

DETEKSI PENYAKIT VIRAL PADA UDANG VANNAMEI (*Litopennaeus vannamei*) DENGAN METODE *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

VIRAL DISEASE DETECTION IN VANNAMEI SHRIMP (*Litopennaeus vannamei*) METHOD *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Bambang Hanggono^{1*}, Muhammad Junaidi²

¹⁾ Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo

²⁾ Program Studi Budidaya Perikanan, Akademi Perikanan Ibrahimy Situbondo

*Penulis Korespondensi : Email: bambanghanggono32@gmail.com

(Diterima September 2014/Disetujui Nopember 2014)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gejala klinis udang vannamei yang virus serta mengetahui teknik diagnosa untuk mendeteksi TSV, IHHNV, IMNV dan WSSV pada udang vannamei dengan metode PCR. Materi yang digunakan dalam penelitian adalah 180 sampel udang vannamei terdiri dari 75 sampel larva, 25 sampel naupli, 60 sampel tokolan dan 20 sampel kaki renang. Penelitian ini menggunakan metode survey, data primer diambil dengan cara observasi, dokumentasi wawancara, dan partisipasi aktif. Sedangkan data skunder dikumpulkan melalui studi literatur. Data yang sudah terkumpul selanjutnya dianalisis secara deskriptif. Hasil analisis menunjukkan bahwa gejala klinis dari penyakit yang disebabkan oleh virus adalah terdapat bintik-bintik putih pucat kekuningan pada kultikultura dan kurang nafsu makan untuk udang IHHNV. Sedangkan untuk virus IMNV tubuh udang pucat tampak seperti udang rebus. Proses (PCR) Untuk mendeteksi adanya infeksi firus terdiri dari Ekstraksi, Amplifikasi, Elektroforosis, dan dokumentasi. Hasil uji PCR terhadap 180 sampel udang adalah 5 sampel terinfeksi WSSV, 3 sampel terinfeksi IHHNV, 11 sampel terinfeksi IMNV dan sisanya tidak terinfeksi virus.

Kata kunci: Viral, PCR, vannamei

ABSTRACT

This study aimed to determine the clinical symptoms of the virus vannamei shrimp and to know the diagnosis techniques for the detection of TSV, IHHNV, WSSV at IMNV and vannamei shrimp by PCR. Materials used in the study were 180 samples of vannamei shrimp larvae consisted of 75 samples, 25 samples naupli, 60 samples and 20 samples tokolan swimming leg. This study uses survey, primary data collected by observation, interview documentation, and active participation. While the secondary data collected through the study of literature. Data already collected then analyzed descriptively. The analysis showed that the clinical symptoms of the disease caused by the virus is contained white spots on a pale yellowish kultikultura and less appetite for shrimp IHHNV. As for the body IMNV virus looks like a pale shrimp boiled shrimp. Process (PCR) to detect the presence of infection firus consists of extraction, amplification, elektroforosis, and documentation. PCR test results on 180 samples of shrimp is 5 WSSV infected samples, 3 samples infected with IHHNV, 11 infected samples IMNV and the rest are not infected with the virus.

Keyword: Viral, PCR, vannamei

PENDAHULUAN

Udang merupakan salah satu komoditas unggulan yang diproyeksikan mengalami peningkatan produksi tiap tahun sebesar 13 % untuk udang Windu dan 16 % untuk udang Vannamei, pada tahun 2014 produksi udang mencapai 699.000 ton, yang terdiri atas 188.000 ton udang Windu dan 511.000 ton udang Vannamei. (Direktorat Kesehatan Ikan dan Lingkungan, 2010). Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu pilihan jenis udang unggul yang dibudidayakan di tambak, selain udang Windu (*Litopennaeus monodon* Fab.). Di Indonesia, udang Vannamei dibudidayakan di Jawa Timur. Keunggulan udang Vannamei antara lain pakan yang diberikan kandungan proteinnya relatif rendah bila dibandingkan dengan dengan pakan yang diberikan pada udang windu sehingga harga pakan relatif murah, memiliki *survival rate* yang tinggi, relatif lebih tahan penyakit daripada jenis udang lainnya, induknya sudah dapat didomestikasi, waktu pemeliharaan lebih pendek dan pertumbuhannya cepat. (Kordi, 2007 dalam Soleh, 2009)

Pencapaian target produksi ini dapat dilakukan melalui kegiatan eksintensifikasi dan intensifikasi budidaya yang dicirikan dengan adanya modifikasi daya dukung lingkungan serta penambahan input produksi seperti pakan, obat ikan dan bahan kimia lain. Hal tersebut berpotensi menimbulkan penyakit apabila tidak diikuti dengan pemilihan teknologi yang tepat serta pengelolaan lingkungan yang baik. (Direktorat Kesehatan Ikan dan Lingkungan, 2010)

Peningkatan produksi tersebut tentunya memerlukan inovasi teknologi budidaya perikanan tepat guna baik tradisional, semi intensif maupun intensif. Jika teknologi tersebut diterapkan dengan cara tidak tepat dan "over activity" akan berdampak pada lingkungan. Disamping itu juga merupakan upaya modifikasi terhadap karakter oko-biologi (lingkungan, biologi reproduksi, kepadatan, pakan dll.) yang dapat menimbulkan tekanan atau stres pada komoditas yang dibudidayakan, sehingga rentan terhadap penyakit, baik yang bersifat infeksius (jamur bakteri parasit) maupun non-infeksius (virus). (Kementerian Kelautan dan Perikanan)

Badan Kesehatan Hewan Dunia (OIE) telah mendata sebanyak 7 (tujuh) jenis penyakit virus pada udang yang dikategorikan sebagai penyakit berbahaya dan harus diwaspadai keberadaannya. Empat virus dari yang tujuh tersebut adalah *Taura Sindrom Virus* (TSV), *Infectious Hypodermal And Hematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV), *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) dan *White Spot Syndrome Virus* (WSSV). Empat penyakit tersebut dapat menyerang secara tunggal (*Single Infection*) dan tergolong ganas karena bisa mematikan udang berumur 60-80 hari dalam sekejap atau tingkat kematian berkisar antara 10 – 30 %, dan bahkan bisa mencapai 60 – 80 %. Dari beberapa jenis virus ini dapat menyerang bersamaan dengan jenis virus yang lain (*Multi Infection*) seperti TSV, dengan WSSV, dan/atau dengan IHHNV dengan tingkat kematian yang sangat signifikan. (Direktorat Kesehatan Ikan dan Lingkungan, 2010)

Ancaman penyakit-penyakit tersebut pada budidaya udang Vannamei belum dapat ditanggulangi secara optimal. Berbagai upaya penanggulangan telah dilakukan untuk mengatasi penyakit tersebut, salah satu strategi penanggulangan yang masih terus dikaji oleh para praktisi adalah melalui penerapan "*good management practices*" yang intinya berusaha meningkatkan status kesehatan udang dan meminimalisir sumber penyebab penyakit baik secara fisikal, kemikal, biologis, maupun ekologis. Namun hingga kini belum tersedia teknologi penanggulangan penyakit yang memiliki tingkat keberhasilan dan kesesuaian yang tinggi terhadap variasi kondisi pertambakan di Indonesia. Dengan demikian pencegahan terhadap kehadiran penyakit tersebut ke dalam unit budidaya udang harus diupayakan secara dini mulai dari pra produksi melalui penerapan konsep manajemen kesehatan udang dan lingkungannya yang terintegrasi, dan relatif mudah untuk diaplikasikan di lapangan. (Direktorat Kesehatan Ikan dan Lingkungan, 2010)

Metode diagnosis yang dapat dilakukan untuk mendeteksi adanya virus pada udang Vannamee adalah dengan menggunakan bantuan *Polymerase Chain Reaktion* (PCR). PCR merupakan salah satu metode untuk mengidentifikasi penyakit infeksius. Metode ini dikembangkan untuk mengatasi kelemahan metode diagnosis konvensional seperti imunologi dan mikrobiologi. Teknik PCR didasarkan pada amplifikasi fragmen DNA spesifik dimana terjadi pengandaan jumlah molekul DNA pada setiap siklusnya secara eksponensial dalam waktu yang relatif singkat. (Madaniyah, 2011)

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui gejala klinis pada sampel udang vannamei yang terserang virus dan mengetahui cara mendiagnosa penyakit yang disebabkan virus pada udang Vannamei dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 04 Februari sampai dengan 04 Mei 2014 di Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo, Jawa Timur

Materi

Materi uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah udang Vannamei (*Litopennaeus Vannamei*) sakit yang diperoleh dari pengirim dari berbagai tempat usaha budidaya perikanan ke BPBAP Situbondo.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam deteksi virus dengan metode PCR adalah sebagaimana yang tersaji pada Tabel 1. Sedangkan alat-alat yang digunakan dalam deteksi penyakit viral dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah sebagaimana yang tersaji pada Tabel 2.

Tabel 1. bahan-bahan RNA yang di gunakan dalam deteksi virus dengan metode PCR

NO	NAMA	Keterangan
1	RNA Ekstraktion Solution	Ekstraksi
2	Ethanol 75%:	Ekstraksi
3	Chloroform:	Ekstraksi
4	Isopropanol	Ekstraksi
5	IQzyme DNA Polymerase (2U/ µl)	Amplifikasi
6	RT Enzyme Mix	Amplifikasi
7	6X Loading	Elektroforosis
8	DNA Marker (100bp)	Elektroforosis
9	Agarose	Gel agarose
10	DEPC ddH2O	Ekstraksi
11	Tris Base	Larutan TAE
12	Glacial acetic acid	Larutan TAE
13	EDTA 3 Na	Larutan TAE
14	Alkohol 70	Seterilisasi
15	Akuades Steril	Larutan TAE

Tabel 2. alat-alat yang di gunakan dalam deteksi virus dengan metode PCR

NO	ALAT	KETERANGAN
1	Dissetting Set (gunting + pinset)	Mengambil dan menghancurkan sampel
2	Mikropipet	Mengambil cairan ekstraksi maupun amplifikasi
3	UV Gel Documentation	Pembacaan hasil pada sel agarose
4	Elektrophoresis Horizontal	Pemisahan produk PCR
5	Thermalcycler	Reaksi PCR
6	Heating Block	Memanaskan larutan
7	Neraca Analitik	Menimbang sampel dan bahan
8	Laminar Flow	seterilisasi alat dan tempat kerja pencampuran primer
9	Vortex	Mencampurkan larutan
10	Sentrifugasi	Memisahkan supernatan dan pellet
11	Penggerus	Menghancurkan sampel
12	Tip Mikropipet	mengambil cairan ekstraksi maupun amplifikasi
13	Mikrotube 200 µl	Tempat sampel
14	Mikrotube 1,5 ml	Tempat sampel

Metode Pengambilan Data

Metode yang di gunakan dalam penelitian ini adalah metode survey, pengumpulan data dilakukan dengan cara observasi, wawancara, partisipasi aktif, sedangkan data sekunder dikumpulkan melalui studi literatur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala Klinis Udang Vannamei Yang Terinfeksi Virus

Selama observasi di lapangan ada beberapa gejala klinis udang vannamei terinfeksi virus yang ditemukan baik dari sampel langsung maupun dari keluhan pengirim sampel yaitu terdapat bintik-bintik putih pucat kekuningan pada kulitkulitula dan kurang nafsu makan, hal ini menunjukkan udang terinfeksi IHNV. Untuk gejala klinis udang vannamei yang terinfeksi IMNV yaitu warna tubuh udang pucat pasi bahkan tampak seperti udang rebus.

Diagnosa Virus Pada Udang Dengan Menggunakan Metode PCR

Diagnosa virus pada udang Vannamei di Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo terdiri dari beberapa tahapan sebagai berikut:

1. Cara pengambilan sampel

Sampel untuk benur atau post larva berupa tubuh secara utuh, sedangkan untuk sampel udang dewasa diambil bagian kaki renang dan insang. Untuk pengambilan sampel yang berupa benur sebanyak $\pm 150 - 200$ ekor yang diperoleh dari beberapa titik unit pemeliharaan yang berbeda pada populasi yang berisi lebih dari 100 ribu ekor, sedangkan untuk udang dewasa diambil sebanyak 5 ekor per unit pemeliharaan, dan untuk induk udang diambil secara individual dengan tanpa mematikan.

Kaki renang dan insang dari udang dewasa diambil menggunakan gunting dan pinset yang sudah steril dan diletakkan pada tempat yang dilapisi dengan pelastik, kemudian dihancurkan menggunakan gunting. Sedangkan untuk sampel naupli atau post larva semua bagian tubuh dihaluskan dan di masukkan dalam mikrotube yang sudah diberi label atau kode dengan berat kurang lebih 15 - 25 mg. Untuk menghindari kontaminasi, hendaknya gunakan gunting dan pinset serta mikrotube yang berbeda untuk sampel yang berbeda asalnya dan menggunakan sarung tangan.

2. Tahapan ekstraksi RNA

- a. Sampel yang ada didalam mikrotube dihancurkan dan ditambahkan RNA Extraction Solution sebanyak 500 μ l kemudian dihomogenkan menggunakan penggerus dan diamkan pada suhu ruangan selama 5 menit.
- b. Setelah itu untuk mengikat protein yang terdapat dalam sampel tambahkan chloroform sebanyak 100 μ l dan di vortex selama 20 detik kemudian diamkan pada suhu ruangan selama 3 menit. Pemberian chloroform berfungsi untuk membantu menghilangkan penghambat PCR yang terdapat pada larutan ekstrak. Metode ini akan menghasilkan lapisan air yang mengandung asam nukleat.
- c. Setelah didiamkan selama 3 menit kemudian sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 15 menit. Sentifugasi bertujuan untuk memisahkan larutan berdasarkan berat jenisnya yaitu antara larutan yang mengandung chloroform (berat jenis lebih besar) dengan fase cair yang mengandung asam nukleat.
- d. Setelah didapatkan supernatan dan pellet, pindahkan supernatan sebanyak 200 μ l kedalam mikrotube baru ukuran 1,5 ml dan tambahkan 200 μ l isopropanol dan di vortex selama 20 detik kemudian sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit sedangkan pelletnya dibuang. Pemberian Isopropanol bertujuan untuk mengikat dan mengendapkan asam ribonukleat sehingga di dapatkan RNA virus.
- e. Setelah itu buang Isopropanol dan cuci pellet dengan Ethanol 75% sebanyak 500 μ l lalu sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 9000 rpm. Pemberian Ethanol 75% adalah untuk mendapatkan RNA murni.

- f. Proses ekstraksi yang terakhir adalah membuang Ethanol 75% dan keringkan pellet dengan cara diletakkan di tempat yang dialasi tissue dengan posisi terbalik dan diamkan pada suhu kamar selama 2-5 menit.
- g. kemudian tambahkan larutan DEPC ddH₂O yang merupakan pelarut bermuatan netral (tidak mengakibatkan reaksi pada asam). Penambahan DEPC ddH₂O disesuaikan dengan jenis sampel, karena sumber sampel yang berbeda memiliki konsentrasi DNA yang berbeda pula. Untuk sampel post larva ditambah 400 µl DEPC ddH₂O, sedangkan untuk sampel udang dewasa 200 µl DEPC ddH₂O.

3. Tahapan ekstraksi DNA

1. Sampel yang ada didalam mikrotube dihancurkan dan ditambahkan Lysis Buffer sebanyak 500 µl kemudian dihomogenkan dengan penggerus dan diamkan pada suhu ruangan selama 5 menit.
2. Setelah itu diinkubasi selama 10 menit pada suhu 95 0C, inkubasi dilakukan bertujuan untuk membakar lapisan penghambat DNA pada sampel.
3. Kemudian sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan supernatan dan pellet.
4. Setelah itu pindahkan supernatan sebanyak 200 µl kedalam mikrotube baru dan tambahkan 400 Ethanol kemudian homogenkan dengan cara di vortex selama 20 detik sedangkan pelletnya dibuang.
5. Kemudian sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 9000 rpm.
6. Kemudian buang Ethanol dan pellet dikering-udarkan (air-dried) dengan cara diletakkan di tempat yang dialasi tissue dengan posisi terbalik dan diamkan pada suhu kamar selama 2-5 menit.
7. Pellet yang sudah kering dilarutkan dengan DEPC ddH₂O sebanyak 200 µl kemudian fortex sampai pellet tidak menggumpal didasar mikrotube setelah itu simpan dalam frezeer suhu -20 0C atau langsung digunakan.

4. Proses amplifikasi

Proses selanjutnya setelah didapatkan DNA virus adalah Amplifikasi atau replikasi DNA dalam mesin *Thermalcycler*. Alat ini mampu mengatur temperatur secara bertingkat sehingga dapat mengadakan siklus berulang agar DNA virus dapat diperbanyak secara logaritmik. Untuk virus berjenis RNA amplifikasi dilakukan melalui dua tahap. Tahap pertama disebut RT-PCR (*Reverse Transcriptase*) dan tahap kedua disebut nested-PCR yang merupakan tahap lanjutan dari RT-PCR sehingga didapatkan cadangan DNA yang lebih banyak. Perbedaan dari dua tahap tersebut terletak pada reagen yang digunakan serta proses reaksi yang terjadi. Sedangkan untuk virus berjenis DNA amplifikasi dilakukan hanya dengan satu tahap yaitu RT-PCR. Berikut ini formulasi reaksi first PCR dan nested PCR, untuk sejumlah reaksi yang mana terdiri dari 1 kontrol positif, 1 kontrol negatif, dan sejumlah sampel. Komposisi pereaksi untuk first PCR (Tabel 3)

Tabel 3. Komposisi Mix pereaksi untuk uji First PCR (RT-PCR)

No	Pereaksi	Campuran Reaksi PCR 20,3 µl
1	Nuclease Free Water	12,55 µl
2	5X EZ Buffer	2 µl
3	MGC12	3,2 µl
4	DNTP Mix	0,4 µl
5	Primer F TSV IMNV	0,4 µl
6	Primer R TSV IMNV	0,4 ul
7	Taq DNA polymerase	0,1 µl
8	R, Nasin	0,05 µl
9	AMV reverse transcriptase	0,1 ul
10	Sampel RNA/DNA	1 ul

Setiap tahap dari amplifikasi terjadi siklus yang berulang pada temperatur yang berbeda-beda. Menurut intruksi kerja Laboratorium Kesehatan Ikan Dan Lingkungan Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo, disebutkan temperatur dan waktu dari tahap RT-PCR secara berurutan sebagai berikut. (Tabel 4, 5, 6)

Tabel 4. Pengaturan suhu dan siklus Thermalcycler Reaksi RT-PCR. Untuk uji TSV dan IMNV

NO	SUHU	LAMA	JUMLAH SIKLUS
1	60 (°C)	30 Menit	
2	95 (°C)	2 Menit	1 siklus
3	95 (°C)	45 Detik	
4	60 (°C)	45 Detik	39 Siklus
5	60 (°C)	7 Menit	1 Siklus
6	4 (OC)	-	-

Tabel 5. Pengaturan suhu dan siklus Thermalcycler Reaksi RT-PCR. Untuk uji WSSV

NO	SUHU	LAMA	JUMLAH SIKLUS
1	94 (°C)	3 Menit	1 siklus
2	94 (°C)	20 Menit	
3	64 (°C)	20 Detik	40 siklus
4	72 (°C)	30 Detik	
5	72 (°C)	3 Menit	1 siklus
6	4 (OC)	-	-

Tabel 6. Pengaturan suhu dan siklus Thermalcycler Reaksi RT-PCR. Untuk uji IHNV

NO	SUHU	LAMA	JUMLAH SIKLUS
1	94 (OC)	5 Menit	1 siklus
2	94 (OC)	30 Menit	
3	60 (OC)	30 Detik	35 siklus
4	72 (OC)	30 Detik	
5	72 (OC)	7 Menit	1 siklus
6	4 (OC)	-	-

Tahap yang kedua bagi virus IMNV adalah Nested-PCR yang merupakan lanjutan dari tahap pertama yaitu RT-PCR. Pada tahap ini juga terjadi replikasi DNA, proses Denaturasi, primer annealing, dan pemanjangan untai DNA yang terjadi secara berulang-ulang sehingga jumlah rantai DNA semakin banyak. Hasil sintesa DNA dalam satu siklus dapat berperan sebagai cetakan (template) pada siklus berikutnya, maka jumlah DNA target meningkat secara eksponensial, sehingga setelah n siklus akan terjadi 2^n amplifikasi DNA target. Berikut ini tabel komposisi mix pereaksi untuk Nested-PCR. (Tabel 7 dan 8)

Tabel 7. Komposisi Mix Pereaksi Untuk Nested -PCR

No	Pereaksi	Campuran Reaksi PCR 14 µl
1	Gotag	6,25 µl
2	Primer F Nested KIT IMNV	0,5 µl
3	Primer R Nested KIT IMNV	0,5 µl
4	Nucleus Free Water	4,25 µl
5	Template	1 µl

Setiap tahap dari amplifikasi Nested-PCR terjadi siklus yang berulang pada temperatur yang berbeda-beda pula. Menurut intruksi kerja Laboratorium Kesehatan Ikan Dan Lingkungan Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo, disebutkan temperatur dan waktu dari tahap Nested-PCR secar berurutan sebagai berikut.

Tabel 8. Pengaturan suhu dan siklus Thermalcycler Reaksi Nested-PCR. Untuk uji IMNV

NO	SUHU	LAMA	JUMLAH SIKLUS
1	95 (°C)	30 Menit	
2	95 (°C)	2 Menit	1 siklus
3	65 (°C)	45 Detik	
4	72 (°C)	45 Detik	39 Siklus
5	72 (°C)	7 Menit	1 Siklus
6	4 (OC)	-	-

Setelah proses amplifikasi berakhir, matikan mesin Thermalcycler dan keluarkan mikrotube. Selanjutnya DNA virus yang telah di amplifikasi dan jumlahnya berlipat ganda dapat dideteksi dengan Elektroforosis gel agarose.

5. Elektroforosis

Elektroforosis gel agarose merupakan metode standar untuk memisahkan, mengidentifikasi, mengkarakterisasi, dan purifikasi dari molekul DNA berdasarkan beratnya. Setelah proses amplifikasi, DNA virus yang akan di running pada elektroforosis gel agarose diberi *loading dye* yang berfungsi untuk pewarna DNA bagi virus TSV sedangkan virus yang lainnya tidak.

6. Proses elektroforosis

Proses elektroforosis terdiri atas tiga tahapan kerja yang saling berkaitan, yaitu pembuatan larutan 20 X TAE dan 1 liter 1 X TAE, pembuatan gel agarose dan pengamatan dengan *Gel Documentation*.

a. Pembuatan larutan 20 X TAE

- Larutan 1: timbang 15,77 gr EDTA 3 Na + 100 ml aquadest steril
- Larutan 2: timbang 96,8 gr triss + 28 gr Acetic Acid (+ 30 ml) + 900 ml Aquadest steril
- Campurkan kedua larutan dan starakan pada pH 8
- Untuk membuat larutan TAE 1 X (siap pakai) larutkan 1 bagian larutan stok dengan 19 bagian akuadest steril. Untuk membuat larutan 1 liter 1 X TAE adalah: ambil 50 ml larutan 20 x TAE kemudian encerkan dengan akuades steril sebanyak 950 ml.

b. Pembuatan gel agaros

- Timbang 3,6 gr bubuk agarose dan masukkan dalam Erlenmeyer ukuran 250 ml.
- Larutkan dengan 185 ml 1 X TAE buffer, lalu panaskan di dalam Heatwave selama 2 menit sampai mendidih kemudian angkat dari Heatwave dan aduk, lalu panaskan kembali di dalam heatwave selama 2 menit sampai mendidih atau larutan menjadi bening.
- Angkat dari heatwave lalu dinginkan dalam temperatur ruang sampai suhu mencapai 50 OC
- Beri larutan 1st BASE sebanyak 15 µl kemudian diaduk sampai merata.
- Setelah itu cetak agarose di atas cetakan gel yang sudah di pasang sisir (comb) selama 30 – 60 menit.
- Gel siap digunakan.

7. Peroses elektroforosis

- Gel agarose yang sudah siap digunakan diambil dari gel box dan diletakkan diatas tangki elektroforosis yang sudah berisi larutan 1X TAE sebanyak 500 ml (sampai gel terndam).
- Untuk virus TSV larutan yang sudah di amplifikasi ditambahkan 3 µl 6X *Loading Dye* sebagai pewarna pada masing-masing mikrotube, campur dan homogenkan sedangkan untuk virus WSSV, IHNV, dan IMNV tidak usah ditambahkan 6X *Loading Dye*.
- Kemudian masukkan 3 µl marker atau penanda DNA (100 bp) pada sumuran gel yang pertama dengan menggunakan mikropipet.
- Selanjutnya masukkan produk PCR dengan mikropipet kedalam sumuran gel berikutnya secara berurutan yaitu kontrol positif, kontrol negatif dan sampel sebanyak 5,8 µl.
- Setelah selesai dimasukkan semua dalam sumuran, pasang penutup elektroforosis dan hidupkan listrik dengan voltase diatur 100 – 150 V, dan proses *running* dilakukan selama 20

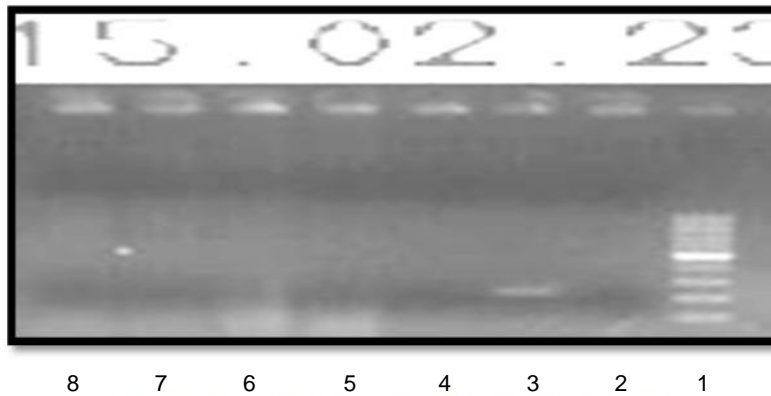
– 30 menit atau sampai warna biru *loading dye* bagi virus TSV mencapai 2/3 gel agarose dan warna biru bagi virus WSSV, IHHNV, dan IMNV mencapai 2/3 gel agarose

8. Pengamatan hasil dan dokumentasi

- Setelah proses elektroforosis selesai, gel agarose diangkat dari elektroforosis dengan menggunakan sarung tangan.
- Kemudian gel agarose dimasukkan ke dalam *UV Transilluminator*, dan hasil elektroforosis diamati di layar monitor dan didokumentasikan dengan kamera palaroid.

9. Pembacaan hasil

- Hasil positif TSV apabila terlihat garis perpendaran pita DNA (band) dengan ukuran 231 bp
- Hasil positif WSSV apabila terlihat garis perpendaran pita DNA (band) dengan ukuran 942 bp
- Hasil positif IHHNV apabila terlihat garis perpendaran pita DNA (band) dengan ukuran 389 bp
- Hasil positif IMNV apabila terlihat garis perpendaran pita DNA (band) dengan ukuran 139 bp (nested)
- Hasil negatif TSV, WSSV, IHHNV dan IMNV apabila tidak terlihat garis perpendaran pita DNA (band).

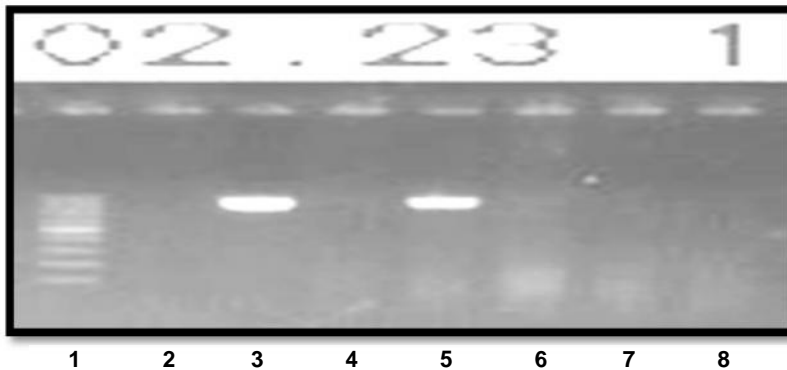


Gambar 1. Hasil uji FCR virus TSV BPBAP Situbondo

Keterangan:

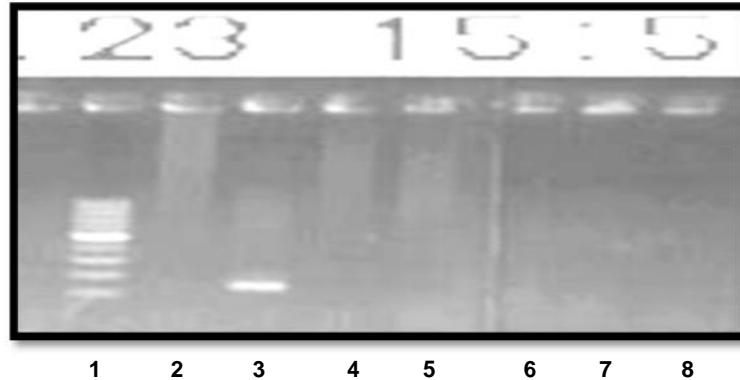
- Lane-1 : Marker
- Lane-2 : Kontrol Negatif
- Lane-3 : Kontrol Positif
- Lane-4 : Sampel tidak terdeteksi TSV
- Lane-5 : Sampel tidak terdeteksi TSV
- Lane-6 : Sampel tidak terdeteksi TSV
- Lane-7 : Sampel tidak terdeteksi TSV
- Lane-8 : Sampel tidak terdeteksi TSV

Lane 1 pada gambar 1 terlihat garis perpendaran pita DNA (band) dengan berbeda-beda tingkatan ukuran. Lane 2 merupakan sampel negatif virus TSV. Lane 3 merupakan kontrol positif virus TSV dengan garis perpendaran pita DNA berukuran 231 bp. Pada lane 4,5,6,7,8 tidak terlihat garis perpendaran pita DNA yang berarti bahwa sampel tersebut tidak terinfeksi virus TSV



Gambar 2. Hasil uji FCR virus WSSV BPBAP Situbondo

Lane 1 pada gambar 2 terlihat garis perpendaran pita DNA (band) dengan berbeda-beda tingkatan ukuran. Lane 2 merupakan control negatif virus WSSV. Lane 3 merupakan kontrol positif virus IHNV dengan garis perpendaran pita DNA berukuran 942 bp. Pada lane 5 terlihat juga garis perpendaran pita DNA yang sama dengan lane 3 yang berarti bahwa sampel tersebut positif terinfeksi virus WSSV. Sedangkan pada lane 4,6,7,8 tidak terlihat garis perpendaran yang menunjukkan bahwa sampel tidak terinfeksi virus IHNV.

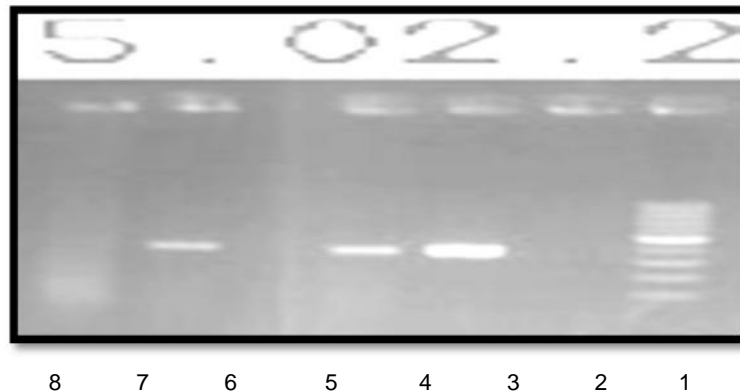


Gambar 3. Hasil uji FCR virus IMNV BPBAP Situbondo

Keterangan:

- Lane-1 : Marker
- Lane-2 : Kontrol Negatif
- Lane-3 : Kontrol Positif
- Lane-4 : Sampel tidak terdeteksi IMNV
- Lane-5 : Sampel tidak terdeteksi IMNV
- Lane-6 : Sampel tidak terdeteksi IMNV
- Lane-7 : Sampel tidak terdeteksi IMNV
- Lane-8 : Sampel tidak terdeteksi IMNV

Lane 1 pada gambar 3 terlihat garis perpendaran pita DNA (band) dengan berbeda-beda tingkatan ukuran. Lane 2 merupakan sampel negatif virus IMNV. Lane 3 merupakan kontrol positif virus IMNV dengan garis perpendaran pita DNA berukuran 139 bp. Pada lane 4,5,6,7,8 tidak terlihat garis perpendaran pita DNA yang berarti bahwa sampel tersebut tidak terinfeksi virus IMNV



Gambar 4. Hasil uji FCR virus IHNV BPBAP Situbondo

Keterangan

- Lane-1 : Marker
- Lane-2 : Kontrol Negatif
- Lane-3 : Kontrol Positif IHNV
- Lane-4 : Sampel positif terdeteksi Virus IHNV
- Lane-5 : Sampel positif terdeteksi Virus IHNV
- Lane-6 : Sampel tidak terdeteksi Virus IHNV

Lane 1 pada gambar 4 terlihat garis perpendaran pita DNA (band) dengan berbeda-beda tingkatan ukuran. Lane 3 merupakan kontrol positif virus IHNV dengan garis perpendaran pita DNA berukuran 389 bp. Pada lane 4 dan 5 terlihat juga garis perpendaran pita DNA yang sama dengan lane 3 yang

berarti bahwa sampel tersebut positif terinfeksi virus IHNV. Sedangkan pada lane 6 tidak terlihat garis perpendaran yang menunjukkan bahwa sampel tidak terinfeksi virus IHNV.

10. Dokumentasi

Diinstruksi kerja laboratorium pengujian Kesehatan Ikan Dan Lingkungan Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo foto hasil pengamatan disimpan dalam bentuk berkas dan atau file dalam komputer dengan status legalitas yang sama. Adapun formulir terkait yang digunakan dalam instruksi kerja ini adalah *worksheet* dan LHUS.

Hasil Uji Virus Pada Udang Vannamee Dengan Metode PCR

Hasil uji virus pada udang vannamee (*Litopenaeus Vannamei*) dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang didapatkan selama Peraktek Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo tersaji dalam tabel 9, 10 dan 11 berikut

Tabel 9 Hasil uji virus pada udang vannamee bulan Februari 2014 di Laboratorium Kesehatan Ikan Dan Lingkungan BPBAP Situbondo

NO	TANGGAL	JENIS SAMPEL	JML	TSV	WSSV	IHNV	IMNV
1	4	Kaki Renang Udang Windu	1	-	-		-
		PL .Vannamei	2	-	-	-	-
2	7	Nauplius Vannamei	1	-	-		-
		PL .Vannamei	2	-	-		-
3	9	PL .Vannamei	1	-	-		-
4	10	PL .Vannamei	1	-	-		-
5	11	tokolan. Vannamei	2	-	-		-
		Nauplius vannamei	1	-	-		-
6	13	PL .Vannamei	1	-	-		-
		Nauplius vannamei	1	-	-	-	-
7	14	PL .Vannamei	2	-	-		-
		Nauplius vannamei	1	-	-	-	-
8	15	PL .Vannamei	1	-	-		-
9	16	PL. Vannamei	1	-	-		-
10	17	PL. Vannamei	2	-	-		-
11	18	Kaki renang induk windu	1	-	-		-
12	19	PL. Vannamei	3	-	-		-
		Kaki renang Vannamei	2		-	+	
13	23	Kaki renang Vannamei	1		+	+	
		Nauplius Vannamei	1	-	-	-	-
		PL. Vannamei	2	-	-	-	-
14	25	Tokolan Vannamei	1	-	-		-
		PL. Vannamei	2	-	-		-
		Tokolan . Vannamei	5	-	-	-	-
15	26	PL. Vannamei	2	-	-		-
		PL. Vannamei	2	-	-		-
16	27	PL. Vannamei	2	-	-	-	-
17	28	PL. Vannamei	1	-	-		-

Keterangan

(+) : Sampel terdeteksi Virus; (-) : Sampel tidak terdeteksi Virus

Tabel 10. Hasil uji virus pada udang Vannamei bulan Maret 2014 di Laboratorium Kesehatan Ikan Dan Lingkungan BPBAP Situbondo

NO	TGL	JENIS SAMPEL	JML	TSV	WSSV	IHHNV	IMNV
1	1	Tokolan Vannamei	1	-	-		
		PL. Vannamei	1	-	-		-
2	3	Pl. Windu	1		-		
		Tokolan vannamei	2	-	-	-	-
		Tokolan Windu	1				-
3	5	Tokolan Vannamei	1	-	-	-	-
		PL. Vannamei	1	-	-	-	-
		PL. Vannamei	2	-	-		-
4	6	Tokolan Vannamei	5	-	-		+
		PL. Vannamei	2	-	-	-	-
5	7	PL. Vannamei	1	-	-	-	+
6	9	PL. Vannamei	1	-	-		-
		Tokolan Vannamei	1		-		
7	10	PL. Vannamei	1	-	-	-	-
8	11	Tokolan Vannamei	1	-	-	-	-
		PL. Vannamei	2	-	-	-	-
9	12	Tokolan Vannamei	3	-	+		+
		Nauplius Vannamei	4	-	-		-
10	13	Tokolan Vannamei	1		+		
		PL. Vannamei	2				+
		PL. Vannamei	1				-
11	17	Tokolan Vannamei	5	-	-		-
		Nauplius Vannamei	1	-	-		-
12	19	PL. Vannamei	1	-	-	-	-
		Tokolan Vannamei	3		-	-	
13	20	PL. Vannamei	1	-	-		-
		Nauplius Vannamei	1	-	-		-
14	21	Nauplius Vannamei	1	-	-		-
		Nauplius Vannamei	1	-	-		-
		Nauplius Vannamei	1	-	-		-
15	23	PL. Vannamei	3	-	-		-
		PL. Vannamei	2	-	-	-	-
		PL. Vannamei	2	-	-		-
16	25	Tokolan Vannamei	1		-		
		Tokolan Vannamei	4	-	-		-
17	26	PL. Vannamei	1	-	-		-
		Nauplius Vannamei	1	-	-		-
		PL. Vannamei	3	-	-		-
18	27	Tokolan Vannamei	1	-	-	-	-
		Kaki Renang Induk Vannamei Betina	1	-	-	-	-
19	28	Kaki Renang Induk Vannamei Jantan	1	-	-	-	-
		PL. Vannamei	1	-	-		-
20	30	Tokolan Vannamei	4	-	-		-
		Nauplius Vannamei	1	-	-		-
21	31	Kaki Renang Induk Vannamei Betina	1	-	-	-	-
		Kaki Renang Induk Vannamei Jantan	1	-	-	-	-

Keterangan

(+) : Sampel terdeteksi Virus

(-) : Sampel tidak terdeteksi Virus

Tabel 11. Hasil uji virus pada udang vannamei bulan April 2014 di Laboratorium Kesehatan Ikan Dan Lingkungan BPBAP Situbondo.

NO	TANGGAL	JENIS SAMPEL	JML	TSV	WSSV	IHHNV	IMNV
1	1	PL. Vannamei	1	-	-		-
2	2	Tokolan Vannamei	1	-	-		-
3	4	PL. Vannamei	1	-	-		-
4	7	PL. Vannamei	2	-	-		-
		Nauplius Vannamei	1	-			
		PL. Vannamei	1				-
5	8	PL. Vannamei	1	-	-	-	-
6	9	Tokolan Vannamei	2	-	-		-
7	10	Naupli Vannamei	5	-	-	-	-
		Tokolan Vannamei	2	-	-		-
8	11	PL. Vannamei	1	-	-		-
9	13	Calon Induk Vannamei	1	-	-	-	-
10	14	PL. Windu	1		-		
		PL. Vannamei	1	-	-		-
11	15	Tokolan Vannamei	1	-	-		-
		PL. Vannamei	2	-	-	-	-
		Calon Induk vannamei	3	-	-	-	-
		Tokolan Vannamei	4	-	-	-	-
		PL. Vannamei	1	-	-	-	-
12	16	PL. Vannamei	2	-	-	-	-
		Nauplius Vannamei	1	-	-		
		Tokolan Vannamei	5	-	-		-
13	17	Kaki Renang Udang Vannamei	1	-	-		-
14	18	PL. Vannamei	1	-	-		-
15	20	PL. Vannamei	3	-	-	-	-
		PL. Vannamei	1	-	-		-
16	21	Nauplius Vannamei	1	-	-		
17	23	PL. Vannamei	3	-	-	-	-
18	24	Tokolan Vannamei	1	-	-		-
		Nauplius Vannamei	2	-	-		-
19	25	PL. Vannamei	1	-	-	-	-
20	27	Tokolan Vannamei	3		-		-

Keterangan

(+) : Sampel terdeteksi Virus

(-) : Sampel tidak terdeteksi Virus

Hasil uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dari 180 sampel. Sampel tersebut terdiri dari 75 sampel larva, 25 sampel naupli, 60 sampel tokolan dan 20 sampel kaki renang yang di uji, diperoleh 1 sampel terinfeksi WSSV pada tanggal 23 Februari dengan jenis sampel kaki renang udang Vannamei, 4 sampel terinfeksi WSSV pada tanggal 12 dan 17 bulan Maret dengan jenis sampel tokolan udang Vannamei, 3 sampel terinfeksi IHHNV pada tanggal 23 Februari dengan jenis sampel kaki renang udang Vannamei, 11 sampel terinfeksi IMNV pada tanggal 6,7,12,17 Maret dengan jenis sampel tokolan dan larva vannamei.

KESIMPULAN

Gejala klinis pada udang Vannamei yang terinfeksi virus sebagian besar akan mengalami perubahan tingkah laku dan morfologinya serta mengalami penurunan nafsu makan. Proses diagnosa virus dengan metode PCR terdiri dari pengambilan sampel, Ekstraksi, Amplifikasi, Elektroforosis, dan dokumentasi. Metode untuk deteksi virus viral dengan cepat adalah melalui PCR (polymerase chain reaction), yaitu proses perbanyak DNA secara *in vitro*. Terdiri dari tiga urutan dasar amplifikasi, yaitu pelepasan untai ganda menjadi tunggal (Denaturasi) DNA, Penempelan primer (*Primer Annealing*) sintesis DNA, dan dilanjutkan dengan pemanjangan primer (*Primer Extension*). Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan diagnosa yang mempunyai spesifitas dan sensitivitas tinggi dibandingkan metode diagnosa yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiwijaya, D. 2003. *Budidaya Udang Vanammei (L. vaname) Sistim Tertutup Yang Ramah Lingkungan*. Departemen Kelautan dan Perikanan, Dirjen. Perikanan Budidaya, Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau Jepara.
- Anonymous. 2007. *Budidaya Vannamei*. SHS Aquatic Marketing Service. PT Surya Hidup Satwa.
- Direktorat Kesehatan Ikan Dan Lingkungan. 2014. *Buku Saku Penyakit Ikan*.
- Direktorat Kesehatan Ikan Dan Lingkungan. 2010. *Petunjuk Teknis Pengendalian Penyakit IMNV Infectious Myonecrosis Virus*
- Direktorat Kesehatan Ikan Dan Lingkungan. 2010. *Petunjuk Teknis Pengendalian Penyakit IHHNV Infektious Hypodermal And Hematopoicetic Necrosis Virus*
- Dhauri. R. 2011. *Budidaya perikanan berkelanjutan berbasis lingkungan*. Trobos Aqua. Jakarta.
- Irmaria. R.N. 2007. Deteksi Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) pada *Litopennaeus Vannamei* dengan menggunakan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) IQ 2000TM di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. Surabaya: ITS
- Kementrian Kelautan Dan Perikanan, Laboratorium Kesehatan Ikan Dan Lingkungan Pedoman Umum – Monitoring
- Rifai. S. 2009. *Deteksi Infektious Hypodermal And Hematopoicetic Necrosis Virus (IHHNV) Pada Udang Vannamei (Litopennaeus Vannamei) Dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) di Balai Budidaya Air Payau Situbondo*. Semarang: UNDIP
- Sulistiyowat. N. 2006. *Deteksi VIRAL TAURA SYNDROME (TSV) Pada Udang Vanname (Litopennaeus Vannamei) Dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR) IQ 2000TM di Laboratorium Hama Dan Lingkungan Balai Budidaya Air Payau Situbondo*. Surabaya: ITS
- Subaidah et. Al, 2008. *Teknik pemeliharaan larva udang vaname (litopennaeus vannamei). Pembenihan udang vaname*. Direktorat Jendral Perikanan Budidaya BBAP Situbondo.
- Utomo. A.S. 2014. *Deteksi VNN Pada Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes Altivelis) Dengan Metode PCR Di BBAP Situbondo*. Semarang: UNDIP
- Sulastri, "Teknik Pembenihan Udang Vannamei (*L. vannamei*) di Balai Budidaya Air Payau Situbondo, Bogor: IPB
- Subaidah dan mulyadi. 2004 "pembenihan udang Vannamei" di Balai Budidaya Air Payau Situbondo, Surabaya: ITS