

**VALIDASI METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) UNTUK
DETEKSI *DECAPOD IRIDESCENT VIRUS 1* (DIV1) PADA UDANG
VANAME (*Litopenaeus vannamei*)**

(Skripsi)

Oleh

**OLSIE RINTANIA PUTRI
NPM 2117021095**



**PROGRAM STUDI S1 BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2025**

**VALIDASI METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) UNTUK
DETEKSI *DECAPOD IRIDESCENT VIRUS 1* (DIV1) PADA UDANG
VANAME (*Litopenaeus vannamei*)**

Oleh

Olsie Rintania Putri

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**PROGRAM STUDI S1 BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRAK

VALIDASI METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) UNTUK DETEKSI *DECAPOD IRIDESCENT VIRUS 1* (DIV1) PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*)

Oleh

OLSIE RINTANIA PUTRI

Udang vaname merupakan komoditas unggulan Indonesia yang memerlukan peningkatan produktivitas untuk memenuhi kebutuhan pasar domestik dan ekspor. Namun, penurunan produktivitas terjadi akibat penyakit yang disebabkan oleh bakteri, jamur, parasit, dan virus. *Decapod Iridescent Virus 1* (DIV1) merupakan salah satu virus yang menyebabkan kerugian besar pada udang vaname. Diperlukan diagnosis yang akurat untuk mengetahui udang yang terinfeksi DIV1 karena beberapa penyakit lainnya memiliki tanda-tanda klinis yang mirip. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk deteksi DIV1.

Metode ini dipilih karena sensitivitas dan spesifisitasnya tinggi dalam mendeteksi virus. Penelitian ini meliputi validasi metode PCR dengan uji Minimum Deteksi Limit (MDL), uji *Repeatability*, dan uji Spesifisitas. Selanjutnya, deteksi sampel dilakukan menggunakan 36 sampel hasil kegiatan monitoring di Kebumen Cilacap, Lampung Timur dan Lampung Selatan. Data uji validasi yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabel Kontingensi 2x2 dan dilanjutkan perhitungan beberapa parameter seperti akurasi, sensitivitas, spesifisitas, nilai duga positif, dan nilai duga negatif sesuai dengan Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budi Daya Nomor 442 tahun 2024 tentang pengujian mutu obat ikan dalam rangka penerbitan sertifikat pendaftaran obat ikan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metode uji *Decapod Iridescent Virus 1* (DIV1) yang digunakan memiliki akurasi, sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi karena hasil pemeriksaan sampel uji sudah sesuai dan memberikan jaminan hasil pengujian yang benar dan hasil deteksi 36 sampel monitoring didapati bahwa sampel tidak terdeteksi virus DIV1.

Kata Kunci : *Decapod Iridescent Virus 1* (DIV1), Udang Vaname, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), Validasi Metode, Deteksi Virus.

ABSTRACT

VALIDATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) METHOD FOR DETECTION OF DECAPOD IRIDESCENT VIRUS 1 (DIV1) IN VANNAMEI SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

Authored by

OLSIE RINTANIA PUTRI

Vannamei shrimp is a major commodity in Indonesia, and its productivity needs to be improved to meet domestic and export market demands. However, the productivity of vannamei shrimp has declined due to diseases caused by bacteria, fungi, parasites, and viruses. Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1) poses a significant threat to vannamei shrimp, resulting in substantial losses. Accurate diagnosis is crucial to identify DIV1-infected shrimp, as other diseases exhibit similar clinical signs. This study aimed to validate the Polymerase Chain Reaction (PCR) method for detecting DIV1.

The PCR method was chosen due to its high sensitivity and specificity in detecting viruses. This study included validation of the PCR method using Minimum Detection Limit (MDL), Repeatability, and Specificity tests. Subsequently, 36 samples from monitoring activities in Kebumen Cilacap, Lampung Timur, and Lampung Selatan were tested for DIV1. The validation results were analyzed using a 2x2 contingency table to calculate parameters such as accuracy, sensitivity, specificity, positif predictive value, and negatif predictive value, in accordance with the Director General of Fisheries and Marine Affairs Regulation No. 442 of 2024.

The study results showed that the DIV1 test method had high accuracy, sensitivity, and specificity, providing reliable test results. Furthermore, the detection of 36 monitoring samples revealed that none of the samples were infected with DIV1.

Keywords: Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1), Vannamei Shrimp, Polymerase Chain Reaction (PCR), Method Validation, Virus Detection.

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Skripsi : VALIDASI METODE POLYMERASE CHAIN REACTION
(PCR) UNTUK DETEKSI *DECAPOD IRIDESCENT*
VIRUS 1 (DIV1) PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus*
vannamei)

Nama Mahasiswa : **Olsie Rintania Putri**

NPM : 2117021095

Program Studi : S1 Biologi

Jurusan : Biologi

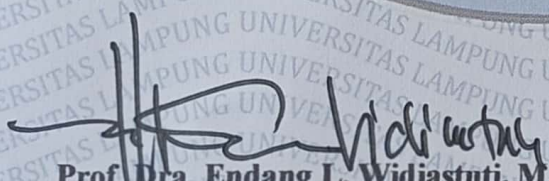
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

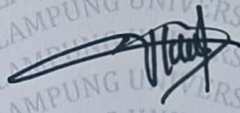


1. Komisi Pembimbing

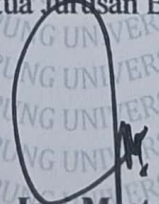
Pembimbing I

Pembimbing II


Prof. Dra. Endang L. Widiastuti, M.Sc., Ph.D.
NIP. 196106111986032001


Indriasih, S.Si., M.Si.
NIP. 198108052009122001

2. Ketua Jurusan Biologi FMIPA

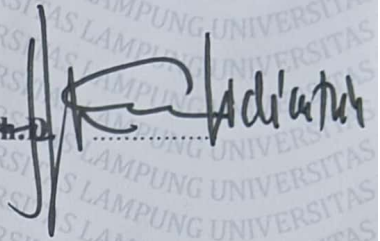

Dr. Jami Master, M.Si
NIP. 198301312008121001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

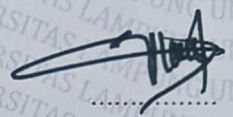
Ketua Penguji

: Prof. Dra. Endang L. Widiastuti, M.Sc., Ph.D.



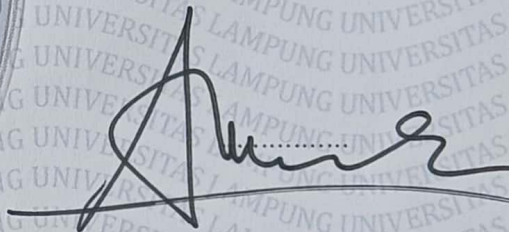
Anggota Penguji

: Indriasih, S.Si., M.Si.



Penguji Utama

: Prof. Dr. Sumardi, M.Si.

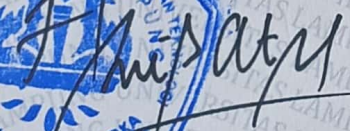


2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Ing. Heri Satria, S.Si., M.Si.

NIP. 197110012005011002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 20 Mei 2025

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Olsie Rintania Putri
NPM : 2117021095
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul :

**“VALIDASI METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) UNTUK
DETEKSI *DECAPOD IRIDESCENT VIRUS 1* (DIV1) PADA UDANG
VANAME (*Litopenaeus vannamei*)”**

Apa yang tertulis dalam karya ilmiah baik data, gagasan, dan pembahasannya adalah benar karya saya sendiri berdasarkan pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Karya ilmiah ini saya susun dengan mengikuti aturan dan etika akademik yang berlaku dan tidak berisikan hasil karya orang lain yang telah dipublikasikan sebelumnya.

Demikian surat pernyataan ini saya buat, jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar atau terdapat kecurangan, maka saya siap mempertanggungjawabkannya .

Bandar Lampung, 27 Mei 2025



Olsie Rintania Putri

NPM. 2117021095

RIWAYAT HIDUP



Olsie Rintania Putri, lahir di Baturaja, 06 November 2003. Penulis merupakan anak ketiga dari tiga bersaudara dari pasangan Bapak Syarmadi bin M. Aziz dan Ibu Wadiyah binti Nazuwi. Penulis beralamat di Jalan Cempaka Putih 1 Blok M No.13, Kelurahan Baturaja Permai, Kecamatan Baturaja Timur, Kabupaten Ogan Komering Ulu, Provinsi Sumatera Selatan.

Penulis memulai pendidikan pertama di Sekolah Dasar (SD) Negeri 08 Baturaja pada tahun 2009 – 2015. Kemudian pendidikan dilanjutkan di Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 1 OKU pada tahun 2015 – 2018. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 1 OKU pada tahun 2018 – 2021. Penulis resmi diterima sebagai mahasiswi di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung pada tahun 2021 melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menempuh pendidikan di Jurusan Biologi, penulis pernah mengikuti program magang serta riset Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) di Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan Serang pada tahun 2024.

Penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) pada bulan Januari – Februari 2024 di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL), Serang dengan judul “**Deteksi *Vibrio parahaemolyticus* Pembawa Gen *VpPirA* dan *VpPirB* pada Benur Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Di Balai Pengujian Kesehatan Ikan Dan**

Lingkungan (BPKIL) Serang”. Kemudian penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Sri Wangi, Kecamatan Way Jepara, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung pada bulan Juni – Agustus 2024.

Selain mengikuti kegiatan akademik, penulis juga aktif dalam kegiatan kemahasiswaan diantaranya Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) sebagai anggota bidang Kaderisasi dan Kepemimpinan pada tahun 2022 dan 2023 dan Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) Universitas Lampung sebagai Staff Ahli Kementerian Kepemudaan pada tahun 2023. Penulis juga aktif dalam kegiatan masyarakat salah satunya program Desa Binaan yang diselenggarakan oleh Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) Universitas Lampung di Desa Suak, Lampung Selatan.

PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan rasa syukur kepada Allah ﷻ yang telah memberikan rahmat, nikmat, hidayah, dan ridho-Nya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan Shalawat beriring salam selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad ﷺ yang dinantikan syafaatnya di yaumul akhir

Saya Persembahkan karya ini untuk:

Orang tua yang sangat saya cintai dan sayangi, Bapak Syarmadi bin M. Aziz dan Ibu Wadiyah binti Nazuwi yang selalu memberikan kasih sayang dan cintanya, dukungan dengan sepenuh hati, motivasi yang tiada henti, pengorbanan waktu, tenaga, dan materi yang tak terganti, serta doa yang dipanjatkan tiada henti dalam mengiringi perjalanan hidup yang saya lalui.

Kakak – kakakku yang selalu memberikan dukungan dan motivasi serta kasih sayang setiap waktu.

Bapak dan Ibu dosen yang telah membimbing dan mengarahkan saya dengan sangat sabar.

Seluruh teman – teman seperjuanganku, sobat Hijrah yang telah kebersamai dan berjuang dari awal, saat ini, dan seterusnya dalam setiap perjalanan hidup saya. Almamaterku yang menjadi kebanggaan saya dimanapun saya berada, Universitas Lampung.

Serta Diri Sendiri, Olsie Rintania Putri yang tetap kuat menjadi dirinya sendiri, berjuang, dan menyelesaikan apa yang telah dimulainya.

MOTTO

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari suatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan lain). Dan hanya kepada TUHAN mu lah engkau berharap.

(QS. Al- Insyirah : 6 – 8)

Berbuat baik hari ini, menuai kebaikan di kemudian hari.

(Penulis)

SANWACANA

Alhamdulillahirabbil'alamin. Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah ﷻ atas limpahan rahmat dan karunia-Nya penulis diberikan kesehatan baik jasmani, maupun rohani, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Validasi Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk Deteksi *Decapod Iridescent Virus 1* (DIV1) pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)” yang menjadi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Sains di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Sholawat beriring salam tak lupa penulis lantunkan kepada Baginda Nabi Muhammad ﷺ, semoga kita semua mendapatkan syafaatnya di akhirat kelak. Aamiinn ya rabbal alamin.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat banyak kekurangan dalam proses penulisan skripsi ini, namun penulis sangat bersyukur karena mendapatkan banyak dukungan, bimbingan, serta bantuan dari berbagai pihak sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A, IPM., ASEAN Eng., selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
3. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
4. Ibu Dr. Kusuma Handayani, M.Si., selaku Ketua Program Studi S1 Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

5. Ibu Prof. Dra. Endang Linirin Widiastuti, M.Sc., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing I yang telah membantu, membimbing, memberikan arahan, dan saran kepada penulis dalam proses penyelesaian skripsi ini.
6. Ibu Indriasih, S.Si., M.Si., selaku Pembimbing II yang telah membantu, membimbing, memberikan arahan, dan saran kepada penulis dalam proses penyelesaian skripsi ini.
7. Bapak Prof. Dr. Sumardi, M.Si., selaku Dosen Pembahas yang telah memberikan banyak masukan, saran, kritik, motivasi, dan arahan yang membangun sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
8. Bapak Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, dukungan, semangat, dan saran selama penulis perkuliahan sampai terselesainya skripsi ini.
9. Seluruh Bapak dan Ibu dosen Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung atas ilmu yang telah diberikan kepada penulis selama perkuliahan sampai mencapai gelar sarjana.
10. Seluruh staf dan karyawan Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung atas dukungan yang telah diberikan kepada penulis selama perkuliahan sampai mencapai gelar sarjana.
11. Staff dan Karyawan Laboratorium Biologi Molekuler, Ibu Indriasih, Ibu Wiwin, Ibu Hasma, Pak Nana dan Kak Nisa yang telah memberikan arahan serta masukan praktik kerja lapangan kepada penulis.
12. Cinta pertamaku Bapak Syarmadi dan pintu surgaku ibu Wadiah. Terima kasih atas setiap tetes keringat dalam setiap langkah pengorbanan dan kerja keras yang dilakukan untuk memberikan yang terbaik kepada penulis, mengusahakan segala kebutuhan penulis, mendidik, membimbing dan selalu memberikan kasih sayang tulus, motivasi serta dukungan dan mendoakan penulis dalam keadaan apapun agar penulis mampu bertahan untuk melangkah setapak demi setapak dalam meraih mimpi di masa depan. Terima kasih untuk selalu berada di sisi penulis dan menjadi alasan bagi penulis dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini hingga memperoleh gelar Sarjana Sains. Bapak, Ibu, putri kecilmu sudah dewasa dan siap melanjutkan mimpi yang lebih tinggi lagi.

13. Kepada kakak – kakakku serta seluruh keluarga besar penulis yang telah memberikan dukungan, perhatian, semangat, serta doa yang tiada hentinya kepada penulis.
14. Sobat Hijrah, Faska, Epis, Tifah, Nabila, Cintya, Intan, Vanya, Hafidz, Reza, dan Fahri atas semua bantuan, semangat, dan kebersamaan yang telah kalian berikan selama penulis menempuh pendidikan S1.
15. M.Kholis, Terima kasih atas motivasi yang telah diberikan supaya penulis bisa segera memiliki gelar sarjana
16. Seluruh rekan 2021 Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung atas banyak pengalaman dan kebersamaan kepada penulis selama penulis menempuh pendidikan Strata Satu (S1).
17. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang telah ikut memberikan pengalaman baru, kebersamaan serta perjalanan hidup penulis selama menempuh pendidikan Strata Satu (S1) 2021 Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

Bandar Lampung, 10 Mei 2025

Olsie Rintania Putri

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
RIWAYAT HIDUP.....	vi
PERSEMBAHAN.....	viii
MOTTO.....	ix
SANWACANA.....	x
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
1.4 Kerangka Pikiran.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Udang Vaname (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	5
2.1.1 Klasifikasi Udang Vaname	5
2.1.2 Morfologi Udang Vaname	5
2.1.3 Habitat dan Kebiasaan Hidup Udang Vaname	6
2.1.4 Tantangan Budidaya	7
2.2 <i>Decapod Iridescent Virus 1</i>	7
2.2.1 Sejarah <i>Decapod Iridescent Virus 1</i>	7
1.1.2 Klasifikasi DIV1	8
1.1.3 Morfologi DIV1	8

1.1.4 Siklus Pada Virus.....	10
1.1.5 Tanda Klinis.....	13
1.1.6 Transmisi.....	15
2.3 Metode Deteksi	15
2.4 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	16
2.5 Validasi Metode	20
III. METODE PENELITIAN	21
3.1 Waktu dan Tempat	21
3.2 Alat dan Bahan.....	21
3.2.1 Alat.....	21
3.2.2 Bahan	21
3.3 Prosedur Penelitian.....	22
3.3.1 Validasi Metode Pengujian <i>Decapod Iridescent Virus 1</i> (DIV1) ...	22
3.3.1.1 Uji Minimum Deteksi Limit (MDL).....	22
3.3.1.2 Uji <i>Repeatability</i>	22
3.3.1.3 Uji Spesifisitas	22
3.3.2 Deteksi <i>Decapod Iridescent Virus 1</i> (DIV1)	23
3.3.2.1 Preparasi Sampel.....	23
3.3.2.2 Ekstraksi DNA.....	24
3.3.2.3 Uji Kuantitatif DNA	24
3.3.2.4 Amplifikasi	25
3.3.2.5 Pembuatan Gel Agarose 2%	28
3.3.2.6 Elektroforesis.....	28
3.3.2.7 Analisis Data.....	28
3.4 Diagram Alir Penelitian.....	32
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
4.1 Hasil	33
4.1.1 Uji Kuantitatif DNA.....	33
4.1.2 Uji Minimum Deteksi Limit (MDL).....	35
4.1.3 Uji <i>Repeatability</i>	36
4.1.4 Uji Spesifisitas	43
4.1.5 Deteksi	50

	xv
4.2 Pembahasan.....	54
V. KESIMPULAN DAN SARAN	62
5.1 Kesimpulan.....	62
5.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN.....	70

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 1. Komposisi larutan PCR step 1.....	25
Tabel 2. Komposisi larutan PCR step 2 (<i>semi nested</i>)	25
Tabel 3. Profil Amplifikasi <i>First</i> PCR.....	27
Tabel 4. Profil Amplifikasi <i>semi nested</i> PCR.....	27
Tabel 5. Interpretasi Hasil Pengujian DIV1 dengan snPCR.....	29
Tabel 6. Kontingensi 2x2.....	30
Tabel 7. Hasil Uji Konsentrasi dan Kemurnian DNA	33
Tabel 8. Hasil Uji Minimum Deteksi Limit (MDL).....	36
Tabel 9. Hasil uji <i>repeatability</i> ulangan 1 dengan menggunakan tabel kontingensi 2x2	38
Tabel 10. Hasil uji <i>repeatability</i> ulangan 2 dengan menggunakan tabel kontingensi 2x2.....	40
Tabel 11. Hasil uji <i>repeatability</i> ulangan 3 dengan menggunakan tabel kontingensi 2x2	42
Tabel 12. Rangkuman Hasil Statistik Uji <i>Repeatability</i>	43
Tabel 13. Hasil Uji Spesifisitas Ulangan 1.....	45
Tabel 14. Hasil Uji Spesifisitas Ulangan 2.....	47
Tabel 15. Hasil Uji Spesifisitas Ulangan 3.....	49
Tabel 16. Rangkuman Hasil Statistik Uji Spesifisitas	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. Kerangka Pemikiran	4
Gambar 2. Morfologi udang vaname (Haliman, 2005).....	6
Gambar 3. Diagram skematik dari potongan melintang partikel iridovirus (Darcy <i>et al.</i> , 1984).....	9
Gambar 4. Visualisasi <i>Transmission Electron Microscopy</i> (TEM) dari virion yang diwarnai negatif yang dimurnikan dari hemolimfa <i>Cherax</i> <i>quadricarinatus</i> yang terinfeksi (Xu <i>et al.</i> , 2016).....	9
Gambar 5. Siklus Litik Pada Virus.....	10
Gambar 6. Siklus Lisogenik Pada Virus.....	12
Gambar 7. Gejala klinis udang vaname yang terinfeksi virus DIV1 dibandingkan dengan kelompok kontrol. (a) Penampakan luar udang. (b) Potongan hepatopankreas (Qiu, 2017).....	14
Gambar 8. Udang yang terinfeksi DIV1 (Qiu, 2017)	14
Gambar 9. Tahapan Deteksi Virus (Zhu, 2020)	17
Gambar 10. Hasil Elektroforesis PCR (SNI 9062-1 : 2022)	18
Gambar 11. Hasil Elektroforesis semi-nested PCR (SNI 9062-1 : 2022)	18
Gambar 12. Hasil Elektroforesis nested PCR (Qiu <i>et al.</i> , 2017).....	18
Gambar 13. Kurva Amplifikasi RT PCR (Artika <i>et al.</i> , 2022).....	20
Gambar 14. Sekuens Fragmen DIV1 (GenBank KY681040) dan Posisi Primer ..	26
Gambar 15. Hasil Uji Minimum Deteksi Limit (MDL)	35
Gambar 16. Uji <i>Repeatability</i> Ulangan 1	37
Gambar 17. Hasil Uji <i>Repeatability</i> Ulangan 2.....	39
Gambar 18. Hasil Uji <i>Repeatability</i> Ulangan 3.....	41
Gambar 19. Hasil Uji Spesifisitas Ulangan 1.....	44

Gambar 20. Hasil Uji Spesifisitas Ulangan 2.....	46
Gambar 21. Hasil Uji Spesifisitas Ulangan 3.....	48
Gambar 22. Hasil Deteksi Sampel Kebumen-Cilacap.....	51
Gambar 23. Hasil Deteksi Sampel Lampung Timur	52
Gambar 24. Hasil Deteksi Sampel Lampung Selatan.....	53
Gambar 25. Hasil Deteksi Sampel Lampung Selatan.....	54
Gambar 26. Hasil Elektroforesis pada Pengujian DIV1.....	57

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang vaname merupakan salah satu komoditas unggulan Indonesia yang terus ditingkatkan guna memenuhi permintaan kebutuhan pasar domestik dan pasar ekspor (Zaidy, 2021). Penyakit yang disebabkan oleh berbagai jenis bakteri, jamur, parasit, dan virus telah menurunkan produktivitas industri udang vaname selama beberapa dekade terakhir. *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV), *Taura Syndrome Virus* (TSV), dan *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) merupakan virus yang paling mengkhawatirkan dalam waktu yang lama (Thitamadee *et al.*, 2016). Namun, pada tahun 2014, *Decapod Iridescent Virus 1* (DIV1) menyebabkan kerugian besar pada udang vaname yang dibudidayakan di Provinsi Zhejiang di Cina. DIV1 diisolasi dan diidentifikasi oleh Qiu *et al.* pada tahun 2017 (Qiu *et al.*, 2017).

Pada tahun 2019, *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) mengidentifikasi dua isolat virus, *Shrimp Hemocyte Iridescent Virus* (SHIV) dan *Cherax Quadricarinatus Iridovirus* (CQIV), sebagai *Decapod Iridescent Virus 1* (DIV1) (Qiu *et al.*, 2019). SHIV pertama kali terdeteksi dan diidentifikasi dalam sampel udang yang sakit yang dikumpulkan dari sebuah tambak di Provinsi Zhejiang, Tiongkok, pada bulan Desember 2014. Namun, hasil survei epidemiologi menunjukkan bahwa virus ini mungkin bukan wabah pertama di tambak tersebut. Dari total 89 dari 575 individu *Litopenaeus vannamei*, 5 dari 33 individu *Fenneropenaeus chinensis* dan 5 dari 10 individu *Macrobrachium rosenbergii* positif SHIV dalam sampel yang dikumpulkan selama tahun 2014 –2016 dari 20 daerah di 5 provinsi di

Tiongkok, sehingga menimbulkan kekhawatiran bahwa virus tersebut mungkin telah menyebar luas dan memburuk ke daerah tambak udang di sekitarnya (Qiu *et al*, 2017).

Udang yang terinfeksi umumnya menunjukkan perut dan saluran usus kosong, hepatopankreas pucat, dan cangkang lunak (Qiu, 2017). Selain itu, udang yang sakit tenggelam ke dasar kolam akuakultur karena kemampuan berenang yang melemah. Selain itu, udang yang mati menumpuk di dasar kolam akuakultur, dan kematian kumulatif dapat mencapai 80% (Qiu, 2020). DIV1 dideteksi juga pada populasi liar *Penaeus monodon* di Samudra Hindia (Srisala, 2021). Hingga saat ini, DIV1 telah dikenal sebagai virus yang sangat mematikan dengan risiko penularan global, yang mampu menginfeksi krustasea air tawar dan laut, termasuk *Marsupenaeus japonicus* (He *et al*, 2021). Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat digunakan untuk pemeriksaan virus pada udang vaname terutama yang di budidayakan. Keberadaan virus dapat dilacak sejak dini dari DNA/RNA virus yang jumlahnya sedikit dapat dilihat dengan PCR. Proses pemeriksaan virus terdiri dari tiga tahapan berupa ekstraksi DNA/RNA dilanjutkan dengan proses amplifikasi dan ditutup dengan proses elektroforesis (Fauziati dan Yulianti, 2022).

PCR menjadi salah satu metode untuk mengidentifikasi penyakit infeksius. Metode ini dikembangkan dengan maksud untuk mengatasi kelemahan dari penggunaan metode diagnosis konvensional, seperti imunologi dan mikrobiologi. Teknik PCR didasarkan pada amplifikasi fragmen DNA spesifik dimana terjadi penggandaan jumlah molekul DNA pada setiap siklusnya secara eksponensial dalam waktu yang relatif singkat (Bambang *et al.*, 2015). Validasi metode sangat diperlukan karena beberapa alasan, yaitu validasi metode adalah persyaratan peraturan dan elemen penting dari kontrol kualitas, serta membantu memberikan jaminan bahwa pengukuran akan dapat diandalkan dalam beberapa bidang (Riyanto, 2014). Menurut Sugihartini *et al.* (2014) validasi terhadap suatu metode analisa menjadi faktor penting karena hanya metode analisa yang telah dibuktikan validitasnya, maka hasil

pengukurannya bisa dipertanggung jawabkan dan dipergunakan sebagai landasan dalam perhitungan berikutnya.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yakni sebagai berikut.

1. Memvalidasi metode kerja *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk deteksi *Decapod Iridescent Virus 1* (DIV1).
2. Mendeteksi *Decapod Iridescent Virus 1* (DIV1) pada udang vaname yang didapat dari hasil monitoring tambak di Kebumen-Cilacap, Lampung Timur dan Lampung Selatan.

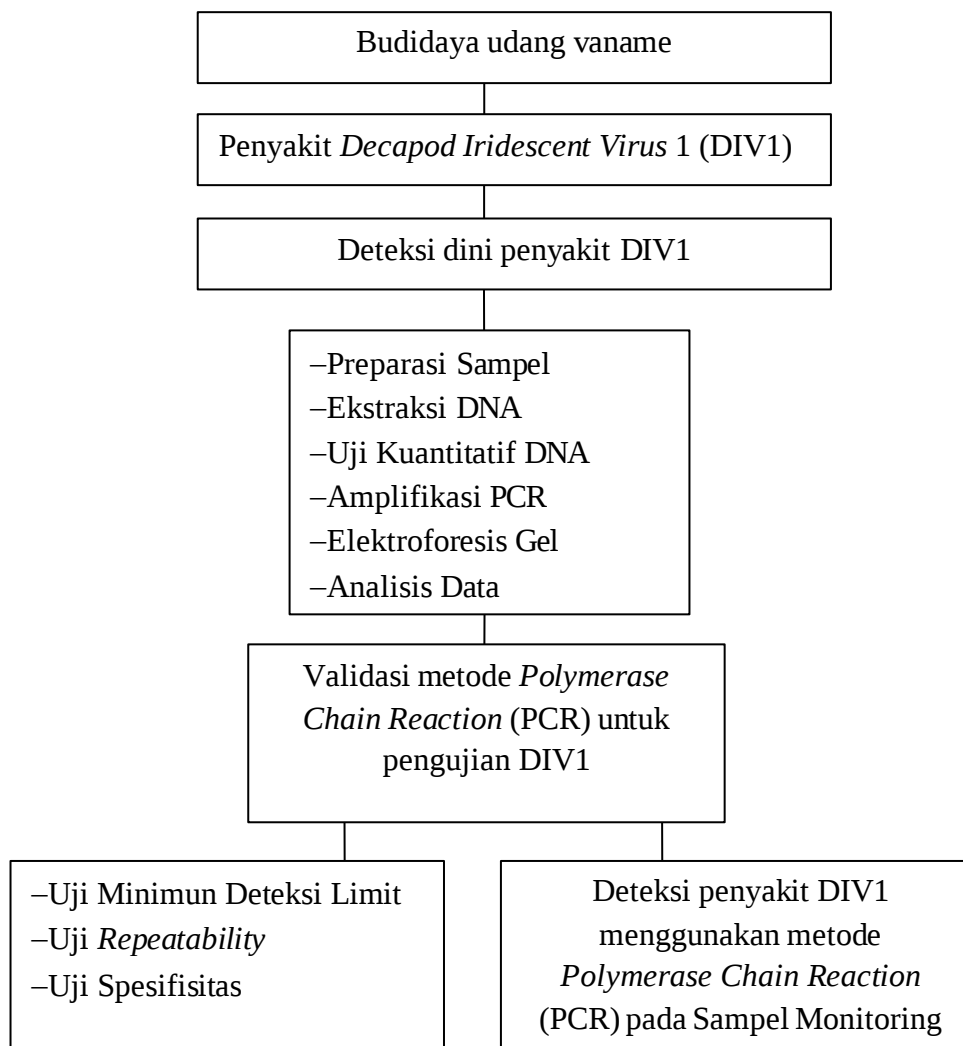
1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk deteksi dini infeksi virus DIV1 pada udang vaname menggunakan metode PCR yang telah tervalidasi. Deteksi dini sangat penting untuk mencegah penyebaran penyakit dan mengurangi kerugian ekonomi pada industri perikanan.

1.4 Kerangka Pikiran

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri, jamur, dan virus menyebabkan penurunan produktivitas industri udang vaname selama beberapa dekade terakhir. Pada tahun 2017 telah diisolasi dan diidentifikasi penyakit *Decapod Iridescent Virus 1* (DIV1) oleh Qiu *et al.* yang dimana DIV1 telah menyebabkan kerugian besar pada udang vaname pada tahun 2014 yang dibudidayakan di Provinsi Zhejiang, China. Saat ini metode diagnostik untuk DIV1 meliputi diagnosis klinis, diagnosis histopatologis dan diagnosis molekuler. Dalam diagnosis klinis, krustasea yang terinfeksi penyakit DIV1 menunjukkan berbagai gejala yang tidak dapat dijadikan standar untuk identifikasi. Infeksi patogenik lainnya memiliki tanda-tanda klinis yang mirip dengan DIV1, termasuk perut dan usus kosong serta warna tubuh kemerahan. Dengan demikian, diperlukannya diagnosis yang akurat untuk mengetahui krustasea terinfeksi DIV1 bukan hanya dengan menggunakan tanda-tanda klinis. Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah banyak diterapkan untuk diagnosis infeksi virus yang akurat. Perlunya dilakukan validasi metode

karena validasi terhadap suatu metode analisis menjadi faktor penting, hanya metode analisis yang telah dibuktikan validitasnya, maka hasil pengukurannya dapat dipertanggung jawabkan dan dipergunakan sebagai landasan dalam perhitungan berikutnya. Validasi untuk deteksi DIV1 menggunakan PCR meliputi uji deteksi limit, uji *repeatability*, dan uji spesifisitas.



Gambar 1. Kerangka Pemikiran

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

2.1.1 Klasifikasi Udang Vaname

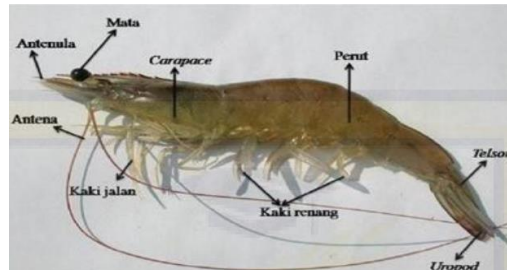
Menurut Pérez *et al.* (1997), klasifikasi udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Anthropoda
Class : Crustacea
Ordo : Decapoda
Famili : Penaidae
Genus : *Litopenaeus*
Spesies : *Litopenaeus vannamei*

2.1.2 Morfologi Udang Vaname

Tubuh udang vaname dibentuk oleh dua cabang (biramous), yaitu exopodite dan endopodite. Seluruh tubuhnya tertutup oleh eksoskeleton yang terbuat dari bahan kitin. Tubuhnya beruas-ruas dan mempunyai aktivitas berganti kulit luar (eksoskeleton) secara periodik (*molting*). Bagian tubuh udang vaname sudah mengalami modifikasi, sehingga dapat digunakan untuk beberapa keperluan antara lain makan, bergerak dan membenamkan diri ke dalam lumpur, menopang insang, karena struktur insang udang mirip bulu unggas serta organ sensor seperti antenna dan antennulae (Haliman, 2005). Tubuh udang yang dilihat dari luar terdiri dari bagian, yaitu bagian depan yang disebut cephalothorax, karena menyatunya bagian kepala dan dada serta bagian belakang (perut)

yang disebut abdomen dan terdapat ekor (*uropod*) di ujungnya (Suyanto, 2001). Bentuk morfologi udang vaname dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Morfologi udang vaname (Haliman, 2005)

Bagian abdomen terdiri dari enam ruas, terdapat lima pasang kaki renang pada ruas pertama sampai kelima dan sepasang ekor kipas (*uropoda*) dan ujung ekor (*telson*) pada ruas yang keenam. Di bawah pangkal ujung ekor terdapat lubang dubur (*anus*) (Suyanto, 2001). Ciri khusus yang dimiliki oleh udang vaname adalah adanya pigmen karotenoid yang terdapat pada bagian kulit. Kadar pigmen ini akan berkurang seiring dengan pertumbuhan udang, karena saat mengalami molting sebagian pigmen yang terdapat pada kulit akan ikut terbangun. Keberadaan pigmen ini memberikan warna putih kemerahan pada tubuh udang (Haliman, 2005).

2.1.3 Habitat dan Kebiasaan Hidup Udang Vaname

Habitat udang tergantung jenis persyaratan hidup dari tingkatan-tingkatan dalam daur hidupnya. Habitat disukai oleh udang adalah dasar laut (*soft*) yang biasanya campuran lumpur berpasir. Induk udang vaname ditemukan di perairan lepas pantai dengan kedalaman berkisar antara 70-72 meter (235 kaki), menyukai daerah yang dasar perairannya berlumpur. Sifat hidup dari udang vaname adalah catadromus atau dua lingkungan, dimana udang dewasa akan memijah di laut terbuka. Larva dan yuana udang vaname yang sudah menetas akan bermigrasi ke daerah pesisir pantai atau mangrove yang biasa disebut daerah estuarine tempat *nursery ground* nya, dan setelah dewasa akan bermigrasi kembali ke laut untuk melakukan kegiatan

pemijahan seperti pematangan gonad (maturasi) dan perkawinan (Wyban dan Sweeney, 1991)

2.1.4 Tantangan Budidaya

Selain berbagai penyakit yang dapat menyerang kegiatan budidaya udang vaname, tantangan lain dalam mengelola budidaya udang yaitu manajemen lingkungan (Anderson, 2017). Selama proses budidaya udang berlangsung akan teramati dampak budidaya terhadap lingkungan dan terhadap perubahan lingkungan budidaya. Masalah buruknya kualitas air karena buangan air hasil budidaya udang akan memiliki dampak akut pada budidaya udang itu sendiri (Portley, 2016).

2.2 *Decapod Iridescent Virus 1*

2.2.1 Sejarah *Decapod Iridescent Virus 1*

Decapod iridescent virus 1 atau DIV1 pertama kali terdeteksi pada awal tahun 2014 dari sampel *Cherax quadricarinatus* yang diambil di Provinsi Fujian, Tiongkok dan untuk sementara virus baru dinamai dengan *Cherax quadricarinatus iridovirus* (CQIV) (Xu *et al.*, 2016). Pada bulan Desember 2014, Qiu *et al.* (2017) mengidentifikasi virus *iridescent* baru pada udang berkaki putih yang dibudidayakan *Penaeus vannamei* dari Provinsi Zhejiang dan menamakannya *Shrimp hemocyte iridescent virus* (SHIV) berdasarkan jaringan yang terinfeksi dan spesies yang rentan. *Decapod iridescent virus 1* (DIV1), sebelumnya dikenal sebagai *shrimp hemocyte iridescent virus/ Cherax quadricarinatus virus*, dapat menyebabkan kerugian besar pada populasi udang dan lobster (Qiu *et al.*, 2017). Antara SHIV dan CQIV adalah 99,97% berdasarkan analisis bioinformasi. Pada tahun 2019 *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) menyatukan nama SHIV dan CQIV menjadi DIV1 dan diklasifikasikan oleh sebagai satu-satunya anggota genus *Decapod iridovirus* dalam famili Iridoviridae (ICTV, 2020).

SHIV pertama kali terdeteksi dan diidentifikasi dalam sampel udang yang sakit yang dikumpulkan dari sebuah peternakan di Provinsi Zhejiang, Cina, pada bulan Desember 2014. Namun, hasil survei epidemiologi menunjukkan bahwa virus ini mungkin bukan wabah pertama di peternakan tersebut. Dari total 89 dari 575 individu *Litopenaeus vannamei*, 5 dari 33 individu *Fenneropenaeus chinensis*, dan 5 dari 10 individu *Macrobrachium rosenbergii* positif SHIV dalam sampel yang dikumpulkan selama tahun 2014 – 2016 di 20 daerah di 5 provinsi di seluruh Tiongkok, meningkatkan kekhawatiran bahwa virus tersebut mungkin telah menyebar luas dan memburuk ke daerah budidaya udang di sekitarnya (Qiu, 2017).

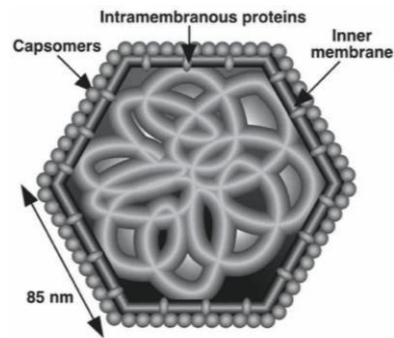
2.2.2 Klasifikasi DIV1

Menurut *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) pada tahun 2021

Kingdom : Bamfordvirae
 Phylum : Nucleocytoviricota
 Class : Megaviricetes
 Order : Pimascovirales
 Family : Iridoviridae
 Subfamily : Betairidovirinae
 Genus : *Decapodiridovirus*
 Species : *Decapod Iridescent Virus 1*

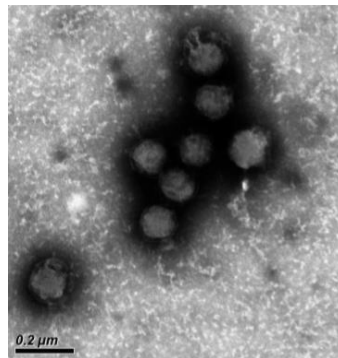
2.2.3 Morfologi DIV1

Decapod iridescent virus 1 (DIV1) pertama kali diidentifikasi pada tahun 2014 dan merupakan virus DNA besar nukleositoplasma sitoplasma yang mengandung *double stranded* DNA (dsDNA) (ICTV). Strukturnya menunjukkan simetri ikosahedral, tampak heksagonal saat dilihat dalam bentuk planar. Genom DIV1 adalah 165.695bp termasuk total 178 *Open Reading Frames* (ORF) (Li *et al.*, 2017)



Gambar 3. Diagram skematik dari potongan melintang partikel iridovirus (Darcy *et al.*, 1984)

Diagram skematik dari potongan melintang partikel iridovirus yang menunjukkan kapsomer, lapisan lipid internal yang mengandung protein transmembran dan inti nukleoprotein berfilamen (Darcy *et al.*, 1984).

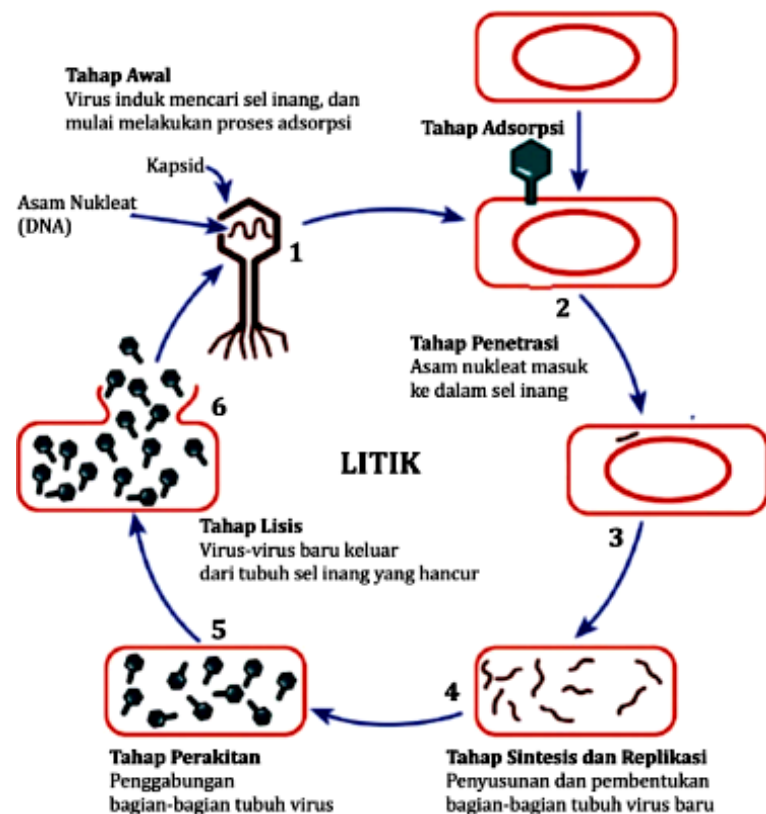


Gambar 4. Visualisasi *Transmission Electron Microscopy* (TEM) dari virion yang diwarnai negatif yang dimurnikan dari hemolimfa *Cherax quadricarinatus* yang terinfeksi (Xu *et al.*, 2016)

Mikroskop elektron terhadap virion bernoda negatif yang dimurnikan sebagian dari hemolimfa udang karang yang sekarat melalui sentrifugasi diferensial mengidentifikasi bahwa virion tersebut berdiameter ~155 nm dan mempunyai cangkang luar tipis yang menutupi kapsid heksagonal (Xu *et al.*, 2016).

2.2.4 Siklus Pada Virus

Virus dapat memperbanyak diri jika berada dalam sel inang. Struktur tubuh virus pada bagian luar memiliki protein reseptor dan dapat menginfeksi apabila struktur tersebut cocok dengan protein reseptor pada membrane sel inang. Proses memperbanyak diri virus disebut dengan replikasi. Replikasi terdiri dari siklus litik dan lisogenik, dimana siklus ini bergantung pada virulensi atau ketahanan sel inang terhadap virus penginfeksi (Murwani, 2015). Jika sel inang memiliki ketahanan yang lemah maka virus dapat melakukan siklus litik. Namun, jika sel inang memiliki ketahanan yang tinggi maka virus melakukan siklus lisogenik. Pada siklus litik diawali dengan melekatnya virus pada sel inang, kemudian penetrasi asam nukleat virus ke dalam sel inang. Tahap selanjutnya sel inang mensintesis asam nukleat dan bagian tubuh virus dirakit menjadi tubuh virus baru. Akhir siklus litik yaitu sel inang pecah dan mengeluarkan virus baru.



Gambar 5. Siklus Litik Pada Virus

Adapun tahapan siklus litik, yaitu (Murwani, 2015) :

1. Tahap Penempelan (Adsorbsi)

Pada tahap ini, virus menempel pada sel inang dengan ikatan khusus antara kapsid protein virus dengan reseptor pada permukaan sel inang. Virus hanya dapat menempel pada inang tertentu, apabila ikatan khusus tersebut tidak cocok maka virus tidak akan menempel. Pada bakteriofage, virus mulai mengeluarkan enzim yang disebut lisozim yang digunakan untuk melubangi sel inang.

2. Tahap Injeksi

Virus mulai memasukkan DNA atau RNA yang terkandung di dalamnya, sedangkan selubung protein dari asam nukleat yang disebut kapsid tetap berada diluar sel. Setelah semua sel genetik masuk ke dalam sel inang, maka kapsid akan terlepas dari sel karena sudah tidak berfungsi lagi bagi virus tersebut.

3. Tahap Sintesis (Tahap Pembentukan)

Setelah menginjeksi asam nukleat, bakteriofage tersebut menghasilkan enzim (yang dikodekan dalam genomnya) untuk menghentikan sintesis molekul bakteri (protein, RNA, DNA). Setelah sintesis protein dan asam nukleat dari sel inang berhenti, virus mengambil alih proses metabolisme sel inang. DNA dan RNA dari sel inang kemudian digunakan untuk menggandakan asam nukleat virus sebanyak mungkin sedangkan protein yang terdapat pada sel inang digunakan untuk menggandakan kapsid.

4. Tahap Perakitan

Pada tahap perakitan, kapsid yang telah terbentuk pada tahap sintesis akan mulai diisi dengan asam nukleat yang telah tereplikasi sehingga menjadi virus yang utuh.

5. Tahap Lisis

Setelah terbentuk virus – virus baru yang sempurna, induk virus mengeluarkan enzim lisozim yang berfungsi untuk menghancurkan sel inang yang kemudian diikuti dengan pelepasan virus – virus baru. Virus yang dilepaskan dalam satu daur berkisar antara 100 – 200

virus. Virus ini kemudian akan mencari sel lain untuk kemudian melanjutkan daur hidup.



Gambar 6. Siklus Lisogenik Pada Virus

Adapun tahapan siklus lisogenik, yaitu (Wahyuni dan Ramadhani, 2020)

1. Tahap Adsorpsi

Pada tahap ini virus akan menempel pada sel inang dan melubangi dengan enzim lisozim.

2. Tahap Injeksi

Virus memasukkan asam nukleat ke dalam sel inang dan melepaskan kapsid.

3. Tahap Penggabungan

Pada tahap penggabungan, virus akan memutus ikatan asam nukleat yang dimiliki sel inang dan masuk ke dalamnya untuk menghubungkan rantai itu lagi. Pada tahap ini virus tidak mengambil alih asam nukleat sel inang, melainkan untuk membentuk satu kesatuan yang disebut profage.

4. Tahap Pembelahan

Pada tahap ini, profage hanya bereplikasi ketika asam nukleat sel inang bersintesis dan melakukan pembelahan. Profage ikut

membelah ketika DNA bereplikasi, sehingga jumlah profage akan sama dengan jumlah hasil DNA hasil replikasi sel inang.

5. Tahap Pemisahan (Memasuki Daur Litik)

Pada saat kondisi lingkungan yang buruk, profage menjadi aktif dan mulai memisahkan diri dari DNA sel inangnya, kemudian mulai mengambil alih peranan DNA dalam hal sintesis protein.

6. Tahap Sintesis

Pada tahap ini DNA dan RNA dari sel inang kemudian digunakan untuk menggandakan asam nukleat virus sebanyak mungkin dan protein yang terdapat sel inang digunakan untuk menggandakan kapsid.

7. Tahap Perakitan

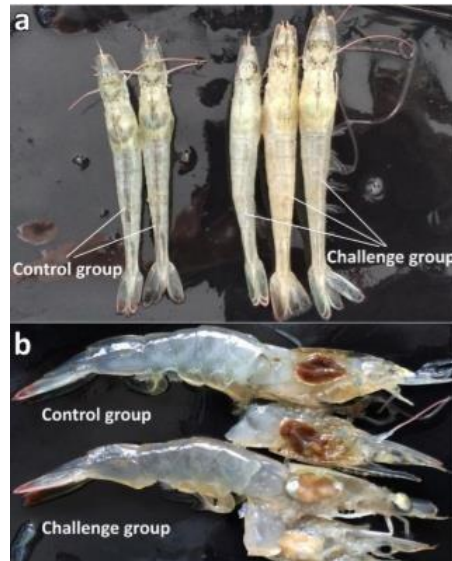
Pada tahap ini virus merakit tubuhnya dan mulai memasukkan asam nukleat (DNA atau RNA) ke dalam kapsid yang telah terbentuk.

8. Tahap Lisis

Virus – virus dibebaskan dari sel inangnya secara eksplosif dengan menggunakan enzim lisozim yang digunakan untuk menghancurkan sel inang.

2.2.5 Tanda Klinis

Penyakit yang disebabkan oleh DIV1 memiliki tanda-tanda klinis pada Udang vaname yang terinfeksi DIV1 menunjukkan gejala atrofi hepatopankreas pucat dan bagian perut dan usus kosong, dapat dilihat pada Gambar 7. merupakan tanda klinis yang dialami oleh udang vaname yang terinfeksi DIV1 dan dibandingkan dengan udang yang tidak terinfeksi virus, terdapat beberapa gejala klinis yang terlihat diantaranya hepatopankreas yang pucat dan lambung kosong.



Gambar 7. Gejala klinis udang vaname yang terinfeksi virus DIV1 dibandingkan dengan kelompok kontrol. (a) Penampakan luar udang. (b) Potongan hepatopankreas (Qiu, 2017)

Pada *Penaeus monodon* menunjukkan tanda-tanda klinis berupa tepi hitam pada cangkang perutnya dapat terlihat pada Gambar 8. Tanda klinis udang yang terinfeksi DIV1. Udang *Litopenaeus vannamei* yang terinfeksi DIV1 menunjukkan gejala lambung dan usus kosong, dan hepatopankreas pucat. Beberapa udang *Litopenaeus vannamei* dan *Penaeus monodon* yang mati menunjukkan tanda klinis tepi hitam pada cangkang abdomen (Panah hitam menunjukkan tepi hitam) (Qiu *et al.*, 2017).



Gambar 8. Udang yang terinfeksi DIV1 (Qiu, 2017)

Macrobrachium rosenbergii memiliki gejala nyata berupa kepala putih dan insang kuning pada tahap awal infeksi. Qiu *et al.* pada tahun 2019 menggunakan PCR kuantitatif untuk mendeteksi *Macrobrachium rosenbergii* dengan penyakit kepala putih, dan mereka menemukan bahwa semua sampel yang sakit negatif untuk *White Spot*

Syndrome Virus (WSSV), Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV), Vibrio parahaemolyticus Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (Vp AHPND), Yellow Head Virus (YHV), Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) dan *Covert Mortality Nodavirus (CMNV)*, tetapi positif untuk DIV1. Selain itu, sebagian besar *Macrobrachium rosenbergii* yang terinfeksi menunjukkan tanda-tanda klinis yang khas, termasuk area segitiga putih yang jelas di bawah karapas, tetapi beberapa individu yang terinfeksi dapat disertai dengan sedikit otot dan antena yang termutilasi. Pada *Penaeus monodon* menunjukkan tanda-tanda klinis yang jelas berupa badan hitam dan cangkang lunak (Qiu, 2019).

2.2.6 Transmisi

Transmisi horizontal dan transmisi vertikal adalah mode utama penularan virus. Umumnya diyakini bahwa perilaku kanibalisme krustasea mungkin berkontribusi secara signifikan terhadap penyebaran virus (Andrade, 2019). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa jaringan target DIV1 termasuk lambung dan usus (Lightner, 2011). Jaringan target DIV1 merupakan komponen utama sistem pencernaan, dapat diperkirakan bahwa kanibalisme mungkin merupakan cara yang efisien untuk menularkan DIV1 ke inang (Liao, 2020). DIV1 dicirikan oleh rentang inang yang luas, masa inkubasi yang panjang, tingkat penularan yang cepat, dan tingkat kematian yang tinggi yang menyebabkan krustasea dekapoda. Penularan horizontal merupakan rute penularan utama untuk DIV1, termasuk kanibalisme di antara spesies yang sama, konsumsi umpan yang membawa virus, dan kultur campuran hewan sehat dengan hewan sakit (Lightner, 2011).

2.3 Metode Deteksi

Belum ada langkah efektif saat ini untuk pencegahan dan pengendalian DIV1, deteksi dan pemantauan merupakan langkah kunci untuk mengendalikan penyebaran virus. Metode diagnostik untuk DIV1 yang telah ditetapkan meliputi diagnosis klinis, diagnosis histopatologi, dan diagnosis biologi

molekuler. Krustasea yang terinfeksi DIV1 tidak menunjukkan gejala klinis, sehingga identifikasi dan diagnosis yang akurat tidak dapat hanya bergantung pada diagnosis klinis. Diagnosis histopatologi rumit untuk dilakukan, sehingga tidak cocok untuk diagnosis klinis skala besar dan hanya dapat berfungsi sebagai metode pemeriksaan tambahan. Saat ini, diagnosis biologi molekuler merupakan metode terpenting untuk mendeteksi DIV1. *World Organisation for Animal Health* (WOAH) merekomendasikan penggunaan *nested* PCR dan *Real time* PCR untuk deteksi DIV1 (Qiu, 2018).

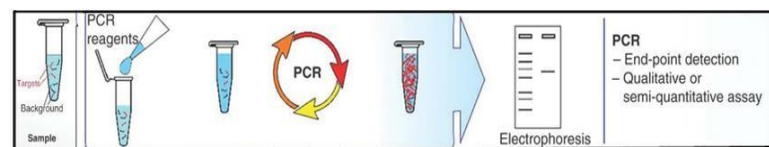
2.4 *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Pemeriksaan virus dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Proses pemeriksaan virus terdiri dari tiga tahapan berupa ekstraksi DNA/RNA dilanjutkan dengan proses amplifikasi dan ditutup dengan proses elektroforesis (Fauziati dan Yulianti, 2022).

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode yang mampu melakukan amplifikasi pada segmen DNA tertentu dari template DNA untai tunggal melalui enzim DNA polimerase pada setiap tahapan amplifikasi. Prinsip dasar proses PCR melalui tahapan diantaranya denaturasi, *annealing*, dan ekstensi. Reaksi tersebut terjadi melalui siklus yang terus berulang dengan temperatur yang berbeda-beda. Pada tahap denaturasi, terjadi peningkatan suhu 94-96°C yang mengakibatkan template DNA untai ganda terdenaturasi menjadi untai tunggal. Suhu pada proses denaturasi ditentukan oleh kandungan guanin (G) dan sitosin (C). Apabila kandungan guanin (G) dan sitosin (C) semakin banyak, maka semakin tinggi suhu yang dibutuhkan untuk memisahkan kedua untai ganda secara sempurna. Jika suhu denaturasi terlalu rendah atau waktu yang ditetapkan terlalu singkat, maka hanya daerah DNA cetakan yang kaya akan adenin (A) dan timin (T) yang akan terdenaturasi (Green, 2019). Berikutnya pada proses *annealing* suhu akan turun menjadi 50-60°C yang menyebabkan hibridisasi sepasang primer pada target yang komplementer. Di tahapan ekstensi, suhu kembali naik hingga 70°C yang mengakibatkan DNA polimerase akan melakukan perpanjangan primer membentuk untai komplementer terhadap untai *template* DNA.

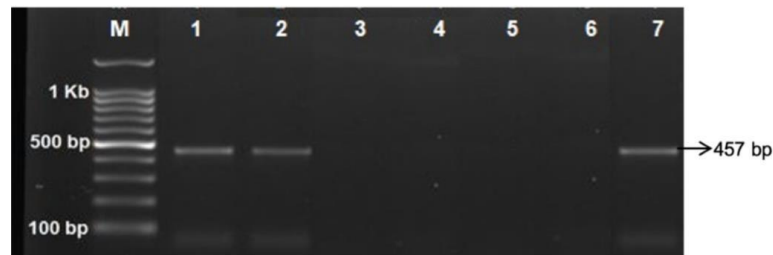
Deteksi *amplicon* dapat dilakukan melalui elektroforesis, hibridisasi *probe*, atau *Real-time*. (Wulandari, 2016).

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) atau reaksi berantai polimerasi merupakan metode enzimatik guna memperbanyak/melipatgandakan (*amplification*) secara eksponensial sekuen nukleotida tertentu yang dilakukan secara *in vitro*. Melalui metode ini dapat diperoleh DNA genom suatu virus dengan pelipatgandaan (perbanyakan), dengan mencampurkan kulturnya di dalam tabung PCR (Kurniawati, 2019). Berdasarkan (Gambar 7) metode PCR konvensional menjadi salah satu alternatif untuk mendeteksi adanya penyakit virus yang cukup akurat dan relatif lebih murah jika dibandingkan dengan metode lain, dalam PCR konvensional produk amplifikasi dilakukan analisis di akhir reaksi dengan elektroforesis gel (Quan, 2018).

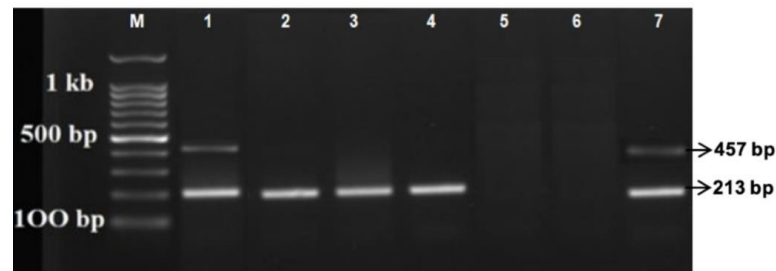


Gambar 9. Tahapan Deteksi Virus (Zhu, 2020)

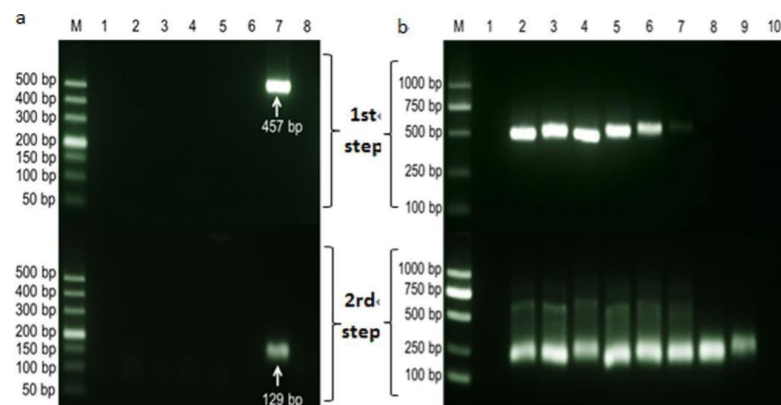
PCR konvensional adalah metode PCR secara umum menggunakan *buffer*, *primer*, *Taq enzyme*, *dNTP mix*, dan *template* DNA melalui proses termal (denaturasi, *annealing*, dan elongasi). Setelah dilakukan proses PCR, produk PCR akan diproses melalui gel elektroforesis sehingga akan muncul hasil pita atau *band* yang nantinya akan dilakukan perbandingan dengan standar (*band* atau pita kontrol). Pita-pita DNA tersebut dibandingkan satu sama lain dengan posisi di jalur penanda DNA (*marker*) (Fitri, 2021). Pengujian PCR konvensional melalui visualisasi pada elektroforesis gel *agarose*. Hasil dari proses elektroforesis akan menunjukkan pita-pita DNA yang letaknya tersebar, sesuai dengan berat molekulnya. Metode PCR konvensional ialah metode deteksi yang sangat spesifik dan sensitif. Cara kerja analisis dimulai dari ekstraksi DNA/RNA, amplifikasi, dan elektroforesis yang harus dilaksanakan secara aseptik (Koesharyani, 2015).



Gambar 10. Hasil Elektroforesis PCR (SNI 9062-1 : 2022)



Gambar 11. Hasil Elektroforesis semi-nested PCR (SNI 9062-1 : 2022)



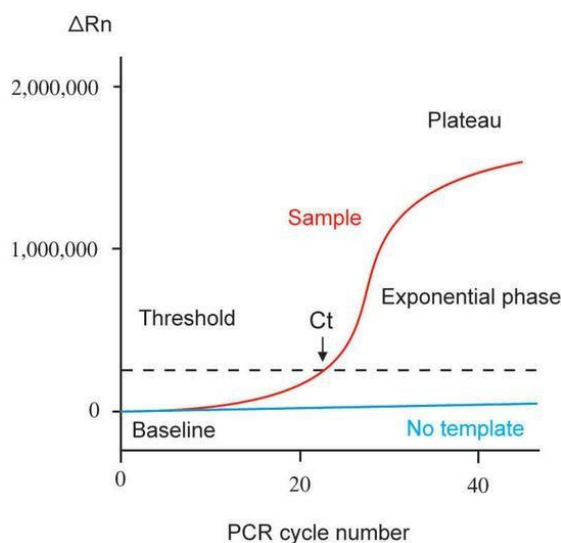
Gambar 12. Hasil Elektroforesis nested PCR (Qiu *et al.*, 2017)

Pada gambar 10 merupakan hasil elektroforesis PCR menggunakan satu pasang primer yang dimana menunjukkan perpendaran pita DNA pada ukuran 457 bp, pada gambar 11 merupakan hasil elektroforesis semi-nested PCR yang menggunakan tiga primer dimana hasil elektroforesis menunjukkan perpendaran pita DNA pada ukuran 457bp dan/ 213bp, sedangkan pada gambar 12 merupakan hasil elektroforesis nested PCR menggunakan 2 pasang primer dimana hasil elektroforesis menunjukkan perpendaran pita DNA pada ukuran 457 bp dan/ 129 bp.

Dalam bidang mikrobiologi, sebagai metode PCR yang lebih sensitif, teknik *nested* PCR dan semi-nested (sn) PCR telah dilaporkan berguna untuk mendeteksi DNA mikroba dari plasma manusia dan kultur darah (Parsternak

et al, 2008). *Nested* PCR dan snPCR adalah teknik di mana amplifikasi tambahan ditambahkan ke PCR konvensional (pertama), dan jumlah primer untuk amplifikasi PCR total berbeda. PCR konvensional memerlukan primer yang komplementer terhadap ujung DNA target. *Nested* PCR melibatkan dua set primer, yang digunakan dalam dua kali PCR berturut-turut, dengan set kedua dimaksudkan untuk mengamplifikasi target sekunder dalam produk hasil PCR pertama. Primer yang digunakan dalam putaran pertama amplifikasi diganti keduanya (*nested* PCR) atau hanya satu atau tidak ada yang diganti (*semi nested* PCR) untuk siklus amplifikasi kedua dan selanjutnya. Akhirnya, sensitivitas PCR meningkat. Metode *nested* PCR memerlukan total empat primer dan metode snPCR menggunakan total tiga primer dalam dua kali PCR (Nakanishi, 2012).

Teknik *Real-Time* PCR mampu mengevaluasi dan melakukan kuantifikasi secara langsung. Teknik ini dilakukan dengan mengintegrasikan teknik PCR dengan komputer dan perangkat lunak (Pranawaty, 2012). Prinsip kerja dari RT-PCR adalah mendeteksi dan mengkuantifikasi berdasarkan berbedanya pewarna yang berada pada Taqman probe (Kuslich, 2019). Probe akan mengikat untai Deoxyribo Nucleid Acid (DNA) target dan akan terakumulasi berdasarkan sinyal pewarna yang berpedar seiring dengan banyaknya siklus (Zhang *et al*, 2019). Satu siklus RT PCR akan memiliki tiga langkah yang berulang, yaitu denaturasi, annealing, dan elongasi (Azevedo, 2021). Probe mampu bereaksi hanya dalam siklus 2 langkah, yaitu dari suhu 94 – 95° C ke suhu 60° C dan kembali lagi ke suhu 94 – 95° C. Waktu yang diperlukan dalam satu siklus sebesar 45 detik, dengan 12-15 detik pada suhu tinggi dan 30 detik pada suhu lebih rendah (Debode, 2017).



Gambar 13. Kurva Amplifikasi RT PCR (Artika *et al.*, 2022)

Amplifikasi target akan terdeteksi pada fase eksponensial yang dapat disebut sebagai nilai *Cycle threshold* (Ct) (Gambar 13). Konsentrasi target yang lebih tinggi pada awal fase akan mengakibatkan kenaikan kurva amplifikasi secara signifikan dan akhir dari proses PCR pada RT-PCR ditandai dengan terbentuknya fase plateau (Mohd Ali *et al.*, 2019).

Menurut Maryati (2017), 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).

2.5 Validasi Metode

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Menurut Sugihartini *et al.* (2014) validasi terhadap suatu metode analisis menjadi faktor penting karena hanya metode analisis yang telah dibuktikan validitasnya, maka hasil pengukurannya bisa dipertanggung jawabkan dan dipergunakan sebagai landasan dalam perhitungan berikutnya.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September – Oktober 2024 di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL) Serang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya yaitu mikropipet berbagai ukuran (2-20 μ L; 10-100 μ L; 20-200 μ L; dan 100-1000 μ L), tip mikropipet (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, dan 1000 μ L), mikrotube (0,2 mL dan 1,5 mL), *microcentrifuge*, *thermal cyclers*, *UV sterilization cabinet*, *laminar air-flow*, *microwave*, *nanodrop spektrofotometer*, *electrophoresis chamber*, *gel scanner*, labu erlenmeyer, *beaker glass* 1000 mL, spidol, pemantik api, *pellet pastle*, gunting, pinset, bunsen, cetakan gel, dan *vortex*.

3.2.2 Bahan

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya yaitu akuades, DNAzol, etanol 96%, etanol 75%, 8mM NaOH, *Nucleous Free Water* (NFW), Promega Go Taq *Green Master mix* (yang berisi Taq DNA *Polymerase*, dNTP, *buffer* dan MgCl₂), SHIV – *Primer Forward* 1, SHIV – *Primer Reverse* 1, SHIV – *Primer Reverse* 2, *gBlocks Gene Fragment* Kontrol Positif DIV1, *agarose*, larutan Tris EDTA (TAE), larutan Tris EDTA (TE), *florosafe DNA stain*, 100 bp *DNA ladder*(*Marker*), dan akuabides.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Validasi Metode Pengujian *Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1)*

Validasi metode kerja dilakukan untuk memastikan keakuratan dan keandalan hasilnya. Terdapat beberapa tahapan dalam melakukan validasi metode kerja PCR menurut (ISO/IEC 17025. Validasi dan Verifikasi Metode Uji) sebagai berikut.

3.3.1.1 Uji Minimum Deteksi Limit (MDL)

Pengujian ini dilakukan dengan melakukan pengenceran pada kontrol positif DIV1 sintetik, pengenceran dilakukan sampai dengan 10 kali tingkat pengenceran, dengan faktor dilusi 1:9 (satu bagian sampel dan sembilan bagian pelarut) dan jenis dilusi yang digunakan ialah dilusi serial dimana pengenceran dilakukan bertahap dengan faktor dilusi yang sama, kemudian dilakukan pengujian menggunakan PCR. Nilai MDL ditentukan berdasarkan tingkat tertinggi yang masih menunjukkan hasil positif.

3.3.1.2 Uji *Repeatability*

Pengujian ini dilakukan dengan menyiapkan kontrol positif sedang, kontrol positif lemah, kontrol negatif/*Non Template Control* (NTC) dan 9 sampel uji *unknown* (tidak diketahui) yaitu sampel yang tidak diketahui dimana identitas atau status sampel tersebut oleh penguji, kemudian dilakukan pengujian dengan menggunakan PCR sebanyak 3 kali ulangan dengan peralatan dan waktu yang sama.

Hasil uji benar apabila :

1. Hasil uji sampel positif menunjukkan hasil positif
2. Hasil uji sampel negatif menunjukkan hasil negatif

3.3.1.3 Uji Spesifisitas

Pengujian ini dilakukan dengan menyiapkan 5 sampel yang terdiri dari sampel negatif DIV1, sampel positif penyakit *White*

Spot Syndrome Virus (WSSV), sampel positif penyakit *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), sampel positif penyakit *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV), dan kontrol positif DIV1. Kemudian, dilakukan pengujian menggunakan komponen *master mix* untuk pengujian DIV1, masing-masing dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Pengujian spesifisitas ini dilakukan untuk memastikan primer yang digunakan hanya mengamplifikasi DNA target yang diinginkan.

Hasil uji dikatakan spesifik apabila :

1. Hasil uji sampel positif penyakit lain menunjukkan hasil negatif.
2. Hasil uji kontrol positif DIV1 menunjukkan hasil positif.

3.3.2 Deteksi *Decapod Iridescent Virus 1* (DIV1)

Deteksi sampel menggunakan 36 sampel yang berasal dari hasil monitoring tambak secara monokultur yaitu hanya terdapat satu jenis komoditas pada petakan tambak yaitu udang vaname dan dengan sistem budidaya intensif pada tambak di Kebumen- Cilacap dan sistem budidaya tradisional pada tambak di Lampung Selatan dan Lampung Timur.

3.3.2.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan menyiapkan mikrotube 1,5 mL yang telah diberi kode lab, melakukan sterilisasi alat seperti gunting dan pinset menggunakan bunsen. Preparasi diawali dengan membuang etanol pada sampel awetan organ target, kemudian dibilas menggunakan akuades sebanyak dua kali, setelah dibilas sampel udang dicacah menggunakan gunting sampai halus menggunakan gunting yang telah disterilkan sebelumnya. Setelah halus, dipindahkan sampel ke dalam mikrotube 1,5 mL yang telah diberi kode lab menggunakan pinset sebanyak 25 – 50 mg.

3.3.2.2 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menghancurkan sampel yang telah dipreparasi sebelumnya menggunakan *pellet pastle*, kemudian dilanjutkan dengan menambahkan 1.000 µl DNAzol reagen yang berfungsi untuk melisiskan sel. Selanjutnya, disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rcf selama 10 menit. Setelah itu dipindahkan 500 µL supernatan ke dalam mikrotube baru yang telah berisi 500 µL etanol 96%, dikocok mikrotube secara perlahan agar tercampur dengan baik, lalu didiamkan selama 1 – 3 menit. Kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 4.000 rcf selama 2 menit . Selanjutnya dibuang etanol 96% sehingga yang tersisa hanya pelletnya saja. Ditambahkan etanol 75% sebanyak 1.000 µL, didiamkan selama 1 menit, lalu dibuang etanol 75% dan dikeringkan selama 5 – 15 detik. Dilakukan pencucian kembali dengan menambahkan etanol 75% sebanyak 1.000 µL, lalu dibuang kembali etanol 75%, lalu dikeringkan selama 5 – 15 detik. Selanjutnya pada tahap akhir yakni dengan menambahkan 8 mM NaOH sebanyak 200 µL kemudian di homogenkan.

3.3.2.3 Uji Kuantitatif DNA

Uji kuantitatif DNA dilakukan dengan menggunakan alat *nanodrop* spektrofotometer. Diawali dengan diambil sebanyak 2 µL sampel yang telah dilakukan ekstraksi, kemudian diletakkan diatas *microdrop plate*. Selanjutnya *microdrop plate* dimasukkan kedalam mesin lalu mesin dijalankan.

Hasil uji kuantitatif DNA dikatakan optimal apabila:

1. Nilai konsentrasi berada pada 10 – 100 ng/ µL.
2. Nilai kemurnian berada pada panjang gelombang 260/280 nm sekitar 1,8 hingga 2,0 ng/ µL.

3.3.2.4 Amplifikasi

Tahapan amplifikasi bertujuan untuk menggandakan DNA. Tahapan sebelum dilakukan amplifikasi pada virus DNA yaitu membuat reagen melalui dua tahapan diantaranya sebagai berikut. Komposisi larutan PCR step 1 untuk deteksi DIV1 disiapkan (25 μ L/reaksi) dengan mencampurkan bahan-bahan pada tabel 1.

Tabel 1. Komposisi larutan PCR step 1

No.	Komponen	Volume (μ L)
1.	Promega <i>Go Taq Green Master mix</i>	12,5
2.	<i>Primer forward</i> SHIV-F1	1
3.	<i>Primer reverse</i> SHIV-R1	1
4.	<i>Nuclease Free Water</i> (NFW)	8,5
5.	Genom DNA	2
Total Volume		25

Selanjutnya dibuat komposisi larutan PCR step 2 (*semi nested*) untuk deteksi DIV1 (25 μ L/reaksi) dengan mencampurkan bahan-bahan pada tabel 2.

Tabel 2. Komposisi larutan PCR step 2 (*semi nested*)

No.	Komponen	Volume (μ L)
1.	Promega <i>Go Taq Green Master mix</i>	12,5
2.	<i>Primer forward</i> SHIV-F1	1
3.	<i>Primer reverse</i> SHIV-R2	1
4.	<i>Nuclease Free Water</i> (NFW)	8,5
5.	Produk PCR step 1	2
Total Volume		25

Adapun primer yang digunakan dalam metode PCR menurut acuan SNI 9062-1 : 2022 yang berdasarkan pada World Organisation for Animal Health (WOAH) yaitu sebagai berikut.

1	ATGGTAGAAT CTCAGGAAGT GTTTTACAAT CCAGAATTTT ACAACTTGTT AAATAAAAAAT	60
61	CCCAATTTGA TCGCATTCAA GAACGGTGTA TACGATTTCG AAAATGATGT TTTCAGGGAT	120
121	GGAAGTCCAG AAGATTATCT TTCAGTTAAA CTCCAATCG ATTACATTGA CTACGGCACG	180
181	ATTGATCATC CCGAAGTTAT CGCAGTAGAC AACTTTTCC AAAAGGTATT CCCCAACATT	240
241	GAAATCAGAG ATTATTTTCT AGATCAGGCC AGTTTGTAT TCGTTGGTGG AAATCACAAC	300
301	AAGGTCATTC TATTTTGGAC AGGAGAGGGA AATAACGGGA AAACGGTAAC TCAAACGTTA	360
361	TTTGAGAAAA TGTTGGGAAA GTTTGCAATT AAATCAACA CATCTCTGAT TACGGGTAAA	420
421	AAGGCAAACA TGGGAGCTGC AAGTCCGAA TTGGCCA <u>GGG CGGGAGATGG TGTTAGAT</u> GG	480
481	GCAGTCATGG ATGAACCAA TGCTGACGAA ATCATCAGTT CGGGAACGTT AAAGGGTCTC	540
541	ACGGGAAACG ATTCGTATTG GGCTCGAGAT TTGTTCCAAC GAGGAAAGGA AACGAAAGAA	600
601	ATTATACCCT TTTTCAAATT ACACATGATT TGCAACAAGC TTCCAGCAA <u>T CAAGGATGCC</u>	660
661	<u>GATCAAGCAA</u> CGTGGAATCG AATCAGGGTT ATTCCATTCG AAAGTACATT CAAACATGAA	720
721	AACGATTGCC CCGTTGAATT TGAAGAACAA ATGAAACAGA AAACATTCCC CATGGATAAA	780
781	AATTTACAG AAAAGATTCC CGAAATGGTA AAACCCCTGG CTGGTATCT T ATTCAGAGA	840
841	TGGAAGACTA TCAGGAAGTG TGAAATTGTA GAGCCAGAGA TTGTAACGGT AGC <u>TACATCT</u>	900
901	<u>TCGTACCGAA ACGA</u> AAACGA TATTTACAAG CAATTCGAAG ATCAGTGTAT CCATCAAGAG	960
961	AAAAATGGAA ATCTCAGCTT TACCGTTTTA TATTCAGTAT TCAAGGATTG GTTCAAAGAA	1020
1021	GAGTATCCTA ATATGACCAT CCCAATCAGA CAAACGATCA GAAAACATTT CATTTCAAA	1080
1081	TTTGGACAAC TTGAGAGAGG TAGATGGAAG AACTTTATAT GCAAGAAGGA CGAAGACGAC	1140
1141	TTTGGTCGGG ATAGTGATGA AGATGGTGAC GATGTTGTGA ATCCCGCTCT TTAGTTTAA	1200

Gambar 14. Sekuens Fragmen DIV1 (GenBank KY681040) dan Posisi Primer

First step PCR:

F1 : 5'-GGG CGG GAG ATG GTG TTA GAT-3'

R1: 5'-TCG TTT CGG TAC GAA GAT GTA-3'

Semi nested PCR:

F1 : 5'-GGG CGG GAG ATG GTG TTA GAT-3'

R2 : 5'-TTG CTT GAT CGG CAT CCT TGA-3'

Kemudian dipersiapkan bahan-bahan tersebut sebanyak 1x jumlah reaksi lalu, distribusikan komposisi larutan PCR ke dalam mikrotube 0,2 mL dengan volume masing-masing 23 μ L, kecuali genom DNA. Selanjutnya, ditambahkan genom DNA, kontrol negatif dan kontrol positif pada masing – masing mikrotube yang telah disiapkan sebanyak 2 μ L. Kemudian, dilakukan pengaturan profil amplifikasi pada *thermocycler* untuk first step pada tabel 3.

Tabel 3. Profil Amplifikasi *First* PCR

Proses		<i>First</i> PCR		
		Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Denaturasi awal		95	3 menit	1
Amplifikasi	Denaturasi	95	30 detik	35
	<i>Annealing</i>	59	30 detik	
	Ekstensi	72	30 detik	
Ekstensi akhir		72	2 menit	1
<i>Hold</i>		4		

Dan dilakukan pengaturan profil amplifikasi pada *thermocycler* untuk step 2 (*semi nested*) pada tabel 4.

Tabel 4. Profil Amplifikasi *semi nested* PCR

Proses		snPCR		
		Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Denaturasi awal		95	3 menit	1
Amplifikasi	Denaturasi	95	30 detik	35
	<i>Annealing</i>	59	30 detik	
	Ekstensi	72	20 detik	
Ekstensi akhir		72	2 menit	1
<i>Hold</i>		4		

3.3.2.5 Pembuatan Gel *Agarose* 2%

Pembuatan gel *agarose* merupakan proses pembuatan media pemisahan dalam teknik elektroforesis untuk memisahkan fragmen DNA dan RNA berdasarkan ukurannya. Sebanyak 2 gram sampel agraris ditimbang dan ditambahkan dengan 100 mL larutan TAE 0,5X. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 1 menit. Selanjutnya, larutan dipanaskan menggunakan oven microwave selama 10 menit hingga mendidih dan tidak berwarna. Setelah itu, larutan didinginkan pada suhu ruang selama 15 menit. Kemudian, ditambahkan 5 μ L flurosaf DNA stain dan dihomogenkan. Larutan tersebut kemudian dituangkan ke dalam cetakan gel yang telah disiapkan dan ditunggu hingga *agarose* padat dan mengeras

3.3.2.6 Elektroforesis

Tahap akhir dalam PCR yaitu elektroforesis dimana tahap ini berfungsi untuk memisahkan DNA berdasarkan ukuran berat molekul dan struktur fisik molekulnya. Gel *agarose* dimasukkan ke dalam mesin elektroforesis horizontal, selanjutnya hasil produk PCR dan *marker* dimasukkan sebanyak 5 μ L kedalam sumuran gel *agarose*. Setelah itu mesin elektroforesis dihidupkan dengan melakukan pengaturan pada tegangan 100 volt selama 25 menit. Kemudian, gel *agarose* direndam menggunakan akuabides sebagai tahap pembilasan selama 5 menit. Gel *agarose* diletakkan di dalam mesin D-Digit/Gel scanner, kemudian dilakukan pemindaian menggunakan aplikasi D-Digit Image Acquisition.

3.3.2.7 Analisis Data

Data hasil pengujian validasi dan deteksi *Decapod Iridescent Virus* 1 menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang diperoleh pada penelitian ini akan dianalisis secara deskriptif

komparatif yaitu metode pembahasan yang memaparkan atau menggambarkan hasil yang akan didapat serta membandingkan dengan literatur. Sebagai contoh, uji dinyatakan positif apabila adanya pita yang berpendar pada ukuran 457 bp dan/atau 213 bp atau sejajar dengan kontrol positif dan uji dinyatakan negatif apabila tidak adanya pita fragmen yang berpendar pada ukuran 457 bp atau 213 bp. Ukuran pita perpendaran tersebut dilihat dari pita *marker* yang dimana satu pita pada *marker* mewakili ukuran 100 bp. Tebal atau tipisnya pita DNA pada hasil elektroforesis dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya konsentrasi DNA, kualitas DNA dan faktor pendukung lainnya yaitu suhu, waktu serta kekuatan medan listrik saat elektroforesis. Apabila pita DNA masih dapat terlihat dengan mata pengamat maka disimpulkan bahwa terdapat pita DNA yang berpendar. Berikut interpretasi hasil pengujian DIV1 dengan snPCR

Tabel 5. Interpretasi Hasil Pengujian DIV1 dengan snPCR

Kode	Ukuran Pita DNA (bp)	Interpretasi
Contoh uji positif DIV1	457	Terdeteksi DIV1 pada <i>first</i> PCR
	457 dan/atau 213	Terdeteksi DIV1 pada snPCR
Contoh uji negatif DIV1	Tidak ada pita fragmen ukuran 457/ 213	Tidak terdeteksi DIV1
Kontrol negatif (NFW)	Tidak ada pita	Tidak ada kontaminasi
Kontrol Positif DIV1 <i>first</i> PCR	457	Reaksi berjalan dengan benar
Kontrol Positif DIV1 sn PCR	213	

Selanjutnya adalah tabel kontingensi. Adapun tabel kontingensi 2x2 pada validasi metode PCR berfungsi untuk mengevaluasi performa metode dengan menghitung beberapa

parameter seperti akurasi, sensitivitas, spesifisitas, nilai duga positif, dan nilai duga negatif sesuai dengan Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budi Daya Nomor 442 tahun 2024 tentang pengujian mutu obat ikan dalam rangka penerbitan sertifikat pendaftaran obat ikan.

Tabel 6. Kontingensi 2x2

Nilai	Hasil Uji		
	Positif	Negatif	Total
Positif	<i>True Positive</i> (TP)	<i>False Positive</i> (FP)	TP+FP
Negatif	<i>False Negative</i> (FN)	<i>True Negative</i> (TN)	FN+TN
Total	TP+FN	FP+TN	N

Keterangan :

TP (*True Positive*) : Jumlah keseluruhan sampel uji yang menunjukkan positif benar (pengujian memberikan hasil positif terhadap ekstrak DNA positif *Decapod Iridescent Virus 1*) (hasil sesuai)

FP (*False Positive*) : Jumlah keseluruhan sampel uji yang menunjukkan positif salah (pengujian memberikan hasil negatif terhadap ekstrak DNA positif *Decapod Iridescent Virus 1*)

TN (*True Negative*) : Jumlah keseluruhan sampel uji yang menunjukkan negatif benar (pengujian memberikan hasil negatif terhadap ekstrak DNA negatif *Decapod Iridescent Virus 1*)

FN (*False Negative*) : Jumlah keseluruhan sampel uji yang menunjukkan negatif salah (pengujian

memberikan hasil positif terhadap ekstrak DNA negatif *Decapod Iridescent Virus 1*).

Perhitungan akurasi, sensitivitas, spesifisitas, nilai duga positif, nilai duga negatif dan akurasi berdasarkan tabel diatas adalah:

– Akurasi

Akurasi (kecermatan) merupakan ukuran ketepatan atau kedekatan hasil yang sebenarnya dan dinyatakan dalam nilai.

$$\text{Akurasi (\%)} = (TP+TN)/N \times 100\%$$

– Sensitivitas

Sensitivitas adalah proporsi subyek yang sakit dengan hasil uji diagnostik positif (positif benar) dibanding seluruh subyek yang sakit (positif benar + negatif palsu).

$$\text{Sensitivitas (Sp)} = TP / (TP+FN)$$

– Spesifisitas

Spesifisitas merupakan proporsi subyek sehat yang memberikan hasil diagnostis negatif (negatif benar) dibandingkan dengan seluruh subyek yang tidak sakit (negatif benar + positif palsu).

$$\text{Spesifisitas (S)} = TN / (TN+FP)$$

– *False Negative Rate (FNR)*

False Negative Rate (FNR) adalah proporsi hasil tes negatif terhadap seluruh populasi yang positif

$$\text{False Negative Rate (FNR)} = FN / (FN+TP)$$

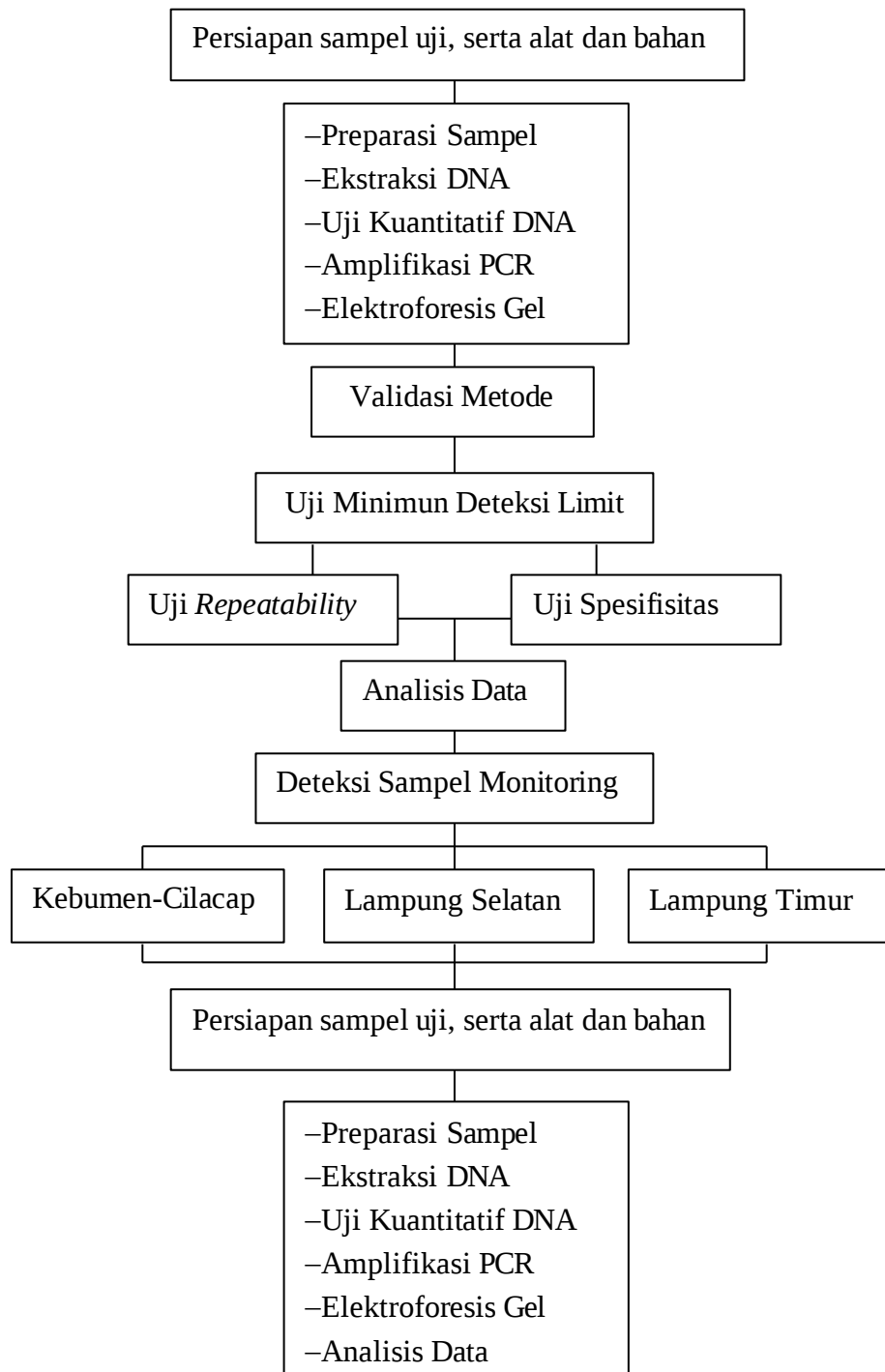
– *False Positive Rate (FPR)*

False Positive Rate (FPR) adalah proporsi hasil tes yang positif terhadap seluruh populasi yang negatif

$$\text{False Positive Rate (FPR)} = FP / (FP+TN)$$

3.4 Diagram Alir Penelitian

Adapun diagram alir yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut :



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Adapun kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut,

1. Metode kerja *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang digunakan untuk deteksi *Decapod Iridescent Virus 1* (DIV1) telah divalidasi dan terbukti memiliki akurasi, sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi karena hasil pemeriksaan sampel uji sudah sesuai dan memberikan jaminan hasil pengujian yang benar.
2. Hasil deteksi menunjukkan bahwa dari 36 sampel yang didapat dari hasil monitoring tambak di Kebumen-Cilacap, Lampung Timur dan Lampung Selatan tidak terdeteksi sampel udang vaname yang terinfeksi *Decapod Iridescent Virus 1* (DIV1).

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian adapun saran untuk penelitian berikutnya yaitu pengembangan metode deteksi DIV1 yang lebih sensitif dan spesifik, pemeriksaan sampel menggunakan beberapa jenis sampel baik air tambak maupun pakan alami untuk udang vaname

DAFTAR PUSTAKA

- Adiwijaya, D., P.R. Sapto, E. Sutikno, E. Sugeng, dan Subiyanto. 2003. Budidaya udang vaname (*L. vannamei*) sistem tertutup yang ramah lingkungan. Departemen Kelautan dan Perikanan. Dirjen Perikanan Budidaya. Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau Jepara. 29 hlm.
- Anderson, J. L., Valderrama, D., Jory, D. 2017. Shrimp Production Review. Global Aquaculture Alliance: Dublin.
- Andrade TP, Lightner DV. 2009. Development of a method for the detection of infectious myonecrosis virus by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification and nucleic acid lateral flow hybrid assay. *Journal Fish Dis.* ;32(11):911-924. doi:10.1111/j.1365-2761.2009.01072.x.
- Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., and Antonjaya, U. 2022. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*, 13(12), 2387. <https://doi.org/10.3390/genes13122387>.
- Azevedo, M. I. N., dan Lilenbaum, W. 2021. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Letters in applied microbiology*. 72(5): 496-508.
- Chinchar VG, Hick P, Ince IA, *et al.* 2017. ICTV virus taxonomy profile: Iridoviridae. *Journal Gen Virol*. 98(5):890-891. doi:10.1099/jgv.0.000818
- Chomczynski, P., Mackey, K., Drews, R., and Wilfinger, W. 1997. DNAzol®: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques*, 22(3) : 550-553.

- Darcy-Tripier, F., Nermut, M. V., Braunwald, J., and Williams, L. D. 1984. The organization of frog virus 3 as revealed by freeze-etching. *Virology*, 138(2), 287-299.
- Debode, F., Marien, A., Janssen, É., Bragard, C., and Berben, G. 2017. The influence of amplicon length on real-time PCR results. *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement*. 21(1): 3-11.
- Fatchiyah EL, Arumningtyas S, Widyarti, dan Rahayu S, 2011. Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis. Jakarta: Erlangga. Hal. 48-57.
- Fauziati, F., dan Yulianti, D. 2022. Pemeriksaan virus white spot syndrom virus (WSSV) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) di Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu Dan Keamanan Hasil Perikanan (SKIPM) Aceh. *Jurnal Marikultur*, 4(1), 1-7.
- Feranisa A, 2016. Komparasi Antara Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Loopmediated Isothermal Amplification (LAMP) Dalam Diagnosis Molekuler. *Odonto: Dental Journal*; 3(2): 145-151.
- Fitri, R. R. A., dan Prasetyo, E. 2021. Perbandingan Metode Pcr Konvensional Dengan Metode Pcr Portable Kit Untuk Deteksi WSSV Pada Udang Vannamei. *Jurnal Ruaya: Jurnal Penelitian dan Kajian Ilmu Perikanan dan Kelautan*. 9(1): 54-62.
- Green, M. R., and Sambrook, J. 2019. Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Protocols Laboratory Press: Birmingham.
- Haliman, R.W. dan Adijaya, S.D. 2005. Udang vannamei, Pembudidayaan dan Prospek Pasar Udang Putih yang Tahan Penyakit. Penebar Swadaya, Jakarta, 75 hlm.
- Harahap AS. 2017. Uji kualitas dan kuantitas DNA beberapa populasi pohon kapur Sumatra. *Journal of Animal Science and Agronomy Panca Budi*. 2(2): 1-6.
- Harahap, M. 2018. Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *Jurnal ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*. 2(1): 21-26.
- Harmita, 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1, (3), 117-135.

- He Z, Zhao J, Chen X, Liao M, Xue Y, Zhou J, *et al.* 2021. The molecular mechanism of hemocyte immune response in *Marsupenaeus japonicus* infected with decapod iridescent virus 1. *Front Microbiol*, 12:710845. doi: 10.3389/fmicb.2021.710845.
- Hidayat, R. 2015. Perbandingan Metode Kit Komersial dan SDS untuk Isolasi DNA Babi dan DNA Sapi dari Simulasi Cangkang Kapsul Keras untuk Deteksi Kehalalan Menggunakan Real-Time PCR (*Polymerase Chain reaction*). UIN Syarif Hidayatullah : Jakarta.
- Hidayati H, Saleh E, dan Aulawi T, 2016. Identifikasi Keragaman Gen BMPR-1b (Bone Morphogenetic Protein Receptor Ib) pada Ayam Arab, Ayam Kampung dan Ayam Ras Petelur Menggunakan PCR-RFLP. *Jurnal Peternakan UIN Sultan Syarif Kasim*; 13(1):1-12.
- Hikmatyar, M.F., Royani, J.I., Dasumiati. 2015. Isolasi dan Amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium flagelliform*) Untuk identifikasi Keragaman Genetik. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 2(2): 42-48
- International Committee on Taxonomy of Viruses
<https://ictv.global/report/chapter/iridoviridae/iridoviridae>
- Kordi, M. G. H. 2010. *Budidaya Perairan Buku Kedua*. Yogyakarta. PT. Citra Aditya Bakti. 947 hlm.
- Koesharyani Isti dan Lila Gardenia. 2015. Metode Deteksi Cepat White Spot Syndrome Virus (WSSV) dan Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) Menggunakan Portabel/Mobile Polymerase Chain Reaction. *Media Akuakultur*. 10(1): 43-49.
- Kuslich, C. D., Chui, B., and Yamashiro, C. T. 2019. Overview of PCR. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*. 18(1): 134.
- Kurniawati, M. D., Sumaryam, S., dan Hayati, I. N. 2019. Aplikasi Polymerase Chain Reaction (PCR) Konvensional dan Real Time-PCR untuk Deteksi Virus VNN (Viral Nervous Necrosis) pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Techno-Fish*. 3(1): 19-30.
- Liao XZ, Wang CG, Wang B, *et al.* 2020. Comparative Transcriptome analysis of *Litopenaeus vannamei* reveals that triosephosphate isomerase-like genes

- play an important role during decapod iridescent virus 1 infection. *Front Immunol.* 11:1904. doi:10.3389/fimmu.2020 .01904.
- Liao, X., He, J., and Li, C. 2022. Decapod iridescent virus 1: An emerging viral pathogen in aquaculture. *Reviews in aquaculture*, 14(4), 1779-1789. <https://doi.org/10.1111/raq.12672>
- Lightner DV. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *Journal Invertebr Pathol.* 106(1):110130. doi:10.1016/j.jip.2010.09.012.
- Ludyasari, A. 2014. Pengaruh Suhu Annealing pada Program PCR terhadap Keberhasilan Amplifikasi DNA Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) Laguna Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah. Doctoral Dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Maryati, H., dan Nurjismi, R. 2017. Deteksi Penyakit WSSV (White Spot Syndrome Virus) pada Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) dengan Metode PCR Konvensional dan Real Time PCR (qPCR) Menggunakan Hydrolisis Probe. *Jurnal Ilmiah Respati*, 8(1).
- Merdekawati, F., & Nurhayati, B. 2023. Desain Primer Gen Pengkode RNA Dependent RNA Polimerase (RDRP) untuk Deteksi Sars Cov2 dengan menggunakan Real Time Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*. 15(1): 30-36.
- Mohd Ali, M. R., Lih Huey, L., Foo, P. C., Goay, Y. X., Ismail, A. S., Mustaffa, K. M. F., Aziah, I., Kia Kien, P., Harun, A., Ismail, N., and Yean Yean, C. 2019. Duplex taqMan hydrolysis probe-based molecular assay for simultaneous detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Leptospira* spp. DNA. *BioMed Research International*, 6.
- Muwarni, S. 2015. Dasar – Dasar Mikrobiologi Veteriner. Malang: UB Press.
- Nakanishi, Y., Shimizu, T., Tsujino, I., Obana, Y., Seki, T., Fuchinoue, F., and Nemoto, N. 2012. Semi-nested real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the successful quantitation of cytokeratin mRNA expression levels for the subtyping of non-small-cell lung carcinoma using paraffin-embedded and microdissected lung biopsy specimens. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 46(2), 85-96.

doi: 10.1267/ahc.12024.

- Nugraha, F., Roslim, D, I., Ardilla, Y. P., Herman. 2014. Analisis sebagian Sekuen Gen Ferritin 2 pada Padi (*Oryza sativa* L.) Indragiri Hilir, Riau. *Biosaintifika*. 6(2): 95-103.
- Pasternak A. O., Adema K. W., Bakker M., Jurriaans S., Berkhout B., Cornelissen M., Lukashov V. V. 2008. Highly sensitive methods based on seminested real-time reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 unspliced and multiply spliced RNA and proviral DNA. *Journal Clin. Microbiol.* 46:2206–2211. doi: 10.1128/JCM.00055-08
- Pérez Farfante, I., & Kensley, B. 1997. "Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world." *Mémoires du Muséum national d'Histoire Naturelle*, 175, 1-233
- Pooja S, Sudesh D, Poonam K, Joginder SD, dan Suresh KG, 2014. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: A Review. *African J Biotechnol.* 13(19): 1920–1928
- Portley, N. 2016. SFP Report on the Shrimp Sector: Asian Farmed Shrimp Trade and Sustainability. Sustainable Fisheries Partnership Foundation. 18.
- Pranawaty, R. N., Buwono, I. D., dan Liviaawaty, E. 2012. Aplikasi Polymerase Chain Reaction (PCR) Konvensional dan Real-Time PCR Untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus Pada Kepiting. *Jurnal Perikanan Kelautan*. 3(4).
- Promega, GoTaq® G2 Green Master Mix, diakses pada tanggal 5 Desember 2024 pukul 08.35, <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-g2-green-master-mix-protocol/>
- Qiu, L., Chen, MM., Wan, XY. *et al.* 2017. Characterization of a new member of *Iridoviridae*, Shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Scientific Reports*, 7, 11834. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10738-8>.
- Qiu L, Chen X, Zhao RH, Li C, Gao W, Zhang QL, *et al.* 2019. Description of a natural infection with decapod iridescent virus 1 in farmed giant

- freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Viruses*. 11:354. doi: 10.3390/v11040354.
- Qiu, L., Chen, M. M., Wan, X. Y., Zhang, Q. L., Li, C., Dong, X., *et al.* 2018. Detection and quantification of shrimp hemocyte iridescent virus by TaqMan probe based realtime PCR. *Journal Invertebr. Pathol.* 154, 95–101. doi: 10.1016/j.jip.2018.04.005.
- Quan, P. L., Sauzade, M., and Brouzes, E. 2018. dPCR: a Technology Review. *Sensors*. 18(4): 1271. <https://doi.org/10.3390/s18041271>.
- Rafiqie, M. 2014. Penyakit udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) di tambak PT Tanjung Bejo, Pajajaran Kabupaten Probolinggo. *Samakia Jurnal Ilmu Perikanan*. 5(1): 20-24.
- Saini R., Santhanam J., Othman N. H., Saini D., Tang T. H. 2009. Single-tube seminested PCR assay for detecting human papillomavirus in clinical samples. *Open Microbiol Journal*. 3:106–112. doi: 10.2174/1874285800903010106.
- Srisala J, Sanguanrut P, Thaiue D, Laiphrom S, Siri wattano J, Khudet J, *et al.* 2021. Infectious myonecrosis virus (IMNV) and decapod iridescent virus 1 (DIV1) detected in captured, wild *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 545:737262. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737262.
- Riana A. D. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Gen Penyandi Protein Struktural VP24 White Spot Syndrome Virus (WSSV) pada UDANG WINDU (*Penaeus monodon* Fabricus, 1798). Universitas Hasanuddin : Makassar.
- Setiaputri, A. A., Barokah, G. R., Sahaba, M. A. B., Arbajayanti, R. D., Fabella, N., Pertiwi, R. M., dan Abdullah, A. 2020. Perbandingan metode isolasi DNA pada produk perikanan segar dan olahan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(3) : 447-458. doi:10.17844/jphpi.v23i3.32314.
- Riyanto. 2014. Validasi dan verifikasi metode uji sesuai dengan ISO/IEC 17025 laboratorium pengujian dan kalibrasi. Yogyakarta: Deepublish.
- Sugihartini, N., Fudholi, A., Pramono, S., dan Sis mindari, S. 2014. Validasi Metode Analisa Penetapan Kadar Epigallocatekin Galat dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, *Pharmaciana*, 4(1), 39–44.
- Suyanto dan Mudjiman., 2001. Budidaya Udang Windu, Penebr Swadaa. Jakarta

- Tanio, E. P. 2017. Efisiensi Transformasi Plasmid Pta7002-Atrkd4 Pada *Escherichia Coli* Bl21 (De3) Dengan Metode Kejutan Panas. Universitas Atma Jaya : Depok.
- Wahyuni dan Ramadhani, I. 2020. Mikrobiologi dan Parasitologi. Purwokerto: CV. Pena Persada.
- Wulandari, D. 2016. Teknik Amplifikasi Asam Nukleat. Pendidikan Berkesinambungan Patologi Klinik. Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Wyban & Sweeney, 1991. Intensive Shrimp Production Technology. The Oseanic Institute Shrimp Manual. Honolulu, Hawai, USA, Hal 158.
- Xu, L., Wang, T., Li, F., and Yang, F. 2016. Isolation and preliminary characterization of a new pathogenic iridovirus from redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Dis. Aquat. Org.* 120, 17–26. doi: 10.3354/dao03007.
- Yusuf ZK, 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek*; 5(6): 1-6.
- Zaidy, A. B., Anggoro, A. D., dan Kasmawijaya, A. 2021. Pengaruh Penggunaan Nanobubble dalam Transportasi Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Akuatika Indonesia*, 6(2), 50-56.
- Zhang, H., Li, H., Zhu, H., Pekárek, J., Podešva, P., Chang, H., and Neužil, P. 2019. Revealing the secrets of PCR. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 298
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., and Neužil, P. 2020. PCR Past, Present and Future. *Biotechniques*. 69(4): 317-32. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>