

SKRINING INDUK UDANG WINDU DENGAN ANALISIS PCR DALAM RANGKA MENUNJANG PROGRAM NSBC

Evy Maftuti Nur¹⁾ dan Budi Santoso²⁾

¹⁾ Teknisi Litkayasa pada Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau, Jepara

ABSTRAK

Udang masih merupakan primadona dan penyumbang devisa terbesar dari sektor non migas, tetapi hingga saat ini penyakit yang mengiringi juga semakin banyak, salah satunya adalah penyakit bercak putih viral. Solusi yang bisa dilakukan adalah antara lain dengan menggunakan budidaya sistem tertutup dan benih yang bebas virus (berkatagori SPF). Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP), Jepara yang ditunjuk sebagai sentra pembenihan udang nasional harus mampu menghasilkan benih udang dengan katagori SPF. Untuk mendapatkan benih dengan kategori tersebut harus dilakukan *skrining* mulai dari induk yaitu menggunakan analisis PCR. Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk mendapatkan induk yang bebas virus dan informasi daerah penghasil induk yang masih steril dari infeksi WSSV. Metode yang digunakan dari kegiatan ini adalah metode *nested* PCR yang meliputi ekstraksi fenol dengan metode fenol, amplifikasi PCR menggunakan metode *Lo et al.* serta elektroforesis. Dari kegiatan ini didapatkan hasil bahwa calon induk dari daerah Nangroe Aceh Darussalam masih relatif lebih baik dibandingkan dari Pangandaran (Jawa Barat) dan Nusa Tenggara Barat.

KATA KUNCI: *skrining*, PCR, WSSV, induk udang

PENDAHULUAN

Hingga saat ini udang masih merupakan primadona dari sektor perikanan dan merupakan penyumbang devisa terbesar dari sektor non migas, sehingga banyak dibuka lahan pertambakan tanpa memperhatikan daya dukung lahan. Dampak yang ditimbulkan juga semakin banyak antara lain menurunnya kualitas lingkungan, yang berpengaruh terhadap hewan kultivan yang dipelihara karena penyakit yang mengiringi juga semakin banyak.

Penyakit yang banyak menyerang pertambakan udang adalah penyakit bercak putih viral (*White Spot Syndrome Virus*, WSSV) yang sampai saat ini belum ada pengobatannya. Beberapa langkah untuk mengatasi berkembangnya virus bercak putih ini adalah dengan memutus siklus hidup dari virus tersebut dan menerapkan budidaya udang dengan sistem tertutup serta menggunakan benih bebas virus/katagori *Specific Pathogen Free* (SPF).

Dalam kaitannya dengan masalah tersebut BBPBAP Jepara sebagai Unit Pelaksana Teknis (UPT) Pusat ditunjuk sebagai sentra pembenihan udang nasional (*National Shrimp Broodstock Center*, NSBC) yang diharapkan mampu memenuhi kebutuhan benih udang bebas virus bagi para pengguna di seluruh Indonesia. Dengan dibentuknya program NSBC tersebut diharapkan perudangan di Indonesia bisa bangkit kembali dengan produk benih berkualitas bebas virus (SPF).

Untuk mendapat benih katagori SPF bisa dengan jalan *skrining* dimulai dari induknya. *Skrining* induk ini adalah salah satu metode untuk mendapatkan induk yang sehat yang akan dipisahkan dari yang sakit untuk mencegah kemungkinan masuknya penyakit melalui kontaminan maupun melalui induk dari daerah lain (Anonim, 2006).

Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk mendapatkan induk bebas virus bercak putih dan mengetahui daerah penghasil induk yang bebas dari infeksi virus bercak putih.

BAHAN DAN METODE

Bahan

- Induk udang dari NAD, Pangandaran, Nusa Tenggara Barat
- Proteinase-K, RNase, SDS
- Saturated Phenol
- CIAA (Chloroform Isoamil Alkohol)
- Sodium Acetat
- Ethanol Absolut
- PCR Core System kit
- Primer set (146 F1/F2, 146 R1/R2)
- Taq DNA Polymerase
- Ethidium Bromide
- Larutan TBE (Triss Boric EDTA)
- 100 bp DNA ladder

Alat

- Tabung eppendorf
- Mikropipet
- Sentrifuge
- Fume Hood
- Inkubator
- Ruang steril
- Mesin Thermocycler
- Elektrophoresis
- UV transiluminator
- Kamera digital

Metode

Sampel yang digunakan dalam uji coba ini adalah udang windu yang baru datang dan diambil hemolimfe sebanyak 0,2 mL untuk masing-masing individu. Analisis menggunakan metode *nested* PCR yang meliputi beberapa tahapan antara lain:

1. Preparasi DNA menggunakan metode fenol yang distandarkan dengan OIE 2003 chapter 4.1.2. Adapun langkah kerja selengkapnya adalah sebagai berikut:
 - Hemolimfe udang diambil sebanyak 0,1 mL, homogenkan dengan akuades, proteinase-K, RNase, dan SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)
 - Diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit
 - Ditambahkan fenol 400 µL, dikocok dengan keras dan sentrifuge dalam suhu ruang dengan kecepatan 12.000 rpm

- Supernatan dipindah ke tabung baru, ditambahkan fenol 400 µL dikocok dengan keras dan sentrifuge dalam suhu ruang dengan kecepatan 12.000 rpm
- Supernatan dipindah ke tabung baru, tambahkan CIAA sebanyak 400 µL kocok dengan keras dan sentrifuge dalam suhu ruang dengan kecepatan 12.000 rpm
- Pindahkan sebanyak 300 nL supernatan ke tabung baru, tambah 30 µL sodium acetate dan 750 µL ethanol absolute. Bolak-balik tabung dan simpan pada suhu -20°C selama 15 menit
- Sentrifuge selama 5 menit pada suhu ruang dengan kecepatan 12.000 rpm
- Buang supernatan, cuci dengan ethanol 75% sebanyak 15.000 L, kocok dengan baik, sentrifuge selama 2 menit dalam suhu ruang dengan kecepatan 12.000 rpm
- Buang supernatan, cuci dengan ethanol absolute sebanyak 12.000 µL, kocok dengan baik dan sentrifuge selama 2 menit dalam suhu ruang dengan kecepatan 12.000 rpm
- Buang supernatan dan keringkan dalam inkubator/desikator selama 10 menit
- Larutkan dengan akuades sebanyak 100 µL

2. Preparasi untuk amplifikasi PCR menggunakan metode Lo *et al.* (1989) yang distandarkan dengan OIE 2003 chapter 4.1.2.

Langkah kerja selengkapnya dibuat koktail PCR dengan volume 25 µL menggunakan campuran:

- Akuabides : 19,125 µL
- 10 x PCR Buffer : 2,5 µL
- 50 mM MgCl₂ : 0,75 µL
- dNTP mix : 0,5 µL
- Primer 146 F1/F2 : 0,5 µL
- Primer 146 R1/R2 : 0,5 µL
- Taq DNA Polymerase : 0,125 µL
- Template DNA : 1 µL

Mesin PCR diatur dengan ketentuan sebagai berikut:

Langkah 1.

- Hot start : 95°C selama 5 menit

- Denaturasi : 95°C selama 30 detik
- Annealing : 52,5°C selama 30 detik
- Extention : 72,5°C selama 1,5 menit.
- Proses PCR ini dilakukan sebanyak 30 siklus dilanjutkan dengan *extra extention* dengan suhu 72°C selama 5 menit

Langkah 2.

- Hot start : 95°C selama 5 menit
- Denaturasi : 95°C selama 30 detik
- Annealing : 54°C selama 30 detik
- Extention : 72°C selama 1 menit
- Proses PCR ini dilakukan sebanyak 30 siklus dilanjutkan dengan *extra extention* dengan suhu 72°C selama 5 menit

3. Elektroforesis

Untuk visualisasi produk PCR dengan mengambil masing-masing 5 µL produk PCR dan dielektroforesis dengan 1,5% agarose yang direndam ethidium bromide dengan konsentrasi 5 µg/mL selama 5 menit.

Hasil positif: apabila terdapat perpendaran pita dengan ukuran 1.447 bp dan 941 bp.

Hasil negatif: apabila tidak terdapat perpendaran pita dengan ukuran 1.447 bp dan 941 bp.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil analisis PCR yang dilakukan terhadap 86 ekor calon induk yang diambil dari 3 daerah dalam program NSBC ini didapatkan bahwa calon induk yang diambil dari daerah Nangroe Aceh Darussalam tidak terdeteksi WSSV untuk udang jantan, sedangkan untuk calon induk udang betina terdeteksi sebanyak 1 ekor dari 6 ekor udang yang dianalisis atau sebesar

16,7% dari calon induk yang disiapkan (Tabel 1).

Calon induk dari Pangandaran (Jawa Barat) terdeteksi WSSV sebanyak 9 ekor dari 20 ekor udang atau sebesar 45% calon induk jantan yang dipersiapkan, sedangkan untuk calon induk betina terdeteksi WSSV sebanyak 3 ekor dari 20 ekor udang atau sebesar 15%. Sementara calon induk yang diambil daerah Nusa Tenggara Barat terdeteksi WSSV sebanyak 4 ekor dari 17 ekor calon induk jantan atau sebesar 23,5% sedangkan untuk calon induk betina terdeteksi WSSV sebanyak 7 ekor dari 17 ekor calon induk atau sebesar 41,2%.

Dengan demikian maka induk dari Nangroe Aceh Darussalam relatif masih bagus untuk digunakan dalam produksi benih bebas virus.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Daerah Nangroe Aceh Darussalam mempunyai induk udang yang relatif lebih baik dalam hubungannya dengan WSSV dibandingkan 2 daerah yang lain yaitu Pangandaran dan Nusa Tenggara Barat.
2. Prosedur *skrining* induk udang windu dengan analisis PCR memberikan hasil yang akurat dan cepat untuk menentukan kesehatan induk yang bebas dari infeksi WSSV.

Saran

1. Pengambilan sampel untuk analisis PCR hendaknya sama jumlahnya untuk masing-masing daerah sehingga data yang didapat bisa lebih tepat dan akurat.
2. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut dengan jumlah dan waktu yang sama.

Tabel 1. Hasil deteksi WSSV dengan analisis PCR dari induk udang asal daerah Nangroe Aceh Darussalam, Pangandaran, dan Nusa Tenggara Barat

Asal daerah	WSSV			
	Positif (%)		Negatif (%)	
	Jantan	Betina	Jantan	Betina
Nangroe Aceh Darussalam	0	16,7	100	83,3
Pangandaran	45	15	55	85
Nusa Tenggara Barat	23,5	41,2	76,5	58,8

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2003. Manual of diagnostic test for aquaic animal. Office International Des Epizooties. Fourth edition. France.
- Anonim. 2006. Penerapan biosecurity dalam pengelolaan kesehatan udang. Prosiding workshop penerapan teknologi BMP untuk mendukung revitalisasi budidaya udang. Direktur Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Jakarta.
- Taslihan, A., R. Handayani, dan E.M. Nur. 2004. Aplikasi teknik PCR (*polymerase chain reaction*) dalam proses *skrining* induk udang windu dalam rangka mendapatkan benih bebas virus bercak putih (WSSV). Forum seminar aplikasi biokimia dan biologi molekuler. UGM.
- Taslihan, A, E.M. Nur, dan B. Santoso. 2005. *Skrining* induk untuk mendapatkan benih bebas virus bercak putih dalam rangka menunjang program NSBC. Laporan kegiatan Balai Besar Budidaya Air Payau. Jepara.
- Sambrook, J., T. Maniatis, and E.F. Fritsch. 1989. Molekuler cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold spring harbour laboratory, New York.

Lampiran 1. Hasil analisis PCR terhadap WSSV pada calon induk udang windu

Jenis kelamin	Asal daerah	Hasil
Jantan	Nangroe Aceh Darussalam	Negatif
Jantan	Nangroe Aceh Darussalam	Negatif
Jantan	Nangroe Aceh Darussalam	Negatif
Jantan	Nangroe Aceh Darussalam	Negatif
Jantan	Nangroe Aceh Darussalam	Negatif
Jantan	Nangroe Aceh Darussalam	Negatif
Betina	Nangroe Aceh Darussalam	Negatif
Betina	Nangroe Aceh Darussalam	Positif
Betina	Nangroe Aceh Darussalam	Negatif
Betina	Nangroe Aceh Darussalam	Negatif
Betina	Nangroe Aceh Darussalam	Negatif
Betina	Nangroe Aceh Darussalam	Negatif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Jantan	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Positif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif

Lanjutan lampiran 1

Jenis kelamin	Asal daerah	Hasil
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Betina	Pangandaran, Jawa Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Positif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Positif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Positif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Positif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Jantan	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Positif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Positif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Positif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Positif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Positif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Positif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Positif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Positif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Negatif
Betina	Nusa Tenggara Barat	Negatif