

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan Mei 2013. Lokasi pengambilan sampel meliputi wilayah pertambakan di Kabupaten Pesawaran. Pengujian dan pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Divisi Kesehatan Ikan dan Lingkungan Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung, Desa Hanura, Kecamatan Padang Cermin, Kabupaten Pesawaran.

3.2 Alatan dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian sebagai berikut:

Tabel 2. Alat dan bahan yang dibutuhkan dalam uji PCR dan identifikasi parasit pada udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*)

No	Alat	Bahan
1.	Mikroskop	Sampel udang vannamei
2.	Alat bedah	<i>Lysis Buffer</i>
3.	<i>Cold box</i>	<i>DNA molecular weight marker</i>
4.	Kaca preparat	Larutan kloroform (CHCl_3)
5.	<i>Microtube 1.5 ml</i>	<i>Dissolving solution</i>
6.	<i>Microtube 0.2 ml</i>	Larutan <i>RNA extraction</i>
8.	Timbangan digital	Etanol 95 %
9.	<i>Vortex</i>	Larutan DEPC DDH_2O
10.	Mikropipet	<i>First PCR premix</i>
11.	<i>Water bath</i>	<i>RT-PCR premix</i>
13.	<i>Thermalcycler</i>	<i>Iqzyme DNA polymerase</i>
14.	<i>Alluminium foil</i>	P(+) standard IMNV
15.	Botol kaca volume 50 ml	P(+) standard WSSV
16.	<i>Microwave</i>	Kontrol negatif (yeast tRNA)
17.	Tangki elektroforesis	<i>Gelred</i>
18.	<i>Uv transilluminator</i>	<i>1x TAE Buffer</i>
19.	Kamera	<i>6x loading dye</i>
20.		NaCl fisiologis
21.		<i>Agarose</i>
22.		<i>Nested PCR PreMix</i>

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Wawancara

Wawancara dilakukan dengan teknisi atau pemilik tambak yang memahami kondisi di lokasi pertambakan, meliputi:

- a. Informasi umum mengenai tambak (luas lokasi tambak, jumlah petak tambak, tahun beroperasi, substrat dasar tambak, sistem budidaya, luas petak tambak, dan jumlah kincir);
- b. Data mengenai udang budidaya (spesies, asal benur, umur, biomassa, populasi udang), manajemen pemberian pakan (jenis pakan, *Feeding Rate*, *Feeding Periode*, *Feeding Method*);
- c. Data kualitas air (sumber air, perlakuan air, kecerahan, suhu, pH, DO, salinitas, dan amonia);
- d. Informasi mengenai aplikasi biosekuritas di lokasi pertambakan.

3.3.2 Penentuan Lokasi Pengambilan Sampel

Lokasi pengambilan sampel dilakukan di dua sentra budidaya tambak udang intensif di Kabupaten Pesawaran. Lokasi pertama dilakukan di tambak udang Desa Sidodadi, sedangkan lokasi kedua dilakukan di tambak udang Desa Gebang.

3.3.3 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam pengamatan parasit dan virus adalah udang vannamei dengan umur yang tidak ditentukan. Sampel dibawa ke laboratorium dalam keadaan hidup yang dimasukkan ke dalam termos berisi es batu. Sampel disimpan dalam *freezer* pada suhu -27°C setelah sampai di laboratorium agar

struktur DNA sampel tidak rusak, kemudian sampel diperiksa dengan metode analisis PCR.

3.3.4 Pemeriksaan Sampel

Pemeriksaan sampel dilakukan melalui metode analisis PCR dilaksanakan berdasarkan *Instruction Manual IQ2000TM Detection and Prevention System* yang merupakan kesatuan instrumen (berupa kit/ paket) yang digunakan untuk menggandakan DNA dengan bantuan enzim.

a. Pemeriksaan *Infectious Mynerosis Virus*(IMNV)

Pemeriksaan *Infectious Mynerosis Virus* dilakukan dengan metode pemeriksaan *IQ2000TM IMNV (nested) Instruction Manual* (2007).

b. Pemeriksaan *White Spot syndrome Virus*

Pemeriksaan *White Spot syndrome Virus* dilakukan dengan metode pemeriksaan *IQ2000TM WSSV (nested) Instruction Manual* (2008).

c. Pengamatan Parasit

Pengamatan parasit pada sempel udang vannamei dilakukan melalui dua pengamatan antara lain:

Pengamatan Ektoparasit :

1. Disiapkan sampel udang yang akan diamati;
2. Diamati permukaan tubuh udang secara visual ;
3. Lendir pada permukaan tubuh dikerik, dan dibuat preparat ulas pada gelas objek ;
4. Preparat diamatidi bawah mikroskop.

Pengamatan Endoparasit :

1. Udang sampel dibedah sehingga organ internal terlihat ;

2. Diamati permukaan organ secara visual dengan bantuan kaca pembesar ;
3. Organ dalam insang dan usus diangkat dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi larutan garam fisiologis ;
4. Dibuat preparat ulas pada gelas objek ;
5. Preparat diamatidi bawah mikroskop.

3.4 Parameter yang Diamati

Parameter penelitian yang diamati adalah:

1. Pengamatan kondisi lingkungan budidaya (prinsip manajemen kesehatan udang biosekuritas yang diterapkan ditambak) menggunakan kuisisioner.
2. Diagnosis penyakit virus antara lain IMNV dan WSSV.
3. Pengamatan parasit pada udang vannamei yang sakit atau berada di pematang atau tertangkap anco.
4. Pertumbuhan udang; ADG (*Average Daily Gain*) dan ABW (*Average Body Weight*).
5. FCR (*Food Conversion Rate*).
6. Hasil produksi (panen).
7. Kualitas air.

3.5 Analisis Data

Penelitian ini dianalisis secara deskriptif. Data yang dihasilkan dalam bentuk gambar dan tabel. Data hasil wawancara akan dianalisis untuk mengetahui pengaruh kondisi umum penerapan biosekuritas tambak terhadap penyebaran penyakit IMNV dan WSSV serta pengaruh hasil produksi pada udang vannamei.