

DETEKSI MOLEKULAR VEKTOR PENYEBAB WSSV PADA UDANG WINDU (*Penaeus monodon*) DI KABUPATEN TAKALAR

Rahmi

Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Makassar
Email: ammy_aki@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan virus WSSV, pada beberapa vektor virus di tambak dengan metode PCR. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2012 sampai bulan Maret 2012. Sampling dilakukan di tambak Kabupaten Takalar, hewan uji yang digunakan jenis krustasea liar berupa krustasea liar (*Mesopodopsis sp.*, *Scylla sp.* dan udang liar). Ekstraksi DNA menggunakan Promega-kit. Konsentrasi PCR yang diperlukan yang dibutuhkan adalah 1 x Buffer PCR yang mengandung 0.65 μ L dNTPs, 0.25 μ L Taq Polymerase, 0.5 μ L Primer F, 0.5 μ L R, 2 μ L Buffer S, 5 μ L Template DNA (sampel) dan 16.1 μ L ddH₂O, dengan konsentrasi total yang dibuat menjadi 25 μ L. Kondisi PCR : denaturasi awal 95°C 5', diikuti dengan 35 siklus denaturasi 95°C 30", annealing 60°C 1', ekstensi 72°C 1' dan 72°C 5'. *Running* Elektroforesis, selanjutnya divisualisasi pada *UV Transiluminator*. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa jenis krustasea liar berupa *Mesopodopsis sp.* dan *Scylla sp.* berperan sebagai vektor yang membawa agen penyakit *White Spot Syndrom Virus* (WSSV) pada tambak udang windu (*P. Monodon*).

Kata kunci: Udang windu, Vektor, WSSV

PENDAHULUAN

Udang windu (*Penaeus monodon* Fabr.) merupakan salah satu unggulan sektor perikanan dan kelautan nasional yang banyak dibudidayakan dan banyak diminati oleh konsumen serta memiliki nilai tinggi dalam perdagangan internasional. Dimana dengan adanya kecenderungan perubahan pola konsumsi dunia dari daging ke produk ikan dan udang juga semakin memperluas peluang pasar. Hal tersebut sesuai dengan kebijakan pembangunan perikanan yang mengupayakan peningkatan ekspor tanpa menunggu peningkatan konsumsi ikan dalam negeri (Rozi, 2008).

Berbagai upaya telah dilakukan dalam meningkatkan produksi udang windu. Salah satu diantaranya adalah penerapan sistem budidaya udang windu secara intensif yang dimulai sejak pertengahan tahun 1986. Dimana komoditi udang windu paling penting

yang diperdagangkan ditinjau dari segi nilai ekonomi yang mencapai 16,5% dari total nilai perdagangan komoditi perikanan secara internasional (FAO, 2007).

Penyebaran virus pada kondisi budidaya biasa terjadi melalui dua model transmisi yaitu transmisi atau penyebaran secara vertikal dan horizontal. Penyebaran secara vertikal terjadi melalui induk udang ke benih melalui embrio atau telurnya, sementara penyebaran secara horizontal adalah penyebaran virus melalui air, tanah, kanibalisme, feses atau lewat vektor. Beberapa jenis organisme yang dapat berperan sebagai pembawa bibit penyakit atau vektor berupa mesopodopsis (jembret), udang liar, kepiting liar, rajungan dan benih udang windu yang ditebar sudah terkontaminasi di pembenihan (Masturi dan Prahasta, 2009).

Infeksi virus pada udang saat ini belum ditemukan obatnya. Untuk mencegah

terjadinya penyebaran penyakit ini, perlu dilakukan deteksi dini terhadap adanya virus yang menyerang organisme budidaya. Saat ini deteksi virus yang telah digunakan secara cepat, tepat (akurat) dan praktis adalah dengan metode reaksi rantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) (Haliman, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan virus WSSV, pada beberapa vektor virus di tambak dengan metode PCR.

Kegunaan penelitian ini, diharapkan dapat menjadi bahan informasi dalam penanggulangan penyakit kerdil di tambak.

METODOLOGI

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada Januari sampai Maret 2012. Sampling dilakukan di tambak udang windu di Kabupaten Takalar karena pada daerah tersebut mudah dalam mengakses sampel. Sampel kemudian dianalisis secara PCR di Laboratorium.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan selama penelitian dilaboratorium, adalah sebagai berikut : Autoclave digunakan sebagai alat sterilisasi basah, oven digunakan sebagai alat sterilisasi kering, thermalcycler PCR digunakan dalam amplifikasi DNA, UV illuminator sebagai tempat dokumentasi hasil PCR, sentrifuse untuk memisahkan ekstrak, vortex untuk mencampur larutan, waterbath, freezer untuk menyimpan sampel, elektroforesis untuk visualisasi ukuran DNA, mikropipet untuk memindahkan cairan atau

larutan, tabung eppendorf sebagai wadah template DNA, alat gerus untuk melumatkan sampel, gunting bedah untuk memotong organ, pinset untuk mengambil sampel, cawan petri sebagai wadah meletakkan sampel dan kamera digital digunakan dalam dokumentasi hasil PCR .

Bahan yang digunakan selama penelitian dilaboratorium adalah sebagai berikut: 150 µL Nucleus lysis, 30 µL EDTA, 4.375 µL Proteinase K, 50 µL Protein Precipitation, 150 µL Isopropanol, 150 µL Ethanol 70%, 25 µL DNA Rehidrasi, 0.65 µL d NTPS, 0.25 µL Taq Polimerase, 0.5 µL Primer F, 0.5 µL Primer R, 2 µL Buffer S, 5 µL Tempalte DNA, 16.1 µL ddH₂O dan tissue.

Materi Penelitian

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah jenis krustasea liar yang terdapat dalam tambak udang windu, di Kabupaten Takalar Propinsi Sulawesi Selatan, berupa krustasea liar (*Mesopodopsis sp*, *Scylla sp*. dan udang liar).

Prosedur Penelitian

Ekstraksi DNA

Sampel krustasea liar yang di ambil dari tambak udang windu selanjutnya setiap sampel diekstraksi DNA nya dengan menggunakan Wizard DNA purification Kit (Pro-mega). Ambil sampel krustacea liar (*Mesopodopsis sp*, *Scylla sp*. dan udang). Sampel dibersihkan beberapa kali dengan menggunakan larutan fisiologis 0.85% kemudian digerus dan dimasukkan dalam tabung eppendorf 1.5 mL. semua dikerjakan dalam keadaan dingin (*on ice*). Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan petunjuk

ekstraksi DNA dari Pro-mega dengan mengikuti prosedur sesuai dengan yang tertulis dalam protocol dengan sedikit modifikasi. Hasil gerusan tersebut diambil lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1.5 mL, selanjutnya ditambahkan 150 μ L Nucleus lysis dan 30 μ L EDTA kemudian divortex dan didinginkan pada freezer selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 4.375 μ L Proteinase K lalu divortex dan disentrifus. Selanjutnya dimasukkan dalam waterbath shaker suhu 55- $^{\circ}$ C selama \pm 1 malam (*overnight*). Setelah diinkubasi dalam waterbath shaker, tambahkan 50 μ L larutan Protein Precipitation pada sampel lalu divortex dan didinginkan dalam freezer selama 5 menit. Sampel disentrifus pada 13000 rpm selama 4 menit. Pindahkan supernatan yang mengandung DNA pada tabung eppendorf dan tambahkan 150 μ L Isopropanol pada suhu ruang. Sentrifus sampel pada 13000 rpm selama 1 menit dan buang supernatan. Tambahkan 150 μ L Ethanol 70% suhu ruang, lalu bolak-balik sampel dan sentrifus pada 13000 rpm selama 1 menit. Buang Ethanol 70% dan simpan pada kondisi terbalik di atas kertas pengisap hingga kering. Tambahkan 25 μ L larutan DNA Rehidrasi dan diinkubasi dalam freezer selama \pm 1 malam (*overnight*).

Protokol Polymerase Chain Reaction (PCR)

Adapun konsentrasi PCR yang dibutuhkan adalah 1 x Buffer PCR yang mengandung 0.65 μ L dNTPs, 0.25 μ L Taq Polymerase, 0.5 μ L Primer F, 0.5 μ L R, 2 μ L Buffer S, 5 μ L Template DNA (sampel) dan 16.1 μ L ddH₂O. Reaksi PCR dilakukan pada

tabung 0.2 mL dengan konsentrasi total yang dibuat menjadi 25 μ L dengan menambahkan distilled water. Kondisi PCR adalah sebagai berikut: denaturasi awal 95 $^{\circ}$ C selama 5 menit, diikuti dengan 35 siklus denaturasi 95 $^{\circ}$ C selama 30 detik, annealing 60 $^{\circ}$ C selama 1 menit, ekstensi 72 $^{\circ}$ C selama 1 menit dan ekstensi akhir 72 $^{\circ}$ C selama 5 menit.

Proses Elektroforesis

1. Persiapan gel agarose

Agarose ditimbang sesuai yang dibutuhkan, kemudian dilarutkan dalam larutan TAE 1 x. Dalam penelitian ini, konsentrasi agarose yang digunakan adalah 1.5%. dengan menggunakan pemanas (*hotplate*) agarose dilarutkan sampai mendidih dan setelah mendidih dibiarkan selama \pm 25 menit sampai suhunya sekitar 50 $^{\circ}$ C, kemudian dicetak dalam tray agarose yang telah dilengkapi dengan sisir untuk membentuk sumur-sumur gel. Setelah agarose dingin, dengan sangat hati-hati sisir tray diangkat kemudian gel dimasukkan ke dalam elektroforesis apparatus yang telah diisi dengan TAE 1 x sebagai buffer elektroforesis.

2. Running elektroforesis

Hasil PCR sebanyak 8 μ L dalam loading dye dirunning pada gel elektroforesis mini bersama-sama dengan DNA marker 100bp. Setelah semua hasil PCR diinjeksikan ke dalam sumur-sumur gel elektroforesis, selanjutnya elektroforesis dijalankan dengan kondisi 100 volt selama 45 menit.

Visualisasi DNA

Visualisasi DNA dilakukan dengan cara pewarnaan dan dokumentasi sampel yang

telah di PCR. Dimana gel hasil elektroforesis di rendam dalam larutan Ethidium bromida (konsentrasi 1 mg/mL) selama 10-15 menit. Selanjutnya gel dicuci dengan akuadest selama 5-10 menit. Untuk mengetahui ada tidaknya infeksi virus terhadap sampel-sampel yang dideteksi, maka gel hasil elektroforesis diamati dengan menggunakan UV Transluminator yang sekaligus dilakukan pengambilan foto. Jika pewarnaan kurang sempurna, seperti terdapat pita-pita DNA tapi terlihat masih buram, maka perendaman dalam Ethidium bromida dan pencucian dengan akuadest diulangi.

Parameter Penelitian

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah Jenis virus dengan primer spesifik yang terdapat pada vektor dengan menggunakan metode PCR.

Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk gambar, yang merupakan data deskriptif hasil penelitian.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi DNA

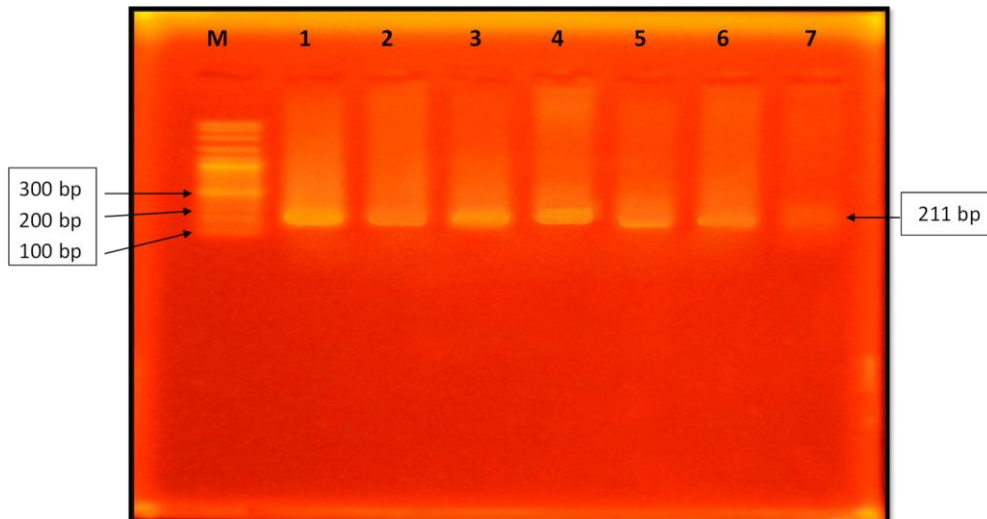
Berdasarkan hasil deteksi penyakit dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sampel krustacea liar (*Mesopodopsis sp.*, Udang Api-api dan *Scylla sp.*) yang di uji secara PCR dengan mengambil kaki renang (pleopoda), insang, dinding usus bagian tengah (*hand mid gut*) dan hepatopankreas. Dari lokasi pengambilan sampel yaitu Kabupaten Takalar, diperoleh hasil bahwa vektor terinfeksi oleh jenis virus White Spot

Syndrom Virus (WSSV), Berikut gambar visualisasi DNA sampel yang terinfeksi virus tersebut.

Berdasarkan hasil pemeriksaan menggunakan metode PCR yang menggunakan primer single White Spot Syndrome Virus (WSSV) menunjukkan hasil positif. Visualisasi hasil elektroforesis yang menampilkan hasil deteksi WSSV pada sampel krustacea liar yang menjadi hewan uji. Pada gambar (1) diatas, dapat dilihat bahwa pita-pita DNA mengisi kontrol positif WSSV. Pita-pita DNA pada sampel 1,2,3,4,5 dan 6 yang terinfeksi WSSV berada pada 211 bp. Hal ini sesuai dengan pendapat Natividad *et al.*,2006 bahwa sampel yang terinfeksi oleh WSSV jika pada lajur DNA genom muncul pita DNA 211 bp.

Dari hasil visualisasi DNA, dapat diketahui bahwa *Mesopodopsis sp.* berperan sebagai vektor yang membawa agen penyakit WSSV pada tambak udang windu (*P. monodon*). Dimana WSSV merupakan penyakit viral yang sangat virulen dan dapat menginfeksi berbagai jenis udang (Lightner, 1996). Penyakit ini menjadi salah satu masalah penting dalam budidaya udang (Chen *et al.*, 2005).

Target serangan WSSV adalah jaringan ekto dan mesodermal asal, seperti insang, organ limfoid dan epitel kutikula. Replikasi terjadi pada nucleus dimana virion terbentuk dan menyebar dari yang terinfeksi ke sel lain dan dari sel yang luruh (Azizah dan Kurniasih *dalam* Vlak *et al.*, 2002).



Gambar 1. Visualisasi DNA hasil M-PCR dari sampel Vektor yang terinfeksi WSSV.

Keterangan : M = Marker/penanda

1,2,3,7 = sampel benih udang windu (*P. monodon*)

4,5,6 = sampel positif terinfeksi WSSV

WSSV termasuk virus DNA untai ganda (dsDNA) dan tergolong ke dalam genus Whispovirus, family Nimaviride. Virion berbentuk batang (rod shape), serta berukuran rata-rata $120 \times 330 \pm 22$ nm (Kosanchandara dan Boonyaratpalin, 1998), sedangkan Wang *et al.*, 2005 bahwa virion berbentuk ellips atau batang dan memiliki envelop serta berukuran $305 \pm 30 \times 127 \pm 11$ nm. WSSV mempunyai berat molekul 27,5 KDa (Nadala *et al.*, 1997).

Karakteristik penyakit akibat serangan WSSV adalah bintik putih pada permukaan karapaks dan cangkang serta terjadi disklorasi sehingga tubuh menjadi kemerah-merahan (Rahmi, 2011 dalam Kosanchandara dan Boonyaratpalin, 1998). WSSV juga menginfeksi ovarium sehingga penyakit ini dapat berjangkit secara vertikal yaitu dari induk ke telur (Lo *et al.*, 1997). Tanda-tanda penyakit ini adalah adanya bercak putih pada exoskeleton dan epidermis pada udang yang

sakit dengan diameter sekitar 0,5-2,0 mm (Takahashi *et al.*, 1994). Tanda-tanda lainnya adalah nafsu makankurang, lesu (letarghy), kulit terkelupas (loose cuticle) dan warna karapaks memerah (Durand *et al.*, 1997; Otta *et al.*, 1999).

Salah satu cara untuk mendeteksi penyakit adalah dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), yang bisa mendeteksi WSSV pada udang dan dapat dipanen dengan kondisi normal (Tsai *et al.*, 1999).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa jenis krustacea liar berupa *Mesopodopsis sp.* dan *Scylla sp.* berperan sebagai vektor yang membawa agen penyakit *White Spot Syndrom Virus* (WSSV) pada tambak udang windu (*P. Monodon*).

Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, disarankan untuk melakukan pemeriksaan terlebih dahulu pada udang windu (*P. Monodon*) yang akan dibudidayakan dan mencegah penyebaran vektor (*Mesopodopsis sp.* dan *Scylla sp.*) pada tambak, untuk mencegah timbulnya penyakit.

DAFTAR PUSTAKA

- Azizah, A., Kurniasih. 2005. Deteksi Infeksi White Spot Syndrome Virus pada Udang Putih (*Penaeus vannamei*) di Pulau Jawa dengan Metode Polymerase Chain Reaction. Jurnal Perikanan (J. Fish. Sci)VII (1): 32-39.
- Durand S, Lightner DV, Redman RM, Bonami JR. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of *White spot syndrome baculovirus* (WSSV). Dis Aquat Org 29: 205-211.
- Haliman, R.W. dan Adiwijaya, D. 2005. Udang Vannamei, Pembudidayaan dan Prospek Pasar Udang Putih yang Tahan Penyakit. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Kasornchandra, J., S. Boonyaratpalin dan T. Itami. 1998. Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. Aquaculture, 164, 243-251.
- Kordi. K., Ghufran, M. H. 2009. Budidaya Perairan. PT Citra Aditya Bakti. Bandung. Hal. 889.
- Latama, G., M. Bunga dan Asmi Citra Malina. 2009. Uji Coba Pembesaran Larva Udang Bebas Virus Di Tambak. Fakultas Kelautan Dan Perikanan, Universitas Hasanuddin. Jurnal Penelitian Sains & Teknologi.
- Lo CF, Ho CH, Chen CT, Liu KF, Chiu YL, Yeh PY, Peng SE, Hsu HC, Liu HC, Chang CF, Su MS, Wang CH. 1997. Detection and tissue tropism of *white spot syndrome baculovirus* (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. Dis Aquat Org 30: 53-72.
- Madeali, M. I., A. Tompo dan Muliani. 1998. Diagnosis Penyakit Viral Pada Udang Windu, *Penaeus monodon* Secara Histopatologis dan Antibody Poliklonal Dengan Metode Elisa. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia, 4 (3): 11-18. PDF
- Masturi, Hasnawi., Prahasta, Arief. 2009. Agribisnis Udang Windu. CV Pustaka Grafika. Bandung.
- Natividad, K. D. T., Maria Veron P. Migo, Juan D. Albaladejo, Jose Paolo V. Magbanua., Nakao Nomura., Masatoshi Matsumura. 2006. Simultaneous PCR detection of two shrimp viruses (WSSV and MBV) in postlarvae of *Penaeus monodon* in the Philippines. Aquaculture 257, 142–149.
- Rozi, A. Fakhrudin. 2008. Penerapan Budidaya Udang Ramah Lingkungan Dan Berkelanjutan Melalui Aplikasi Bakteri Antagonis Untuk Biokontrol Vibriosis Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr.). Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Takahashi, Y., T. Itami, M. Kondom, M. Maeda, R. Fujii, S. Tomonaga, K. Supamattaya dan S. Boonyaratpalin. 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). Fish Pathology, 29, 121-125.
- Tsai MF, Kou GH, Liu KF, Chang CF, Peng SE, Hsu HC, Wang CH, Lo CF. 1999. Long term presence of *White spot syndrome virus* (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. Dis Aquat Org 38: 107-114.