

PEMERIKSAAN WSSV (WHITE SPOT SYNDROME VIRUS) DENGAN UJI PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) PADA UDANG VANNAMEI (*Litopenaeus vannamei*) DI UPT LABORATORIUM KESEHATAN IKAN DAN LINGKUNGAN, PASURUAN JAWA TIMUR

WSSV (WHITE SPOT SYNDROME VIRUS) EXAMINATION USING THE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) TEST ON VANNAMEI SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) AT UPT FISH AND ENVIRONMENTAL HEALTH LABORATORY, PASURUAN, EAST JAVA

Amalia Khofifah¹, Indah Wahyuni Abida¹, Asmaul Khusnah²

¹Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan, Jurusan Kelautan dan Perikanan Fakultas Pertanian, Universitas Trunojoyo Madura

²Analisis Kesehatan Ikan dan Lingkungan (Biologi Molekuler) UPT Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Pasuruan, Jawa Timur

*Corresponding author email: indahwahyuniabida@trunojoyo.ac.id

Submitted: 16 August 2022 / Revised: 31 May 2023 / Accepted: 31 May 2023

<http://doi.org/10.21107/juvenil.v4i2.16462>

ABSTRAK

Udang vannamei mempunyai banyak keunggulan daripada udang jenis lainnya, akan tetapi resisten terhadap serangan penyakit yang disebabkan oleh virus. Virus WSSV merupakan virus yang menyerang sistem organ dari crustacea yang menyebabkan bercak putih di permukaan eksternal udang sehingga menimbulkan kerugian berupa kematian tinggi mencapai 100% dari udang pemeliharaan waktu 3-10 hari sejak gejala klinis muncul. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil pemeriksaan WSSV dengan uji PCR pada udang vannamei. Penelitian ini dilaksanakan di UPT (Unit Pelaksana Teknis) Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Pasuruan Jawa Timur pada 17 Januari sampai 17 Februari 2022. Metode pemeriksaan WSSV (White Spot Syndrome Virus) pada udang vannamei dilakukan dengan uji PCR (Polymerase Chain Reaction). Prosedur diawali persiapan sampel yang didapatkan dari customer yang ingin mengujikan udangnya, ekstraksi sampel, persiapan reagen, amplifikasi pada mesin PCR, persiapan elektroforesis, proses elektroforesis, analisis hasil pada UV Transilluminator, dokumentasi hasil dan pembacaan hasil. Pemeriksaan sampel 59 dan 61 menunjukkan hasil WSSV negatif dengan adanya 1 garis perpendaran pita DNA (band) ukuran 848 bp, sampel tersebut tidak terinfeksi virus WSSV. Pembacaan hasil uji PCR (+) WSSV berat (severe) terlihat 3 garis perpendaran pita DNA (band) ukuran 910 bp, 550 bp, 296 bp, yang terjadi pada sampel 57 dan sampel duplo 57. Sampel 72 menunjukkan hasil (+) WSSV ringan (light) yang terlihat 1 garis perpendaran pita DNA (band) dengan ukuran 296 bp.

Kata Kunci: Udang vannamei, WSSV (White Spot Syndrome Virus), PCR (Polymerase Chain Reaction)

ABSTRACT

Vannamei shrimp have many advantages over other types of shrimp, but they are resistant to disease attacks caused by viruses. The WSSV virus is a virus that attacks the organ systems of crustaceans which causes white spots on the external surface of the shrimp, causing losses in the form of high mortality reaching 100% of reared shrimp within 3-10 days since clinical symptoms appear. This study aims to determine the results of WSSV examination with the PCR test on vannamei shrimp. This research was conducted at the UPT (Technical Implementation Unit) Fish and Environmental Health Laboratory, Pasuruan, East Java from 17 January to 17 February 2022. WSSV (White Spot Syndrome Virus) examination method on vannamei shrimp was carried out by PCR (Polymerase Chain Reaction) test. The procedure begins with sample preparation obtained from the

customer who wants to test the shrimp, sample extraction, reagent preparation, amplification on the PCR machine, electrophoresis preparation, electrophoresis process, analysis of the results on the UV Transilluminator, results documentation and results reading. Examination of samples 59 and 61 showed negative WSSV results in the presence of 1 luminescent DNA band (band) measuring 848 bp, these samples were not infected with the WSSV virus. The reading of the results of the PCR (+) WSSV heavy (severe) test showed 3 lines of fluorescence of DNA bands (bands) of size 910 bp, 550 bp, 296 bp, which occurred in sample 57 and sample 57 duplo. Sample 72 showed mild (+) WSSV results (light) which shows 1 glowing line of DNA band (band) with a size of 296 bp.

Keywords: Vannamei Shrimp, WSSV (White Spot Syndrome Virus), PCR (Polymerase Chain Reaction)

PENDAHULUAN

Udang vannamei merupakan produk primadona di sektor perikanan karena memiliki nilai ekonomis dan prospek ekspor yang menjanjikan (Putri *et al.*, 2020). Permintaan pasar yang tinggi baik dalam maupun luar negeri menjadikan Indonesia sebagai negara pengirim udang. Badan Pusat Statistik (BPS) mencatat pertumbuhan Produk Domestik Bruto (PDB) Nasional sektor perikanan tahun 2017 sebesar 6,75 % atau naik sebesar 31 % dari tahun 2016. Angka PDB tersebut tercatat paling progresif dan berada di atas rata-rata pertumbuhan PDB Nasional yang hanya 5,03 % (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, 2018). Kontribusi udang vannamei mencapai 45,6% dari keseluruhan nilai perdagangan ekspor komoditas perikanan dan paling digemari di pasar internasional (Fauzi *et al.*, 2023). Fuady *et al.* (2013) melaporkan keunggulan udang vannamei yaitu pertumbuhan cepat dan ukuran panen yang seragam serta dapat dibudidayakan padat tebar tinggi

Udang vannamei menurut Rahmi *et al.* (2016) mempunyai peranan sebagai pakan bagi hewan akuatik yang lebih besar, seperti ikan di dalam sebuah rantai makanan. Pertumbuhan yang lambat dan turunnya daya tahan udang disebabkan oleh faktor biologi, kimia, dan fisika. Faktor biologi menurut Mahyudin *et al.* (2015) misalnya kelimpahan virus dan bakteri yang dapat mempengaruhi pertumbuhan udang vannamei. Faktor kimia yang mempengaruhi pertumbuhan udang di antaranya oksigen terlarut (DO), derajat keasaman (pH) dan amonium (NH_4^+). Adapun faktor fisika mempengaruhi pertumbuhan udang diantaranya suhu dan salinitas. Udang vannamei mempunyai banyak keunggulan daripada udang jenis lainnya, akan tetapi resisten terhadap serangan penyakit yang disebabkan oleh virus (Yasin, 2021).

Pratama *et al.* (2017) menyatakan keberadaan penyakit disebabkan kurang optimalnya pengelolaan pakan, pengelolaan

induk, dan minimnya implementasi sistem pengelolaan air yang menjadikan sistem reproduksi udang vannamei tidak terukur. Yasin (2021) melaporkan penurunan volume ekspor terjadi akibat penurunan produksi yang sangat drastis karena adanya serangan penyakit WSSV (*White Spot Syndrom Virus*) pada udang vannamei. Permasalahan ini sangat mempengaruhi jumlah kelimpahan udang vannamei di perairan dan merupakan patogen paling serius menyerang udang serta menghancurkan industri udang di berbagai negara (Rahma *et al.*, 2014). Virus WSSV merupakan virus yang menyerang sistem organ *crustacea* yang menyebabkan spot putih atau bercak putih di permukaan eksternal udang sehingga menimbulkan kerugian berupa kematian tinggi mencapai 100% dari udang pemeliharaan waktu 3-10 hari sejak gejala klinis muncul (Supriatna *et al.*, 2014).

Amrillah *et al.* (2015) menyatakan secara kronologis peneliti di Indonesia menunjukkan hampir semua penyakit WSSV meledak pada musim penghujan, musim pancaroba dan musim dingin. Udang vannamei setiap fase hidupnya rentan diserang virus apabila tidak diimbangi dengan manajemen kualitas air yang baik. Penyakit udang terinfeksi virus dapat diantisipasi tindakan pencegahan meliputi benih yang unggul, manajemen budidaya yang baik, selain itu pemantauan keberadaan patogen di lingkungan tambak selama budidaya yang dapat dilakukan dengan peringatan dini, serta pemanfaatan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang bekerja secara sensitif dan spesifik. Virus yang menginfeksi udang vannamei dalam jumlah sedikit dan belum menimbulkan gejala penyakit pada udang dapat dideteksi dengan menggunakan uji PCR.

Latritiani *et al.* (2017) menyatakan bahwa uji PCR mempunyai fungsi untuk memastikan keamanan udang vannamei sebelum dikonsumsi dan meminimalisir adanya virus pada udang dalam kegiatan ekspor dan impor.

Deteksi virus WSSV pada udang vannamei dengan metode PCR yang hasilnya negatif umumnya masih perlu di kontrol tambak udang vannamei seperti manajemen kualitas air, pemberian pakan dan lain sebagainya dengan tujuan menghindari infeksi virus WSSV (Rante et al., 2012). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil pemeriksaan WSSV dengan uji PCR pada udang vannamei di UPT (Unit Pelaksana Teknis) Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Pasuruan Jawa Timur.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini telah dilaksanakan pada 17 Januari hingga 17 Februari 2022. Sampel udang vannamei berasal dari tambak *customer* yang ingin dideteksi virus WSSV dengan uji PCR. Penelitian dilakukan di UPT Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Pasuruan Jawa Timur.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *mini centrifuge*, *vortex (maxi mini)*, *DNA atau RNA extraction kit (spin column and collection tube)*, *DNA atau RNA extraction kit (grinder)*, *vortex (thermoscientific)*, *thermocycler*, *enclosures*, *minispin*, 1 unit *elektrophoresis horizontal*, sisir (*comb*), *uv transilluminator*, kamera digital, *analitic balance*, *hot plate*, *waterbath*, *autoclave*, *uv*, *frezeer 100 l*, *tube (1.5 ml, 0.5 ml, 0.2 ml)*, *rack tube*, tip mikropipet, mikropipet, *disecting set* (gunting dan pinset), *glass ware* (erlenmeyer, gelas ukur dan corong kaca), *magnetic stirrer*, *timer*, *aluminium foil*, dan spatula laboratorium. Adapun bahan yang digunakan diantaranya, *DNA atau RNA extraction kit (solution 1, solution 2, solution 3)*, *first PCR premix* (termasuk didalamnya *buffer*, *dNTPS*, *primer WSSV*) berjumlah 7.5 µl, *IQZyme DNA polymerase 2 U / µL*, *template DNA* (hasil proses ekstraksi sampel), *nested PCR premix* (termasuk didalamnya *buffer*, *dNTPS*, *primer WSSV*) berjumlah 0.5 µl, *P (+) standart* berjumlah 2 µl, larutan TAE 10X (*tris acetate*), *aquadest steril*, *agarose 0,8 mg*, *syber gel stain*, *template DNA* (hasil proses amplifikasi sebanyak 5 µl), *6X loading dye*, *DNA marker* (848 bp, 630 bp, 33 bp) dan *DNA 100 bp ladder*, alkohol 70%, dan sampel udang vannamei.

Metode analisis

Analisis biologi molekuler yang dilakukan yaitu pemeriksaan WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) pada udang vannamei (*Litopenaeus*

vannamei) dari tambak *customer*. Pemeriksaan WSSV pada sampel menggunakan metode uji PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Konvensional menurut UPT Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Pasuruan Jawa Timur. Prosedur analisis uji PCR Konvensional terdiri atas beberapa tahap diantaranya adalah:

Sterilisasi Ruangan

Sterilisasi ruang dilakukan 1 bulan 2 kali dengan membersihkan ruangan terlebih dahulu kemudian menutup ruangan dan menyalakan lampu UV selama 30 menit.

Sterilisasi Alat di Autoclave

Tahap pertama menghubungkan kabel listrik ke stop kontak pada tegangan 220 volt, dan memastikan bahwa semua tombol pada posisi off. Tahap kedua memasukkan *aquadest* dalam ruang sterilisasi sampai menutup sistem pemanas. Tahap ketiga memasukkan keranjang berisi bahan atau alat yang akan disterilkan kedalam *autoclave*, lalu menutup *autoclave* sampai terkunci rapat serta mengecek bagian *exhaust* dalam posisi tutup, untuk mencegah uap air keluar. Tahap keempat menghubungkan kabel listrik ke stop kontak dan memilih tombol *power on* pada samping kiri *autoclave* untuk menjalankan arus listrik yang menghubungkan ke *autoclave*. Tahap kelima memilih tombol *power on* pada tutup *autoclave* untuk menghidupkan dan memilih *mode liq* di tombol *mode* pada *autoclave* bahan yang akan disterilisasikan. Tahap keenam menekan tombol *set* atau *ent* pada *autoclave* untuk mengatur suhu 121°C dengan tekanan 1 atm, lalu menekan tombol *next* pada *autoclave* untuk mengatur waktu yang dibutuhkan sterilisasi yakni 15 menit. Pengoperasian *autoclave* harus memastikan semuanya sudah diatur dan sudah tertutup rapat, selanjutnya memilih tombol *start* untuk menjalankan proses sterilisasi. Proses sterilisasi selesai ditandai dengan bunyi alarm pada *autoclave* tersebut. Tahap terakhir yaitu buka *exhaust* serta tunggu 5 hingga 10 menit agar uap airnya keluar, lalu tutup *autoclave* bisa dibuka.

Persiapan Sampel

Tahap awal apabila sampel sudah siap, peralatan (*disecting set*, *tube 1.5 mL*, *aluminium foil*) dan bahan (sampel udang vannamei) untuk preparasi sampel serta alat dan bahan untuk ekstraksi sampel harus dalam satu meja ekstraksi. Tahap kedua untuk menghindari kontaminasi, hendaknya

menggunakan *disecting set* yang berbeda disetiap sampelnya saat mengambil organ target uji. Tahap terakhir yakni memberi kode sampel pada *tube*, tujuannya agar mengetahui sampel nomor berapa yang diekstraksi. *Aluminium foil* digunakan sebagai alas ketika mengambil organ target uji.

Tahapan Ekstraksi Sampel

Tahap pertama memasukkan sampel seperti *uropod*, *pleopod*, *periopod* atau insang sebanyak 2-5 *pieces* (20 mg) atau 30 < *post larva* 12 sebanyak 25-50 ekor ke dalam *tube* 1,5 mL dengan *disecting set*. Tahap ke dua mengambil 500 μ L *Solution 1* dan menaruh ke dalam *tube* menggunakan tip mikropipet beserta mikropipet nya. Tahap ketiga menghancurkan sampel dengan menggerus memakai *grinder* sampai homogen, penghancuran sampel pada proses ekstraksi bertujuan didapatkannya DNA atau RNA pada target uji. Tahap keempat menambahkan 500 μ L *Solution 2*, kemudian vortex 10 detik dan *centrifuge* 1 menit di *mini centrifuge*, serta memindahkan *supernatant* 500 μ L ke tabung fiter (*tube fiter*) baru. Tahap kelima, memvortex 10 detik dan *centrifuge* 1 menit lalu, membuang larutan yang ada di *collection tube*, setelah itu menambahkan 500 μ L *Solution 2* menggunakan tip mikropipet beserta mikropipet nya. Tahap keenam, memasukkan kembali *tube filter (collection tube)* ke dalam *tube*, memvortex 10 detik dan mensentrifuge selama 3 menit. Tahap ketujuh memindahkan *tube filter (collection tube)* ke dalam *tube* baru dan menambahkan *Solution 3* sebanyak 200 μ L, berikutnya memvortex 10 detik dan sentrifugasi mini 1 menit. DNA siap digunakan pada tahap uji PCR selanjutnya yakni amplifikasi mesin PCR, apabila tidak langsung digunakan DNA dapat disimpan terlebih dahulu pada suhu 20°C di dalam *freezer* 100 L. Ekstraksi sampel nomor 057, 059, 061 organ target uji yang diambil ialah insang (*gill*), sedangkan sampel nomor 072 organ target uji yang diambil ekor (*uropod*).

Persiapan Reagen Dan Amplifikasi Pada Mesin PCR

Tahap pertama menyiapkan reagen di dalam *enclosures* dan memastikan penggunaan reagen atau bahan yang diambil dari *freezer* 100 L sudah mencair tidak membeku, apabila membeku divortex 10 detik. Tahap kedua memperhatikan komposisi larutan PCR untuk 1 reaksi step 1 atau *First PCR* (10 μ L per reaksinya) dengan mencampurkan bahan-bahan *First PCR Premix* 7.5 μ L, *IQZyme DNA Polymerase 2 U / μ L* berjumlah 0.5 μ L dan

template DNA (hasil proses ekstraksi sampel) berjumlah 2 μ L, percampuran bahan-bahan tersebut menggunakan tip dan mikropipet serta menaruhnya ke *tube* 0.5 mL yang sudah diberi kode tulisan nomor sampel dan *first PCR* (step 1). Tahap ketiga memperhatikan komposisi larutan PCR untuk 1 reaksi pada step 2 atau *Nested PCR* (15 μ L per reaksinya), proses ini dilakukan di *enclosures* dengan mencampurkan bahan-bahan *Nested PCR Premix* 14 μ L, *IQZyme DNA Polymerase 2 U / μ L* berjumlah 1 μ L, kedalam *tube* 0.5 mL baru yang sudah di beri kode tulisan nomor sampel dan *nested PCR* (step 2), kemudian ke dua *tube* tersebut di taruh di *rack tube*. Jumlah banyaknya bahan yang dipersiapkan adalah jumlah sampel yang ditambah 1 reaksi. Tahap keempat setelah semua bahan dicampur (kecuali *template DNA*), di bagikan kedalam *tube* 0,2 mL dengan volume masing-masing 8 μ L untuk step 1 atau *first PCR* lalu di vortex dan *minispin*, sedangkan bahan atau larutan *nested PCR* atau step 2 disimpan pada suhu 4°C di *freezer* 100 L. Tahap kelima menambahkan *template DNA*, termasuk P (+) *standart* 2 μ L. Vortex sebentar *tube* 0.2 mL kemudian di *minispin* sebelum dimasukkan mesin PCR (*thermocycler*) dan memastikan program yang dijalankan *WSSV First PCR* (step 1), alat *thermocycler* umumnya untuk menggandakan DNA target uji. Pengaturan suhu step 1 (*First PCR*) pada *thermocycler*, di antaranya ialah 94°C 30 detik, 62°C 30 detik, 72°C 30 detik, diulang sebanyak 5 siklus, kemudian 94°C 15 detik, 62°C 15 detik, 72°C 20 detik, diulang sebanyak 15 siklus dan yang terakhir 72°C 30 detik, 20°C 30 detik, sampai siklus berakhir. Tahap keenam, setelah reaksi step 1 (*First PCR*) selesai selama 27 menit sampai siklus berakhir, memencet *thermocycler (done)* dan mengeluarkan *tube* dari mesin PCR untuk ditambahkan reagen *nested PCR* 15 μ L per reaksinya yang sudah disiapkan sebelumnya. Tahap ke enam ini dilakukan diruang *nested (enclosures)* untuk pencampuran dimana (membuka dan menutup tabung dengan cepat dan tepat) yang bertujuan untuk menghindari kontaminasi serta mengganti tip mikropipet untuk tiap-tiap *tube*. Tahap ketujuh sebelum memasukkan *tube nested PCR* dalam *thermocycler*, di vortex dan *minispin* terlebih dahulu, kemudian memastikan bahwa sebelum *product PCR* dijalankan *WSSV Nested PCR* (Step 2). Pengaturan suhu step 2 (*Nested PCR*) pada *thermocycler* diantaranya ialah 94°C 20 detik, 62°C 20 detik, 72°C 30 detik, diulang sebanyak 25 siklus dan 72°C 30 detik, 20°C 30 detik, sampai siklus berakhir. Tahap berikutnya setelah proses berakhir selama 57 menit step

2 (*nested PCR*), mengeluarkan *tube* lalu mematikan mesin dan *product PCR* siap dijalankan pada proses *elektrophoresis*.

Persiapan *Elektrophoresis* Dalam Pembuatan Larutan TAE 1X

Tahap pertama melarutkan larutan stok TAE 10X (*tris acetate*) 50 ml ke dalam *glass ware* (*erlenmeyer*) yang sudah di isi 450 ml *aquadest sterill*. Tahap berikutnya aduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai tercampur rata diatas *hot plate* dengan pengaturan stir 8 dan waktu 3 menit serta menutup *glass ware* dengan *aluminium foil*. Tahap selanjutnya, setelah 3 menit angkat dari *hot plate* lalu ambil *magnetic stirrer* dan larutan TAE 1X siap digunakan.

Persiapan *Elektrophoresis* Dalam Pembuatan 2% Gel Agarose

Tahap pertama menimbang 0,8 mg bubuk *agarose* diatas *aluminium foil* didalam *analitic balance* menggunakan spatula laboratorium, lalu memasukkan kedalam *glass ware* (*erlenmeyer*). Tahap kedua, memasukkan larutan TAE 1X sebanyak 45 ml kedalam *glass ware*, kemudian dipanaskan diatas *hot plate* untuk menghomogenkan larutan gel *agarose*, dengan ukuran *head* 7 serta menunggu sampai gel *agarose* sedikit mendidih atau larutan gel *agarose* menjadi bening. Tahap ketiga memasukkan *syber gel stain* 10 μ l menggunakan tip mikropipet beserta mikropipet kedalam larutan gel *agarose* pada saat sedikit mendidih lalu tutup kembali dengan aluminium foil. Tahap keempat, *glass ware* dapat diambil dari *hot plate* dengan kain serbet ketika sudah mendidih dan mematikan *hot plate* kemudian meletakkan diatas *waterbath* suhu 60°C selama 3 menit. Proses berikutnya mematikan *waterbath*, mencetak *agarose* diatas cetakan gel yang sudah dipasang sisir (*comb*) dimana sisir yang tipis berada dibawah dan sisir yang tebal berada diatas. setelah mencetak gel *agarose* dapat menunggu diluar ruangan selama 20-60 menit, sebab uap gel *agarose* bersifat karsinogenik. Gel *agarose* siap digunakan untuk proses *elektrophoresis* apabila teksturnya sudah memadat.

Proses *Elektrophoresis*

Pengoperasian *elektrophoresis horizontal*, diawali dengan persiapan alat dan bahan kemudian sebelumnya meletakkan gel yang sudah di cetak lalu mengisi tangki dengan larutan TAE 1X yang sudah diencerkan sebanyak 500 ml, sampai gel *agarose*

terendam. Tahap ke dua menyiapkan *tube* (*product PCR*) yang sudah di amplifikasi lalu menambahkan (6X *Loading dye*) sebanyak 5 μ l pada masing-masing *tube* sampel WSSV dengan memakai tip mikropipet beserta mikropipetnya dan selalu mengganti tip mikropipet pada tiap-tiap pengambilan (6X *Loading dye*) untuk menghindari adanya kontaminasi. Tahap berikutnya mencampurkan hingga *homogen*. Tahap ketiga memasukkan *product PCR* yang sudah tercampur (6X *Loading dye*) dengan menggunakan tip mikropipet beserta mikropipetnya kedalam sumuran gel sebanyak 5 μ l. Tahap keempat memasukkan DNA *marker* yang biasanya disebut sebagai penanda DNA yang sudah diketahui berat molekulnya (848 bp, 630 bp, 333 bp) sebanyak 5 μ l, atau dapat menggunakan DNA 100 bp *ladder*. Proses tersebut dalam peletakkan DNA *marker* dapat diawal atau diakhir deretan sumuran gel dan pada tahap ini gel *agarose* berfungsi sebagai media dalam proses *elektrophoresis*. Tahap terakhir yaitu semua sampel dimasukkan ke dalam sumuran yang mana dengan urutan DNA *marker*, K (+), K (-), sampel WSSV, sampel WSSV duplo, lalu memasang tutup *elektrophoresis* dan menghidupkan listrik dengan *voltase* yang diatur 120 V selama 30 menit.

Analisis Hasil Pada UV Transilluminator Dan Dokumentasi

Tahap diawali dengan proses *elektrophoresis horizontal* telah selesai dan gel *agarose* diangkat dari alat *elektrophoresis* menggunakan spatula laboratorium kemudian dipindahkan untuk melakukan proses UV *Transsiluminator* dengan memencet tombol *on*. Tahap berikutnya didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital. Alat *elektrophoresis horizontal* serta alat UV *Transsiluminator* dimatikan lalu dibersihkan dan tahap terakhir ialah membuang gel *agarose* kedalam plastik klip.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyebaran WSSV dimulai tahun 1992 dengan daerah persebaran Jepang, Thailand, Bangladesh, India, Korea, Malaysia, Philipina hingga ke Indonesia, dan gejala penyakit berawal dari interaksi antara inang, agen penyakit serta lingkungan (Supriatna et al., 2014). Respon imun untuk antibakteri dan antijamur pada *crustacea* memiliki kesamaan dengan kelompok insekta, sedangkan respon imun untuk antivirus masih perlu kajian lebih lanjut. Iqbal et al. (2016) melaporkan

pemeriksaan penyakit yang viral dapat dilakukan dengan metode konvensional, yakni melalui pemeriksaan patologi mikroskopik dan isolasi virus. Pendekatan biologi molekuler umumnya diarahkan pada deteksi materi genetik akibat penyakit, yang disebut dengan metode PCR (reaksi *polymerase* berantai) untuk melipatgandakan sedikit materi genetik (DNA) menjadi banyak materi genetik, hal ini

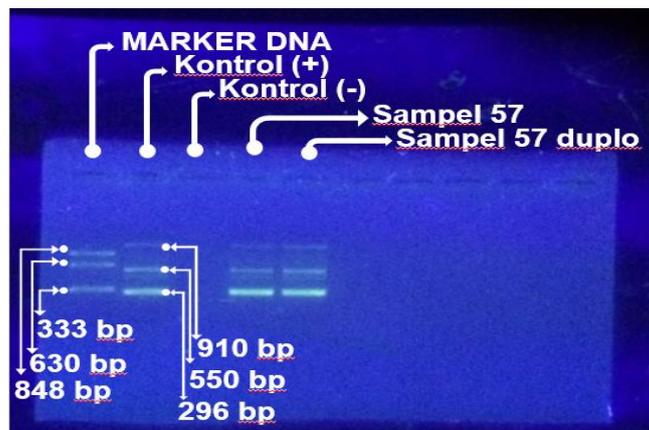
dapat dilakukan deteksi keberadaan patogen virus WSSV melalui PCR yang bekerja secara spesifik dan sensitif (Fuady *et al.*, 2013). Hasil pemeriksaan WSSV dengan uji PCR pada udang vannamei di UPT Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Pasuruan Jawa Timur, dapat dilihat pada **tabel 1** sebagai berikut:

Tabel 1. Pemeriksaan WSSV dengan uji PCR pada udang vannamei di UPT Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Pasuruan Jawa Timur

No.	Kode Sampel	Organ Target Uji	Kedadaan Udang Vannamei	Hasil Uji PCR (WSSV)
1.	57	Insang (<i>gill</i>)	Ukuran tubuh besar, udang terlihat tidak segar dan terdapat bercak putih dibagian eksternal udang.	Positif
2.	59	Insang (<i>gill</i>)	Ukuran tubuh sedang, udang terlihat segar, tidak terdapat tanda-tanda infeksi virus WSSV.	Negatif
3.	61	Insang (<i>gill</i>)	Ukuran tubuh sedang, udang terlihat segar, tidak terdapat tanda-tanda infeksi virus WSSV.	Negatif
4.	72	Ekor (<i>Uropod</i>)	Ukuran tubuh sedang, udang terlihat sedikit segar dan terdapat bercak putih dibagian eksternal udang.	Positif

Tabel 1 dapat dilihat perbedaan hasil uji PCR WSSV pada tiap sampel nya. Sampel yang digunakan apabila ditemukan adanya garis *DNA marker* sejajar dengan kontrol positif dapat diartikan bahwa udang vannamei yang diuji tidak terinfeksi virus WSSV. Kontrol positif dalam uji PCR berfungsi sebagai indikator ada atau tidaknya virus pada sampel, apabila kontrol positif tidak muncul biasanya dikarenakan adanya kontaminasi pada saat

pengerjaan proses analisa maupun kontrol positif tersebut sudah lama tidak digunakan. Adapun marker berfungsi sebagai acuan atau penanda nilai bp (*basepare*), yang mana setiap garis putih marker bernilai 100, terkadang pada hasil uji biasanya terdapat *DNA marker* yang tidak begitu jelas warna garisnya. Hal tersebut dikarenakan pada saat pembuatan marker penambahan bahannya kurang.



Gambar 1. Hasil uji PCR WSSV Sampel Nomor 57 (Data Primer, 2022)

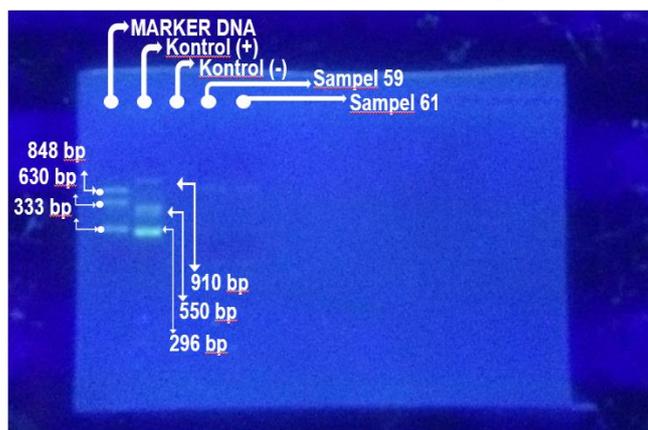
Harahap (2018) melaporkan bahwa hasil yang menunjukkan kontrol positif muncul dapat diartikan bahwa sampel tersebut tidak terdeteksi adanya virus, namun apabila

sampel ditemukan garis sejajar dengan kontrol positif serta *DNA marker*, maka kemungkinan besar sampel mengalami infeksi virus WSSV sejak proses ekstraksi, amplifikasi maupun

elektrophoresis. Pernyataan tersebut sesuai pembacaan hasil uji PCR (+) WSSV berat (*severe*), yang terlihat 3 garis perpendaran pita DNA (*band*) ukuran 910 bp, 550 bp, 296 bp, yang terjadi pada sampel 57 dan sampel duplo 57 atau dapat dilihat pada **gambar 1**. Adapun sampel duplo pengujian PCR WSSV dilakukan dengan tujuan untuk meyakinkan hasil saat pengujian berlangsung, yang mana sampel pertama dan sampel duplo di uji dalam waktu yang sama. Reaksi yang terjadi pada tahap amplifikasi ini umumnya untuk meningkatkan jumlah salinan urutan DNA. Kegiatan yang dilakukan sesuai dengan pernyataan Kurniawati *et al.* (2019) bahwa proses amplifikasi dapat menggandakan atau mereplikasi suatu DNA yang awalnya sedikit menjadi banyak atau berlipat ganda.

WSSV dapat teridentifikasi secara cepat dan tepat pada berbagai stadia udang baik dari alam ataupun udang dari lokasi budidaya dengan menggunakan metode PCR. Virus

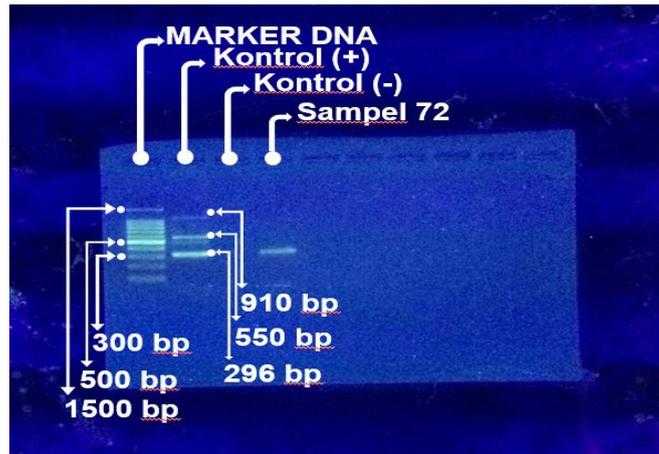
WSSV adalah virus yang disebabkan virus SEMBV dan termasuk golongan virus berbahan genetik DNA berbentuk batang. Fajri (2017) melaporkan bahwa virus merupakan partikel elemen genetik yang mengandung salah satu asam nukleat yaitu DNA (Asam *Deoksiribo Nukleat*) dan RNA (Asam *Ribo Nukleat*) yang berada dalam dua kondisi berbeda, yakni secara intraseluler dalam tubuh inang dan ekstraseluler diluar tubuh inang. Kasus penyakit bercak putih yang terjadi pada udang vannamei umumnya akan menyerang beberapa organ vital diantaranya sel-sel insang, hepatopankreas dan usus, yang mana kerusakan ini ditandai dengan hipertropi inti dan inklusi sel tubuh. Iqbal *et al.* (2016) menyatakan mengenai bercak putih pada karapas dengan diameter 0,5-0,3 nm akan terjadi pada fase akut, sedangkan pada induk udang akan berwarna merah, karena virus WSSV termasuk virus ganas dan mempunyai tiga selaput (*envelope*) yang melindungi inti (*nucleocapsid*).



Gambar 2. Hasil uji PCR WSSV Sampel Nomor 59 dan 61 (Data Primer, 2022)

Pembacaan hasil (-) WSSV negatif menunjukkan 1 garis perpendaran pita DNA (*band*) dengan ukuran 848 bp, seperti pada sampel 59 dan 61 atau dapat dilihat pada **gambar 2**. Hasil negatif didapatkan dari tidak adanya infeksi WSSV. Rante *et al.* (2012) menyatakan bahwa deteksi virus WSSV pada udang vannamei dengan metode PCR Konvensional yang hasilnya negatif masih perlu di kontrol tambak udang vannamei seperti manajemen kualitas airnya, pemberian pakan dan lain sebagainya dengan tujuan menghindari infeksi virus WSSV. Boyd (1990) melaporkan oksigen terlarut merupakan parameter utama kualitas air yang

berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup udang, yang mana meliputi gangguan fungsi biologis dengan terserangnya virus, lambatnya pertumbuhan, nafsu makan rendah, konversi pakan tinggi, bahkan dapat mengakibatkan kematian. Musim kemarau menjadikan salinitas air tambak bersifat *hypersaline* (berkadar garam tinggi, lebih dari 40 ppt), hal ini menjadikan udang vannamei tidak tumbuh, akan tetapi udang vannamei memiliki toleransi salinitas luas (*euryhalin*) sehingga dapat dipelihara diperairan bersalinitas 1-40 ppt (Anita *et al.*, 2017).



Gambar 3. Hasil uji PCR WSSV Sampel Nomor 72 (Data Primer, 2022)

Sampel 72 menunjukkan hasil (+) WSSV ringan (*light*) yang terlihat 1 garis perpendaran pita DNA (*band*) dengan ukuran 296 bp. Dokumentasi hasil sampel 57, 59, 61 dan 72 menunjukkan persamaan akan fungsi penggunaan DNA marker dalam pemeriksaan Uji PCR WSSV. Perbedaan terletak pada penggunaan DNA marker yang berbeda, sampel 72 menggunakan marker umum (marker 100 bp ladder), sedangkan sampel 57, 59 dan 61 menggunakan DNA marker yang sudah diketahui berat molekulnya (848 bp, 630 bp, 333 bp), penggunaan marker umum dikarenakan bahan dari IQ2000 WSSV (DNA marker) di UPT LKIL, Pasuruan Jawa Timur habis. Virus WSSV pada udang menginfeksi pada tingkat ringan dan beberapa tingkatan. Infeksi hasil positif WSSV tingkat berat (*severe*) terjadi seperti pada sampel 57, hasil positif WSSV tingkat sedang (*medium*) terjadi apabila terlihat garis perpendaran pita DNA (*band*) dengan ukuran 550 bp dan 296 bp, kemudian hasil positif WSSV tingkat ringan (*light*) terjadi seperti pada sampel 72 serta hasil negatif terjadi seperti pada sampel 59 dan 61. Hasil akurat pemeriksaan virus WSSV dengan uji PCR diperoleh dari tidak adanya kontaminasi selama berlangsungnya uji (UPT LKIL PASURUAN, 2021).

Penularan virus WSSV secara umum melalui hewan perantara (*carrier*) yakni burung camar serta adanya sifat kanibal udang vannamei, bermula pada udang yang sehat memakan udang yang terinfeksi WSSV, sehingga udang yang sehat dapat tertular virus tersebut. Infeksi WSSV sangat patogenik pada kondisi udang yang diberikan tekanan, hal ini karena mekanisme pertahanan tubuh udang tidak dapat mencegah atau menahan perbanyakannya WSSV dibawah kondisi stress. Kandungan oksigen terlarut dalam air dapat mendukung kehidupan udang minimum 3 mg/L,

sedangkan untuk pertumbuhan yang normal bagi udang yaitu 4-7 mg/L. Kadar oksigen terlarut 3 mg/L walaupun tidak memperlihatkan gejala abnormal akan tetapi sebenarnya berpengaruh pada pertumbuhan udang (Rahma *et al.*, 2014). Pendeteksian virus WSSV dengan uji PCR mendapati hasil uji positif WSSV berat (*severe*) dan positif WSSV ringan (*light*) terjadi karena kemungkinan besar terinfeksi melalui air media yang terkontaminasi WSSV.

Perkembangbiakan virus mempunyai arti penting agar mengetahui bagaimana virus masuk dan keluar dari sel inang, bagaimana virus bisa mematikan atau mentransformasikan sel. Reproduksi dalam virus terdapat beberapa tahap diantaranya *adsorpsi* (fase penempelan), virus pada sel inang, *injeksi* (fase memasukkan asam inti), *sintesis* (fase pembentukan), *perakitan* dan *lisis* (fase pemecahan sel inang). Sari (2018) melaporkan bahwa tahapan-tahapan daur hidup virus dapat dibedakan menjadi daur litik dan daur lisogenik.

Infeksi WSSV mengakibatkan perubahan bentuk tubuh, ukuran benih yang tidak seragam, pertumbuhan lambat, adanya mortalitas serta tanda bintik putih pada bagian eksternal udang vannamei. Perubahan iklim yang terjadi maka tidak menutup kemungkinan terjadinya mutasi virus yang mengakibatkan perubahan sifat virus tersebut menjadi lebih membahayakan. Pengendalian virus WSSV dapat dilakukan dengan cara melakukan penebaran benih yang diketahui bebas virus melalui deteksi dengan uji PCR pada benih ataupun naupli (f1), menghindari pemeliharaan udang pada musim bediding/musim pancaroba (suhu air terlalu rendah), menghindari pemberian pakan secara berlebihan yang dapat menimbulkan

kerusakan lingkungan, menghindari penyebab stress dengan melakukan pergantian air secara rutin dan lain sebagainya. Adapun benih yang akan dikeluarkan dari unit pembenihan dan dibesarkan ditambak sebaiknya dilakukan uji laboratorium (uji PCR). Koesharyani *et al.* (2015) melaporkan hal tersebut dilakukan guna memastikan benih bebas penyakit dan virus, sehingga kegagalan panen dapat diminimalkan. Upaya monitoring untuk mencegah WSSV pada tambak udang vannamei sangat disarankan untuk dilakukan metode pengawasan kesehatan tambak (Hidayani *et al.*, 2015).

KESIMPULAN DAN SARAN

Pemeriksaan WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) dengan uji PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) di UPT Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Pasuruan Jawa Timur, yang mana prosedur diawali persiapan sampel, ekstraksi sampel, persiapan reagen, amplifikasi pada mesin PCR, persiapan elektroforesis, proses *elektrophoresis*, analisis hasil pada *UV Transilluminator*, dokumentasi hasil dan pembacaan hasil. Hasil pemeriksaan sampel 59 dan 61 menunjukkan hasil WSSV negatif (tidak terdeteksi WSSV). Pembacaan sampel 57 didapatkan hasil uji PCR (+) WSSV berat (*severe*) dan sampel 72 menunjukkan hasil (+) WSSV ringan (*light*). Upaya monitoring untuk mencegah WSSV pada tambak udang *vannamei* sangat disarankan untuk dilakukan metode pengawasan kesehatan tambak.

DAFTAR PUSTAKA

Amrillah, A. M., Widyarti, S., & Kilawati, Y. (2015). Dampak stres salinitas terhadap prevalensi White Spot Syndrome Virus (WSSV) dan survival rate udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) pada kondisi terkontrol. *Research Journal of Life Science*, 2(2), 110-123.

Anita, A. W., Agus, M dan Mardiana, T. Y. (2017). Pengaruh Perbedaan Salinitas terhadap Pertumbuhan dan Kelangsungan Hidup Larva Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) PL-13. *PENA Akuatika*, 16(1), 12-19.

Boyd. (1990). *Water Quality In Pond For Aquaculture*. Auburn University Alabama.

Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, D. J. P. (2018). *Capaian Kinerja Subsektor Perikanan Budidaya dan Outlook Tahun 2018*. KKP. Jakarta.

<https://kkp.go.id/djpb/artikel/3042-capaian-kinerja-subsektor-perikanan-budidayaan-outlook-tahun-2018> [5 November 2018]

- Fajri, N.A. (2017). Deteksi WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) Pada Lobster Air Tawar (*Procambarus clarkia*) Menggunakan Metode *Real Time-PCR*. *Genec Swara*, 11(2), 33-38.
- Fauzi, M., Kristiani, M. G. E., Hapsari, F., & Putra, A. (2023). Hasil Produksi Dan Analisis Usaha Pembesaran Udang. *Fisheries of Wallacea Journal*, 4(1), 10-18
- Fuady, M. F., & Nitisupardjo, M. (2013). Pengaruh pengelolaan kualitas air terhadap tingkat kelulushidupan dan laju pertumbuhan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) di PT. Indokor Bangun Desa, Yogyakarta. *Management of Aquatic Resources Journal (MAQUARES)*, 2(4), 155-162.
- Harahap, M. R. (2018). Elektroforesis: Analisis elektronika terhadap biokimia genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1), 21- 26.
- Hidayani, A. A., Malina, A. C., Tampangallo, B. R., & Fathurrahman, A. F. (2015). Deteksi distribusi white spot syndrome virus pada berbagai organ udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Torani Journal of Fisheries and Marine Science*, 25(1), 1-6.
- IQ2000TM. *IQ2000TM WSSV Instruction Manual*. (2014). Taiwan: Gene Reach Biotechnology Corporation.
- Iqbal, M., Buwono, I. D., & Kurniawati, N. (2016). Analisis perbandingan metode isolasi DNA untuk deteksi white spot syndrome virus (WSSV) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan Kelautan*, 7(1), 54 – 65.
- Koesharyani, I., Gardenia, L., & Mufidah, T. (2015). Sebaran Infeksi Taura Syndrome, Infectious Myonecrosis, dan Penaeus vannamei Nervous Virus (TSV, IMNV, dan PVNV) pada Budidaya Udang *Litopenaeus vannamei* di Jawa Barat, Jawa Timur, dan Bali. *Jurnal Riset Akuakultur*, 10(3), 415-422.
- Kurniawati, M. D., Sumaryam, S., & 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.
- Latritiani, R., Desrina dan Sarjito. (2017). Keberadaan *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) di Pertambakan Kota Pekalongan. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 6(3), 276–283.
- Mahyudin., Soemarno dan Tri, B, P. 2015. Analisis Kualitas Air dan Strategi Pengendalian Pencemaran Air Sungai Metro di Kota Kepanjen, Kabupaten Malang. *J-PAL*, 6(2), 105-114.
- Nuhman. (2009). Pengaruh Prosentase Pemberian Pakan Terhadap Kelangsungan Hidup dan Laju Pertumbuhan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 1(2), 193-197.
- Pratama, A., Wardiyanto dan S. (2017). Studi Performa Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Yang Dipelihara Dengan Sistem Semi Intensif Pada Kondisi Air Tambak Dengan Kelimpahan Plankton Yang Berbeda Pada Saat Penebaran. *Jurnal Rekayasa Dan Teknologi Budidaya Perikanan*, 6(1), 643–652.
- Putri, D. S., Affandi, M. I., & Sayekti, W. D. 2020. Analisis Kinerja Usaha Dan Risiko Petambak Udang Vaname Pada Sistem Tradisional Dan Sistem Semi Intensif di Kecamatan Labuhan Maringgai Kabupaten Lampung Timur. *Jurnal Ilmu-Ilmu Agribisnis*, 8(4), 625. <https://doi.org/10.23960/jiia.v8i4.4707>
- Rahma, H. N., Prayitno, S. B., & Haditomo, A. H. C. (2014). Infeksi white spot syndrome virus (WSSV) pada udang windu (*Penaeus monodon* fabr.) yang dipelihara pada salinitas media yang berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3(3), 26-34.
- Rahmi, R., Annawaty, A., & Fahri, F. (2016). Keanekaragaman Jenis Udang Air Tawar Di Sungai Tinombo Kecamatan Tinombo Kabupaten Parigi Moutong Provinsi Sulawesi Tengah. *Natural Science: Journal of Science and Technology*, 5(2), 199-208.
- Rante, B.T., Muliani and Koko, K. (2012). Several Stressing Methods To Induce The Development Of WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) On Tiger Shrimp Shrimp Fries (*Penaeus monodon*). *Aquaculture Research Journal*, 7 (3), 465 – 475.
- Sari, N. (2018). *Upaya Meningkatkan Kreativitas Dan Hasil Belajar Siswa Dengan Penggunaan Media Alat Peraga Pada Materi Virus Di Mas Muta'allimin Kecamatan Blang Bintang Aceh Besar*. Skripsi. Fakultas Tarbiyah Dan Keguruan, Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh. Aceh.
- Supriatna, I., Yustiati, A dan Iskandar, I. (2014). Sekuen Asam Amino Anti *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) Pada Udang Windu (*Penaeus Monodon*), *Bionatura*, 16(1), 40–46.
- Yasin, M, I. 2021. Studi Penyakit dan Penanggulangan Bahan Kimia Pada Tambak Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Di Kabupaten Mamuju Tengah Menggunakan *Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry* Dan Diagnosa Molekuler. *Jurnal Ilmiah Maju*, 4(2), 6-13.