

**DETEKSI MARKER MIKROSATELIT DNA PADA  
UDANG WINDU (*Penaeus monodon*) YANG  
DITANTANG DENGAN BAKTERI *Vibrio harveyi***

---

---

**SKRIPSI**

---

---

**IKE IKARTI**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
JURUSAN PERIKANAN  
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2012**

**DETEKSI MARKER MIKROSATELIT DNA PADA  
UDANG WINDU (*Penaeus monodon*) YANG  
DITANTANG DENGAN BAKTERI *Vibrio harveyi***

---

---

**S K R I P S I**

---

---

**IKE IKARTI  
L 221 08 278**

**Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana  
Pada Program Studi Budidaya Perairan Jurusan Perikanan  
Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan  
Universitas Hasanuddin  
Makassar**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
JURUSAN PERIKANAN  
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2012**

## ABSTRAK

**IKE IKARTI. L22108298. Deteksi marker mikrosatelit DNA pada udang windu (*Penaeus monodon*) yang ditantang dengan bakteri *Vibrio harveyi*. Di bawah bimbingan Asmi Citra Malina sebagai pembimbing utama dan Andi Parenrengi sebagai pembimbing anggota.**

Penyakit merupakan salah satu kendala terbesar yang dihadapi dalam budidaya udang windu. Dalam usaha pembenihan dibutuhkan calon induk yang bebas dan tahan terhadap penyakit. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk memperoleh calon induk sehat dari penyakit adalah dengan menggunakan marker mikrosatelit ketahanan penyakit. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi marka mikrosatelit DNA ketahanan penyakit pada udang windu yang resisten maupun tidak resisten terhadap infeksi bakteri *Vibrio harveyi*. Hewan uji yang digunakan adalah udang windu (*Penaeus monodon*). Sampel udang windu diperoleh dari Instalasi Tambak Percobaan Balai Penelitian Perikanan Budidaya Air Payau di Takalar. Ukuran hewan uji yang akan digunakan diusahakan seragam, yakni sekitar 10-15 gram sebanyak 40 ekor. Selanjutnya udang windu diinjeksi dengan bakteri *V. harveyi*  $10^6$  CFU/mL masing-masing sebanyak 0.1 mL/ekor pada bagian abdominal (intramuscular) segmen ke dua menggunakan jarum suntik volume 1 mL. Genom DNA diisolasi dari jaringan otot/daging 25 mg (diambil secara aseptis dari kaki renang) dengan menggunakan metode fenol-kloroform. Pada udang windu baik yang resisten maupun yang tidak resisten memiliki kemurnian dan konsentrasi DNA genom yang sangat tinggi. Selanjutnya diamplifikasi menggunakan primer spesifik yang didesain berdasarkan informasi dari Bank Gen dengan nomor akses AF077565. fragmen DNA target menunjukkan bahwa udang yang diamplifikasi berada pada posisi 317 bp untuk yang resisten penyakit sedangkan yang tidak resisten pada posisi 317 dan 60 bp. Fragmen posisi 60 bp lebih banyak ditemukan pada udang windu yang tidak resisten terhadap *V. harveyi*. Persentase marker mikrosatelit pada udang windu yang telah diuji tantang tertinggi pada udang windu yang hidup yaitu 86,36 % sedangkan persentase yang terendah pada udang yang mati yaitu 11,11%. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa marker mikrosatelit DNA dapat digunakan sebagai penanda ketahanan penyakit pada udang windu terhadap bakteri patogen khususnya bakteri *Vibrio harveyi*.

**KATA KUNCI :** Udang windu, *Vibrio harveyi*, penyakit, marker mikrosatelit

## ABSTRACT

**IKE IKARTI. L22108298. Detection of Microsatellite DNA from In Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Challenged With Bacteria *Vibrio harveyi*. Di bawah bimbingan Asmi Citra Malina dan Andi Parenrengi.**

The disease is one of the biggest obstacles encountered in shrimp aquaculture. In the seeding effort required prospective parent-free and resistant to disease. One method that can be used to obtain a healthy prospective parent of the disease is by using microsatellite markers of disease resistance. This study aimed to detect microsatellite DNA markers of disease resistance in shrimp-resistant and non-resistant to infection of bacteria *Vibrio harveyi*. Animal testing is used tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Samples were obtained from shrimp farms Installation Experiment Research Brackish Water Aquaculture in Takalar. Size of the test animals to be used uniformly cultivated, which is about 10-15 grams total of 40 birds. Furthermore shrimp injected with bacteria *V. harveyi* 106 CFU / mL of each as much as 0.1 mL / tail on the abdominal (intramuscular) segment into two using a syringe volume of 1 mL. Genomic DNA was isolated from muscle tissue / meat 25 mg (taken aseptically from foot pool) with the phenol-chloroform method. In both tiger shrimp resistant and non-resistant has a purity and DNA concentration of genomic is very high. Furthermore amplified using specific primers designed based on information from Gen Bank with accession number AF077565. target DNA fragments showed that the shrimp were amplified in a position 317 bp for resistant disease while that is not resistant the position of 317 and 60 bp. Position 60 bp fragments are more common in black tiger shrimp were not resistant to *V. harveyi*. Percentage of microsatellite markers in black tiger shrimp have tested the highest challenge in black tiger shrimp living is 86.36% while the lowest percentage of dead shrimp is at 11.11%. From the results obtained indicate that microsatellite DNA markers can be used as a marker of disease resistance in shrimp against pathogens especially bacteria *Vibrio harveyi*.

KEY WORDS: Tiger shrimp, *Vibrio harveyi*, disease, microsatellite marker

## RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Ike Ikarti. Penulis lahir di Bima (Nusa Tenggara Barat) pada Tanggal 17 Februari 1990. Anak pertama dari lima bersaudara pasangan Muhammad Ali dan St. Mariam. Bertempat tinggal di Bima. Penulis menamatkan Sekolah Dasar di SD Melayu 1 Bima pada tahun 2002. Kemudian menamatkan Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 1 Bima pada tahun 2005. Dan menamatkan Sekolah Menengah Atas di SMK Negeri 1 Bima pada tahun 2008. Pada tahun 2008, penulis diterima di Universitas Hasanuddin Makassar melalui jalur SNMPTN dan sejak itu telah terdaftar sebagai mahasiswi di Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Jurusan Perikanan, Program Studi Budidaya Perairan. Untuk menyelesaikan masa studinya penulis mengambil judul penelitian **Deteksi Marker Mikrosatelit DNA Pada Udang Windu (*Penaeus monodon*) yang Ditantang Dengan Bakteri *Vibrio harveyi*.**

## KATA PENGANTAR



Alhamdulillahirrabbalamin, segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan berkah dan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan kegiatan penelitian hingga penulisan skripsi ini dengan baik. Skripsi ini merupakan salah satu syarat memperoleh gelar kesarjanaan di Jurusan Perikanan Fakultas Ilmu Kelautan Dan Perikanan Universitas Hasanuddin Makassar.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis banyak melibatkan berbagai pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan penghargaan yang setinggi-tingginya dan ucapan terima kasih kepada :

1. Ibu Asmi Citra Malina, S.Pi., M.Agr., Ph.D selaku pembimbing utama yang telah memberikan saran, petunjuk dan bimbingan selama penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Dr. Ir. Andi Parenrengi, M.Sc selaku pembimbing anggota di Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau yang telah memberikan banyak bimbingan selama melakukan penelitian hingga penyusunan skripsi ini.
3. Bapak Dr. Ir. Gunarto Latama, M.Sc., Ibu Dr. Ir. Sriwulan. MP. dan Ibu Ir. Margaretha Bunga, MP selaku penguji yang telah banyak memberikan saran dan kritik dalam penyusunan skripsi ini.
4. Ibu Prof. Dr. Ir. A. Niartiningsih, MP. selaku Dekan Fakultas Ilmu Kelautan Dan Perikanan, Universitas Hasanuddin.
5. Bapak Prof. Dr. Ir. Nadjamuddin, M.Sc. selaku Pembantu Dekan I, Fakultas Ilmu Kelautan Dan Perikanan, Universitas Hasanuddin.

6. Ibu Dr. Ir. St. Aslamyah.,MP selaku Ketua Program Studi Budidaya Perairan, Universitas Hasanuddin.
7. Ayah, Ibu, dan Saudara (i) dan keluarga serta kak Har atas dukungan doa restu, dorongan, semangat, cinta, dan pengorbanan yang telah mereka berikan kepada penulis, peluk cium dari penulis selalu untuk mereka semua. Terima kasih.
8. Staf pegawai dan teknisi Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau (Kak Tenriulo, Kak Ana, Kak Mari, Kak Lia, Pak Samuel, ibu Emma dan Angie) atas saran dan arahan yang diberikan kepada Penulis selama pelaksanaan Penelitian.
9. Rekan-rekan seperjuangan Perikanan Angkatan 2008, khususnya BDP-08 terima kasih atas dukungan dan motivasinya serta semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu-persatu dan rekan penelitian Enty Karnila dan Musyarafah Mansyah, terima kasih atas kerja samanya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati dan harapan penulis menerima saran maupun kritik dari berbagai pihak agar Skripsi ini dapat bermanfaat dan dipergunakan sebagai tambahan pustaka serta menjadi sumber ide-ide bagi peneliti yang akan datang. Amin.

***Wabillahittaufig wal hidayah***

Makassar , 2012

Ike Ikarti

**DAFTAR ISI**

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
ABSTRAK .....	iii
RIWAYAT HIDUP .....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
I. PENDAHULUAN	
Latar belakang .....	1
Tujuan dan Kegunaan .....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
Karakteristik udang windu ( <i>P. monodon</i> ).....	4
Sistem pertahanan tubuh udang windu .....	8
Penyakit udang windu .....	9
Bakteri <i>V. harveyi</i> .....	11
Pengertian dan struktur DNA .....	13
<i>Polymerase chain reaction</i> (PCR) .....	16
Elektroforesis DNA .....	22
Marker mikrosatelit DNA .....	24
III. METODE PENELITIAN	
Waktu dan tempat .....	29
Alat dan bahan .....	29
Prosedur penelitian .....	29
Analisis data .....	34
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
Tingkah laku dan Mortalitas udang windu yang diuji tantang .....	35
Ekstraksi DNA genom .....	37
Analisis marker mikrosatelit DNA menggunakan PCR .....	41



V. KESIMPULAN DAN SARAN	
Kesimpulan .....	46
Saran .....	46
 DAFTAR PUSTAKA .....	 47

## DAFTAR TABEL

<b>No</b>	<b>Teks</b>	<b>Halaman</b>
1	Alat dan bahan yang digunakan selama penelitian .....	29
2	Kemurnian dan konsentrasi DNA udang windu yang tidak resisten setelah diuji tantang .....	38
3	Kemurnian dan konsentrasi DNA udang windu yang resisten setelah diuji tantang .....	39
4	Aplikasi marker mikrosatelit udang windu yang telah diuji tantang dengan bakteri <i>V. harveyi</i> .....	43

## DAFTAR GAMBAR

<i>No</i>	<i>Teks</i>	<i>Halaman</i>
1	Morfologi Udang Windu ( <i>P.monodon</i> ).....	4
2	Siklus Hidup Udang Windu ( <i>P.monodon</i> ).....	7
3	Ilustrasi Penanda DNA Mikrosatelit.....	25
4	Pendeteksian Daerah Mikrosatelit pada Genom .....	25
5	Hasil Visualisasi Data Mikrosatelit .....	26
6	Udang windu yang terinfeksi bakteri <i>V. harveyi</i> .....	36
7	Hasil elektroforesis genom DNA pada agarose 0,8 %.....	37
8	Hasil amplifikasi marker mikrosatelit DNA untuk identifikasi ketahanan penyakit dari udang windu yang diuji tantang dengan bakteri <i>V.harveyi</i> , di elektroforesis pada gel agarosa 4 %.....	41
9	Grafik persentase marka mikrosatelit udang windu yang diuji tantang dengan bakteri <i>V.harveyi</i> .....	44

## I. PENDAHULUAN

### Latar Belakang

Udang windu (*Penaeus monodon*) merupakan salah satu spesies krustasea lokal yang potensial secara ekonomi dan disukai di masyarakat karena rasa dagingnya yang lezat serta bernilai gizi tinggi. Budidaya udang windu telah berkembang di tambak-tambak air payau di Indonesia. Namun sejak tahun 1990-an, budidaya udang windu mengalami berbagai kasus kematian, baik akibat lingkungan perairan yang kurang mendukung maupun adanya serangan penyakit bakteri maupun virus. Kasus ini tidak hanya terjadi di Indonesia (Atmomarsono, 2004), tetapi juga terjadi di negara lain seperti India (Sathish dkk., 2004), Korea (Kim dkk., 2004), China (Zhan dkk., 2004), dan Amerika (Guevara dan Meyer, 2006).

Munculnya penyakit merupakan akibat adanya interaksi antara agen penyebab penyakit, inang dan lingkungan. Dalam hal ini, lingkungan dapat menjadi *stressor* (penyebab munculnya penyakit), karena pada saat lingkungan memburuk, seperti adanya fluktuasi kualitas air secara ekstrim, udang mudah stress dan akibatnya rentan terhadap penyakit, serta dapat mengakibatkan kematian atau penurunan sintasan (Tidwell dkk., 1998).

Penyakit yang sering menyerang udang baik di pembenihan maupun pembesaran adalah Vibriosis. Penyakit vibriosis dapat menyebabkan kerugian akibat kematian yang ditimbulkannya. Penyakit tersebut biasanya disebabkan oleh bakteri *Vibrio harveyi*. Penyakit yang diakibatkan *V. harveyi* bersifat sangat akut dan ganas karena dapat mematikan populasi larva udang yang terserang dalam waktu 1 sampai 3 hari (Rukyani, 1999).

Upaya penanggulangan penyakit dengan penggunaan obat-obatan dan antibiotik telah dilakukan, tetapi tidak efektif lagi, karena pada dosis tertentu justru berdampak negatif pada udang itu sendiri, bahkan dapat menimbulkan resistensi bagi virus dan bakteri. Penggunaan vaksin dan immunostimulan juga telah digunakan untuk merangsang peningkatan kekebalan non-spesifik pada udang windu (Atmomarsono, 2004). Selain itu, upaya pendekatan genetik melalui teknologi konvensional seperti seleksi, perbaikan teknik budidaya dan nutrisi juga telah banyak dilakukan.

Pendekatan yang memanfaatkan kemajuan bioteknologi dan teknik PCR dapat digunakan untuk mengembangkan suatu penanda spesifik. Metode PCR digunakan untuk mengamplifikasi daerah tertentu dari rantai DNA. Primer rantai pendek oligonukleotida yang didesain akan menghibridisasi masing-masing ujung dari daerah target pada rantai DNA dan kemudian memperpanjangnya pada sisi yang berlawanan dari DNA template. Cunningham (2002) menambahkan bahwa proses amplifikasi dari gen-gen mengkode sifat-sifat tertentu misalnya sifat ketahanan penyakit dapat dilakukan sehingga hasil yang didapatkan dapat dijadikan sebagai marker DNA.

Mikrosatelit merupakan salah satu marker paling banyak digunakan secara luas untuk pemetaan genetik, analisis keragaman genetik dan studi evolusi. Mikrosatelit telah banyak digunakan sebagai penanda genetik pada beberapa jenis udang penaeid termasuk *Penaeus vanamei* (Meehan *dkk.*, 2003), *Penaeus stylirostris* (Vonau *dkk.*, 1999) dan *Penaeus setiferus* (Ball *dkk.*, 1998). Mikrosatelit juga telah banyak dikembangkan dan digunakan untuk mempelajari keragaman genetik udang windu (Tassanakajon *dkk.*, 1998; Wuthisuthimethavee *dkk.*, 2003). Tiga penanda mikrosatelit polimorfik tinggi diidentifikasi dan ditandai untuk mempelajari struktur populasi dari udang di perairan sekitar Australia (Brooker *dkk.*, 2000).

Penelitian sebelumnya (Tenriulo *dkk.*, 2011) menunjukkan bahwa marker mikrosatelit dapat digunakan untuk mengidentifikasi udang windu resisten penyakit. Pada penelitian tersebut, sampel yang digunakan berasal dari beberapa populasi induk udang windu alam (Aceh, Timika dan Pangkep), hasil seleksi tumbuh cepat, dan hasil transfeksi. Karakterisasi marker mikrosatelit DNA ketahanan penyakit yang ditemukan tersebut telah dilakukan dimana seluruh DNA-nya memiliki kemiripan (99%) dengan seluruh mikrosatelit DNA pada udang windu tahan penyakit yang telah dilaporkan pada bank gen. Oleh karena itu, verifikasi marker mikrosatelit tersebut perlu dilakukan pada udang windu yang tahan terhadap penyakit khususnya penyakit vibriosis.

Sampai sejauh ini, belum ada penelitian yang dilakukan untuk mendeteksi marker mikrosatelit DNA resisten penyakit pada udang windu yang diuji tantang dengan bakteri. Oleh karena itu, deteksi penanda genetik mikrosatelit resisten penyakit pada udang windu yang diuji tantang dengan bakteri perlu dilakukan untuk memperoleh udang windu yang tahan terhadap penyakit, khususnya vibriosis.

### **Tujuan dan Kegunaan**

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi marker mikrosatelit DNA ketahanan penyakit pada udang windu yang resisten maupun tidak resisten yang telah diuji tantang dengan bakteri patogen *V. harveyi*

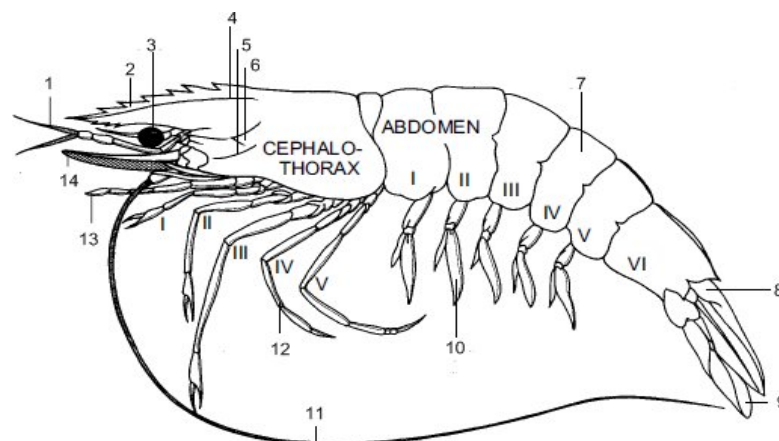
Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai bahan informasi untuk melakukan program pembenihan udang windu dalam rangka memperoleh udang yang tahan terhadap penyakit melalui seleksi.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### Karakteristik Udang Windu (*Penaeus monodon*)

#### Morfologi Udang Windu

Udang windu memiliki ciri-ciri antara lain; kulitnya tebal dan keras dengan warna bervariasi dari coklat muda sampai biru keabuan dengan garis-garis loreng hitam atau abu-abu tua pada abdomennya. Tubuhnya agak melengkung (bengkok). Udang windu mempunyai 2 bagian utama yaitu bagian kepala yang menyatu dengan dada yang disebut *cephalothorax* dalam bagian tubuh sampai ekor disebut *abdomen* (Tricahyo, 1995).



Gambar 1. Morfologi Udang Windu (*P. monodon*)

Keterangan Gambar: 1. Antenulla (sungut kecil); 2. Rostrum; 3. Mata; 4. Adostril carina; 5. Hepatic carina; 6. Hepatic spine; 7. Abdomen; 8. Ujung ekor; 9. Ekor kipas; 10. Kaki renang; 11. Antenna (sungut); 12. Kaki jalan; 13. Alat-alat pembantu rahang (maxilliped); 14. Antenna scale (Primavera, 1990) dalam Braak (2002).

Udang windu dapat mencapai ukuran paling besar diantara udang-udang lain dalam keluarga *penaeidea*. Ukuran yang terbesar yang dapat dicapai adalah panjang 33-34 cm dengan berat 270 gram per ekornya. Karena ukuran yang

besar ini, sering dijuluki sebagai udang harimau raksasa (*giant tiger prawn* atau *jumbo tiger prawn*).

Di dalam daging udang windu, mempunyai kandungan protein sebesar 18,1 %, lemak 0,8 %, air 8,2 %, senyawa nitrogen non protein sebesar 0,81 %, serta garam mineral 1,4 % yang terdiri dari Kalsium, Magnesium, Phospor, Zat besi, Natrium dan Kalium (Tricahyo, 1995.)

### **Klasifikasi Udang Windu**

Menurut Martosudarmo dan Ranoemiharjo (1998), secara taksonomi udang windu dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Filum	: Arthropoda
Klas	: Krustasea
Sub klas	: Malacostraca
Super Ordo	: Eucarida
Ordo	: Decapoda
Family	: Panaeidae
Sub Famili	: Peninae
Genus	: <i>Penaeus</i>
Spesies	: <i>Penaeus monodon</i>

### **Biologi Udang Windu**

Udang windu memiliki saluran pencernaan yang terbagi menjadi usus bagian depan (*foregut*), usus bagian tengah (*midgut*) dan usus bagian belakang (*hindgut*). Penyerapan nutrien dalam tubuh udang terjadi pada usus bagian tengah (*midgut*). Pada usus bagian tengah ini terdapat hepatopankreas yang berfungsi menghasilkan enzim pencernaan yang berfungsi untuk menghidrolisis nutrient makanan dan membantu pemecahannya (Millamena *dkk.*, 2002).



Udang windu memiliki sifat-sifat dan ciri khas yang membedakannya dengan udang-udang yang lain. Udang windu bersifat *Euryhaline*, yakni secara alami bisa hidup di perairan yang berkadar garam dengan rentang yang luas, yakni 5-45 ‰. Kadar garam ideal untuk pertumbuhan udang windu adalah 19-35 ‰. Sifat lain yang juga menguntungkan adalah ketahanannya terhadap perubahan suhu yang dikenal sebagai *eurythermal* (Suyanto dan Mujiman, 2004).

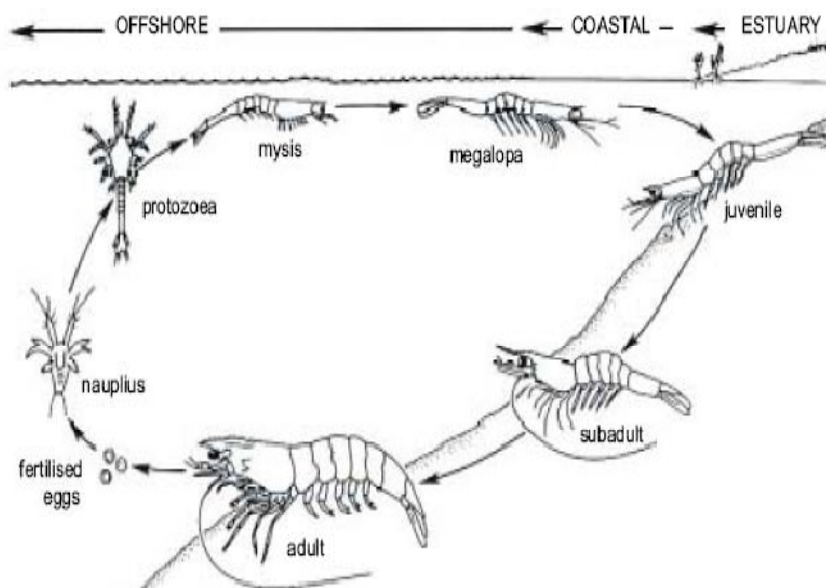
Udang merupakan organisme yang aktif mencari makan pada malam hari (*nocturnal*). Jenis makannya sangat bervariasi tergantung pada tingkatan umur udang. Pada stadia benih, makanan utamanya adalah plankton (fitoplankton dan zooplankton). Udang dewasa menyukai daging binatang lunak atau *mollusca* (kerang, tiram, siput), cacing, *annelida* yaitu cacing *Polychaeta*, dan *krustasea*. Dalam usaha budidaya, udang mendapatkan makanan alami yang tumbuh di tambak, yaitu klekap, lumut, plankton, dan benthos. Udang akan bersifat *kanibal* bila kekurangan makanan (Soetomo, 1990).

Pada siang hari, udang hanya membenamkan diri pada lumpur maupun menempelkan diri pada sesuatu benda yang terbenam dalam air (Soetomo, 1990). Apabila keadaan lingkungan tambak cukup baik, udang jarang sekali menampakkan diri pada siang hari. Apabila pada suatu tambak udang tampak aktif bergerak di waktu siang hari, hal tersebut merupakan tanda bahwa ada yang tidak sesuai. Ketidakesuaian ini disebabkan oleh jumlah makanan yang kurang, kadar garam meningkat, suhu meningkat, kadar oksigen menurun, ataupun karena timbulnya senyawa-senyawa beracun (Suyanto dan Mujiman, 2004).

### **Siklus Hidup Udang Windu**

Udang windu mengalami perubahan stadia dalam proses perkembangannya. Udang windu tumbuh menjadi dewasa dan memijah di tengah laut. Telur udang yang telah dihasilkan kemudian disimpan pada bagian

punggung dari *abdomen* betina. Bila telur tersebut telah matang dan siap untuk dibuahi maka dikeluarkan melalui saluran telur (*oviduct*) yang terdapat pada bagian pangkal dari pasangan kaki jalan ke tiga. pada saat telur dikeluarkan, secara bersamaan spermatofor dipecahkan oleh induk betina, sehingga terjadilah pembuahan. Telur yang telah dibuahi akan menetas dalam waktu 12-15 jam dan berkembang menjadi larva.



Gambar 2 . Siklus hidup udang windu (*Penaeus monodon*) (Motoh, 1984) dalam (Braak, 2002)

Proses perubahan stadia udang windu yaitu telur menetas dalam waktu 16 jam setelah pembuahan. Tahap larva terdiri dari *nauplius* (6 tahapan dalam 2 hari), *zoea* (3 tahap dalam 5 hari), *mysis* (3 tahap dalam 4-5 hari dan *postlarva* (6-35). Transisi dari *juvenile* ke udang muda membutuhkan 135-255 hari kemudian menyelesaikan kematangan seksual terjadi dalam 10 bulan (Motoh, 1984) dalam (Braak, 2002).

Udang muda (*juvenile*) bermigrasi ke daerah pantai setelah telur-telur menetas, larva hidup di laut lepas menjadi bagian dari zooplankton. Saat stadium *postlarva* mereka bergerak ke daerah dekat pantai dan perlahan-lahan turun ke

dasar di daerah estuari dangkal. Perairan dangkal ini memiliki kandungan nutrisi, salinitas dan suhu yang sangat bervariasi dibandingkan dengan laut lepas. Setelah beberapa bulan hidup di daerah *estuari*, udang dewasa kembali ke lingkungan laut dalam dimana kematangan sel kelamin, perkawinan dan pemijahan terjadi (Millamena *dkk*, 2002).

## **Sistem Pertahanan Tubuh Udang Windu**

### **Sistem Imun Udang Windu**

Imunitas atau kekebalan adalah sistem mekanisme pada organisme yang melindungi tubuh terhadap pengaruh biologis luar dengan mengidentifikasi dan membunuh patogen serta sel tumor (Anonim, 2012). Sistem ini mendeteksi berbagai macam pengaruh biologis luar yang luas, organisme akan melindungi tubuh dari infeksi, bakteri, virus sampai cacing parasit, serta menghancurkan zat-zat asing lain dan memusnahkan mereka dari sel dan jaringan organisme yang sehat agar tetap dapat berfungsi seperti biasa.

Antibodi (*immunoglobulin*) merupakan substansi khusus yang dibentuk oleh tubuh sebagai respon terhadap stimulasi antigen yang dihasilkan oleh sel plasma sebagai akibat interaksi antara limfosit B yang peka terhadap antigen khusus (Pelczar dan Chan, 1986). Selanjutnya Bellanti (1993) menyatakan bahwa respon kekebalan non spesifik merupakan pertahanan pertama inang dengan benda asing yang menimbulkan elemen fagositik ke darah tempat benda masuk. Hal ini dapat terjadi sebagai bagian dari respon inflamasi (peradangan)

Sistem pertahanan tubuh udang windu masih primitif dan tidak memiliki sel memori, tidak seperti vertebrata yang mempunyai antibodi spesifik. Sistem pertahanan tubuh pada invertebrata seperti udang tidak mempunyai immunoglobulin yang berperan dalam mekanisme kekebalan alami (*innate immunity*) (Mahasri, 2008). Sistem pertahanan tubuh udang windu tidak

mempunyai kemampuan mengingat antigen dan merupakan sistem kekebalan nonspesifik. Kinerja sistem pertahanan tubuh terpusat pada sistem proPO. Sistem pertahanan tubuh akan berfungsi bila distimulir oleh enzim tertentu. Bahan-bahan untuk mengaktifkan enzim tersebut didapatkan dari luar tubuh (Sakai, 1999).

Sistem pertahanan tubuh pada invertebrata (termasuk udang) yang berperan adalah mekanisme pertahanan tubuh oleh hemosit, di mana penyebaran dan peningkatan jumlah hemosit diasumsikan sebagai bentuk dari respon imun seluler pada tubuh udang (Braak, 2002).

Pada mekanisme pertahanan diri ini udang menghasilkan suatu metabolit yang berfungsi sebagai pemicu kekebalan tubuh dalam mekanisme pertahanan terhadap pengganggu. Pada udang, sistem pertahanan ini disebut proPO yang beraa di hemosit krustasea dan kebanyakan serangga dan terdiri dari beberapa proteinase serin dan prophenoloxidase yang mengaktifkan sistem dalam sel darah yang memicu reaksi kekebalan tubuh bawaan serta berpartisipasi dalam pertahanan inang pada arthropoda dari peningkatan fagositosis, inisiasi enkapsulasi, mediasi koagulasi dan produksi zat fungsistatik (Kilawati, 2010).

Udang windu seperti halnya krustasea lainnya hanya memiliki respon kekebalan non spesifik, sehingga diperlukan cara untuk menginduksi kekebalan udang terhadap kemungkinan serangan patogen. Beberapa substansi diketahui mampu meningkatkan respon kekebalan seperti Lipopolisakarida dan  $\beta$ -Glukan (Scombes, 1994).

### **Penyakit pada Udang Windu**

Budidaya udang windu dihadapkan pada berbagai kendala, salah satunya adalah berjangkitnya berbagai penyakit udang yang menyebabkan kegagalan panen, terutama serangan penyakit yang mematikan seperti : penyakit yang

disebabkan oleh virus atau (*WSSV* dan *MBV*) dan bakteri (*Vibrio sp*). Genus *Vibrio* merupakan agen penyebab penyakit vibriosis yang menyerang hewan laut seperti ikan, udang, dan kerang-kerangan. Spesies *Vibrio* yang berpendar umumnya menyerang larva udang dan penyakitnya disebut penyakit udang berpendar. Bakteri *Vibrio* menyerang larva udang secara sekunder yaitu pada saat dalam keadaan stres dan lemah, oleh karena itu sering dikatakan bahwa bakteri ini termasuk jenis *opportunistic* patogen. Berbagai upaya telah dilakukan untuk menanggulangi penyakit pada udang windu, antara lain dengan menggunakan obat-obatan kimia dan antibiotik. Penanggulangan penyakit dengan menggunakan obat-obatan kimia dan antibiotik dapat membawa dampak yang serius karena masalah residu bahan antimikroba pada udang dan timbulnya resistensi bakteri terhadap antibiotik (Muliani, *dkk.*, 2003).

Penyakit biasanya timbul beberapa hari setelah penebaran dan timbulnya penyakit ini diawali dengan adanya perubahan lingkungan yang mengakibatkan stres pada udang. Stres ini terjadi karena belum adanya penyesuaian dengan lingkungan yang baru. Pemilihan benur, pengangkutan, perubahan suhu, kurangnya oksigen terlarut, adanya gas dan senyawa beracun serta kurangnya makanan mengakibatkan timbulnya stres pada udang, akibatnya produksi antibodi berkurang sehingga imunitas atau kekebalan akan menurun.

Pencegahan dan perluasan penyakit pada udang perlu dilakukan usaha pencegahan secara dini, untuk itu diperlukan diagnosis dan penanganan penyakit yang tepat (Chang dan Wang, 1992). Upaya pengendalian yang dilakukan dengan pemakaian bahan-bahan kimia dapat menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan perairan dan menyebabkan resistensi patogen. Untuk menghindari hal tersebut, usaha meningkatkan ketahanan tubuh dengan imunostimulan yang ramah lingkungan merupakan pilihan yang tepat.

### **Bakteri *Vibrio harveyi***

### **Klasifikasi *Vibrio harveyi***

Dalam Bergey's Manual edisi ke-9 (Holt dan Krieg., 1984), klasifikasi bakteri *Vibrio harveyi* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Prokaryota
Divisi	: Bacteria
Ordo	: Eubacteriales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Spesie	: <i>Vibrio harveyi</i>

### **Karakteristik Biologi**

Bakteri *V. harveyi* termasuk genus *Vibrio*, memiliki ciri-ciri morfologi dan fisiologi sebagai berikut: bentuk koloni bulat, elevasi cembung, berwarna krem dengan diameter 2-3 mm pada media SWC-agar. Bakteri *V. harveyi* bersifat gram negatif, sel tunggal berbentuk batang pendek yang bengkok (koma) atau lurus, motil, oksidase positif, sensitif terhadap uji vibriostatik 0/129, tidak membentuk  $H_2S$ , tidak membentuk gas dari fermentasi terhadap D-glukosa, tumbuh pada media dengan penambahan 1-6 % NaCl, dan mempunyai flagella pada salah satu kutub selnya (Suwanto *dkk.*, 1998) *dalam* Tepu, 2006).

*V. harveyi* terlihat berpendar jika diamati di ruang gelap dan pendarannya dapat bertahan 2-3 hari pada media *Thiosulphate Citrate Bile-Salt Sucrose* (TCBS) (Lavilla-Pitogo *dkk.*, 1990). Kemampuan berpendar merupakan hasil aktivitas enzim *luciferase* yang dapat berfungsi sebagai katalisator dalam proses oksidasi reduksi. Proses oksidasi melibatkan flavin mononukleotida dan aldehid alifatik rantai panjang sebagai substratnya. Senyawa-senyawa tersebut masing-masing diubah menjadi flavin mononukleotida dan asam lemak disertai dengan pelepasan emisi cahaya dengan panjang gelombang sekitar 490 nm. Gen-gen

yang mengkodekan fungsi perpendaran ini disandikan dalam suatu operon yang disebut dengan operon *lux* (Meighen, 1991).

Menurut Lavilla-Pitogo *dkk* (1990), pada umumnya *V. harveyi* bersifat patogen oportunistik, yaitu organisme yang dalam keadaan normal ada di lingkungan pemeliharaan yang bersifat saprofitik dan berkembang menjadi patogenik apabila kondisi lingkungan dan inangnya memburuk. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu 30°C, salinitas antara 20-30 ppt dengan pH 7,0 dan bersifat anaerobik fakultatif, yaitu dapat hidup baik dengan atau tanpa adanya oksigen (Holt dan Krieg, 1984). Bakteri *V. harveyi* dapat diisolasi dari air, kotoran dan eksoskeleton induk udang, air penetasan pakan alami, artemia, serta usus udang sehat (Lavilla-Pitogo *dkk.*, 1990).

Penyakit vibriosis pada udang, baik dipembenihan maupun pembesaran, merupakan salah satu jenis penyakit yang sering menyebabkan kerugian akibat kematian yang ditimbulkannya. Penyakit vibriosis disebabkan oleh bakteri *V. harveyi*, dan serangannya dapat menyebar dalam waktu yang cepat.

### **Patogenitas *Vibrio harveyi***

*Vibrio* merupakan bakteri yang berbahaya dalam kegiatan budidaya perikanan laut dan payau, baik bagi jenis ikan maupun krustasea. Menurut Egidius (1987) *Vibrio* menyerang lebih dari 40 spesies ikan di 16 negara. Sedangkan menurut Lightner (1983) dari 17 spesies bakteri yang diisolasi dari *Penaeus setiferus* 42,3 % adalah *Vibrio* yang terdiri dari 57 strain. *Vibrio* merupakan penyebab utama penyakit udang menyala dan dapat berperan sebagai patogen primer ataupun patogen sekunder. Sebagai patogen primer, *vibrio* masuk melalui kontak langsung dengan organisme, sedangkan sebagai patogen sekunder, *Vibrio* menginfeksi organisme yang telah terlebih dahulu terinfeksi penyakit lain. Menurut Rheinheimer (1985) *Vibrio* menyerang dengan

merusak lapisan kutikula yang mengandung khitin dikarenakan *Vibrio* memiliki *chitinase*, *lipase*, dan *protease*. Penyakit udang menyala ini pada umumnya menyerang udang pada stadia *mysis* sampai awal *pasca larva* (Taslihan, 1988).

Penanganan yang paling umum dilakukan untuk mengatasi penyakit udang menyala akibat infeksi *V. harveyi* adalah dengan menggunakan bahan-bahan kimia seperti : *Chloramphenicol* 1,9 ppm, *Oxytetracycline* 2 ppm, *Furazalidon* 2-4 ppm, dan *Prefuran* 1,5-2,0 ppm (Rukyani, 1999). Akan tetapi sebagian besar obat-obatan yang digunakan tersebut pada akhirnya tidak efektif dan dapat mengakibatkan kelainan (*deformities*) pada larva udang (Lavilla-pitogo, 1990) serta dapat juga berakibat berkembangnya resistensi bakteri terhadap obat (Rukyani, 1999).

### **Pengertian dan Struktur DNA**

Materi genetik adalah bagian yang membawa informasi penentu sifat-sifat suatu organisme yang bertanggung jawab untuk memindahkan informasi genetik dari induk keturunannya. *Deoxyribonucleic acid* (DNA) adalah material genetik pada hampir semua organisme, kecuali pada beberapa bakteriofage, virus, dan beberapa tanaman, *Ribonucleic acid* (RNA) merupakan material genetiknya.

Asam deoksiribonukleat, lebih dikenal dengan DNA (bahasa Inggris: *deoxyribonucleic acid*), adalah sejenis asam nukleat yang tergolong biomolekul utama penyusun berat kering setiap organisme. DNA merupakan polimer yang terdiri dari tiga komponen utama, yaitu *gugus fosfat*, *gula deoksiribosa*, dan *basa nitrogen*. Sebuah unit monomer DNA yang terdiri dari ketiga komponen tersebut dinamakan nukleotida, sehingga DNA tergolong sebagai polinukleotida. Di dalam sel, DNA umumnya terletak di dalam inti sel. Secara garis besar, peran DNA di dalam sebuah sel adalah sebagai materi genetik; artinya, DNA menyimpan cetak biru bagi segala aktivitas sel. Ini berlaku umum bagi setiap organisme.



Sifat dari materi genetik yakni; 1) mempunyai kemampuan menyimpan informasi genetik dan memindahkan kepada sel sesuai yang diperlukan, 2) mempunyai kemampuan memindahkan informasinya ke sel anak dengan tingkat kesalahan yang minimum, 3) mempunyai stabilitas kimiawi dan fisika sehingga informasi tersebut tidak hilang, 4) mempunyai kemampuan untuk mengubah sifat genetik walaupun tidak kehilangan informasi dari induknya (Fujaya, 1999).

DNA dan RNA sebagai materi genetik merupakan asam nukleat yaitu suatu polimer yang mengandung nukleotida. Nukleotida yang menyusun DNA dan RNA hampir sama kecuali pada gugus pentose dan basa nitrogen yang menyusunnya. Gugus gula pada DNA adalah Deoksiribosa sedangkan RNA adalah Ribosa, sedangkan gugus basa khas pada DNA adalah Timin dan pada RNA adalah Urasil (Fujaya, 1999).

Bentuk alami DNA adalah helik ganda dari dua rantai antiparalel yang mempunyai sekuen nukleotida yang komplementer. Lokasi basa saling, berhadapan pada kedua rantai, Adenin hanya berpasangan dengan Timin, Guanin hanya dengan Sitosin, Sedangkan bentuk alami RNA adalah serat tunggal yang memiliki sekuen basa yang komplementer dengan DNA, namun basa Timin pada DNA diganti menjadi Urasil pada RNA (Fujaya, 1999).

DNA membawa informasi genetik dan bagian DNA yang membawa ciri khas yang diturunkan disebut gen. Perubahan yang terjadi pada gen akan menyebabkan terjadinya perubahan pada produk gen tersebut. Gen sering juga diartikan sebagai ruas DNA yang menghasilkan produk gen yang berupa enzim yang dikenal dengan teori satu gen satu enzim. Karena enzim dapat merupakan kombinasi polipeptida maka teori tersebut diubah menjadi satu gen satu polipeptida.

Dugaan DNA sebagai materi genetik secara tidak langsung sebenarnya dapat dibuktikan dari kenyataan bahwa hampir semua sel somatis pada spesies

tertentu mempunyai kandungan DNA yang selalu tetap, sedangkan kandungan RNA dan proteinnya berbeda-beda antara satu sel dan sel yang lain.

Isolasi DNA kromosom adalah memisahkan DNA kromosom atau DNA genom dari komponen-komponen sel lain. Sumber DNA bisa dari tanaman, kultur mikroorganise, atau sel manusia. Membran sel dilisis dengan menambahkan detergen untuk membebaskan isinya, kemudian pada ekstrak sel tersebut ditambahkan protease (yang berfungsi mendegradasi protein) dan RNase (yang berfungsi untuk mendegradasi RNA), yang tinggal adalah DNA. Selanjutnya ekstrak tersebut dipanaskan sampai suhu 90<sup>0</sup>C untuk menginaktifasi enzim yang mendegradasi DNA (*DNase*). Larutan DNA kemudian di presipitasi dengan etanol dan bisa dilarutkan lagi dengan air (Ratnasari, 2008).

Ekstraksi DNA dari organisme eukaryota (manusia, hewan dan tumbuhan) dilakukan melalui proses penghancuran dinding sel (*lysis of cell walls*), penghilangan protein dan RNA (*cell digestion*) dan pengendapan DNA (*precipitation of DNA*) dan pemanenan. Berbagai teknik ekstraksi DNA telah dikembangkan dari prinsip dasar tersebut, sehingga saat ini muncul berbagai teknik ekstraksi dan purifikasi DNA. Prinsip dasar ekstraksi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. Hasil ekstraksi tersebut merupakan tahapan penting untuk langkah berikutnya. Oleh sebab itu dalam pelaksanaannya harus dilakukan dengan baik dan bebas kontaminasi (Paradisa, 2010).

Secara kimiawi penghancuran sel dilakukan dengan memanfaatkan senyawa kimia seperti EDTA (*ethylenediamine tetraacetic*), dan SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*). EDTA berfungsi sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium (ion ini berfungsi untuk mempertahankan integritas sel maupun mempertahankan aktivitas enzim nukleas yang merusak asam nukleat). SDS merupakan sejenis deterjen yang berfungsi merusak membrane sel. Enzim

proteinase K dapat digunakan untuk menghancurkan protein. Kotoran akibat lisis sel dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Kemudian molekul nukleotida (DNA dan RNA) yang telah dipisahkan dibersihkan dari protein yang masih ada dengan menggunakan phenol. Dalam proses ini sebagian kecil RNA juga dapat dibersihkan. Sedangkan choloform digunakan untuk membersihkan sisa-sisa protein dan polisakarida dari larutan. Enzim RNAase digunakan untuk menghancurkan RNA sehingga DNA dapat diisolasi secara utuh. Pemurnian atau purifikasi DNA dapat dilakukan dengan mencampur larutan DNA tersebut dengan NaCl yang berfungsi memekatkan, memisahkan DNA dari larutan, dan mengendapkan DNA sewaktu dicampur dengan ethanol. Proses sentrifugasi dengan kecepatan tinggi akan mengendapkan tepung berwarna putih (DNA) dan menempel di dasar tabung ependorf (Albert, 1994).

### ***Polymerase Chain Reaction (PCR)***

PCR merupakan suatu teknik perbanyakan molekul DNA dengan ukuran tertentu secara enzimatik melalui mekanisme perubahan suhu. Pada prinsipnya, teknologi PCR terdiri atas 2 tahap reaksi berbeda dalam satu siklus, ketiga tahap tersebut adalah denaturasi, anneling, dan polimerisasi. Tahap denaturasi (pembelahan untai ganda menjadi untai tunggal) bertujuan untuk memutuskan ikatan hydrogen asam *deoksiribonukleat* (DNA) untai ganda yang akan diamplifikasi. Hasil yang diperoleh merupakan DNA cetakan untai tunggal untuk penempelan oligonukleotida primer dalam tahap anneling. Pada tahap anneling terbentuk ikatan H baru antara untai tunggal DNA cetakan dengan oligonukleotida primer. Tahap polimerisasi merupakan tahap pemanjangan rantai tunggal oligonukleotida primer dari ujung 3' ke ujung 5' dengan katalis enzim DNA polymerase. Fragmen pelacak ini dibuat secara *In vitro* menggunakan teknik PCR. Namun, teknik yang ditemukan oleh Kary Mullis tahun

(1987) ini, tidak hanya digunakan untuk membuat fragmen pelacak, tetapi secara umum teknik ini merupakan cara untuk menggandakan urutan basa nukleotida secara *in vitro* (Anonim, 2012).

### **Komponen dan Tahapan PCR**

Penggandaan urutan basa nukleotida berlangsung melalui reaksi polimerisasi yang dilakukan berulang-ulang secara berantai selama beberapa putaran (*siklus*). Tiap reaksi polimerisasi membutuhkan komponen-komponen sintesis DNA seperti untai DNA yang akan digunakan sebagai (*templat*), molekul oligonukleotida untai tunggal dengan ujung 3'-OH bebas yang berfungsi sebagai precursor (*primer*), sumber basa nukleotida berupa empat macam dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), dan enzim DNA polymerase. DNA templat adalah DNA untai ganda yang membawa urutan basa fragmen atau gen yang akan digandakan. Urutan basa ini disebut juga urutan target (*target sequence*). Penggandaan urutan target pada dasarnya merupakan akumulasi hasil polimerisasi molekul primer.

Primer adalah molekul oligonukleotida untai tunggal yang terdiri atas sekitar 30 basa. Polimerisasi primer dapat berlangsung karena adanya penambahan basa demi basa dari dNTP yang dikatalisasi oleh enzim DNA polimerase. Namun, pada PCR enzim DNA polimerase yang digunakan harus termostabil karena salah satu tahap reaksinya adalah denaturasi untai ganda DNA yang membutuhkan suhu sangat tinggi (sekitar 95<sup>0</sup>C). Salah satu enzim DNA polimerase yang umum digunakan adalah *Taq* DNA polimerase, yang berasal dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus* (Anonim, 2012)

Tiap putaran reaksi PCR terdiri atas tiga tahap, yaitu denaturasi templat, penempelan primer, dan polimerisasi primer, yang masing-masing berlangsung pada suhu lebih kurang 95<sup>0</sup> C, 50<sup>0</sup> C, dan 70<sup>0</sup> C. Pada tahap denaturasi,

pasangan untai DNA templat dipisahkan satu sama lain sehingga menjadi untai tunggal. Pada tahap selanjutnya, masing-masing untai tunggal akan ditempel oleh primer. Jadi, ada dua primer yang masing-masing menempel pada untai tunggal DNA templat. Biasanya, kedua primer tersebut dinamakan primer maju (*forward primer*) dan primer mundur (*reverse primer*). Setelah menempel pada untai DNA templat, primer mengalami polimerisasi mulai dari tempat penempelannya hingga ujung 5' DNA templat (*ingat polimerisasi DNA selalu berjalan dari ujung 5' ke 3' atau berarti dari ujung 3' ke 5' untai templatnya*). Dengan demikian, pada akhir putaran reaksi pertama akan diperoleh dua pasang untai DNA jika DNA templat awalnya berupa sepasang untai DNA.

### **Prinsip Dasar PCR**

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu metode untuk mengidentifikasi penyakit infeksi. Metode ini dikembangkan untuk mengatasi kelemahan metode diagnosis konvensional seperti imunologi dan mikrobiologi. Teknik PCR didasarkan pada amplifikasi fragmen DNA spesifik di mana terjadi penggandaan jumlah molekul DNA pada setiap siklusnya secara eksponensial dalam waktu yang relatif singkat. Proses ini dapat dikelompokkan dalam tiga tahap berurutan yaitu *denaturasi templat*, *annealing* (penempelan) pasangan primer pada untai DNA target dan *extension* (pemanjangan atau polimerisasi), sehingga diperoleh amplifikasi DNA antara 10<sup>8</sup> – 10<sup>9</sup> kali (Retnoningrum, 1997).

### **Proses dalam PCR**

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) terdiri dari tiga proses, yaitu:

#### **1. Denaturasi**

Newton and Graham (1997) *dalam* Rohmy (2001), menyatakan bahwa denaturasi merupakan proses memisahkan DNA menjadi utas tunggal. Tahap denaturasi DNA biasanya dilakukan pada kisaran suhu 92–95 °C. *Denaturasi* awal dilakukan selama 1 – 3 menit diperlukan untuk meyakinkan bahwa DNA telah terdenaturasi menjadi untai tunggal. *Denaturasi* yang tidak berlangsung secara sempurna dapat menyebabkan utas DNA terputus. Tahap *denaturasi* yang terlalu lama dapat mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim polimerase (Lisdiyanti, 1997 *dalam* Rohmy 2001).

## **2. Annealing**

Merupakan proses penempelan primer. Tahap *annealing* primer merupakan tahap terpenting dalam PCR, karena jika ada sedikit saja kesalahan pada tahap ini maka akan mempengaruhi kemurnian dan hasil akhir produk DNA yang diinginkan. Faktor yang mempengaruhi tahap ini antara lain suhu *annealing* dan primer. Suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat mengakibatkan timbulnya pita elektroforesis yang tidak spesifik, sedangkan suhu yang tinggi dapat meningkatkan kespesifikan amplifikasi (Saiki *et al.*, 1988 *dalam* Rohmy, 2001). Kenaikan suhu setelah tahap *annealing* hingga mencapai 70–74 °C bertujuan untuk mengaktifkan enzim TaqDNA polimerase. Proses pemanjangan primer (tahap *extension*) biasanya dilakukan pada suhu 72 °C, yaitu suhu optimal untuk TaqDNA polimerase. Selain itu, pada masa peralihan suhu dari suhu *annealing* ke suhu *extension* sampai 70 °C juga menyebabkan terputusnya ikatan-ikatan tidak spesifik antara DNA cetakan dengan primer karena ikatan ini bersifat lemah. Selain suhu, semakin lama waktu *extension* maka jumlah DNA yang tidak spesifik semakin banyak (Saiki *et al.*, 1988 *dalam* Rohmy, 2001).

## **3. Extension**

Merupakan proses pemanjangan DNA. Dalam tahap *extension* atau sintesis DNA, enzim polimerase bergabung bersama dengan nukleotida dan

pemanjangan primer lengkap untuk sintesis sebuah DNA utas ganda. Reaksi ini akan berubah dari satu siklus ke siklus selanjutnya mengikuti perubahan konsentrasi DNA. Hasil sintesa DNA dalam satu siklus dapat berperan sebagai cetakan (*template*) pada siklus berikutnya sehingga jumlah DNA target menjadi berlipat dua pada setiap akhir siklus. Dengan kata lain DNA target meningkat secara eksponensial, sehingga setelah 30 siklus akan menjadi milyaran amplifikasi DNA target. Selanjutnya, DNA virus yang telah berlipat ganda jumlahnya dapat dideteksi dengan elektroforesis sel agarosa. Setelah diwarnai dengan *Ethidium Bromida* (ETBr), hasil elektroforesis yang berupa band RNA dapat dilihat dengan *UV transluminator* dan diabadikan dengan kamera polaroid (Sunarto *dkk.*, 2004).

Uji PCR untuk mendeteksi keberadaan virus dilakukan di laboratorium dengan pengambilan sampel udang Vanamei dari tambak budidaya. Sampel udang Vanamei yang diambil tersebut selanjutnya dilakukan pemotongan bagian insang, kaki renang (*pleopoda*), atau cairan hemolim. Sampel yang akan diuji PCR sebaiknya dalam kondisi segar, tetapi bila tidak memungkinkan, sampel dapat disimpan dalam larutan alkohol 95% dengan perbandingan 1 : 9 (1 bagian sampel dengan 9 bagian alkohol 95%). Hal ini bertujuan untuk mencegah terjadinya kerusakan DNA/RNA (Haliman dan Adijaya, 2005).

Menurut Haliman dan Adijaya (2005), secara umum uji PCR di laboratorium dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

- a. DNA dari sel-sel sampel diekstraksi dengan larutan lysis buffer (IQ2000TM). Lysis buffer (IQ2000TM) juga berfungsi untuk mengamankan hasil ekstraksi dari kerusakan akibat kerja enzim dNase. Hasil ekstraksi DNA disentrifus hingga diperoleh butiran atau pelet DNA. Sementara untuk mengekstraksi RNA digunakan RNA *extraction solution* (IQ2000TM). RNA *extraction*

*solution* (IQ2000TM) juga berfungsi mengamankan RNA dari kerusakan akibat kerja enzim RNase.

- b. Hasil ekstraksi DNA pada tahap pertama digandakan dengan bantuan enzim-enzim yang dikenal sebagai primer. Satu jenis primer bertanggung jawab atas penggandaan satu jenis DNA tertentu sehingga primer satu jenis virus hanya dapat digunakan untuk deteksi virus tersebut saja. Proses penggandaan ini dikenal sebagai proses amplifikasi. Proses tersebut dilakukan pada kondisi suhu dan siklus penggandaan tertentu, yang dapat diatur pada mesin PCR (*thermocycle*). Proses ini disebut dengan reaksi rantai polimerase (*polymerase chain reaction, PCR*) karena merupakan siklus penggandaan yang berulang sehingga kegiatan ini seolah-olah merupakan suatu proses reaksi berantai.

### **Aplikasi PCR dalam Bidang Perikanan**

PCR singkatan dari *Polymerase Chain Reaction* yang merupakan suatu teknik atau uji positif terhadap adanya virus atau bakteri melalui reaksi berantai suatu primer dari sequence DNA dengan bantuan enzim polymerase, sehingga terjadi amplifikasi DNA target secara *invitro*. Teknik PCR ditemukan oleh Dr.Kary Mullis pada tahun 1985 dan mendapatkan hadiah nobel atas temuannya pada tahun 1993. Sistem kerja mesin PCR dimaksudkan untuk memperjelas bagian dari DNA mikroorganisme patogen sehingga dapat mendiagnosa penyebab penyakit secara akurat sedini mungkin (Anonim, 2012).

Pengujian PCR mempunyai keunggulan dalam mendeteksi penyakit yang disebabkan oleh virus, bakteri atau parasit sebanyak satu organisme. Keunggulan yang paling utama adalah hasilnya bisa langsung dilihat pada hari itu juga. Untuk menjalankan tes ini penggunaan asam nukleus (DNA/RNA) sebagai simbol sangatlah kecil.



PCR mempunyai keunggulan dibandingkan dengan tes-tes lain seperti tes serological (*ELISA*, *CF*, *IFT* dll) karena pada tes *serological* bisa terjadi reaksi silang, kurang sensitive dan berbasis pada antibodi. Padahal antibodi dapat diseleksi dalam darah mulai hari ke lima setelah terjadi infeksi, sedangkan dengan PCR dapat digunakan mulai hari pertama terjadinya infeksi. Metode konvensional seperti kultur biakan atau identifikasi dengan menggunakan mikroskop atau reaksi biokimia merupakan metode yang cukup sulit dan memerlukan waktu yang lama. Dengan menggunakan PCR maka dapat mendeteksi infeksi tahap yang paling dini/awal. Sehingga bisa sesegera mungkin diambil tindakan pencegahan agar penyakit tidak semakin parah dan kerugian bisa ditekan seminim mungkin.

Dengan metode ini dapat diketahui tingkat serangan penyakit apakah masih dalam tahap ringan, sedang sampai penyakit sudah parah dari sampel ikan/udang yang dengan cara memipitkannya dengan plasmid standar yang ada. Semua bagian tubuh udang/ikan dapat dipergunakan sebagai sampel dalam uji PCR kecuali bagian yang keras (cangkang/rostrum) serta hepatopankreas karena disini merupakan organ yang kaya akan enzim sehingga dapat merusak DNA bakteri pada saat proses ekstraksi. Cukup dengan sedikit sampel oleh karenanya tingkat keberhasilan maupun kegagalan suatu terapi dapat diperkirakan hasilnya (Anonim, 2012).

### **Elektroforesis DNA**

Elektroforesis DNA merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Gel yang biasa digunakan antara lain gel agarosa. Elektroforesis gel agarosa dapat dilakukan untuk memisahkan sampel DNA dengan ukuran dari beberapa ratus hingga 20.000 pasang basa (bp). Prinsip dasar teknik elektroforesis ini adalah

DNA, RNA, atau protein dapat dipisahkan oleh medan listrik. Elektroforesis gel biasanya dilakukan untuk tujuan analisis, namun dapat pula digunakan sebagai teknik preparative (Standfield, 1996).

Menurut Pratiwi (2001), elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang Bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Klug and Cummings (1994) menambahkan bahwa elektroforesis adalah suatu teknik yang mengukur laju perpindahan atau pergerakan partikel-partikel bermuatan dalam suatu medan listrik. Prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (*anion*), dalam hal tersebut DNA, yang Bergerak menuju kutub positif (*anode*), sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (*kation*) akan Bergerak menuju kutub negatif (*anode*).

Menurut Rachmaniar (1998), agarosa merupakan polimer dari 3,6-Anhidro- L-galaktosa dengan b-d-galaktosa, yang memiliki komponen netral atau tidak bermuatan. Agarosa merupakan polisakarida yang diekstrak dari rumput laut, rumput laut yang digunakan yaitu *Euchema spinosum* atau bisa juga dari jenis golongan *Phaeophycophyta*. Agarosa akan membentuk gel padat jika dilarutkan dengan pemanasan pada konsentrasi antara 0,5% dan 2%. Agarosa yang digunakan untuk elektroforesis lebih murni bila dibandingkan dengan agar yang digunakan untuk kultur bakteri. Agarosa akan membentuk pori yang besar sesuai dengan konsentrasi agarosa. Sambrook dan Russel (2001), menambahkan bahwa gel ini mengandung larutan buffer *Tris Asetat EDTA (TAE)* yang dapat memberikan resolusi terbaik untuk DNA. Gel agarosa mempunyai laju pemisahan lebih cepat, dapat memisahkan fragmen DNA antara 100 bp–50 kb tergantung dari konsentrasi gel agarosa yang digunakan, medan gerak biasanya horizontal.

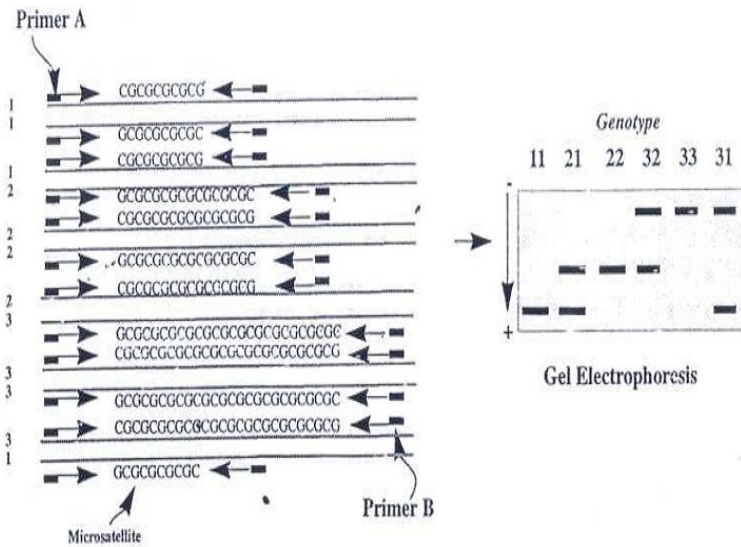
## Marker Mikrosatelit DNA

*Mikrosatelit* yaitu sekuen DNA berulang dengan ukuran ulangan 1-6 bp, jumlah ulangan dari mikrosatelit biasanya kurang dari 100 bp (Liu, 1998). Menurut Archana & Jawali (2006) mikrosatelit merupakan sekuen DNA dengan panjang pengulangan beberapa basa nukleotida. Penanda genetik mikrosatelit merupakan metode yang sangat efektif untuk DNA *fingerprinting* pada mamalia dan mikroorganisme eukariotik seperti fungi patogen, metode ini bersifat *discriminate*, *reproducible*, mudah dilakukan dan hasilnya tetap stabil pada setiap generasi (Foulet *dkk.*, 2005).

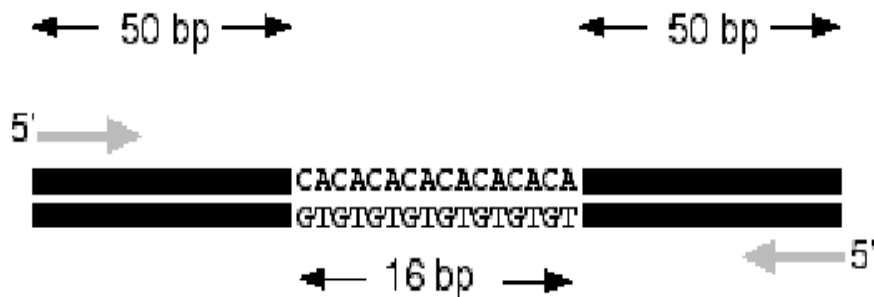
Menurut Sartika *dkk.*, (2004) penanda mikrosatelit mempunyai derajat polimorfisme yang tinggi, profil pola pita yang tampak dapat diinterpretasikan dengan mudah sebagai alel dalam suatu lokus, kodominan alel dan sangat akurat karena ukuran alelnya dapat dibedakan sampai satu pasang basa (1 bp). Tingginya tingkat polimorfik dari penanda ini merupakan ciri penting sehingga dapat digunakan untuk mengetahui individu antar dan dalam populasi (Jayme *dkk.*, 2008). Mikrosatelit memiliki tingkat variasi yang tinggi pada spesies hewan dan tumbuhan (Liu, 1998).

Variasi dalam mikrosatelit terletak pada perbedaan jumlah pengulangan sekuen DNA. Variasi dapat dideteksi dengan PCR yang selanjutnya divisualisasikan menggunakan gel. Mikrosatelit memiliki motif pengulangan dinukleotida seperti (CA)<sub>n</sub>:(GT)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>:(CT)<sub>n</sub>, (CG)<sub>n</sub>:(CG)<sub>n</sub> dan (AT)<sub>n</sub>:(TA)<sub>n</sub> dengan n adalah jumlah pengulangan (Liu, 1998). Spesies yang berbeda pada hewan dan tumbuhan memiliki penyebaran variasi mikrosatelit yang berbeda dalam genom setiap spesiesnya (Liu, 1998). Terdapat dua cara untuk mendapatkan lokus mikrosatelit yaitu dengan cara *hibridisasi* dan *sekuensing* (Liu, 1998), dari hasil sekuens dapat dirancang primer mikrosatelit yang akan

digunakan untuk mendeteksi lokus mikrosatelit pada genom. Pada Gambar 3 menunjukkan variasi mikrosatelit dapat dideteksi menggunakan primer pada proses PCR. Gambar 4 menunjukkan dua primer yang didesain untuk mendeteksi daerah mikrosatelit motif (CA).

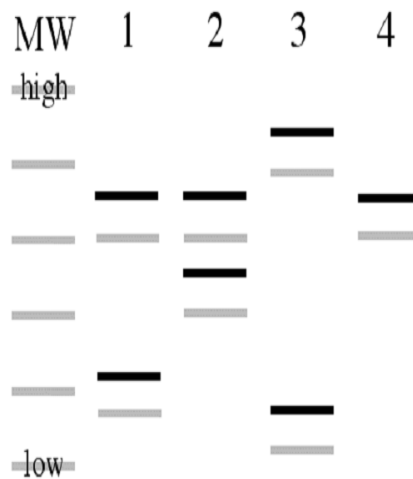


**Gambar 3. Ilustrasi Penanda DNA mikrosatelit**



**Gambar 4. Pendeteksian Daerah Mikrosatelit pada genom. Dua primer (*forward* dan *reverse* yang ditunjukkan oleh tanda panah warna abu-abu) didesain untuk mengapit daerah mikrosatelit. (Sumber: Davidson, 2001)**

Ilustrasi variasi mikrosatelit yang mempunyai jumlah sekuen yang berbeda dapat menghasilkan pola pita berbeda pula, dengan menggunakan PCR yang divisualisasikan pada sebuah gel. hasil visualisasi pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil Visualisasi Data Mikrosatelit, empat set data yang dihasilkan oleh elektroforesis gel dapat terlihat pita mayor; besar (warna hitam) dan pita minor (warna abu-abu). MW: standar berat molekul (Sumber : Davidson, 2001)

Penggunaan penanda mikrosatelit saat ini banyak digunakan untuk penelitian dalam menganalisis variasi genetik, pemetaan, perbedaan genotip pada tumbuhan maupun hewan. Beberapa penelitian tersebut antara lain penelitian yang dilakukan oleh Rashed *dkk.*, (2009) mengenai penggunaan penanda genetik pada tiga famili dari *Oreochromis niloticus* untuk memperkirakan tingkat pertumbuhan yang tinggi. Pada penelitian ini digunakan tujuh primer *SSR* dan 11 primer *RAPD* yang diperoleh hasil *SSR* maupun *RAPD* keduanya dapat membedakan variasi genetik pada tiga famili *O.niloticus*. Hasil yang diperoleh pada masing-masing penanda genetik *RAPD* dan Mikrosatelit dianalisis menggunakan diploid data, dominan (*RAPD*) dan ko-dominan (Mikrosatelit) dengan menggunakan program standar *POPGENE* (version 1.32) untuk analisis populasi genetik. Penggunaan penanda genetik pada penelitian ini memiliki peran penting dalam mempertahankan dan memantau kegiatan pembudidayaan yang dilakukan pada masa yang akan datang.

Ada beberapa permasalahan dalam penggunaan penanda mikrosatelit yaitu, pemilihan primer untuk mikrosatelit, banyak jenis primer yang telah

didesain untuk analisis mikrosatelit. Primer-primer itu perlu diskriminasi dan dioptimasi sebelum diaplikasikan pada jenis tanaman tertentu, karena setiap tanaman mempunyai karakteristik spesifik yang berbeda satu sama lain, ukuran produk amplifikasi berbeda dari ukuran produk sebenarnya. Ketidakakuratan dalam identifikasi alel mungkin juga disebabkan oleh *Taq* polimerase yang menambah nukleotida adenosin sampai ujung 3' produk amplifikasi (Herliana, 2009).

### **Aplikasi Penanda Mikrosatelit untuk Perikanan dan Pembudidayaan Ikan**

Berbagai penanda molekuler, protein atau DNA (mitokondria DNA atau DNA inti seperti minisatelit, mikrosatelit, *transcribed sequences*, *anonymous cDNA* atau *RAPD*) dapat digunakan untuk pembudidayaan perikanan. Kombinasi antara penanda molekuler dengan perkembangan statistik dapat digunakan untuk menjelaskan perbedaan dan persamaan antara indukan (*stock*) dan individu, dalam populasi asalnya pada setiap individu ikan. Hal ini merupakan penemuan yang baru dan dapat diaplikasikan untuk perikanan dan pengolahan pembudidayaan ikan (Okumus *dkk.*, 2003). Penelitian tentang sifat yang tampak yang diatur oleh faktor genetik adalah penting dalam perkembangan strategi seleksi persilangan untuk meningkatkan kualitas dari hasil pembudidayaan untuk masa yang akan datang (Dahle *dkk.*, 2006).

Penanda genetik yang didasarkan pada DNA sering digunakan dalam aplikasi budidaya perikanan seperti, *Tandemly repeated DNA (mini- and micro-satellites)*, *RAPD*, dan *AFLPs* (Magoulas, 1998). Pada tahun 1996, industri ikan Canadian halibut masih dalam masa pertumbuhan, memerlukan waktu yang relatif lama (5-7 tahun) untuk kematangan seksual ikan tersebut merupakan faktor kunci dalam realisasi pengembangan program untuk pemilihan indukan.

Permasalahan lainnya terletak pada biaya pakan, dan persilangan antara famili (Reith *dkk.*, 2004).

Penanda mikrosatelit merupakan penanda yang ideal untuk berbagai aplikasi pada bidang pembudidayaan perikanan. Penanda ini dapat secara optimal memetakan gen, dan bertanggung jawab pada kondisi faktor tunggal (contoh: distropi otot) atau untuk kondisi multifaktor (*Quantitative Traits Loci, QTL*) (Magoulas, 1998).