

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Maret sampai Mei 2014. Lokasi pengambilan sampel meliputi wilayah Kalianda Kabupaten Lampung Selatan yang melalui pengamatan di Laboratorium Budidaya Perikanan Universitas Lampung dan Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung.

#### 3.2. Peralatan dan Bahan

**Tabel. 3.** Alat dan Bahan Uji PCR

<b>Alat</b>	<b>Bahan</b>
PCR	Sampel udang windu dan udang vannamei
Alat bedah	<i>Lysis Buffer</i>
<i>Cold box</i>	<i>DNA molecular weight marker</i>
<i>Microtube</i> 1.5 ml	Larutan kloroform (CHCl <sub>3</sub> )
<i>Microtube</i> 0.2 ml	<i>Dissolving solution</i>
Timbangan digital	Larutan <i>RNA extraction</i>
<i>Vortex</i>	Etanol 95 %
Mikropipet	Larutan DEPC DDH <sub>2</sub> O
<i>Water bath</i>	<i>First PCR premix</i>
<i>Thermalcycler</i>	<i>RT-PCR premix</i>
<i>Aluminium foil</i>	<i>Iqzyme DNA polymerase</i>
<i>Microwave</i>	NaCl fisiologis
Tangki elektroforesis	P(+) standard WSSV
<i>Uv transilluminator</i>	Kontrol negatif (yeast tRNA)
	<i>Gelred</i>
	<i>1x TAE Buffer</i>
	<i>6x loading dye</i>

**Tabel. 4.** Alat dan Bahan Pengamatan Kualitas Benih Udang

<b>Alat</b>	<b>Bahan</b>
Mikroskop	Sampel udang windu dan vannamei
Akuarium	Media TCBS
<i>Cold box</i>	
<i>Beaker glass</i>	
Senter atau lampu pijar	
Kaca preparat	
Cawan petri	
Sprider	
Tabung reaksi	
Timbangan digital	

### **3.3. Prosedur Penelitian**

Data dikumpulkan melalui teknik wawancara, metode dokumentasi, penentuan lokasi pengambilan sampel, pengamatan kesehatan dan identifikasi penyakit.

#### **3.3.1. Wawancara**

Wawancara dilakukan untuk memperoleh berbagai informasi yang dibutuhkan dalam penelitian (Lampiran 1). Wawancara dilakukan kepada teknisi atau pemilik panti benih mengenai fasilitas, air dan udang, manajemen karantina, kesehatan udang, manajemen pemeliharaan dan manajemen personil. Wawancara dilakukan untuk memperoleh hasil penerapan manajemen kesehatan udang yang diterapkan pada masing-masing panti benih. Adapun kriteria wawancara pada panti benih antara lain :

##### **3.3.1.1. Air dan Benur**

Air merupakan media hidup dari benih udang yang menjadi unsur terpenting bagi kelangsungan hidup benih udang. Sedangkan benur (benih udang) merupakan organisme budidaya yang akan dibudidayakan. Benih udang yang baik dihasilkan

dari indukan yang baik juga. Kriteria air dan benih udang yang baik antara lain : menggunakan sumber air yang bebas dari hewan air lainnya, air difilter terlebih dahulu menggunakan filter dengan ukuran kecil untuk mencegah telur atau larva hewan masuk melalui air, air diperlakukan desinfeksi yang dirancang untuk mematikan karier udang liar, air yang telah dipersiapkan untuk budidaya telah dipastikan tidak terdapat potensi karier patogen tertentu, fasilitas budidaya dirancang untuk mencegah transmisi patogen melalui udara dari sumber air yang masuk, fasilitas budidaya dirancang untuk mencegah transmisi patogen dari sekitar panti benih dan sumber air yang masuk, naupli yang dipelihara dalam fasilitas budidaya bersertifikat bebas dari patogen target, naupli dikarantina dahulu setelah sampai di fasilitas budidaya, naupli dipindahkan dari dalam panti benih selama transportasi atau kotak kemasan tidak menggunakan air yang berasal dari tempat asal.

#### **3.3.1.2. Karantina**

Karantina merupakan sistem yang menanggulangi penularan penyakit dengan cara mengisolasi penyakit agar tidak menginfeksi organisme yang lain. Kriteria karantina antara lain : sistem karantina udang atau udang sakit dirancang lebih awal sesuai dengan prosedur operasional standar perusahaan terhadap panti benih, petak karantina dibedakan pada ruang, gedung, atau area yang terisolasi secara fisik dengan panti benih produksi, karantina digunakan secara tersendiri (isolasi), dengan menggunakan sumber air dan pembuangan air yang terpisah dari panti benih produksi, apakah naupli atau telur baru diaklimatisasi untuk diobservasi ketidaknormalan dalam tingkah laku dan perubahan badan dan untuk mengkonfirmasi konsumsi pakannya,

Saat benih udang teramati tidak normal, apakah sampel benih udangnya diuji, benih udang normal diambil sampelnya untuk diuji pada target patogen tertentu (parasit, bakteri, dan virus), sampel benih udang yang mati (masih segar) dan hidup diambil setiap waktu tertentu, udang yang dipelihara dalam kondisi kepadatan yang sama, pengelola, operator mencuci tangan sampai lengan sebelum pergi antara wilayah sistem karantina dan produksi, operator panti benih bekerja pada panti benih tertentu yang sudah menjadi bagian tanpa bekerja di bagian lain, peralatan karantina hanya digunakan dalam wilayah sistem karantina.

### **3.3.1.3. Kesehatan Udang**

Kesehatan udang merupakan faktor-faktor akumulasi dan sinergi antara beberapa bidang ilmu parsial (penyakit, nutrisi, kualitas air, dan keteknikan) dengan tindakan manajemen sehingga mewujudkan satu kesatuan aksi yang potensial dapat mencegah dan mengurangi akibat dari penyakit ikan. Kriteria untuk kesehatan udang antara lain : pengawasan kesehatan udang direncanakan bersama manajemen fasilitas budidaya, kualitas air diawasi dan diatur untuk kondisi yang sesuai dengan kebutuhan udang, kualitas pakan disediakan untuk memberikan status nutrisi yang optimal untuk pertumbuhan, naupli dibeli berasal dari induk yang berusia produktif pada masa pematangan yang optimal, bahan kimia yang digunakan untuk pencegahan penyakit dalam sistem manajemen yang baik, pakan bervitamin digunakan untuk pencegahan penyakit dalam sistem manajemen yang baik, obat-obatan termasuk antibiotik digunakan untuk pencegahan penyakit, benih udang abnormal, sakit, dan mati dibunuh untuk mencegah menyebarnya patogen.

#### **3.3.1.4. Pemeliharaan**

Pemeliharaan merupakan tahapan benih udang untuk di pelihara untuk mencapai ukuran tertentu dengan penambahan berat dan panjang serta menghindari kontaminasi dengan patogen. Kriteria pemeliharaan yang baik antara lain : tempat pencucian alas kaki disediakan pada saat memasuki area produksi dan dibersihkan dan larutan diganti pada waktu tertentu, operator mencuci tangan dan lengan sebelum memasuki daerah budidaya, tersedia wilayah untuk desinfeksi dan mencuci perlengkapan budidaya seperti ember, baskom, jaring, pengukur oksigen terlarut, termometer dan perlengkapan lainnya, peralatan yang sudah bersih sudah disediakan tempat tertentu, prosedur pemeliharaan dibuat untuk semua tahapan seperti pembuangan feses, pakan sisa, algae, tanaman air, udang mati dan buangan terdekomposisi dari dasar bak, pipa kedalam dan pipa keluar, peralatan aerasi, pipa oksigen dan peralatan lain dalam petak bak, tangan dicuci dengan sabun mengandung desinfektan pada saat bekerja pada bagian pemeliharaan yang berbeda, terdapat jadwal bekerja pada pemberian pakan benih udang, pada bak panti benih yang sama dalam siklus produksi, setiap bak panti benih diperlakukan terpisah untuk mengetahui meminimalisasi potensi kontaminasi silang pada patogen, peralatan didesinfeksi sebelum digunakan untuk bak panti benih yang berbeda, lingkungan tambak diberi keterangan "terkontaminasi" dan dibersihkan dengan benar, semua bagian dari sistem pemeliharaan diinspeksi dan dibersihkan, setidaknya satu bulan sekali, lingkungan panti benih yang bersih menjadi kebiasaan, terdapat waktu

tertentu untuk membersihkan lingkungan panti benih secara keseluruhan, binatang peliharaan, rodensia, burung, dan vertebrata lain berada diluar wilayah budidaya.

### **3.3.1.5. Manajemen Personil**

Manajemen personil merupakan proses penting dalam menjalankan budidaya setiap pembudidaya harus menaati peraturan dan menjaga bak pemeliharaan agar tidak terkontaminasi. Kriteria dalam manajemen personil antara lain : terdapat prosedur operasional standar untuk operator panti benih atau pegawai lain untuk penerapan biosekuritas dan manajemen kesehatan, membersihkan diri misalnya mencuci tangan dan lengan dengan sabun antibakteri merupakan standar kerja, jadwal kerja diatur untuk memperkecil jumlah orang yang berbeda bekerja pada petak panti benih , kendaraan di desinfeksi sebelum masuk dalam wilayah budidaya, parkir kendaraan pengunjung sudah disesuaikan dengan tempat yang tersedia jauh dari fasilitas budidaya, akses bak panti benih terlarang untuk jumlah orang yang banyak, jumlah kunjungan diperkecil dan terbatas untuk jumlah sedikit untuk mempermudah pengaturan kelompok orang, terdapat pencatatan setiap kejadian pada setiap bak pemeliharaan, pengunjung dihimbau untuk membersihkan diri misalnya mencuci tangan dan lengan dengan sabun antibakteri selama kunjungan, pengunjung dihimbau untuk tidak memegang apapun dalam panti benih. Setelah jam kunjungan bak pencuci alas kaki dan lantai dibersihkan.

### **3.3.2. Metode Dokumentasi**

Metode dokumentasi merupakan metode yang digunakan untuk mengumpulkan data sekunder, meliputi foto-foto fasilitas panti benih, bak pemeliharaan benih udang, sistem biosekuriti dan lingkungan.

### **3.3.3. Penentuan Lokasi Pengambilan Sampel**

Sampel diambil di Kalianda Lampung selatan yang terdiri dari 4 desa yaitu Canti, Banding, Rajabasa dan Way Muli. Sampel diambil setelah proses wawancara pada stadia *naupli*, fase *zoea*, fase *mysis*, dan *post larva* pada panti benih udang windu dan *vannamei* di pesisir Lampung Selatan.

### **3.3.4. Pengambilan Sampel**

Sampel diambil secara acak dalam bak pemeliharaan benih pada setiap lokasi. Pengambilan dengan alat tangkap berupa jaring. Sampel diambil dari bak pemeliharaan dalam keadaan hidup dan langsung dimasukkan ke dalam plastik yang berisi air.

### **3.3.5. Pengamatan Kesehatan Benih Udang**

Udang diamati dengan menggunakan mikroskop dan diamati didalam laboratorium. adapun kriteria dan prosedur pengamatan yang dilakukan pada kesehatan benih antara lain :

### **A. Respon Cahaya**

Adapun proses pengamatannya antara lain :

1. Sampel diambil larva atau post larva diambil sebanyak 100 ekor
2. Sampel larva atau post larva di letakkan pada beaker glass yang telah diisi dengan air
3. Semua cahaya dimatikan
4. Udang diamati dengan menggunakan senter antau lampu belajar
5. Persentase larva atau post larva yang mendekati cahaya dan yang menjauhi cahaya kemudian dihitung.

### **B. Pengamatan Aktivitas**

Adapun proses pengamatannya antara lain :

1. Sampel diambil larva atau post larva diambil sebanyak 100 ekor
2. Sampel larva atau post larva diletakkan pada beaker glass yang telah diisi dengan air.
3. Air kemudian diberi arus searah sehingga terbentuk arus.
4. Sampel diamati dan dihitung persentase larva yang aktif melawan arus dan yang mengikuti arus
5. Prevalensi larva atau post larva yang lemah dihitung persentasenya.



### C. Pengamatan *Feeding Rate*

Adapun proses pengamatannya antara lain :

1. Sampel diambil sebanyak minimal 30 ekor dengan menggunakan pipet tetes atau disaring kedalam mangkok pisin (untuk stadia PL), diletakkan pada kaca objek.
2. Sampel larva atau post larva diamati dengan menggunakan mikroskop hingga seluruh pencernaan terlihat jelas dengan menggunakan perbesaran 100 kali.
3. Panjang diperkirakan saluran pencernaan yang terisi yaitu : Full,1 atau 2 atau kosong.
4. Kelompokkan *feeding rate* tersebut dalam tiga bagian yaitu : 1 penuh atau 2 dan kosong.
5. *Feeding rate* dikatakan *full* apabila usus benih udang terisi pakan dari belakang hepatopankreas hingga melewati segmen ke 4. Dan dikatakan 1 atau 2 apabila usus benih udang terisi pakan dari belakang hepatopankreas hingga segmen ke 1 atau di segmen ke 4 dan *feeding rate* dikatakan kosong apabila usus benih udang kelihatan bening (kosong atau tidak ada makanan).

#### **D. Pengamatan Pigmentasi**

Adapun proses pengamatannya antara lain :

1. Sampel diambil sebanyak minimal 30 ekor dengan menggunakan pipet tetes atau disaring ke dalam mangkok pisin dan diletakkan pada kaca objek.
2. Penampakan warna tubuh larva atau post larva terutama pada bagian mata, abdomen dan ekor diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 40 – 100 kali.
3. Pada keadaan normal warna tubuh larva atau *post larva* akan terlihat transparan dengan titik-titik kromatofor yang berwarna merah, biru, kuning dan oranye yang berderet di sepanjang sisi tubuh bagian bawah. Sedangkan pada kondisi yang tidak normal kromatofor akan terlihat melebar hingga seluruh bagian mata, tubuh maupun ekor. Adanya tanda-tanda erosi pada bagian luar tubuh (eksoskeleton) dikategorikan pada kelompok tubuh yang “kusam” (*pale*).
4. Prevalensi benih udang yang pigmentasinya tidak normal dihitung persentasenya.

#### **E. Parasit**

Adapun proses pengamatannya antara lain :

1. Sampel diambil sebanyak minimal 30 ekor dengan menggunakan pipet tetes atau disaring ke dalam mangkok pisin dan letakkan pada kaca objek
2. Sampel dibasahi dan ditutup dengan kaca penutup

3. Sampel diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 – 400 kali pada seluruh bagian tubuh luar larva atau *post larva* untuk mendeteksi adanya ektoparasit dari jenis ciliophora seperti : *Epistylis*, *Zoothamnium*, *Vorticella* dan lain-lain.
4. Prevalensi benih udang yang terinfeksi ektoparasit dihitung persentasenya.

#### **F. Pengamatan Abnormalitas**

Adapun proses pengamatannya antara lain :

1. Sampel diambil sebanyak minimal 30 ekor dengan menggunakan pipet tetes atau disaring dan diletakkan pada kaca objek
2. Larva atau post larva diamati dengan menggunakan perbesaran 100 kali.
3. Seluruh bagian tubuh larva atau post larva diobservasi
4. Hasil observasi dicatat dengan membedakan jenis abnormalitas yang ditemukan

#### **G. Pengamatan Hepatopankreas**

Adapun proses pengamatannya antara lain :

1. Sampel diambil sebanyak minimal 30 ekor dengan menggunakan pipet tetes atau disaring ke dalam mangkok pisin dan letakkan pada kaca objek
2. Penampakan hepatopankreas larva atau *post larva* diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 40 – 100 kali.
3. Pada keadaan normal (*Good*) : Pada stadia zoea bentuk hepatopankreas seperti kupu-kupu bentuk simetris antara sisi kiri dan kanan,

*Medium* : Pada stadia zoea bentuk hepatopankreas tidak simetris antara sisi kiri dan kanan atau mungkin hepatopankreas mengalami pembengkakan,

*Bad* : Hepatopankreas sudah tidak berbentuk, warna kehitaman.

4. Prevalensi benih udang yang hepatopankreasnya dihitung persentasenya.

## **H. Pengamatan Lipid**

Adapun proses pengamatannya antara lain :

1. Sampel diambil sebanyak minimal 30 ekor dengan menggunakan pipet tetes atau disaring ke dalam mangkok pisin dan letakkan pada kaca objek
2. Penampakan *lipid* diamati pada hepatopankreas larva atau *post larva* dengan menggunakan mikroskop perbesaran 40 – 100 kali

*High* : apabila jumlah *lipid* banyak, sebaran merata, *lipid* menutupi seluruh hepatopankreas

*Medium* : apabila jumlah *lipid* sangat sedang, sebaran kurang merata, atau *lipid* hanya menutupi sebagian hepatopankreas

*Low* : apabila jumlah *lipid* sangat sedikit atau bahkan tidak ada, sebaran hanya disalah satu bagian hepato, atau *lipid* hanya menutupi seperempat bagian hepatopankreas.

3. Prevalensi benih udang yang hepatopankreasnya dihitung persentasenya.

### **3.3.6. Identifikasi Penyakit pada Udang**

Metode identifikasi penyakit pada udang dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu secara visual, mikroskopis dan PCR (Yanto, 2006).

#### **A. Identifikasi Secara Visual**

Pemeriksaan visual dapat dilakukan dengan cara mengamati secara langsung baik fisik maupun tingkah laku udang hidup, karena udang yang sakit akan memperlihatkan gejala yang berbeda dari udang sehat (Subaidah, 2006). Beberapa penyakit terutama parasit yang ukurannya besar dapat dilihat secara visual dengan menggunakan kaca pembesar. Pemeriksaan secara visual juga dapat dilakukan dengan melihat organ dalam pada udang, seperti usus dengan cara pembedahan (Afrianto,1992). Adanya infeksi penyakit dapat mengakibatkan ketidaknormalan bentuk dan warna organ dalam udang (Alifuddin,1993).

**Tabel 5.** Gejala Udang Terkena Penyakit Bakteri dan Parasit

<b>Bagian yang diserang</b>	<b>Gejala Klinis</b>
Karapas dan seluruh tubuh	Bercak merah dan kelihatan menyala
Sistem otot dan sistem kekebalan tubuh	Larva kelihatan lemah dan tidak aktif
Organ Pencernaan	Nafsu makan menurun
Antena, uropod, pleopod dan bagian tambahan lainnya	Mengalami luka dan berwarna coklat
<i>Haemolymph</i>	Terjadi defisiensi kekurangan vitamin C dan terdapat sel-sel bakteri dalam darah udang
Eksoskeleton	Molting tidak sempurna
Bentuk tubuh	Bengkok
Daerah branchial insang	menghambat perkembangan gonad pada udang
Dinding <i>proventriculus</i> dan usus.	Nafsu makan menurun
Sepanjang syaraf bagian ventral	Gerakan yang tidak terkendali
Hepatopankreas	Nafsu makan menurun

## **B. Identifikasi Penyakit Secara Mikroskopis**

Prosedur kerja identifikasi penyakit diawali dengan mengambil sampel benih udang. Sampel udang yang diperiksa adalah udang yang menunjukkan gejala klinis terserang penyakit berupa bakteri dan parasit. Udang yang terserang penyakit kemudian dibawa ke laboratorium untuk diperiksa. Teknik pemeriksaan dan identifikasi parasit pada udang windu yaitu:

1. Sampel udang diambil kemudian dimatikan;
2. Sampel udang diletakkan pada kaca objek dan ditetesi dengan air laut dan ditutupi dengan kaca penutup;
3. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran. Hasil pengamatan dicocokkan pada gambar atau buku identifikasi (Afrianto, 1992).

Prosedur identifikasi penyakit oleh bakteri dilakukan dengan melihat kepadatan bakteri pada udang. Adapun prosedur kerja pengamatan bakteri antara lain dengan menggunakan metode *plate count* :

1. Sampel udang diambil secara acak dari bak pemeliharaan dalam keadaan hidup
2. Sampel diambil pada bagian insang dan usus
3. Sampel kemudian dimasukkan kedalam media agar TCBS
4. Kemudian sampel diinkubasi selama 24 jam
5. Biakan Agar Plate diambil dari Inkubator;
6. Dengan menggunakan *Colony Counter* dan Hand-Counter diamati dan dihitung koloni yang tumbuh. Jumlah koloni yang dapat dihitung berkisar antara 30 – 300 koloni;
7. Kalkulasikan jumlah koloni terhitung dengan cara mengalikan koloni yang terhitung dengan faktor pengenceranya (Dermawan *et al.*,2004).

Kriteria bakteri dengan menggunakan metode *plate count* :

- a. Jumlah koloni rendah < 30
- b. Jumlah koloni sedang 30-300
- c. Jumlah koloni tinggi >300

(Dermawan *et al.*,2004)

### C. Identifikasi Sampel Dengan PCR

Pengujian sampel dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* yang dilaksanakan berdasarkan Instruction Manual IQ2000TM *Detection and Prevention System*. Prosedur yang dilakukan antara lain :

#### 1. Ekstraksi DNA

Sebanyak 25-50 mg jaringan udang bisa berupa *pleopod* dan insang udang juvenil atau *subadult* hidup, *postlarva* 11, keseluruhan jaringan untuk postlarva 10 atau 0,1 ml *haemolymph* dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 ml. Jaringan dihancurkan dalam mikrotube dengan menggunakan *pellet pastle*, kemudian tambahkan 1ml DNAzol<sup>®</sup> *reagent*. Lalu jaringan disentrifugasi pada kecepatan 10000X g selama 10 menit pada 4°C atau suhu ruang. Supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam mikrotube baru, kemudian ditambahkan 0,5 ml etanol 96%. Mikrotube dibolak-balik agar tercampur lalu diamkan selama 1-3 menit pada suhu ruang. Setelah itu disentrifugasi kembali mikrotube dengan kecepatan 4000X g selama 1-2 menit pada 4°C atau suhu ruang. Etanol 96% yang ada di dalam mikrotube dibuang sehingga hanya tersisa *pellet* lalu cuci *pellet* tersebut dengan 0,8-1 ml etanol 75% dan diamkan selama 30-60 detik. Selanjutnya etanol 75% dibuang kemudian keringkan selama 5-15 detik. *Pellet* dicuci kembali dengan penambahan 0,8-1 ml etanol 75% dan diamkan selama 30-60 detik. Etanol 75% dibuang kemudian keringkan selama 5-15 detik. Lalu *pellet* di dalam mikrotube ditambahkan 8 mM NaOH sebanyak 0,2-0,3 ml, kemudian dihomogenkan. Lalu *pellet* disimpan pada suhu -20°C ( LULP2IL-S, 2013).



## **Amplifikasi PCR Konvensional**

Komponen-komponen PCR (*master mix*) berikut dimasukkan ke dalam *microtube* 0.2 mL : ddH<sub>2</sub>O 15.875  $\mu$ L, 5X PCR *buffer* 5  $\mu$ L, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L, dNTPs 0.5  $\mu$ L, *primer forward* 146F1 0.5  $\mu$ L, *primer reverse* 146R1 0.5  $\mu$ L, *Taq DNA Polymerase* 0.125  $\mu$ L. *Master mix* disiapkan sebanyak 1,1 X dari setiap reaksi. *Microtube* dibagi ke dalam sampel, kontrol positif dan kontrol negatif, kemudian ditambahkan sampel DNA dan kontrol positif masing-masing sebanyak 1  $\mu$ L.

*Microtube* dimasukkan ke dalam mesin PCR, kemudian dijalankan proses amplifikasi (PCR) *step 1* sebagai berikut: *hotstart* pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 52.5°C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 1.5 menit. Siklus denaturasi-*annealing*-ekstensi diulang sebanyak 30 kali. Siklus PCR diakhiri dengan ekstra ekstensi pada suhu 72°C selama 5 menit. Sampel hasil PCR dapat disimpan pada suhu 4°C atau dilanjutkan ke tahap berikutnya yaitu *step 2* (*Nested PCR*).

Proses PCR kedua (*nested PCR*) sebanyak 1  $\mu$ L larutan hasil PCR awal dimasukkan ke dalam *microtube* yang telah berisi *master mix*. Komposisi *mastermix* sama dengan amplifikasi tahap pertama, perbedaannya terletak pada jenis primer yang digunakan (Primer 146F2 & 146R2). Selanjutnya dijalankan kembali siklus amplifikasi PCR dengan pola siklus: *hotstart* pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 54°C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit. Siklus denaturasi-*annealing*-ekstensi diulang sebanyak 30 kali.

Siklus amplifikasi PCR diakhiri dengan ekstra ekstensi pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil PCR disimpan pada suhu 4°C dan siap untuk digunakan elektroforesis (LULP2IL-S, 2013).

WSSV dideteksi dengan prosedur OIE *chapter 2.2.6* (2012). WSSV adalah virus bergenom DNA yang dapat dilakukan amplifikasi langsung setelah proses isolasi genom. Karena genom WSSV yang sangat panjang (292967 bp) maka untuk meningkatkan spesifisitas deteksi tahapan PCR tidak hanya dilakukan satu tahap, tetapi dua tahap dengan *nested* PCR (Hulten, 2001).

*Nested* PCR adalah metode PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA spesifik (*target sequences*) dengan menggunakan dua pasang primer. Primer pertama digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA yang lebih panjang dari segmen target yang mengikutsertakan segmen target di dalamnya. Siklus PCR kedua digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA target dengan primer spesifik yang terletak di kedua ujung segmen target. Fungsi dari *nested* PCR adalah untuk peningkatan spesifisitas karena kemampuan amplifikasi oleh primer kedua tergantung pada produk amplifikasi oleh primer pertama (Davidson, 2002).

## **2. Elektroforosis**

Gel *Agarose* dimasukkan ke dalam mesin elektroforesis horizontal. Lalu ditambahkan larutan TBE 1X ke dalam mesin elektroforesis hingga gel *agarose* terendam. Sebanyak 5 µl produk hasil PCR yang menggunakan 5X PCR *buffercolourless* diambil dan ditambahkan dengan *Loading dye* 6X sebanyak 1 µl dan

dicampurkan dengan baik. Kemudian hasil PCR yang telah ditambahkan larutan diatas disuntik ke dalam lubang sumur gel dengan menggunakan mikropipet. Untuk sampel PCR yang menggunakan 5X PCR *buffergreen* tidak perlu lagi ditambahkan dengan *Loading dye* 6X. Selain sampel juga dimasukkan marker sebagai penanda ukuran pita DNA. Setelah itu penutup elektroforesis dipasang lalu operasikan mesin pada 100V selama 30 menit, setelah semua sampel dimasukkan. Kemudian gel *Agarose* diangkat dan direndam dalam larutan Gelred™ (3X *in water*) selama 15-30 menit. Selanjutnya bilas gel *agarose* dengan cara direndam kedalam akuades selama 10-20 menit untuk menghentikan proses pewarnaan. Setelah itu gel *agarose* diamati pada UV *transilluminator*. Hasil positif terdeteksi WSSV bila terlihat perpendaran jauh pita DNA pada ukuran 1447 bp dan 941 bp atau 941 bp saja. Hasil negatif WSSV bila tidak terlihat perpendaran pita DNA pada ukuran 1447 bp dan 941 bp (LULP2IL-S, 2013).

#### **4. Analisis PCR Menggunakan IQ2000™ System**

Virus didiagnosis menggunakan IQ2000™ System yang terdiri dari ekstraksi bahan genetik sampel. Ekstraksi bertujuan memperoleh ekstraksi DNA udang maupun virus WSSV yang menginfeksi udang. Rangkaian analisis PCR yang terdiri dari First PCR dan Nested PCR bertujuan untuk memperbanyak DNA virus WSSV sesuai dengan primer yang telah disediakan. Langkah PCR yang terakhir adalah proses elektroforesis dan pembacaan hasil PCR (interpretasi) yang berupa pendaran band (pita) pada lubang-lubang kecil lempengan agarose (*chip chamber*). Setiap proses analisis sampel selalu disertai dengan kontrol positif dan kontrol negatif untuk

menghindari kesalahan positif (*false-positive result*) maupun kesalahan negatif (*false-negative result*) (OIE, 2009).

### **3.4. Parameter yang Diamati**

Parameter yang diamati adalah:

- a. Prinsip manajemen kesehatan yang diterapkan di lokasi panti benih (dengan kuisisioner).
- b. Kualitas benih udang windu dan udang vannamei yang dihasilkan oleh panti benih yang ada di Kalianda Lampung Selatan.
- c. Hubungan antara penerapan manajemen kualitas benih dengan kualitas benih yang dihasilkan.

### **3.5. Analisis Data**

Data yang diperoleh berupa hasil kuisisioner (penerapan manajemen kesehatan benih udang) dan pengamatan kualitas benur akan dianalisis secara regresi polinomial dengan menggunakan Microsoft Excel. Data hasil penelitian dianalisis untuk mengetahui hubungan antara penerapan manajemen kesehatan udang dengan kualitas benih udang yang dihasilkan oleh panti benih di Kalianda Lampung Selatan.