

3. METODE PENELITIAN

3.1. Materi Penelitian

Materi utama dalam penelitian ini adalah udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) ukuran PL 30. Perlakuan salinitas berbeda yaitu 5 ppt, 15 ppt dan 25 ppt sebagai media hidup udang untuk mengetahui perbedaan salinitas terhadap morfologi udang vaname yang terinfeksi WSSV. Virus WSSV yang didapatkan dari laboratorium *MANDIRI* kave delegan Gresik. Prosedur pembuatan inokulum virus dibuat mengikuti metode Hameed *et al.*, (1998). Pertama sebanyak 1 gram udang digerus dengan mortar sampai halus. Kemudian disuspensikan dalam 9 ml air laut steril. Selanjutnya suspensi organ disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C dan kecepatan 8000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C. Cairan supernatan yang dihasilkan disaring dengan menggunakan kertas filter 0,45 µm dan didapatkan suspensi virus dengan konsentrasi 10 % (w/v) yang setara dengan konsentrasi 20 mg/ml protein virus kemudian virus diencerkan menjadi 20 µg/ml. Selain itu dilakukan pula pengukuran parameter kualitas air agar tetap stabil sebagai parameter penunjang yang mendukung kehidupan udang. Parameter tersebut meliputi suhu, pH, dan oksigen terlarut dan salinitas.

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

Adapun alat dan bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3. Metode Pengumpulan Data Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen atau percobaan. Menurut Hanafiah (2010), percobaan adalah suatu rangkaian tindakan coba-coba *trial* yang dirancang untuk menguji *validity* dari hipotesis yang diajukan.

Percobaan untuk melihat hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Tujuannya adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen. Penelitian dapat dilakukan tanpa atau dengan kelompok pembanding. Metode eksperimen dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah pengaruh perbedaan salinitas terhadap morfologi udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang telah terinfeksi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV).

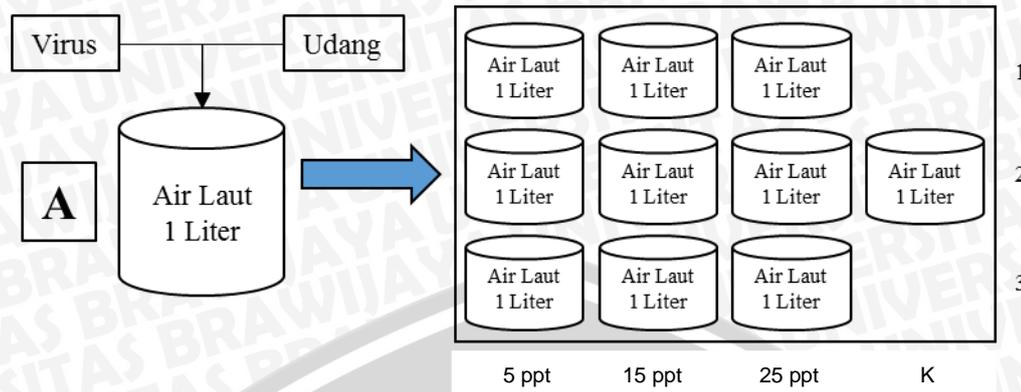
3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi dua tahap yakni pengamatan udang vaname secara morfologi dan analisis PCR. Dan sebagai penunjang penelitian dilakukan pengukuran kualitas air secara rutin meliputi suhu, pH, DO dan salinitas untuk menjaga kondisi perairan tetap stabil.

3.4.1 Pengamatan Morfologi Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*)

Pengamatan morfologi yang dilakukan antara lain respon makan, cara berenang, warna kemerahan pada tubuh (perubahan warna tubuh), bintik putih pada *karapaks* (Wang *et al.*, 1997)

Pelaksanaan pengamatan udang vannamei secara morfologi, meliputi beberapa kegiatan seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Proses Pengamatan Morfologi Udang Vannamei

- 1) Memasukkan udang vaname sebanyak 210 ekor kedalam bak utama (salinitas optimal 24 ppt) dan diberi virus WSSV dengan dosis 20 $\mu\text{g/ml}$
- 2) Merendam udang selama 3jam
- 3) Memasukkan udang vaname sebanyak 21 ekor lainnya ke dalam bak kontrol dengan salinitas optimal (24 ppt) tanpa pemberian dosis virus WSSV
- 4) Merendam selama 3 jam, lalu udang dari bak utama diambil sebanyak 63 ekor kemudian tiap 21 ekor dipindahkan ke bak perlakuan pertama yang masing-masing bak perlakuan dengan 3 kali ulangan berisi 1 liter air laut pada salinitas 5 ppt.
- 5) Mengambil udang dari bak utama sebanyak 63 ekor kemudian tiap 21 ekor dipindahkan ke bak perlakuan kedua yang masing-masing bak perlakuan dengan 3 kali ulangan berisi 1 liter air laut pada salinitas 15 ppt.
- 6) Mengambil udang dari bak utama sebanyak 63 ekor kemudian tiap 21 ekor dipindahkan ke bak perlakuan ketiga yang masing-masing bak perlakuan dengan 3 kali ulangan berisi 1 liter air laut pada salinitas 25 ppt.
- 7) Mengukur salinitas, suhu, DO, pH setiap hari untuk menjaga agar kualitas air tetap stabil, yang dilakukan sebanyak 3 kali pada pukul 09.00, 14.00, dan 19.00 WIB selama 7 hari

8) Mengamati secara morfologi dengan cara skoring, pemberian kode skoring dalam penelitian ini berdasarkan tingkat infeksi terhadap morfologi udang vaname, yaitu untuk infeksi ringan diberi skor 1 (+), infeksi sedang skor 2 (++), dan infeksi berat diberi skor 3 (+++). Penjelasan tentang kategori kode dapat dilihat pada uraian dibawah ini yaitu :

- a). Skor 1 (+) = infeksi ringan yang terjadi pada morfologi udang vanamei dicirikan belum adanya perubahan morfologi yang nampak selain perubahan tingkah laku yang tidak normal pada udang serta perubahan warna pada tubuh udang vanamei. Menurut Sudha et al (1981) dalam Yanto (2006), menyebutkan bahwa bila udang yang terserang WSSV tetapi belum terdapat tanda bintik putih, dikategorikan infeksi ringan (kronis) dimana infeksi yang dialami oleh jaringan rendah sehingga bintik putih dan kemerahan pada udang tidak tampak.
- b) Skor 2 (++) = infeksi sedang yang terjadi yaitu perubahan warna pada bagian tubuh dan ekor menjadi merah muda serta timbulnya bintik putih antara 1-3 buah pada karapas dan ekor gerimpis. Menurut Wang et al (1993) dalam Yanto (2006), pada kasus WSSV adanya bintik atau spot putih pada bagian karapas sudah menjadi tanda umum, dan Mahardika et al (2004) dalam Yanto (2006), menjelaskan pada induk udang warnanya menjadi merah muda.
- c) Skor 3 (+++) = infeksi bersifat berat yang dicirikan bintik putih sudah menyebar ke bagian tubuh udang serta adanya perubahan warna menjadi kemerahan pada ekor dan tubuh udang, selain itu ekor gerimpis, antenna patah dan mata rusak. Ditjen Perikanan Budidaya (2006), menjelaskan infeksi berat (akut), udang mengalami perubahan warna tubuh kemerahan yang lebih tegas warna merah dapat dilihat pada ekor

serta Departemen Kelautan dan Perikanan (2003), bila sudah parah bercak putih menyebar sampai ke seluruh bagian tubuh.

3.4.2 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Metode PCR bertujuan untuk memperkuat data yang telah dihasilkan pengamatan secara morfologi, prosedur PCR meliputi :

a. Sterilisasi alat

Prosedur untuk melakukan sterilisasi alat menurut Fatchiyah *et al.* (2006) adalah sebagai berikut:

Mempersiapkan seluruh peralatan yang akan disterilisasi.

- 1) Mencuci semua peralatan yang akan disterilisasi dengan desinfektan.
- 2) Membungkus semua peralatan dengan menggunakan aluminium foil untuk mengurangi penguapan dan terjaga kebersihannya.
- 3) Meletakkan peralatan yang akan disterilisasi ke dalam keranjang.
- 4) Mengisi *autoclave* dengan aquades hingga batas "filament" pemanas.
- 5) Memasukkan keranjang ke dalam *autoclave*.
- 6) Menutup *autoclave* secara rapat dengan memutar "monoskrup" yang terdapat di atas tutup *autoclave*.
- 7) Menekan tombol *ON* di bagian kiri badan *autoclave*.
- 8) Memutar tombol *EXHAUNT* hingga batas maksimal.
- 9) Mengeset suhu pada layar *autoclave* dengan suhu 121 °C / 1 atm.
- 10) Menunggu *autoclave* hingga proses sterilisasi dan layar menunjukkan fase *COMPLETE* selama ± 2 jam.
- 11) Setelah *autoclave* menunjuk ke arah *COMPLETE*, selanjutnya diputar tombol *EXHAUNT* hingga ke batas minimum.
- 12) Mematikan *autoclave* dengan menekan tombol *OFF*.
- 13) Membuka *monoskrup* pada tutup *autoclave*.

- 14) Menggeser tutup *autoclave*, kemudian diambil keranjang peralatan.
- 15) Mengeluarkan peralatan dari dalam keranjang lalu menyimpannya di dalam kotak plastik dan tutup agar tetap terjaga kebersihannya.

b. Persiapan sampel udang

Prosedur untuk melakukan persiapan sampel udang menurut Fatchiyah *et al.*, (2011) adalah sebagai berikut:

- 1) Mempersiapkan udang yang akan diekstrak DNANYa.
- 2) Memotong bagian kaki renang dan bagian karapasnya dengan gunting dan pinset yang telah disterilisasi dengan alkohol 70 %.
- 3) Mengeringkan sampel dengan menggunakan tisu.
- 4) Mempersiapkan *aluminium foil* dan timbangan digital.
- 5) Mengeset satuan pada timbangan digital menjadi satuan berat gram (g).
- 6) Memasukkan *aluminium foil* ke dalam timbangan digital, kemudian ditutup seluruh bagian kaca timbangan digital tersebut.
- 7) Mengubah berat pada layar timbangan dengan menekan tombol "TARE".
- 8) Menunggu hingga timbangan menunjukkan angka "0.0000"
- 9) Memasukkan kaki atau karapas udang sebanyak 25 mg = 0,025 g.
- 10) Memasukkan organ yang akan ditimbang ke dalam *aluminium foil* kemudian dibungkus.
- 11) Mengambil kertas label untuk menandai organ
- 12) Meletakkan organ yang telah dibungkus *aluminium foil* di atas es batu untuk menjaga kondisinya tetap dingin

c. Ekstraksi DNA udang

Prosedur untuk melakukan ekstraksi DNA udang menurut Fatchiyah *et al.*, (2011) adalah sebagai berikut:

- 1) Membersihkan seluruh bagian meja yang akan dijadikan tempat penelitian larutan alkohol 70 % dan dilap dengan tisu hingga bersih.

- 2) Mempersiapkan 6 buah *tube* lalu diberi tanda dengan spidol marker.
- 3) Mempersiapkan *inkubator* yang telah diisi dengan aquades dan dipanaskan dengan suhu 56 °C.
- 4) Mengisi masing-masing *tube* dengan larutan PBS (*Phospat Buffer Saline*) sebanyak 50 µl menggunakan *mikropipet*.
- 5) Memasukkan sampel udang ke dalam *tube* disesuaikan dengan label.
- 6) Memotong-motong sampel udang bersama dengan larutan PBS (*Phospat Buffer Saline*) di dalam *tube* hingga berukuran sangat kecil menggunakan gunting yang telah disterilisasi dengan alkohol 70 %.
- 7) Setiap pergantian sampel udang, gunting yang telah digunakan harus disterilisasi dengan larutan alkohol 70 % agar tidak terkontaminasi dan diperoleh DNA murni yang diinginkan.
- 8) Menambahkan larutan *lysis buffer (T1)* sebanyak 180 µl.
- 9) Menghomogenkan larutan dalam *tube* dengan cara “thawing” telunjuk jari.
- 10) Menambahkan *proteinase K* sebanyak 25 µl menggunakan *mikropipet*.
- 11) Menghomogenkan larutan dengan menggunakan *vortex* selama 1 menit.
- 12) Menutup *tube* dengan *parafilm* selanjutnya diletakkan pada spons.
- 13) Menginkubasi *tube* di dalam *inkubator* semalam.

d. Isolasi DNA udang

Prosedur untuk melakukan isolasi DNA udang menurut Fatchiyah *et al.*, (2011) adalah sebagai berikut:

- 1) Memasukkan *buffer BE* ke dalam oven dengan suhu 70 °C.
- 2) Mengambil sampel udang dari dalam *inkubator*.
- 3) Menghomogenkan larutan dengan menggunakan *vortex* selama 20 detik.
- 4) Melepaskan *parafilm* dari tutup *tube*.
- 5) Mengsentrifugasi dengan kecepatan 11.000 xg selama 5 menit, 25 °C.

- 6) Mempersiapkan *tube* baru sebanyak 6 buah kemudian ditutup bagian penutupnya dan diberi tanda dengan spidol marker.
- 7) Mengambil *tube* dari dalam *sentrifugator* dan diletakkan dalam wadah.
- 8) Memindahkan *supernatant* dari *tube* sebelumnya ke dalam *tube* yang baru dan meninggalkan residu di dalam *tube* yang lama.
- 9) Menambahkan *supernatant* dengan larutan *buffer B3* sebanyak 200 μ l.
- 10) Menghomogenkan larutan dengan menggunakan *vortex* selama 20 detik.
- 11) Memasukkan *tube* yang berisi larutan ke dalam oven dengan suhu 70 °C selama 30 menit (setiap 10 menit *tube* dikeluarkan dari dalam oven dan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 10 detik, selanjutnya dimasukkan kembali dalam oven).
- 12) Setelah 30 menit *tube* dikeluarkan dari dalam oven dan dihomogenkan kembali dengan menggunakan *vortex* selama 10 detik.
- 13) Menambakan larutan *ethanol* sebanyak 210 μ l ke dalam *tube*.
- 14) Menghomogenkan kembali larutan menggunakan *vortex* selama 10 detik.
- 15) Mempersiapkan *nukeluSpin* dan *tube column* sebanyak 6 buah.
- 16) Memasukkan *nukeluSpin* ke dalam *tube column* dan ditutup *nukeluSpin*.
- 17) Memberi tanda pada tutup *nukeluSpin* dan samping *tube column*.
- 18) Memindahkan *supernatant* dari dalam *tube* ke dalam *nukeluSpin* menggunakan mikropipet secara tegak lurus sehingga tidak mengenai bagian *silica gel* pada bagian tengah *sukeluSpin*.
- 19) Menutup *nukeluSpin* dan disentrifugasi dengan kecepatan 11. 000 xg selama 1 menit dengan suhu 25 °C.
- 20) Mempersiapkan *tube column* yang baru sebanyak 6 buah.
- 21) Memindahkan *nukeluSpin* dan *tube column* dari *sentrifugator* pada *tube*.
- 22) Memindahkan *nukeluSpin* dari dalam *tube column* lama ke dalam *tube column* yang baru dengan cepat agar tidak terkontaminasi udara luar.

- 23) Menambahkan larutan *buffer BW* sebanyak 500 μ l ke dalam *nukleuSpin* secara tegak lurus menggunakan *mikropipet* agar tidak menyentuh bagian dinding dan *silica gel* pada *nukleuSpin*.
- 24) Menutup *nukleuSpin* dan disentrifugasi dengan kecepatan 11. 000 xg selama 1 menit dengan suhu 25 °C.
- 25) Mempersiapkan *tube column* yang baru sebanyak 6 buah.
- 26) Memindahkan *nukeluSpin* dan *tube column* dari *sentrifugator* pada *tube*.
- 27) Memindahkan *nukleuSpin* dari dalam *tube column* lama ke dalam *tube column* yang baru dengan cepat agar tidak terkontaminasi udara luar.
- 28) Menambahkan larutan *buffer B5* sebanyak 600 μ l ke dalam *nukleuSpin* secara tegak lurus menggunakan *mikropipet* agar tidak menyentuh bagian dinding dan *silica gel* pada *nukleuSpin*.
- 29) Menutup *nukleuSpin* dan disentrifugasi dengan kecepatan 11. 000 xg selama 1 menit dengan suhu 25 °C.
- 30) Mempersiapkan *tube column* yang baru sebanyak 6 buah.
- 31) Memindahkan *nukeluSpin* dan *tube column* dari *sentrifugator* pada *tube*.
- 32) Memindahkan *nukleuSpin* dari *tube column* lama ke *tube column* yang baru dengan cepat agar tidak terkontaminasi udara luar.
- 33) Mengsentrifugasi kembali *nukleuSpin* dengan kecepatan 11. 000 xg selama 1 menit dengan suhu 25 °C untuk pengeringan.
- 34) Mempersiapkan *tube* (bukan *tube column*) baru sebanyak 6 buah dan diberi tanda pada bagian tutup dan sampingnya.
- 35) Memindahkan *nukeluSpin* dan *tube column* dari *sentrifugator* pada *tube*.
- 36) Memindahkan *nukleuSpin* dari dalam *tube column* lama ke dalam *tube* yang baru dengan cepat agar tidak terkontaminasi udara luar.

- 37) Menambahkan larutan *buffer BE* sebanyak 50 μ l yang diambil dari dalam oven ke dalam *nukleuSpin* secara tegak lurus menggunakan mikropipet agar tidak menyentuh bagian dinding dan *silica gel* pada *nukleuSpin*.
- 38) Membiarkannya selama 5 menit menyesuaikan suhu ruangan.
- 39) Mengsentrifugasi *nukleuSpin* dengan kecepatan 11. 000 xg selama 1 menit dengan suhu 25 °C.
- 40) Memasukkan kembali *buffer BE* ke dalam oven dengan suhu 70 °C.
- 41) Memindahkan *nukeluSpin* dan *tube* dari *sentrifugator* pada wadah *tube*.
- 42) Menambahkan larutan *buffer BE* lagi sebanyak 50 μ l yang diambil dari dalam oven ke dalam *nukleuSpin* secara tegak lurus agar tidak menyentuh bagian dinding dan *silica gel* pada *nukleuSpin*.
- 43) Membiarkannya selama 5 menit menyesuaikan suhu ruangan.
- 44) Mengsentrifugasi kembali *nukleuSpin* dengan kecepatan 11. 000 xg selama 1 menit dengan suhu 25 °C.
- 45) Mempersiapkan 1 buah plastik krep.
- 46) Memindahkan *nukeluSpin* dan *tube* dari *sentrifugator* pada wadah *tube*.
- 47) Memindahkan *nukeluSpin* ke dalam *plastik krep* dan dibuang.
- 48) Menutup *tube* dan disimpan dalam lemari pendingin suhu 4 °C, 15 menit.
- 49) Menyiapkan 1 buah plastik krep baru dan diberi tanda dengan spidol marker (nama pemilik, jenis sampel, tanggal dan waktu).
- 50) Mengeluarkan *tube* dari lemari pendingin, lalu tutup *tube* diberi *parafilm*.
- 51) Memindahkan *tube* ke dalam *plastik krep* dan dimasukkan kembali dalam lemari pendingin selama \pm 3 jam, suhu -20 °C atau hingga membeku.

e. Pengukuran kemurnian DNA udang

Prosedur untuk melakukan pengukuran kemurnian udang menurut Fatchiyah *et al.*, (2011) adalah sebagai berikut:

- 1) Mengambil *tube* sampel dari lemari pendingin dan diletakkan pada es *tube* dengan posisi tegak lurus agar suhunya tetap terjaga.
- 2) Mencairkan sampel dengan cara *dithawing* menggunakan tangan.
- 3) Mempersiapkan alat *spektrfotometer nanoDrop*
- 4) Membuka bagian *pedestal* dengan diangkat bagia tengahnya ke atas.
- 5) Menuangkan *aquades* secukupnya pada tisu dan dilapkan pada *pedestal*.
- 6) Menutup *pedestal*.
- 7) Membuka *software* "ND 1.000"
- 8) Mengulang kegiatan 3 hingga 6.
- 9) Membuka kembali *pedestal*, kemudian mengambil larutan sampel dari dalam *tube* sebanyak 1,5–2 μl dan meneteskannya pada *filament*.
- 10) Menutup *pedestal* dan ditunggu nilai kemurnian DNA lalu dicatat hasilnya.

f. Tahapan "Polymerase Chain Reaction" (PCR)

Prosedur untuk melakukan tahapan PCR menurut Fatchiyah *et al.*, (2011) adalah sebagai berikut:

- 1) Mempersiapkan tube bervolume 10 ml sebanyak 1 buah.
- 2) Memberi tanda dengan marker (PCR) MIX.
- 3) Mempersiapkan wadah plastik (dapat berupa kotak makan plastik).
- 4) Mengambil *ice tube* dari freezer lalu diletakkan dalam wadah plastik.
- 5) Mengambil bahan-bahan dan sampel DNA dari lemari pendingin lalu diletakkan pada *ice tube* (untuk menjaga kondisi dingin atau sejuk).
- 6) Membuat campuran larutan primer yang akan digunakan dalam proses

Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan komposisi setiap sampel:

Primer F	0,5 μl
Primer R	0,5 μl
ddH ₂ O ("steril water")	3 μl
Green gotag	5 μl
<hr/>	
total volume	9 μl

- 7) Mengalikan seluruh komposisi diatas dengan jumlah sampel dan larutan *control negative* untuk mengetahui jumlah larutan yang akan digunakan.
- 8) Mencampur seluruh larutan ke dalam *tube* yang telah diberi label.
- 9) Mempersiapkan *tube* dengan ukuran 200 µl sebanyak sampel yang diuji.
- 10) Memberi tanda seluruh *tube* sesuai dengan sampel yang akan diuji.
- 11) Meletakkan *tube* yang telah diberi tanda ke dalam wadah *tube*.
- 12) Mengambil es batu dari *freezer*, diserut dan diletakkan di wadah plastik.
- 13) Mengambil 9 µl larutan (PCR) MIX dari dalam *tube* kemudian dipindahkan ke dalam *tube* yang telah diberi tanda sebelumnya.
- 14) Meletakkan *tube* yang telah diisi larutan (PCR) MIX pada serutan es yang telah disediakan secara tegak lurus.
- 15) Menambahkan 1 µl larutan sampel DNA ke dalam *tube* yang berisi larutan (PCR) MIX. Meletakkan kembali pada serutan es secara tegak lurus.
- 16) Mempersiapkan 1 buah *tube* berukuran 200 µl dan diberi tanda dengan marker sebagai *control negatif*
- 17) Mengambil 10 µl larutan (PCR) MIX dengan mikropipet dan memindahkannya ke dalam *tube* kontrol negatif.
- 18) Mengomogenkan seluruh larutan baik sampel uji dan larutan kontrol negatif dengan cara *dithawing* dengan telunjuk jari.
- 19) Membersikan dinding *tube* dengan *spin down* agar larutan dalam *tube* tidak menempel pada dinding *tube* dan terdapat di dasar *tube* seluruhnya.
- 20) Memasukkan sampel dan kontrol negatif menggunakan mesin (PCR).
- 21) Membiarkannya 3 jam hingga mencapai fase *COMPLETE*.
- 22) Memindahkan *tube* ke dalam wadah *tube* dan disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu 4 °C.

g. Proses dan pengaturan alat GRADIENT (PCR)

Proses dan pengaturan alat GRADIENT (PCR) menurut Fatchiyah *et al.*, (2011) adalah sebagai berikut:

- 1) Memasukkan seluruh sampel DNA dan kontrol negatif ke dalam alat (PCR) (GRADIENT (PCR) dan sedikit ditekan.
- 2) Melakukan pengaturan alat dengan ketentuan sebagai berikut:

Hot start : suhu 95 °C, 3 menit.

Denaturasi : suhu 94 °C, 1 menit.

Anneling : suhu 59 °C, 1 menit.

Extantion : suhu 72 °C, 1 menit.

Post extantion : suhu 72 °C, 7 menit.

Keterangan:

- a) Proses *anneling* dan *extantion* dilakukan berulang kali sebanyak 30 siklus.
- b) Mengeluarkan sampel dari dalam alat dan meletakkannya ke dalam wadah tube.
- c) Memasukkan sampel ke dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C selama semalam.

h. Tahapan elektroforesis

Prosedur untuk melakukan elektroforensis menurut Fatchiyah *et al.*, (2011) adalah sebagai berikut:

- 1) Mempersiapkan alat dan bahan yang diperlukan.
- 2) Menyiapkan larutan *TBE* 30 ml.
- 3) Menimbang *agarose* 1,5 % sebanyak 0,45 gram di atas kertas saring dengan timbangan digital.
- 4) Mempersiapkan erlenmeyer 300 ml.
- 5) Memasukkan *agarose* 1,5 % ke dalam tabung erlenmeyer.

- 6) Menambahkan larutan *TBE* yang telah disiapkan ke dalam erlenmeyer.
- 7) Menghomogenkan larutan *TBE* dan *agarose* 1,5 %.
- 8) Menutup mulut erlenmeyer dengan plastik *wrap* bening kemudian diberi beberapa lubang di atasnya dengan menggunakan tusukan jarum.
- 9) Memasukkan erlenmeyer dalam *microwave* suhu *MEDIUM* ± 1 menit.
- 10) Mengeluarkan erlenmeyer dari *microwave*, hingga larutan bening.
- 11) Apabila belum terjadi perubahan warna menjadi bening ulangi kegiatan 9–10 hingga terjadi perubahan warna.
- 12) Membuka plastik *wrap* dari mulut erlenmeyer.
- 13) Membiarkan larutan *agarose* 1,5 % hingga menghangat.
- 14) Mempersiapkan cetakan gel dan *plate* untuk membuat sumuran.
- 15) Menambahkan larutan *EtBr* 1 µl dengan mikropipet lalu dihomogenkan.
- 16) Menuangkan *agarose* dan *EtBr* pada cetakan yang telah dipasang sisi pembuat sumuran sampel.
- 17) Bila telah mengeras, masukkan gel dan cetakannya ke dalam *chamber* dan menuangkan larutan *TBE* sampai gel terendam.
- 18) Memasukkan DNA dan larutan *loading dye* (5:1) pada mikrotiter dan dihomogenkan dengan bantuan mikropipet, selanjutnya dimasukkan ke dalam sumuran mulai pada baris ke 3–6 secara tegak lurus dan tidak boleh mengenai dasar atau dinding *agarose*.
- 19) Memasukkan kontrol negatif dan larutan *loading dye* (5:1) pada mikrotiter dan dihomogenkan dengan bantuan mikropipet, selanjutnya dimasukkan ke dalam sumuran pada baris ke 1 secara tegak lurus dan tidak boleh mengenai dasar atau dinding *agarose*.
- 20) Memindahkan cetakan *agarose* dari *chamber* ke dalam *elektroforesis*.
- 21) Hubungkan elektroda dengan *power supply* dengan tegangan 50 volt dan nyalakan hingga 1–2 jam.

- 22) *Dirunning* sampel hingga pada baris ke 3 dari bawah *plate*.
- 23) Setelah selesai, matikan alat *elektroforesis* dan ambil gel.
- 24) Memindahkan gel ke *UV- transimulator* dan amati hasilnya.
- 25) Dokumentasikan hasilnya dengan kamera polaroid khusus atau diekspose *GelDoc-imaging* sehingga mudah dianalisis.

3.5 Parameter Kualitas Air

Pengukuran suhu, pH, DO dan salinitas dilakukan agar kualitas air tetap stabil sebagai penunjang untuk mendukung kehidupan udang vaname bertahan hidup. Berikut prosedur pengukuran kualitas air :

3.5.1 Suhu

Pengukuran suhu menggunakan alat yaitu termometer raksa (Hg), berdasarkan Nuhman (2009), pengukuran suhu dilakukan dengan cara:

- 1) Mencilupkan ujung termometer raksa (Hg) ke dalam contoh air ± 10 cm selama 3 menit
- 2) Membiarkan beberapa saat sampai air raksa tidak mengalami perubahan
- 3) Membaca suhu yang ditunjukkan oleh air raksa dalam termometer dan mencatat hasilnya

3.5.2 pH (Derajat Keasaman)

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter tipe KL-03 (II) Waterproof Pen dengan prosedur pengukuran pH menurut Suprpto (2011) sebagai berikut:

- 1) Melakukan kalibrasi pH meter dengan menggunakan larutan buffer atau dengan menggunakan aquades
- 2) Memasukkan pH meter ke dalam air sampel selama ± 2 menit

- 3) Menekan tombol *HOLD* yang terdapat pada pH meter untuk menghentikan angka yang muncul pada pH meter dan mencatat hasilnya.

3.5.3 DO (*Dissolved Oxygen*)

Pengukuran DO menggunakan alat DO meter tipe Lutron DO-5510.

Menurut petunjuk pemakaian DO meter tersebut, prosedur pengukuran DO yaitu:

- 1) Membilas probe dengan deionised atau air suling sebelum digunakan agar kotoran atau debu yang menempel pada ujung probe hilang. Langkah lain untuk mengkalibrasi alat ini sebelum digunakan adalah direndam pada air kran selama 30 menit terlebih dahulu
- 2) Menyalakan DO meter dengan nilai DO terletak pada bagian atas layar sedangkan indikator suhu terletak pada bagian pojok kanan bawah pada layar alat ini
- 3) Mencilupkan probe pada sampel perlakuan penelitian dan dibiarkan sampai beberapa saat hingga nilai yang tertera pada layar stabil dengan catatan yaitu ketika kita mencelupkan probe pada sampel, ujung probe harus tercelup semua dan jangan sampai ada gelembung karena dapat menyebabkan kesalahan dalam pembacaan
- 4) Membaca nilai yang tertera pada layar alat ini ketika sudah dirasa stabil dan akan muncul kata *READY*, dan sampel perlakuan penelitian sudah bisa dibaca nilainya
- 5) Menekan tombol *HOLD* untuk mengunci nilai DO yang telah terbaca dan menekan tombol *HOLD* kembali untuk melepaskan kuncinya

Jika ingin menentukan nilai suhu secara langsung menggunakan alat ini juga dapat dilihat di bagian kiri bawah pada layar DO meter.

3.5.4 Salinitas

Pengukuran salinitas dengan menggunakan alat Refraktometer ATAGO, berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) tahun 2006, cara mengukur salinitas yaitu sebagai berikut:

- a) Menyiapkan refraktometer
- b) Membuka penutup kaca prisma dan mengkalibrasi dengan menggunakan aquades
- c) Membersihkan dengan tisu secara searah
- d) Meneteskan 1 tetes air sampel yang akan diukur salinitasnya dengan menggunakan pipet tetes
- e) Menutup kembali secara pelan-pelan agar tidak terjadi gelembung udara di dalam permukaan kaca prisma yang akan diamati salinitasnya
- f) Mengarahkan refraktometer ke sumber cahaya lalu melihat nilai salinitasnya melalui kaca pengintai dan mencatat hasil pengukuran.

