

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI (*Loligo* sp.)
TERHADAP GEN *MOLTING INHIBITING HORMONE* (MIH) PADA UDANG
VANAME (*Litopenaeus vannamei*) YANG TERINFEKSI *WHITE FECES*
SYNDROME (WFS) PADA SALINITAS MEDIA YANG BERBEDA**

SKRIPSI

Oleh :

**LAKSONO RADITYO SUWANDI
NIM.155080500111063**



**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 *MOLTING INHIBITING HORMONE* (MIH) PADA UDANG
VANAME (*Litopenaeus vannamei*) YANG TERINFEKSI *WHITE FECES*
SYNDROME (WFS) PADA SALINITAS MEDIA YANG BERBEDA**

SKRIPSI

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

Oleh :

LAKSONO RADITYO SUWANDI
NIM. 155080500111063



**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 *MOLTING INHIBITING HORMONE* (MIH) PADA UDANG
VANAME (*Litopenaeus vannamei*) YANG TERINFEKSI *WHITE FECES*
SYNDROME (WFS) PADA SALINITAS MEDIA YANG BERBEDA**

Oleh:

LAKSONO RADITYO SUWANDI
NIM.155080500111063

Telah dipertahankan di depan penguji
Pada tanggal : 28 Maret 2019
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

MENGETAHUI,
KETUA JURUSAN MSP



(Dr. Ir. M. Firdaus, MP)

NIP. 19680919 200501 1 001

Tanggal: **05 APR 2019**

MENYETUJUI,
DOSEN PEMBIMBING



(Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc.)

NIP. 19621014 198701 1 001

Tanggal: **05 APR 2019**

LEMBAR IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI (*Loligo* sp.) TERHADAP GEN *MOLTING INHIBITING HORMONE (MIH)* PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) YANG TERINFEKSI *WHITE FECES SYNDROME (WFS)* PADA SALINITAS MEDIA YANG BERBEDA**

Nama Mahasiswa : LAKSONO RADITYO SUWANDI

NIM : 155080500111063

Program Studi : Budidaya Perairan

PENGUJI PEMBIMBING:

Pembimbing 1 : Dr. Ir. Mohamad 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, April 2019

Mahasiswa,

Laksono Radityo S.
NIM. 155080500111063

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyadari bahwa dalam pelaksanaan laporan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dari semua pihak. Melalui kesempatan ini, dengan perkenankan penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Tuhan Yang Maha Esa yang memberikan ridho dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat melakukan penelitian dengan lancar.
2. Sujud dan terima kasih yang dalam penulis persembahkan kepada kedua orang tua ayahanda Ir. Totok Suwandi, ibunda Herlina Handayani, B.Sc dan kakak Sekar Indah Maharani, S.TP yang senantiasa memberikan dukungan baik moril maupun materil.
3. Ayah Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc selaku pembimbing yang telah memberi arahan, semangat dan bimbingan dengan sepenuh hati kepada penulis.
4. Bapak Budianto, S.Pi., MP., M.Sc dan bapak Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, M.Si selaku penguji yang telah memberikan kritik dan masukan kepada penulis.
5. Mas Jefri, Ilham, Nafa, Ivana dan Yashinta (TIM CUMI) atas dukungan dan kerjasama selama penelitian dan penyusunan laporan ini.
6. Silvi, April dan Adhi yang selalu mendukung dan menyemangati dalam penyusunan laporan ini.
7. Teman-teman Budidaya Perairan angkatan 2015 "Aqualatte" yang telah memberikan semangat, motivasi dan do'a selama ini.

Malang, Februari 2018

Penulis

RINGKASAN

Laksono Radityo Suwandi. Skripsi tentang Pengaruh Pemberian Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.) terhadap Gen *Molting Inhibiting Hormone* (MIH) pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang Terinfeksi *White Feces Syndrome* (WFS) pada Salinitas Media yang Berbeda (di bawah bimbingan **Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc.**).

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) adalah salah satu spesies udang yang bernilai ekonomis dan merupakan komoditas unggulan nasional. Udang vaname dapat dipelihara dengan kisaran salinitas yang lebar, dapat ditebar dengan kepadatan yang tinggi, lebih resisten terhadap kualitas lingkungan yang rendah, dan waktu pemeliharaan lebih pendek. Molting merupakan peristiwa ganti kulit pada udang, gen *MIH* merupakan penghambat dari peristiwa tersebut. Kendala pembudidaya saat ini adalah banyaknya wabah penyakit yang menginfeksi udang. Salah satu penyakit pada udang vaname yang sering muncul di tambak adalah *WFS* atau yang dikenal dengan berak putih. Pembawa dari penyakit berak putih ini diketahui yaitu bakteri *vibrio* spp. dan *blue green algae* (BGA). Tinta cumi-cumi mengandung butir-butir melanin atau pigmen hitam. Melanin dari tinta cumi-cumi mempunyai aktivitas anti-tumor dan aktivitas antibakteri. Selain itu dari tinta cumi-cumi juga mengandung asam oleat yang dapat membunuh bakteri secara langsung pada membran selnya.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) terhadap gen *MIH* udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi *WFS* dengan salinitas media yang berbeda. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya dan Laboratorium Hidrobiologi Divisi Sumberdaya Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya pada bulan November 2018 – Januari 2019. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimen. Metode eksperimen merupakan langkah-langkah lengkap yang diambil sebelum eksperimen dilakukan agar data yang semestinya diperlukan dapat diperoleh sehingga analisis menjadi obyektif. Parameter utama untuk penelitian ini yaitu uji kuantitatif DNA, hasil amplifikasi, hasil elektroforesis dan hasil sekuensing. Sedangkan parameter penunjang pada penelitian ini yaitu pengamatan gejala klinis dan nilai kualitas air.

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak tinta cumi-cumi terhadap ekspresi gen *MIH* udang vaname yang terinfeksi *WFS* adalah sebagai berikut, intensitas pita DNA gen *MIH* pada udang vaname untuk perlakuan A (24 ppt) yaitu 9.816.180 int, perlakuan B (27 ppt) yaitu 10.042.164 int dan perlakuan C (30 ppt) yaitu 13.209.240 int, sedangkan perlakuan K (+) (33 ppt) yaitu 12.361.734 int dan K (-) yaitu 4.083.486 int. Jarak amplikon *basepairs* pada gen *MIH* udang vaname untuk perlakuan A (24 ppt) yaitu 260,98831 bp, perlakuan B (27 ppt) yaitu 267,09059 bp dan perlakuan C (30 ppt) yaitu 273,33544 bp, sedangkan perlakuan K (+) (33 ppt) yaitu 282,97756 bp dan K (-) yaitu 252,09546 bp. Hasil semua perlakuan (A, B, C, K+ dan K-) memiliki nilai *query cover* antara 90-98%, *E-Value* 0,0 dan nilai *identity* pada semua perlakuan

adalah 98-99%. Berdasarkan nilai yang diperoleh, artinya sekuen DNA sampel memiliki panjang sekuen yang sama dengan *database* yang ada di *Genbank* 90-98% dengan E value 0.0 dapat disimpulkan bahwa sekuen sampel memiliki tingkat homologi yang cukup tinggi. Komposisi Nukleotida gen *MIH* pada setiap perlakuan memiliki basa Adenin (A) 22,12%, basa Guanin (G) berkisar antara 22,12-22,60%, basa Sitosin (C) berkisar antara 15,38-15,87% dan basa Timin (T) berkisar antara 39,90-40,38%. Gen yang terjadi mutasi adalah pada perlakuan K (+), A dan B jika dibandingkan dengan perlakuan K (-) yang merupakan udang vaname normal (tidak terinfeksi *WFS*). Hasil analisis mutasi, diketahui bahwa mutasi tersebut merupakan mutasi gen substitusi, yaitu pergantian basa nukleotida. Nilai mutasi gen *MIH* pada penelitian ini yaitu $< 1\%$ yang menunjukkan bahwa mutasi gen *MIH* pada udang vaname terjadi pada alel, dan tidak terjadi polimorfisme.

Hasil pengamatan gejala klinis udang yang terinfeksi *WFS* sebagai udang kontrol terlihat udang bergerak kurang aktif, hepatopankreas berwarna putih, dan usus tidak terisi. 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 normal, namun ada beberapa parameter yang tidak dalam kisaran normal.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) tidak berpengaruh terhadap gen *MIH* udang vaname yang terinfeksi *WFS*.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkah, karunia serta ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul: “Pengaruh Pemberian Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.) terhadap Gen *Molting Inhibiting Hormone* (MIH) pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang Terinfeksi *White Feces Syndrome* (WFS) pada Salinitas Media yang Berbeda”. Saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc. selaku dosen pembimbing dan semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan laporan ini.

Saya menyadari bahwa masih banyak kekurangan yang mendasar pada laporan ini. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang dapat membangun saya. Kritik konstruktif dari pembaca sangat kami harapkan untuk penyempurnaan laporan selanjutnya, agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Demikian penulis sampaikan terimakasih.

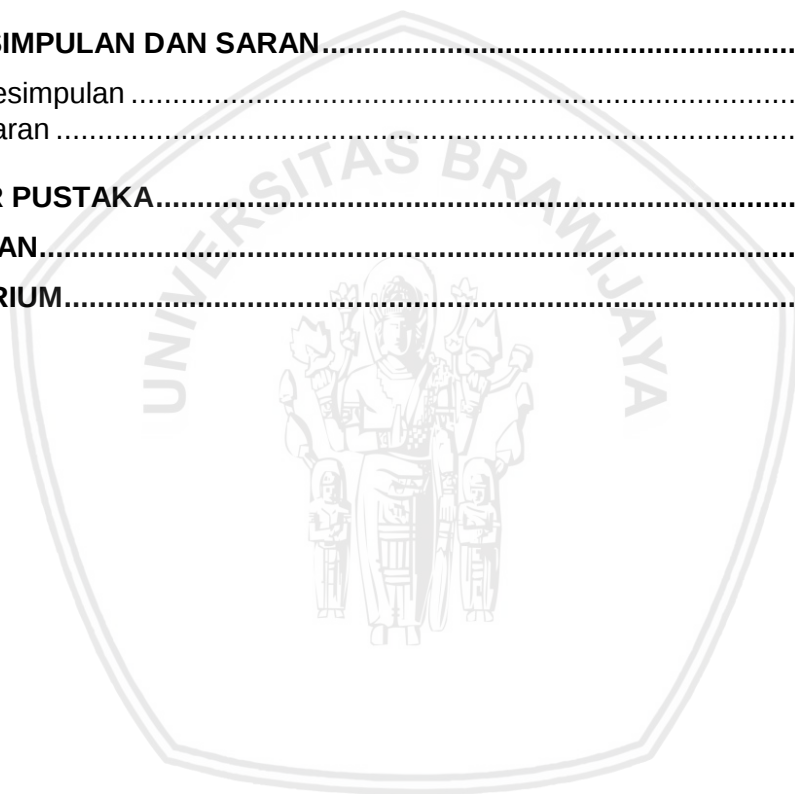
Malang, Maret 2019

Penulis

DAFTAR ISI

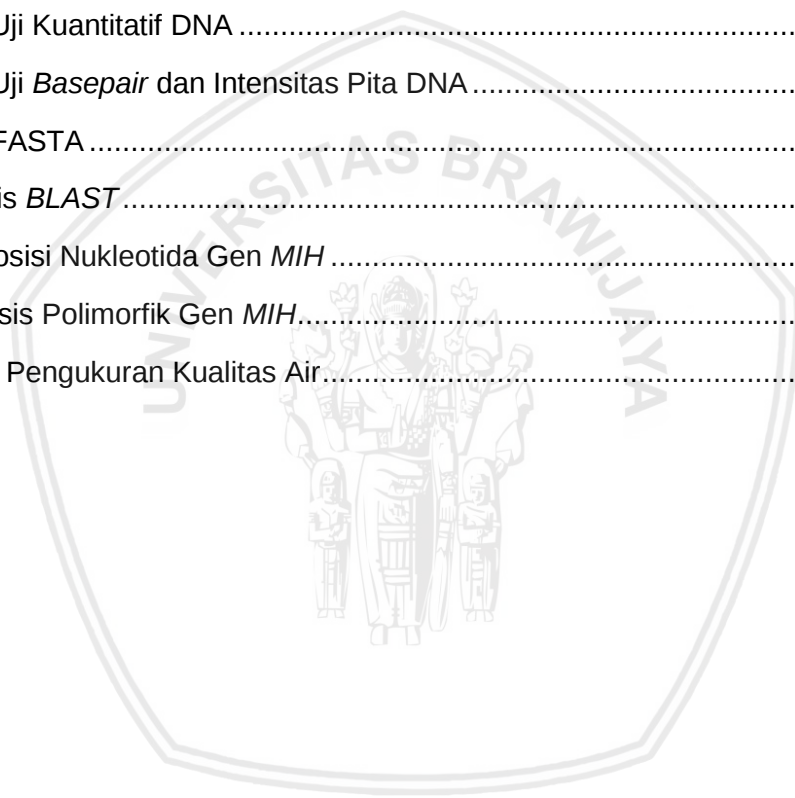
	Halaman
RINGKASAN	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Kegunaan.....	5
1.6 Tempat, Waktu dan Jadwal Pelaksanaan.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Biologi Udang Vaname (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	7
2.1.3 Siklus Hidup	8
2.2 <i>White Feces Syndrome (WFS)</i>	9
2.3 Gen <i>MIH (Molting Inhibiting Hormone)</i> pada Udang Vaname	11
2.4 Tinta Cumi-Cumi (<i>Loligo</i> sp.).....	14
2.4.1 Kandungan Senyawa Aktif pada Tinta Cumi-Cumi (<i>Loligo</i> sp.)	14
2.4.2 Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (<i>Loligo</i> sp.)	15
2.5 Antimikroba	15
2.6 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	16
3. METODE PENELITIAN	23
3.1 Materi Penelitian	23
3.1.1 Alat Penelitian	23
3.1.2 Bahan Penelitian	25
3.2 Metode Penelitian	26
3.3 Pengambilan Data.....	27
3.4 Rancangan Penelitian	27
3.5 Prosedur Penelitian.....	30
3.5.1 Persiapan Penelitian.....	30
3.5.2 Pelaksanaan Penelitian	34
3.6 Parameter Uji	36
3.6.1 Parameter Utama	36
3.6.2 Parameter Penunjang.....	43

3.7	Analisis Data	45
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	46
4.1	Parameter Utama.....	46
4.1.1	Hasil Uji Kuantitatif DNA	46
4.1.2	Hasil Amplifikasi DNA	47
4.1.3	Hasil Elektroforegram	48
4.1.4	Hasil Sekuensing.....	51
4.2	Parameter Penunjang	56
4.2.1	Gejala Klinis	56
4.2.2	Kualitas Air	57
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	59
5.1	Kesimpulan	59
5.2	Saran	59
	DAFTAR PUSTAKA.....	60
	LAMPIRAN.....	66
	GLOSARIUM.....	88



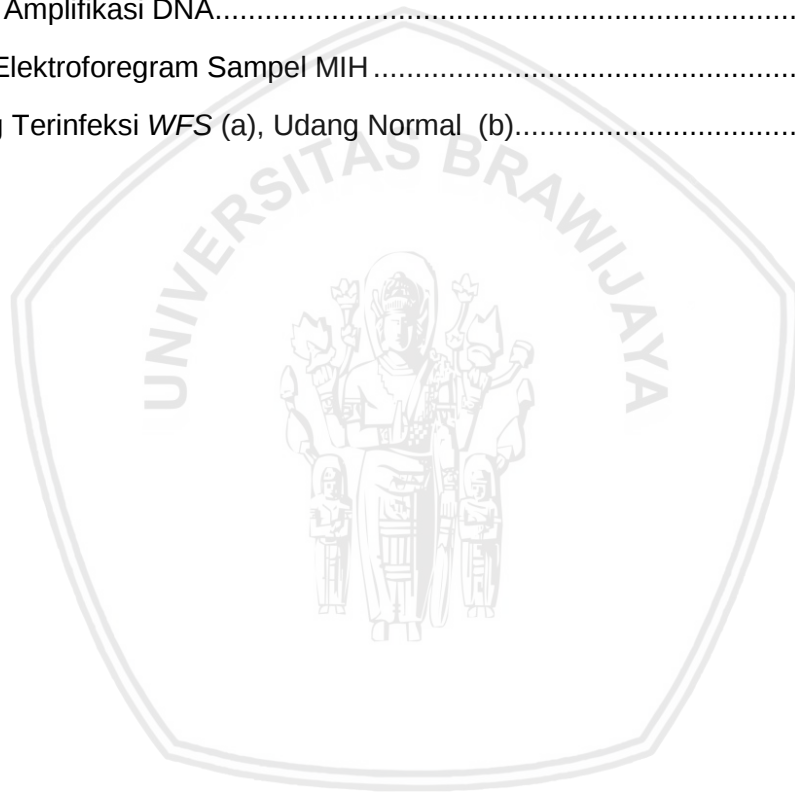
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian.....	23
2. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian.....	25
3. Volume Pengenceran DNA.....	39
4. Komposisi Larutan <i>PCR Mix</i>	40
5. Hasil Uji Kuantitatif DNA	46
6. Hasil Uji <i>Basepair</i> dan Intensitas Pita DNA.....	49
7. Hasil FASTA	51
8. Analisis <i>BLAST</i>	52
9. Komposisi Nukleotida Gen <i>MIH</i>	53
10. Analisis Polimorfik Gen <i>MIH</i>	54
11. Hasil Pengukuran Kualitas Air.....	57



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi Udang Vaname	7
2. Jalur Perangsangan gen <i>MIH</i>	13
3. Contoh Elektroforegram DNA-PCR universal pada gel agarose	21
4. Denah Penelitian	29
5. Siklus Amplifikasi DNA.....	47
6. Hasil Elektroforegram Sampel MIH	48
7. Udang Terinfeksi WFS (a), Udang Normal (b).....	57



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat-alat Penelitian yang Digunakan	66
2. Bahan-bahan Penelitian yang Digunakan	71
3. Proses Ekstraksi Tinta Cumi-cumi (<i>Loligo</i> sp.).....	74
4. Hasil Sekuensing gen <i>MIH</i> pada Udang Vaname	75
5. Data Kualitas Air	80
6. Perhitungan	86



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) adalah spesies udang yang bernilai ekonomis dan merupakan komoditas unggulan nasional. Udang vaname memiliki beberapa keunggulan jika dibandingkan dengan udang windu, yaitu dapat dipelihara dengan kisaran salinitas yang lebar (0,5-45 ppt), dapat ditebar dengan kepadatan yang tinggi hingga lebih dari 150 ekor/m², lebih resisten terhadap kualitas lingkungan yang rendah, dan waktu pemeliharaan lebih pendek yakni sekitar 90-100 hari per siklus (Hudi dan Shahab 2005).

Pertumbuhan udang vaname dipengaruhi oleh faktor molting atau ganti kulit. Molting pada udang dipengaruhi oleh gen *Molting Inhibiting Hormone (MIH)*. *MIH* merupakan salah satu gen yang mempengaruhi pertumbuhan udang. Molting sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, pakan dan dipicu oleh hormon ekdisteroid dan dihambat oleh hormon penghambat yaitu *Molting Inhibiting Hormone (MIH)* (Subaidah, et al., 2012).

Salah satu permasalahan pada budidaya adalah penyakit yang dapat menurunkan nilai produksi, salah satunya adalah penyakit *White Feces Syndrome (WFS)*. Udang yang terinfeksi *WFS* proses pertumbuhannya akan terhambat yang disebabkan oleh pengaruh lingkungan, bakteri, gregarin dan alga (Subaidah, et al., 2012). Gejala yang ditimbulkan apabila terserang *WFS* yaitu nafsu makan udang menurun, pertumbuhan udang menjadi tidak normal, adanya kotoran berwarna putih yang mengambang di permukaan perairan, usus udang berwarna putih dan terlihat kosong karena kurang makan (Jayadi, et al., 2016). Dilanjutkan oleh Mastan (2015), dampak yang terjadi apabila udang vaname terserang *WFS* yaitu terjadinya penurunan hasil produksi budidaya udang yang

terserang sangat sulit untuk diselamatkan sehingga seluruh udang yang ada terpaksa dipanen atau dibuang. Penularannya dapat langsung melalui air atau kontak langsung. Penyebarannya sangat cepat pada organisme yang dipelihara pada kepadatan tinggi. Penyakit pada udang ini dapat mengganggu proses kehidupan udang sehingga pertumbuhannya menjadi tidak normal.

Untuk pengendalian penyakit, dapat dilakukan dengan pencegahan. Salah satu cara pencegahan adalah dengan penggunaan kombinasi berbagai antibiotik yang dapat menimbulkan masalah resistensi pada bakteri. Akibat resistensi yang ditimbulkan oleh antibiotik maka dari itu memerlukan solusi usaha pengembangan bahan alternatif sebagai antibakteri yang dapat membunuh bakteri (Sari, *et al.*, 2015). Pada penyakit WFS telah banyak digunakan bawang putih sebagai pencegahannya. Seperti penelitian Chutchawanchaipan, *et al.* (2004), bahwa pencegahan penyakit berak putih pada udang dapat dilakukan dengan penggunaan antibiotik alami berupa ekstrak bawang putih. Bawang putih mengandung antibiotik alisin yang mampu mengendalikan bakteri gram positif maupun gram negatif.

Alternatif lain sebagai pencegahan penyakit adalah dengan menggunakan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.). Ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk menangani penyakit vibriosis dan tinta cumi-cumi memiliki kemampuan antibakteri. Dilanjutkan oleh Fadjar, *et al.* (2015), bahwa ekstrak methanol tinta cumi dapat dipergunakan sebagai *inhibitor autoinducer quorum sensing* bakteri *V. harveyi* dengan dosis 8 ppm.

Dengan adanya permasalahan tersebut, kegiatan penelitian ini penting dilakukan untuk mengetahui apakah pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo*

sp.) mampu mempengaruhi gen *MIH* udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi *WFS* pada salinitas media yang berbeda.

1.2 Perumusan Masalah

Serangan penyakit kotoran putih pada udang vaname dapat dilihat dari kotoran udang berwarna putih memanjang dan mengapung pada permukaan air, eksoskeleton tampak lembek dan ditemukan infeksi protozoa sehingga menyebabkan insang gelap. Berdasarkan hasil identifikasi bakteri ditemukan *Vibrio* spp. pada udang (Supito, *et al.*, 2015). Gejala yang ditimbulkan apabila terserang *WFS* yaitu nafsu makan udang menurun, pertumbuhan udang menjadi tidak normal, adanya kotoran berwarna putih yang mengambang di permukaan perairan, usus udang berwarna putih dan terlihat kosong karena kurang makan (Jayadi, *et al.*, 2016).

Selama ini telah dilakukan pengendalian menggunakan antibiotik, namun antibiotik memiliki dampak negatif terhadap udang itu sendiri dan residu dari antibiotik mampu membahayakan manusia yang mengkonsumsinya. Hal ini disebabkan karena obat berbahan dasar kimia dapat menimbulkan efek samping. Oleh karena itu digunakan tinta cumi untuk mengobati udang vaname yang terinfeksi *WFS* karena tinta cumi itu sendiri memiliki kandungan antibakteri (Sukenda, *et al.*, 2007). Kandungan yang terkandung dalam tinta cumi yaitu melanin alami, yaitu melanoprotein yang mengandung 10-15% protein, sehingga menjadi salah satu sumber protein yang baik (Agusandi, *et al.*, 2013). Selain itu tinta cumi mengandung pula lemak dan glikosaminoglikan. Melanin dari tinta cumi-cumi mempunyai aktivitas anti-tumor dan aktivitas antibakteri (Fitrial dan Khotimah, 2017). 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. Asam oleat dalam tinta cumi dapat menempel pada membran bakteri (misalnya, ceragenin dan lipopeptida), yang kemudian merusak struktur dinding sel bakteri.

Molting Inhibiting Hormone (MIH) merupakan salah satu gen yang mempengaruhi pertumbuhan udang. Molting sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, pakan dan dipicu oleh hormon ekdisteroid dan dihambat oleh hormon penghambat yaitu *MIH* (Subaidah, et al., 2012).

Berdasarkan permasalahan di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu apakah pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) mampu mempengaruhi gen *MIH* pada udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi *WFS* yang dipelihara pada salinitas media yang berbeda.

1.3 Tujuan

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

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini yaitu:

H_0 : Diduga penambahan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) tidak berpengaruh terhadap gen *MIH* udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi *WFS* yang dipelihara pada salinitas media yang berbeda.

H_1 : Diduga penambahan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) berpengaruh terhadap gen *MIH* udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi *WFS* yang dipelihara pada salinitas media yang berbeda.

1.5 Kegunaan

Kegunaan penelitian ini adalah untuk memberikan informasi kepada para pembudidaya untuk menggunakan bahan alternatif untuk mengendalikan serangan *WFS* dengan menggunakan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) sebagai upaya pemanfaatan bahan buangan di bidang perikanan. Selain bermanfaat bagi mahasiswa sebagai informasi tambahan 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, Waktu dan Jadwal Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Eksplorasi Sumberdaya Perikanan dan Kelautan Divisi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya; Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit dan Parasit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya; UPT. Perikanan Air Payau dan Laut Probolinggo, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya; Laboratorium Hidrobiologi Divisi Sumberdaya Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya pada bulan November 2018 - Januari 2019.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Pengklasifikasian taksonomi udang vaname menurut Dugassa dan Gaetan (2018), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Arthropoda
Class	: Malacostraca
Order	: Decapoda
Family	: Penaeidae
Genus	: Penaeus
Species	: <i>Litopenaeus vannamei</i>

Udang vaname memiliki ukuran yang lebih kecil dibandingkan udang windu dan udang jrebung, chitin berwarna putih kekuning-kuningan dengan kaki berwarna putih. Tubuhnya dibagi menjadi dua bagian, yakni *cephalothorax* yang terdiri atas kepala dan dada serta bagian abdomen yang terdiri atas perut dan ekor. *Cephalothorax* terdiri atas lima ruas kepala dan delapan ruas dada. Sedangkan, abdomen terdiri atas enam ruas dan satu ekor (telson). Terdapat rostrum yang merupakan bagian kepala yang menjorok yang berupa kelopak mata yang memanjang dan bergerigi (Amri dan Kanna, 2013). Udang vaname dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi Udang Vaname (Marbun, 2018)

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Udang vaname merupakan udang introduksi yang berasal dari perairan pantai dan laut Amerika Latin seperti Meksiko, Nikaragua dan Puerto Rico. Udang ini kemudian diimpor oleh negara-negara pembudidaya, seperti Indonesia. Dapat hidup dalam tambak dengan salinitas (kadar garam) di tambak pemeliharaan berkisar 5-35 ppt. Udang vaname dinilai memiliki beberapa kelebihan antara lain tahan terhadap fluktuasi lingkungan, waktu pemeliharaan yang relatif pendek dan pertumbuhan lebih cepat (Amri dan Kanna, 2013).

Udang vaname mempunyai kemampuan beradaptasi terhadap salinitas yang luas dengan kisaran salinitas 0,5-45 ppt. pH yang optimal untuk udang vaname adalah 7,3-8,5 (Pasongli, *et al.*, 2015). Temperatur juga memiliki pengaruh yang besar pada pertumbuhan udang. Udang putih akan mati jika terpapar pada air dengan suhu di bawah 15 °C atau di atas 33 °C selama 24 jam atau lebih. Stres subletal dapat terjadi pada 15-22 °C dan 30-33 °C. Temperatur yang cocok bagi pertumbuhan udang putih adalah 23-30 °C. Pengaruh temperatur pada pertumbuhan udang putih adalah pada spesifitas tahap dan ukuran. Udang muda dapat tumbuh dengan baik dalam air dengan temperatur

hangat, tapi semakin besar udang tersebut, maka temperatur optimum air akan menurun (Wyban dan Sweeney, 1991).

2.1.3 Siklus Hidup

Udang vaname hidup pada laut tropis. Udang dewasa hidup dan memijah di laut. Namun, larva dan juvenil biasa ditemukan pada perairan terbuka seperti estuari, laguna atau area mangrove. Udang vaname betina tumbuh lebih cepat daripada udang jantan. Udang betina melepaskan telurnya pada daerah lepas pantai. Pembuahan hingga penetasan terjadi pada perairan (diluar tubuh udang). Setelah proses penetasan, larva stadia pertama, nauplii keluar dari telur. Nauplii berkembang dari stadia larva yang berbeda dengan metamorfosis (Dugassa dan Gaetan, 2018).

Siklus hidup udang vaname dimulai dari udang dewasa yang melakukan pemijahan hingga terjadi fertilisasi. Setelah 16 - 17 jam dari fertilisasi, telur menetas menjadi nauplius (0,32-0,58 mm). Tahap nauplii tersebut memakan kuning telur yang tersimpan dalam tubuhnya dan akan mengalami molting, molting (terjadi ketika karapas udang sudah tidak dapat menahan tubuh udang yang tumbuh) , kemudian metamorphosis menjadi zoea (1,05-3,30 mm) . Zoea akan mengalami metamorfosis menjadi mysis (3,50-4,80 mm). Mysis mulai terlihat seperti udang kecil memakan alga dan zooplankton. Setelah 3 sampai 4 hari, mysis mengalami metamorfosis menjadi *postlarva* (> 5 mm). Tahap postlarva adalah tahap saat udang sudah mulai memiliki karakteristik udang dewasa. Keseluruhan proses dari tahap nauplii sampai postlarva membutuhkan waktu sekitar 12 hari. Kemudian post larva akan dilanjutkan ketahap juvenil (Wyban dan Sweeney, 1991).

2.2 *White Feces Syndrome (WFS)*

2.2.1 Pengertian

Serangan penyakit yang dikenal dengan kotoran putih pada udang vaname saat ini telah menurunkan produktivitas udang vaname. Secara visual pada udang yang terserang penyakit ini akan terlihat kotoran udang berwarna putih memanjang dan mengapung pada permukaan air, eksoskeleton nampak lembek dan ditemukan infeksi protozoa sehingga menyebabkan insang gelap (Limsuwan, 2010).

Berdasarkan hasil identifikasi bakteri yang ditemukan pada hepatopankreas, usus dan haemolimp udang yang terserang penyakit berak putih adalah jenis *Vibrio* spp. yang merupakan salah satu dari bakteri yang ditemukan dalam kasus serangan penyakit berak putih. Diduga infeksi bakteri patogen *vibrio* terjadi pada saat dominasi yang tinggi di lingkungan dan masuk melalui makanan yang dikonsumsi pada media. Dalam kasus penyakit berak putih, udang dengan infeksi berat (>100 gregarin dalam 1 cm midgut usus) diduga dapat menyebabkan kerusakan pada mukosa usus (lapisan usus yang mampu menyerap nutrisi) sehingga menyebabkan bakteri patogen *vibrio* masuk ke dalam haemolimp dan bersifat mematikan (Supito, *et al.*, 2015).

2.2.2 Faktor Penyebab

Berdasarkan studi ekplorasi pada beberapa tambak yang terinfeksi WFS ditemukan penyebab terjadinya serangan WFS adalah warna air berubah menjadi kegelapan dengan didominasi oleh jenis plankton *Blue Green Algae* (BGA). Kandungan bahan organik air media tambak yang tinggi lebih dari 250 ppm. Air tambak mengandung jumlah bakteri *Vibrio* sp. dengan dominasi lebih

dari 12% dari total bakteri. Berdasarkan hasil identifikasi pada usus udang menunjukan adanya infeksi dari berbagai jenis bakteri *vibrio* (Dirjen Perikanan Budidaya, 2018).

Penyebab utama penyakit kotoran putih adalah gregarin (Parasit yang berhabitat di dalam saluran pencernaan dan rongga perut dari invertebrata yang hanya hidup pada satu inang). yang terinteraksi dengan bakteri genus *vibrio*. Penyakit ini tidak akan mematikan udang tetapi akan menurunkan daya tahan udang sehingga akan mengalami kematian setelah beberapa hari terserang (WWF Indonesia, 2014). Salah satu jenis *vibrio* yang ditemukan pada udang vaname yang terserang penyakit kotoran putih adalah *V. harveyi* (Chaweepack, et al., 2015). Diduga infeksi bakteri patogen *vibrio* terjadi pada saat dominasi yang tinggi di lingkungan dan masuk melalui makanan yang dikonsumsi pada media (Kaemudin, et al., 2016).

2.2.3 Penanggulangan

Chutchawanchaipan, et al. (2004) telah menggunakan ekstrak bawang putih untuk mencegah penyakit berak putih, bawang putih mengandung antibiotik alisin yang mampu mengendalikan bakteri gram positif maupun gram negatif. Secara komersial ekstrak bawang putih sudah beredar dalam bentuk tepung. Aplikasi ekstrak bawang putih sebaiknya dilakukan mulai dari awal pemeliharaan. Dosis yang dilakukan adalah 3-5 g/kg pakan udang atau 10-20 gr/kg pakan untuk ekstrak segar pemberian selama 5 minggu berturut - turut mampu menurunkan jumlah gregarin dari mid-gut usus udang windu. Pemberian dilakukan setiap hari dengan cara mencampurkan ekstrak bawang putih pada pakan kemudian dikering anginkan selama ½ jam. Pakan selanjutnya diberikan pada udang terutama pada waktu laju konsumsi pakan tinggi yang biasanya terjadi pada siang dan sore hari.

Bahan-bahan lain dapat dijadikan penanggulangan pada penyakit udang. Limbah-limbah yang banyak terbuang ternyata dapat dijadikan solusi untuk penyakit udang. Contohnya adalah tinta cumi. Ekstrak tinta cumi-cumi menunjukkan aktivitas antimikroba pada mikroorganisme gram positif dan gram negatif. *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* keduanya merupakan bakteri gram positif sedangkan *Salmonella* sp. dan *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif. Masing-masing bakteri ini penyebab beberapa penyakit bawaan makanan yang mempengaruhi kehidupan manusia. Baik bakteri gram positif maupun gram negatif menunjukkan kerentanan terhadap berbagai jenis tinta cumi-cumi, dimana zona penghambatannya berkisar antara 7 mm sampai 8,5 mm untuk ekstrak air suling dan dari 8,5 mm sampai 15 mm untuk ekstrak etanol (Zaharah dan Rabeta, 2018).

2.3 Gen *MIH* (Molting Inhibiting Hormone) pada Udang Vaname

2.3.1 Pengertian

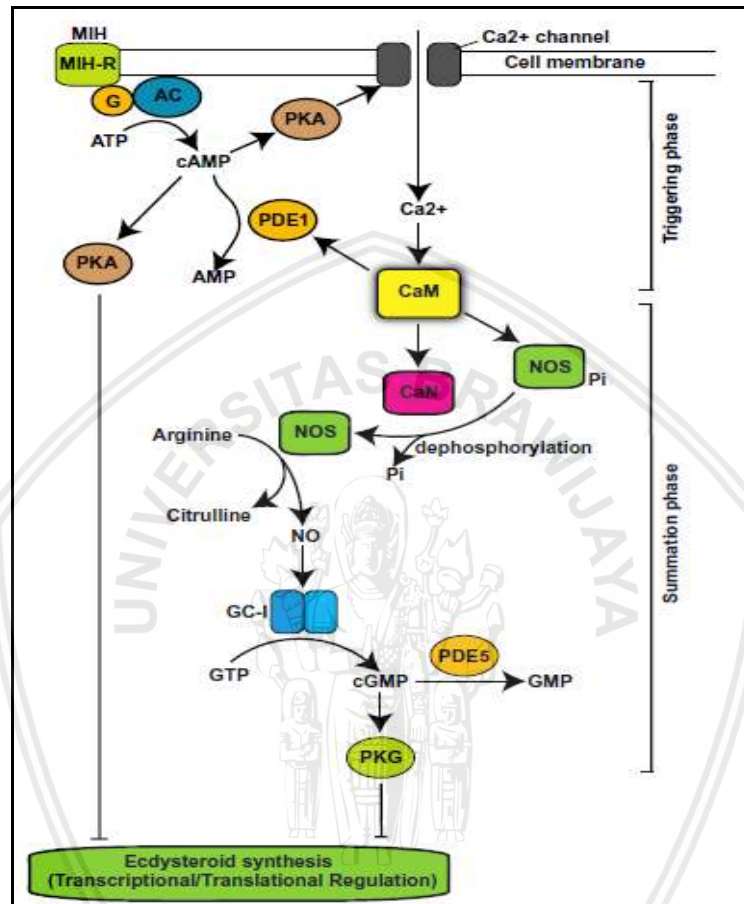
Aspek pertumbuhan krustasea dan perkembangannya, termasuk molting dan regenerasi, dikendalikan oleh hormon steroid yang disebut ekdisteroids. Ekdisteroids diproduksi oleh Y-organ yang berpasangan dengan kelenjar endokrin yang berasal dari ektodermal yang terletak di anterior *cephalothorax*. Secara umum, tingkat ekdisteroids di hemolim rendah sepanjang intermolt, meningkat selama premolt, kemudian jatuh sebelum molting, menghasilkan tingkat rendah ekdisteroids selama ecdysis (tahap E) dan postmolt. Sintesis ekdisteroids oleh Y-Organ secara negatif (berlawanan dengan kerja Y-Organ) diatur (dihambat) oleh *peptida neurohormone, molt-inhibiting hormone (MIH)*. *MIH* diproduksi dalam sel *neurosecretory eyestalk* (Organ X, merupakan organ pemicu molting) dan dilepaskan dari terminal akson yang terkait di kelenjar sinus

neurohemal. Urutan asam amino menempatkan *MIH* di dalam kelompok *Crustacea Hyperglychemic Hormone* (CHH). (Nakatsuji, et al., 2009).

. Proses molting pada krustasea ini diatur melalui hormon ekdisteroid dari Y-organ selama proecdysis dan *moult inhibiting hormone* (*MIH*) yang diproduksi oleh sekelompok sel *neurosecretory* (NSC) di kompleks kelenjar sinus X-organ dari tangkai mata udang. Tingkat sintesis ekdisteroid umumnya dikendalikan oleh *MIH* dari kompleks kelenjar sinus X-organ. Percobaan dengan *eyestalk ablated* (Proses pemotongan tangkai mata udang, dengan tujuan mempercepat kematangan gonad) pada udang dan dengan Y-organs yang diinkubasi secara in vitro dengan adanya ekstrak kelenjar sinus menunjukkan bahwa X-organ mengatur hormon ekdison (hormon pemicu molting) di Y-organ (Diwan, 2005).

Jalur pensinyalan *MIH* yang mengatur ekdisteroidogenesis (Jalur biosintesis yang memproduksi hormon steroid) pada kelenjar molting dekapod krustasea. Fase 'pemicuan' dimulai oleh pengikatan *MIH* ke reseptor protein-G berpasangan (*MIH-R*) dan aktivasi *adenylyl cyclase* (AC); cAMP meningkatkan Ca^{2+} intraseluler melalui fosforilasi protein kinase (PKA) dependen-cAMP dari saluran Ca^{2+} . Sensitivitas terhadap *MIH* ditentukan oleh aktivitas phosphodiesterase 1 (PDE1), yang bervariasi selama siklus molting. Fase 'penambahan' dimediasi oleh NO dan cGMP. Calmodulin (CaM) menghubungkan dua fase dengan mengaktifkan NO-synthase (NOS) secara langsung dan tidak langsung melalui calcineurin (CaN). Dephosphorilasi NOS oleh CaN berpotensi memperpanjang respons terhadap *MIH*. CaM juga dapat mengaktifkan PDE1 untuk menghambat fase pemicuan (PDE1 juga dapat menghidrolisis cGMP, sehingga menghambat fase penjumlahan). cGMP-dependen protein kinase (PKG) menghambat ekdisteroidogenesis. Aktivasi kronis PKA dapat secara langsung menghambat ekdisteroidogenesis. CAMP intraseluler yang meningkat

secara kronis dapat menghambat ecdisteroidogenesis secara langsung, mungkin dengan menghambat sintesis protein (Chang dan Mykles, 2011). Alur perangsangan *MIH* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Jalur Perangsangan gen *MIH* (Chang dan Mykles, 2011)

Keterangan: *MIH-R* = Protein-G ; ATP = Energi ; AC = Adenylyl Cyclase ; cAMP = *Cathelicidin Antimicrobial Peptide* ; PKA = Protein Kinase ; CaM = Calmodulin; NOS = NO-synthase ; CaN = Calcineurin ; PDE = Phosphodiesterase.

Beberapa kode cDNAs *MIH* pada krustasea telah diisolasi, digandakan dan tergambarkan oleh teknologi DNA rekombinan. Banyak pelaporan yang menjelaskan bahwa kloning kode cDNA pada *MIH* belum diketahui secara utuh pada struktur gen dan susunannya. Penting untuk mengetahui sekuens cDNA nukleotida pada kepiting (Chan, *et al.*, 1998). Primer spesifik yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *MIH* udang vaname pada penelitian Chen, *et al.*

(2007), yaitu MIH-f2 (5'-MRGGGSRKVATGGGKAATCG-3') and MIH-b1 (5'-MWGTCCSGSGTTVAGRATRC-3').

2.3.2 Letak

Kontrol pertumbuhan tergantung pada kontrol molting proses molting pada krustasea telah dibuktikan / prosesnya diatur melalui hormon ekdisteroid dari organ-Y selama proecdysis dan *moult-inhibiting hormone (MIH)* yang diproduksi oleh sekelompok sel neurosecretory (NSC) di organ-X kompleks kelenjar sinus pada tangkai mata udang (Diwan, 2005).

Pertumbuhan pada krustasea melibatkan peluruhan berkala pada eksoskeleton pada saat molting. Proses ini dibawah kontrol dua hormon yang saling berlawanan. Proses ini di stimulasi oleh *molting hormone* (ekdisteroid) dan tertahan oleh *molt inhibiting hormone (MIH)*. *MIH* diproduksi di medulla terminalis pada X-Organ (MTXO) dan terletak pada kelenjar sinus pada tangkai mata. Hormon ini mengatur molting dengan penghambatan produksi dari ekdisteroid oleh Y-Organ (Chan, *et al.*, 1998).

2.4 Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.)

2.4.1 Kandungan Senyawa Aktif pada Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.)

Tinta cumi merupakan limbah yang sering terbuang. Namun ternyata tinta cumi memiliki kandungan yang berguna. Tinta cumi bersifat 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 alami adalah melanoprotein yang mengandung 10-15% protein, sehingga menjadi salah satu sumber protein yang baik (Agusandi, *et al.*, 2013). Selain itu tinta cumi mengandung pula lemak dan glikosaminoglikan. Melanin dari tinta cumi-cumi

mempunyai aktivitas anti-tumor dan aktivitas antibakteri (Fitrial dan Khotimah, 2017).

Kandungan melanin sebesar 15% dari berat total tinta dan protein berkisar 5-8%. Melanin merupakan pigmen alami yang umumnya terdapat pada hampir semua organisme dengan berbagai macam fungsi. Produksi melanin pada kantung tinta memiliki sejumlah bahan kimia penting termasuk tirosi, dopamine, dan enzim seperti tirosinase, peroksidase, peptidoglikan. Tinta cumi memiliki kemampuan sebagai *antimicrobial* karena kandungan melaninnya (Derby, 2014).

2.4.2 Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.)

Ekstrak tinta cumi-cumi menunjukkan aktivitas antimikroba pada mikroorganisme gram positif dan gram negatif. *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* keduanya merupakan bakteri gram positif sedangkan *Salmonella* sp. dan *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif. Masing-masing bakteri ini penyebab beberapa penyakit bawaan makanan yang mempengaruhi kehidupan manusia. Baik bakteri gram positif maupun gram negatif menunjukkan kerentanan terhadap berbagai jenis tinta cumi-cumi, dimana zona penghambatannya berkisar antara 7 mm sampai 8,5 mm untuk ekstrak air suling dan dari 8,5 mm sampai 15 mm untuk ekstrak etanol (Zaharah dan Rabeta, 2018).

2.5 Antimikroba

Zat antimikroba adalah senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Zat antimikroba yang bersifat membunuh mikroorganisme disebut *microbicidal*. Sementara itu, zat yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme disebut *microbiostatic*. Dalam

perkembangannya, zat antimikroba yang banyak beredar luas saat ini cenderung bersifat sintetis. Jika digunakan secara terus-menerus dapat menimbulkan gangguan bagi kesehatan (Harmanto, 2012).

Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat berupa kerusakan 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 Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.6.1 Pengertian

Teknik *PCR* memungkinkan identifikasi organisme secara spesifik dan cepat pada berbagai jenis sampel bahan/produk pangan. Dengan instrumen *thermal cycler*, amplifikasi fragmen gen spesifik dilakukan dalam tiga tahapan, yaitu (1) Denaturasi DNA untai ganda menjadi untai tunggal; (2) Amplifikasi DNA untai tunggal dengan primer spesifik; dan (3) Ekstensi primer dengan enzim *polymerase*. Proses ini menghasilkan fragmen DNA target secara eksponensial sesuai dengan jumlah pengulangan/*cycle* yang dilakukan. Selanjutnya fragmen DNA target hasil *PCR* dianalisis baik dengan sekuensing maupun dengan teknik-teknik sidik jari seperti DGGE, RFLP, RAPD, PFGE, dan lain-lain (Dwiyitno, 2010).

Proses *PCR* melibatkan beberapa tahap yaitu (1) Pra-denaturasi DNA templat; (2) Denaturasi DNA templat; (3) Penempelan primer pada templat (*annealing*); (4) Pemanjangan primer (*extension*) dan (5) Pemantapan (*postextension*). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), dimana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

2.6.2 Proses Ekstraksi DNA

Prinsip dasar ekstraksi DNA adalah mengisolasi DNA dari komponen – komponen sel lainnya. Dalam proses isolasi DNA, strategi optimasi dan pH, sehingga senyawa esensial yang dapat mencegah DNA dari proses degradasi seharusnya terkandung dalam buffer ekstraksi yang digunakan (Maftuchah, *et al.*, 2014).

Dilanjutkan oleh Tan dan Yiap (2009), bahwa ekstraksi biomolekul, DNA, RNA, dan protein adalah metode yang paling penting yang digunakan dalam biologi molekular. Proses ini merupakan titik awal untuk mendiagnostik. DNA, RNA dan protein dapat diisolasi dari bahan biologis seperti jaringan hidup, jaringan sel, partikel virus, atau sampel lain, untuk tujuan analitis atau preparatif. Dua kategori yang terlibat dalam pemurnian DNA meliputi isolasi kontruksi DNA rekombinan seperti plasmid atau bakteriiofenotase dan isolasi DNA kromosom atau genomik dari organisme prokariotik dan eukariotik. Proses ekstraksi DNA terdiri dari 4 tahapan, yakni proses penghancuran (lisis) DNA, proses eliminasi RNA, proses presipitasi DNA dan proses hidrasi DNA.

2.6.3 Proses Amplifikasi

a. Pengertian Amplifikasi

Amplifikasi merupakan proses utama dalam *PCR*. Amplifikasi bertujuan untuk memperbanyak DNA target untuk dapat dianalisis menggunakan

elektroforesis gel agarose. Satu siklus dalam proses amplifikasi meliputi tiga tahap yaitu denaturasi, annealing primer, dan ekstensi. Pada proses amplifikasi dapat terjadi 30-40 siklus yang dapat menghasilkan berjuta-juta DNA (Fitriatin dan Manan, 2015).

b. Primer DNA

Primer adalah molekul oligonukleotida untai tunggal yang terdiri atas sekitar 30 basa. Desain primer yang tepat adalah salah satu faktor yang paling penting dalam keberhasilan sekuensing DNA (Sasmito, *et al.*, 2014). Ditambahkan oleh Handoyo dan Rudiretna (2000), keberhasilan suatu proses *PCR* sangat tergantung dari primer yang digunakan. Pada proses *PCR*, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses ekstensi DNA. Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari *database GenBank*. Apabila urutan DNA maupun urutan protein yang dituju belum diketahui maka perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat.

- Perancangan Primer DNA

Dalam merancang suatu primer perlu diperhatikan komposisinya. Rentetan nukleotida yang sama perlu dihindari, hal ini dapat menurunkan spesifisitas primer yang dapat memungkinkan terjadinya *mispriming* di tempat lain. Kandungan (G+C) (% jumlah G dan C) sebaiknya sama atau lebih besar dari kandungan (G+C) DNA target. Sebab primer dengan % (G+C) rendah diperkirakan tidak akan mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada tempat yang dituju dengan demikian akan menurunkan efisiensi proses

PCR. Selain itu, urutan nukleotida pada ujung 3' sebaiknya G atau C. Nukleotida A atau T lebih toleran terhadap *mismatch* dari pada G atau C, dengan demikian akan dapat menurunkan spesifisitas primer (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

Melting temperature (T_m) adalah temperatur di mana 50% untai ganda DNA terpisah. Pemilihan T_m suatu primer sangat penting karena T_m primer akan berpengaruh sekali dalam pemilihan suhu *annealing* proses *PCR*. T_m berkaitan dengan komposisi primer dan panjang primer. Secara teoritis T_m primer dapat dihitung dengan menggunakan rumus $[2(A+T)+4(C+G)]$. Sebaiknya T_m primer berkisar antara 50 – 65 °C (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

Annealing Temperature (T_a) primer merupakan suhu yang diperkirakan agar primer dapat berkaitan dengan template (DNA) secara stabil. Suhu *annealing* yang tinggi akan menyulitkan terjadinya ikatan primer sehingga menghasilkan produk *PCR* yang kurang efisien. Sebaliknya, suhu aneling yang terlalu rendah menyebabkan terjadinya penempelan primer pada DNA di tempat yang tidak spesifik. Nilai suhu aneling yang sebanding dengan suhu leleh menyebabkan suhu aneling tidak dimasukkan dalam perhitungan keoptimalan desain primer (Sasmito, *et al.*, 2014).

- Mekanisme Kerja Primer DNA

Pada tahap penempelan primer (*annealing*), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses *annealing* ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada template. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu 50 °C – 60 °C. Selanjutnya, *DNA polymerase* akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada 72 °C (Fatchiyah, *et al.*, 2011).

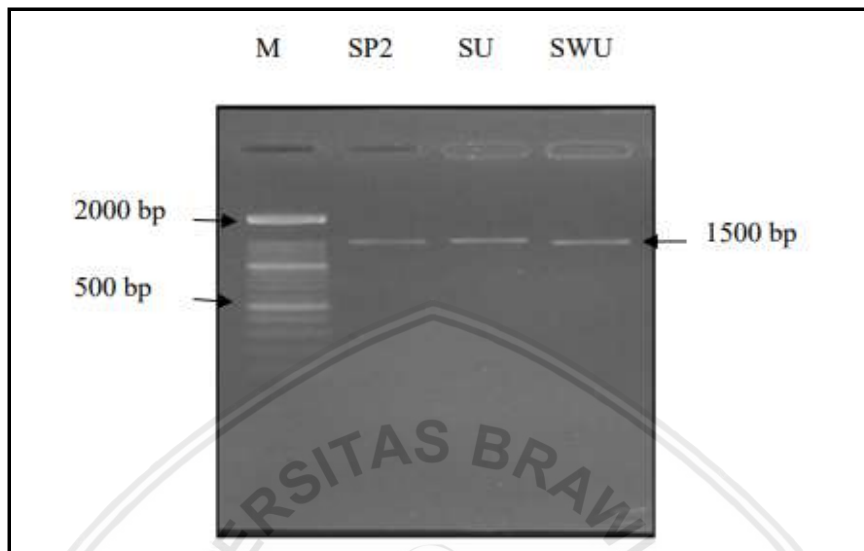
Suhu *annealing* adalah suhu di mana primer akan menempel pada *template DNA*, besarnya suhu dapat dihitung berdasarkan nilai *melting temperature* (T_m) dari masing-masing primer. Pencarian kondisi optimal dari suhu *annealing* sangat penting, karena berkaitan dengan spesifitas dan sensitifitas produk PCR (Asy'ari dan Noer, 2005).

2.6.4 Proses Elektroforesis

Elektroforesis merupakan proses setelah amplifikasi dalam kegiatan identifikasi bakteri. Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul selular berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Teknik ini dapat digunakan dengan memanfaatkan muatan listrik yang ada pada makromolekul, misalnya DNA yang bermuatan negatif. Jika molekul yang bermuatan negatif dilewati melalui suatu medium, misal gel agarose, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (Yuwono, 2009).

Elektroforesis DNA umumnya menggunakan metode elektroforesis gel agarosa (Karp, 2008). Metode elektroforesis tersebut pada prinsipnya melibatkan fase stasioner yang berupa gel agarosa dan fase gerak berupa buffer *Tris-acetate* EDTA (TAE) atau *Tris-borat* EDTA (TBE) (Switzer, 1999). TBE (*Tris-borat* EDTA) 1X, *Tris/Borat* adalah buffer yang umum digunakan sebagai buffer elektroforesis karena memiliki kapasitas buffering yang tinggi pada titik isoelektriknya (Ausubel, 2003). *Borat* bertindak sebagai *conducting* ion sehingga dapat mempertahankan kesetimbangan ion H^+ dan OH^- yang dihasilkan oleh elektroda, hal ini berhubungan dengan fungsi buffer dalam menjaga kesetimbangan pH saat migrasi fragmen DNA berlangsung, perubahan pH dapat

mendenaturasi struktur DNA sehingga mengubah elektromobilitas DNA (Martin, 1996). Contoh elektroforegram dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Contoh Elektroforegram DNA-PCR universal pada gel agarose (Seprianto, 2017)

2.6.5 Sekuensing

Sekuensing merupakan proses penentuan urutan basa nukleotida suatu molekul dari suatu materi genetik seperti fragmen DNA atau RNA (Russell, 1990). Metode sekuensing yang umum digunakan adalah metode Maxam-Gilbert dan Sanger. Metode Maxam-Gilbert merupakan metode sekuensing yang menggunakan bahan kimia spesifik untuk memotong untai fragmen DNA target, sedangkan metode Sanger menggunakan enzim DNA polimerase untuk membentuk salinan komplementer dari fragmen DNA target. Sebagian besar proses sekuensing telah dimodifikasi menjadi suatu program pada komputer, sehingga dikenal sebagai *automated DNA sequencing*. Proses tersebut merupakan modifikasi dari metode Sanger (Sambrook, *et al.*, 1989).

Komputerisasi program sekuensing umumnya menggunakan beberapa macam pewarna yang dapat berpendar untuk memberikan label pada ddNTP. Pewarna tersebut menggantikan peran dari radioaktif fosfat. Pembacaan sekuen

dilakukan oleh sistem komputer dengan membedakan panjang gelombang yang berbeda dari hasil pendaran beberapa jenis pewarna (Paoella, 1998).

Hasil sekuensing yang didapat kemudian dikonfirmasi dengan menggunakan program *BLASTn* dan *BLASTx* pada *gene bank*. Program *BLASTn* digunakan untuk mendapatkan informasi organisme yang memiliki kesamaan nukleotida dengan sampel nukleotida yang dimiliki, sedangkan program *BLASTx* digunakan untuk mendapatkan informasi organisme yang memiliki kesamaan asam amino dengan sampel nukleotida yang dimiliki (Priyambodo, 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 yang digunakan dalam penelitian

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	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.	Heater masak	Untuk memasak air hangat
12.	Akuarium 30 x 30 x 40 cm ³	Sebagai wadah pemeliharaan udang vaname
13.	Selang aerasi	Untuk menyalurkan O ₂ dari aerator ke media
14.	Batu aerasi	Untuk memecah O ₂ yang dihasilkan oleh aerator ke air
15.	Selang air	Untuk penambahan air pada akuarium
16.	<i>Heater</i> akuarium	Untuk memberikan suhu panas yang sesuai
17.	Seser	Untuk mempermudah dalam memindahkan udang
18.	Kendi	Sebagai wadah penampungan air laut
19.	pH meter	Untuk mengukur besarnya pH dalam media pemeliharaan
20.	Thermometer	Untuk mengetahui suhu air sampel
21.	DO meter	Untuk mengukur kandungan DO dalam media pemeliharaan
22.	Mikroskop	Untuk membantu pengamatan <i>blue green algae</i>
23.	<i>Object Glass</i>	Sebagai wadah sampel plankton

(Lanjutan Tabel 1.)

No.	Alat	Kegunaan
24.	<i>Blower</i>	Untuk sumber oksigen utama
25.	<i>Handtally counter</i>	Untuk membantu menghitung hemosit
26.	Hotplate	Untuk memanaskan larutan
27.	Erlenmeyer	Untuk wadah menghomogenkan larutan
28.	Pipet volume	Untuk membantu mengambil larutan
29.	Bola hisap	Untuk membantu pipet volume
30.	Statif	Untuk tempat buret
31.	Buret	Untuk wadah larutan
32.	Paranet	Untuk pelindung agar udang tidak melompat keluar dari akuarium
33.	Klip Kertas	Untuk menahan paranet pada akuarium
34.	Loyang	Untuk tempat pakan yang telah disemprot ekstrak tinta cumi-cumi
35.	Spektrofotometer	Untuk mengukur kualitas air
36.	Kuvet	Sebagai wadah sampel air pada pengukuran di Spektrofotometer
37.	<i>Sectio set</i>	Untuk pembedahan udang
38.	Spekto NanoDrop	Untuk mengetahui nilai kemurnian DNA
39.	<i>PCR</i>	Untuk mengamplifikasi sampel DNA
40.	<i>Vortex Mixer</i>	Untuk menghomogenkan larutan sampel
41.	Sentrifuse	Untuk memisahkan Pellet DNA dengan Supernatan
42.	Sentrifuse <i>SpinDown</i>	Untuk menurunkan larutan yang menempel pada dinding <i>tube</i>
43.	<i>Spin Column tube</i>	Untuk memisahkan benang DNA saat ekstraksi DNA
44.	Inkubator <i>Shaker</i>	Menginkubasi sampel diatas suhu ruang dengan pengadukan.
45.	<i>Tube</i> 1,5 ml steril	Sebagai wadah larutan ekstraksi.
46.	<i>Tube PCR</i> 10 μ l	Sebagai wadah sampel <i>PCR</i> .
47.	<i>Microwave</i>	Untuk menghomogenkan agarose
48.	Cetakan Agar	Membuat agar dengan bentuk persegi Panjang dengan lubang (sumur) yang dibutuhkan.
49.	Elektroforesis	Untuk memberi tegangan listrik pada agar.
50.	UV Transluminator	Sebagai tempat menaruh agar, untuk merealisasikan visualisasi hasil elektroforesis.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini dapat dilihat pada

Tabel 2.

Tabel 2. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian

No.	Bahan	Kegunaan
1.	Ekstrak tinta cumi-cumi (<i>Loligo</i> sp.)	Sebagai bahan yang akan diuji pengaruhnya
2.	Aquades	Sebagai bahan pelarut
3.	Udang vaname (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Sebagai objek yang diuji
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.	Pakan	Sebagai makanan udang selama pemeliharaan
12.	Test kit nitrat	Sebagai pengukur kadar nitrat
13.	Test kit nitrit	Sebagai pengukur kadar nitrit
14.	Test kit ammonia	Sebagai pengukur kadar ammonia
15.	KMnO ₄	Sebagai oksidator dan larutan titrasi TOM
16.	H ₂ SO ₄	Sebagai katalisator
17.	Na-Oxalate	Sebagai reduktor
18.	Air sampel	Sebagai air yang diukur kualitas airnya
19.	Methyl orange	Sebagai pengondisian asam
20.	HCl	Sebagai larutan titrasi alkalinitas
21.	Blue tip	Untuk membantu mengambil larutan
22.	White tip	Untuk membantu mengambil larutan
23.	Trashbag	Sebagai penutup toples
24.	Masker	Sebagai pelindung mulut bagi peneliti

(Lanjutan Tabel 2.)

No.	Bahan	Kegunaan
25.	Sarung tangan	Sebagai alat mencegah kontaminasi
26.	Larutan elusi (TE-Buffer)	Sebagai larutan blanko uji kuantitatif DNA
27.	Larutan Kit Tiangen (Buffer GA, Buffer GB, Buffer GD, Buffer DW, Buffer TE, Proteinase K, <i>Spin Column</i> , Etanol Absolut)	Sebagai larutan Ekstraksi DNA
28.	Primer <i>MIH Forward</i> (5'-ATTATACACTCATGTATCGGCTGGC-3') dan <i>Reverse</i> (5'-AGAGGCTTGTCCCAACAACACTACAAT-3')	Sebagai pembatas DNA Target yang akan diduplikasi
29.	My Taq	DNTP; sebagai cetakan DNA yang akan diduplikasi, Taq Polimerase; sebagai enzim yang dapat menduplikasi DNA.
30.	ddH ₂ O	Sebagai pelarut saat proses <i>mixing</i> .
31.	Bubuk agarose	Bahan dasar pembuatan agarose.
32.	EtBr (Etidium Bromida)	Pelarut pembuatan agarose

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimen. Umar (2005) menjelaskan bahwa metode eksperimen merupakan langkah-langkah lengkap yang diambil sebelum eksperimen dilakukan agar data yang semestinya diperlukan dapat diperoleh sehingga analisis menjadi obyektif. Variabel bebas dijadikan sebagai variabel eksperimen, variabel penyebab atau variabel perlakuan yang karakteristiknya diyakini dapat menghasilkan perbedaan, sedangkan variabel terikat atau variabel akibat merupakan hasil dari suatu penelitian. Dikatakan terikat karena tergantung atas variabel bebas.

3.3 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 dimana peneliti mengadakan pengamatan terhadap gejala-gejala subjek yang ditelitinya dengan perantara sebuah alat.

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian merupakan gambaran umum penelitian yang akan dilaksanakan oleh peneliti untuk mencapai tujuan tertentu. Penelitian ini menggunakan Rancangan Penelitian Deskriptif. Sukmadinata (2011) menjelaskan bahwa Rancangan Penelitian Deskriptif merupakan rancangan percobaan yang ditujukan untuk mendeskripsikan atau menggambarkan fenomena-fenomena yang ada, baik fenomena yang bersifat alamiah atau rekayasa manusia. Penelitian deskriptif juga berarti penelitian yang dimaksudkan untuk menjelaskan fenomena atau karakteristik individual, situasi atau kelompok tertentu secara akurat. Penelitian deskriptif merupakan cara untuk menemukan

makna baru, menjelaskan sebuah kondisi keberadaan, menentukan frekuensi kemunculan sesuatu dan mengkategorikan informasi. Penelitian deskriptif dilakukan dengan memusatkan perhatian kepada aspek-aspek tertentu dan sering menunjukkan hubungan antar berbagai variabel. Setiap metode penelitian yang digunakan dalam penelitian memiliki desain atau rancangan. Rancangan digunakan sebagai pedoman yang dapat ditempuh oleh peneliti dalam melakukan penelitian. Sebuah rancangan penelitian meliputi proses perencanaan dan pelaksanaan penelitian.

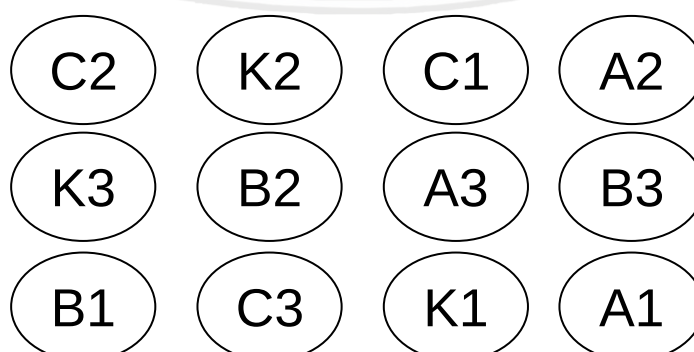
Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) yang mengacu pada penelitian sebelumnya oleh Anjaini (2016), bahwa dosis terbaik ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) untuk menghambat bakteri *V. harveyi* adalah 8 ppm, sehingga digunakan dosis 8 ppm untuk pencampuran pada pakan untuk sampel perlakuan dan digunakan kontrol pembanding yaitu sebagai perlakuan sampel terinfeksi WFS dan tanpa pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.).

Pada penelitian ini digunakan 4 perlakuan dengan salinitas berbeda yaitu 24 ppt, 27 ppt, dan 30 ppt, sedangkan untuk kontrol 33 ppt. Pengambilan kadar salinitas pada penelitian diambil dari parameter toleransi kehidupan udang vaname dan bakteri *vibrio* dimana bakteri merupakan parameter yang menyebabkan terjadinya sindrom berak putih. Udang vaname mempunyai kemampuan beradaptasi terhadap salinitas yang luas dengan kisaran salinitas 0,5-45 ppt (Pasongli, *et al.*, 2015). *Vibrio* tumbuh dengan rentang toleransi salinitas 5-80 ppt, dan tumbuh optimal pada salinitas 20-40 ppt (Taslihan, 1992). Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Dari perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 12 sampel. Pada setiap perlakuan nantinya akan diambil 1 tangkai mata 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.). Pada perlakuan ini udang yang digunakan adalah udang yang baru datang tanpa adanya perlakuan pemeliharaan.

Denah penelitian disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. 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.)

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 cumi-cumi. Cumi-cumi yang digunakan berasal dari wilayah Pasuruan, Jawa Timur dalam keadaan segar. Pengambilan tinta diawali dengan dipotongnya bagian mantel (bagian bawah/posterior tubuh cumi-cumi) secara vertikal atau membujur 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 dan 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).

- Pengambilan tinta cumi-cumi dilakukan dengan 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. Setelah 7 hari 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. 25 mL tinta cumi diekstraksi dengan 75 mL pelarut polar dan non-polar (1: 3 v / v) seperti heksana, petroleum eter, kloroform, butanol, etil asetat , aseton, metanol dan etanol dari botol kaca steril dengan metode ekstraksi paralel. Tinta dicampur dengan pelarut selama 7 hari untuk ekstraksi kasar.

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 pemusnahan mikroorganisme patogen bakteri-bakteri hingga ke bagian sporanya (Adji, *et al.*, 2007). 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, tekan 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 di putar pada 15 menit.
- Setelah 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 (mencampurkan 20 gram kaporit ke dalam 1 liter air) dan di rendam selama 24 jam. Setelah 24 jam, ditambahkan larutan Na-thiosulfat 10.000 ppm (mencampurkan 10 gram ke dalam 1 liter air). Akuarium setelah di sterilisasi selama 24 jam, kemudian dibilas lagi menggunakan air tawar. Setelah itu, dilakukan pencucian menggunakan sabun dan dibilas air, lalu dikeringkan. Selang aerator, batu aerator juga disterilisasi dengan cara direbus dengan air panas hingga 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 ke dalam 1 liter air laut (20.000 ppm). 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 (10.000 ppm).

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. Udang vaname yang diambil memiliki bobot rata-rata 2,18 gram ($\pm 0,49$).

e. Pengambilan Sampel BGA yang terinfeksi (WFS)

Blue Green Algae diambil dari Tambak Tani Manunggul 2, Kabupaten Tuban, Jawa Timur. Kepadatan *Blue Green Algae* sebesar $213,33 \times 10^4$ sel/ml. Salinitas BGA yang di dapat 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 menimbang ekstrak tinta cumi-cumi sesuai dosis perlakuan 8 ppm. Kemudian dilarutkan ke dalam air hangat. Ekstrak disemprotkan pada pakan secara merata dan diinkubasi dengan dijemur 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 di dalam *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 empat perlakuan, antara lain 24 ppt (A), 27 ppt (B), 30 ppt (C), dan 33 ppt (K). 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 air *mix*, N_1 adalah salinitas air yang diinginkan, sedangkan V_2 adalah volume air *BGA* dan N_2 adalah salinitas air *BGA* yang sudah ditetapkan dimana nilainya 33 ppt. 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 (*Day of Culture* / Masa pemeliharaan udang hari ke-30). Udang tersebut direndam di air media yang berisi biakan bakteri 10^6 cfu/mL. Setiap akuarium diisi air media sesuai dengan empat perlakuan salinitas, 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 dimasukan kedalam masing-masing akuarium dengan perlakuan salinitas yang berbeda yaitu perlakuan A (24 ppt), perlakuan B (27 ppt), dan perlakuan C (30 ppt). Ugang vaname dipelihara selama 14 hari dan diamati gejala klinis udang yang telah diberi *treatment* melalui pakan.

Ugang 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 harian yang diukur 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, amonia, TOM dan alkalinitas.

e. Pengambilan Sampel Organ Udang Vaname (Tangkai Mata)

Mengambil beberapa udang disetiap perlakuan guna untuk diambil tangkai matanya, dilakukan uji *PCR* guna mengetahui pengaruh dari pemberian ekstrak tinta cumi-cumi dengan salinitas media yang berbeda terhadap ekspresi gen *MIH* pada udang vanname. Tangkai mata udang diambil, karena merupakan pusat produksi gen *MIH*, hal ini didukung oleh penelitian Chan, *et al.*, (1998), *MIH* diproduksi di medulla terminalis pada X-Organ (MTXO) dan terletak pada kelenjar sinus pada tangkai mata. Hormon ini mengatur molting dengan penghambatan produksi dari ekdisteroid oleh Y-Organ.

Pertama yaitu dipotong bagian rostrum udang menggunakan *sectio set*, lalu diambil bagian tangkai matanya. Tangkai mata yang diambil adalah dari setiap perlakuan dengan 3 ulangan, masing-masing paling sedikit 1 tangkai mata udang. Sampel tangkai mata diletakkan pada *tube* dan diberi label setiap masing-masing *tube*. Untuk selanjutnya dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya mutasi pada udang yang terinfeksi *WFS*.

3.6 Parameter Uji

3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama dalam penelitian ini adalah uji kuantitatif DNA, hasil amplifikasi DNA, hasil elektroforesis dan hasil sekuensing.

a. Uji Kuantitatif DNA

Uji kuantitatif DNA didapatkan dari hasil ekstraksi DNA. Tan dan Yiap (2009), mengatakan bahwa ekstraksi biomolekul, DNA, RNA, dan protein adalah metode yang paling penting yang digunakan dalam biologi molekular. Proses ini merupakan titik awal untuk mendiagnostik. DNA, RNA dan protein dapat diisolasi dari bahan biologis seperti jaringan hidup, jaringan sel, partikel virus,

atau sampel lain, untuk tujuan analitis atau preparatif. Pada proses ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Kit Tiangen dengan prosedur sebagai berikut:

- Tangkai mata udang ditimbang dengan timbangan analitik hingga didapatkan 0,05 gram.
- Tangkai mata udang dicacah dalam *tube* 1,5 ml hingga halus dan ditambahkan TE-Buffer pH 7.
- Setelah halus ditambahkan 200 μ L buffer GA dan 20 μ L proteinase-K dan dilapisi tutup *tube* 1,5 ml dengan paraffin (agar pada saat proses inkubasi pada alat *shaker incubator* sampel tidak tumpah).
- Sampel diinkubasi pada *shaker incubator* dengan suhu 56 °C semalam untuk mengoptimalkan proses lisis pada sel.
- Sampel disentrifugasi selama 8 menit dengan kecepatan 11.000 rpm (*Room Temperature*).
- Diambil supernatan dan ditambahkan buffer GB untuk lebih memaksimalkan proses lisis dan diinkubasi kembali pada suhu 70 oC selama 30 menit.
- Ditambahkan 200 μ L etanol absolut dan divotex selama 10 detik.
- Sampel dipindah kan ke *spin column* dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 4 menit.
- Dipindahkan ke *spin column* baru dan ditambahkan 500 μ L buffer GD dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 4 menit.
- Dipindahkan ke *spin column* baru dan ditambahkan 600 μ L buffer PW dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 4 menit sebanyak 2 kali (diulang 1 kali lagi).

- Sampel di sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 6 menit untuk membersihkan sisa etanol yang menempel.
- Sampel dipindahkan ke *tube* 1,5 ml dan ditambahkan 25 μ L Buffer-TE hangat dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit.
- Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 8 menit.
- Sampel ditambahkan Buffer-TE hangat dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit.
- Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 8 menit.

Setelah proses ekstraksi selesai, didapatkan ekstrak DNA pada tangkai mata, kemudian dilakukan uji kuantitatif dengan spektrofotometer NanoDrop. Penggunaan spektrofotometer NanoDrop yaitu dengan ditetaskan larutan elusi pada probe spektro untuk perlakuan kalibrasi, kemudian dilap menggunakan tisu. Setelah itu ditetaskan ekstrak DNA ke probe dan diklik "*measure*". Kemudian dilihat hasil kemurnian dan konsentrasi DNANYa. Sambrook dan Russel (2001), mengatakan kuantifikasi DNA umumnya mengukur *purity*, konsentrasi protein, konsentrasi DNA dan absorbansi. *Purity* merupakan tingkat kemurnian sampel DNA, *Purity* didapat dari hasil ratio absorbansi A260/A280. Tingkat kemurnian DNA berbanding lurus dengan nilai absorbansi dan berkolerasi positif, dimana nilai rasio absorbansi sama dengan 2 maka sampel tidak terkontaminasi.

Untuk melanjutkan ke tahapan selanjutnya yaitu amplifikasi DNA, dibutuhkan pengenceran untuk mendapatkan hasil konsentrasi DNA yang sama yaitu 100 ng/ μ L. Pengenceran DNA dilakukan dengan penambahan larutan ddH₂O sesuai dengan perhitungan. Volume dari pengenceran DNA yang dilakukan dapat dilihat pada Tabel 3. Perhitungan pengenceran DNA dapat dilihat pada Lampiran 6.

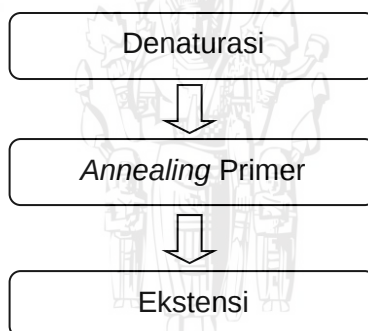
Tabel 3. Volume Pengenceran DNA

Perlakuan	Volume DNA (μL)	Volume ddH ₂ O (μL)
K (-)	9,1	40,9
TA	12,5	37,5
TB	15,6	34,4
TC	10,7	39,3
K (+)	14,4	35,6

Keterangan : K(-) = Udang Normal; TA = Udang Perlakuan A (Salinitas 24 ppt); TB = Udang Perlakuan B (Salinitas 27 ppt); TC = Udang Perlakuan C (Salinitas 30 ppt); K (+) = Udang Terinfeksi WFS tanpa perlakuan ekstrak tinta cumi-cumi (Salinitas 33 ppt).

b. Hasil Amplifikasi DNA

Amplifikasi merupakan proses utama dalam *PCR*. Amplifikasi bertujuan untuk memperbanyak DNA target untuk dapat dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarose. Satu siklus dalam proses amplifikasi meliputi tiga tahap sebagai berikut:



(1) denaturasi (Pemisahan untai ganda DNA); (2) annealing primer (pengenalan primer DNA ke DNA target) dan (3) ekstensi (Pemanjangan untai DNA baru). Pada proses amplifikasi dapat terjadi 30-40 siklus yang dapat menghasilkan berjuta-juta DNA. Amplifikasi *PCR* dilakukan dengan menggunakan alat *Thermal cycler* (Fitriatin dan Manan, 2015).

Sebelum dilakukannya proses amplifikasi pada alat *thermal cycler* atau *PCR*, 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 <i>MIH</i> (5'ATTATACACTCATGTATCGGCTGG C-3')	0,5 μ L	5	3 μ L
Primer R <i>MIH</i> (5'AGAGGCTTGTCCCAACAACACTACAA T-3')	0,5 μ L	5	3 μ L
ddH ₂ O	2,75 μ L	5	16,5 μ L
2x Go Taq Green	5 μ L	5	30 μ L
BSA	0,25 μ L	5	1,5 μ L
DNA	1 μ L	5	6 μ L
Jumlah Volume <i>PCR Mix</i>			60 μ L

Total dari larutan *PCR mix* dituangkan pada *tube* 1,5 ml tanpa adanya DNA terlebih dahulu, kemudian dibagi rata sejumlah sampel (5 sampel) ke *tube* 0,2 μ L sebanyak 9 μ L pada 5 *tube*. Setelah terbagi ke 5 *tube* dimasukkan 1 μ L DNA pada setiap *tube*. Selanjutnya *tube PCR* dimasukkan kedalam lubang sampel dan jalankan program sesuai dengan *primer*, setelah mesin berhenti bekerja diambil sampel untuk ke proses elektroforesis.

c. Hasil Elektroforesis

Elektroforesis merupakan proses setelah amplifikasi. Elektroforesis adalah suatu pemisahan molekul selular berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Teknik ini dapat digunakan dengan memanfaatkan muatan listrik yang ada pada makromolekul, misalnya DNA yang bermuatan agarose. Jika molekul yang bermuatan agarose dilewati melalui suatu medium, agaros gel agarose, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (Yuwono, 2009).

Elektroforesis DNA umumnya menggunakan metode elektroforesis gel agarose (Karp, 2008). Metode elektroforesis tersebut pada prinsipnya melibatkan

fase stasioner yang berupa gel agarose dan fase gerak berupa buffer *Tris-acetate* EDTA (TAE) atau *Tris-borat* EDTA (TBE) (Switzer, 1999). TBE (*Tris-borat* EDTA) 1X, *Tris/Borat* adalah buffer yang umum digunakan sebagai buffer elektroforesis karena memiliki kapasitas buffering yang tinggi pada titik isoelektriknya (Ausubel, 2003). Borat bertindak sebagai *conducting* ion sehingga dapat mempertahankan kesetimbangan ion H^+ dan OH^- yang dihasilkan oleh elektroda, hal ini berhubungan dengan fungsi buffer dalam menjaga kesetimbangan pH saat migrasi fragmen DNA berlangsung, perubahan pH dapat mendenaturasi struktur DNA sehingga mengubah elektromobilitas DNA (Martin, 1996).

Tahapan elektroforesis yaitu pembuatan agarose, elektroforesis dan visualisasi. Tahapan elektroforesis adalah sebagai berikut:

- Pembuatan Agarose

Prosedur Pembuatan Agarose adalah sebagai berikut:

1. 0,8 gram bubuk agarose ditimbang dan dimasukkan kedalam gelas ukur 250 ml. Kemudian 100 ml larutan TAE 1x atau TBE 1x dicampurkan pada gelas ukur 250 ml.
2. Gelas ukur dilapisi plastik wrap dan dilubangi, tujuannya adalah untuk mencegah larutan menguap terlalu banyak dan agar tidak tumpah. Larutan dimasukkan kedalam *microwave* hingga bubuk agarose larut (kurang lebih 1 menit 30 detik).
3. Larutan dituangkan kedalam cetakan agar.

- Elektroforesis

Prosedur elektroforesis adalah sebagai berikut:

1. Sampel hasil *PCR* dimasukkan ke sumur gel agarose sebanyak 3-5 μ l.
2. Ladder dimasukkan pada ujung kiri sumur.

3. Running elektroforesis selama ± 30 menit dengan larutan TAE 1x atau TBE 1x pada tegangan 100 V dan 80 A.
4. Gel agarose direndam pada 200 ml larutan TAE 1x atau TBE 1x ditambahkan 20 μ l *Diamond dye* selama 20-30 menit.

- Visualisasi

Prosedur Visualisasi adalah sebagai berikut:

1. Gel agarose yang telah di elektroforesis ditaruh pada UV Transluminator.
2. Komputer dan Kamera dihidupkan.
3. Masuk ke dalam program.
4. Nyalakan Sinar UV.
5. Klik foto ("*Capture*") untuk mendapatkan hasil elektroforesis dan lihat hasilnya (berapa *basepair*).

Setelah visualisasi menggunakan alat, elektroforegram dianalisis pada *software* Biorad for PC untuk mengetahui intensitas band DNA dan rentang *basepair* pada elektroforegram.

d. Hasil Sekuensing

Hasil sekuensing yang didapat kemudian dikonfirmasi dengan menggunakan program *BLASTn* dan *BLASTx* pada *gene bank*. Program *BLASTn* digunakan untuk mendapatkan informasi organisme yang memiliki kesamaan nukleotida dengan sampel nukleotida yang dimiliki, sedangkan program *BLASTx* digunakan untuk mendapatkan informasi organisme yang memiliki kesamaan asam amino dengan sampel nukleotida yang dimiliki (Priyambodo, 2011).

Pada penelitian sekuensing menggunakan *software* MEGA X dan *website* *BLAST* (BLAST.ncbi.nih.gov/). Penggunaan *software* MEGA X adalah untuk penyelarasan sekuens, mendapatkan FASTA untuk *BLAST* dan melihat ada tidaknya mutasi pada sekuens. Sedangkan *website* *BLAST* digunakan untuk

mendapatkan informasi yang memiliki kesamaan informasi genetic dengan sampel yang dimiliki.

3.6.2 Parameter Penunjang

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

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 $KMnO_4$ (1 mol $KMnO_4$ melepas 5 oksigen dalam reaksi ini)
- 0,01 : Molaritas $KMnO_4$
- 1000 : Konversi ml ke liter
- ml air sampel : jumlah air sampel yang digunakan.

Menurut Hastuti (2012) pengukuran alkalinitas menggunakan rumus :

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

Keterangan :

- V titran : Volume titran HCl yang terpakai
- N titran : Normalitas HCl
- 100 : Molaritas $CaCO_3$
- 2 : Valensi dari $CaCO_3$

1000 : Konversi dari ml ke liter

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

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Parameter Utama

Penelitian mengenai ekspresi gen *Molting Inhibiting Hormone (MIH)* pada udang vaname ini terdiri dari dua tahapan, yaitu pengamatan di laboratorium dan pengujian. Pada pengujian didapatkan data parameter utama. Tahapan pengambilan parameter utama yaitu uji kuantitatif DNA, amplifikasi DNA, elektroforesis dan analisis sekuensing. Data parameter utama yang diambil yaitu mengenai hasil uji kuantitatif DNA, hasil amplifikasi DNA, hasil elektroforegram dan hasil sekuensing.

4.1.1 Hasil Uji Kuantitatif DNA

Hasil dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi terhadap gen *MIH* pada udang vaname yang terinfeksi *WFS* dengan salinitas media yang berbeda untuk uji kuantitatif dari hasil ekstraksi DNA didapatkan hasil pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji Kuantitatif DNA

Sampel	Nilai Kemurnian ($\text{\AA}260/\text{\AA}280$)	Nilai Konsentrasi DNA (ng/ μL)
K (-)	1.98	548.83
TA	1.93	399.61
TB	2.04	320.14
TC	2.24	469
K (+)	2.28	347.28

Keterangan : K(-) = Udang Normal; TA = Udang Perlakuan A (Salinitas 24 ppt); TB = Udang Perlakuan B (Salinitas 27 ppt); TC = Udang Perlakuan C (Salinitas 30 ppt); K (+) = Udang Terinfeksi *WFS* tanpa perlakuan ekstrak tinta cumi-cumi (Salinitas 33 ppt).

Hasil uji kuantitatif dengan alat NanoDrop ialah berupa nilai kemurnian DNA pada $\text{\AA}260/\text{\AA}280$ dan nilai konsentrasi DNA. DNA berkualitas baik berdasarkan uji nano drop memiliki kemurnian 1,8 – 2,0 dan konsentrasi di atas 100 ng/ μL (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Dilanjutkan oleh Sambrook dan Russel (2001), bahwa kemurnian dan konsentrasi DNA yang berada pada diluar batas

optimum terjadi karena sampel mengandung kontaminan yang tinggi, proses pengerjaan yang tidak steril dan diduga materi genetik dari DNA tidak diekspresikan sesuai dengan primer, sehingga tingkat kemurnian yang berbeda. Dari data pada Tabel 5, dapat dikatakan bahwa hasil kemurnian dan konsentrasi DNA terkena beberapa kontaminan. Karena pada hasil uji kuantitatif diluar kisaran kemurnian 1,8 – 2,0 dan konsentrasi di atas 100 ng/ μ L.

4.1.2 Hasil Amplifikasi DNA

Hasil dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi terhadap gen *MIH* pada udang vaname yang terinfeksi *WFS* dengan salinitas media yang berbeda, untuk siklus amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 5.



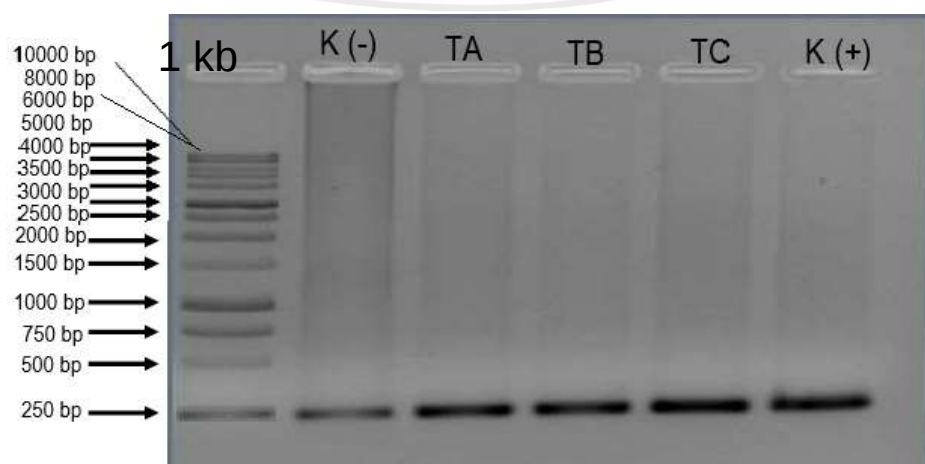
Gambar 5. Siklus Amplifikasi DNA

Berikut adalah proses amplifikasi DNA pada alat *thermal cycler*: Proses yang pertama dimulai dari *Hot Start* (denaturasi awal) merupakan proses awal dari amplifikasi, pada proses ini dimulai dengan suhu 95 °C selama 5 menit. Proses selanjutnya yaitu denaturasi, dimulai 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. *Taq DNA polymerase* dapat menahan rusaknya struktur DNA temperatur sekitar 95 °C (Fatchiyah, *et al.*, 2011).

Proses selanjutnya yaitu *annealing*, proses ini dimulai dengan suhu 54 °C selama 1 menit. Adapun proses *annealing* merupakan proses pengenalan/penempelan primer DNA template, suhu *annealing* ditentukan oleh susunan primer. Optimalisasi temperatur *annealing* dimulai dengan menghitung *Melting Temperature* (Tm) dari ikatan primer dan DNA *template* untuk pengenalan DNA target (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Proses berikutnya yaitu *extension*, proses ini dimulai 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 atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Proses terakhir yaitu *Post extension*, pada proses ini dengan suhu 72 °C selama 7 menit. Kemudian masuk ke denaturasi kembali dan diulang hingga 35 siklus.

4.1.3 Hasil Elektroforegram

Hasil dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi terhadap gen *MIH* pada udang vaname yang terinfeksi *WFS* dengan salinitas media yang berbeda, untuk elektroforesis didapatkan hasil pada Gambar 6.



Gambar 6. Hasil Elektroforegram Sampel MIH

Keterangan : K (-) = Udang Normal; TA = Udang Perlakuan A (Salinitas 24 ppt); TB = Udang Perlakuan B (Salinitas 27 ppt); TC = Udang Perlakuan C (Salinitas 30 ppt); K (+) = Udang Terinfeksi WFS tanpa perlakuan ekstrak tinta cumi-cumi (Salinitas 33 ppt).

Setelah didapatkan visualisasi elektroforogram, jarak *basepair* dan intensitas pita DNA dianalisis menggunakan *software ImageLab*. Pada *software* amplikon pita DNA yang berpendar dihitung dengan jarak dengan akurat. Selain itu ketebalan pita DNA juga diukur berdasarkan volume intensitasnya (int). Dan didapatkan hasil pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji *Basepair* dan Intensitas Pita DNA

Perlakuan	<i>Basepair</i>	Volume (int)
<i>Marker (1kb)</i>	250	268356
K (-)	252.09546	4083486
TA	260.98831	9816180
TB	267.09059	10042164
TC	273.33544	13209240
K (+)	282.97756	12361734

Keterangan : K (-) = Udang Normal; TA = Udang Perlakuan A (Salinitas 24 ppt); TB = Udang Perlakuan B (Salinitas 27 ppt); TC = Udang Perlakuan C (Salinitas 30 ppt); K (+) = Udang Terinfeksi WFS tanpa perlakuan ekstrak tinta cumi-cumi (Salinitas 33 ppt).

Hasil yang didapatkan pada Tabel 6. Menunjukkan bahwa amplikon sampel pada semua perlakuan berpendar pada 250 – 282.98 bp. Hal ini didukung dengan penelitian Chen, *et al.* (2007), bahwa amplifikasi *PCR* cDNA turunan *eyestalk*, menggunakan primer degenerat yang dirancang berdasarkan beberapa sekuens *MIH*, menghasilkan produk yang muncul sebagai pita tunggal ketika dianalisis dengan elektroforesis gel. Urutan sekuens menunjukkan amplikon berpendar pada 220 bp dan 224 bp. Dapat dilihat bahwa gen *MIH* udang vaname berpendar diatas 200 bp.

Perlakuan A, B dan C memiliki ketebalan *Band* yang lebih tinggi dibandingkan dengan udang normal, dimana hasil ketebalan band tertinggi didapatkan pada perlakuan C (salinitas 30 ppt) dan perlakuan A (salinitas 24 ppt)

memiliki intensitas paling rendah. Irmawati (2003) mengatakan bahwa pita DNA yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil.

Penelitian Subaidah, *et al.*, (2012), menunjukkan tingkat ekspresi gen *MIH* pada udang yang diinfeksi bakteri meningkat. Molting memiliki peran penting dalam pertumbuhan, ekdisteroid merupakan hormon yang bertanggung jawab dalam pertumbuhan, organ Y mensintesis *MIH* yang berperan menghambat sintesis ekdisteroid. Dari hasil penelitian dilihat bahwa konsentrasi gen *MIH* pada sampel perlakuan lebih dominan dibandingkan dengan udang normal. Hal tersebut dikarenakan gen *MIH* diproduksi oleh udang pada saat udang terganggu, sehingga hormon ekdisteroid yang berfungsi mengatur pertumbuhan pada udang terhambat. Ditambahkan oleh Chang dan Mykles (2011), bahwa berbagai sinyal mempengaruhi aktivitas Organ-Y. Pengaruh eksternal, seperti stres, suhu ekstrem dan fotoperiode pendek dapat menghambat molting.

Kemungkinan pada hasil menunjukkan bahwa perbedaan *basepair* pada amplikon terjadi karena mutasi yang berbeda pada setiap perlakuan. Karima dan Widyarti (2016), mengatakan bahwa basa nukleotida pada DNA *template* dapat dikenali oleh primer sehingga terjadi penempelan yang spesifik. Hasil pita DNA menunjukkan ketebalan yang berbeda dikarenakan jumlah DNA yang menempel berbeda, sehingga yang berhasil teramplifikasi juga berbedda ketika divisualisasi. Amplikon harus disekuensing untuk mengetahui ada tidaknya perubahan sekuen nukleotidanya untuk menentukan ada tidaknya mutasi.

4.1.4 Hasil Sekuensing

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

a) Hasil FASTA Gen *MIH*

Hasil dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi terhadap gen *MIH* pada udang vaname yang terinfeksi *WFS* dengan salinitas media yang berbeda, hasil FASTA (Urutan keselarasan DNA) didapatkan dari hasil sekuensing. Hasil FASTA dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil FASTA

No	Perlakuan	Hasil FASTA
1.	K (-)	TTATTATACACTCATGTATCGGCTGGCAATGGTAAGAGACTGAGAGTT TTTTGGAGGTGGATATTTGTCTTTTGCACCTTAGTAGCCATCGCAGG GTTGTTTATTTTCTAGATTTGATCCTCGCTTTATTTATTTTCTTCCTC TTCGTTGCAGAAGACATGGCTAGCTATAGTGATTGTAGTTGTTGGGAC AAGCCTCTAAAAA.
2.	A (24 ppt)	TTATTATACACTCATGTATCGGCTGGCAATGGTAAGAGACTGAGAGTT TTTTGGAGGTGGATATTTGTCTTTTGCACCTTAGTAGCCATCGCAGG GTTGTTTATTTTCTAGATTTGATCCTCGCTTTATTTATTTTCTTCCTC TTCGTTGCAGAAGACATGGCTAGCTATAGTGATTGTAGTTGTTGGGAC AAGCCTCTAAAAA.
3.	B (27 ppt)	TTATTATACACTCATGTATCGGCTGGCAATGGTAAGAGACTGAGAGTT TTTTGGAGGTGGATATTTGTCTTTTGCACCTTAGTAGCCATCGCAGG GTTGTTTATTTTCTAGATTTGATCCTCGCTTTATTTATTTTCTTCCTC TTCGTTGCAGAAGACATGGCTAGCTATAGTGATTGTAGTTGTTGGGAC AAGCCTCTAAAAA.
4.	C (30 ppt)	TTATTATACACTCATGTATCGGCTGGCAATGGTAAGAGACTGAGAGTT TTTTGGAGGTGGATATTTGTCTTTTGCACCTTAGTAGCCATCGCAGG GTTGTTTATTTTCTAGATTTGATCCTCGCTTTATTTATTTTCTTCCTC TTCGTTGCAGAAGACATGGCTAGCTATAGTGATTGTAGTTGTTGGGAC AAGCCTCTAAAAA.
5.	K (+) (33 ppt)	TTATTATACACTCATGTATCGGCTGGCAATGGTAAGAGACTGAGAGTT TTTTGGAGGTGGATATTTGTCTTTTGCACCTTAGTAGCCATCGCAGG GTTGTTTATTTTCTAGATTTGATCCTCGCTTTATTTATTTTCTTCCTC TTCGTTGCAGAAGACATGGCTAGCTATAGTGATTGTAGTTGTTGGGAC AAGCCTCTAAAAA.

Keterangan : warna merah menunjukkan basa nukleotida yang berubah.

Pada setiap perlakuan didapatkan FASTA yang didapatkan dari proses *alignment* (penyelarasan). Proses penyelarasan dilakukan pada *software* MEGA X. FASTA gen *MIH* yang didapatkan berjumlah 208 basa nukleotida. Hasil penelitian didapatkan pada setiap perlakuan terlihat memiliki kesamaan urutan basa nukleotida hingga akhir yang dibandingkan dengan perlakuan K (-). Hanya ada 3 perlakuan yang memiliki perubahan basa nukleotida, yaitu pada perlakuan A, B dan K (+).

Hasil FASTA dianalisis dengan *BLAST* seperti pernyataan Priyambodo (2011), hasil sekuensing yang didapat kemudian dirapihkan dan dikonfirmasi dengan menggunakan program *BLASTn* dan *BLASTx* pada *gene bank*. Program *BLASTn* digunakan untuk mendapatkan informasi organisme yang memiliki kesamaan nukleotida dengan sampel nukleotida yang dimiliki, sedangkan program *BLASTx* digunakan untuk mendapatkan informasi organisme yang memiliki kesamaan asam amino dengan sampel nukleotida yang dimiliki.

b) Identifikasi Sampel Menggunakan Analisis *BLAST*

Hasil analisis *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tools*) dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi terhadap gen *MIH* pada udang vaname yang terinfeksi *WFS* dengan salinitas media yang berbeda dicocokkan dari *genbank* pada *ncbi* (*National Center for Biotechnology Information*). Hasil analisis *BLAST* yang ditunjukkan memiliki nilai *Query cover* antara 98-99%, nilai *identity* antara 99-100 dan *E-value* 0.0. Hasil identifikasi sampel menggunakan analisis *BLAST* dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Analisis *BLAST*

Sampel	<i>BLAST</i>				
	<i>Species</i>	<i>Access code of NCBI</i>	<i>Query Cover (%)</i>	<i>E-value</i>	<i>Identity (%)</i>
Udang A	<i>L. vannamei</i>	DQ412566.1	90	0,00	98
Udang B	<i>L. vannamei</i>	DQ412566.1	91	0,00	99

Udang C	<i>L. vannamei</i>	DQ412566.1	97	0,00	98
Udang K (+)	<i>L. vannamei</i>	DQ412566.1	92	0,00	99
Udang K (-)	<i>L. vannamei</i>	DQ412566.1	98	0,00	98

Hasil memiliki nilai *query cover* (Persentasi dari panjang nukleotida yang selaras dengan database yang terdapat pada *BLAST*) antara 90-98%, *E-Value* (Nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuen) 0,0 dan nilai *identity* (Kesamaan isolat dengan spesies pada *BLAST*) pada semua perlakuan adalah 98-99%. Berdasarkan nilai yang diperoleh, artinya sekuen DNA sampel memiliki panjang sekuen yang sama dengan *database* yang ada di *Genbank* 90-98% dengan *E-value* 0.0, dapat disimpulkan bahwa sekuen sampel memiliki tingkat homologi yang cukup tinggi. Hal ini sesuai dengan penelitian Priyambodo (2011), bahwa dengan tingkat homologi 99-100% dapat dikatakan spesies yang identik dan dapat diidentifikasi sebagai spesies tersebut.

c) Komposisi Nukleotida Gen *MIH*

Hasil dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi terhadap gen *MIH* pada udang vaname yang terinfeksi *WFS* dengan salinitas media yang berbeda, untuk komposisi nukleotida gen *MIH* dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Komposisi Nukleotida Gen *MIH*

Perlakuan	Basa (%)				Ikatan	
	A	G	C	T	A-T	G-C
A (24 ppt)	22.12	22.12	15.87	39.90	62,02	37,98
B (27 ppt)	22.12	22.60	15.38	39.90	62,02	37,98
C (30 ppt)	22.12	22.12	15.38	40.38	62,5	37,5
K (+) (33 ppt)	22.12	22.60	15.38	39.90	62,02	37,98
K (-)	22.12	22.12	15.38	40.38	62,5	37,5

Pada hasil penelitian dapat dilihat pada Perlakuan A terkandung Basa Nukleotida Adenin (A) sebesar 22,12 %, Basa Nukleotida Guanin (G) sebesar 22,12 %, Basa Nukleotida Sitosin (C) sebesar 15,78 % dan Basa Nukleotida Timin (T) sebesar 39,90 %. Perlakuan B terkandung Basa Nukleotida Adenin (A)

sebesar 22,12 %, Basa Nukleotida Guanin (G) sebesar 22,60 %, Basa Nukleotida Sitosin (C) sebesar 15,38 % dan Basa Nukleotida Timin (T) sebesar 39,90 %. Perlakuan C terkandung Basa Nukleotida Adenin (A) sebesar 22,12 %, Basa Nukleotida Guanin (G) sebesar 22,12 %, Basa Nukleotida Sitosin (C) sebesar 15,38 % dan Basa Nukleotida Timin (T) sebesar 39,90 % Perlakuan K (+) terkandung Basa Nukleotida Adenin (A) sebesar 22,12 %, Basa Nukleotida Guanin (G) sebesar 22,60 %, Basa Nukleotida Sitosin (C) sebesar 15,38 % dan Basa Nukleotida Timin (T) sebesar 39,90 %. Perlakuan K (-) terkandung Basa Nukleotida Adenin (A) sebesar 22,12 %, Basa Nukleotida Guanin (G) sebesar 22,12 %, Basa Nukleotida Sitosin (C) sebesar 15,38 % dan Basa Nukleotida Timin (T) sebesar 30,38 %.

Komposisi nukleotida gen *MIH* pada udang vaname didominasi oleh ikatan basa adenin dan timin (A-T). Ini menunjukkan bahwa gen *MIH* termasuk *AT-Rich* DNA (DNA yang kaya akan basa A dan T). Lee and Luo (1997), menjelaskan bahwa 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.

d) Analisis Polimorfik Gen *MIH*

Hasil dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak tinta cumi terhadap gen *MIH* pada udang vaname yang terinfeksi *WFS* dengan salinitas media yang berbeda, untuk analisis polimorfik gen dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Analisis Polimorfik Gen *MIH*

Perlakuan	Posisi Nukleotida	
	68	81
K (-)	T	T
K (+) (33 ppt)	G	T
A (24 ppt)	T	C
B (27 ppt)	G	T
C (30 ppt)	T	T

Keterangan : Warna abu-abu : Basa nukleotida udang normal ; Warna merah = Basa yang berganti (mutasi substitusi)

Pada hasil penelitian, basa nukleotida yang terjadi mutasi adalah pada perlakuan K (+), A dan B jika dibandingkan dengan perlakuan K (-) yang merupakan udang vaname normal (tidak terinfeksi *WFS*). Pada Perlakuan A, terjadi mutasi pada urutan nukleotida ke 81 pada FASTA yaitu dari Basa Timin (T) menjadi Sitosin (C). Sedangkan pada Perlakuan K (+) dan B terjadi mutasi pada urutan nukleotida ke 68 pada FASTA yaitu dari Basa Timin (T) menjadi Guanin (G). Morihito, *et al.* (2017), menjelaskan bahwa secara alami, perubahan molekul DNA dari organisme dapat terjadi melalui dua cara, yaitu melalui mutasi, dimana terjadi penggantian (substitusi), penghapusan (delesi) atau penambahan (adisi) satu atau lebih bagian dari molekul DNA, dan melalui pertukaran informasi genetik atau DNA antar organisme sejenis melalui peristiwa reproduksi seksual. Hasil dari penelitian ini didapatkan 3 perlakuan yang mengalami mutasi substitusi atau penggantian.

Pada perlakuan A yang terdiri dari 208 FASTA didapatkan 1 basa nukleotida yang mengalami perubahan, sehingga presentasi mutasi dari perlakuan A adalah sebesar 0,05 %. Pada perlakuan B yang terdiri dari 208 FASTA didapatkan 1 basa nukleotida yang mengalami perubahan, sehingga presentasi mutasi dari perlakuan B adalah sebesar 0,05 %. Pada perlakuan C yang terdiri dari 208 FASTA tidak terdapat basa nukleotida yang mengalami perubahan, sehingga presentasi mutasi dari perlakuan C adalah sebesar 0 %. Pada perlakuan K (+) yang terdiri dari 208 FASTA didapatkan 1 basa nukleotida yang mengalami perubahan, sehingga presentasi mutasi dari perlakuan K (+) adalah sebesar 0,05 %.

Lusiastuti, *et al.* (2015), mengemukakan bahwa polimorfisme (perubahan satu nukleotida yang berubah pada genom) dapat terjadi pada setiap lokasi genetik dan sedikitnya dapat ditemukan pada dua sekuens yang berbeda, yaitu setiap sekuens yang muncul pada sedikitnya satu persen dari populasi. Lebih jauh, *cut off* prevalensi minimal 1% diklasifikasikan sebagai polimorfisme dan jika frekuensinya lebih kecil dari 1% maka alel dianggap mengalami mutasi. Dapat disimpulkan bahwa pada penelitian perlakuan A, B dan K (+) mengalami mutasi pada alel, sehingga hasil pada penelitian tidak terjadi mutasi polimorfisme karena pada semua perlakuan presentase mutasi lebih kecil dari 1%.

4.2 Parameter Penunjang

Penelitian mengenai ekspresi gen *MIH* pada udang vaname ini terdiri dari dua tahapan, yaitu pengamatan di laboratorium dan pengujian. Pada pengamatan di laboratorium 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.

Hasil pengamatan udang yang belum terinfeksi *WFS* terlihat udang masih bergerak aktif, hepatopankreas terlihat berwarna cokelat dan usus terlihat terisi. Sedangkan pada udang yang terinfeksi *WFS* sebagai udang kontrol terlihat udang bergerak kurang aktif, hepatopankreas berwarna putih, dan usus tidak

terisi. Perbandingan udang yang terinfeksi WFS dan yang normal dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Udang Terinfeksi WFS (a), Udang Normal (b)

Serangan penyakit yang dikenal dengan kotoran putih pada udang vaname saat ini telah menurunkan produktivitas udang vaname. Secara visual pada udang yang terserang penyakit ini akan terlihat kotoran udang berwarna putih memanjang dan mengapung pada permukaan air, eksoskeleton nampak lembek dan ditemukan infeksi protozoa sehingga menyebabkan insang gelap (Limsuwan, 2010).

4.2.2 Kualitas Air

Kualitas air pada kegiatan budidaya sangat mempengaruhi dari kelangsungan hidup organisme yang dibudidayakan. Kualitas air merupakan faktor penting yang dapat menunjang kehidupan organisme yang dibudidayakan. Pada udang vaname kualitas air yang dapat mendukung kehidupannya yaitu suhu, pH, DO (*Dissolved Oxygen*) , salinitas, amonia, 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 amonia, nitrat, nitrit , TOM dan alkalinitas. Nilai pengukuran kualitas air pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil Pengukuran Kualitas Air

Parameter	Hasil Pengukuran	Toleransi Udang Vaname (Literatur)	Keterangan
Suhu	27,53 °C – 31,33 °C	23-30 °C (Wyban dan Sweeney,	Baik

pH	4,57 – 6,84	1991) 7,3-8,5 (Pasongli, <i>et al.</i> , 2015)	Buruk
DO	3,8 ppm – 6,2 ppm	0,75–2,5 mg/L (Budiardi, <i>et al.</i> , 2005)	Baik
Salinitas	24 ppt – 33 ppt	0,5-45 ppt (Pasongli, <i>et al.</i> , 2015)	Baik
Amonia	0,2 ppm – 0,5 ppm	< 0,2 mg/L (Ferrerira, <i>et al.</i> , 2011)	Buruk
Nitrat	5 ppm	< 5 ppm (Boyd dan Clay, 2002)	Buruk
Nitrit	0,33 ppm – 1,5 ppm	< 0,2 mg/L (Ferrerira, <i>et al.</i> , 2011)	Buruk
TOM	15,33 ppm – 73,4 ppm	< 55 mg/L (Adiwijaya, <i>et al.</i> , 2003).	Buruk
Alkalinitas	290,33 ppm – 414,33 ppm	120–150 mg/L (Tahe dan Suwoyo, 2011)	Buruk

Kualitas air yang baik untuk pemeliharaan udang vaname pada parameter pH berkisar 7,3-8,5 (Pasongli, *et al.*, 2015), Amonia tidak melebihi 0,2 mg/L (Ferrerira, *et al.*, 2011), Nitrat tidak melebihi 5 ppm (Boyd dan Clay, 2002), Nitrit tidak melebihi 0,2 mg/L (Ferrerira, *et al.*, 2011), TOM tidak melebihi 55 mg/L (Adiwijaya, *et al.*, 2003) dan Alkalinitas berkisar antara 120 – 150 mg/L (Tahe dan Suwoyo, 2011). Berdasarkan kisaran-kisaran nilai kualitas air yang diperoleh pada media pemeliharaan selama penelitian berlangsung, hampir semua parameter berada pada kisaran yang kurang baik untuk pemeliharaan udang vaname. Parameter yang masih dalam kisaran yang baik untuk pemeliharaan udang vaname yaitu suhu, DO dan salinitas jika dilihat pada Tabel 11. Kondisi parameter lingkungan ini diduga sebagai salah satu penyebab timbulnya penyakit WFS.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan yaitu pemberian ekstrak tinta cumi dengan salinitas media yang berbeda tidak berpengaruh terhadap gen *MIH* pada udang vaname yang terinfeksi *WFS*. Hal tersebut dilihat dari hasil analisis polimorfik yang menunjukkan angka $< 1\%$. Dibandingkan perlakuan A (24 ppt) dan perlakuan B (27 ppt) dan K (+) (33 ppt), pemberian ekstrak tinta cumi-cumi dengan dosis 8 ppm pada perlakuan C (30 ppt) bekerja paling baik terhadap gen *MIH*, karena pada hasil pita band DNA menunjukkan paling tinggi yang menunjukkan bahwa udang mampu menahan molting lebih baik dan pada analisa polimorfik gen tidak terjadi mutasi (0%).

5.2 Saran

Berdasarkan hasil disarankan agar dapat melakukan penelitian lanjutan dengan waktu penelitian yang lebih lama dan penelitian skala lapang guna mengetahui salinitas media yang optimal pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) terhadap gen *MIH* pada udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi *WFS*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiwijaya, D., P.R. Sapto, E. Sutikno, Sugeng dan Subiyanto. 2003. Budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) system tertutup yang ramah lingkungan. Departemen Kelautan dan Perikanan, Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau. Jepara. 29 hlm.
- Adji, D., Zuliyanti dan H. Larashanty. 2007. Perbandingan efektifitas sterilisasi *alcohol* 70% inframerah, otoklaf dan ozon terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*. *J. Sain Vet.* **25** (1): 17-24.
- Ali, F dan A. Waluyo. 2015. Tingkat kelangsungan hidup dan pertumbuhan udang galah (*Macrobranchium rosenbergii* De Man) pada media bersalinitas. *LIMNOTEK.* **22** (1). 42-51.
- Amri, K. dan I. Kanna. 2013. Budi Daya Udang Vaname. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 168 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.
- Asy'ari, M. dan A. S. Noer. 2005 Optimasi Konsentrasi $MgCl_2$ dan Suhu *Annealing* pada Proses Amplifikasi Multifragmens MtDNA dengan Metoda PCR. *J. Kim. Sains & Apl.* **8** (1) : 23-27.
- Ausubel, F. M. 2003. Current Protocols in Molecular Biology. Random House : USA. 259 p.
- Boyd, C. E and J. W. Clay. 2002. Evaluation of Belize Aquaculture, Ltd: A Superintensive Shrimp Aquaculture Systems. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium, 17 pp.
- Budiardi, T., T. Batara dan D. Wahjuningrum. Tingkat Konsumsi Oksigen Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) dan Model Pengelolaan Oksigen pada Tambak Intensif. *Jurnal Akuakultur Indonesia.* **4** (1): 89–96.
- Chan, S. M., X.G. Chen and P. L. Gu. 1998. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab (*Charybdis feriatus*). *Elsevier Science.* 224 : 23-33.
- Chang, E. S. and D. L. Mykles. 2011. Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives. *General and Comparative Endocrinology.* 172: 323–330.
- Chatchawanchapain, W., Thafornyutikrn, M. and J. Kasornchandra. 2004. Application of using garlic paste against gregarines infestation in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. The 5th National symposium on marine shrimp, 29-30 March 2004, Miracle Grand Convention, Bangkok Thailand. Pp. 335-342.

- 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 syndrome (ahpnd) in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *International Journal of Biology*. **7** (3): 8-17.
- Chen, H. Y., R. D. Watson, J. C. Chen, H. F. Liu and C. Y. Lee. 2007. Molecular characterization and gene expression pattern of two putative molt-inhibiting hormones from *Litopenaeus vannamei*. *General and Comparative Endocrinology*. 151: 72–81.
- Clark, M. S. 1997. Plant Molecular Biology : A laboratory manual. 70 p.
- Derby, C. D. 2014. Cephalopod ink: production, chemistry, functions and applications. *Marine drugs*. **12**: 2700-2730.
- Diwan, A. D. 2005. Current Progress in Shrimp Endocrinology. *Indian Journal of Experimental Biology*. 43 : 209-223.
- Diantha, I. M. P. 2016. Metodologi Penelitian Hukum Normatif dalam Justifikasi Teori Hukum. Prenada Media Group. Jakarta. 206 hlm.
- Dugassa, H. and D.G. Gaetan. 2018. Biology of White Leg Shrimp, *Penaeus vannamei*: Review. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. **10** (2): 5-17.
- Dwiyitno. 2010. Identifikasi Bakteri Patogen pada Produk Perikanan Dengan Teknik Molekuler. *Squalen*. **5**(2) : 67-78.
- 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. 191 hlm.
- Felix, F., T. T. Nugroho, S. Silalahi, and Y. Octavia. 2011. Skrining Bakteri *Vibrio* sp. Asli Indonesia sebagai Penyebab Penyakit Udang Berbasis Teknik 16S Ribosomal DNA. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. **3**(2): 85-99.
- Ferreira, N. C., C. Bonetti and W.Q. Seiffert. 2011. Hydrological and water quality indices as management tools in marine shrimp culture. *Aquaculture*. 318:425-433.
- Fitrial, Y. dan I. K. Khotimah. 2017. Aktivitas antibakteri dari melanin tinta sotong dan cumi-cumi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **20** (2): 266-274.
- Fitriatin, E dan A. Manan. 2015. Pemeriksaan *Viral Nervous Necrosis* (VNN) Pada Ikan dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **7**(2) : 149-152.

- Girija, A.S.S., V. Priyadharshini J., P. Suba K., Hariprasad P. dan Raguraman R. 2012. Antibacterial effect of squid ink on SEBL production strains of *Escherichia coli* and *klebsiella pneumonia*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. **41** (4): 338-343.
- Handoyo, D. dan A. Rudiretna. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Unitas*. **9** (1) : 17-29.
- Harmanto, N. 2012. Daun Sukun Si Daun Ajaib Penakluk Aneka Penyakit. PT. AgroMedia Pustaka. Jakarta. 110 hlm.
- Hasanah, H. 2016. Teknik-teknik observasi (sebuah alternatif metode pengumpulan data kualitatif ilmu-ilmu sosial). *Jurnal at-Taqaddum*. **8** (1): 2146.
- Hudi, L., dan A. Shahab. 2005. Optimasi produktivitas budidaya udang vaname (*Litopenaeus vanamei*) dengan menggunakan metode respon surface dan non linear programming. *Prosiding Seminar Nasional manajemen Teknologi II*. 28 : 1-28.
- Irmawati. 2003. Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama Pada Stok Hatchery. Thesis. Bogor: IPB.
- Iskandar, R., Fitriadi. S. 2017. Analisa Proksimat Pakan Hasil Olahan Pembudidaya Ikan di Kabupaten Banjar Kalimantan Selatan. *ZIRAA'AH*. **42** (1): 65-68.
- 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 Researc*. **9**: 448-452.
- Kaemudin., A. Erlina dan A. Taslihan. 2016. Aplikasi ekstrak allisin untuk pengendalian penyakit kotoran putih pada udang vanamei (*Litopenaus vanamei*) di Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara. Prosiding Seminar Nasional Tahunan Ke-V Hasil-Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan. Juni 2016: hlm. 493-499.
- Kamaliah. 2017. Perbandingan metode ekstraksi DNA *Phenol-Chloroform* dan *Kit Extraction* pada Sapi Aceh dan Sapi Madura. *Jurnal Biotik*. **5** (1): 60-65.
- Karima, I. dan Widyarti, S. 2016. Studi Gen *Parp-1* Ekson 23 pada Testis Mencit Setelah Induksi Formalin: Tidak Terdeteksi Mutasi. *Jurnal Biotropika*. **4** (1) : 11-16.
- Karp, G. 2008. Cell and molecular biology. Shieldcrest Publisher: USA. 289 p.
- Kordi, K. M. G. H. 2009. Budi Daya Perairan. Citra Aditya Bakti. Jakarta. 963 hlm.
- Kurien, B. T. and R. H. Scofield. 2015. Western Blotting-Methods and Protocols. Humana Press Inc: Totowa. 509 p.
- Kusmiyati dan N. W. S. Agustini. 2007. Uji aktivitas senyawa antibakteri dari mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. **8** (1): 48-53.

- Lee, W and Luo L. 1997. Periodicity of base correlation in nucleotide sequence. *Physical Review E*. **56**. 848-851.
- 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.
- Limsuwan, C. 2010. *White faeces syndrome* in Thailand. Bangkok Press. 118 p.
- Liu, H.C., W. Cheng, J.P. Hsu and J.C. Chen. 2004. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *SYNDROMES OF AQUATIC ORGANISMS JOURNAL*. **61**: 169–174.
- Lusiastuti, A. M., H. Seeger, D. Sugian, T. Mufidah dan H. Novita. 2015. Deteksi *Polymorphisme* dengan Substitusi Nukleotida Tunggal pada *Streptococcus agalactiae* Isolat Lokal Indonesia. *Media Akuakultur*. **10** (2): 91-95.
- Maftuchah, A. Winarya dan A. Zainuddin. 2014. Teknik Dasar : Analisis Biologi Molekuler. Penerbit Deepublish : Sleman. 225 hlm.
- Marbun, J. 2018. Pengobatan Penyakit *White Feces Syndrome (WFS)* pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Menggunakan Ekstrak Rimpang Lengkuas Merah. *Skripsi*. Universitas Negeri Lampung. Lampung. 41 hlm.
- Martin, R. 1996. Gel electrophoresis: Nucleic acids. Olimpia Publisher: UK. 320 p.
- Marwan, H. A., N. Widiyorini, dan M. Nitisupardjo. Hubungan Total Bakteri Dengan Kandungan Bahan Organik Total di Muara Sungai Babon, Semarang. *Diponegoro Journal Of Maquares*. **4** (3): 171-179.
- Mastan, S.A. 2015. Incidences Of White Feces Syndrome (*WFS*) In Farm-Reared Shrimp, *Litopenaeus Vannamei*, Andhra Pradesh. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. ISSN NO: 2231-6876.
- Morihito, R. V. S. A., S. E. Chungdinata, T. A. Nazareth, M. I. Pulukadang, R. A. M. Makalew dan Benny Pinontoan. 2017. Identifikasi Perubahan Struktur DNA terhadap Pembentukan Sel Kanker menggunakan Dekomposisi Graf. *Jurnal Ilmiah Sains*. **17** (2): 153-160.
- Nakatsuji-a, T., C. Y. Lee-b and R. D. Watson. 2009. Crustacean molt-inhibiting hormone: Structure, function, and cellular mode of action. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **152**: 139–148.
- Paoletta, P. 1998. Introduction to molecular biology. McGraw-Hill Companies, Inc., Boston: xiii. 241 hlm.
- Pasongli, H., G. D. Dirawan dan Suprpta. 2015. Zonasi kesesuaian tambak untuk pengembangan budidaya udang vaname (*Penaeus vannamei*) pada aspek kualitas air di Desa Todowongi Kecamatan Jailolo Kabupaten Halmahera Barat. *Jurnal Bioedukasi*. **3** (2): 324-335.

- Perry, R. P., J. La Torre, D. E Kelley, and J. R. Greenberg. 1972. On the lability of poly(A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **262**: 220-226.
- Pratisto, A. 2004. Cara Mudah Mengatasi Masalah Statistik dan Rancangan Percobaan dengan SPSS 12. PT. Elex Media Komputindo. Jakarta. 283 hlm.
- Priyambodo, R. 2011. Rekonstruksi Primer *Polymerase Chain Reaction (PCR)* Spesifik Untuk Gen Transferin Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Skripsi*. FMIPA : Universitas Indonesia.
- Russell, P.J. 1990. Genetics: 5th edition. Addison Wesley Longman, Inc. California: xxi. 805 hlm.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Manniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: xxxviii. 69 hlm.
- _____ and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition. New York (USA) : Cold Spring Harbor. 34 hlm.
- Sari, R. R. B., Sarjito dan A. H. C. Haditomo. 2015. Pengaruh penambahan serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia*) dalam pakan terhadap kelulushidupan dan histopatologi hepatopankreas udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **4** (1): 26-32.
- Sasmito, D. E. K., R. Kurniawan dan I. Muhimmah. 2014. Karakteristik Primer pada *Polymerase Chain Reaction (PCR)* untuk Sekuensing DNA: Mini Review. Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V. 6 Desember 2014.
- Seprianto, Feliatra dan T. T. Nugroho. 2017. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik Dari Usus Udang Windu (*Penaeus monodon*) Berdasarkan Sekuens Gen 16S rDNA. **5**(2) : 83-92.
- Subaidah, S., O. Carman, K. Sumantadinata, Sukenda, dan Alimuddin. 2012. Respons Pertumbuhan dan Imunitas Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) terhadap Pemberian Hormon Pertumbuhan Rekombinan Ikan Kerapu Kertang. *J. Ris. Akuakultur*. **7** (3): 359-369.
- Sugiono. 2010. Metode Penelitian Pendidikan Pendekatan Kuantitatif, Kualitatif dan R&D. Cetakan ke 11. Bandung : CV. Alfabeta.
- Sukenda, Y. T. Anggoro., D. Wahyuningrum dan Rahman. 2007. Penggunaan kitosan untuk pengendalian infeksi *Vibrio harveyi* pada udang putih (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **6** (2): 205-209.
- Sukmadinata, N. S, (2011). Metode Penelitian Pendidikan. Cetakan ke 7. Bandung : Remaja Rosdakarya.

- Supito, Gunarso, dan Rizkiyanti .2015. Teknik Pengendalian Penyakit Kotoran Putih (*White Feces Syndrome*) Pada Budidaya Udang Vaname di tambak .Report BBPBAP Jepara. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **5** (1) : 11-18.
- Supono, 2006. Produktivitas udang putih pada tambak intensif di Tulang Bawang Lampung. *Jurnal Saintek Perikanan*. **2** (1): 48-53.
- Suryani, I., I. A. K. Kadriah, dan I. Kuruseng. 2013. Deteksi *Vibrio harveyi* menggunakan primer hemolisin pada benur udang *Penaeus monodon*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **12** (2). 101-105.
- Switzer. 1999. Experimental Biochemistry. Greathouse Publisher : Norwegia. 201 p.
- Tahe, S. dan H. S. Suwoyo. 2011. Pertumbuhan dan Sintasan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan Kombinasi Pakan Berbeda dalam Wadah Terkontrol. *J. Ris. Akuakultur*. **6**(1): 31-40.
- Taslihan, A. 1992. The use of enrofloxacin to prevent mortality of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) larvae due to *Vibrio* sp. *Bull. Brackishwater Aquaculture Dev.Cent*. **9**: 31-35
- Tan, S.C dan B.C. Yiap.2009. DNA, RNA and Protein Extraction : The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnolgy*. **10** : 1 – 20.
- Umar, H. 2005. Riset Sumber Daya Manusia. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 320 hlm.
- Wyban, J. A and Sweeney, J. 1991. Intensif Shrimp Production Technology the Oceanic. Institute Shrimp Manual the Oceanic Institute, Honolulu, HI, USA. 158 p.
- WWF-Indonesia. 2014. BMP Budidaya Udang Windu (*Penaeus monodon*) – Tambak Tradisional dan Semi Intensif. WWF-Indonesia. Jakarta. 46 hlm.
- Yagi ,N., Satonaka K, Horio M, Shimogaki H, Tokuda Y, Maeda S. 1996. The role of DNase and EDTA on DNA degradation in formaldehyde fixed tissues. *Biotechnic & Histochemistry*. **71** (3): 123–129.
- Yuwono, T. 2009. Biologi Molekuler. Erlangga : Jakarta. 269 hlm.
- Zaharah, M. Y. F. and M. S. Rabeta. 2018. Antioxidant and antimicrobial activities of squid ink powder. *Food Research*. **2** (1): 82-88.
- BLAST. 2019. *FASTA Complete Sequences, Litopenaeus vannamei molt-inhibiting hormone MIH1 gene, complete cds*. (<https://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov/>). Diakses pada 5 Februari 2019.
- Dirjen Perikanan Budidaya. 2018. Teknik pengendalian penyakit berak putih pada budidaya udang vaname <https://www.djpb.kkp.go.id/index.php/arsip/c/447/TEKNIKPENGENDALIA-N-PENYAKIT-BERAK-PUTIH-PADA-BUDIDAYA-UDANG-VANAME/>. Diakses pada 9 November 2018.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat-alat Penelitian yang Digunakan

 Kulkas	 Gelas ukur 100 ml
 Timbangan analitik	
 Washing bottle	 Seser



Pipa paralon



Kendi



Akuarium 30 x 30 x 40 cm³



Aerator Set



DO meter



pH meter



Thermometer



Mikroskop



Object Glass



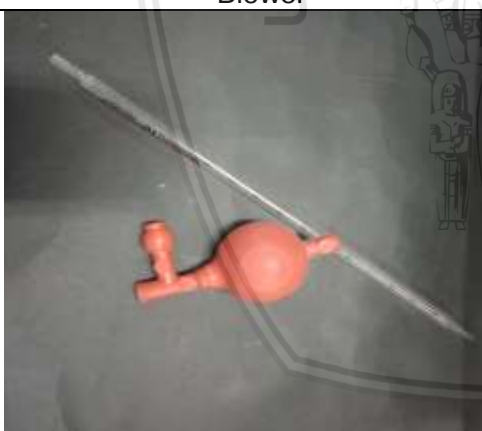
Sentrifuse



Blower



Erlenmeyer



Pipet volume dan bola hisap



Buret dan Statif



Loyang



Spektrofotometer



Microwave



Sectio set



Spektro NanoDrop



PCR



Spin Column tube



Tube PCR



Tube 1,5 ml



Sentrifuse Spindown



Inkubator Shaker



Elektroforesis



UV Transluminator

Lampiran 2. Bahan-bahan Penelitian yang Digunakan

 Ekstrak tinta cumi-cumi (<i>Loligo</i> sp.)	 Udang vaname (<i>Litopenaeus vannamei</i>)
 Aquades	 Alkohol 70%
 Pakan	 Test kit nitrat
 Test kit nitrit	 Test kit amonia
 KMnO₄	 H₂SO₄



Na-Oxalate



Methyl Orange



HCl



Trashbag



Blue tip



White tip



Aluminium Foil



Larutan elusi (TE-Buffer)



Larutan Kit Tiangen



Primer MIH Forward dan Reverse



My Taq



ddH₂O



Bubuk agarose



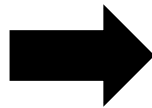
EtBr



Lampiran 3. Proses Ekstraksi Tinta Cumi-cumi (*Loligo* sp.)



Pengambilan Kantong Tinta Cumi-cumi



Maserasi Tinta Cumi-Cumi
Menggunakan Pelarut Metanol
dengan Perbandingan 1:3



Hasil



Evaporasi menggunakan alat *Vacuum Rotary Evaporator*

File: Udang (A) F.scf Sample: Udang (A) F 178 bases in 2158 scans Page 1 of 1

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

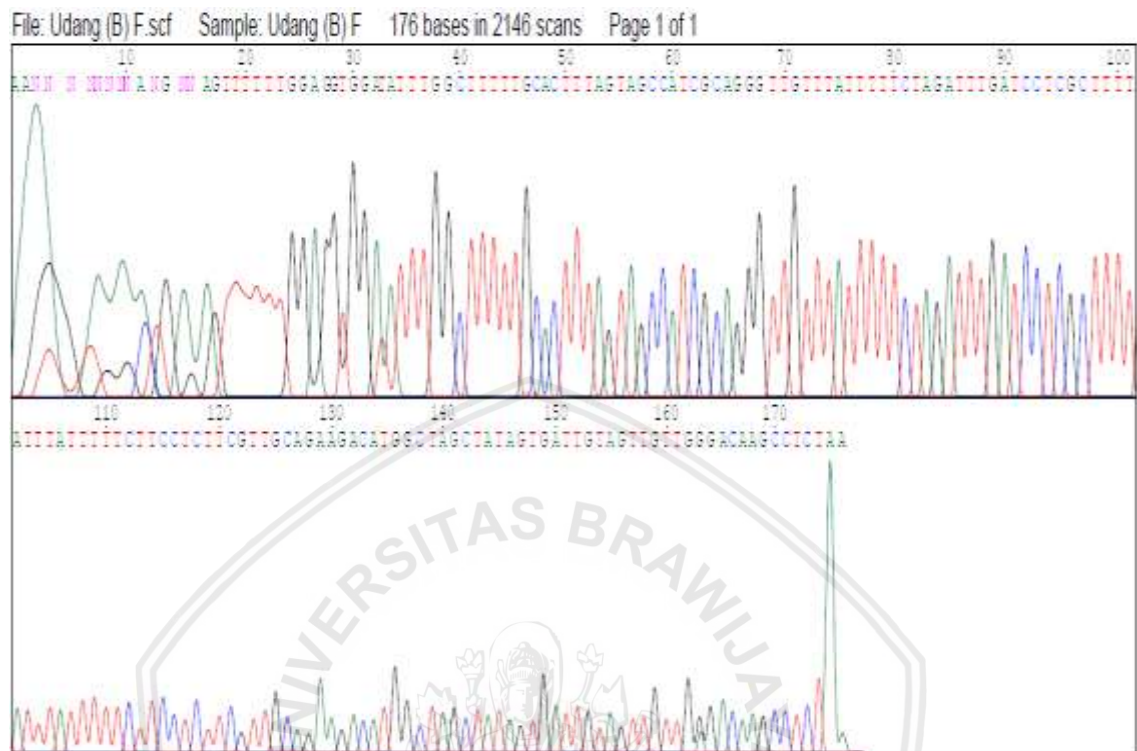
TTTT G GAGG G GAT T T GTC TTTT GCAT TCAGT AGC ATG CAGGG TTG TTTT TTTT TCTAG ATTGAT CCG CTTT

110 120 130 140 150 160 170

TATTTT TTTT TCTT CTTT GCTT G CAGG AGAC TTGG TTTG CTTAT AGT GATTT TACCT GATGG GACAG CCGT TAA

[illegible]

➤ Kromatogram Udang B Primer *Forward*

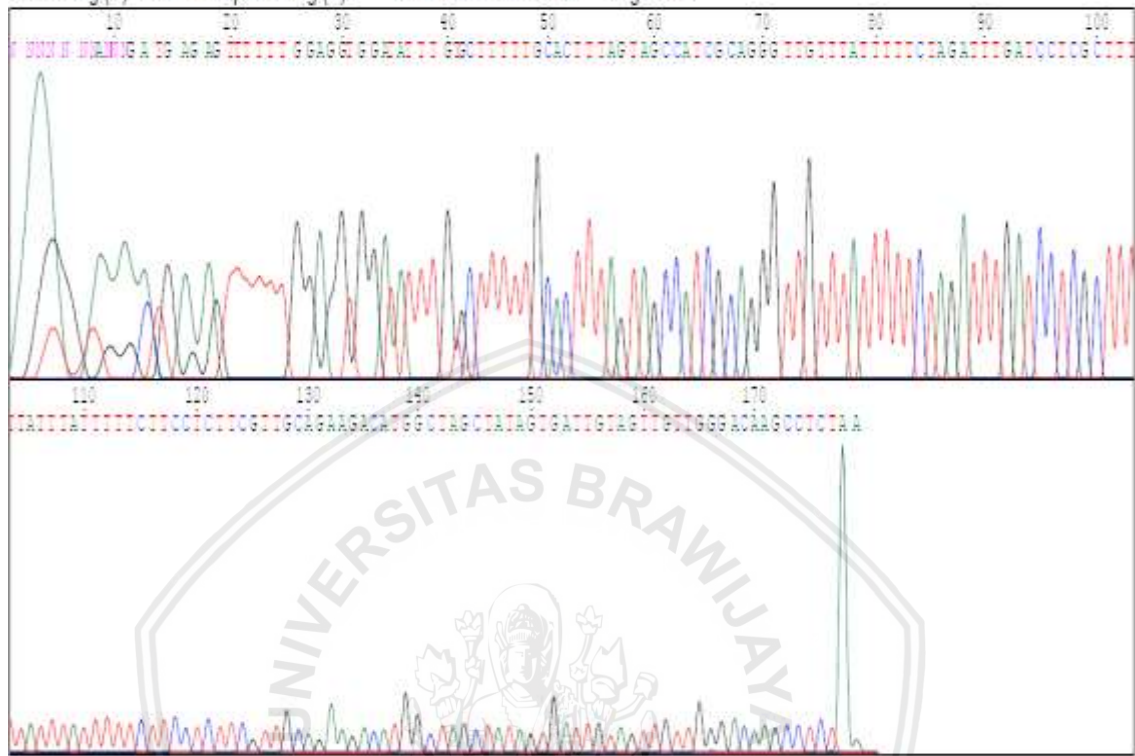


➤ Kromatogram Udang B Primer *Reverse*



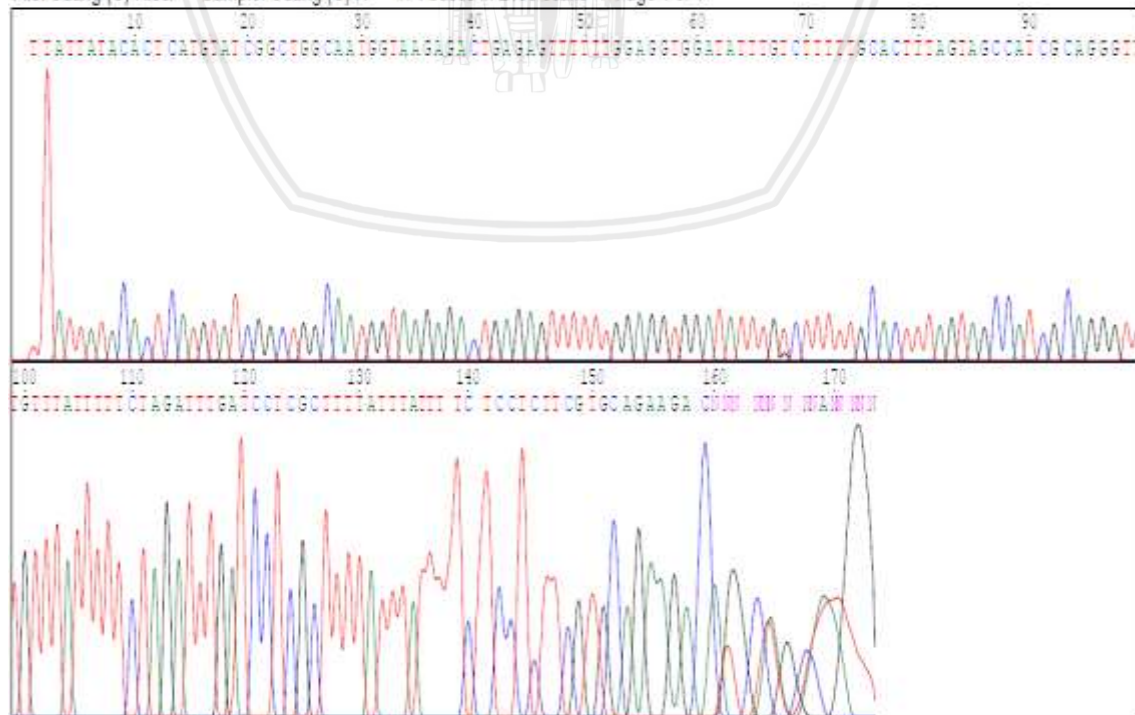
➤ Kromatogram Udang C Primer *Forward*

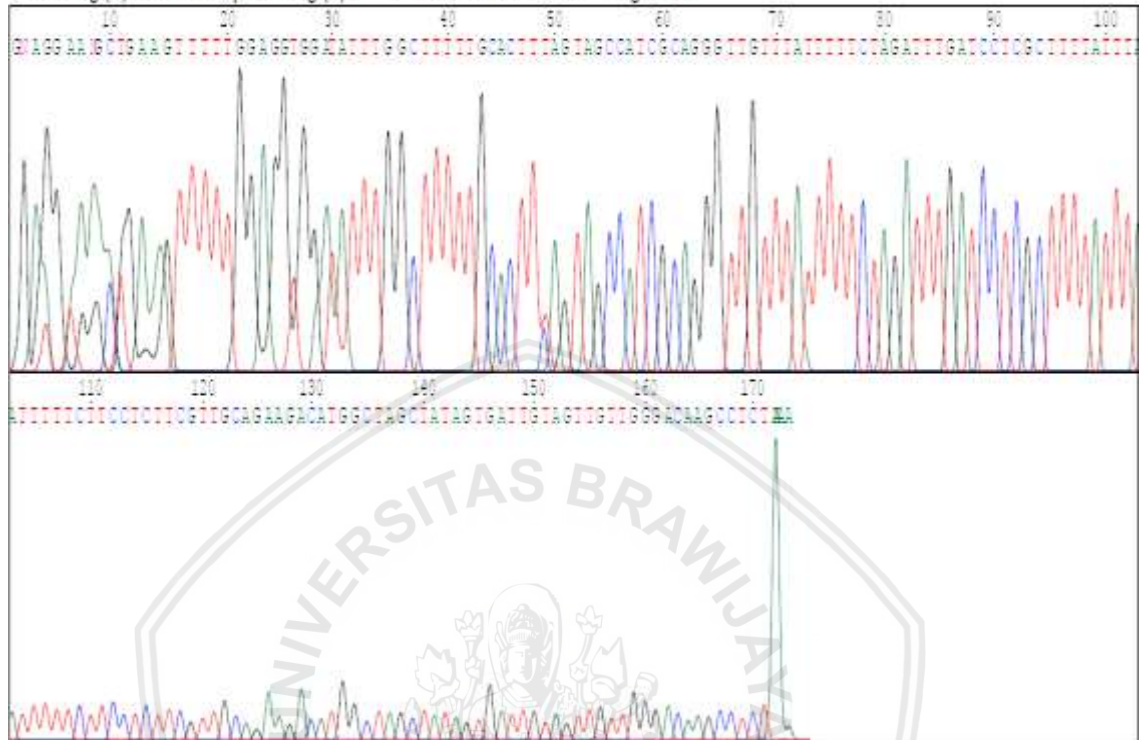
File: Udang (C) F.scf Sample: Udang (C) F 179 bases in 2164 scans Page 1 of 1



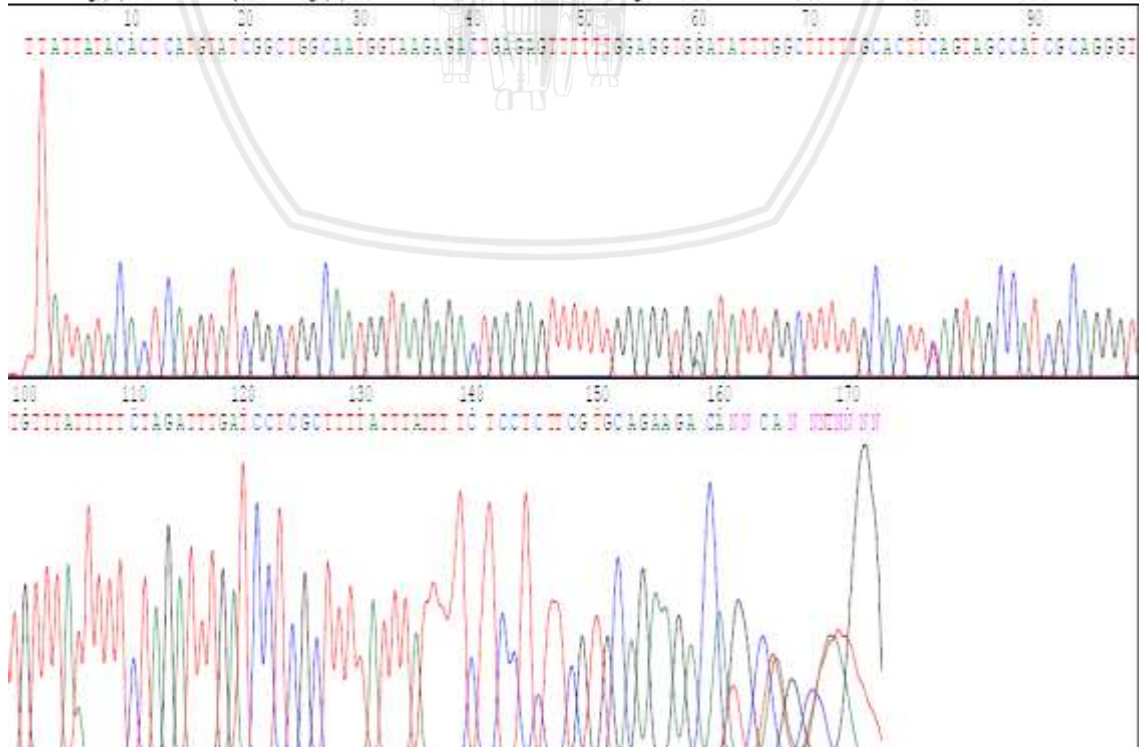
➤ Kromatogram Udang C Primer *Reverse*

File: Udang (C) R.scf Sample: Udang (C) R 174 bases in 2158 scans Page 1 of 1



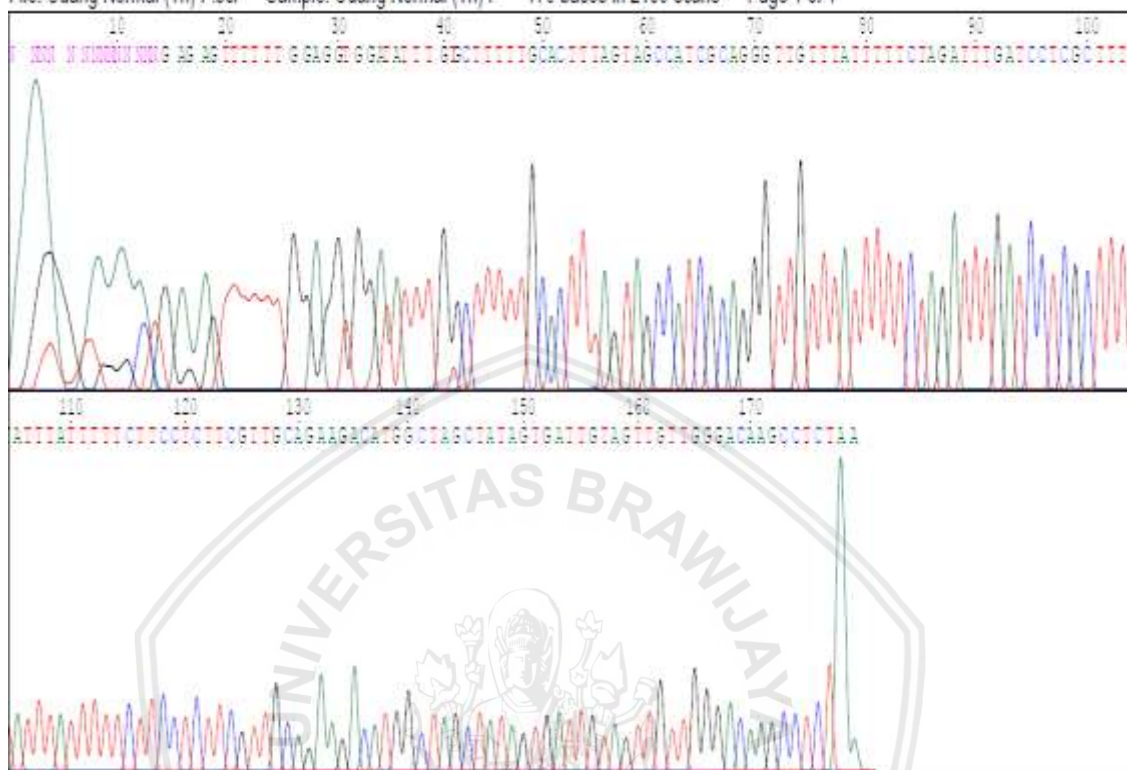


File: Udang (K) R.scf Sample: Udang (K) R 172 bases in 2165 scans Page 1 of 1



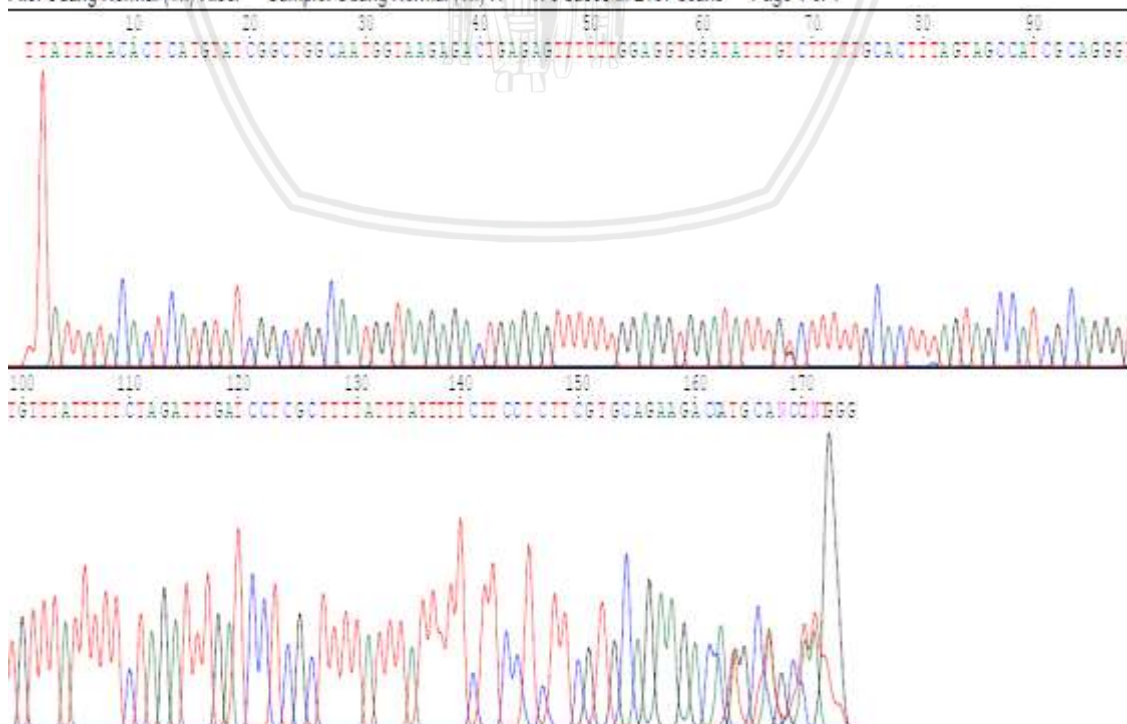
➤ Kromatogram Udang K (-) Primer *Forward*

File: Udang Normal (Tn) F.scf Sample: Udang Normal (Tn) F 179 bases in 2159 scans Page 1 of 1



➤ Kromatogram Udang K (-) Primer *Reverse*

File: Udang Normal (Tn) R.scf Sample: Udang Normal (Tn) R 176 bases in 2137 scans Page 1 of 1



Lampiran 5. Data Kualitas Air

➤ Data Kualitas Air Harian

Hari, anggal	Perlakuan	Kualitas Air							
		Pagi				Sore			
		Suhu (°C)	DO (ppm)	pH	Salinitas (ppt)	Suhu (°C)	DO (ppm)	pH	Salinitas (ppt)
6 Desember 2018	K1	31	4.5	6.55	33	30	6.6	6.41	33
	K2	30	6.9	6.57	34	30	5.4	6.42	33
	K3	33	6.5	6.55	33	30	6.1	6.45	33
	A1	30	4.4	6.41	25	30	4.5	6.23	24
	A2	30	6.2	6.57	24	30	5.3	6.36	24
	A3	32	3.3	6.32	24	30	4	6.3	24
	B1	31	6.6	6.49	27	31	6	6.34	27
	B2	32	3.5	6.34	28	30	4.5	6.3	27
	B3	30	3.6	6.45	27	30	6.1	6.3	27
	C1	30	6	6.47	31	30	4.8	6.29	30
	C2	30	5.8	6.46	31	31	5.8	6.27	30
	C3	30	6.2	6.57	30	30	6.5	6.49	30
7 Desember 2018	K1	31	5.3	6.57	34	28	6	6.68	34
	K2	30	4.3	6.38	33	28	4	6.3	33
	K3	31	5	6.63	33	27	5.3	6.61	33
	A1	30	4.5	6.39	24	28	4.6	6.68	24
	A2	27	5.8	6.3	24	27	5.4	6.63	24
	A3	30	4.6	6.36	25	29	4.4	6.57	25
	B1	31	3.2	6.41	27	30	6.3	6.62	27
	B2	30	4.2	6.31	26	28	5	6.54	26
	B3	30	4	6.5	27	28	4.5	6.51	27
	C1	30	5.6	6.45	30	28	4.8	6.5	30
	C2	30	6.9	6.33	31	27	4.8	6.4	31
	C3	31	4.2	6.62	30	30	5.1	6.53	30
8 Desember 2018	K1	29	5	6.7	33	29.5	5	6.65	32
	K2	28	4.8	6.44	34	29	5.6	6.36	33
	K3	27	5.8	6.6	33	28	5.6	6.57	33
	A1	29.5	4.4	6.67	24	29.5	4.9	6.67	24
	A2	28	6.6	6.7	25	26	6.5	6.83	24
	A3	28	5.5	6.6	25	30	4.8	6.57	25
	B1	29	6.64	6.7	27	28	6.3	6.66	26
	B2	29	5.4	6.59	28	29.5	5.8	6.57	27

Hari, tanggal	Perlakuan	Kualitas Air							
		Pagi				Sore			
		Suhu (°C)	DO (ppm)	pH	Salinitas (ppt)	Suhu (°C)	DO (ppm)	pH	Salinitas (ppt)
9 Desember 2018	B3	27	5.8	6.59	28	29.2	5.8	6.62	27
	C1	28	5.8	6.63	31	30	5.6	6.52	29
	C2	29	4.4	6.4	30	29	4.5	6.44	30
	C3	29	6.1	6.6	29	29	5.2	6.6	30
	K1	30.6	6.6	6.74	33	30.6	4.8	6.71	33
	K2	28.9	5.6	6.46	34	28.9	6	6.5	34
	K3	26.6	6.4	6.6	33	26.6	5.4	6.51	33
	A1	26.6	6.3	6.72	25	31	4.8	6.69	25
	A2	27.1	6.8	6.84	24	27.2	7.4	6.7	24
	A3	28.9	5.3	6.72	24	28.9	5.5	6.63	24
	B1	29	3.6	6.74	27	29	4.3	6.61	27
	B2	27.7	6.7	6.73	27	27.7	5.1	6.51	27
	B3	29	6.1	6.75	27	29	5	6.67	27
	C1	27.7	6.6	6.66	31	27.7	6.4	6.8	31
	C2	28.3	5.3	6.59	30	28.3	5	6.6	30
	C3	28.6	5.6	6.65	30	28.6	4.9	6.65	30
10 Desember 2018	K1	30.6	5	6.68	32	30.3	4.8	6.68	33
	K2	27.2	5.8	6.47	33	27.3	5.6	5.76	33
	K3	27.4	5.2	6.5	31	27.7	5.3	6.57	34
	A1	30	5	6.67	23	30.7	4.5	6.68	25
	A2	27.4	6.5	6.4	25	27.4	5.6	6.7	24
	A3	29.2	5.6	6.5	24	29.1	4.7	6.57	24
	B1	30	4.7	6.53	27	29	5.2	6.75	28
	B2	27.2	5.3	6.74	27	28.5	4.7	6.67	27
	B3	29	5.2	6.57	26	28.7	4.47	6.68	27
	C1	30	6.1	6.7	30	28.2	5	6.6	31
	C2	28.8	4.7	6.5	30	27.3	5.6	6.45	30
	C3	28	4.5	6.63	29	28.7	4.57	6.64	31
11 Desember 2018	K1	31	4.5	6.71	32	31	4.9	6.6	34
	K2	29	4.7	6.51	33	29.3	6	6.4	33
	K3	29	4.8	6.63	34	29.6	5.3	6.54	33
	A1	30	4.1	6.67	25	31	4.8	6.65	24
	A2	27	6.5	6.69	24	30.3	6.1	6.67	25
	A3	30	5.4	6.62	25	30	5.2	6.62	24
	B1	29	5.51	6.66	28	29	5.1	6.44	27

Hari, tanggal	Perlakuan	Kualitas Air							
		Pagi				Sore			
		Suhu (°C)	DO (ppm)	pH	Salinitas (ppt)	Suhu (°C)	DO (ppm)	pH	Salinitas (ppt)
12 Desember 2018	B2	29	4.4	6.58	27	29.7	5.3	6.7	27
	B3	29	5.8	6.78	28	29.5	6.4	6.78	28
	C1	29	5.6	6.62	30	30	5.5	6.56	30
	C2	29	5.8	6.65	30	29.5	6	6.58	30
	C3	30	4.7	6.68	30	30	5	6.63	30
	K1	27.5	6.1	6.72	34	31.3	4.9	6.62	33
	K2	28.8	5.1	6.45	33	30	5.3	6.54	33
	K3	28.7	5.6	6.58	33	29	5.7	6.56	33
	A1	27.9	5.7	6.68	24	31	5	6.66	24
	A2	29.6	5.3	6.73	24	31	5.9	6.73	23
	A3	30.1	4.3	6.68	25	30	4.9	6.67	24
	B1	28.8	5.3	6.63	28	29	5.5	6.64	27
	B2	27.2	5.8	6.77	27	29	4.9	6.64	27
	B3	27.8	5.5	6.77	28	30	6.1	5.83	28
	C1	27.5	5.3	6.58	30	29	5.8	6.52	30
	C2	27.6	5.4	6.62	30	29	4.7	6.57	28
	C3	27.8	5.4	6.66	31	30	4.8	6.6	30
13 Desember 2018	K1	28.9	5.3	6.78	33	31.2	5.5	6.78	33
	K2	27.1	5.7	6.45	34	29.5	5.7	6.45	33
	K3	28.2	5.4	6.49	33	29.5	5.1	6.54	33
	A1	27.2	5.3	6.79	25	31.5	4.4	6.7	24
	A2	28.1	5.5	6.6	26	31	5.3	6.73	24
	A3	29.8	5.1	6.78	25	30.5	4.7	6.68	24
	B1	28.7	5	6.51	28	29.7	4.7	6.51	27
	B2	28.7	5.2	6.52	27	29.3	4.7	6.52	28
	B3	30.1	5.4	5.72	27	29.7	5.6	5.72	27
	C1	28.5	4.6	6.48	31	30.2	5.5	6.48	30
	C2	27	5.1	6.59	31	30.3	5.1	6.59	30
	C3	28.8	4.5	6.82	30	29.9	4.5	6.82	30
14 Desember 2018	K1	27.4	5.1	6.69	34	29.1	4.2	6.62	33
	K2	28.6	4.8	6.46	33	28.8	5.6	6.52	33
	K3	28.7	4.7	6.45	33	29.1	5	6.42	33
	A1	29.7	4.7	6.74	24	29.1	4.9	6.71	24
	A2	30.3	4.7	6.71	25	30.2	4.7	6.63	24

Hari, tanggal	Perlakuan	Kualitas Air							
		Pagi				Sore			
		Suhu (°C)	DO (ppm)	pH	Salinitas (ppt)	Suhu (°C)	DO (ppm)	pH	Salinitas (ppt)
15 Desember 2018	A3	29	4.9	6.44	24	29.8	4.4	6.67	24
	B1	28.3	4.6	6.64	27	29.3	4.3	6.34	27
	B2	29.3	4.4	6.72	27	28.6	4.3	6.69	27
	B3	28.5	4.8	6.78	27	28.3	4.8	6.77	27
	C1	29.3	5	6.6	30	29.1	5.1	6.57	30
	C2	28.7	4.8	6.57	31	28.3	5.1	6.53	30
	C3	28.6	4.4	6.7	31	29.6	4.8	6.57	30
	K1	30.6	4.2	6.66	34	30.3	5.2	5.85	33
	K2	30.5	5.1	6.69	33	29.1	6.2	5.8	33
	K3	29.6	5.6	6.47	33	29.1	6.2	6.58	33
	A1	30.8	4	6.68	25	31	4.7	5.79	24
	A2	29.2	4.9	6.56	24	30.7	5.6	5.82	24
	A3	29.7	4.8	6.57	25	29.9	4.1	5.9	24
16 Desember 2018	B1	29.8	4.6	6.58	27	29.4	5.3	6.58	27
	B2	29.4	4.8	6.68	28	29	4.9	5.84	27
	B3	29	5.4	6.77	28	29.2	5.6	5.92	27
	C1	29.5	5.7	6.56	30	29.1	5.7	6.52	30
	C2	29.4	5.6	6.5	30	29.2	5.6	6.62	30
	C3	29.5	4	6.78	31	29.7	6.7	5.92	30
	K1	30.3	5.2	6.45	33	30.8	5	5.95	33
	K2	29.1	5.1	6.62	34	29.5	6.8	5.6	33
	K3	29.5	5.5	6.3	33	29.3	6.2	6.2	33
	A1	30.5	4.2	6.53	24	31.3	5.2	5.78	24
	A2	30.5	4.9	6.15	25	30.9	6.9	6.01	24
	A3	31.1	4.8	6.71	24	30.1	5	6	25
	B1	29.2	4.9	6.51	27	29	5.4	6.48	27
17 Desember 2018	B2	29.6	4.8	6.66	28	29.8	4.9	5.84	27
	B3	30.2	4.4	6.59	27	29.9	5.9	5.93	27
17 Desember 2018	C1	29.5	5.5	6.08	31	30	6.7	6	30
	C2	29.8	5.2	6.32	30	28.8	6.1	6.42	30
17 Desember 2018	C3	30.2	4.8	6.11	30	29.3	5.7	5.93	30
	K1	30.5	4.7	6.5	34	29.5	4.4	6.52	33
	K2	29.3	4.8	6.62	33	28.7	5.4	6.51	33

Hari, tanggal	Perlakuan	Kualitas Air							
		Pagi				Sore			
		Suhu (°C)	DO (ppm)	pH	Salinitas (ppt)	Suhu (°C)	DO (ppm)	pH	Salinitas (ppt)
18 Desember 2018	K3	29.5	5.7	6.82	33	29.1	5.1	6.71	33
	A1	29	5.2	6.82	24	28.9	4.9	6.72	24
	A2	31	5.3	6.15	24	30	4.9	6.18	24
	A3	31.5	4.9	6.7	25	28.8	4.8	6.21	24
	B1	29	5.4	6.84	28	29.2	4.6	6.72	27
	B2	29.2	5.2	6.84	27	28.3	4.1	5.82	28
	B3	30.4	5	6.43	28	28	5.1	6.48	27
	C1	29.5	5.7	6.86	31	29.3	4.6	6.87	30
	C2	30	5.7	6.43	31	31	5.2	6.84	31
	C3	29.5	4.4	6.83	30	29.4	4.7	6.81	30
	K1	30.9	5.6	6.41	33	31.2	5.1	6.9	33
	K2	29.2	5.7	6.51	33	29.2	6	6.71	33
	K3	29.7	5.8	6.71	34	30	6.2	6.72	33
	A1	29.1	5.8	6.61	24	29.1	6	6.61	24
	A2	30.8	5.7	6.7	25	30.7	5.8	6.73	24
	A3	30	4.8	6.9	25	30.1	5.6	6.61	24
	B1	29.3	4.2	6.7	28	29.7	5.4	6.15	27
	B2	29.7	5.4	6.78	27	29.8	5.6	6.8	27
	B3	29.1	5.9	6.91	27	29.5	5.9	6.89	27
	C1	30	5.9	6.5	31	29.9	5.8	6.51	30
	C2	29.6	5.7	6.66	30	29.8	6	6.7	30
	C3	30.1	5.1	6.72	30	30.1	5.6	6.5	31
19 Desember 2018	K1	26.7	4.6	6.83	33	30.1	5.6	6.17	33
	K2	28.7	4.7	6.73	34	30.5	5.4	6.1	33
	K3	27.6	4.8	6.73	33	30.1	5.8	6.2	33
	A1	27.5	4.4	6.33	24	29.5	5.9	6.19	24
	A2	29.8	5	6.72	25	29.9	5.3	6.2	24
	A3	28.2	4.8	6.72	24	29.7	5.4	6.5	24
	B1	27.5	4.7	6.73	28	30.7	5.5	6.57	27
	B2	28.7	4.9	6.38	27	30.1	5.6	6.8	27
	B3	28.1	4.5	6.44	27	30.4	5.6	6.87	27
	C1	28.9	4.5	6.82	31	29.4	4.9	6.89	30
	C2	27	5.4	6.84	30	29.8	5	6.7	30

Hari, tanggal	Perlakuan	Kualitas Air							
		Pagi				Sore			
		Suhu (°C)	DO (ppm)	pH	Salinitas (ppt)	Suhu (°C)	DO (ppm)	pH	Salinitas (ppt)
	C3	27.8	4.5	6.48	31	30	5.1	6.1	30

➤ Data Kualitas Air Mingguan

• Pagi

Perlakuan	Kualitas Air				
	Minggu Pertama (12 Desember 2018)				
	Nitrit (ppm)	Nitrat (ppm)	Amonia (ppm)	TOM (ppm)	Alkalinitas (ppm)
K1	0.25	5	0.25	15.68	280
K2	0.5	5	0.25	13.43	243
K3	0.25	5	0.25	20.77	348
A1	0.25	5	0.15	12.46	340
A2	0.5	5	0.25	15.3	322
A3	0.25	5	0.25	18.23	380
B1	1	5	0.25	31.6	400
B2	0.25	5	0.25	29.44	467
B3	0.5	5	1	29.34	376
C1	0.25	5	0.25	18.96	368
C2	0.5	5	0.2	15.75	332
C3	1	5	0.15	23.12	439

• Sore

Perlakuan	Kualitas Air				
	Minggu Kedua (19 Desember 2018)				
	Nitrit (ppm)	Nitrat (ppm)	Amonia (ppm)	TOM (ppm)	Alkalinitas (ppm)
K1	1.8	5	0.25	64.46	360
K2	1	5	0.25	83.42	408
K3	1.7	5	0.25	72.31	400
A1	0.25	5	0.25	26.54	336
A2	1	5	0.25	39.14	320
A3	0.5	5	0.2	29.67	315
B1	1.7	5	0.15	41.71	440
B2	1.7	5	0.25	46.76	324
B3	0.25	5	0.25	44.24	310
C1	1	5	0.25	34.12	344
C2	1	5	0.25	27.8	412
C3	1.7	5	1	36.65	410

Lampiran 6. Perhitungan

➤ Perhitungan Mix BGA

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

Keterangan rumus :

V_1 = Volume air tawar;

V_2 = Volume air BGA;

N_1 = Salinitas yang dicari;

N_2 = Salinitas air BGA

Diketahui:

Salinitas BGA : 33 ppt

Volume BGA : 10 L

Salinitas Perlakuan : (A: 24 ppt; B: 27 ppt; C: 30 ppt; K: 33 ppt)

Perlakuan A : $24 \times X = 33 \times 10$

$$24x = 330$$

$$X = 23,75 \text{ L (pengurangan 2,75 L)}$$

Perlakuan B : $27 \times X = 33 \times 10$

$$27x = 330$$

$$X = 12,2 \text{ L (pengurangan 2,2 L)}$$

Perlakuan C : $30 \times X = 33 \times 10$

$$30x = 330$$

$$X = 11 \text{ L (pengurangan 1 L)}$$

Perlakuan K : $33 \times X = 33 \times 10$

$$33x = 330$$

$$X = 10 \text{ L (tanpa pengurangan)}$$

➤ Sampling udang awal

No.	Berat Udang (gr)
1.	1.02
2.	2.03
3.	2.01
4.	2.10

5.	2.04
6.	2.10
7.	2.09
8.	2.10
9.	2.50
10.	2.10
11.	3.04
12.	3.07
13.	2.21
14.	2.11

Jumlah udang disampling : 14

Total Berat : 30,52 gr

Rata-rata : 2,18 gr

Standar deviasi : 0,49

➤ Pengenceran Ekstrak DNA

$$T_n = \frac{100}{548,83} \times 50 = 9,1 \text{ (DNA)} + 40,9 \text{ (ddH}_2\text{O)}$$

$$T_A = \frac{100}{399,61} \times 50 = 12,5 \text{ (DNA)} + 37,5 \text{ (ddH}_2\text{O)}$$

$$T_B = \frac{100}{320,14} \times 50 = 15,6 \text{ (DNA)} + 34,4 \text{ (ddH}_2\text{O)}$$

$$T_C = \frac{100}{469} \times 50 = 10,7 \text{ (DNA)} + 39,3 \text{ (ddH}_2\text{O)}$$

$$T_K = \frac{100}{347,28} \times 50 = 14,4 \text{ (DNA)} + 35,6 \text{ (ddH}_2\text{O)}$$

➤ Presentase Mutasi

$$\text{Presentase Mutasi} = \frac{\text{Jumlah Basa Berubah}}{\text{Total Basa Nitrogen}} \times 100\%$$

$$\text{Perlakuan A} = \frac{1}{208} = 0,05 \%$$

$$\text{Perlakuan B} = \frac{1}{208} = 0,05 \%$$

$$\text{Perlakuan C} = \frac{0}{208} = 0 \%$$

$$\text{Perlakuan K (+)} = \frac{1}{208} = 0,05 \%$$

GLOSARIUM

<i>Molting Inhibiting Hormone</i>	: Sebuah neuropeptida yang menghambat produksi ecdisteroid oleh sepasang Y-organ yang berfungsi menghambat molting pada krustasea.
Molting	: Proses pergantian kulit pada krustasea.
Ecdisteroid	: Hormon molting pada krustasea.
<i>White Feces Syndrome</i>	: Penyakit berak putih pada udang
Gregarin	: Parasit yang berhabitat di dalam saluran pencernaan dan rongga perut dari invertebrata yang hanya hidup pada satu inang.
Gen	: Unit pewarisan sifat bagi organisme hidup.
Allel	: Gen yang memiliki lokus (posisi pada kromosom) yang sama, tetapi memiliki sifat bervariasi yang disebabkan mutasi pada gen asli.
FASTA	: DNA dan protein urutan keselarasan.
Sekuens DNA	: Sebuah seri huruf-huruf mewakili struktur primer dari molekul DNA atau " <i>strand</i> " nyata atau hipotetis.
Mutasi	: Perubahan yang terjadi pada bahan genetik baik pada taraf tingkatan gen maupun pada tingkat kromosom.
DNA	: Sejenis biomolekul yang menyimpan dan menyandi instruksi-instruksi genetika setiap organisme.
Nukleotida	: Molekul yang tersusun dari gugus basa heterosiklik, gula, dan satu atau lebih gugus fosfat.
Kromatogram	: Visualisasi dari hasil pemisahan senyawa yang berbeda.
<i>Polymerase Chain Reaction</i>	: suatu teknik atau metode perbanyakan (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme
Amplifikasi	: Proses perbanyakan DNA target
Denaturasi	: Proses pemisahan <i>template</i> DNA menjadi utas tunggal dengan suhu tinggi.
<i>Annealing</i>	: Proses penempelan primer DNA pada DNA target.
Ekstensi	: Proses pemanjangan untai baru DNA
<i>BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)</i>	: Algoritme untuk membandingkan informasi sekuens biologis primer, DNA dan / atau sekuens RNA