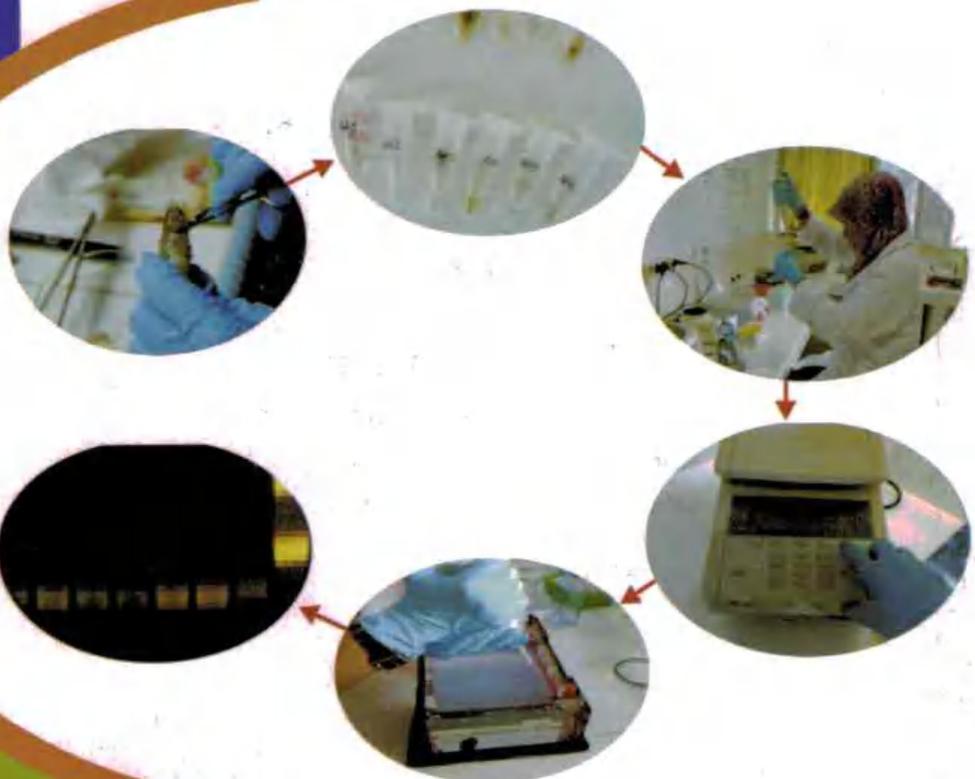


Petunjuk Teknis

DETEKSI DINI VIBRIOSIS (*Penyakit Kunang-Kunang*) Pada Udang Penaeid Menggunakan Primer Spesifik IAVh



Ince Ayu Khairana Kadriah
Koko Kurniawan
Endang Susianingsih
Muharijadi Atmomarsono



BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERIKANAN BUDIDAYA
BALAI PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BUDIDAYA AIR PAYAU

Maros, 2014

PETUNJUK TEKNIS

**DETEKSI DINI VIBRIOSIS
(PENYAKIT KUNANG-KUNANG) PADA UDANG
PENAEID MENGGUNAKAN PRIMER SPESIFIK IAVh**

PENGARAH:

Andi Parenrengi

PENYUSUN:

Ince Ayu Khairana Kadriah

Koko Kurniawan

Endang Susianingsih

Muharijadi Atmomarsono

EDITOR:

Akhmad Mustafa

Syarifuddin Tonnek

Muliani

EDITOR PELAKSANA:

Andi Indra Jaya Asaad

Rosmiati

DESAIN SAMPUL:

Husain

Penerbitan Petunjuk Teknis Ini dibiayai oleh:

PELAYANAN TEKNIS

BALAI PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BUDIDAYA AIR PAYAU

DIPA NO. 032.11.2.230894/2014

| | |
|---|-----|
| PRAKATA | i |
| DAFTAR ISI | iii |
| DAFTAR GAMBAR | iv |
| DAFTAR LAMPIRAN | vi |
| BAB I PENDAHULUAN | |
| A. Latar Belakang | 1 |
| B. Tujuan dan sasaran | 2 |
| BAB II METODE DETEKSI | 3 |
| A. Pengambilan Sampel di Lapangan | 3 |
| 1. Pembenuhan | 3 |
| 2. Pentokolan dan Pembesaran | 4 |
| B. Ekstraksi Genom | 5 |
| 1. Benur | 5 |
| 2. Tokolan, udang dewasa, dan induk | 6 |
| 3. Air | 7 |
| 4. Sedimen | 8 |
| C. Proses Amplifikasi DNA Bakteri <i>Vibrio Sp</i> Patogen Dengan Metode PCR | 9 |
| D. Proses Observasi dan Dokumentasi Hasil PCR | 11 |
| BAB III HASIL DETEKSI VIBRIOSIS PADA BEBERAPA PERTAMBAKAN DI INDONESIA | 13 |
| DAFTAR PUSTAKA | 17 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Gambar 1. | Memasukkan benur ke dalam tabung mikro (A) dan sampel benur yang siap dibawa ke laboratorium (B)..... | 4 |
| Gambar 2. | Proses koleksi sampel udang di pentokolan (A) dan pembesaran (B)..... | 4 |
| Gambar 3. | Proses ekstraksi genom sampai mendapatkan hasil PCR | 11 |
| Gambar 4. | Lajur 1–6 benur Barru1, insang udang Pangkep, benur Takalar, insang udang Maros, benur Barru2, kaki jalan udang Pangkep, M adalah 100 bp DNA/ladder. Lajur 7 kontrol positif | 12 |
| Gambar 5. | Hasil PCR untuk sampel Krablet kepiting, (1,2); Takalar (3–8); Maros (9–18); Lampung (19–24). Sampel dari Takalar, Maros dan Lampung menunjukkan hasil positif rendah dengan konsentrasi bakteri 10^1 – 10^2 CFU/mL | 14 |
| Gambar 6. | Hasil PCR Situbondo (Paras Duwet) Lajur 1–6: tutup insang, insang, Hepatopankreas, Kaki Jalan, khaki renang, ekor. Sampel Pangkep Lajur 7-10: Hepatopankreas, Kaki jalan, kaki renang, ekor. Semua sampel tidak terinfeksi <i>Vibrio</i> pathogen (negative) | 14 |
| Gambar 7. | Lajur 1–3 udang tambak Desa Panarukan Situbondo, lajur 4–7 udang windu Kabupaten Bulukumba; Lajur 8–11 udang api-api dari Kabupaten Bulukumba, semua sampel tidak terinfeksi <i>Vibrio</i> pathogen | 14 |
| Gambar 8. | Hasil PCR dari Kab. Indramayu dan Kabupaten Cirebon (Jawa Barat). Lajur 1 dan 11 kontrol positif, Lajur 2–10 udang Indramayu, lajur 12–15 udang Cirebon. M adalah 100 bp DNA Ladder. Semua sampel positif rendah dengan konsentrasi bakteri hanya 10^1 CFU/mL | 15 |

| | | |
|------------|---|----|
| Gambar 9. | Hasil PCR sampel Lombok. Lajur 1–3 sampel Peras, lajur 4–6 sampel Kabupaten Lombok Barat, lajur 7–9 sampel Kabupaten Lombok Timur, lajur 10–12 sampel Ds. Tutu, lajur 13–16 sampel desa Pijot. Sampel dari Lombok positif | 15 |
| Gambar 10. | Sampel udang yang dikoleksi dari Paras Duwet, Situbondo Udang yang terlihat sehat dengan warna tubuh lebih cerah (A). udang sakit dengan warna tubuh lebih gelap (B) | 16 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Lampiran 1. | Skema Proses Ekstraksi Genom dari benur dengan metode DTAB/CTAB..... | 19 |
| Lampiran 2. | Skema Proses Ekstraksi Genom dari organ udang dengan metode Kit Genaeid | 20 |
| Lampiran 3. | Skema Proses Ekstraksi Genom dari air dengan metode Kit Sure Prep (Fisher Bio Reagents) | 22 |
| Lampiran 4. | Skema Proses Ekstraksi Genom dari sedimen dengan metode Kit Sure Prep | 24 |
| Lampiran 5. | Skema Proses Amplifikasi DNA dengan metode PCR..... | 26 |
| Lampiran 6. | Skema Pembuatan Gel Agarose untuk elektroforesis | 27 |
| Lampiran 7. | Skema Proses Elektroforesis..... | 28 |

A. Latar Belakang

Bakteri *Vibrio* spp. sudah dikenal sebagai patogen penyebab vibriosis (penyakit kunang-kunang) pada organisme akuatik, seperti udang windu (Karunasagar *et al.*, 1994), beberapa spesies ikan dan kekerangan (Austin, 2006) bahkan juga karang (Ben-Haim *et al.*, 2003). Vibriosis pada budidaya udang penaeid (udang windu, udang vanname, dan udang putih) dapat menyebabkan penurunan produksi yang cukup besar.

Selama ini gejala awal munculnya vibriosis di lapangan ditandai dengan adanya air bercahaya (*bioluminescence*). Identifikasi dan deteksi vibriosis dilakukan dengan pengamatan berdasarkan gejala klinis dan kemudian dilanjutkan dengan uji biokimiawi di laboratorium. Udang yang terserang vibriosis terlihat lemah dalam pergerakannya dan mengalami nekrosis pada bagian ekornya (Karunasagar, 1994). Pada kondisi tersebut konsentrasi bakteri *Vibrio* spp. pada hepatopankreas sudah mencapai kepadatan 10^5 - 10^6 CFU/mL (Leano, 1998). Dikatakan juga bahwa kepadatan bakteri *Vibrio* spp. lebih besar dari atau sama dengan 10^5 CFU/mL bersifat patogen di alam. Hal inilah yang menyebabkan tidak efektifnya upaya penanggulangan penyakit karena kepadatan bakteri sudah terlanjur tinggi apabila didasarkan atas gejala klinisnya.

Metode deteksi vibriosis yang selama ini dilakukan menggunakan media selektif *Thiosulphate Citrate Bile-salt Sucrose Agar* (TCBSA) dan dilanjutkan dengan uji biokimiawi (West *et al.*, 1984) untuk mengidentifikasi spesies bakteri *Vibrio* spp. yang terdapat pada media budidaya. Metode diagnosis tersebut memerlukan waktu 3-7 hari dan populasi bakteri yang dapat dihitung lebih besar dari atau sama dengan 10^2 CFU/mL. Di samping itu hasil metode media selektif seringkali tidak dapat mendeteksi keberadaan

Pengembangan metode deteksi cepat, tepat, akurat dan murah berbasis molekuler sangat diperlukan dalam upaya pencegahan vibriosis di lapangan baik pada pembenihan maupun pada pembesaran udang. Upaya pencegahan ini harus dilakukan sebelum koloni bakteri mencapai kepadatan terendah yang memungkinkan menjadi patogen (*quorum*). Penelitian yang dilakukan oleh Defoirdt (2007) menyimpulkan bahwa kemampuan bakteri *Vibrio* spp. untuk melakukan komunikasi antarsel (*quorum sensing*) sangat dipengaruhi oleh populasi bakteri tersebut di alam. Kepadatan bakteri 10^4 CFU/mL merupakan kepadatan minimal yang memungkinkan bakteri *Vibrio* spp. dapat berkomunikasi secara seluler baik dengan sesamanya dalam satu spesies (interspesies) maupun dengan jenis *Vibrio* spp. patogen lainnya (intraspesies) (Defoirdt 2007).

Salah satu metode yang telah diterapkan dalam identifikasi bakteri dan deteksi Vibriosis secara molekuler adalah analisis sekuensing gen 16sRNA (Dorsch *et al.*, 1992). Metode ini dinilai lebih akurat dibandingkan secara biokimiawi. Meskipun demikian, metode 16sRNA sulit untuk mengidentifikasi dan mendeteksi *V. harveyi* dan membedakannya dengan spesies *Vibrio* lainnya yang memiliki kekerabatan filogeni yang erat seperti *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* dan *V. campbellii* (Kita-Tsukamoto *et al.*, 1993).

Alternatif gen penanda lain yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme patogenik melalui teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yaitu gen *haemolysin* (Yuhana *et al.*, 2008). *Haemolysin* merupakan bagian yang bertanggung jawab terhadap kerusakan membran eritrosit (hemolisis) (Conejero dan Hedreyda, 2004). Penanda gen *haemolysin* dapat dideteksi dengan menggunakan primer spesifik IAVh. Primer tersebut dapat mendeteksi keberadaan bakteri *Vibrio* spp. berpendar patogenik secara spesifik dan sensitif dibandingkan kit komersial yang sudah ada. Primer tersebut dapat langsung digunakan pada sampel organ udang sakit yang dilakukan secara molekuler dengan alat PCR.

B. Tujuan dan Sasaran

Petunjuk teknis ini dibuat sebagai panduan dalam upaya untuk mendeteksi vibriosis pada udang penaeid secara cepat, tepat, akurat dan murah melalui penggunaan primer spesifik IAVh. Petunjuk teknis ini diharapkan dapat digunakan sebagai system peringatan dini kejadian vibriosis pada budidaya udang penaeid sehingga penanggulangan dapat dilakukan secara cepat.

Metode deteksi vibriosis menggunakan primer IAVh dilakukan melalui beberapa tahapan kegiatan sebagai berikut:

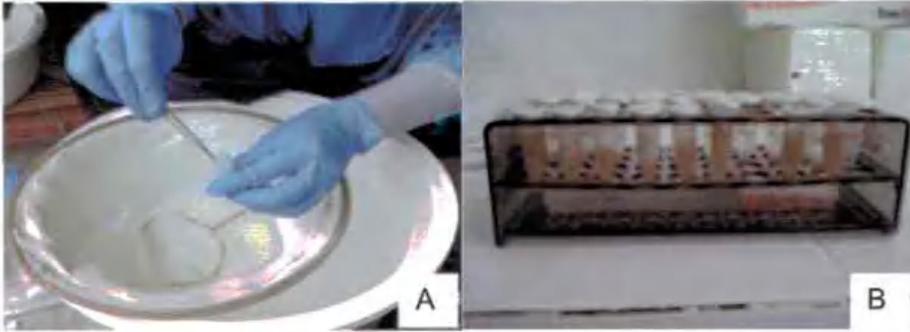
A. Pengambilan Sampel di Lapangan

Pengambilan sampel untuk deteksi vibriosis di lapangan sebaiknya dilakukan secara berkala sejak proses pembenihan, pentokolan, dan pembesaran. Semua alat dan bahan yang digunakan untuk pengambilan dan penyimpanan sampel harus dalam kondisi steril. Sterilisasi alat dan bahan dilakukan secara basah (menggunakan autoclave pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 15 menit) atau kering (menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam).

1. Pembenihan

Pengambilan sampel di pembenihan dimulai dari induk, naupli sampai pascalarva (PL) siap tebar. Organ induk udang yang dikoleksi adalah kaki jalan, kaki renang, insang, tutup insang dan ekor. Sampel seberat 50–100 mg dimasukkan ke dalam tabung mikro yang berisi larutan buffer TNES 500 μ L dan dibawa ke laboratorium untuk proses selanjutnya.

Sampel benur (naupli hingga PL) seberat 50–100 mg dimasukkan ke dalam tabung mikro tanpa menggunakan pengawet dan dibawa ke laboratorium pada kondisi dingin. Sedangkan sampel air sebanyak 500–1.000 mL dimasukkan ke dalam botol sampel tanpa menggunakan pengawet dan dibawa ke laboratorium pada kondisi dingin (Gambar 1).



Gambar 1. Memasukkan benur ke dalam tabung mikro (A) dan sampel benur yang siap dibawa ke laboratorium (B)

2. Pentokolan dan Pembesaran

Pengambilan sampel di pentokolan berupa sampel air, PL yang baru ditebar, dan tokolan siap panen. Sedangkan pada pembesaran sampel yang diambil berupa air, sedimen, dan organ udang yang diambil secara berkala. Sampel air sebanyak 500-1.000 mL dimasukkan ke dalam botol sampel tanpa menggunakan pengawet dan dibawa ke laboratorium pada kondisi dingin.

Sampel sedimen sebanyak 5-10 g dimasukkan ke dalam botol sampel tanpa menggunakan pengawet dan dibawa ke laboratorium pada kondisi dingin. Sedangkan organ udang yang dikoleksi adalah kaki jalan, kaki renang, insang, tutup insang dan ekor (Gambar 2). Sampel seberat 50–100 mg dimasukkan ke dalam tabung mikro yang berisi larutan buffer TNES 500 μ L dan dibawa ke laboratorium untuk proses selanjutnya.



Gambar 2. Proses koleksi sampel udang di pentokolan (A) dan pembesaran (B)

B. Ekstraksi Genom

Setelah sampel tiba di laboratorium kemudian dilakukan proses ekstraksi genom dengan tujuan untuk mendapatkan genom total (genom bakteri dan inangnya) dalam setiap sampel.

1. Benur

Proses ekstraksi genom dari benur dilakukan menggunakan metode DTAB-CTAB (*Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide/Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). Proses ini diawali dengan menimbang sampel sebanyak 30 mg, kemudian dihaluskan dengan penggerus. Tambahkan larutan DTAB sebanyak 600 μL , dihaluskan dengan menggunakan penggerus. Lalu dihomogenkan menggunakan vortex selama 20 detik. Kemudian diinkubasi menggunakan Thermoblock pada suhu 75°C selama 5 menit. Lalu didinginkan pada suhu ruang selama 5-10 menit dan selanjutnya dihomogenkan lagi menggunakan vortex selama 20 detik dan *diffashing* (diputar cepat). Tambahkan khloroform sebanyak 700 μL lalu dihomogenkan menggunakan vortex selama 20 detik, kemudian disentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Cairan jernih yang terbentuk pada bagian atas diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL kemudian ditambahkan larutan CTAB sebanyak 100 μL dan ddH₂O sebanyak 900 μL . Homogenkan menggunakan vortex selama 20 detik lalu diinkubasi pada suhu 75°C selama 5 menit. Setelah itu didinginkan pada suhu ruang selama 5-10 menit. Selanjutnya disentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, lalu supernatan dibuang dan ditambahkan pelarut sebanyak 150 μL . Inkubasi pada suhu 75°C selama 5 menit, kemudian didinginkan pada suhu ruang selama 5-10 menit, disentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Ambil supernatan pindahkan ke dalam tabung mikro lalu tambahkan etanol dingin 95% sebanyak 300 μL , kemudian dihomogenkan dengan vortex selama 20 detik. Sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Etanol 95% dibuang secara hati-hati, kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 200 μL lalu disentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Kemudian etanol dibuang lalu tabung mikro dibalikkan di atas tisu selama 2 jam untuk proses pengeringan genom. Setelah 2 jam

tambahkan buffer TE sebanyak 200 μ L, kemudian disimpan pada suhu -20°C.

2. Tokolan, udang dewasa, dan induk

Proses ekstraksi genom dari organ udang yang diisolasi dari lapangan dilakukan menggunakan kit ekstraksi genom (Kit Geneaid). Proses diawali dengan memotong-motong organ udang kemudian ditimbang sebanyak 30 mg, lalu dimasukkan ke dalam tabung mikro dan dihancurkan menggunakan penggerus sampai halus. Tambahkan larutan buffer GT sebanyak 200 μ L dan dihomogenkan kembali dengan penggerus. Tambahkan *Proteinase* K sebanyak 20 μ L dan dikocok kencang agar proteinnya hancur. Setelah itu diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit dan setiap 5 menit tabung dibolak-balik untuk melisis sel secara sempurna. Tambahkan larutan buffer GBT sebanyak 200 μ L dan dikocok kencang selama 5 detik. Inkubasi kembali pada suhu 60°C selama 20 menit dan setiap 5 menit tabung dibolak-balik. Sentrifuse pada kecepatan 15.000xg (13.000 rpm) selama 2 menit. Sambil menunggu sentrifuse, buffer *elution* yang akan digunakan sebagai pelarut genom mulai dipanaskan pada suhu 60°C. Setelah sentrifuse selesai supernatan dipindahkan ke tabung mikro 1,5 mL. Tambahkan larutan *RNase* A (10 mg/mL) sebanyak 4 μ L ke dalam sampel dan dikocok kencang lalu inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Tambahkan etanol 95% sebanyak 200 μ L dan dikocok kencang selama 10 detik. Masukkan kolom purifikasi GD pada tabung pengumpul 2 mL. Pindahkan seluruh sampel (supernatan dan pelet) ke kolom purifikasi GD yang sudah disatukan dengan tabung pengumpul. Sentrifuse pada kecepatan 15.000xg (13.000 rpm) selama 2 menit. Buang tabung pengumpul dan masukkan kolom purifikasi GD ke dalam tabung pengumpul yang baru. Tambahkan buffer W1 sebanyak 400 μ L ke dalam kolom purifikasi GD kemudian sentrifuse pada kecepatan 15.000xg (13.000 rpm) selama 30 detik. Buang cairan yang terkumpul pada tabung pengumpul dan masukkan kembali kolom purifikasi GD ke tabung pengumpul. Tambahkan buffer pencuci yang sudah dicampur etanol (100 mL) sebanyak 600 μ L ke kolom purifikasi GD kemudian sentrifuse pada kecepatan 15.000xg

(13.000 rpm) selama 30 detik. Buang cairan yang terkumpul pada tabung pengumpul dan masukkan kembali kolom purifikasi GD ke tabung pengumpul. Sentrifuse kolom purifikasi GD pada kecepatan 15.000xg (13.000 rpm) selama 3 menit untuk mengeringkan kolom purifikasi GD. Pindahkan kolom purifikasi GD yang kering ke tabung mikro 1,5 mL. Tambahkan buffer elution sebanyak 100 μ L (yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 60°C) ke bagian tengah membran kolom purifikasi GD. Biarkan kolom dalam keadaan tegak selama 5 menit untuk memastikan buffer elution sudah terserap sempurna pada filter kolom. Sentrifuse pada kecepatan 15.000xg (13.000 rpm) selama 30 detik untuk melulusi genom yang telah terpurifikasi. Buang kolom purifikasi GD dan simpan genom pada suhu -20°C secepatnya (Gambar 3).

3. Air

Siapkan sampel air sebanyak 10-100 mL (tergantung pada tipe sumber air sampel). Tempatkan/letakkan kolom filter ke dalam komponen alat vakum. Masukkan 20 mL air sampel ke dalam kolom filter. Biarkan seluruh air sampel melewati filter dengan lobang pori ukuran 0,45 μ m. Proses ini dapat diulangi sampai seluruh sampel air (100 mL) tersaring oleh kolom filter. Potong bagian atas (O-ring) dari tabung filter menggunakan pisau bedah. Pindahkan kertas filter dengan hati-hati menggunakan pinset ke dalam tabung manik (*bead tube*), usahakan untuk tidak menyentuh bagian tengah dari filter. Pada saat menempatkan filter ke dalam tabung manik, pastikan permukaan atas dari filter menghadap ke bagian tengah dari tabung manik.

Tambahkan larutan lisis (*lysis solution*) sebanyak 500 μ L ke dalam tabung manik dan homogenkan menggunakan vortex dengan kecepatan maksimum selama 5 menit. Usahakan posisi tabung tegak lurus terhadap landasan vortex. Inkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit dan setiap 3 menit tabung dibolak balik untuk memastikan filternya tidak kering.

Sentrifuse tabung pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Pindahkan supernatan pada tabung mikro 1,5 mL baru dan perhatikan volumenya. Tambahkan etanol 70% sebanyak volume supernatan ke dalam tabung. Homogenkan dengan vortex. Pasangkan kolom pada

tabung pengumpul. Masukkan lisat yang telah ditambahkan etanol (maksimum volume 600 μ L) ke dalam kolom. Sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Buang cairan yang terkumpul pada tabung pengumpul dan pasang kembali kolom pada tabung pengumpul. Tambahkan larutan pencuci sebanyak 500 μ L ke dalam kolom dan sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Buang cairan yang terkumpul pada tabung pengumpul dan pasang kembali kolom pada tabung pengumpul. Ulangi sekali lagi proses pencucian ini. Setelah cairan di tabung pengumpul dibuang, sentrifuse kolom pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit untuk mengeringkan kolom dan buang tabung pengumpul.

Tempatkan kolom pada tabung elution 1,7 mL yang sudah tersedia. Tambahkan buffer elution asam nukleat sebanyak 50 μ L ke dalam kolom. Sentrifuse pada kecepatan 1.500 rpm selama 2 menit dan diikuti dengan sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Proses penambahan buffer elution asam nukleat dapat dilakukan dua kali untuk meningkatkan total genom yang berhasil diekstrak sebanyak 20-30%.

4. Sedimen

Timbang tanah sebanyak 250 mg dan masukkan ke dalam tabung ulir 2mL jika sampel tanah bercampur air, maka terlebih dahulu masukkan sampel ke dalam tabung sentrifuse mikro ukuran 1,7 mL. Sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Buang air dengan hati-hati menggunakan pipet, kemudian timbang tanah. Tambahkan 500 mg manik kaca ke dalam tabung ulir yang telah berisi 250 mg sampel tanah (perbandingan antara manik kaca dan sampel tanah adalah 2:1).

Tambahkan larutan lisis sebanyak 700 μ L ke dalam tabung dan homogenkan dengan vortex. Tambahkan bahan tambahan lisis sebanyak 100 μ L dan vortex singkat. Pastikan tabung berada dalam posisi tegak lurus terhadap landasan vortex. Homogenkan larutan dengan vortex pada kecepatan maksimum selama 5 menit. Sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit.

Pindahkan supernatan sebanyak 450 μ L (maksimum) ke dalam tabung mikro sentrifuse. Tambahkan larutan pengikat sebanyak 100

μL . Campur dengan membolak-balikkan tabung beberapa kali dan inkubasi tabung di dalam es selama 5 menit. Putar cepat lisat selama 1 menit untuk mengendapkan partikel protein dan tanah.

Pindahkan supernatan sebanyak 450 μL (maksimum) ke dalam tabung mikro sentrifuse. Tambahkan etanol 70% sebanyak volume larutan supernatan yang dikumpul (100 μL etanol untuk 100 μL lisat). Homogenkan lisat dan etanol dengan vortex. Masukkan kolom berputar (*spin column*) ke dalam tabung pengumpul. Masukkan lisate yang sudah bersih (setelah dicuci dengan etanol) ke dalam kolom dan sentrifuse pada 12.000 rpm selama 1 menit. Buang larutan yang terkumpul pada tabung pengumpul dan masukkan kembali kolom ke dalam tabung pengumpul. Ulangi proses ini sampai seluruh lisat selesai difilter.

Masukkan larutan pencuci I sebanyak 500 μL ke dalam kolom dan sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Buang cairan yang terkumpul pada tabung pengumpul dan pasang kembali kolom pada tabung pengumpul. Masukkan larutan pencuci II sebanyak 500 μL ke dalam kolom dan sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Buang cairan yang terkumpul pada tabung pengumpul dan pasang kembali kolom pada tabung pengumpul. Ulangi proses pencucian dengan larutan pencuci II sekali lagi. Sentrifuse kolom pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit untuk mengeringkan kolom dan buang tabung pengumpul.

Masukkan kolom ke dalam tabung elution ukuran 1.7 mL. Tambahkan buffer elution sebanyak 50 μL ke dalam kolom. Sentrifuse pada kecepatan 1.500 rpm selama 2 menit dilanjutkan dengan sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Jika sampel belum seluruhnya terlarut, ulangi proses ini sekali lagi. Pengulangan proses elusi dapat meningkatkan total genom yang berhasil diekstrak sebanyak 20-30%.

C. Proses Amplifikasi DNA Bakteri *Vibrio* spp. Patogen dengan Metode PCR

Setelah ekstraksi genom selesai, dilanjutkan dengan amplifikasi DNA bakteri dengan metode PCR menggunakan primer spesifik IAVh sebagai

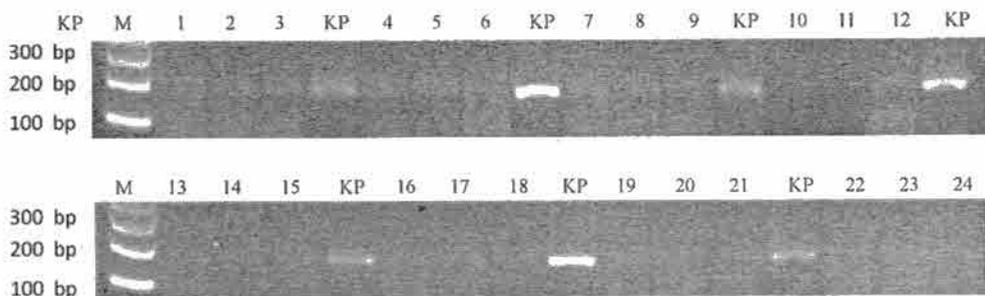
menggunakan primer IAVhF1 dan IAVhR1 dengan templat DNA dari sampel benur dan organ udang (Gambar 4).



Gambar 4. Lajur 1-6 benur Barru1, insang udang Pangkep, benur Takalar, insang udang Maros, benur Barru2, kaki jalan udang Pangkep, M adalah 100 bp DNA ladder. Lajur 7 kontrol positif

Aplikasi Kit deteksi dilakukan untuk mendeteksi dini keberadaan bakteri *Vibrio* patogen pada sampel yang dikoleksi langsung dari lapangan. Pengambilan sampel telah dilakukan di Kab Pinrang (Kecamatan Suppa), Kabupaten Barru (Kecamatan Soppengriaja), Kabupaten Pangkep, Kabupaten Maros (Kecamatan Maros Baru), Kabupaten Takalar, Kabupaten Bulukumba (Kecamatan Ujung Loe), Kabupaten Situbondo (Kecamatan Paras Duwet, Panarukan dan Sletreng), Kabupaten Indramayu, Kabupaten Cirebon, Kabupaten Lombok Barat, Kabupaten Lombok Timur, dan Provinsi Lampung (Bakauheni dan Kalianda). Sampel yang dikoleksi adalah organ udang berupa insang, tutup insang, kaki renang, kaki jalan dan ekor. Pengambilan sampel benur juga dilakukan di panti perbenihan. Isolasi genom untuk sampel benur dan organ udang dewasa dilakukan menggunakan metode yang telah dijelaskan sebelumnya.

Hasil PCR yang divisualisasikan dengan elektroforesis menunjukkan sampel yang dikoleksi umumnya tidak terinfeksi *Vibrio* patogen kecuali sampel dari kabupaten Pinrang dan dari Kabupaten Lombok Timur. Dari hasil yang diperoleh dapat diketahui kemampuan primer IAVh untuk deteksi vibriosis di lapangan cukup baik. Pada hampir semua sampel, keberadaan bakteri *Vibrio* patogen dapat dideteksi walaupun pada konsentrasi yang rendah. Hal ini dapat dilihat pada hasil PCR dari sampel Takalar, Maros, dan Lampung (gambar 5, 6, dan 7).



Gambar 5. Hasil PCR untuk sampel Krablet keping, (1,2); Takalar (3-8); Maros (9-18); Lampung (19-24). Sampel dari Takalar, Maros dan Lampung menunjukkan hasil positif rendah dengan konsentrasi bakteri 10^1-10^2 CFU/mL



Gambar 6. Hasil PCR Situbondo (Paras Duwet) Lajur 1-6: tutup insang, insang, Hepatopankreas, Kaki Jalan, kaki renang, ekor. Sampel Pangkep Lajur 7-10: Hepatopankreas, Kaki jalan, kaki renang, ekor. Semua sampel tidak terinfeksi *Vibrio* pathogen (negative)



Gambar 7. Lajur 1-3 udang tambak Desa Panarukan Situbondo, lajur 4-7 udang windu Kabupaten Bulukumba; Lajur 8-11 udang api-api dari Kabupaten Bulukumba, semua sampel tidak terinfeksi *Vibrio* pathogen

Walaupun demikian kondisi udang dinyatakan tetap aman karena konsentrasi bakteri hanya berada pada kisaran 10^1-10^2 CFU/mL jika dilihat dari ketebalan pita DNA hasil elektroforesis. Terlihat tidak terdapat pita DNA pada hasil PCR untuk sampel yang berasal dari Karawang, Situbondo, Pangkep, dan Bulukumba. Hal ini menggambarkan kondisi udang yang

dibudidayakan di daerah tersebut cukup aman dari serangan *Vibrio* patogen. Pada pengamatan morfologi udang yang dikoleksi dari seluruh daerah memang terlihat kondisinya cukup baik dan tidak terdapat tanda-tanda klinis terserang Vibriosis. Satu kasus kematian udang ditemukan di Kec. Paras Duwet, Kab. Situbondo, namun udang yang mati tidak menunjukkan gejala klinis serangan vibriosis. Hal ini diperkuat dengan hasil uji PCR yang menunjukkan tidak adanya pita DNA pada panjang basa 151 bp (negatif).



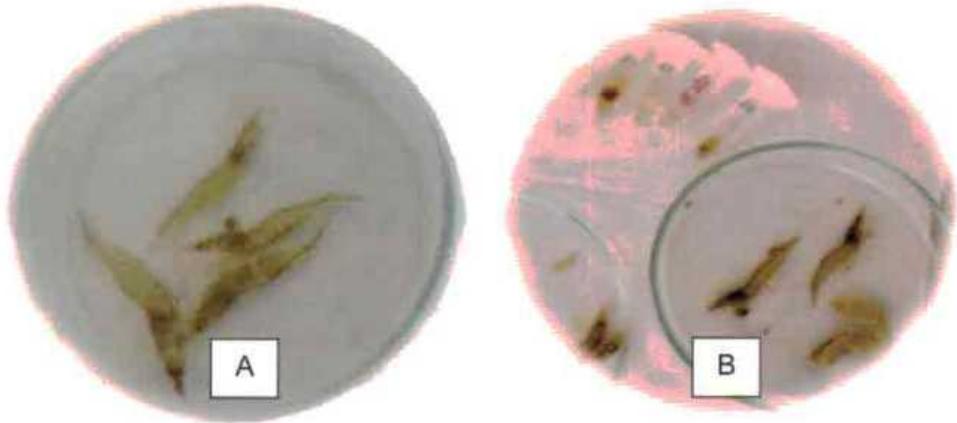
Gambar 8. Hasil PCR dari Kab. Indramayu dan Kabupaten Cirebon (Jawa Barat). Lajur 1 dan 11 kontrol positif, Lajur 2–10 udang Indramayu, lajur 12–15 udang Cirebon. M adalah 100 bp DNA Ladder. Semua sampel positif rendah dengan konsentrasi bakteri hanya 10^1 CFU/mL



Gambar 9. Hasil PCR sampel Lombok. Lajur 1–3 sampel Peras, lajur 4–6 sampel Kabupaten Lombok Barat, lajur 7–9 sampel Kabupaten Lombok Timur, lajur 10–12 sampel Ds. Tutu, lajur 13–16 sampel desa Pijot. Sampel dari Lombok positif

Penyakit vibriosis pada budidaya udang dapat menyebabkan penurunan produksi yang cukup besar. Adanya metode deteksi dini yang dapat dengan cepat mendeteksi adanya kontaminasi bakteri *Vibrio* berpendar patogen akan sangat membantu dalam penanganan dan pencegahan awal yang tepat waktu untuk mengurangi kematian udang. Seperti diketahui bahwa kemampuan bakteri dalam menginfeksi inangnya juga dipengaruhi oleh kepadatan bakteri dalam media budidaya. Sehingga jika keberadaan bakteri dapat dideteksi sebelum jumlahnya mencapai *quorum*, usaha pencegahan dapat dilakukan dengan menghambat pertumbuhan bakteri agar sifatnya tidak berubah dari saprofit menjadi patogen. Beberapa penulis melaporkan kemampuan bakteri *Vibrio* sebagai penyebab penyakit yang utama dan pertama (Saulnier *et al.* 2000a;

Vandenberghé *et al.* 2003), serta dapat pula sebagai patogen oportunistis (Saulnier *et al.* 2000b) yang memanfaatkan kesempatan melemahnya sistem pertahanan tubuh udang setelah serangan patogen lainnya.

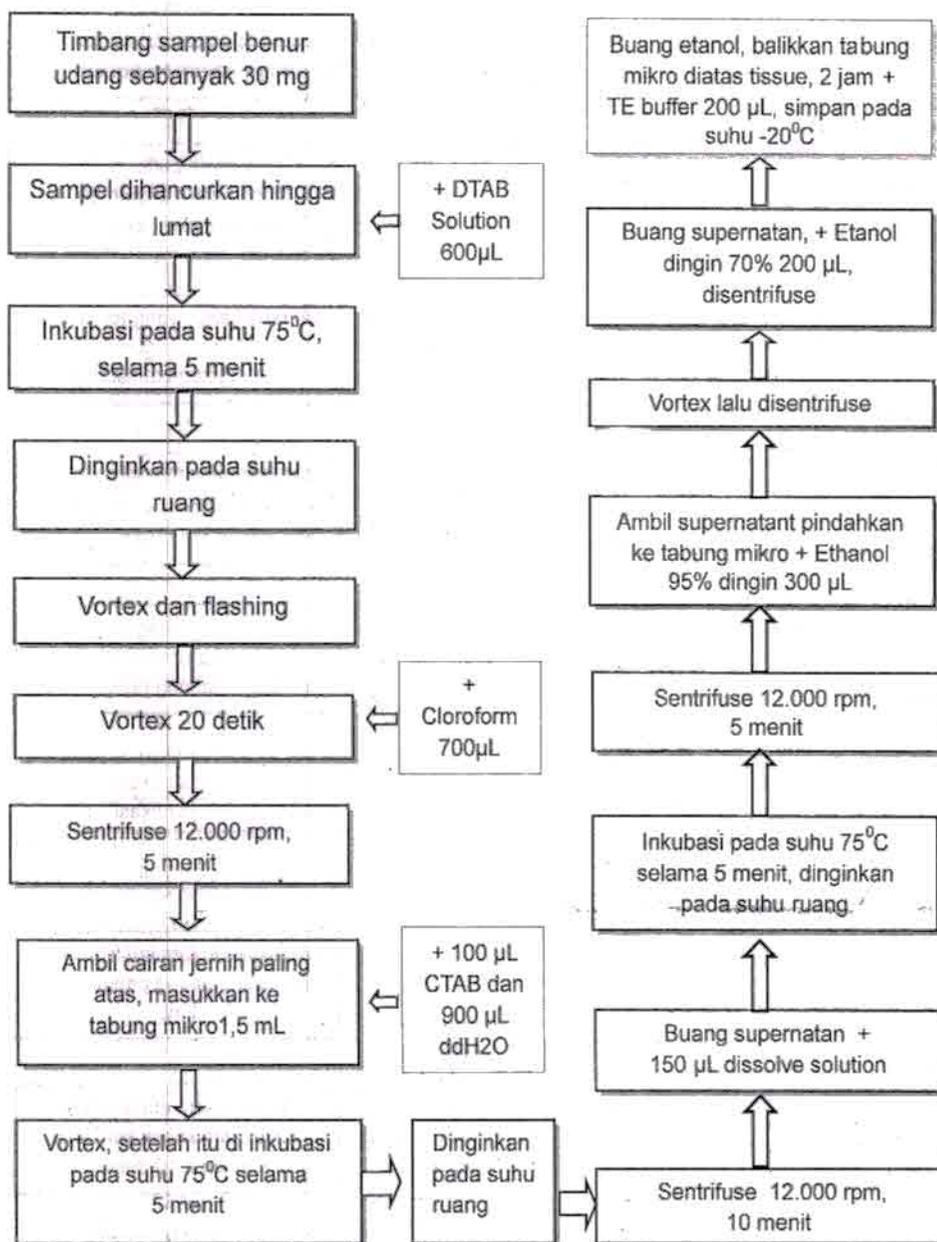


Gambar 10. Sampel udang yang dikoleksi dari Paras Duwet, Situbondo. Udang yang terlihat sehat dengan warna tubuh lebih cerah (A). udang sakit dengan warna tubuh lebih gelap (B)

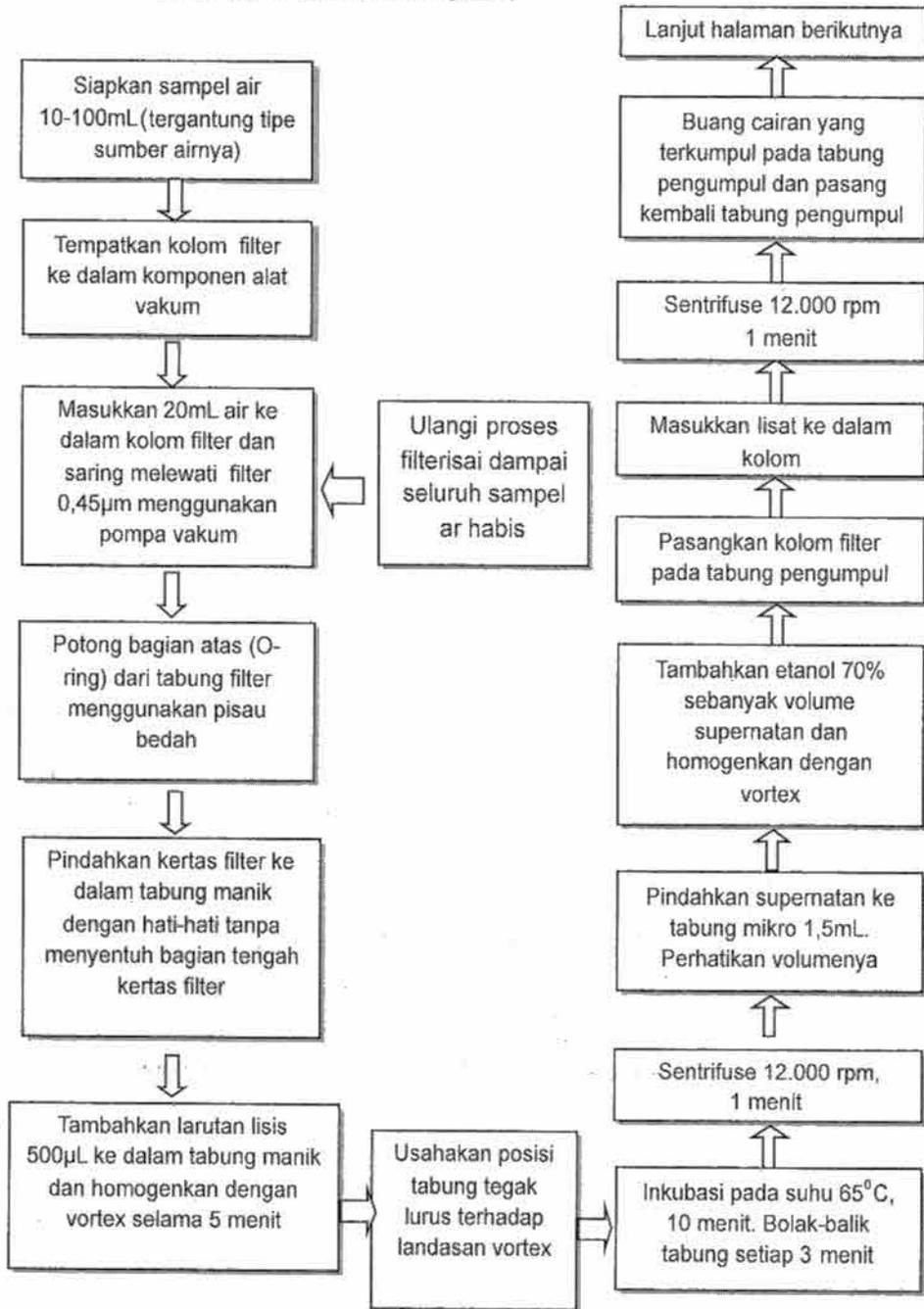
- Austin, B, Zhang, XH. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Let Appl Microbiol* 43:119–124.
- Ben-Haim, Y., Thompson, FL., Thompson CC., Cnockaert, MC., Hoste, B, Swings J, Rosenberg E. 2003. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 309–315.
- Conejero, MJU., CT, Hedreyda, 2004. PCR detection of *hemolysin* (vhh) gene in *Vibrio harveyi*. *J Gen Appl Microbiol* 50: 137–142.
- Defoirdt, T. 2007. Quorum sensing disruption and the use of short-chain fatty acids and polyhydroxyalkanoates to control luminescent *Vibriosis*. [PhD thesis] Belgium: Ghent University.
- Kadriah, I.A.K. 2012. Pengembangan Metode Deteksi Cepat *Vibrio* Berpendar Patogenik Pada Udang Penaeid. Disertasi. Institut Pertanian Bogor.
- Kadriah, IAK., Susianingsih, E., Sukenda., Yuhana, M., dan Harris, E. 2013. Desain Primer Spesifik Untuk Deteksi Dini Penyakit Vibriosis Pada Udang Penaeid. *Jurnal Riset Akuakultur* 8(1): 131–143.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, GR., Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203–209.
- Leano, EM., Lavilla-Pitogo, CR., Paner, M.G. 1998. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous *Vibriosis*. *Aquaculture* 164: 367–374.
- Saulnier, D., Avarre, JC., Le Moullac, G., Ansquer, D., Levy, P., Vonau, V. 2000a. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia. *Dis Aquat Org* 40: 109–115.

- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., Ansquer, D. 2000b. Experimental infection models for shrimp *Vibriosis* studies: a review. *Aquaculture* 191: 133–144.
- Vandenbergh, J., Thompson, FL., Gomez-Gil, B., Swings, J. 2003. Phenotypic diversity among *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture* 219: 9–20.
- Yuhana, M., Widanarni, Sukenda, 2008. Pengembangan Penanda Molekuler untuk Diagnostik Cepat Penyakit *Vibrio* Berpendar pada Budidaya Udang *Litopenaeus vannamei*. Tahun Pertama: Pengumpulan Isolat, Desain Primer, Karakterisasi Gen Penyandi 16S-rRNA dan Analisis Phylogenetik *Vibrio* sp. Laporan Penelitian Hibah Bersaing LPPM IPB. Bogor.
- Yuwono T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Penerbit Andi. Yogyakarta.

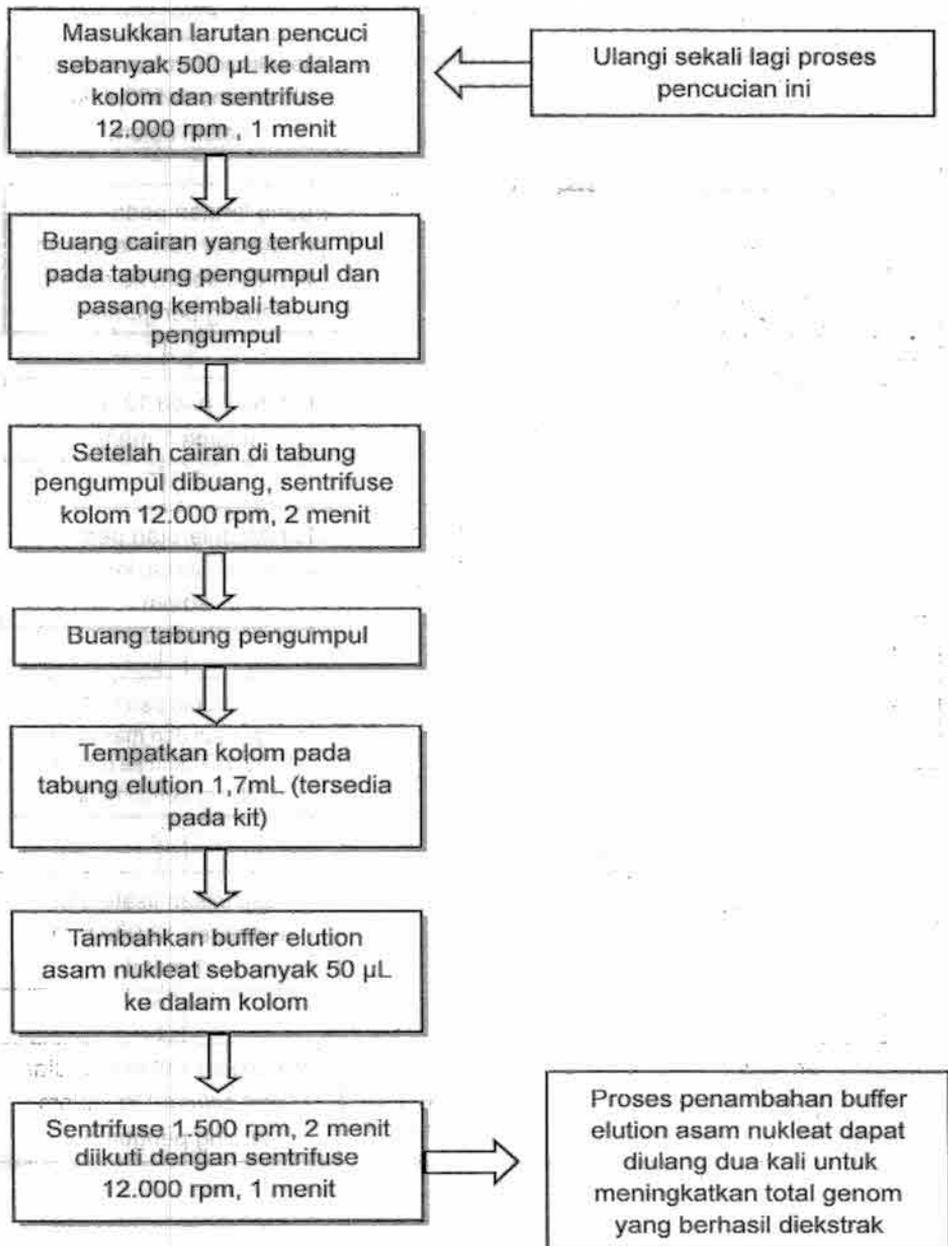
Lampiran 1. Skema proses ekstraksi genom dari benur dengan metode DTAB - CTAB



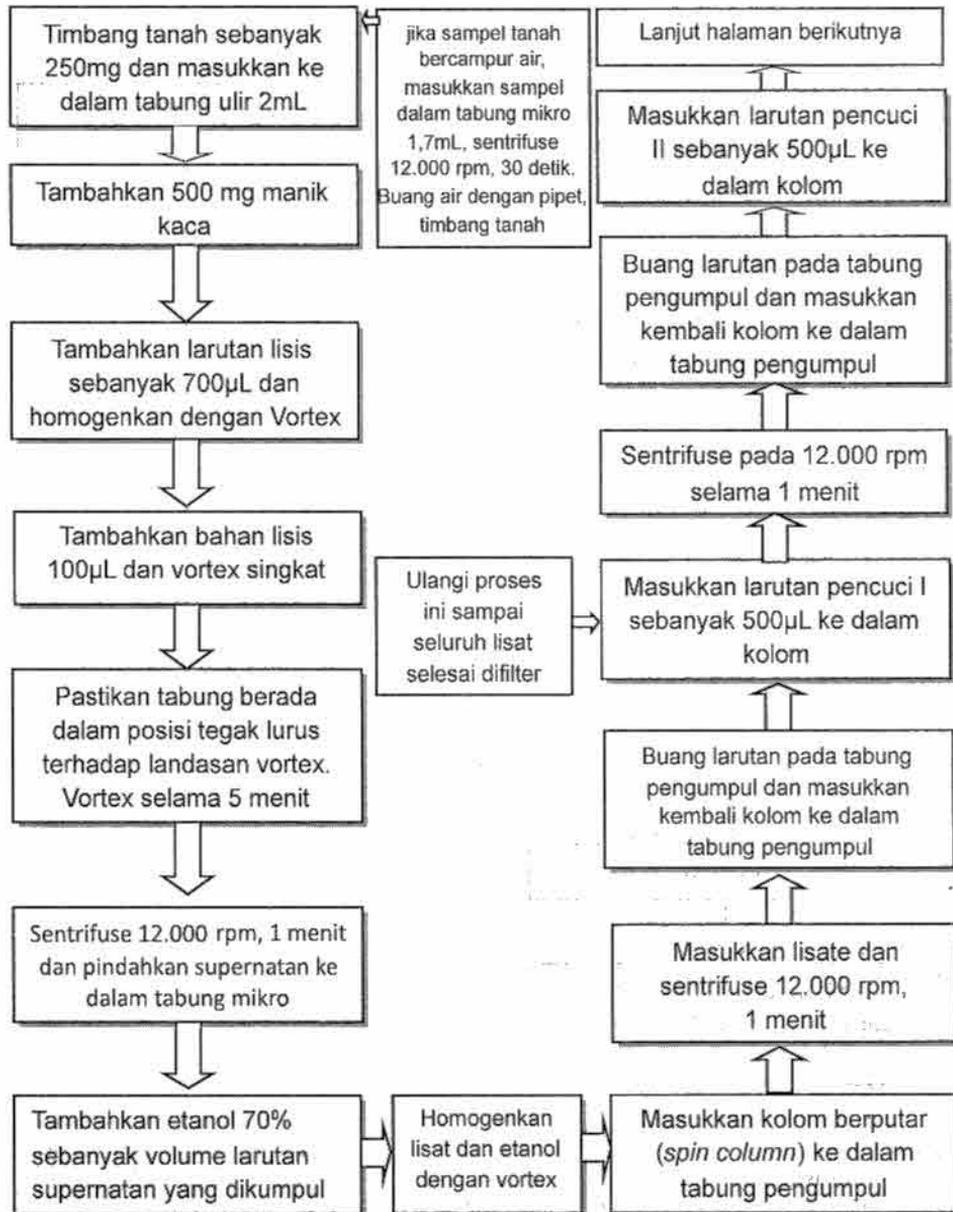
Lampiran 3. Skema proses eksternal genom dari air dengan metode Kit SurePrep (Fisher BioReagents)

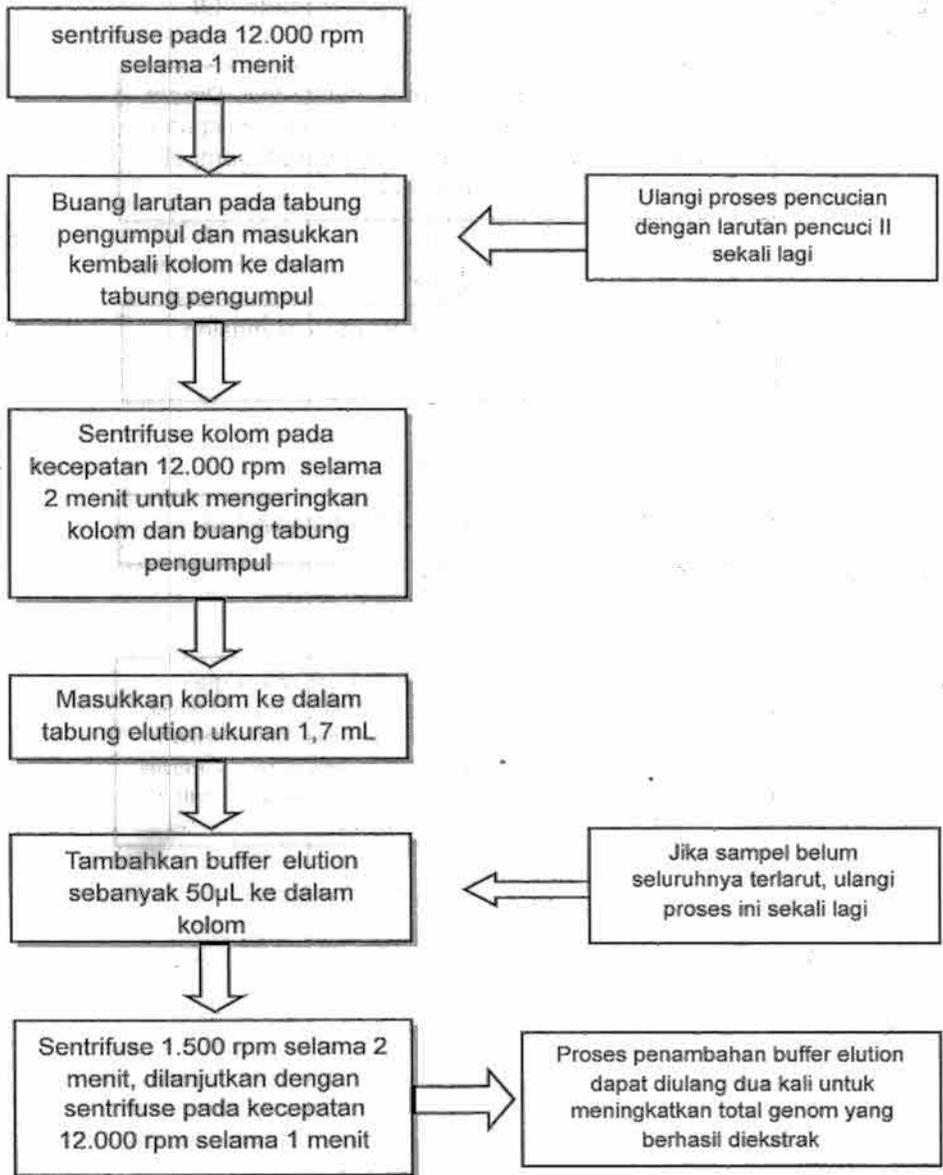


Lampiran 3. Skema proses ekstraksi genom dan air dengan metode Sure Prep (Lanjutan)

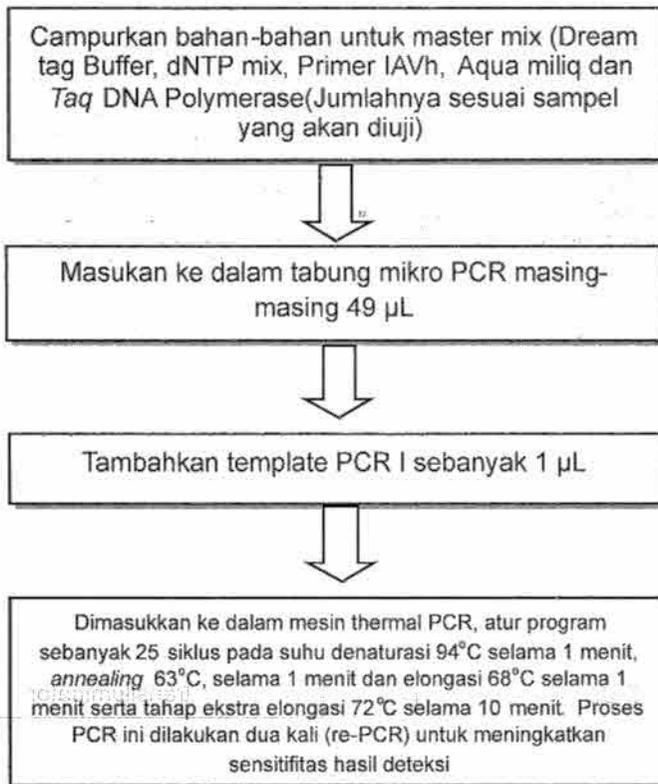


Lampiran 4. Proses ekstraksi genom dari sedimen dengan metode Kit SurePrep

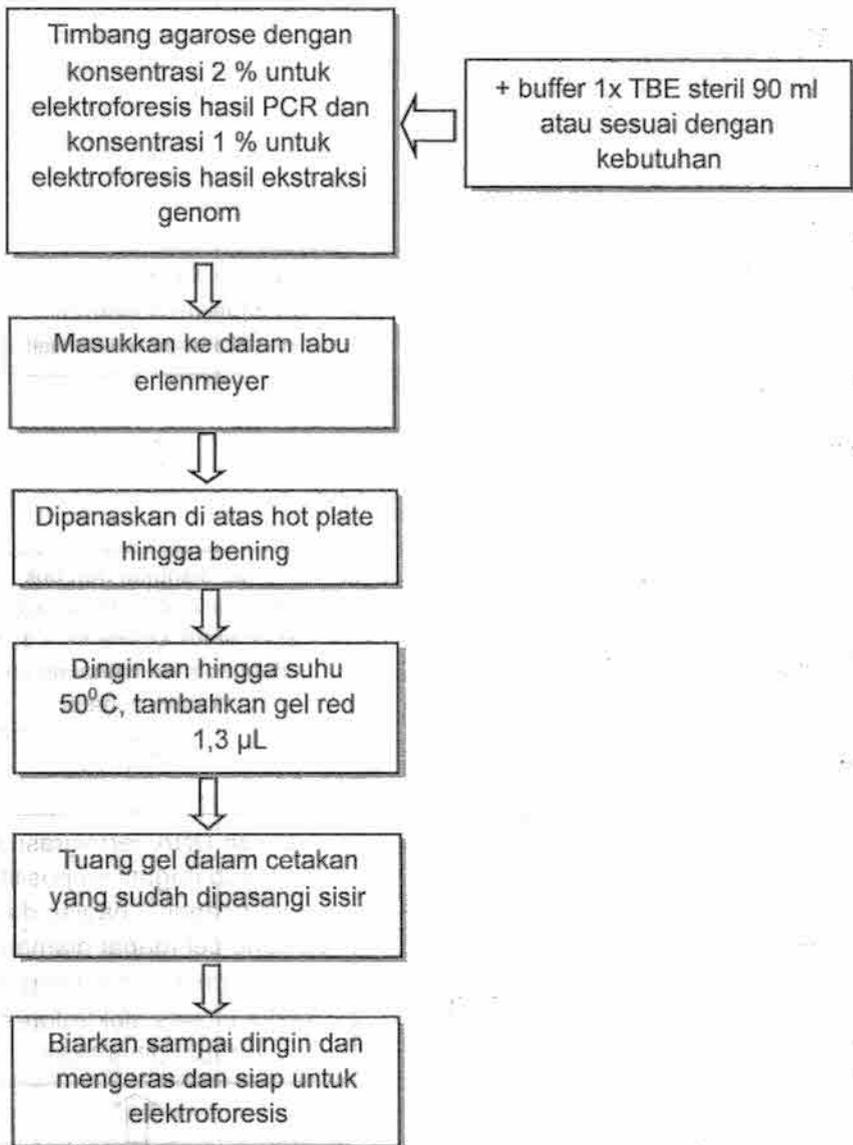




Lampiran 5. Skema proses amplifikasi DNA dengan metode PCR



Lampiran 6. Skema pembuatan gel agarose untuk elektroforesis



Lampiran 7. Skema proses elektroforesis

