yang cukup tinggi (Nuraini dkk., 2007). Produksi udang vannamei sendiri meningkat sejak tahun 2005 dari 280.629 ton menjadi 400.300 ton di tahun 2010, namun pada tahun 2009 mengalami penurunan dari produksi sebelumnya sebesar 61.490 ton (KKP, 2010b). Pertumbuhan budidaya udang vannamei yang semakin pesat serta perubahan iklim lokal membuat keseimbangan lingkungan berubah. Hal ini menyebabkan daya tahan udang menurun, sehingga mudah terkena penyakit. Penyakit infeksi dapat timbul karena lingkungan hidup yang tidak sehat atau hilangnya keseimbangan antara patogen, lingkungan dan inang, yang menyebabkan stress pada udang. Faktor-faktor penyebab menurunnya ketahanan tubuh organisme udang terhadap serangan penyakit, karena kualitas lingkungan yang buruk, jika hal ini dibiarkan secara terus-menerus maka kematian secara massal akan terjadi sehingga populasi akan menurun.

Salah satu penyakit udang yang mematikan adalah White Spot Syndrome Virus (WSSV). Penyakit ini mempunyai inang yang sangat luas, tidak hanya jenis udang penaeid namun bisa menyerang decapoda (Lo et al., 1996a, Lo et al., 1996b). WSSV dapat menyebabkan kerugian secara ekonomis yang sangat besar. Kerugian yang telah ditimbulkan sejak pertama kali wabah di Asia pada tahun 1992 hingga tahun 2001 adalah sebesar 4 hingga 6 juta dollar AS (Lightner, 2003). Kematian udang pada umur satu sampai dua bulan di tambak sudah menjadi hal yang umum sebagai akibat serangan virus bercak putih, yang mengakibatkan ribuan hektar tambak tidak dapat berproduksi lagi. Hal ini berdampak terhadap kerugian Negara yang diperkirakan mencapai 2,5 triliun rupiah per tahun (Ditjen Perikanan Budidaya, 2004).

Wabah WSSV dilaporkan telah menyerang udang Windu di Sidoarjo yang mengakibatkan petambak mengalami kerugian besar. Selain menyerang udang Windu, wabah ini juga menyerang udang vannamei dan telah mewabah lebih dari satu dekade terakhir (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2014). Oleh sebab itu, diperlukan metode diagnosa dini yang cepat, sensitif dan akurat sebagai langkah pencegahan awal terhadap penyebaran penyakit ini.

Usaha mengatasi WSSV adalah melakukan diagnosa dini dalam deteksi WSSV yang menyerang udang vannamei. Kegiatan diagnosa meliputi pengujian, deteksi dan identifikasi untuk mengetahui jenis virus yang menyerang secara spesifik. Salah satu pendekatan yang dapat digunakan adalah biologi molekuler menggunakan metode PCR konvensional dan metode Real Time PCR. Virus yang menginfeksi udang dalam jumlah sedikit dan belum menimbulkan gejala penyakit pada udang dapat dideteksi dengan menggunakan alat PCR. Keberadaan virus dapat dilacak sejak dini karena bahan genetik virus yang jumlahnya sedikit dapat digandakan dengan PCR sehingga keberadaannya segera dilacak dan dapat diambil tindakan pencegahan khususnya pada benur udang yang akan ditebar.

Pada analisa PCR konvensional deteksi keberadaan DNA dilakukan pada akhir reaksi dan pengamatan keberadaan DNA hasil amplifikasi dilakukan di gel agarose setelah dilakukan proses elektroforesis. Sedangkan analisa menggunakan real time PCR pengamatan hasil pada saat reaksi berlangsung, keberadaan DNA hasil amplifikasi dapat

diamati pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi dari probe (penanda).

2. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas metode PCR konvensional dan Metode real time PCR (qPCR) menggunakan hidrolisis probe mendeteksi penyakit pada udang *Vannamei* (*Litopenaeus vannamei*).

3. BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah pengukur konsentrasi asam nukleat berbasis spektrofotometri, freezer (-20°C atau lebih rendah), waterbath, laminar air flow, mesin real-time PCR, mini mixer, mikropipet ukuran 0,1µl-1.000µl, pinset, gunting, rak blok es, sentrifus, masker, penggerus, sarung tangan, tabung dan mikro ukuran 0,2 ml; 1,5 ml-2 ml. Bahan yang digunakan yaitu buffer tris EDTA (TE) (konsentrasi 10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH 7,5), *nuclease-free water*, etanol *p.a*, *filtered microtip* berbagai ukuran 10 µl – 1 000 µl, isopropanol (2-propanol), kloroform, *kit real-time PCR* komersial kompatibel dengan *TaqMan® probe*, larutan ekstraksi DNA komersial, larutan *DNase*, plasmid standar positif, 1 set primer dan *probe* (PrimerWSSV270:5'-ACCATGGAGAAGATATGTACAAGCA-3'; PrimerWSSV345:5'-GGCATGGACAGTCAGGTCTTT-3'; WSSV296Tprobe:5'-FAM- TTACAGTGATGGAATTCGTTTATC-TAMRA).

3.1. Metode Penelitian

Metode penelitian menggunakan metode eksperimen kualitatif dilaksanakan di Laboratorium Biomolekuler di Balai Uji Standar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BUSKIPM).

a. Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel udang *vannamei* yang diperoleh dari tambak udang yang berasal dari daerah Blanakan kabupaten Subang Jawa Barat, jumlah sampel yang di siapkan sebanyak 6 ekor udang yang belum mengalami gejala klinis dengan umur udang 20 hari, kemudian sampel sebanyak 6 ekor udang berumur 45 hari yang sudah mengalami gejala klinis. Sampel udang yang masih berupa fiksatif dimasukkan ke dalam larutan alkohol 96%. Selanjutnya dilakukan nekropsi pada sampel berupa pengambilan organ target sampel yaitu kaki renang yang akan di ekstraksi DNA.

b. Ekstraksi DNA

Contoh uji sebanyak 20 mg dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml kemudian ditambahkan 600 µl larutan kit ekstraksi DNA komersial *Dodecyl trimethyl bromide* (DTAB) dan dihomogenkan menggunakan penggerus pelet. Larutan diinkubasi pada suhu 75°C selama 5 menit lalu didinginkan sampai suhu ruang, kemudian ditambahkan Kloroform sebanyak 700 µl ke dalam tabung lalu divortex sampai tercampur rata selama 20 detik. Sisa-sisa jaringan diendapkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan atau cairan lapisan paling atas dipindahkan ke dalam tabung baru sebanyak 200 µl, kemudian ditambahkan larutan kit ekstraksi *Cetyl Trimethylammonium Bromide* (CTAB) sebanyak 100 µl dan ddH₂O sebanyak 900 µl setelah itu divortex dan inkubasi pada suhu 75°C selama 5 menit, lalu didinginkan sampai suhu ruang, DNA diendapkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Larutan bening hasil sentrifugasi kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikro

baru yang sudah berisi 300 µl etanol 95%, lalu larutan dihomogenkan kemudian disentrifugasi pada 12000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang lalu pelet dicuci dengan dengan 200 µl etanol 75% lalu disentrifugasi pada kecepatan 7.500 rpm selama 2 menit. Pelet dikeringkan kemudian dilarutkan dengan 50 – 100 µl dd2H₂O atau TE *buffer*, lalu simpan larutan DNA pada suhu -20°C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada *freezer* dengan suhu yang lebih rendah (<-40°C) dalam bentuk aliquot.

3.2. Pemeriksaan dengan Metode PCR Konvensional

a. Amplifikasi PCR

Kegiatan amplifikasi ini bertujuan untuk menggandakan DNA yaitu melalui 2 kali proses amplifikasi, pada amplifikasi pertama atau First Step PCR dibutuhkan komponen yaitu:

Tabel 1. Komposisi First Step PCR

No.	Komponen	Volume/reaksi (µl)
1.	Go Taq Green	12
2.	Primer Forward (10 Mm)	1
3.	Primer Reverse (10 Mm)	1
4.	Template DNA	4
5.	NFW (Nucleous Free Water)	7
Total Volume		25

Tabel 2. Profil Amplifikasi Single Step PCR

		94 °C, 4 Menit
	Pre Heat	55 °C, 1 Menit
		72 °C, 2 Menit
40	Siklus	
	<i>Denaturasi</i>	94 °C, 60 detik
	<i>Annealing</i>	55 °C, 60 detik
	<i>Ekstensi</i>	72 °C, 2 menit
	<i>Final ekstensi</i>	72 °C, 5 menit
	<i>Hold/End</i>	4 ^o ,
	<i>Amplicon</i>	1447 bp

Dengan membuat *Master Mix* yang merupakan campuran dari primer F, R, Go Taq Green dan NFW sesuai dengan jumlah reaksi uji ditambah 2 kontrol (+) dan kontrol (-), semua komposisi di tabel 1 dicampur menjadi 1 tube dihomogenkan dengan divortex lalu di spindown. Setelah itu di amplifikasi dalam mesin PCR sesuai dengan profil PCR WSSV pada tabel 2. Proses amplifikasi pertama akan menghasilkan produk First PCR atau yang biasa disebut *amplicon*, dan sebanyak 1-2 µl produk amplicon ini akan digunakan sebagai sampel untuk amplifikasi kedua dari metode *Nested PCR*.

Tabel 3. Komposisi Nested PCR

No.	Komponen	Volume/reaksi (µl)
1.	Go Taq Green	12
2.	Primer NF (10 Mm)	1
3.	Primer NR (10 Mm)	1
4.	Template DNA	2
5.	NFW (Nucleous Free Water)	9

No.	Komponen	Volume/reaksi (µl)
	Total Volume	25

Tabel 4. Profil Amplifikasi Nested PCR

		94 °C, 4 Menit
	Pre Heat	55 °C, 1 Menit
		72 °C, 2 Menit
40	Siklus	
	<i>Denaturasi</i>	94 °C, 60 detik
	<i>Annealing</i>	55 °C, 60 detik
	<i>Ekstensi</i>	72 °C, 2 menit
	<i>Final ekstensi</i>	72 °C, 5 menit
	<i>Hold/End</i>	4 ^o
	Amplicon	941 bp

Dengan membuat *Master Mix* yang merupakan campuran dari primer NF, NR, Go Taq Green dan NFW sesuai dengan jumlah reaksi uji ditambah 2 kontrol (+) dan kontrol (-), semua komposisi di tabel I dicampur menjadi 1 tube dihomogenkan dengan divortex lalu di spindown. Setelah itu di amplifikasi dalam mesin PCR sesuai dengan profil PCR WSSV pada tabel 4. Proses amplifikasi kedua atau *Nested PCR* ini merupakan proses akhir dari kegiatan amplifikasi WSSV dan kemudian akan dilakukan proses selanjutnya yaitu elektroforesis.

b. Elektroforesis

Amplicon yang didapat dari hasil amplifikasi dianalisa lebih lanjut dengan Elektroforesis gel agarose untuk menunjukkan hasil dari WSSV pada udang vannamei. Berikut langkah-langkah proses elektroforesis adalah pembuatan agarose dengan konsentrasi 1,5% dengan cara menimbang agarose sebanyak 0,75g lalu dilarutkan dalam 50ml TAE (*Tris Acis ADTA*) Buffer 1x, kemudian dipanaskan dalam microwave sampai gel agarose benar benar larut dan berwarna bening. Kemudian didinginkan sampai suhu 50 °C lalu ditambahkan 4 µl SYBR Safe, agarose yang telah larut dimasukkan didalam bejana elektro tunggu sampai agarose mengeras, setelah itu larutan TAE buffer 1x dituang ke dalam bejana elektroforesis kemudian masukkan ke dalam lubang sumuran gel secara berurutan marker/ladder, kontrol positif, kontrol negatif dan amplicon sampel. Kemudian dialiri listrik dengan tegangan 100 volt selama ± 30 menit sampai pita turun dengan ditandai dengan berpindahnya amplicon ke bagian bawah gel agarose. Setelah *bands* turun kemudian gel agarose dipindahkan ke dalam mesin *UV Transmilluminator* yang sudah dikoneksikan dengan PC dengan program UVITEC untuk dapat melihat dan membaca hasilnya.

3.4.2 Pemeriksaan dengan Metode Real Time PCR

a. Amplifikasi Real Time PCR

DNA *template*, Quantitect 2x PCR Master Mix, primer, *probe*, *Nuclease-free water* dibiarkan cair dengan meletakkan bahan tersebut di atas rak blok es. Preparasi *master mix* dibuat sesuai yang disajikan pada Tabel 5. Volume *mastermix*_{n+1} (n= setiap 10 jumlah reaksi) disiapkan lebih banyak dari yang dibutuhkan. Contoh uji minimal dianalisis secara duplo. Semua bahan *master mix* dihomogenkan dan distribusikan ke dalam masing-masing tabung PCROptikal kemudian dimasukkan 2 µl *template* DNA (10 ng – 100 ng) contoh uji, kontrol positif ekstraksi; kontrol negatif ekstraksi, kontrol positif

amplifikasi (DNA); kontrol negatif amplifikasi (NTC); dan 4 standar positif (10^1 copies; 10^2 copies; 10^3 copies; 10^4 copies). Setelah itu, dilakukan amplifikasi dengan real time PCR, dengan kondisi sesuai Tabel 6.

Tabel 5- Komposisi koktail untuk Qpcr

No.	Komponen	Volume/reaksi (μ l)	Konsentrasi akhir
1.	Quantitect 2x PCR <i>master mix</i>	12,5	1 x
2.	<i>Primer Forward</i> (20 Mm)	0,5	0,4 Mm
3.	<i>Primer Reverse</i> (20 Mm)	0,5	0,4 Mm
4.	<i>Probe</i> (10 Mm)	0,5	0,2 Mm
5.	<i>DNAase free water</i>	9	-
6.	<i>Template DNA</i>	2	10 ng-100 ng
Total Volume		25	

Tabel 6. Program amplifikasi

Proses	Suhu ($^{\circ}$ C)	Waktu	
<i>PCR initial Activation</i>	95	15 menit	1
<i>Denaturasi</i>	94	15 detik	40
<i>Annealing/extension</i>	60	60 detik	40

b. Analisa Data

Data dianalisis menggunakan metode deskriptif komparatif yaitu metode pembahasan yang memaparkan atau menggambarkan kegiatan yang dilakukan serta membandingkan dengan literatur. Analisis data sesuai dengan *software real-time PCR* yang digunakan. Contoh uji dinyatakan positif apabila terlihat naiknya kurva di atas garis *threshold/cut off* dan nilai Ct lebih kecil atau sama dengan LoD, semakin cepat naik atau munculnya kurva dan memotong garis *threshold/cut off* menunjukkan jumlah *copy* DNA virus yang semakin banyak atau konsentrasinya tinggi, contoh uji dinyatakan negatif apabila berada dibawah garis *threshold/cut off* dan nilai Ct lebih besar dari LoD dengan tingkat kepercayaan (*confident level*) 95%.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Deskripsi Sampel Udang

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu udang yang berasal dari daerah kecamatan Blanakan kabupaten Subang Jawa Barat, sampel sebanyak 12 ekor udang vannamei, sampel sebanyak 6 ekor udang yang berumur 20 hari belum mengalami tanda-tanda gejala klinis terinfeksi virus WSSV yang diberi kode B1, B2, B3, B4, B5 dan B6, sampel kedua sebanyak 6 ekor udang berumur 45 hari yang diberi kode A1, A2, A3, A4, A5 dan A6 dimana sampel udang tersebut sudah mengalami tanda-tanda gejala klinis terinfeksi virus WSSV.

Hasil Deteksi WSSV dengan PCR Konvensional

Hasil deteksi virus WSSV pada sampel udang vannamei umur 20 hari menggunakan metode uji PCR konvensional keseluruhan sampel menunjukkan negatif terinfeksi WSSV, ditandai dengan tidak adanya pita pada 941bp. Sampel udang B1, B2, B3, B4, B5 dan B6 (gambar 4) dinyatakan negatif terinfeksi virus WSSV.

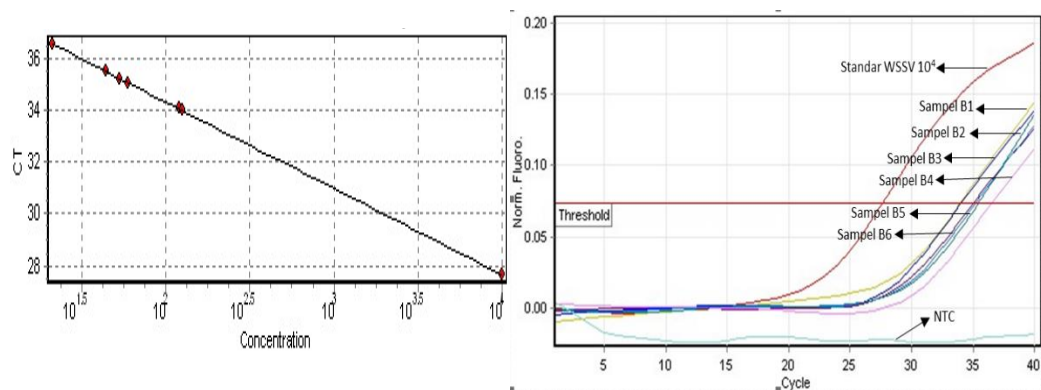
Pada udang vannamei usia 20 hari terdiri dari enam (6) sampel udang yang diperiksa dengan menggunakan PCR konvensional hasil pengujian negatif terinfeksi

virus WSSV disajikan pada (gambar 4) terlihat bahwa sumur 1 adalah DNA Marker ladder 100 bp, sumur 2 adalah kontrol positif dan sumur 3 adalah kontrol negatif sedangkan sumur 4 sampai sumur 9 adalah sampel yang di uji, pada sumur 4 sampai sumur 9 adalah sampel kode B1, B2, B3, B4, B5 dan B6 tidak menunjukkan adanya pita DNA WSSV. Menurut Dwinanti (2006), pada PCR Konvensional hasil negatif yang salah dapat disebabkan karena jumlah kopian DNA yang tidak mencukupi dan tingkat infeksi yang terlalu rendah sehingga pita DNA berpendar redup atau bahkan tidak berpendar. Hal ini juga berbeda dengan pendapat Natividat *et al.*, 2006 bahwa sampel yang terinfeksi virus WSSV jika pada jalur DNA genom muncul pita DNA pada 211bp.

Sedangkan hasil deteksi virus WSSV pada sampel udang vannamei umur 45 hari menggunakan metode uji PCR Konvensional keseluruhan sampel menunjukkan hasil positif terinfeksi WSSV, ditandai dengan adanya pita pada 941bp. Sampel A1, A2, A3, A4, A5 dan A6 (gambar 5) dinyatakan positif terinfeksi WSSV. Pada udang vannamei usia 45 hari terdiri dari enam (6) sampel udang yang diperiksa dengan menggunakan metode uji PCR konvensional hasil pengujian disajikan pada (gambar 5) terlihat bahwa sumur 1 adalah DNA Marker ladder 100bp, sumur 2 adalah kontrol positif dan sumur 3 adalah kontrol negatif sedangkan sumur 4 sampai sumur 9 adalah sampel yang di uji yaitu kode A1, A2, A3, A4, A5 dan A6 menunjukkan hasil positif karena terlihat perpendaran pita DNA WSSV berada pada 941 bp. Hal ini sesuai dengan pendapat Natividat *et al.*, 2006 bahwa sampel yang terinfeksi oleh *White Spot Syndrome Virus* jika pada jalur DNA genom muncul pita DNA pada 211bp.

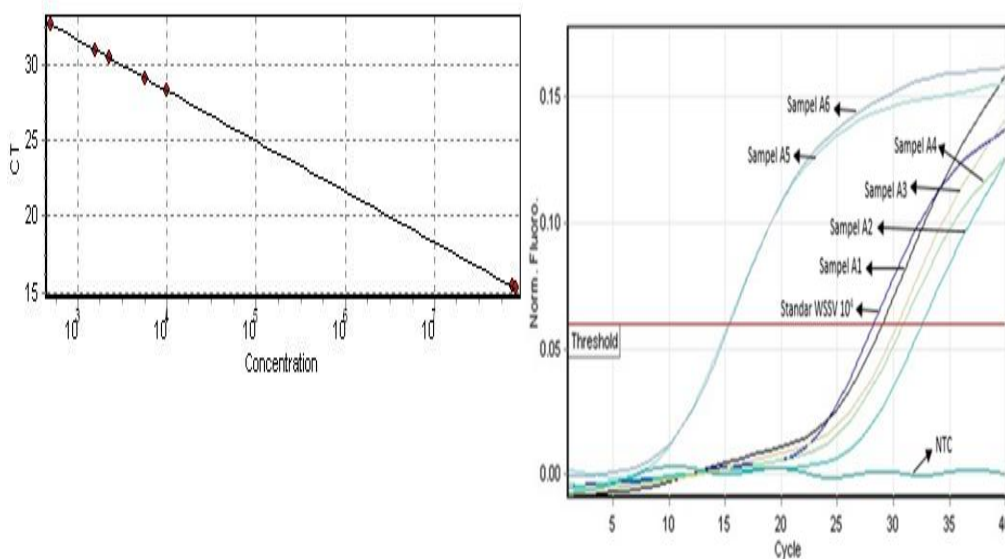
Deteksi WSSV dengan *Real Time PCR* (qPCR)

Hasil deteksi *real time PCR* (qPCR) pada sampel udang vannamei umur 20 hari menunjukkan keseluruhan sampel positif terinfeksi WSSV. Berdasarkan hasil uji *real time PCR* (qPCR) pada (gambar 6 dan Tabel 7) menunjukkan nilai *cycle threshold* (CT) masing-masing sampel kode B1, B2, B3, B4, B5 dan B6 adalah 33, 34, 35, 36, 35, dan 35, konsentrasi jumlah kopi salinan virus WSSV tersebut berkisar antara $2,1-1,25 \times 10^2$ kopi. Nilai *cycle threshold* (CT) diperoleh berdasarkan adanya akumulasi sinar *fluoresens* dan melintasi *base line threshold* (Koesharyani *et al.*, 2004). Kurva standar dengan tingkatan pengenceran DNA virus 10.000 dan grafik hasil amplifikasi disajikan pada Gambar 6 dan Tabel 7.



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1	Red	Standar WSSV 10 ⁴	Standard	27.66	10,000.0	10,000.0
2	Yellow	Sampel B1	Unknown	33.96		125.3
3	Blue	Sampel B2	Unknown	34.03		119.3
4	Purple	Sampel B3	Unknown	35.03		59.4
5	Pink	Sampel B4	Unknown	36.52		21.1
6	Light Blue	Sampel B5	Unknown	35.20		53.0
7	Teal	Sampel B6	Unknown	35.45		44.2
8	Light Green	NTC	Unknown			

Hasil deteksi terhadap virus *White Spot Syndrome Virus* pada udang vannamei umur 45 hari dengan *real time* PCR (qPCR) keseluruhan sampel kode A1, A2, A3, A4, A5 dan A6 menunjukkan hasil positif terinfeksi virus WSSV dengan nilai *cycle threshold*(CT) masing-masing sampel adalah 29, 32, 30, 30,15 dan 15, Adapun konsentrasi masing-masing sampel berkisar antara 1,5-8,1x10⁷kopi. Kurva standar dengan tingkatan pengenceran DNA virus 10.000 dan grafik hasil amplifikasi disajikan pada gambar 7 dan tabel 8. Deteksi terhadap virus WSSV menggunakan *Real Time* PCR (qPCR) pada sampel udang vannamei umur 45 hari apabila dilihat pada grafik Amplifikasi positif control WSSV (kurva Standar) dan grafik amplifikasi sampel, menunjukkan hasil positif karena adanya akumulasi pada signal fluorensen dan melintasi *baselane threshold* sedangkan NTC tidak melintasi *baselane threshold* yang menunjukkan hasil negatif, disajikan pada Tabel 8.



Tabel 8. Hasil amplifikasi WSSV sampel udang umur 45 hari

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1	Blue	Standar WSSV 10 ⁴	Standard	28.24	10,000.0	10,000.0
2	Black	Sampel A1	Unknown	29.03		5,744.7
3	Cyan	Sampel A2	Unknown	32.54		500.5
4	Gold	Sampel A3	Unknown	30.37		2,264.3
5	Green	Sampel A4	Unknown	30.89		1,578.2
6	Light Green	Sampel A5	Unknown	15.30		81,007,532.5
7	Light Blue	Sampel A6	Unknown	15.44		73,467,650.1
8	Teal	NTC	Unknown			

Perbandingan Hasil Pengujian PCR Konvensional dan *Real Time* PCR (qPCR)

Hasil pemeriksaan udang vannamei umur 20 hari dan 45 hari yang diduga terinfeksi virus WSSV menggunakan PCR Konvensional dan *real time* PCR, menunjukkan hasil yang berbeda (Tabel 9).

Tabel 9. Hasil Perbandingan Pengujian PCR Konvensional dengan *Real Time* PCR

	Sampel	Konvensional	PCR		WSSV
1.	Kontrol (-)	Negatif	Negatif	0	0
2.	Kontrol (+)	Positif	Positif	27.66	10.000
3.	B1	Negatif	Positif	33.96	125.3
4.	B2	Negatif	Positif	34.03	119.3
5.	B3	Negatif	Positif	35.03	59.4
6.	B4	Negatif	Positif	36.52	21.1
7.	B5	Negatif	Positif	35.20	53.0
8.	B6	Negatif	Positif	35.45	44.2
9.	Kontrol (-)	Negatif	Negatif	0	0
10.	Kontrol (+)	Positif	Positif	28.24	10.000
11.	A1	Positif	Positif	29.03	5,744.7
12.	A2	Positif	Positif	32.54	500.5
13.	A3	Positif	Positif	30.37	2,264.3
14.	A4	Positif	Positif	30.89	1,578.2
15.	A5	Positif	Positif	15.30	81,007.532.5
16.	A6	Positif	Positif	15.04	73,467.650.0

Ket: B= sampel udang vannamei berumur 20 hari

A= sampel udang vannamei berumur 45 hari

5. KESIMPULAN

Real Time PCR (qPCR) lebih sensitif dan efektif dalam mendeteksi adanya penyakit *White Spot Syndrome Virus* pada udang vannamei yang berumur 20 hari, dibandingkan dengan metode PCR konvensional yang hanya mampu mendeteksi adanya virus *White Spot Syndrome Virus* pada udang vannamei umur 45 hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiwijaya, D., Sucipto dan I. Sumantri. 2008. Penerapan Teknologi Budidaya Udang *Vannamei* (*L. vannamei*) Semi Intensif Pada Lokasi Tambak salinitas Tinggi. Media Budidaya Air Payau Perekayasa Vol. 7. Halaman 54 – 72. Balai Besar Pengembangan Air Payau Jepara.
- Anonim, 2013. *Real Time PCR*. <http://www.lab.biomol.com/2013/01/real-time-PCR-qPCR.html>
- Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. 2006. *Uji Teknologi Budidaya Udang Bebas Penyakit Bercak Putih*. Mina Bahari, 3 (02):16-17.
- KKP {Kementerian Kelautan dan Perikanan}. 2010b. Target produksi udang dikurangi, antisipasi penyakit, perizinan impor tetap disumbat. Agribisnis: Bisnis Indonesia. Selasa, 24 Agustus 2010.
- Nur'aini, Y. L., H. Bambang, S. Subyakto, dan T. Gemi. 2007. Active Surveillance of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) in Pond- Cultured White Shrimp (*Lithopenaeusvannamei*) in East Java and Bali. Jurnal Perikanan UGM. IX (1) : 25-31.