

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI
(*Loligo sp.*) TERHADAP GEN *CYCLOPHILIN A (CYPA)* PADA UDANG
VANAME (*Litopenaeus vannamei*) YANG TERINFEKSI
WHITE FECES SYNDROME (WFS) DENGAN SALINITAS
MEDIA YANG BERBEDA**

SKRIPSI

Oleh:

**ILHAM BAYU SATRIO
NIM. 155080501111038**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI
(*Loligo* sp.) TERHADAP GEN *CYCLOPHILIN A* (CYPA) PADA
UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) YANG TERINFEKSI
WHITE FECES SYNDROME (WFS) DENGAN
SALINITAS MEDIA YANG BERBEDA**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:

**ILHAM BAYU SATRIO
NIM. 155080501111038**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI
(*Loligo sp.*) TERHADAP GEN *CYCLOPHILIN A* (CYP A) PADA
UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) YANG TERINFEKSI
WHITE FECES SYNDROME (WFS) DENGAN
SALINITAS MEDIA YANG BERBEDA

Oleh :
ILHAM BAYU Satrio
NIM. 155080501111038

telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 28 Maret 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP



(Dr. Ir. M. Pirdaus, MP.)
NIP. 19680919 200501 1 001
TANGGAL: 05 APR 2019

Menyetujui,
Dosen Pembimbing

(Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc.)
NIP. 19621014 198701 1 001
TANGGAL: 05 APR 2019



LEMBAR IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TINTA CUMICUMI (*Loligo* sp.)
TERHADAP GEN *CYCLOPHILIN A* (*CYPA*) PADA UDANG VANAME
(*Litopenaeus vannamei*) YANG TERINFEKSI *WHITE FECES*
SYNDROME (WFS) DENGAN SALINITAS MEDIA YANG BERBEDA**

Nama Mahasiswa : ILHAM BAYU SATRIO

NIM : 155080501111038

Program Studi : Budidaya Perairan

PENGUJI PEMBIMBING:

Pembimbing 1 : Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING:

Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, M. Si

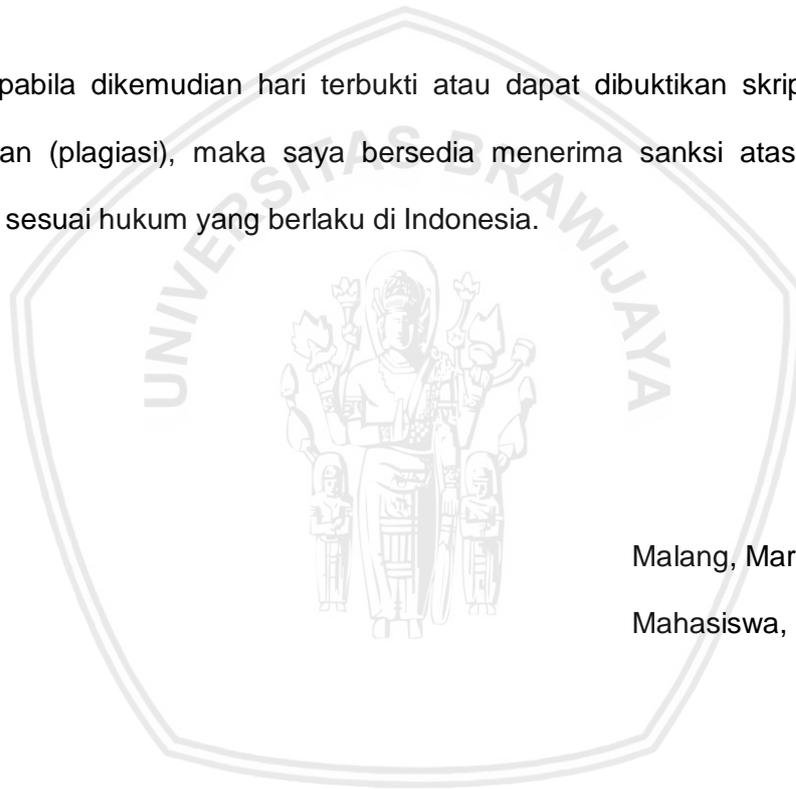
Dosen Penguji 2 : Budianto, S.Pi., MP., M. Sc

Tanggal Ujian : 28 Maret 2019

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri di bawah payung penelitian Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc yang dibiayai oleh Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi, Sesuai dengan Kontrak Penelitian Nomor : 054/SP2H/LT/DRPM/2018, tanggal : 12 Maret 2018

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, Maret 2019

Mahasiswa,

Ilham Bayu Satrio

NIM. 155080501111038

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyadari bahwa penulisan usulan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan moril dan materil dari semua pihak. Melalui kesempatan ini, dengan kerendahan hati perkenankan penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT karena atas berkah dan limpahan rahmat-Nya laporan ini dapat terselesaikan dengan tepat waktu.
2. Ibu dan Ayah yang senantiasa terus memberikan doa, motivasi dan dukungannya selama ini.
3. Bapak Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan saran, bimbingan, arahan dan nasehat bagi penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi ini dengan baik.
4. Jefri Anjaini, S.Pi dan Endar Riyani, S.Pi yang telah banyak membantu selama penelitian
5. Tim penelitian cumi yaitu Tyo, Nafa, Yashinta dan Ivana yang telah bekerja sama dengan baik dalam melakukan penelitian dan penyusunan laporan

RINGKASAN

Ilham Bayu Satrio. Pengaruh Pemberian Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo* sp.) terhadap Gen *Cyclophilin A* (*CypA*) pada Udang Vanname (*L. vannamei*) yang Terinfeksi *White Feces Syndrome* (WFS) dengan Salinitas Media yang Berbeda di bawah bimbingan **Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc.**

Budidaya udang vaname di Indonesia mulai berkembang sejak tahun 2012. Budidaya ini dikembangkan dikarenakan udang vaname merupakan varietas unggul yang memiliki nilai ekonomis yang cukup tinggi. Usaha untuk meningkatkan produktivitas untuk memenuhi kebutuhan pasar yaitu merubah sistem budidaya udang vaname menjadi intensif. Seiring meningkatnya teknologi dan padat tebar tinggi menyebabkan timbulnya suatu penyakit, salah satunya *white feces syndrome*. Diduga adanya keterkaitan kualitas lingkungan air yang buruk, gregarin, blue green algae, dan bakteri vibrio merupakan penyebab penyakit WFS ini. Pengaplikasian antibiotik sekarang sudah dibatasi, dikarenakan menimbulkan efek samping bagi pathogen maupun organisme itu sendiri. Oleh karena itu obat-obatan herbal menjadi solusi, salah satunya tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) sebagai antibakteri yang dapat melawan bakteri Vibrio.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan salinitas media yang berbeda terhadap gen *cyclophilin A* pada udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi WFS. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan, Laboratorium Hidrobiologi Divisi Lingkungan dan Bioteknologi Perairan, dan Laboratorium Hidrobiologi Divisi Sumberdaya Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, serta Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya, Malang pada 1 Desember - 15 Desember 2018 dan 20 Desember 2018 – 15 Januari 2019. Penelitian ini menggunakan metode deskriptif, dengan menggunakan variabel pemberian ekstrak tinta cumi-cumi 8 ppm pada perlakuan salinitas media 24 ppt (A), 27 ppt (B), 30 ppt(C), dan 33 ppt (K). Parameter utama pada penelitian ini adalah kemurnian DNA, elektroforegram dan blastn pada udang vaname, sedangkan parameter penunjang dalam penelitian ini adalah gejala klinis, parameter kualitas air (pH, suhu, salinitas, DO, nitrat, nitrit, amonia, TOM, dan alkalinitas) dan persentase kelangsunganhidup udang vaname.

Hasil yang didapat dari penelitian ini adalah sebagai berikut, intensitas volume pita DNA gen *CypA* pada udang vaname untuk perlakuan A (24 ppt) sebesar 6032130, perlakuan B (27 ppt) sebesar 4922970, perlakuan C (30 ppt) sebesar 5000840, sedangkan perlakuan K(+) (33 ppt) sebesar 7053150 dan K(-) yaitu 2175160. Panjang basepair yang didapat pada gen *CypA* udang vaname untuk perlakuan A (24 ppt) yaitu 203,4876, perlakuan B (27 ppt) yaitu 193,9718, perlakuan C (30 ppt) yaitu 184,901, sedangkan perlakuan K(+) (33 ppt) sebesar 182,7004 dan K(-) sebesar 208,4191. Nilai *query cover* yang didapat pada semua sampel (A,B,C,K+,K-) berkisar antara 67-97 %, nilai *identity* antara 91-97 % dan *E-value* 0.0. Berdasarkan nilai yang diperoleh, artinya sekuen DNA sampel memiliki panjang sekuen yang sama dengan *database* yang ada di *Genbank* 67-97% dengan *E-value* 0.0 dapat disimpulkan bahwa sekuen sampel memiliki tingkat homologi yang sangat tinggi. Hasil analisis komposisi nukleotida pada gen *CypA* pada *L. vannamei* menunjukkan bahwa jumlah rata-rata adenin dan timin ditemukan paling tinggi. sehingga gen *CypA* pada udang vaname dikategorikan sebagai kelompok kaya basa A-T dimana memiliki ikatan hidrogen yang lemah. Hasil

analisis variasi genetik didapat pola variasi genetik pada gen *CypA*. Adanya variasi basa-basa tersebut diduga terdapat adanya suatu mutasi. Total pasangan basa yang didapatkan dari hasil BLAST setiap perlakuan yaitu 167 bp, didapatkan nilai polimorfisme terendah pada perlakuan A (24 ppt) yaitu 8,4% sedangkan nilai polimorfisme tertinggi pada perlakuan K(+) yaitu 15%.

Hasil pengamatan yang didapatkan pada perlakuan kontrol dimana diduga terinfeksi WFS terlihat udang berenang kurang aktif, hepatopankreas berwarna putih pucat, dan usus terlihat tidak utuh. Sedangkan pada udang yang diberi ekstrak tinta cumi-cumi baik pada perlakuan A (24 ppt), B (27 ppt), C (30 ppt) tidak terlihat gejala klinis seperti pada perlakuan kontrol (K+).

Hasil dari pengamatan parameter kualitas air yang terdiri dari suhu, pH, salinitas, oksigen terlarut (DO), nitrat, nitrit, amonia, TOM, dan alkalinitas menunjukkan hasil yang secara umum kurang baik akan tetapi masih dapat ditolerir oleh udang vaname. Untuk hasil kelulushidupan udang vaname tertinggi pada perlakuan B (27 ppt) 85,7% dan terendah pada perlakuan kontrol 40,7%.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) tidak berpengaruh terhadap gen *CypA* udang vaname yang terinfeksi WFS yang diperlihara pada salinitas media yang berbeda.



KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkah, karunia serta ridhlo-Nya penulis dapat menyelesaikan usulan skripsi dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*) Terhadap Gen *Cyclophilin A* (*CypA*) pada Udang Vanname (*L. vannamei*) yang Terinfeksi *White Feces Syndrome* (WFS) dengan Salinitas Media yang Berbeda”. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada bapak Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc selaku dosen pembimbing dan semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan usulan ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan yang mendasar pada usulan ini. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang dapat membangun. Kritik konstruktif dari pembaca sangat diharapkan untuk penyempurnaan laporan selanjutnya, agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Demikian penulis sampaikan terima kasih.

Malang, Februari 2019

Penulis

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) menjadi komoditas unggulan mulai tahun 2012 khususnya pada budidaya udang di Indonesia. Direktorat Jendral Perikanan Budidaya (2014) melaporkan bahwa capaian volume produksi udang nasional sebesar 592.219 ton dan udang vaname sebesar 411.729 ton dari target produksi udang vaname sebesar 450 ribu ton. Capaian ini masih belum memenuhi target, akan tetapi naik 20,49% dari tahun 2013.

Udang vaname memiliki beberapa kelebihan sehingga disebut sebagai varietas unggul. Kelebihan yang dimilikinya antara lain: lebih tahan terhadap penyakit dari udang lainnya, memiliki pertumbuhan yang lebih cepat, lebih cepat beradaptasi terhadap fluktuasi lingkungan (*euryhaline* 5-35 ppt), lama pemeliharaan relatif lebih singkat (3,5 bulan), dan FCR rendah (1,2) (Mustafa, *et al.*, 2010). Produktivitas udang vaname cukup tinggi, hal ini disebabkan udang spesies ini dapat memanfaatkan kolom air dan dapat dibudidayakan secara intensif hingga 120 ekor/m² (Fuady, *et al.*, 2013).

Permintaan pasar akan udang yang meningkat tiap tahunnya menyebabkan pembudidaya juga harus meningkatkan teknologi budidayanya. Perkembangan budidaya dari sistem ekstensif ke intensif pada mayoritas tambak udang vaname diduga memiliki dampak terhadap peningkatan pencemaran lingkungan. Bahan-bahan pencemaran lingkungan yang sulit diuraikan menyebabkan penimbunan dan berakibat langsung bagi lingkungan dan mengganggu biota yang hidup pada lingkungan tersebut. Adanya penimbunan bahan-bahan organik menyebabkan oksigen menurun sehingga organisme yang tinggal di lingkungan tersebut juga mengalami kekurangan oksigen. Faktor-faktor

di atas merupakan penyebab utama menurunnya sistem imun pada biota yang dibudidayakan sehingga sangat mudah terinfeksi penyakit karena kualitas lingkungannya yang buruk (Kilawati dan Maimunah, 2015).

Wabah penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan buruknya parameter kualitas lingkungan merupakan agen yang harus diperhatikan pada budidaya udang. Berdasarkan pendapat Chaweepack, *et al.* (2015), bahwa terdapat wabah penyakit baru yang kebanyakan menginfeksi udang putih yaitu penyakit berak putih (WFS). Kasus penyakit WFS ini sangat mudah dalam penyebarannya. Penyakit berak putih sudah mewabah di China, Vietnam, Thailand, Malaysia, India, dan Mexico. Adapun di Indonesia mulai mewabah pada awal tahun 2014 dan menginfeksi tambak-tambak intensif udang vaname (*L. vannamei*) di wilayah pulau Sumatra, Jawa, Sulawesi, Bali dan Nusa Tenggara Barat (Taslihan *et al.*, 2014).

WFS merupakan salah satu penyakit sangat dihindari oleh para petambak budidaya udang. Pemicu yang kompleks akan penyakit ini dikhawatirkan menyebabkan gagal panen, apabila tidak ditanggapi dengan serius. Penyakit ini sangat mempengaruhi tingkat kelulushidupan dan tingkat pertumbuhan pada udang (Thitamadee, *et al.*, 2016). Hal ini dapat dilihat terjadi penurunan kelulushidupan hingga 20-30%, selain itu terjadi penurunan nafsu makan sehingga konsumsi akan pakan rendah, menyebabkan penurunan pertumbuhan dan meningkatkan FCR antara 1.7-2.5 (Sriuraitana, *et al.*, 2014).

Prakoso, *et al.* (2016) memaparkan penurunan kualitas air merupakan salah satu penyebab WFS. Kualitas air yang buruk seperti fluktuasi salinitas, DO, dan tingginya kandungan bahan organik (amonia, nitrit, nitrat dan fosfat) diduga penyebab terjadinya penyakit berak putih ini. Amonia tersebut berasal dari manajemen pakan yang kurang baik, sehingga terjadi penumpukan pakan yang tidak termanfaatkan dengan baik. Salinitas juga berperan penting terhadap laju

konsumsi oksigen dan perubahan pola respirasi, sehingga salinitas yang tidak sesuai pada udang vaname dapat menghambat pertumbuhannya. Limsuwan (2010) dalam penelitiannya melaporkan bahwa penyakit WFS ini menginfeksi *L. vannamei* pada salinitas yang rendah (3-5 ppt). Selain itu diduga kuat penyakit ini disebabkan oleh kombinasi serangan parasit gregarin dari jenis *nematopsis* yang terinteraksi dengan *Vibrio*. Bakteri jenis *Vibrio* yang ditemukan pada udang vaname yang terinfeksi penyakit WFS adalah *V. harveyi* (Chaweepack, *et al.*, 2015). Mekanisme masuknya patogen *Vibrio* ke dalam haemolimp diduga terjadi kerusakan pada mukosa usus (lapisan usus yang mampu menyerap nutrisi) akibat infeksi berat (> 100 gregarin dalam 1 cm usus bagian tengah) (Kaemudin, *et al.*, 2016).

Infeksi penyakit WFS pada udang vaname saat ini telah menurunkan produktivitas udang vaname. Secara visual udang yang terinfeksi penyakit ini akan muncul kotoran udang berwarna putih memanjang dan mengapung pada permukaan air, eksoskeleton nampak lebih lembek serta ditemukan infeksi dari protozoa sehingga menyebabkan insang lebih gelap (Limsuwan, 2010). Penyebab lain dari penyakit WFS adalah kondisi lingkungan/kualitas air yang buruk sehingga menyebabkan sistem imun udang menurun yang ditandai dengan respon patogen menurun, sistem imun menurun secara drastis (Kamimura, 2008), sehingga menyebabkan udang mudah terinfeksi suatu penyakit.

Terdapat gen untuk mengindikasi adanya patogen salah satunya adalah *Cyclophilin A (CypA)*. Kesehatan udang vaname dipengaruhi oleh dua faktor yaitu lingkungan bagi inang dan patogen yang menginfeksi inang. Kualitas lingkungan yang buruk dapat menyebabkan menurunnya daya kerja reseptor pendeteksi adanya patogen, sehingga patogen dapat dengan mudah menginfeksi udang vaname (Muhammad, *et al.*, 2017). Kasus penyakit WFS yang menginfeksi udang

vaname menyebabkan menurunnya respon imunitas. Indikasi patogen pada udang adalah reseptor *immunosupressor* yang terkait dengan gen imun *CypA*. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi genetik gen *CypA* pada udang yang terinfeksi WFS dengan salinitas media yang berbeda.

1.2 Perumusan Masalah

Penyakit WFS salah satu penyakit yang menjadi kekhawatiran bagi petambak budidaya udang. Pemicu yang kompleks akan penyakit ini dikhawatirkan menyebabkan gagal panen, apabila tidak ditanggapi dengan serius. Penyakit ini sangat mempengaruhi tingkat kelulushidupan dan tingkat pertumbuhan pada udang (Thitamadee, *et al.*, 2016). Hal ini dapat dilihat terjadi penurunan kelulushidupan hidup hingga 20-30%, selain itu terjadi penurunan nafsu makan sehingga konsumsi akan pakan rendah, menyebabkan penurunan pertumbuhan dan meningkatkan FCR antara 1.7-2.5 (Sriuraitana, *et al.*, 2014). Limsuwan (2010) dalam penelitiannya melaporkan bahwa penyakit WFS ini menginfeksi *P. monodon* pada salinitas yang rendah (3-5%), kemudian menyebar keseluruh tambak budidaya udang vaname di Thailand.

Usaha pengendalian bakteri sudah dilakukan dengan menggunakan antibiotik, akan tetapi penggunaan yang berlebihan antibiotik ini dapat menimbulkan efek samping bagi patogen itu sendiri dan organisme budidaya (Sari, *et al.*, 2012). Penggunaan obat-obatan herbal mulai menjadi sorotan dunia sekarang ini. Kebijakan ini hasil dari penggunaan obat-obatan secara kimia yang menimbulkan efek samping yang buruk. Oleh karena itu digunakan tinta cumi-cumi untuk mengobati udang vaname yang terinfeksi WFS karena tinta cumi-cumi itu sendiri mengandung melanin, dimana bekerja sebagai antibakteri untuk menghambat aktivitas bakteri *Vibrio* sehingga ekskresi dari *CypA* dapat ditekan (Derby, 2014). Berdasarkan permasalahan di atas, maka rumusan masalah dalam

penelitian ini yaitu apakah pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) mampu mempengaruhi gen *CypA* pada udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi WFS dengan salinitas media yang berbeda.

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) terhadap gen *CypA* pada udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi WFS dengan salinitas media yang berbeda.

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang digunakan untuk mendasari penelitian ini yaitu:

H₀ : Diduga penggunaan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) tidak berpengaruh terhadap gen *Cyclophylin A* (*CypA*) pada udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi *white feces syndrome* dengan salinitas media yang berbeda.

H₁ : Diduga penggunaan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) berpengaruh terhadap gen *Cyclophylin A* (*CypA*) pada udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi *white feces syndrome* dengan salinitas media yang berbeda.

1.5 Kegunaan Penelitian

Kegunaan penelitian ini adalah untuk memberikan informasi kepada para pembudidaya untuk menggunakan bahan alternatif sebagai upaya pemanfaatan bahan buangan di bidang perikanan untuk mengendalikan serangan *white feces syndrome* dengan menggunakan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.). Manfaat lainnya yaitu menambah wawasan bagi mahasiswa sebagai seputar penyakit, penelitian ini juga dapat dimanfaatkan bagi para pembudidaya ikan dalam menanggulangi wabah penyakit yang menyerang tambak mereka sehingga penelitian ini memiliki banyak manfaat.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan, Laboratorium Hidrobiologi Divisi Lingkungan dan Bioteknologi Perairan, dan Laboratorium Hidrobiologi Divisi Sumberdaya Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, serta Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Desember 2018 – Januari 2019.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Udang Vanname (*Litopenaeus vannamei*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Amri dan Kanna (2008), penggolongan udang vaname secara lengkap berdasarkan ilmu taksonomi hewan (sistem pengolompokan hewan berdasarkan bentuk tubuh dan sifat-sifatnya) dipaparkan sebagai berikut:

Filum : Arthropoda

Kelas : Crustacea

Ordo : Decapoda

Famili : Penaeidae

Genus/Marga : *Litopenaeus*

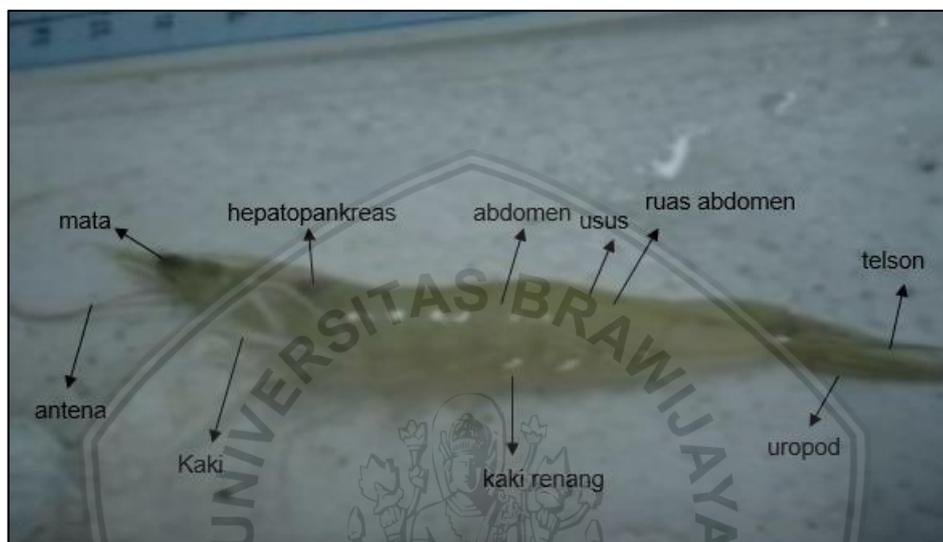
Species/Jenis : *L. vannamei*

Nama lokal : Udang vaname, udang kaki putih, udang putih Amerika

Udang vaname (Gambar. 1) adalah binatang air yang mempunyai tubuh beruas-ruas seperti udang penaeid lainnya, dimana pada tiap ruasnya terdapat sepasang anggota badan. Udang vaname termasuk ordo decapoda yang dicirikan memiliki sepuluh kaki terdiri dari lima kaki jalan dan lima kaki renang. Tubuh udang vaname secara morfologis dibedakan menjadi 2 bagian yaitu cephalothorax atau bagian kepala dan dada serta abdomen atau perut. Bagian cephalothorax terlindung oleh kulit chitin yang tebal yang disebut carapace. Secara anatomi cephalothorax dan abdomen terdiri dari segmen-segmen atau ruas-ruas, dimana masing-masing segmen tersebut memiliki anggota badan yang mempunyai fungsi sendiri-sendiri (Panjaitan, 2012).

Udang vaname memiliki rostrum yang merupakan bagian kepala yang menjorok yang berupa kelopak mata yang memanjang dan bergerigi (Amri dan

Kanna, 2013). Mulut berada di bawah bagian bawah mata, dilengkapi dengan bagian lainnya yaitu sungut kecil (*antennule*), sungut besar (*antenna*), rahang (*mandibular*), alat bantu rahang (*maxilla*) dan *maxilliped*. Di bawah karapas terdapat insang di kiri dan kanan bagian dada. Terdapat lima pasang kaki renang pada bagian perut (Suyanto dan Takarina, 2009).



Gambar 1. Udang vaname (*L. vannamei*) (Sartijo dan Prayitno, 2015)

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Udang vaname memiliki sifat *euryhaline* atau mampu hidup pada kisaran salinitas yang lebar. Habitat aslinya, udang ini ditemukan pada perairan dengan kisaran salinitas 0,5-40 ppt. Kelebihan ini membuka peluang bagi petambak udang untuk mengembangkan komoditas ini di perairan daratan (*inland water*). Budidaya udang vaname di lingkungan bersalinitas rendah merupakan pilihan budidaya alternatif mengingat mulai munculnya penyakit infeksi pada udang yang dipelihara di tambak air asin (Maica, *et al.*, 2012). Udang juga memiliki daya tahan suhu dengan rentang yang relatif luas berkisar 22°C – 31°C, di malam hari suhu tambak dapat mencapai 22°C atau dibawah 25°C. Namun pada siang hari suhu dapat mencapai 31°C (Suyanto dan Takarina, 2009).

Pengenalan udang vanamei (*L. vannamei*) pertama kali di Indonesia dilakukan pada tahun 2001 dengan induk dan benur berasal dari Hawaii. Besarnya potensi lahan perairan tawar yang dimiliki, adanya kesulitan mendapatkan air tawar pada musim-musim tertentu di daerah pesisir merupakan pertimbangan utama berkembangnya model budidaya desalinasi ini baik pada budidaya udang windu dan udang vaname (Yudiati, *et al.*, 2009).

Secara ekologis, udang vanamei mempunyai siklus hidup identik dengan udang windu (*P. monodon*), yaitu melepaskan telur di tengah laut, kemudian terbawa arus dan gelombang menuju pesisir menetas menjadi nauplius. Stadium ini kemudian berlanjut menjadi stadium zoea, mysis, postlarva, dan juvenile. Pada stadium juvenile telah tiba di daerah pesisir, selanjutnya kembali ke tengah laut untuk proses pendewasaan dan bertelur (Ghufran dan Kordi, 2009).

2.1.3 Kebiasaan Makan

Udang vaname memiliki kebiasaan makan dan cara makan (feeding food habit) juga identik dengan udang windu, yaitu tergolong hewan omnivorous scavenger, pemakan segala (hewan dan tumbuhan), dan bangkai. Jenis makanan yang dimakan antara lain plankton (fitoplankton dan zooplankton), alga benthik, detritus dan bahan organik lainnya. Udang vaname lebih rakus (*piscivorous*) dan membutuhkan protein yang lebih rendah dibandingkan udang windu. Udang vaname membutuhkan pakan udang yang mengandung protein berkisar 32-38% sehingga dapat tumbuh dengan optimal (Ghufran dan Kordi, 2009).

Udang mempunyai kebiasaan dan jenis makanan yang berbeda tergantung stadia hidupnya. Pada saat zoea, udang memakan plankton nabati dan mikro pellet. Pada stadia *mysis*, udang cenderung menyukai plankton hewani dan mikro pellet. Memasuki stadia *post larva*, udang hidup di dasar perairan, oleh karena itu udang memakan pakan yang tenggelam. Udang dapat tumbuh dengan cepat

apabilan diberi pakan dengan kadar protein 35-40% dan cenderung menyukai pakan yang berasal dari protein hewani (Suyanto dan Takarina, 2009).

2.2 *White Feces Syndrome*

Infeksi penyakit berak putih pada udang vaname memiliki ciri visual berupa akan terlihat kotoran udang berwarna putih memanjang dan mengapung pada permukaan air, eksoskeleton nampak lembek dan ditemukan infeksi protozoa sehingga menyebabkan insang gelap. (Kaemudin, *et al.*, 2016). WFS sangat dihindari oleh para petambak budidaya udang. Pemicu yang kompleks akan penyakit ini dikhawatirkan menyebabkan gagal panen, apabila tidak ditanggapi dengan serius. Penyakit ini sangat mempengaruhi tingkat kelulushidupan dan tingkat pertumbuhan pada udang (Thitamadee, *et al.*, 2016). Hal ini dapat dilihat terjadi penurunan kelulushidupan hingga 20-30%, selain itu terjadi penurunan nafsu makan sehingga konsumsi akan pakan rendah, menyebabkan penurunan pertumbuhan secara drastis dan meningkatkan FCR antara 1.7-2.5 (Sriuraitana, *et al.*, 2014).

Menurut hasil penelitian Jayadi, *et al.* (2016), gejala klinis yang ditimbulkan WFS adalah terjadi perubahan morfologi udang vaname (*L. vannamei*) dan lingkungannya. Selain itu terjadi penurunan nafsu makan pada udang yang juga menurunkan kenaikan bobot udang perhari menjadi $\leq 0,1$ gram, sedangkan pada udang normal kenaikan bisa mencapai 0,2 gram perhari. Tingkat kelulushidupan pada udang vaname yang terinfeksi WFS hanya berkisar 20-30%. Perubahan morfologi udang vaname dan lingkungannya yang disebabkan infeksi WFS dapat dilihat pada Gambar 2. Terdapat kotoran yang berwarna putih yang mengapung dipermukaan perairan (A), dan tampak insang berwarna kehitaman (B).



Gambar 2. Gejala Klinis WFS pada Udang Vaname, (A) Kotoran Putih di Perairan, (B) Insang tampak kehitaman (Srinivas, *et al.*, 2016).

2.3 Kandungan pada Tinta Cumi-cumi (*Loligo* sp.)

Tinta cumi merupakan hasil sekresi dari kantung tinta yang tidak memiliki nilai jual apabila dalam proses pengelohannya tidak tepat. Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa tinta cumi telah digunakan sebagai pengobatan tradisional dikarenakan kandungan yang dimilikinya. Kandungan utama pada tinta cumi adalah asam oleat. Fadjar, *et al.*, (2015) memaparkan bahwa dari hasil uji GC-MS ekstrak tinta cumi-cumi mengandung senyawa asam oleat. Kandungan asam oleat dalam ekstrak tinta cumi-cumi dapat membunuh bakteri secara langsung. Asam oleat dalam tinta cumi dapat menempel pada membran bakteri (misalnya, ceragenin dan lipopeptida), yang kemudian merusak struktur dinding sel bakteri.

Tinta cumi juga memiliki sifat alkaloid, alkaloid merupakan kelompok terbesar dari metabolit sekunder yang beratom nitrogen dan bersifat basa, beberapa alkaloid memiliki manfaat dalam proses pengobatan. Tinta cumi mengandung butir-butir melanin atau pigmen hitam. Melanin ini berfungsi untuk mengikat protein melalui asam amino yang mengandung sulfur, misalnya sistein yang bisa mengikat sel darah putih dan berguna mencegah antikanker (Pringgenies, *et al.*, 2014). Melanin dari tinta cumi-cumi mempunyai aktivitas anti-

tumor dan aktivitas antibakteri. Melanin juga berperan sebagai antioksidan, anti radiasi, meningkatkan sistem imun (Fitrial dan Khotimah, 2017).

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses yang digunakan untuk memisahkan beberapa zat yang diinginkan dari campurannya menggunakan bantuan pelarut. Salah satu faktor penting yang menentukan keberhasilan ekstraksi dalam menggunakan pelarut adalah pemilihan jenis pelarut yang digunakan. Pelarut yang biasanya digunakan adalah etanol, n-heksan, dan metanol (Ariyani, *et al.*, 2008). Pelarut-pelarut tersebut akan mempengaruhi jenis senyawa bioaktif yang terekstrak karena masing-masing pelarut mempunyai efisiensi dan selektifitas yang berbeda untuk melarutkan komponen bioaktif (Sartika, *et al.*, 2013).

Pembuatan ekstrak dapat dilakukan dengan beberapa metode. Salah satu yang umum digunakan adalah metode maserasi. Maserasi merupakan proses ekstraksi sederhana dengan merendam bahan dalam pelarut dalam beberapa hari pada suhu ruang dan terhindar dari cahaya. Proses maserasi dilakukan dengan pengadukan 1 menit secara manual pada suhu ruang dan terlindungi dari cahaya, kemudian didiamkan selama 12 jam (Damayanti dan Fitriana, 2012). Metode maserasi umum digunakan karena metode ini tergolong sederhana dan cepat tetapi sudah dapat mencari zat aktif yang diinginkan dengan maksimal. Hasil dari proses maserasi berupa ekstrak cair dan dilanjutkan pada proses evaporasi untuk diperoleh ekstrak kental (gel) (Sa'adah dan Nurhasnawati, 2015).

2.5 Antimikroba

Zat antimikroba adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan atau metabolisme mikroorganisme. Berdasarkan aktivitasnya, zat antimikroba dibedakan menjadi dua jenis, yaitu zat antimikroba yang bersifat membunuh

mikroorganisme disebut *microbicial*. Sementara itu, zat yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme disebut *microbiostatic*. Aktivitas antimikroba ditandai dengan terbentuknya suatu zona bening atau zona hambat di sekitar kertas cakram (Saskiawan dan Hasanah, 2015). Dalam perkembangannya, zat antimikroba yang banyak beredar luas saat ini cenderung bersifat sintetik. Jika digunakan secara terus-menerus dapat menimbulkan gangguan bagi kesehatan (Harmanto, 2012).

Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat berupa perusakan dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Di bidang farmasi, bahan antibakteri dikenal dengan nama antibiotik, yaitu suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. Senyawa antibakteri dapat bekerja sebagai bakteristatik, bakterisidal, dan bakterilitik (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

2.6 Cyclophilin A (CypA)

2.6.1 Pengertian CypA

Sistem imun merupakan respon organisme terhadap adanya patogen atau kualitas air menurun. Sistem imun bekerja apabila reseptornya bekerja dengan baik. Hal ini dikarenakan reseptor tersebut digunakan sebagai indikasi perubahan lingkungan dan infeksi patogen. Salah satu reseptor sistem imun untuk menangkap sinyal adalah *CypA*. *Cyclophilin A* adalah protein konvensional yang ada pada bakteri, jamur, tumbuhan, dan mamalia. *CypA* berhubungan dengan

immunophilin dan penyusun dari cyclophilin (*Cyp*), FK binding protein (*FKBPs*) dan parvulins (Qiu, *et al.*, 2009).

CypA berperan penting pada sinyal sel, indikator beragam lingkungan buruk, *autoimmune* penyakit, dan patogenesis. *CypA* juga berfungsi dalam sistem imunitas bawaan hewan akuatik. *CypA* merupakan reseptor dari *immunosuppressor agent* cyclosporin A. Cyclosporin A merupakan protein yang menjalankan fungsi untuk mendapatkan kontak dengan protein lain atau disebut dengan penghubung (Muhammad, *et al.*, 2017).

2.6.2 Letak Gen *CypA*

CypA terletak di beberapa organ, diantaranya hepatopankreas, insang, organ limfoid, dan otot (daging). *LvCypA* tertinggi terletak pada otot, kemudian insang dan organ limfoid dan diikuti hepatopankreas. Hasil dari *real time* PCR menunjukkan bahwa ekspresi *LvCypA* terdapat pada jaringan otot yang lebih tinggi daripada organ limfoid dan hepatopankreas. Tingkat ekspresi otot 1.2 kali lipat lebih tinggi dari hepatopankreas, 0.4 kali lebih tinggi dari insang dan 0.8 kali lebih tinggi daripada organ limfoid (Muhammad, *et al.*, 2017). Qiu, *et al.* (2009), memaparkan dalam penelitiannya bahwa ekspresi dari *CypA* terdapat juga pada ovarium, hati, darah dan otak pada udang.

2.6.3 Pengaruh *CypA*

Faktor yang mempengaruhi tingkat produksi dalam usaha budidaya crustacea antara lain adalah kesehatan, laju pertumbuhan, dan kelulushidupan. Secara fisiologis udang yang mengalami kerusakan sel, ditandai dengan karapas yang lembek serta berenang yang tidak normal. Hal ini dipengaruhi karena terganggunya gen reseptor pada udang. Gen reseptor tersebut salah satunya adalah *Cyclophilin A* (*CypA*). *CypA* berpengaruh dalam respon rangsangan inflamasi seperti infeksi dan hipoksia (De Wilde, *et al.*, 2018). *CypA* juga memiliki

peran penting dalam sinyal sel, apoptosis, merespon adanya lingkungan yang buruk, sistem *auto-imun* penyakit dan patogenesis (Muhammad, *et al.*, 2017).

2.7 Teknik Analisis Biologi Molekuler

2.7.1 Isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan tahap pertama dari berbagai teknologi analisis DNA. DNA dapat ditemukan baik pada kromosom inti maupun pada organel yaitu pada mitokondria dan kloroplas. Untuk mengekstrak DNA diperlukan langkah – langkah laboratorium untuk memecahkan dinding sel dan membran inti, dan dilanjutkan dengan pemisahan DNA dari berbagai komponen sel yang lain. Pada saat melakukannya harus dijaga agar DNA tidak rusak dan didapatkan DNA dalam bentuk rantai yang panjang (Fatchiyah, *et al.*, 2009).

Proses pengeluaran DNA dari tempatnya berada (ekstraksi atau lisis) biasanya dilakukan dengan homogenasi dan penambahan buffer ekstraksi atau buffer lisis untuk mencegah DNA rusak. Untuk membantu terjadinya lisis biasanya dilakukan inkubasi pada suhu sekitar 60°C. Dalam proses ini biasa digunakan senyawa – senyawa phenol, chloroform, dan isoamyl alcohol untuk memaksimalkan proses lisis (Fatchiyah, *et al.*, 2009). Tan dan Yiap (2009) mengatakan bahwa ekstraksi DNA menggunakan prosedur *phenol-chloroform*. *Phenol-chloroform* adalah salah satu contoh, yang secara luas digunakan untuk ekstraksi DNA. Untuk ekstraksi RNA sering menggunakan kit daripada metode manual. Chen *et al.* (2007), melakukan ekstraksi RNA menggunakan kit *Purescript® RNA Isolation Kit* (Gentra). Karena RNA lebih gampang terkontaminasi saat melakukan ekstraksi.

2.7.2 Primer

Primer merupakan oligonukleotida sintesis, umumnya terdiri atas 12 hingga 20 basa, yang berfungsi sebagai prekursor sintesis DNA dari DNA template. Oligonukleotida memiliki urutan sekuens berbeda dan komplementer dengan utas yang berlawanan pada DNA template. Pada proses PCR diperlukan adanya satu set primer yang masing-masing terletak di kedua ujung fragmen DNA target, yaitu primer *forward* (arah sintesis maju) dan *reverse* (arah sintesis terbalik), yang dikatalisis oleh DNA polimerase (Dienffenbach dan Dveksler, 1995).

Perancangan primer dilakukan berdasarkan sekuens basa atau asam amino yang konservatif. Tingkat konservatif dapat diperoleh melalui penjajaran (*alignment*) beberapa sekuens. Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam perancangan primer untuk mengoptimalkan perolehan hasil amplifikasi, yaitu terbebas dari pembentukan struktur sekunder (*hairpin*/struktur tusuk konde, *self dimer*, dan *cross dimer*), besar amplicon, panjang primer, titik leleh, dan kestabilan internal proses PCR (Riupassa, 2009).

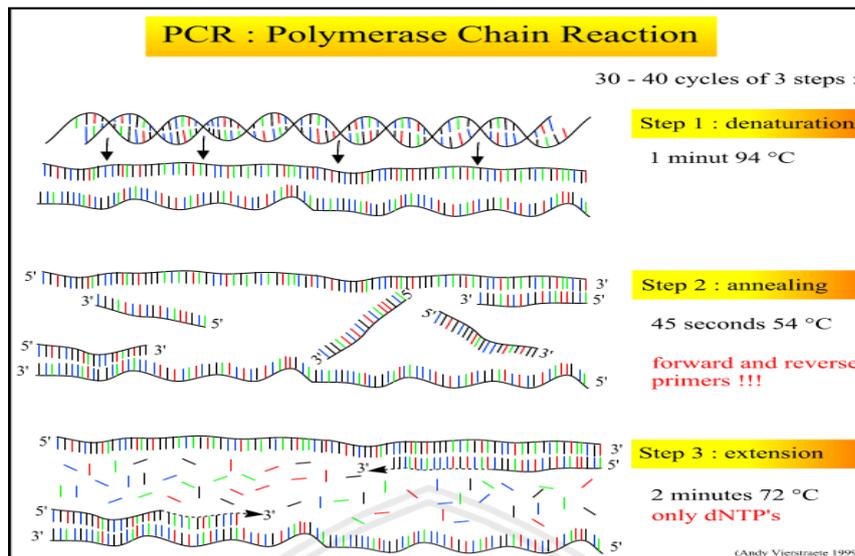
2.7.3 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR adalah salah satu teknik dalam biologi molekuler untuk mengamplifikasi atau menggandakan sejumlah kecil DNA secara *in vitro* menggunakan sistem enzimatik dan suhu. PCR juga disebut sebagai metode untuk mendeteksi dan mengukur virus pada sampel (Sedlak dan Jerome, 2013)., Salah satu pengaplikasian PCR di dunia medis yaitu digunakan sebagai forensik untuk mengidentifikasi penjahat dan mendiagnosa penyakit (Garibyan dan Avashia, 2013).

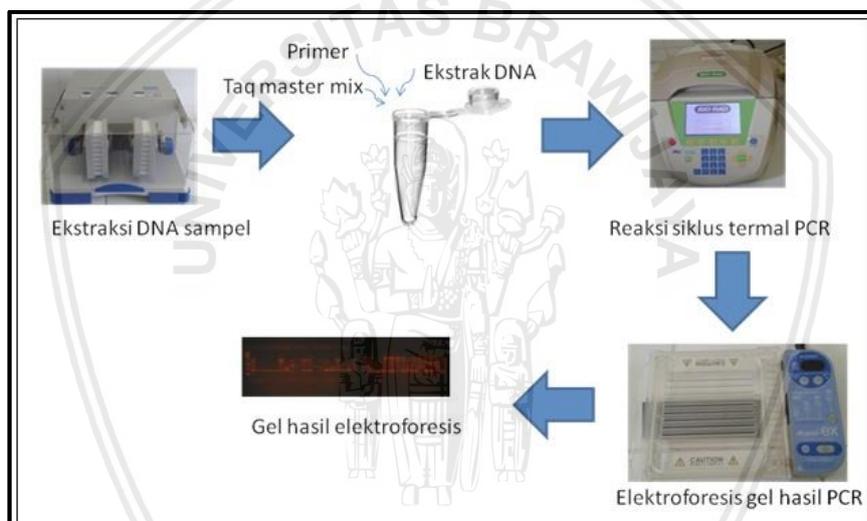
Komponen yang dibutuhkan dalam reaksi PCR adalah DNA target (*template*) yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, oligonukleotida primer yaitu suatu sekuens oligonukleotida pendek (15 - 25 basa nukleotida) yang

digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), bufer, dan yang terakhir enzim DNA polimerase sebagai katalis reaksi sintesis rantai DNA (Yuwono, 2006).

Reaksi PCR terdiri atas beberapa siklus, biasanya 20 sampai 40 siklus. Setiap siklus PCR, DNA polimerase akan menggandakan DNA sebanyak dua kali. Reaksi PCR terdiri atas 3 tahapan berulang seperti pada Gambar 4. Tahapan tersebut yaitu denaturasi (*denaturation*), penempelan (*annealing*), dan pemanjangan (*extension*). Pemisahan untai DNA (denaturasi) dilakukan pada suhu 94°C selama 60 detik sehingga terjadi pemisahan utas ganda DNA menjadi dua utas tunggal DNA yang menjadi cetakan (*template*) tempat penempelan primer dan tempat kerja *DNA polimerase*. Selanjutnya proses penempelan yang dilakukan pada suhu 54°C agar terjadi hibridisasi dengan pita DNA selama 45 detik. DNA polimerase akan memasang dNTP yang sesuai dengan pasangannya, jika basa pada cetakan adalah A (adenin) maka akan dipasangkan dengan *deoxythiamine triphosphate* (dTTP) dan begitu seterusnya. Tahapan yang terakhir yaitu pemanjangan. Suhu pada tahap ini dinaikkan 72°C yang merupakan suhu optimum Taq DNA polimerase untuk polimerisasi selama 30 detik. Polimerisasi DNA akan mensintesis pita-pita DNA baru dengan cara memanjangkan rantai primer. Waktu pemanjangan bergantung pada panjang daerah yang akan diamplifikasi (Bintang, 2010). Tahapan reaksi PCR dan prosedur pelaksanaan PCR dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Tahapan Reaksi PCR (Sambrook, *et al.*, 1989)



Gambar 4. Prosedur umum pelaksanaan PCR (Suharsono dan Wdyastuti, 2006)

2.7.4 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul Bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk, dan ukuran. Dengan demikian elektroforesis dapat digunakan untuk separasi makromolekul (seperti protein dan asam nukleat) (Fatchiyah *et al.*, 2009). Elektroforesis digunakan untuk identifikasi, pemisahan, dan purifikasi fragmen DNA.

Pada prinsipnya molekul DNA yang bermuatan negatif akan bermigrasi ke elektroda positif karena molekul DNA negatif mengandung gugus fosfat (Sambrook dan Russel, 2001). Proses identifikasi lokasi fragmen DNA dilakukan dengan menggunakan 1 μ l pewarna etidium bromida yang ditambahkan ke 5 μ l DNA dan 2% gel agarose (Reddy, 2013). Etidium bromida digunakan untuk visualisasi DNA dibawah sinar UV (305 nm), karena pita DNA dapat berikatan dengan pewarna tersebut. semakin besar ukuran pita DNA yang terbentuk pada media gel agarose, maka konsentrasi DNA semakin baik.

2.7.5 Sekuensing

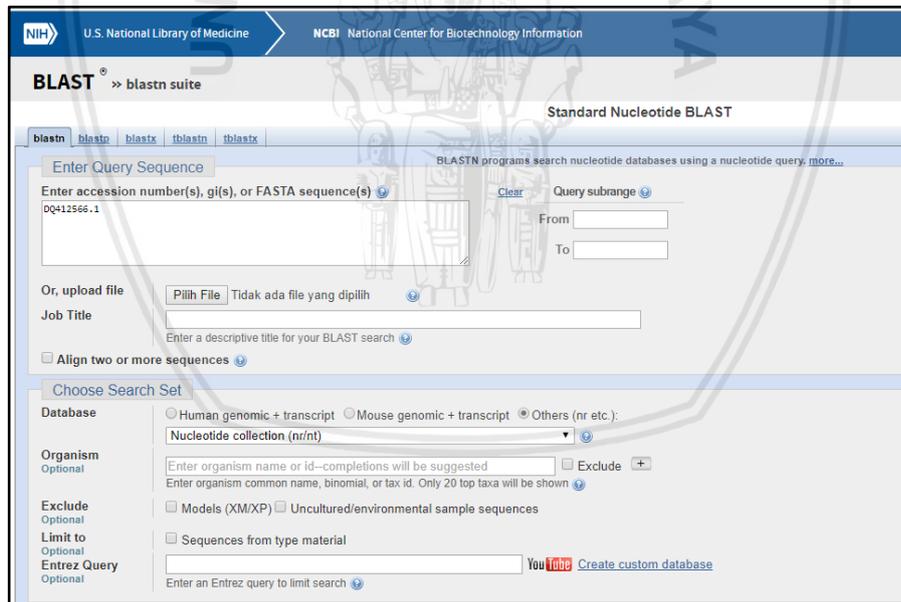
Sekuensing DNA atau pengurutan DNA adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuens DNA, yang merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup (Roger, 2011). Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuens-nya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui (Glick, 2010).

Metode sekuensing otomatis mampu mengurutkan sekuens DNA lebih banyak dalam waktu yang lebih singkat. Prosedur yang dijalankan oleh mesin sekuensing DNA otomatis dilakukan dalam tabung tunggal yang berisi keempat ddNTP, masing-masing diberi label dengan pewarna warna yang berbeda. Seperti dalam metode Sanger yang manual, DNA dipisahkan pada gel. Dalam sekuensing otomatis menggunakan ABI 377 alat analisis genetik otomatis yang menggunakan sistem lempengan gel elektroforesis. Terakhir ABI 310 mesin penganalisa ukuran fragmen genetik menganalisis produk sekuensing dengan sistem elektroforesis berbasis kapiler, selanjutnya keempat pewarna berpendar pada panjang

gelombang yang berbeda, kemudian laser membaca gel untuk menentukan identitas dari band masing-masing sesuai dengan panjang gelombang di mana ia berfluoresensi. Hasilnya kemudian digambarkan dalam bentuk kromatogram, dimana puncak berwarna sesuai dengan posisi urutan nukleotida (Agrawal, 2008).

2.7.6 Program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

Program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) adalah program dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) yang digunakan untuk mencari similaritas dari suatu sequence nukleotida atau protein dengan *sequence database* yang terdapat pada *GenBank*. Similaritas tersebut digunakan untuk mengetahui fungsi dari suatu gen, memperkirakan anggota baru dari suatu famili, dan mengetahui hubungan kekerabatan (NCBI, 2011). Layout website NCBI dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Layout dari website NCBI yang memuat program BLAST (NCBI, 2011).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Alat-alat penelitian yang digunakan

No.	Alat	Kegunaan
1.	Kulkas	Untuk menyimpan bahan pada suhu dingin
2.	Kabel roll	Untuk menghubungkan arus listrik
3.	Gelas ukur 100 ml	Sebagai alat mengukur larutan
4.	Mikropipet 100-1000 μ l	Untuk mengambil bahan yang berbentuk cair
5.	Timbangan analitik	Sebagai alat penimbang bahan dengan ketelitian 10^{-4}
6.	Nampan	Sebagai tempat menyimpan alat
7.	<i>Washing bottle</i>	Sebagai tempat menyimpan akuades dan tempat menyimpan alkohol untuk sterilisasi
8.	Refraktometer	Sebagai alat untuk mengukur salinitas
9.	Botol <i>sprayer</i>	Untuk tempat menyimpan larutan air hangat yang telah dicampur ekstrak tinta cumi-cumi dan untuk wadah klorin
10.	Pipa paralon	Untuk <i>shelter</i> /tempat berlindung udang
11.	<i>Heater</i> masak	Untuk memasak air hangat
12.	Ember 25 L	Untuk wadah air laut
13.	Mikropipet 1-10 μ l	Untuk mengambil bahan yang berbentuk cair
14.	Selang aerasi	Untuk menyalurkan O_2 dari aerator ke media
15.	Batu aerasi	Untuk memecah O_2 yang dihasilkan oleh aerator ke air
16.	<i>Spin Down</i>	Untuk membantu menghomogenkan larutan
17.	<i>Heater</i> akuarium	Untuk memberikan suhu panas yang sesuai
18.	Seser	Untuk mempermudah dalam memindahkan udang
19.	Akuarium 30x30x40 cm	Untuk wadah pemeliharaan udang
20.	pH meter	Untuk mengukur besarnya pH dalam media pemeliharaan
21.	Thermometer	Untuk mengetahui suhu air sampel
22.	DO meter	Untuk mengukur kandungan DO dalam media pemeliharaan
23.	Mikroskop	Untuk membantu pengamatan plankton

Tabel 1. (Lanjutan)

No.	Alat	Kegunaan
24.	<i>Gel Doc</i>	Untuk visualisasi hasil amplifikasi
25.	<i>Thermal cycler</i>	Untuk mengamplifikasi sampel DNA
26.	<i>Casting ray</i>	Untuk membuat mencetak gel agarose
27.	Pipet tetes	Untuk membantu mengambil air bersalinitas
28.	Blower	Untuk sumber oksigen utama
29.	<i>Gel tank</i>	Untuk wadah gel agarose
30.	Hotplate	Untuk memanaskan larutan
31.	Erlenmeyer	Untuk wadah menghomogenkan larutan
32.	Pipet volume	Untuk membantu mengambil larutan
33.	Bola hisap	Untuk membantu pipet volume
34.	Statif	Untuk tempat buret
35.	Buret	Untuk wadah larutan
36.	Paranet	Untuk pelindung agar udang tidak melompat keluar dari toples
37.	Klip kertas	Untuk menjepit paranet
38.	Loyang	Untuk tempat pakan yang telah disemprot ekstrak tinta cumi-cumi
39.	Inkubator	Untuk menginkubasi pakan
40.	Microwave	Untuk memanaskan gel agarose
41.	Microtiter	Untuk menghomogenkan amplicon dengan <i>loading dye</i>
42.	Nanodrop spectrofotometer	Untuk uji kualitatif DNA
43.	<i>Sectio set</i>	Untuk membantu mengambil sampel udang
44.	Sentrifuge dingin	Untuk memisahkan supernatan dan residu
45.	<i>Sprayer</i>	Untuk wadah alkohol 70%
46.	Komputer	Untuk menjalankan alat software
47.	Rak tip	Untuk wadah tip sebelum digunakan
48.	Printer	Untuk mencetak hasil aplikasi software
49.	Combs	Untuk membuat sumuran pada gel agarose
50.	Kamera	Untuk mendokumentasikan selama kegiatan

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini dapat dilihat pada

Tabel 2.

Tabel 2. Bahan-bahan penelitian yang digunakan

No.	Bahan	Kegunaan
1.	Ekstrak tinta cumi-cumi (<i>Loligo sp.</i>)	Sebagai bahan yang akan diuji pengaruhnya
2.	Aquades	Sebagai bahan pelarut
3.	Udang vaname (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Sebagai objek yang diuji

Tabel 2. (Lanjutan)

No.	Bahan	Kegunaan
4.	Aluminium foil	Sebagai bahan yang digunakan untuk membungkus ekstrak tinta cumi-cumi
5.	Alkohol 70%	Sebagai pengondisian aseptis
6.	Kertas label	Sebagai penanda
7.	Tisu	Sebagai bahan pembersih
8.	Air tawar	Sebagai bahan pembuat air payau
9.	Air laut	Sebagai bahan pembuat air payau
10.	Air payau	Sebagai media hidup udang vaname
11.	Methanol	Sebagai bahan fiksasi
12.	Pakan	Sebagai pakan udang selama pemeliharaan
13.	Test kit (Nitrit, Nitrat Amonia)	Sebagai pengukur kadar nitrit, nitrat, amonia
14.	KmnO ₄	Sebagai oksidator dan larutan titrasi TOM
15.	H ₂ SO ₄	Sebagai katalisator
16.	Na-Oxalat	Sebagai reduktor
17.	Air sampel	Sebagai sampel yang diukur kualitas airnya
18.	Methyl orange	Sebagai pengondisian asam
19.	HCl 0,02 N	Sebagai larutan titrasi alkalinitas
20.	Tube 1,5 ml steril	Sebagai wadah larutan ekstraksi
21.	Tube PCR 10 µl	Sebagai wadah sampel PCR
22.	Blue tip	Sebagai pembantu mengambil larutan
23.	Yellow tip	Sebagai pembantu mengambil larutan
24.	White tip	Sebagai pembantu mengambil larutan
25.	Trashbag	Sebagai penutup toples akuarium
26.	Masker	Sebagai pelindung mulut
27.	Lateks	Sebagai pelindung tangan
28.	Larutan elusi (TE-Buffer)	Sebagai larutan blanko uji kuantitatif DNA
29.	Larutan Kit Tiangen (Buffer GA, Buffer GB, Buffer GD, Buffer DW, Buffer TE, Proteinase K, Spin Column, Etanol Absolut)	Sebagai larutan Ekstraksi DNA
30.	Primer CypA	Sebagai pembatas DNA Target yang akan diduplikasi
31.	Go Taq Green	DNTP; sebagai cetakan DNA yang akan diduplikasi
32.	ddH ₂ O	Sebagai pelarut saat proses <i>mixing</i>
33.	Bubuk agarose	Bahan dasar pembuatan agarose
34.	Etbr	Pelarut pembuatan agarose

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode penelitian deskriptif. Metode penelitian deskriptif merupakan suatu penelitian yang digunakan untuk mendeskripsikan atau menjelaskan suatu kejadian yang ada pada saat ini atau pada masa lampau, baik kejadian tersebut bersifat ilmiah atau rekayasa dari manusia (Sukmadinata, 2011). Adapun tujuan dari penelitian deskriptif yaitu untuk membuat suatu gambaran penjelasan atau lukisan yang disusun secara sistematis, faktual dan akurat mengenai kejadian nyata (fakta), sifat-sifat atau hubungan antar kejadian yang sedang diamati dan sedang diteliti oleh seorang peneliti (Hamdi dan Baharuddin, 2014).

3.3 Teknik Pengambilan Data

Proses pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung. Hasanah (2016) mendefinisikan observasi sebagai aktivitas mencatat suatu gejala dengan bantuan instrumen-instrumen dan merekamnya dengan tujuan ilmiah atau tujuan lain. Lebih lanjut dikatakan bahwa observasi merupakan kumpulan kesan tentang dunia sekitar berdasarkan semua kemampuan daya tangkap pancaindera manusia. Teknik observasi menurut Diantha (2016) dapat dibedakan menjadi dua yaitu teknik observasi langsung dan teknik observasi tidak langsung. Teknik observasi langsung adalah teknik pengumpulan data di mana peneliti mengadakan pengamatan secara langsung atau tanpa alat terhadap gejala-gejala subjek yang diselidiki baik pengamatan dilakukan dalam situasi yang sebenarnya maupun dilakukan dalam situasi buatan, yang khusus diadakan. Adapun teknik observasi tidak langsung adalah teknik pengumpulan data di mana peneliti mengadakan pengamatan terhadap gejala-gejala subjek yang ditelitinya dengan perantara sebuah alat.

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian adalah gambaran garis besar penelitian yang akan dilakukan oleh peneliti untuk mencapai tujuan tertentu. Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian deskriptif. Nursalam (2008) menjelaskan bahwa rancangan penelitian deskriptif bertujuan untuk menjelaskan atau menggambarkan, memberi suatu nama, situasi atau fenomena-fenomena yang ada, dalam menemukan ide baru. Penelitian deskriptif umumnya dilakukan dengan menunjukkan hubungan antar berbagai variabel. Hal yang harus diperhatikan pada setiap penelitian yaitu terdapat suatu desain atau rancangan. Rancangan ini digunakan sebagai panduan yang digunakan oleh peneliti dalam melakukan penelitian agar mencapai suatu tujuannya (Nursalam, 2008).

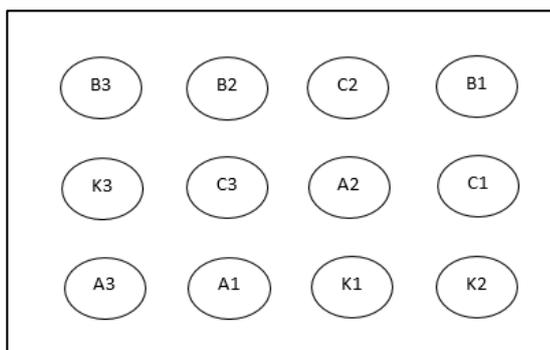
Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) yang mengacu pada penelitian sebelumnya oleh Anjaini (2016), bahwa dosis terbaik ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) untuk menghambat bakteri *V. harveyi* adalah 8 ppm. Dosis ekstrak cumi-cumi 8 ppm tersebut dilakukan pencampuran dengan *dispray* pada pakan. Pakan yang sudah tercampur ekstrak tinta cumi akan diberikan pada sampel perlakuan dan digunakan kontrol (sampel yang terinfeksi WFS) sebagai pembanding yang pakan tidak mengandung ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*).

Mengacu pada pernyataan diatas, maka pada penelitian ini digunakan tiga perlakuan dengan pada salinitas yang berbeda yaitu 24 ppt, 27 ppt, 30 ppt dan kontrol (33 ppt). Penentuan kadar salinitas yang digunakan didasarkan pada parameter dari variabel yang digunakan, yaitu toleransi kehidupan udang vaname dan bakteri *Vibrio* dimana merupakan bakteri yang diduga menyebabkan terjadinya WFS. Hasil pemaparan Taslihan (1992), *Vibrio* dapat tumbuh dengan baik pada kisaran salinitas 20-40 ppt. Sedangkan udang vaname memiliki toleransi

salinitas berkisar antara 0,5-45 ppt (Pasongli, *et al.*,2015). Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, sehingga didapatkan total sampel sebanyak 12 sampel. Pada setiap perlakuan nantinya akan diambil daging udang pada setiap ulangan. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- A : Perlakuan pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) yang dicampur pakan dengan dosis 8 ppm terhadap udang vaname yang terinfeksi WFS dengan salinitas media 24 ppt.
- B : Perlakuan pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) yang dicampur pakan dengan dosis 8 ppm terhadap udang vaname yang terinfeksi WFS dengan salinitas media 27 ppt.
- C : Perlakuan pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) yang dicampur pakan dengan dosis 8 ppm terhadap udang vaname yang terinfeksi WFS dengan salinitas media 30 ppt.
- K (+) : Perlakuan udang vaname yang terinfeksi WFS dan tanpa pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) yang dicampur pakan dengan salinitas media 33 ppt.
- K (-) : Perlakuan udang vaname yang tidak terinfeksi WFS (udang normal) dan tanpa pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*).

Denah penelitian disajikan pada Gambar 6 dibawah ini:



Gambar 1. Denah Penelitian

Keterangan:

A, B, C : perlakuan

K : kontrol

1,2,3 : ulangan

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Penelitian

a. Pengambilan Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*)

Tahap pengambilan tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) menjadi tahapan awal dalam penelitian ini, langkah-langkah sebagai berikut:

- Tahap pertama yang harus dilakukan dalam penelitian ini adalah pengambilan tinta dari cumi-cumi. Cumi-cumi yang digunakan berasal dari wilayah Pasuruan, Jawa Timur dalam keadaan segar. Pengambilan tinta diawali dengan pemotongan secara vertikal atau membujur bagian mantel (bagian bawah/posterior tubuh cumi-cumi) dengan *sectio set.* Kemudian kantong tinta cumi diambil menggunakan pinset. Pengambilan dilakukan dengan hati-hati untuk menghindari sobeknya kantong tinta.
- Kantong tinta cumi diletakkan pada wadah dan dipotong dengan menggunakan gunting, selanjutnya diperas untuk diambil tintanya (karena mengandung asam oleat) yang berwarna hitam pekat.
- Tinta cumi-cumi dimasukkan pada lemari pendingin untuk mencegah agar tinta tidak rusak.

b. Pembuatan Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*)

Tinta cumi diambil dari wilayah Pasuruan, Jawa Timur dalam keadaan segar. Adapun proses ekstraksi tinta cumi adalah sebagai berikut:

- Maserasi merupakan upaya perendaman tinta cumi-cumi dengan pelarut. Pada penelitian ini pelarut yang digunakan adalah pelarut metanol 96%. Perbandingan pencampuran antara tinta cumi-cumi dan pelarut (metanol)

adalah 1:3 yaitu 50 ml tinta cumi- cumi dengan 150 ml Metanol (Girija, *et al.* 2012).

- Tinta cumi-cumi diambil menggunakan gelas ukur sebanyak 50 ml dan metanol sebanyak 150 ml lalu dituangkan ke dalam toples.
- Mulut toples ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil kemudian diikat dengan tali.
- Toples disimpan selama 7 hari. Kemudian dilakukan evaporasi dengan menggunakan rotary evaporator.

Waktu yang digunakan untuk membuat ekstrak kasar tinta cumi-cumi adalah 7 hari. Waktu tersebut merupakan waktu untuk pelarut dapat mengikat biomolekul dari tinta cumi. Hal tersebut mengacu pada penelitian Girija, *et al.* (2012), Ekstraksi kasar dari biomolekul aktif dilakukan menggunakan pelarut. Setelah proses evaporasi dari 200 ml hasil maserasi tinta cumi dengan pelarut metanol didapatkan ekstrak kasar berbentuk pasta dengan berat 38,15 gram.

c. Sterilisasi

➤ Alat laboratorium

Sterilisasi merupakan upaya pengelolaan alat atau bahan dengan pemusnahan mikroorganisme patogen bakteri-bakteri hingga ke bagian sporanya (Sofiana dan Wahyuni, 2015). Proses sterilisasi dilakukan dengan metode sebagai berikut:

- Alat-alat yang akan disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas koran (tabung reaksi dan erlenmeyer bagian atas diberi kapas dan ditutup aluminium foil).
- Akuades dituang secukupnya dalam autoklaf, kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan ke dalam autoklaf dan ditutup rapat, selanjutnya ditekan ON.

- Setelah uap keluar, ditutup klep pada autoklaf dan ditunggu suhu sampai 121°C.
- Setelah mencapai suhu 121°C, pengatur suhu dikecilkan hingga lampu sterilisasi menyala. Kemudian pengatur waktu diputar pada 15 menit.
- Kemudian ditunggu proses sterilisasi hingga alarm berbunyi. Kemudian saklar listrik dimatikan dan ditunggu sampai suhu 0°C.

➤ **Akuarium pemeliharaan**

Sebelum dilakukan pemeliharaan, akuarium di sterilisasi terlebih dahulu menggunakan kaporit dosis 20.000 ppm dan direndam selama 24 jam. Kemudian ditambahkan larutan Na-thiosulfat 10.000 ppm ditunggu selama 24 jam. Selanjutnya, dibilas menggunakan air biasa. Setelah itu, dilakukan pencucian menggunakan sabun dan dibilas air, lalu dikeringkan. Selang aerator, batu aerator juga disterilisasi dengan cara direbus menggunakan air panas yang mendidih dan bersuhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$.

➤ **Media pemeliharaan udang vaname**

Sebelum dilakukan pengenceran, terlebih dahulu dilakukan sterilisasi menggunakan kaporit 20 gram yang dilarutkan kedalam 1 liter air laut. Selain air laut, media air tawar juga disterilisasi untuk percampuran proses pengenceran. Media pemeliharaan diberi aerasi untuk menghomogenkan. Setelah 24 jam, dinetralkan dengan Na-thiosulfat dengan penggunaan dosis $\frac{1}{2}$ dari penggunaan kaporit yaitu 10 gram yang dilarutkan kedalam 1 liter air.

d. Pengambilan Sampel Udang Vaname (*L. vannamei*)

Hewan uji yang digunakan yaitu udang vaname (*L. vannamei*) yang didapatkan dari UPT PPL Probolinggo sebanyak 400 ekor dengan menggunakan plastik yang dirangkap dua agar meminimalisir kebocoran. Udang vaname yang diambil memiliki bobot rata-rata 2,18 gram (nilai Standar Deviasi = 0,49)

e. Pengambilan Sampel *Blue Green Algae* (BGA) yang terinfeksi WFS

Blue Green Algae (BGA) diambil dari tambak Tani Manunggul 2, Kabupaten Tuban, Jawa Timur. Kepadatan BGA sebesar $213,33 \times 10^4$ sel/ml. Salinitas BGA yang didapat yaitu 33 ppt. BGA diambil menggunakan jerigen yang berkapasitas 30 liter menggunakan alat angkut roda empat.

f. Suplementasi Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo* sp.)

Prosedur penelitian penambahan suplementasi ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) ke dalam pakan dengan menggunakan metode *spray* (Kaemudin, *et al.*, 2016). Pertama dilakukan penimbangan ekstrak tinta cumi-cumi sesuai dosis perlakuan 8 ppm. Kemudian ekstrak tinta cumi-cumi dilarutkan ke dalam air hangat. Ekstrak yang sudah dilarutkan selanjutnya disemprot pada pakan secara merata dan diinkubasi pada suhu ruang (25°C) selama satu hari.

g. Kultur Bakteri *Vibrio harveyi*

Media yang digunakan untuk kultur bakteri adalah media *Nutrient Broth*. Kepadatan bakteri *V. harveyi* 10^{11} cfu/ml dan kepadatan untuk penginfeksi bakteri 10^6 cfu/ml. Kultur bakteri dilakukan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya didalam *Laminary Air Flow*. Setelah bakteri dikultur, dilakukan inkubasi didalam inkubator pada suhu 30°C.

3.5.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Pembuatan Media Air Tawar dan Air Laut

Pembuatan media dilakukan berdasarkan tiga perlakuan, antara lain A (24 ppt), B (27 ppt), C (30 ppt), dan kontrol (33 ppt). Pembuatan media bersalinitas berdasarkan penelitian Ali dan Waluyo (2015), bahwa pada tiap-tiap akuarium menggunakan rumus :

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

Dimana V_1 adalah volume media pemeliharaan, N_1 adalah salinitas air yang diinginkan, sedangkan V_2 adalah volume air BGA dan N_2 adalah salinitas yang sudah ditetapkan yaitu 33 ppt (salinitas air BGA). Air laut yang sudah ditambahkan air tawar dihomogenkan dengan cara diaerasi. Perhitungan pembuatan media dapat dilihat pada Lampiran 6.

b. Penginfeksian Bakteri *Vibrio harveyi*

Infeksi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan cara perendaman. Adapun wadah yang digunakan adalah akuarium yang memiliki kapasitas 25 L sebanyak 12 buah. Volume air laut yang diisikan ke dalam akuarium yaitu 20 L. Masing-masing akuarium ditebar 14 ekor udang (*DOC 30*). Udang tersebut direndam di air media yang berisi biakan bakteri 10^6 cfu/mL. Setiap akuarium diisi air media sesuai dengan tiga perlakuan salinitas dan kontrol, antara lain 24 ppt (A), 27 ppt (B), 30 ppt (C), dan 33 ppt (K).

Penginfeksian bakteri berdasarkan penelitian Suriyani, *et al.* (2013), menunjukkan dengan menggunakan biakan bakteri 10^6 cfu/mL dapat menginfeksi udang. Hal ini dapat dilihat 12 jam pasca infeksi ditemukan gen yang mengkode hemolisin. Gen ini digunakan sebagai penanda untuk deteksi Vibriosis.

c. Pemberian *Treatment* Pakan yang Telah Dicampur dengan Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*)

Pemberian pakan yang telah dicampur dengan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dilakukan sebanyak empat kali dalam sehari yaitu pukul 08.00, 12.00, 16.00, dan 20.00 WIB. Pemberian pakan sesuai FR (*Feeding Rate*) yaitu 5% dari total biomassa/hari. Padat tebar dalam satu akuarium diisi 14 ekor udang. Berat total biomassa dari satu akuarium yaitu 30,52 gram. Total pakan yang diberikan per hari dalam satu akuarium yaitu 1,53 gram. Pakan dimasukkan kedalam masing-

masing akuarium dengan perlakuan salinitas yang berbeda yaitu perlakuan A (24 ppt), perlakuan B (27 ppt), dan perlakuan C (30 ppt). Udang vaname dipelihara selama 14 hari dan diamati gejala klinis udang yang telah diberi *treatment* melalui pakan.

Udang putih dapat tumbuh baik dengan kepadatan tebar yang tinggi, yaitu 60-150 ekor/m². Dengan tingkat pertumbuhan 1-1,5 gr/minggu. Hal ini disebabkan udang putih mampu memanfaatkan kolom air sebagai tempat hidup sehingga ruang hidup udang menjadi lebih luas (Supono, 2006). Hal ini sesuai dengan padat tebar yang digunakan dalam penelitian ini.

d. Pengukuran Kualitas Air

Penelitian ini dilakukan pengukuran kualitas air sebagai parameter penunjang. Pengukuran kualitas air dibagi menjadi dua yaitu kualitas air harian dan mingguan. Kualitas air harian diukur sebanyak dua kali dalam sehari yaitu pukul 08.00 dan 16.00 WIB. Parameter yang diukur harian adalah tingkat oksigen terlarut (*Dissolved Oxygen*), suhu air pada media pemeliharaan, derajat keasaman (pH) dan salinitas. Pengukuran kualitas air mingguan dilakukan sebanyak dua kali dalam dua minggu masa pengamatan. Parameter yang diukur yaitu nitrat, nitrit, ammonia, TOM dan alkalinitas.

e. Pengambilan Sampel Organ Udang Vaname (Daging)

Beberapa udang di setiap perlakuan dan ulangan diambil dagingnya, kemudian dilakukan uji PCR guna mengetahui pengaruh dari pemberian ekstrak tinta cumi-cumi terhadap gen *CypA* pada udang vanname dengan salinitas media yang berbeda. Pertama yaitu dipotong karapas punggung udang menggunakan *sectio set*, lalu dibuang bagian ususnya dan diambil hanya dagingnya saja. Sampel daging yang diambil adalah dari setiap perlakuan dengan tiga ulangan, masing-masing paling sedikit satu gram. Sampel daging diletakkan pada mikrotube ukuran

1.5 ml dan diberi label setiap masing-masing mikrotube. Selanjutnya sampel udang dicacah dan ditimbang sebanyak 0,05 gram guna ekstraksi DNA. Tahap selanjutnya dilakukan uji kuantitatif DNA, amplifikasi, elektroforesis dan sekuensing serta BLASTn untuk mengetahui ada atau tidaknya mutasi pada udang yang terkena WFS.

3.6 Paramater Uji

3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama dalam penelitian ini antara lain uji kuantitatif DNA, hasil elektroforesis dan hasil BLAST.

a. Uji Kuantitatif

Pada proses ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Kit Tiangen dengan prosedur sebagai berikut;

- Daging sampel yang sudah didapatkan ditimbang menggunakan timbangan analitik hingga didapatkan 0,05 gram.
- Sampel dicacah di dalam tube 1,5 ml dengan gunting hingga halus dan ditambahkan TE-Buffer pH 7.
- Setelah halus ditambahkan 200 μ L buffer GA dan 20 μ L proteinase-K dan dilapisi menggunakan paraffin.
- Selanjutnya sampel diinkubasi pada *thermo mixer* dengan suhu 56 °C semalam untuk mengoptimalkan proses lisis pada sel dengan kecepatan 800 rpm.
- Kemudian sampel disentrifugasi selama 8 menit dengan kecepatan 11.000 rpm, pada suhu ruang.

- Diambil supernatant dan ditambahkan buffer GB untuk memaksimalkan proses lisis dan meminimalisir kontaminan protein selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 70 °C selama 30 menit.
- Kemudian ditambahkan 200 µL etanol absolut untuk mengikat DNA dan divortex selama 10 detik.
- Setelah itu sampel dipindahkan ke *spin column* dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 4 menit.
- Selanjutnya ditambahkan 500 µL buffer GD dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 4 menit.
- Setelahnya ditambahkan 600 µL buffer PW dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 4 menit sebanyak 2 kali (diulang 1 kali lagi).
- Kemudian sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 6 menit untuk membersihkan sisa etanol yang menempel pada membran.
- Selanjutnya sampel dipindahkan ke tube 1,5 ml dan ditambahkan 25 µL Buffer-TE hangat untuk membantu meluruhkan DNA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit.
- Kemudian sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 8 menit, pada suhu ruang.
- Selanjutnya sampel ditambahkan 25 µL Buffer-TE hangat dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit.
- Langkah terakhir sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 8 menit, pada suhu ruang.

Setelah didapatkan hasil ekstraksi, selanjutnya diuji kemurnian DNA (kuantitas DNA). Uji kuantitasi DNA hasil lisis dilakukan dengan metode nanodrop spektrofotometri. Menurut Yulinery dan Nurhidayat (2015), metode spektrofotometri digunakan panjang gelombang A260 dan A280 nm untuk

mengetahui kemurnian DNA dan juga pengukuran konsentrasi DNA. Hasil uji nanodrop ialah berupa nilai kemurnian DNA pada $\text{\AA}260/\text{\AA}280$. Kemurnian DNA ditentukan dengan indeks kemurnian berkisar antara 1.8-2.0 (Sambrook and Russell, 2001).

Selanjutnya hal yang harus diperhatikan adalah nilai konsentrasi DNA yang ingin di amplifikasi. Nilai konsentrasi DNA yang terlalu besar harus dilakukan pengenceran. Pengenceran DNA dapat dilakukan dengan penambahan larutan ddH₂O yang disesuaikan dengan nilai perhitungan. Volume dari pengenceran DNA yang dilakukan dapat dilihat pada Tabel. 3. Perhitungan pengenceran konsentrasi DNA disajikan pada Lampiran 6.

Tabel 3. Volume Pengenceran Konsentrasi DNA

Perlakuan	Volume DNA (μL)	Volume ddH ₂ O (μL)
K (-)	3,6	46,4
A	5,2	44,8
B	5,1	44,9
C	6,8	43,2
K (+)	4,7	45,3

Keterangan : K (-) = kontrol negatif (udang normal); A = perlakuan A (salinitas 24 ppt); B = perlakuan B (salinitas 27 ppt); C = perlakuan C (salinitas 30 ppt); K (+) = kontrol positif (terinfeksi WFS) (salinitas 33 ppt)

b. Hasil Amplifikasi DNA

Amplifikasi bertujuan untuk memperbanyak DNA target yang kemudian akan divisualisasi menggunakan proses elektroforesis pada gel agarose. Amplifikasi memiliki beberapa tahapan dalam prosesnya yaitu predenaturasi, denaturasi, *annealing*, ekstension dan final ekstension. Pada setiap tahapannya memiliki suhu dan waktu yang berbeda sesuai dengan primer yang digunakan. Satu siklus proses amplifikasi dapat terjadi 30-40 siklus. Alat yang digunakan untuk proses amplifikasi yaitu *Thermal cycler* (Sriwulan dan Anshary, 2011).

Adapun yang harus dipersiapkan untuk proses amplifikasi, yaitu dilakukan pembuatan larutan PCR *mix*. Adapun komposisi larutan PCR *mix* dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi larutan PCR *mix*

Larutan	Volume (persampel)	Banyaknya Sampel	Volume Total (+1)
Primer F CypA (5'- CTG TAA AGT TTC AGA ACA TTC CCC C -3')	0,5 µL	5	3 µL
Primer R CypA (5'- GGA CAC CTA TCT TGT TTC ACC ACC T -3')	0,5 µL	5	3 µL
ddH ₂ O	2,75 µL	5	16,5 µL
2x Go Taq Green	5 µL	5	30 µL
BSA	0,25 µL	5	1,5 µL
DNA	1 µL	5	6 µL
Jumlah Volume PCR <i>Mix</i>			60 µL

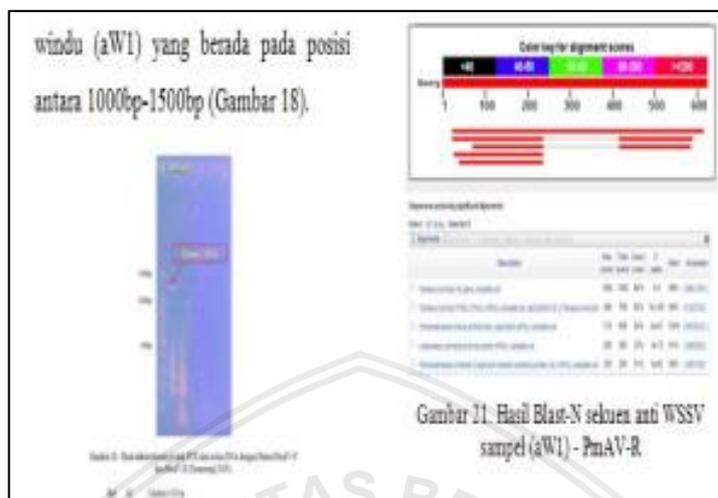
c. Hasil Elektroforesis

Visualisasi DNA dilakukan dengan cara pewarnaan dan dokumentasi sampel yang telah di PCR. Menurut Rahmi (2012), gel hasil elektroforesis di rendam dalam larutan Ethidium bromida (konsentrasi 1 mg/mL) selama 10-15 menit. Selanjutnya gel dicuci dengan akuadest selama 5-10 menit. Untuk mengetahui ada tidaknya infeksi virus terhadap sampel-sampel yang dideteksi, maka gel hasil elektroforesis diamati dengan menggunakan UV Transluminator yang sekaligus dilakukan pengambilan foto. Jika pewarnaan kurang sempurna, seperti terdapat pita-pita DNA tapi terlihat masih buram, maka perendaman dalam Ethidium bromida dan pencucian dengan akuades diulangi.

d. Hasil BLAST

Data sekuens sampel diambil melalui National Center for Biotechnology Information (NCBI) situs web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. Wulansari, *et al.* (2015), memaparkan bahwa pencarian gen spesifik yang diinginkan dapat menggunakan program Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) dalam situs NCBI:[http:// blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Hasil primer yang diperoleh

kemudian diuji pada web <http://www.oligoevaluator.com/OligoCalcServlet#>. Hasil BLAST sekuens dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 2. Hasil blast sekuens (Supriatna, *et al.*, 2014)

3.6.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah menghitung pengamatan gejala klinis dan kualitas air (suhu, DO, salinitas, pH, nitrat, nitrit, ammonia, TOM, dan alkalinitas).

a. Gejala Klinis

Pengamatan secara visual dilakukan untuk mengamati perubahan morfologi udang uji. Pengamatan dilakukan setelah udang diberi pakan yang telah dicampur dengan ekstrak tinta cumi-cumi pada media pemeliharaan yang diamati setiap 24 jam selama 2 minggu.

b. Pengukuran Kualitas Air

Parameter kualitas air yang diukur pada penelitian ini adalah tingkat oksigen terlarut (*Dissolved Oxygen*), suhu, derajat keasaman (pH), salinitas, nitrat, nitrit, amonia, TOM, dan alkalinitas. Pengukuran kualitas air harian meliputi DO, suhu, pH, dan salinitas. Pengukuran kualitas air harian dilakukan dua kali dalam sehari yakni pada pukul 07.00 WIB dan 16.00 WIB. Pengukuran suhu menggunakan termometer akuarium, yaitu dengan melekatkan termometer

akuarium ke dalam akuarium perlakuan lalu dilihat hasilnya. Pengukuran DO yaitu menggunakan DO meter, DO meter dimasukkan ke dalam akuarium pemeliharaan lalu ditunggu hingga menunjukkan angka yang stabil pada DO meter. Pengukuran pH yaitu menggunakan pH meter, pH meter dimasukkan ke dalam akuarium pemeliharaan lalu ditunggu hingga menunjukkan angka yang stabil pada pH meter. Pengukuran salinitas dilakukan dengan cara air sampel diteteskan pada alat refraktometer kemudian alat tersebut diarahkan pada cahaya sampai terlihat nilai salinitas yang tertera pada refraktometer pada sisi sebelah kanan.

Pengukuran kualitas air mingguan meliputi nitrit, nitrat, amonia, TOM, dan alkalinitas. Pengukuran kualitas air mingguan dilakukan dua kali selama penelitian. Pengukuran nitrit, nitrat, dan amonia menggunakan test kit khusus untuk mengukur masing-masing ketiga parameter tersebut. Pengukuran TOM dan alkalinitas menggunakan metode titrasi larutan. Menurut Marwan (2015) pengukuran TOM menggunakan rumus :

$$TOM = \frac{(X - Y) \times 31,6 \times 0,01 \times 1000}{V \text{ air sampel}}$$

Keterangan :

- X : volume larutan titrasi awal (sampel) – volume larutan titrasi akhir (sampel)
 Y : volume larutan titrasi awal (aquades) – volume larutan titrasi akhir (aquades)
 31,6 : 1/5 dari BM KMnO₄ (1 mol KMnO₄ melepas 5 oksigen dalam reaksi ini)
 0,01 : Molaritas KMnO₄
 1000 : Konversi ml ke liter
 ml air sampel : jumlah air sampel yang digunakan.

Menurut Hastuti (2012) pengukuran alkalinitas menggunakan rumus :

$$Alkalinitas \text{ total} = \frac{V \text{ HCl} \times N \text{ HCl}}{ml_{\text{air sampel}}} \times \left(\frac{100}{2}\right) \times 1000$$

Keterangan :

V titran : Volume titran HCl yang terpakai
N titran : Normalitas HCl
100 : Molaritas CaCO₃
2 : Valensi dari CaCO₃
1000 : Konversi dari ml ke liter

c. Kelulushidupan Udang Vaname (SR)

Tingkat kelulushidupan (SR) merupakan tolak ukur keberhasilan kegiatan budidaya yang dinyatakan dalam prosentase. Tingkat kelulushidupan adalah jumlah semua organisme yang dibudidayakan dari awal tebar hingga panen. Adapun beberapa faktor yang dapat mempengaruhi tinggi rendahnya tingkat kelulushidupan udang dibagi menjadi dua yaitu faktor biotik dan abiotik. Contoh faktor biotik yaitu: predator, parasit, kompetitor, dan gen. Faktor abiotik diantaranya faktor fisika, kimia air atau yang biasa disebut kualitas air. Kualitas air yang baik dapat meningkatkan tingkat kelulushidupan organisme yang dibudidayakan (Fuady, *et al.*, 2013). Rumus untuk menghitung tingkat kelulushidupan (SR) adalah sebagai berikut:

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100\%$$

Keterangan:

SR : Survival Rate (%)

N_t : Jumlah udang hidup pada akhir penelitian (ekor)

N_o : Jumlah udang hidup pada awal pemeliharaan (ekor)

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh akan dilakukan analisa secara kuantitatif pada penelitian deskriptif mutlak dianalisa dengan menggunakan statistis. Statistik deskriptif digunakan menganalisa data yang bersifat kuantitatif dengan cara mendeskripsikan atau menggambarkan data apa adanya. Statistik deskriptif bisa berupa rata-rata hitung (mean), median, modus, kadang-kadang persentase dll.

Menurut Sugiono (2010), statistik deskriptif juga dapat dilakukan mencari kuatnya hubungan antar variabel melalui analisis korelasi, melakukan prediksi dengan analisis regresi dan membuat perbandingan dengan membandingkan rata-rata data sampel atau populasi. Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan salinitas dengan ekspresi gen *CypA* pada udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi WFS.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Parameter Utama

Penelitian tentang ekspresi gen *CypA* pada udang vaname ini terdiri dari dua tahapan, yaitu pengamatan di laboratorium dan pengujian. Pada tahap pengujian didapatkan data parameter utama. Tahapan pengambilan parameter utama yaitu isolasi DNA, amplifikasi DNA, visualisasi elektroforesis dan analisis sekuensing. Data parameter utama meliputi hasil uji kuantitatif DNA, hasil elektroforegram dan hasil skuensing.

4.1.1 Hasil Uji Kuantitatif

Hasil yang diperoleh dari pengujian kuantitatif tentang pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi dengan salinitas media yang berbeda terhadap gen *CypA* pada udang vaname yang terinfeksi WFS dari hasil ekstraksi DNA didapatkan hasil pada Tabel 5.

Tabel 1. Hasil uji kuantitatif DNA

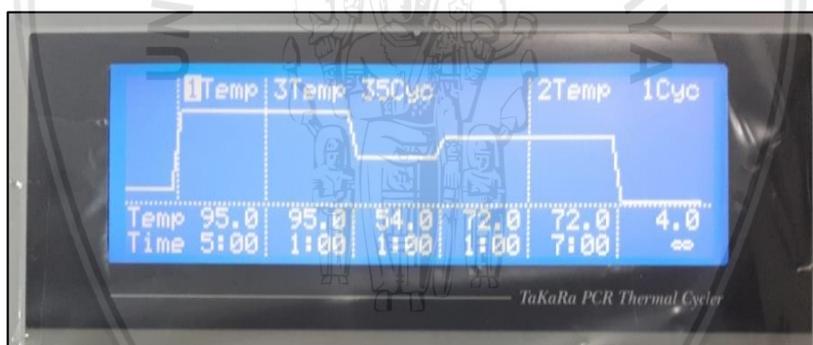
Sampel	Nilai Kemurnian ($\text{Å}260/\text{Å}280$)	Nilai Konsentrasi DNA (ng/ μL)
K (-)	1.98	1387,59
A	2.19	957.47
B	2.20	970.93
C	2.28	736.02
K (+)	2.30	1068.24

Keterangan : K (-) = kontrol negatif (udang normal); A = perlakuan A (salinitas 24 ppt); B = perlakuan B (salinitas 27 ppt); C = perlakuan C (salinitas 30 ppt); K (+) = kontrol positif (terinfeksi WFS) (salinitas 33 ppt)

Berdasarkan dari hasil uji kuantitatif menggunakan alat Nanodrop didapatkan nilai konsentrasi DNA dan nilai kemurnian DNA pada $\text{Å}260/\text{Å}280$. Digunakan DNA yang berkualitas baik untuk dilanjutkan pada tahapan selanjutnya, agar pita band DNA dapat terlihat dengan jelas. Pengujian Nanodrop dimana DNA

dikatakan berkualitas baik memiliki kemurnian 1,8 – 2,0 dan konsentrasi di atas 100 ng/ μ L (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Berdasarkan pernyataan tersebut, dapat dikatakan bahwa hasil kemurnian DNA yang didapat melebihi batas kemurnian yang sudah ditentukan. Hal ini dikarenakan pada daging udang mengandung banyak protein sehingga didapatkan kemurnian DNA cukup tinggi dimana melebihi batas kualitas kemurnian DNA yang baik. Hal ini sesuai dengan pendapat Fatchiyah, *et al.* (2011), kemurnian DNA dipengaruhi oleh kontaminan dari protein suatu organisme itu sendiri.

Tahapan selanjutnya adalah amplifikasi DNA. Adapun proses siklus amplifikasi yang dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi-cumi dengan salinitas media yang berbeda terhadap gen *CypA* pada udang vaname yang terinfeksi WFS dapat dilihat pada Gambar 8.



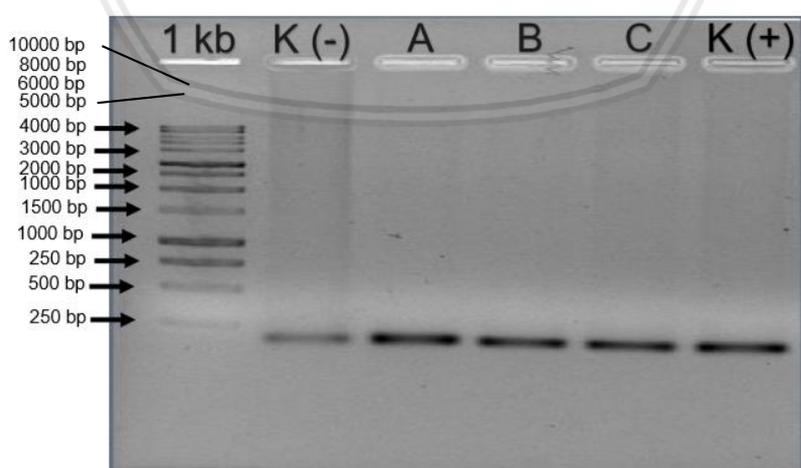
Gambar 1. Siklus amplifikasi PCR

Berikut adalah proses amplifikasi DNA pada alat *thermal cycler*. Tahapan pertama yang dilakukan adalah *Hot Start* (denaturasi awal) merupakan proses awal dari amplifikasi, pada proses ini berlangsung dengan suhu 95 °C selama 5 menit. Tahapan selanjutnya yaitu denaturasi, pada proses ini berlangsung dengan suhu 95 °C selama 1 menit. Adapun proses denaturasi merupakan denaturasi dua untai DNA template menjadi untai tunggal. Temperatur yang tinggi pada awal proses menyebabkan pemisahan untai ganda DNA. (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Tahapan selanjutnya adalah *annealing*, pada proses ini berlangsung dengan suhu

54 °C selama 1 menit. Adapun proses *annealing* merupakan proses penempelan DNA template, suhu *annealing* ditentukan oleh susunan primer yang digunakan. Optimalisasi temperatur *annealing* dimulai dengan menghitung suhu leleh dari ikatan primer dan DNA *template* (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Tahapan selanjutnya *extension*, pada proses ini berlangsung dengan suhu 72 °C selama 1 menit. Adapun proses *extension* merupakan proses pemanjangan untai baru DNA, dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Tahapan terakhir yaitu *Post extension*, pada proses ini berlangsung dengan suhu 72 °C selama 7 menit. Kemudian masuk ke denaturasi kembali dan diulang hingga 35 siklus.

4.1.2 Hasil Elektroforegram

Hasil dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi dengan salinitas media yang berbeda terhadap gen *Cyclophilin A (CypA)* pada udang vaname yang terinfeksi WFS dapat divisualisasi menggunakan elektroforegram, hasil elektroforegram disajikan pada Gambar 9.



Gambar 2. Hasil Elektroforegram Sampel Daging Udang (*CypA*)

Keterangan : K (+) = kontrol positif (udang normal); A = perlakuan A (salinitas 24 ppt); B = perlakuan B (salinitas 27 ppt); C = perlakuan C (salinitas 30 ppt); K (-) = kontrol negatif (terinfeksi WFS) (salinitas 33 ppt)

Berikut hasil panjang *basepair* dan ketebalan *band* setelah hasil PCR divisualisasi pada elektroforegram. Panjang *basepair* dan ketebalan *band* dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 2. Hasil uji panjang *basepair* dan ketebalan *band*

Sampel	<i>Basepair</i>	Volume (int)
Marker (1kb)	250	309985
K (-)	208.4191	2175160
A	203.4876	6032130
B	193.9718	4922970
C	184.901	5000840
K (+)	182.7004	7053150

Keterangan : K (-) = kontrol negatif (udang normal); A = perlakuan A (salinitas 24 ppt); B = perlakuan B (salinitas 27 ppt); C = perlakuan C (salinitas 30 ppt); K (+) = kontrol positif (terinfeksi WFS) (salinitas 33 ppt)

Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis yang dilakukan, gen *CypA* ditemukan pada panjang 182.7004 – 208.4191 bp dengan primer 250 bp. Primer yang digunakan pada proses amplifikasi (PCR) adalah 5'- CTG TAA AGT TTC AGA ACA TTC CCC C -3' (primer F) dan 5'- GGA CAC CTA TCT TGT TTC ACC ACC T -3' (primer R). Berdasarkan penelitian Muhammad, *et al.* (2017), hasil analisis sekuensing menunjukkan *LvCypA* ditemukan pada panjang 495 bp. Berdasarkan *database* NCBI cDNA dari gen *CypA* sebesar 855 bp. Analisis yang digunakan yaitu menggunakan *real time* PCR. Primer yang digunakan pada RT-PCR adalah 5' TCGCAGTTCTTCATCTGCAC 3' (primer F) dan 5' AGTTGCGCGATCACCCTTTC 3' (primer R). Penggunaan primer yang berbeda menghasilkan hasil visualisasi yang berbeda juga.

Berdasarkan hasil yang disajikan pada Tabel 5, sampel udang perlakuan A, B dan C memiliki ketebalan *band* yang lebih tinggi dibandingkan dengan udang normal, dimana hasil ketebalan *band* tertinggi didapatkan pada perlakuan A. Sedangkan pada kontrol memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel udang yang diberi perlakuan. Ardiana (2009), memaparkan perbedaan

suatu organisme dapat dideteksi melalui beberapa penanda, salah satunya yaitu pola pita DNA. Kuantitas DNA ditentukan dengan membandingkan ketebalan pita DNA contoh dengan pita standar λ DNA ladder (1 Kb DNA ladder). Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi hasil visualisasi DNA (elektroforesis) salah satunya yaitu proses isolasi DNA (ekstraksi DNA). Visualisasi pita *band* DNA yang tebal menunjukkan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan DNA yang terlihat pudar menunjukkan DNA total yang diekstrak terdapat ikatan antar molekul DNA yang terputus (Irmawati, 2003).

Berdasarkan hasil ketebalan *band* yang didapat dapat dikatakan bahwa pada perlakuan A gen *CypA* dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan B dan C, yang menunjukkan bahwa pada perlakuan A pemberian pakan dengan dosis 8 ppm tinta cumi sedikit berpengaruh. Sedangkan pada perlakuan B gen *CypA* dihasilkan lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan A dan C, yang menunjukkan bahwa perlakuan B (27 ppt) pemberian pakan dengan dosis 8 ppm tinta cumi paling berpengaruh dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Hal ini dapat dilihat dari volume intensitas ketebalan *band* yang lebih kecil, dimana gen *CypA* yang terekspresikan lebih rendah. Dapat dikatakan bahwa gen *CypA* pada sampel kontrol diproduksi lebih banyak dibandingkan dengan udang normal (sehat) dan udang yang diberi perlakuan ekstrak tinta cumi. Hal ini diduga karena gen *CypA* diproduksi lebih banyak oleh udang sebagai respon perubahan kondisi lingkungan yang buruk. Berdasarkan penelitian Chen, *et al.* (2011), spesies kerang (*V. philippinarum*) yang diinfeksi dengan bakteri *Vibrio* menunjukkan adanya peningkatan dari ekspresi gen *CypA* pada waktu ke 24 jam dan 96 jam pasca infeksi. Hal ini diduga adanya respon dari sistem imun untuk menanggapi adanya perubahan lingkungan atau adanya pathogen yang menginfeksi.

4.1.3 Hasil Sekuensing

Hasil dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi-cumi terhadap gen *CypA* pada udang vaname yang terinfeksi WFS dengan salinitas media yang berbeda, pada uji sekuensing parameter yang dilihat yaitu hasil FASTA gen *CypA*, identifikasi sampel menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), komposisi nukleotida gen *CypA* dan analisis mutasi gen *CypA*. Adapun hasil uji sekuensing dapat dilihat sebagai berikut:

a. Hasil FASTA gen *CypA*

Hasil dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi-cumi terhadap gen *CypA* pada udang vaname yang terinfeksi WFS dengan salinitas media yang berbeda, untuk hasil FASTA (udang vaname) setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 3. Hasil FASTA *L. vannamei*

No	Perlakuan	Hasil Sequencing FASTA Format
1.	K (-) (33 ppt)	TTTCGGAAAAGTTTCAGACCTTCCCTTAACCCGCCC CCATTTTTTTTTCTGATGTAATTGAGGATCCAGGATATA ATCTTTGCTGTATTGGCACTTCAGTGTTAAATTCGGCTG AAAATTTAAAGTATATAACGTAAAGGTGGTCAAACAGA AATTGGTTTCCC
2.	A (24 ppt)	GTTCTGTGTAATGTCAGAGCATACCCCCCAGCGCCCC ACATTTTTTTTTCTGATGTAATTGAGGATCCAGGATATA ATCTTTGCTTTATTGGCACTTCAGTGTTAAATTCGGCTG AAAATTTAATGCTATATAACGTAAAGGTGGTCAAACAAT ATGTGTTCAAA
3.	B (27 ppt)	TTTCTGTAAAGTTTCAGAACATTCCCCCTTAGCCGCCCA CAGTTTTTTTTCTGATGTAATTGAGGATCCAGGATATAA TCTTTGCTGTATTGGCACTTCAGTGTTAAATTCGGCTGA AAATTTAATGCTATATAACGTAAAGGTGGTCAAACAAGA TAGGTGTTCAA
4.	C (30 ppt)	TTTCTGTAAAGTTTCAGAACATTCCCCCTTAGCCGCCCA CAGTTTTTTTTCTGATGTAATTGAGGATCCAGGATATAA TCTTTGCTGTATTGGCACTTCAGTGTTAAATTCGGCTGA AAATTTAATGCTATATAACGTAAAGGTGGTCAAACAAGA TAGGTGTTCAA
5.	K (+) (33 ppt)	TTTCTGTAAAGTTTCAGAACATTCCCCCTTAGCCGCCCA CAGTTTTTTTTCTGCTGTAATTGAGGATCCAGGATATAA TCTTTGCTGTATTGGCACTTCAGTGTTAAATTCGGCTGA AAATTTAATGCTATATAACGTAAAGGTGGTCAAACAAGA TAGGTGTTCAA

Dapat dilihat pada Tabel 7 setiap sampel perlakuan didapatkan hasil FASTA menggunakan analisis aplikasi MEGA X. Hasil FASTA yang didapat ini digunakan untuk mencocokkan spesies ataupun gen sesuai dari primer yang digunakan. Pada tahapan selanjutnya FASTA ini juga dapat digunakan untuk menganalisis suatu alel yang muncul akibat adanya mutasi, jarak antar spesies, membuat pohon filogeni dan lain lain (Hall, 2013).

b. Identifikasi Sampel Menggunakan Analisis BLAST

Hasil dari analisis BLAST mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi-cumi terhadap gen *CypA* pada udang vaname yang terinfeksi WFS dengan salinitas media yang berbeda didapatkan dari *genbank*. Hasil dari analisis BLAST yaitu perbandingan urutan basa sampel dan urutan basa yang ada di *genbank* dengan melihat nilai *query cover*, *E-value* dan *identity*. *Query cover* merupakan persentase dari panjang nukleotida sampel yang selaras dengan *database* yang ada di *Genbank*. *E-value* merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik signifikan terhadap kedua sekuen. Semakin tinggi nilai *E-value* maka semakin rendah tingkat homologi antar sekuen. *Identity* merupakan nilai tertinggi dari presentase kecocokan antara sekuen sampel dengan sekuen dalam *database Genbank* (Valen, 2018). Hasil identifikasi sampel menggunakan analisis BLAST dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 4. Identifikasi Menggunakan Analisis BLAST

Sampel	Species outcome	BLAST			
		Access code of NCBI	Query Cover (%)	E-value	Identity (%)
K (-)	<i>L. vannamei CypA</i>	HQ894380.2	84	0.0	91
A	<i>L. vannamei CypA</i>	HQ894380.2	67	0.0	97
B	<i>L. vannamei CypA</i>	HQ894380.2	97	0.0	96
C	<i>L. vannamei CypA</i>	HQ894380.2	97	0.0	96
K (+)	<i>L. vannamei CypA</i>	HQ894380.2	97	0.0	95



Hasil analisis BLAST yang ditunjukkan pada Tabel 8 memiliki nilai *Query cover* antara 67-97 %, nilai *identity* antara 91-97 % dan *E-value* 0.0. Berdasarkan nilai yang diperoleh, artinya sekuen DNA sampel memiliki panjang sekuen yang sama dengan *database* yang ada di *Genbank* 67-97% dengan *E-value* 0.0 dapat disimpulkan bahwa sekuen sampel memiliki tingkat homologi yang sangat tinggi. Hal ini sama yang dikemukakan Christiningrum, *et al.* (2016), Nilai *E-value* yang dihasilkan bernilai 0 yang berarti sampel identik dengan spesies pembanding. Semakin tinggi nilai *E-value* maka semakin rendah homologi antar sekuens, sedangkan semakin rendah nilai *E-value* maka semakin identik.

c. Komposisi Nukleotida gen *CypA* L. *vannamei*

Hasil dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi-cumi terhadap gen *CypA* pada udang vaname yang terinfeksi WFS dengan salinitas media yang berbeda, untuk komposisi nukleotida gen *CypA* pada L. *vannamei* ditunjukkan pada Tabel 9.

Tabel 5. Komposisi Nukleotida gen *CypA*

Perlakuan	Basa (%)			
	T(U)	C	A	G
K (-)	35,3	18,6	27,5	18,6
A	34,1	18,6	28,1	19,2
B	34,7	16,8	28,7	19,8
C	34,7	16,8	28,7	19,8
K (+)	34,7	17,4	28,1	19,8

Hasil analisis komposisi nukleotida pada gen *CypA* pada L. *vannamei* menunjukkan bahwa jumlah rata-rata adenin dan timin ditemukan paling tinggi. sehingga gen *CypA* pada udang vaname dikategorikan sebagai kelompok kaya basa A-T (*A-T rich*). Untuk hasil sekuens DNA digambarkan menggunakan alfabet dimana A = adenin, T = timin, C = sitosis dan G = guanin. Terdapat ikatan antar nukleotida dimana untuk ikatan kuat digambarkan G-C karena memiliki 3 ikatan hidrogen, sedangkan untuk ikatan lemah digambarkan A-T dikarenakan hanya

memiliki 2 ikatan hidrogen (Lee and Luo, 1997). Dapat disimpulkan hasil yang didapatkan kemungkinan terjadinya mutasi gen *CypA* lebih tinggi.

d. Analisis Variasi Genetik Gen *CypA*

Hasil dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi-cumi terhadap gen *CypA* pada udang vaname yang terinfeksi WFS dengan salinitas media yang berbeda, untuk analisis variasi genetik gen *CypA* pada *L. vannamei* ditunjukkan pada Tabel 10.

Tabel 6. Analisis Variasi Genetik Gen *CypA* pada *L. vannamei*

Spesies	Posisi Nukleotida												
	1	5	7	8	9	11	13	19	21	23	28	29	30
K (-)	T	G	A	A	A	G	T	C	T	T	T	T	A
A	G	T	T	G	T	A	G	G	A	A	C	C	C
B	T	T	T	A	A	G	T	A	A	T	C	T	T
C	T	T	T	A	A	G	T	A	A	T	C	T	T
K (+)	T	T	T	A	A	G	T	A	A	T	C	T	T
	32	34	35	39	42	50	51	54	87	124	126	127	
K (-)	C	C	G	C	T	T	C	A	G	T	A	A	
A	G	G	C	A	T	T	C	A	T	A	T	G	
B	G	C	G	A	G	T	C	A	G	A	T	G	
C	G	C	G	A	G	T	C	A	G	A	T	G	
K (+)	G	C	G	A	G	C	T	C	G	A	T	G	
	128	154	155	157	158	159	161	162	163	164	166	167	
K (-)	G	G	A	A	T	T	G	T	T	T	C	C	
A	C	A	T	T	G	T	T	T	C	A	A	A	
B	C	A	G	T	A	G	T	G	T	T	A	A	
C	C	A	G	T	A	G	T	G	T	T	A	A	
K (+)	C	A	G	T	A	G	T	G	T	T	A	A	

Keterangan : Warna Kuning = adanya perubahan basa

Hasil analisis variasi genetik gen *CypA* udang vaname (*L. vannamei*) yang normal (K-) dibandingkan dengan udang yang terinfeksi WFS pada perlakuan dan kontrol (K+) memiliki basa nukleotida yang berbeda. Tabel 10 menunjukkan terdapat beberapa pola variasi genetik pada gen *CypA* yaitu terdapat perubahan sebagian dari basa nukleotida seperti timin menjadi guanin (T-G), adenin menjadi guanin (A-G), timin menjadi sitosin (T-C), adenin menjadi sitosin (A-C), adenin menjadi timin (A-T), sitosin menjadi guanin (C-G) dan ada juga yang sebaliknya. Adanya perubahan basa-basa tersebut diduga terdapat adanya suatu mutasi. Berdasarkan sumbernya mutasi yang ditemukan dapat digolongkan menjadi

mutasi buatan atau induksi, dimana disebabkan oleh adanya agen patogen (bakteri) yang disengaja ditambahkan oleh manusia (Warisno, 1998). Susan dan William (2007), menambahkan bahwa adanya perubahan satu basa purin menjadi satu basa pirimidin atau kebalikannya merupakan mutasi tranversi, sedangkan satu basa purin menjadi satu basa purin atau satu basa pirimidin menjadi satu basa pirimidin merupakan mutasi transisi. Berdasarkan pemaparan diatas maka didapatkan hasil bahwa terdapat mutasi tranversi dan mutasi transisi dimana sampel udang K(-) (udang normal) dibandingkan dengan perlakuan dan K(+) (udang terinfeksi WFS) . Mutasi tranversi terletak pada posisi nukleotida ke- 1 (A), 5 (A,B,C,K+), 7 (A,B,C,K+), 9 (A), 13 (A), 19 (A,B,C,K+), 21 (A,B,C,K+), 23 (A), 30 (A,B,C,K+), 32 (A,B,C,K+), 34 (A), 35 (A), 39 (A,B,C,K+), 42 (B,C,K+), 54 (K+), 87 (A), 124 (A,B,C,K+), 126 (A,B,C,K+), 128 (A,B,C,K+), 157 (A,B,C,K+), 158 (A,B,C,K+), 159 (B,C,K+), 161 (A,B,C,K+), 162 (B,C,K+), 164 (A), 166 (A,B,C,K+) dan 167 (A,B,C,K+). sedangkan mutasi transisi terletak pada posisi nukleotida ke- 8 (A), 11 (A), 28 (A,B,C,K+), 29 (A), 50 (K+), 51 (K+), 127 (A,B,C,K+), 128 (A,B,C,K+), 154 (A,B,C,K+), 158 (A,B,C,K+) dan 163 (A).

Total pasangan basa yang didapatkan dari hasil BLAST setiap perlakuan yaitu 167 bp, untuk perlakuan A (24 ppt) didapatkan perbedaan basa nukleotida sebesar 8,4% dari K(-), perlakuan B (27 ppt) didapatkan perbedaan basa nukleotida sebesar 13% dari K(-), perlakuan C (30 ppt) didapatkan perbedaan basa nukleotida sebesar 13% dari K (-) dan perlakuan K(+) (33 ppt) didapatkan perbedaan basa nukleotida sebesar 15% dari K(-). Berdasarkan perbedaan basa nukleotida yang berubah, dapat dikatakan sebagai polimorfisme. Yuyun (2015), adanya perubahan sekuens DNA disebut juga dengan mutasi. *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) digunakan untuk menjelaskan adanya perubahan satu pasang basa pada suatu populasi. Suatu populasi dikatakan polimorfisme yaitu

sedikitnya dua sekuens DNA yang berbeda memiliki perubahan sekuens sebesar > 1% dari populasi. Penyebab adanya perubahan dari susunan basa suatu individu adalah usaha untuk melakukan adaptasi terhadap lingkungan disekitarnya untuk bertahan hidup (Lemey, *et al.*, 2009).

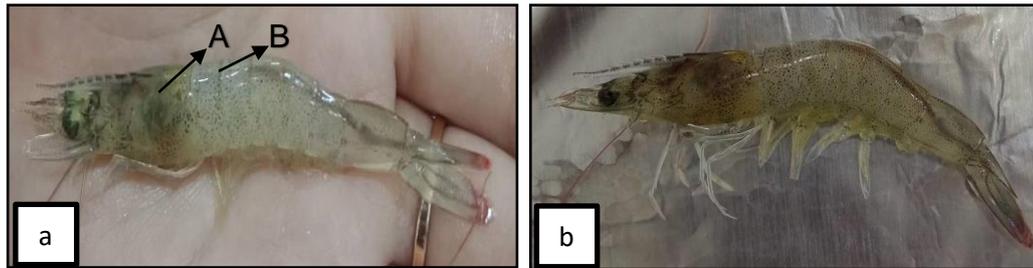
4.2 Parameter Penunjang

Penelitian mengenai ekspresi gen *CypA* pada udang vaname ini terdiri dari dua tahapan, yaitu pengamatan di laboratorium dan pengujian. Pada pengamatan di labortorium didapatkan data parameter penunjang. Adapun parameter penunjang yang diambil yaitu mengenai gejala klinis dan kualitas air.

4.2.1 Gejala Klinis

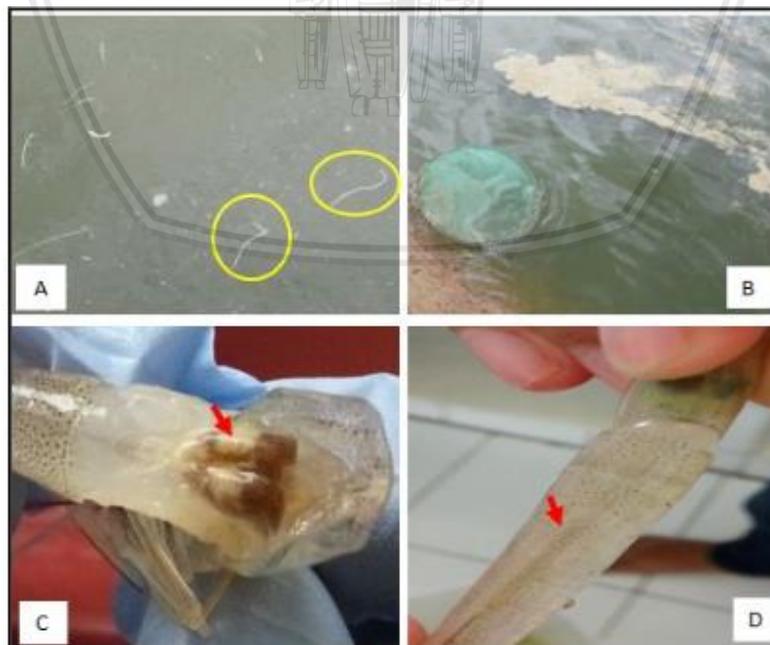
Pengamatan yang dilakukan secara visual untuk gejala klinis ini bertujuan untuk mengetahui perubahan morfologi udang vaname yang belum terinfeksi WFS, udang yang telah terinfeksi WFS dan udang yang telah diberi diberikan perlakuan ekstrak tinta cumi-cumi pada pakan. Pengamatan setelah pemberian ekstrak tinta cumi-cumi ini dilakukan pada akhir pemeliharaan.

Berdasarkan hasil pengamatan yang didapatkan pada perlakuan kontrol dimana diduga terinfeksi WFS terlihat udang berenang kurang aktif, hepatopankreas berwarna putih pucat, dan usus tampak kosong serta seperti terputus. Sedangkan perlakuan ekstrak tinta cumi-cumi 8 ppm pada perlakuan A (24 ppt), perlakuan B (27 ppt), dan perlakuan C (30 ppt) tampak berbeda dari ciri-ciri dan morfologi seperti perlakuan kontrol yang menunjukkan adanya tanda dari infeksi WFS. Pengamatan perbedaan morfologi udang vaname yang tidak diberi perlakuan ekstrak tinta cumi-cumi dan yang diberi perlakuan ekstrak tinta cumi-cumi dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 3. (a) Udang pada Perlakuan Kontrol (A) Hepatopankreas Tampak Putih Pucat, (B) Usus Tampak Kosong dan (b) Udang pada Perlakuan A,B, dan C.

Menurut hasil penelitian Jayadi, *et al.* (2016), gejala klinis yang ditimbulkan WFS adalah terjadi perubahan morfologi udang vaname (*L. vannamei*) dan lingkungannya. Selain itu terjadi penurunan nafsu makan pada udang yang juga menurunkan kenaikan bobot udang perhari menjadi $\leq 0,1$ gram, sedangkan pada udang normal kenaikan bisa mencapai 0,2 gram perhari. Perubahan morfologi udang vaname dan lingkungannya yang disebabkan infeksi WFS yaitu kotoran putih berbentuk panjang yang nampak mengapung di permukaan perairan (A), warna perairan menjadi hijau pekat (B), hepatopankreas berwarna putih pucat (C), dan usus yang terlihat kosong (D). Secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 4. Gejala klinis WFS pada udang vaname (Jayadi, *et al.*, 2016)

Keterangan: (A) Berak putih yang nampak mengapung di permukaan perairan, (B) Warna perairan menjadi hijau pekat kebiruan, (C) Hepatopankreas berwarna putih pucat, (D) Usus yang terlihat kosong

4.2.2 Kualitas Air

Kualitas air pada kegiatan budidaya sangat mempengaruhi dari kelulushidupan hidup organisme yang dibudidayakan. Kualitas air merupakan faktor penting yang dapat menunjang kehidupan organisme yang dibudidayakan, baik dari segi pertumbuhan, metabolisme dan kegiatan perkembangbiakan suatu organisme. Pada udang vaname kualitas air yang dapat mendukung kehidupannya yaitu suhu, pH, DO (*Dissolved Oxygen*), salinitas, ammonia, nitrat, nitrit, TOM (*Total Organic Meter*) dan Alkalinitas. Pada penelitian ini kualitas air harian yang diukur yaitu suhu, pH, DO dan salinitas. Sedangkan kualitas air mingguan yang diukur yaitu ammonia, nitrat, nitrit, TOM dan alkalinitas.

a. Suhu

Pengukuran suhu dilakukan setiap hari selama 2 minggu, yaitu pada pukul 08.00 dan 16.00 WIB. Suhu merupakan salah satu parameter yang mempengaruhi metabolisme udang. Suhu pemeliharaan udang vaname selama 2 minggu pemeliharaan yaitu berkisar antara 27 °C - 31 °C. Dapat dikatakan kondisi suhu selama pemeliharaan berlangsung berada dalam kisaran suhu tambak udang vaname yang terinfeksi WFS. Berdasarkan hasil penelitian Durai, *et al.* (2011), pengukuran parameter suhu untuk tambak budidaya udang putih (*L. vannamei*) berkisar antara 22-29 °C. Data lengkap mengenai hasil pengukuran suhu dapat dilihat pada Lampiran 5.

b. Derajat Keasaman (pH)

Pengukuran pH dilakukan setiap hari selama 2 minggu, yaitu pada pukul 08.00 dan 16.00 WIB. pH pemeliharaan udang vaname selama 2 minggu pemeliharaan yaitu berkisar antara 4,57 – 6,84. Nilai pH selama penelitian buruk

dan jauh dari kondisi normal bagi kehidupan udang berdasarkan pendapat Ferreira, *et al.* (2011), yang menyatakan bahwa derajat keasaman air media hidup udang yang dapat menunjang kehidupannya berkisar antara 7-9. Durai, *et al.* (2011), memaparkan hasil pengukuran pH untuk tambak budidaya udang putih (*L. vannamei*) yang terinfeksi WFS berkisar antara 7,5-8,4. Data lengkap mengenai hasil pengukuran pH dapat dilihat pada Lampiran 5.

c. DO (*Dissolved Oxygen*)

Pengukuran DO dilakukan setiap hari selama 2 minggu, yaitu pada pukul 08.00 dan 16.00 WIB. Oksigen terlarut merupakan salah satu parameter yang penting bagi kehidupan udang vaname. Fluktuatifnya kandungan oksigen terlarut dipengaruhi hasil sisa metabolisme udang. Banyaknya hasil metabolisme, dapat menurunkan kandungan oksigen yang ada diperairan, hal ini dikarenakan oksigen lebih banyak digunakan oleh bakteri perairan untuk mendekomposisi bahan organik. DO pemeliharaan udang vaname selama 2 minggu pemeliharaan yaitu berkisar antara 3,8 ppm – 6,2 ppm. Data lengkap mengenai hasil pengukuran DO dapat dilihat pada Lampiran 5. Sepanjang pemeliharaan saat penelitian kandungan DO pada air media udang vaname masih tergolong pada kategori normal berdasarkan pendapat Ferreira, *et al.* (2011), kisaran kandungan oksigen terlarut yang baik untuk pemeliharaan udang vaname yaitu > 3,0 ppm. Kisaran kandungan DO pada tambak udang yang terinfeksi WFS antara 4,0-6,5 ppm.

d. Salinitas

Pengukuran salinitas dilakukan setiap hari selama 2 minggu, yaitu pada pukul 08.00 dan 16.00 WIB. Salinitas merupakan parameter kualitas air yang harus diperhatikan bagi pembudidaya udang. Udang vaname merupakan organisme yang bersifat *euryhaline* dimana udang vaname memiliki toleransi salinitas yang cukup luas. Salinitas pemeliharaan udang vaname selama 2 minggu pemeliharaan

yaitu berkisar antara 24 ppt – 33 ppt. Data lengkap mengenai hasil pengukuran salinitas tiap harinya dapat dilihat pada Lampiran 5. Kisaran salinitas selama penelitian tergolong berada dalam keadaan yang dapat ditoleransi oleh udang vaname. Hal ini sesuai dengan pernyataan Maica (2012), udang vaname memiliki toleransi salinitas berkisar antara 0,5-40 ppt. Durai, *et al.* (2015), menambahkan kadar salinitas tambak udang vaname yang terinfeksi WFS berkisar antara 22-30 ppt.

e. Ammonia

Pengukuran ammonia dilakukan setiap 7 hari sekali selama 2 minggu, yaitu pada minggu pertama pemeliharaan dan minggu terakhir pemeliharaan. Kadar ammonia pemeliharaan udang vaname selama 2 minggu pemeliharaan yaitu berkisar antara 0,20 – 0,50 ppm. Data lengkap mengenai hasil pengukuran ammonia dapat dilihat pada Lampiran 5. Selama penelitian konsentrasi ammonia pada air media hidup udang vaname termasuk pada kisaran tambak yang terinfeksi WFS berdasarkan penelitian dari Durai, *et al.* (2015), yaitu 0,1-0,3 ppm.

f. Nitrat

Pengukuran nitrat dilakukan setiap 7 hari sekali selama 2 minggu, yaitu pada minggu pertama pemeliharaan dan akhir pemeliharaan. Kadar nitrat pemeliharaan udang vaname selama 2 minggu pemeliharaan yaitu berkisar 5 ppm. Kadar nitrat selama penelitian dapat buruk bagi kehidupan udang. Hal ini sesuai dengan pendapat dari Boyd dan Clay (2002), dimana konsentrasi nitrat yang dapat meracuni kehidupan udang adalah di atas 4 atau 5 ppm. Data lengkap mengenai hasil pengukuran nitrat dapat dilihat pada Lampiran 5.

g. Nitrit

Pengukuran nitrit dilakukan setiap 7 hari sekali selama 2 minggu, yaitu pada minggu pertama pemeliharaan dan akhir pemeliharaan. Konsentrasi nitrit

pemeliharaan udang vaname selama 2 minggu pemeliharaan yaitu berkisar antara 0,33 – 1,5 ppm. Konsentrasi nitrit yang didapatkan pada akhir penelitian cukup tinggi, hal ini dikarenakan tidak ada perlakuan penyifonan dan tetap ada pemberian pakan secara teratur. Namun kondisi nitrit ini masih sesuai untuk kelangsung hidup udang vaname. Menurut pendapat Adiwijaya, *et al.* (2003), untuk budidaya udang vaname kisaran parameter optimum dari nitrit berkisar antara 0,01 - 0,05 ppm. Suprpto (2005), menambahkan kandungan nitrit yang mampu ditolerir oleh udang vaname memiliki *range* antara 0,1 - 1 ppm. Data lengkap mengenai hasil pengukuran nitrit dapat dilihat pada Lampiran 5.

h. TOM (*Total Organic Meter*)

Pengukuran TOM dilakukan setiap 7 hari selama 2 minggu, yaitu pada minggu pertama pemeliharaan dan akhir pemeliharaan. Kadar TOM pemeliharaan udang vaname selama 2 minggu pemeliharaan yaitu berkisar antara 15,33 – 73,40. Kandungan bahan organik total yang paling tinggi terdapat pada perlakuan kontrol (K) berdasarkan tabel yang didapatkan pada minggu kedua sebesar 73,40. Besarnya kandungan bahan organik pada perlakuan A,B,dan C masih tergolong pada kadar optimal untuk pemeliharaan udang vaname. Hal ini sesuai dengan pendapat Adiwijaya, *et al.* (2003), kandungan bahan organik pada perairan yang masih layak untuk udang vaname berkisar < 55 ppm. Data lengkap mengenai hasil pengukuran TOM dapat dilihat pada Lampiran 5.

i. Alkalinitas

Pengukuran alkalinitas dilakukan setiap 7 hari selama 2 minggu, yaitu pada minggu pertama pemeliharaan dan akhir pemeliharaan. Kadar alkalinitas pemeliharaan udang vaname selama 2 minggu pemeliharaan yaitu berkisar antara 290,33 – 414,33 ppm. Data lengkap mengenai hasil pengukuran alkalinitas dapat dilihat pada Lampiran 5. Nilai hasil pengukuran alkalinitas selama penelitian dapat

dikatakan masih berada dalam kondisi yang normal berdasarkan Wyk, *et al.* (1999), bahwa umumnya ditambah nilai alkalinitas air media hidup udang dapat mencapai > 100 ppm. Namun, Ferreira, *et al.* (2011), menambahkan kadar alkalinitas yang direkomendasi untuk tambak budidaya udang vaname berkisar 100 ppm.

Berdasarkan kisaran-kisaran nilai kualitas air yang diperoleh pada media pemeliharaan selama penelitian berlangsung, terdapat beberapa parameter yang tidak optimal untuk pemeliharaan udang vaname akan tetapi masih tetap dalam toleransi kehidupan udang vaname. Kondisi parameter lingkungan yang buruk ini diduga sebagai salah satu penyebab timbulnya penyakit WFS.

4.2.3 Kelulushidupan Udang Vaname (SR)

Persentase kelulushidupan udang vaname (*L. vannamei*) merupakan salah satu parameter penunjang dalam penelitian ini. Berdasarkan penelitian pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) didapatkan hasil rerata persentase kelulushidupan udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi WFS seperti yang dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 7. Rerata Kelulushidupan Udang Vaname (*L. vannamei*) (%)

Perlakuan	SR (%)
A	64.29
B	85.71
C	71.43
K	42.86

Berdasarkan Tabel 11 diatas, perlakuan dengan pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) yang memiliki nilai kelulushidupan yang rendah ada pada perlakuan Kontrol dimana tidak diberi pakan dengan ekstrak tinta cumi-cumi dengan rerata kelulushidupan 40,50%, sedangkan nilai kelulushidupan yang tinggi ada pada perlakuan B (27 ppt) dengan rerata kelulushidupan 85,73%. Adanya

perbedaan nilai kelulushidupan yang berbeda diduga disebabkan adanya variasi ekspresi gen *CypA* pada setiap perlakuan. Berdasarkan intensitas ketebalan *band* yang didapat, perlakuan B memiliki ketebalan *band* yang paling rendah, yang berarti gen *CypA* terekpresi paling rendah dikarenakan adanya penambahan ekstrak tinta cumi dengan dosis 8 ppm.

Maica, *et al.* (2012), mengemukakan bahwa udang vaname merupakan organisme yang bersifat *euryhaline* dimana memiliki toleransi salinitas yang luas. Berdasarkan habitat aslinya, udang vaname ditemukan pada perairan dengan kisaran salinitas 0,5-40 ppt. Akan tetapi Haliman dan Dian (2006), menambahkan udang vaname dapat tumbuh dengan optimal jika media pemeliharaannya memiliki kisaran salinitas 15-30 ppt. Disamping itu, adanya penambahan perlakuan ekstrak tinta cumi yang mengandung antibakteri guna menghambat aktifitas dari bakteri sehingga didapatkan hasil kelulushidupan yang lebih tinggi pada perlakuan yang diberi pakan tinta cumi-cumi.

Tinta cumi memiliki kandungan melanin didalamnya, yang dapat digunakan sebagai antibakteri. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Fitriani, *et al.* (2017), adanya peningkatan konsentrasi melanin berbanding lurus dengan daya hambat bakteri. Semakin tinggi konsentrasi melanin yang digunakan, maka semakin tinggi pula aktifitas daya hambat bakteri. Fadjar, *et al.*, (2015) juga menambahkan bahwa dari hasil uji GC-MS diketahui bahwa ekstrak tinta cumi-cumi mengandung senyawa asam oleat. Kandungan asam oleat dalam ekstrak tinta cumi-cumi dapat membunuh bakteri secara langsung. Hal ini yang dapat membuat tingkat kelulushidupan udang pada perlakuan B lebih tinggi dibanding dengan kontrol.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan kesimpulan bahwa pemberian ekstrak tinta cumi-cumi tidak berpengaruh terhadap gen *CypA* pada udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi WFS. Ekspresi gen *Cyclophilin A* tertinggi terdapat pada perlakuan K(+) dengan dilihat dari ketebalan *band* sebesar 7053150. Didapatkan nilai polimorfisme terendah pada perlakuan A (24 ppt) yaitu 8,4% sedangkan nilai polimorfisme tertinggi pada perlakuan K(+) yaitu 15%. Salinitas media yang terbaik dari pemberian ekstrak tinta cumi-cumi udang yang terinfeksi WFS yaitu pada perlakuan B (salinitas 27 ppt) dengan melihat nilai persentase kelulushidupan yang tinggi didapatkan pada perlakuan B yaitu 85,73%. Ini menunjukkan pemberian ekstrak tinta cumi-cumi tidak berpengaruh secara molekuler terhadap gen *CypA* pada udang vaname akan tetapi didapatkan adanya hasil tingkat kelulushidupan dan morfologi yang lebih baik pada udang yang diberi ekstrak tinta cumi-cumi pada pakan dibandingkan dengan udang yang tidak diberikan perlakuan pemberian ekstrak tinta cumi-cumi.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, disarankan untuk dilakukan penelitian lanjutan menggunakan gen target yang lain untuk menambah informasi terkait penyebab penyakit WFS pada tambak udang vaname (*L. vannamei*). Selain itu, pada penelitian selanjutnya diharapkan ada variasi waktu yang lebih lama dalam penginfeksi WFS untuk mendapatkan hasil data yang bervariasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiwijaya, D., P. R. Sapto, Sutikno, E. Sugeng, dan Sabiyanto. 2003. Budidaya Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Sistem Tertutup yang Ramah Lingkungan. Departemen Kelautan dan Perikanan. Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau Jepara. 29 hlm.
- Agrawal, Surakhsa. 2008. Techniques in Molecular Biology. International Book Distribution, Sadar Lucknow : 337 hlm.
- Amri, K. dan I. Kanna. 2008. Budidaya Udang Vannamei Secara Intensif, Semi Intensif, dan Tradisional. PT Gramedia Pustaka. Jakarta. 163 hlm.
- Anjaini, J. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*) sebagai Penghambat Quorum Sensing Bakteri *Vibrio harveyi* pada Post Larva Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang. 64 hlm.
- Ardiana, D. W. 2009. Teknik isolasi dna genom tanaman pepaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi buffer ctab. Buletin Teknik Pertanian. **14** (1): 12-16.
- Ariyani, F., L. E. Setiawan, dan F. E. Soetaredjo. 2008. Ekstraksi minyak atsiri dari tanaman sereh dengan menggunakan pelarut metanol, aseton, dan n-heksan. *WIDYA TEKNIK*. **7** (2): 124-133.
- Asep, H. 2005. Penelitian Bisnis Paradigma Kuantitatif. Grasindo. Jakarta. 168 hlm.
- Bintang, M. 2010. Teknik Penelitian Biokimia. Penerbit Erlangga. Jakarta. 12-53 hlm.
- Boyd, C. E. 1990. Water Quality in Warmwater Fish Ponds. Agriculture Experimentation, Auburn University, Opelika, Alabama. 359 p.
- Boyd, C. E. and Clay, J. W. 2002. Evaluation of Belize Aquaculture, Ltd: A Superintensive Shrimp Aquaculture System. Report prepare under the World Bank, NACA, WWF, and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 17 p.
- Chaweepack, T., B. Muenthaisong., S. Chaweepack and K. Kamei. 2015. The potential of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) extract against the pathogens that cause white feces syndrome and acute hepatopancreatic necrosis disease (ahpnd) in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *International Journal of Biology*. **7** (3): 8-17.
- Chen, H. Y, R. Douglas W., Jiann-Chu C., Hui-Fen L., Chi-Ying L. 2007. Molecular characterization and gene expression pattern of two putative molt-inhibiting hormones from *Litopenaeus vannamei*. *Journal of General and Comparative Endocrinology* : 151 (2007). 72–81 hlm.

- Christiningrum, O, D., A. Budiharjo dan E. Kusdiyantini. 2016. Karakteristik molekular tanaman sambung nyawa (*Gynura procumbers* [Lour.] Merr) berdasarkan 18S rRNA. *Jurnal Biologi*. **5** (3): 60 – 70.
- Damayanti, A. dan E. A. Fitriana. 2012. Pemungutan minyak atsiri mawar (*rose oil*) dengan metode maserasi. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*. **1** (2): 1-8.
- De Wilde, A. H., U. Pham, C. C. Posthuma, dan E. J. Snijder. 2018. Cyclophilins and Cyclophilin inhibitors in nidovirus replication. *Virology*. **522**: 45-55.
- Derby, Charles D. 2014. Cephalopod ink: production, chemistry, functions and applications. *Marine drugs*. **12**: 2700-2730.
- Diantha, I. M. P. 2016. Metodologi Penelitian Hukum Normatif dalam Justifikasi Teori Hukum. Prenada Media Group. Jakarta. 206 hlm.
- Dieffenbach, C. W. dan Dveksler, G.S. 1995. PCR Primer, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York. 72 p.
- Direktorat Jendral Perikanan Budidaya. 2014. Laporan Kinerja Tahunan. Kementerian perikanan dan Kelautan. 9 hlm.
- Durai, V., B. Gunalan, P. M. Johnson, M. L. Maheswara and M. Pravinkumar. 2015. Effect on white gut and white feces disease in semi intensive *Litopenaeus vannamei* shrimp culture system in south Indian state of Tamilnadu. *International Journal of Marine Sciece*. **5** (4): 1-5.
- Fadjar, M., K. Zaelanie dan A.R. Faqih. 2015. Ekstrak tinta cumi (*Loligo* sp.) sebagai *inhibitor autoinducer quorumsensing* bakteri *Vibrio harveyi* pada budidaya udang vanamei (*Litopenaeus vannamei*). Laporan Akhir Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi. Universitas Brawijaya. Malang. 71 hlm.
- Fatchiyah, A., L.E. Widyarti dan S. Rahayu. 2011. Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis. Eralangga. Malang.
- Fatchiyah, E. L., Arumiagtyas, S. Widyarti, S. Rahayu. 2009. Dasar – dasar analisa Biologi Molekuler. Lembaga Penerbitan Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya Malang. 235 hlm.
- Fitrial, Y. dan I. K. Khotimah. 2017. Aktivitas antibakteri dari melanin tinta sotong dan cumi-cumi. *JPHPI 2017*. **20** (2): 266-274.
- Fuady, M. F., M. N. Supardjo, dan Haeruddin. 2013. Pengaruh pengelolaan kualitas air terhadap tingkat kelulushidupan dan laju pertumbuhan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) di PT. Indokor bangun desa, yogyakarta. *Diponegoro Journal of Maquares*. **2** (4): 155-162.
- Gabriyan, L. dan N. Avashia. 2013. Poymerase chain reaction. *The Society for Investigative Dermatology*. **133**. 1-4.
- Ghufran, M. H. dan K. Kordi. 2009. Budi Daya Perairan. PT Citra Aditya Bakti. Bandung. 963 hlm.

- Girija, A. S. S., J. V. Priyadharsini., K. P. Suba., P. Hariprasad and R. Raguraman. 2012. Antibacterial effect of squid ink on ESBL producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. **41** (4): 338-343.
- Glick B, Pasternak JJ, Patten CL. 2010. Molecular biotechnology : Principles and applications of recombinant DNA. ASM Press. Washington DC. 117-118p.
- Gulo, W. 2000. Metodologi Penelitian. Grasindo. 117 hlm.
- Hall, B. G. 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*. **30** (5): 1129 – 1235.
- Hamdi, A. S. dan Baharuddin E. 2014. Metode Penelitian Kuantitatif Aplikasi Dalam Pendidikan. Depublish. Yogyakarta. 5 hlm.
- Harmanto, N. 2012. Daun Sukun Si Daun Ajaib Penakluk Aneka Penyakit. PT. AgroMedia Pustaka. Jakarta. 110 hlm.
- Irmawati. 2003. Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama Pada Stok *Hatchery*. Thesis. Bogor: IPB.
- Istijanto, M. M. 2005. Riset Sumber Daya Manusia. Gramedia. Jakarta. 54 hlm.
- Jayadi, M., A. Prajitno and Maftuch. 2016. The identification of *Vibrio* spp. bacteria from *Litopenaeus vannamei* infected by white feces syndrome. *International Journal of ChemTech Research*. **9** (7): 448-452.
- Kaemudin., A. Erlina dan A. Taslihan. 2016. Aplikasi ekstrak allisin untuk pengendalian penyakit kotoran putih pada udang vanamei (*Litopenaeus vanamei*) di Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara. Prosiding Seminar Nasional Tahunan Ke-V Hasil-Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan. Juni 2016: 493-499 hlm.
- Kamimura, M. T., K. M. Meier, R. O. Cavalli, J. Lourino, R. Maggioni, dan F. Marins. 2008. Characterization of growth-related genes in the south-western atlantic pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Perez-farfante 1967) through a modified DDRT-PCR protocol. *Aquaculture Research*. **39**. 200-204.
- Kilawati, Y. dan Y. Maimunah. 2015. Kualitas lingkungan tambak intensif *Litopenaeus vannamei* dalam kaitannya dengan prevalensi penyakit white spot syndrome virus. *Journal of Life Science*. **2** (1): 50-59.
- Kusmiyati dan N. W. S. Agustini. 2007. Uji aktivitas senyawa antibakteri dari mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. **8** (1): 48-53.
- Le, X., P. Luo., Y. Gu., Y. Tao and H. Liu. 2015. Squid ink polysaccharide reduces cyclophosphamide-induced testicular damage via Nrf2/ARE activation pathway in mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. **18** (8): 827-831.
- Lee, W and Luo L. 1997. Periodicity of base correlation in nucleotide sequence. *Physical Review E*. **56**. 848-851.

- Lemey, P., A. Rambaut, A. J. Drummond and M. A. Suchard. 2009. Bayesian phylogeography find its roots. *PLOS*. 5 (9): 1-16.
- Limsuwan, C. 2010. White Feces Disease In Thailand. Kasetsart University. Bangkok. 3 p.
- Maica, P. F., M. R. de Borba, dan W. Wasielesy Jr. 2012. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. *Aquaculture research*. **43**: 361-370.
- Muhammad, F., Zhang Zhi-Feng, Shao Ming-Yu, dan M. Shafi. 2017. cDNA cloning and expression of cyclophilin a (*LvCypA*) in white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Pakistan J. Zool.* **49** (3): 935-941.
- Mustafa, A., I. Sapo, dan M. Paena. Studi penggunaan produk kimia dan biologi pada budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) di tambak kabupaten pesawaran provinsi lampung. *Jurnal Ris. Akuakultur*. **5** (1): 115-133.
- Nasution, F. M., R. S. Mardia, A. Azri, R. R. Hutabarat, F. Al Izza dan R. Asfur. 2017. Pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi (*squid ink*) terhadap asteroklerosis. *Jurnal e-Biomedik*. **5** (2): 1-6.
- NCBI. 2011. The BLAST sequence analysis tool. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nursalam. 2008. Konsep Dan Penerapan Metodologi Penelitian Ilmu Keperawatan Edisi 2. Salemba Media. Jakarta. 80 hlm.
- Panjaitan, A. S. 2012. Pemeliharaan larva udang vaname (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) dengan pemberian jenis fitoplankton yang berbeda. Tugas Akhir Program Magister. 148 hlm.
- Prakoso, A. A., T. Elfitasari, dan F. Basuki. 2016. Studi analisa usaha dan prospek pengembangan budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) sistem intensif di kecamatan sluke, kabupaten rembang. Prosiding Seminar Nasional Tahunan Ke-V Hasil-Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan Juni 2016. 313-331 hlm.
- Pratisto, A. 2004. Cara Mudah Mengatasi Masalah Statistik dan Rancangan Percobaan dengan SPSS 12. PT. Elex Media Komputindo. Jakarta. 283 hlm.
- Pringgencies, D., A. S. Sasongko, dan S. Sedjati. 2014. Karakterisasi tinta cumi-cumi (*Sepiotheuthis lessoniana*) dan toksisitasnya. Pertemuan Ilmiah Nasional Tahunan X ISOI. 244-253.
- Qiu, Lihua, Shigui Jiang, Jianhua Huang, Weifang Wang, Caiyan Zhu, dan Tianfeng Su. 2009. Molecular cloning and mRNA expression of cyclophilin A gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & Shellfish Immunology*. **26**: 115-121.
- Rahmi. 2012. Deteksi molekular vektor penyebab wssv pada udang windu (*Penaeus monodon*) di kabupaten takalar. *Octopus*. **1** (2): 96-101.

- Reddy, M. M. 2013. Molecular phylogeny and population genetic structure of the shallow-water piny lobster *Panulirus homarus* in the South West Indian Ocean Region: Implications for management. *Thesis*. University of KwaZulu-Natal, Westville Campus, Durban, South Africa.
- Riupassa, P. A. 2009. Perancangan primer oligonukleotida untuk polimerisasi in vitro gen sukrosa sintase. *Biosfera*. **26** (3): 131-137.
- Rogers K. 2011. *New Thinking about Genetic*. Britannica Educational Publishing. New York. hlm. 132.
- Sa'adah, H. dan Henny, N. 2015. Perbandingan pelarut etanol dan air pada pembuatan ekstrak umbi bawang tiwai (*Eleutherine americana Merr*) menggunakan metode maserasi. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. **1** (2): 149-153.
- Sambrook, J., dan Russel, D. 2001 *Molecular Clonning: A Laboratory Manual*, Vol 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sari, N. W., I. Lukistyowati, dan N. Aryani. 2012. Pengaruh pemberian temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) terhadap kelulushidupan ikan mas (*Cyprinus carpio* L) setelah di infeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **17** (2): 43-59.
- Sartidjo, N. A. dan S. B. Prayitno. Pengaruh perendaman ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dengan konsentrasi yang berbeda terhadap gejala klinis, kelulushidupan, histopatologi dan pertumbuhan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diinfeksi *Vibrio harveyi*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **4** (3): 54-60.
- Sartika, R., Melki dan A. I. S. Purwiyanto. 2013. Aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut *eucheuma cottoni* terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera* dan *Salmonella typhosa*. *Maspuri Journal*. **5** (2): 98-103.
- Saskiawan, I. dan N. Hasanah. 2015. Aktivitas antimikroba dan antioksidan senyawa polisakarida jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*). *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiv Indonesia*. **1** (5): 1105-1109.
- Satrosupadi, Adji. 2000. *Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian*. Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.
- Sedlak, R. H. dan K. R. Jerome. 2013. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **75**: 1-4.
- Sofiana, L. dan Wahyuni, D. 2015. Pengaruh sterilisasi ozon terhadap penurunan angka kuman udara di ruang rawat inap di rumah sakit umum pku muhammadiyah bantul 2014. *KESMAS*. **9** (1): 19-24.
- Srinivas, D., C. Venkatrayalu, and B. Laxmappa. 2016. Indetifiying diseases affecting farmed *Litopenaeus vannamei* in different areas of nellore district in andhra pradesh, india. *Internasional Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. **4** (2): 447-451.

- Sriurairatana, S., V. Boonyawiwat, W. Gangnonngiw, C. Laosutthipong, J. Hiranchan, T. Flegel. 2014. White feces syndrome of shrimp arises from transformation, sloughing and aggregation of hepatopancreatic microvilli into vermiform bodies superficially resembling Gregarines. *PLOS ONE*. Vol. 9 issue 6.
- Sukmadinata, N. S. 2011. Metode Penelitian Pendidikan. Cetakan ke 7. Remaja Rosdakarya. Bandung. 15 hlm.
- Suprpto. 2005. Petunjuk Teknis Budidaya Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). CV Biotirta. Bandar Lampung. 25 hlm.
- Supriatna, I., A. Yustiati, dan Iskandar. 2014. Sekuen asam amino anti *white spot syndrome virus* (wssv) pada udang windu (*Penaeus monodon*). Jurnal Ilmu Hayati dan Fisik. **16** (1): 40-46.
- Susan, L. E. dan Wiliam, D. S. 2007. Genetika Edisi Keempat. Penerbit Erlangga. Jakarta. 20 hlm.
- Suyanto, R. dan E. P. Takarina. 2009. Panduan Budidaya Udang Windu. Penebar Swadaya. Jakarta. 213 hlm.
- Tan, S. C., dan Yiap, B. C. 2009. Review : DNA, RNA, and Protein Extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* : 10p.
- Taslihan A, Fairus MS, Supito. 2015. Petunjuk teknis pengendalian penyakit berak putih (white feces syndrome) pada udang vaname di tambak. Kementerian Kelautan dan Perikanan. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. BBPBAP Jepara. Halaman 1-23.
- Thitamadee, S., A. Prachumwat, J. Srisala, P. Jaroenlak, P. V. Salachan, K. Sritunyalucksana, T. W. Flegel, dan O. Itsathitphaisarn. 2016. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in asia. *Aquaculture*. **452**: 69-87.
- Umar, H. 2005. Riset Sumber Daya Manusia. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 320 hlm.
- Valen, F. S. 2018. Identifikasi molekuler dan karakteristik genetik *mystacoleucus* sp. berdasarkan gen cytochrome oxidase c subunit I (COI) di das brantas. Tesis. FPIK UB. Malang.
- Warisno. 1998. Jagung Hibrida. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 41 hlm.
- Wulansari, N., M. Nurilmala, dan Nurjanah. 2015. Deteksi ikan tuna dan produk olahannya berbasis protein dan dna barcoding. *JPHPI*. **18** (2): 119-127.
- Yudiati, E., S. Sedjati, I. Enggar dan I. Hasibuan. 2009. Dampak pemaparan logam berat cadmium pada salinitas yang berbeda terhadap mortalitas dan kerusakan jaringan insang juvenile udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Ilmu Kelautan. **14** (4): 29-35.
- Yulinery, T. dan N. Nurhidayat. 2015. Uji aktivitas antibakteri *Lactobacillus plantarum* terseleksi dari buah markisa (*Passiflora edulis*) dan

kaitannya dengan genplantarisin A (plnA). Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversity Indonesia. **1** (2): 270-277.

Yusuf, Muri. 2016. Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif & Penelitian Gabungan. Prenada Media. Jakarta. 480 hlm.

Yuwono. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Andi Offset. Yogyakarta.

Yuyun, Y. 2015. Deteksi Dini Stroke Iskemia dengan Pemeriksaan Ultrasonografi Vaskular dan Variasi Genetika. UB Press. Malang. 222 hlm.

Zaharah, M. Y. F. and M. S. Rabeta. 2018. Antioxidant and antimicrobial activities of squid ink powder. *Food Research*. **2** (1): 82-88.

