



**Deteksi Molekuler *Yellow Head Virus* (YHV) pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan Metode *Semi Nested Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) di Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Mataram**

Wahyudin Islamsyah<sup>1\*</sup>, NosaSeptiana Anindita<sup>2</sup>, Amira Baihani<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Aisyiyah Yogyakarta

<sup>2</sup>Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Aisyiyah Yogyakarta

<sup>3</sup>Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Mataram

\*Email: [wahyu.islem@gmail.com](mailto:wahyu.islem@gmail.com)

---

**Abstrak**

**Keywords:**  
*yellow head virus;*  
*litopenaeus*  
*vannamei;*  
*amplikon; semi*  
*nested reverse-*  
*transcriptase*  
*polymerase chain*  
*reaction*

*Penyakit yang disebabkan oleh Yellow head virus pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) telah mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat besar bagi masyarakat terutama para pembudidaya. Dan dapat menurunkan kualitas dan kuantitas hasil panen. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi secara molekular Yellow head virus (YHV) pada *Litopenaeus vannamei* di Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu Dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Mataram. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan teknik semi nested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Hasil Yellow head virus (YHV) secara molekular pada *Litopenaeus vannamei* di tambak masyarakat di Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu Dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Mataram menunjukkan bahwa pita DNA tidak menunjukkan pada ukuran amplikon 135 bp. Ukuran amplikon 135 bp merupakan ukuran positif bagi Yellow head virus (YHV). Udang vaname di Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu Dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Mataram. Tidak ditemukan adanya serangan Yellow head virus (YHV).*

---

**1. PENDAHULUAN**

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) ialah produk hasil perikanan yang memiliki nilai ekonomis yang cukup besar serta diminati oleh konsumen di pasaran nasional maupun internasional. menurut Aristiyani [1] udang vaname merupakan salah satu produk ekspor utama perikanan di Indonesia dengan nilai jual yang cukup tinggi dan mengalami peningkatan yaitu sebesar 158.062 ton dan nilai ekspor sebesar US\$ 1.309.674 sampai dengan sebanyak 196.623 ton dengan nilai ekspor US\$ \$ 2.140.862.

Bersamaan dengan peningkatan hasil perikanan spesialnya yang berasal dari budidaya udang vaname, dikhawatirkan hendak mencuat permasalahan permasalahan yang hendak membatasi keberhasilan kenaikan produktifitas. Kasus yang universal terjadi ialah timbulnya serbuan hama serta penyakit ikan selaku akibat dari induk serta benih yang tidak dipastikan kualitasnya serta penyakit ikan yang telah endemik. Wabah hama serta penyakit ikan tersebut dampaknya bisa merendahkan produktifitas serta mutu produk perikanan paling utama udang yang



memiliki nilai tinggi berarti dampaknya bisa mengganggu sosial ekonomi masyarakat khususnya pelakon usaha perikanan [2].

Arafani et al. [3] mengantarkan penyakit pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) sudah menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar untuk warga paling utama para pembudidaya. Totalitas produksi udang vaname sangat rendah pada tahun 2012 dari 1.900 ton menjadi 1.025,8 ton. Penyakit unit zona udang vaname diprediksi diakibatkan oleh peradangan agen infeksius. tipe virus pemicu kerugian pada unit budidaya udang vaname yaitu *Taura Syndrome Virus* (TSV), *Infectious Mortification Virus* (IMNV), *White Spot Syndrome Virus* (WSSV), layer serta *Hemopoietic sphacelus Virus* (HHNV).) serta (*Virus Kepala Kuning* (YHV).

*Yellow Head Virus* (YHV) adalah patogen yang berbahaya bagi sektor budidaya udang, dapat dilihat pada *cephalothorax* bewarna kuning pucat, YHV adalah virus dari ordo *Nidovirales*, famili *Roniviridae*, genus *Okavirus* dan famili *Coronaviridae*. Dan merupakan virus RNA untai tunggal, memiliki partikel berbentuk batang dengan panjang 150.200 nm dan diameter 40-60 nm. YHV menginfeksi sebagian besar spesies udang komersial dan dapat mematikan [4].

Menurut made dan Sunaryam [5] Metode diagnosa hama dan penyakit sumber perikanan harus dengan prosedur yang tepat dan sistematis berkesinambungan dan terencana pada populasi hasil budidaya terutama komoditas unggulan. Virus yang dapat menyebabkan penyakit dapat didiagnosis dengan cara-cara seperti mengisolasi dan menganalisis morfologinya. Seperti Menggunakan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mendeteksi gen penyebab penyakit dan mendapatkan antibodi dari infeksi. Amplifikasi fragmen DNA *in vitro*.

Dibandingkan dengan metode lain, metode PCR lebih spesifik dan sensitif. Metode ini dapat meningkatkan urutan DNA dalam genom virus dengan

mencampurkan kultur dalam tabung PCR. Sehingga dari jaringan tubuh udang yang sakit dapat diketahui jenis organisme patogen yang menyerang. Sehingga dari jaringan tubuh udang atau ikan yang sakit dapat diketahui jenis organisme patogen yang menyerang [5].

Adanya lalu lintas ilegal dalam pembudidayaan benih udang dapat menimbulkan masalah besar bagi sektor budidaya udang vaname di Mataram karena berpotensi menyebarkan penyakit. Berdasarkan permasalahan ini pemerintah membentuk satuan kerja yaitu BKIPM, yang bertanggung jawab terhadap pencegahan masuk dan tersebarnya Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) serta mencegah keluarnya Hama dan Penyakit pada komoditas perikanan (HPI) di Indonesia khususnya di wilayah Nusa Tenggara Barat. Salah satu kegiatan yang perlu dilakukan yaitu mendiagnosa penyakit sebelum kegiatan ekspor dan impor serta dilalulintaskan secara domestik. Salah satu Teknik deteksi yang akurat, tepat, dan sistematis yaitumenggunakan metode PCR [2].

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan kajian di BKIPM Mataram, untuk mendeteksi hingga ranah molekuler keberadaan virus YHV penyebab penyakit YHD dalam budidaya udang *Litopenaeus vannamei* dengan tingkat validitas penyebab infeksi lebih akurat. Adanya deteksi dini dapat digunakan untuk mengetahui secara cepat infeksi virus sehingga tidak menyebar dan menginfeksi udang yang lain. Kajian ini juga memberikan manfaat dalam penentuan kebijakan maupun prosedur pengendalian penyakit pada budidaya udang vaname.

## 2. METODE

### 2.1 Persiapan Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan pada tahap nekropsi diantaranya *scalpel* dan *blade*, gunting bedah, petridish, neraca analitik serta kertas label. Alat yang dibutuhkan untuk proses ekstraksi yaitu *Rneasy Mini Spin Columns* (pink), *microtube* 0,2 ml; 1,5 ml, *collection tube* 2 ml, mikropipet,

microtip, penggerus (pastel) plastik, *Deep freezer*, *refrigerator*, *vortex*, kemudian alat yang dibutuhkan untuk amplifikasi dan elektroforesis adalah *microtube* 0,2 ml, mesin PCR (*thermal cycler*), seperangkat *UV documentation*, seperangkat alat *electrophoresis*, *microcentrifuge*, *laminar air flow*, *thermo shaker*, neraca analitik, *microwave*, gelas ukur.

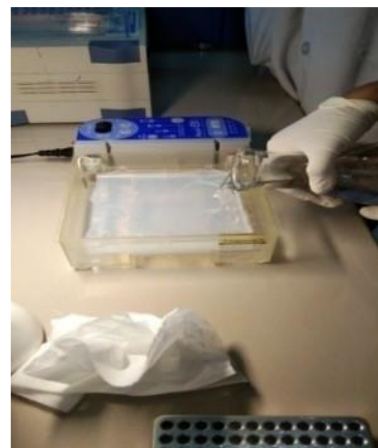
Bahan yang digunakan pada proses preparasi sampel dan analisis data terkait deteksi virus pada udang vaname meliputi hewan uji berupa udang vaname yang dipelihara di tambak, dengan bobot 7 g. Organ target yang digunakan yaitu insang, kemudian bahan selanjutnya adalah *GoTaq Green*, *Nuclease Free Water* (NFW), Kontrol Positif YHV, Enzim RT AMV, Marker, *B-Mercaptoethanol*, Buffer RLT, Buffer RW, Buffer RPE, *RNASE Free Water*, Etanol 75%, *Sybr-Green*. TAE Buffer, Agarosa, Primer *fir*: *forward* 1 5'-CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3 dan *reverse* 1 5'-AAGGTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT-3'. Primer *semi nested*: *forward* 1 5'-CCG-CTAATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3 dan *reverse* 1 5'-AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGAAGT-3'.

## 2. 2 Pembuatan Media Agarosa

Agarosa ditimbang sebanyak 1,5 g ke dalam Erlenmeyer memakai spatula. Berikutnya, ditambahkan 60 ml TAE buffer 1x 16 memakai gelas ukur. Agarosa dilarutkan memakai *microwave* pada temperatur 100- 150°C sepanjang 4 menit. Sehabis mendidih, agarosa didiamkan untuk merendahkan temperatur sampai ± 40°C serta ditambahkan *Sybr-green* sebanyak 4µl. Berikutnya media agarosa dituang ke dalam cetakan elektroforesis secara perlahan yang tadinya sudah dibersihkan serta dipasangkan sisir pencetak sumur. Agarosa didiamkan sampai dingin. Prosedur ini mengikuti SOP BKIPM terpaut pembuatan agarosa [2]. Proses pembuatan media agarosa bisa dilihat pada Foto 1a serta 1b.



**Gambar 1a.** Pencampuran Media Agarosa Dengan Buffer TAE



**Gambar 1b.** Proses Pencetakan Media Agarosa Untuk Elektroforesis

## 2.3 Preparasi Sampel

Panjang sampel Udang Vaname diukur dengan penggaris/ mistar serta ditimbang bobot badannya di atas timbangan. Berikutnya sampel organ sasaran Udang Vaname diambil memakai gunting serta pinset serta dipindahkan ke dalam cawan petri Insang ditimbang sebanyak 30 mg serta dimasukkan ke dalam *microtube* 1, 5 ml. Bukti identitas sampel ditulis (no. contoh uji, nama sampel, sasaran pengujian serta bertepatan pada masuk ilustrasi) memakai spidol permanen. Kemudian *microtube* berisi sampel tersebut dimasukkan kedalam tatakan buat berikutnya dicoba sesi ekstraksi RNA. Alat- alat yang sudah digunakan dalam preparasi dibersihkan, kemudian disterilkan dengan menyemprotkan perlengkapan tersebut memakai alkohol 70%. Prosedur ini menjajaki SOP BKIPM terpaut



preparasi ilustrasi[2].

## 2.4 Deteksi Molekuler YHV

### 2.4.1 Ekstraksi RNA dengan *RNeasy Mini spin column*

Prosedur ini mengikuti SOP BKIPM [2]. Microtube berisi sampel yang sebelumnya telah dipreparasi dan ditambahkan *Ethanol absolute*. Selanjutnya ditambahkan buffer 600  $\mu$ l RLT yang sudah dicampur dengan  $\beta$ -*mercaptoethanol* 10  $\mu$ l kemudian digerus menggunakan *micropastle* hingga hancur, Sampel kemudian dipisahkan melalui *sentrifug* dengan kecepatan 13.000 rpm selama 4 menit, sehingga diperoleh lapisan atas dan bawah pada sampel, butiran/pelet RNA, yang akan dipakai dalam tahap kedua proses uji PCR. Selanjutnya 200  $\mu$ l supernatant dipindahkan ke dalam microtube 0,5 ml yang baru dan berisi 100  $\mu$ l ethanol 70%. Kemudian, 700  $\mu$ l campuran tersebut dipindahkan ke dalam *RNeasy Spin Column* (pink). Kemudian *disentrifuge* 10.000 rpm selama 15 detik, *filtrate* dibuang, tetapi *collection tube* digunakan kembali. Selanjutnya ditambahkan 700  $\mu$ l Buffer RWI ke dalam *RNeasy Spin Column* dan *disentrifuge* 10.000 rpm selama 15 detik. *Filtrate* dibuang, *collection tube* masih digunakan kembali.

Selanjutnya ditambahkan 500  $\mu$ l Buffer RPE ke dalam *RNeasy Spin Column* lalu *disentrifuse* 10.000 rpm selama 15 detik *Filtrate* dibuang, tetapi *collection tube* digunakan kembali. Kemudian ditambahkan 500  $\mu$ l Buffer RPE ke dalam *RNeasy Spin Column* lalu *disentrifuge* 10.000 rpm selama 2 menit. Kemudian *RNeasy Spin Column* ditempatkan ke dalam *collection tube* baru lalu *disentrifuge* pada 13.000 rpm selama 2 menit. Selanjutnya *RNeasy Spin Column* dimasukkan ke dalam tube 1.5 ml kemudian ditambahkan 50  $\mu$ l *RNAse free water* ke dalam *column*. *disentrifuge* 10.000 rpm selama 1 menit untuk mengelusi RNA. *Microtube* berisi sampel dimasukkan kedalam tatakan di *freezer* dengan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sebelum dilakukan tahap amplifikasi DNA.

### 2.4.2 Amplifikasi RNA

Proses amplifikasi *first* RNA menggunakan *Access Quick master mix* sebanyak prosedur dari produk Promega yaitu sebanyak 12,5 $\mu$ l, primer *forward*, 1, $\mu$ l dan

primer *reverse* 1, $\mu$ l, enzim RT (AMV) 0,5  $\mu$ l, template RNA 4 $\mu$ , serta *nucleus free water* 7  $\mu$ l. Kemudian untuk amplifikasi nested RNA Menggunakan *Go Taq Green* 12,5  $\mu$ l, primer *forward* 1  $\mu$ l dan primer *reverse* 1  $\mu$ l, templet RNA 2  $\mu$  dan *Nukleus free water* sebanyak 7  $\mu$ l. Proses amplifikasi RNA yang dilakukan dengan 2 tahapan dan menggunakan 2 tube dengan prosedur didasari dari referensi dari OIE [6] sebagai berikut:

1. Amplifikasi *first* RT-PCR *Pre heat*  $94^{\circ}\text{C}$  2 menit selama 1 siklus, *Denaturasi*  $94^{\circ}\text{C}$  30 detik, *Annealing*  $58^{\circ}\text{C}$  30 detik, *Extension*  $72^{\circ}\text{C}$  30 detik selama 30 siklus selanjutnya *Final Extension*  $72^{\circ}\text{C}$  5 detik selama 1 siklus dan *Hold*  $4^{\circ}\text{C}$  dan amplicon 135 Bp.
2. Amplifikasi *semi Nested* RT-PCR *Pre heat*  $94^{\circ}\text{C}$  2 menit selama 1 siklus, *Denaturasi*  $94^{\circ}\text{C}$  30 detik, *Annealing*  $58^{\circ}\text{C}$  30 detik, *Extension*  $72^{\circ}\text{C}$  30 detik selama 30 siklus, selanjutnya *Final Extension*  $72^{\circ}\text{C}$  5 menit selama 1 siklus dan *Hold*  $4^{\circ}\text{C}$  dan amplicon 135 bp.

## 2.5 Elektroforesis

### 2.5.1 Pencampuran DNA

Pencampuran DNA berlangsung didalam gel yang direndam pada larutan buffer. Media agarose yang telah dibuat dimasukkan ke dalam cetakan elektroforesis. Selanjutnya, menuangkan larutan TAE buffer 1x kedalam alat electrophoresis sebatas *fill line* hingga agarose terendam seluruhnya. Dimasukan produk PCR hasil amplifikasi sebanyak masing masing 5  $\mu$ l (marker, kontrol (+) dan kontrol (-) serta sampel) Lalu menutup alat electrophoresis hingga rapat. *Gel box* dihubungkan dengan *power suplay* sebelum digunakan. Alat electrophoresis dinyalakan dengan elektroda yang digunakan 100–150 *volt* selama 30 menit, *Electrophoresis* dihentikan ketika proses *running* memperlihatkan warna biru gelap telah mencapai  $\frac{1}{2}$  sampai  $\frac{2}{3}$ , dari gel sesuai dengan penelitian dari Suprpto dan Yulia [7].

### 2.5.2 Dokumentasi Produk PCR

Sampel (cetakan agarosa) yang telah direndam TAE 1x dimasukkan dan dicuci *aquades*, kemudian sampel (cetakan agarose) diatur posisinya. Pintu alat *Geldoc* ditutup, lalu tombol *off* lampu ruang *Geldoc* ditekan dan

lampu *Ultra Violet* (UV) yang terletak pada bagian bawah pintu alat *Geldoc* dinyalakan. Prosedur ini telah sesuai dengan SOP BKIPM [2].

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1 Morfologi Sampel

Udang vaname yang digunakan dalam kajian ini termasuk ke dalam kategori udang vaname yang sehat (Gambar 2). Hal ini ditandai dengan tidak terdapat adanya perubahan warna pada kepala serta insang udang tersebut. Sedangkan gejala klinis yang dapat diketahui apabila udang sudah terinfeksi YHV bisa terlihat (Gambar 3) dengan gejala terlihat warna keseluruhan tubuh memutih dan perubahan warna pada *hepatopankreas* menjadi kuning yang normalnya berwarna coklat berdasarkan OIE [6]. Sebelumnya udang vaname tersebut telah dilakukan preparasi dengan terlebih dahulu diukur panjang sampel dan ditimbang bobotnya (Gambar 4).



**Gambar 2.** Udang Vaname Normal



**Gambar 3.** Udang Vaname Terinfeksi YHV



**Gambar 4.** Pengukuran Dan Pengambilan Sampel Organ Udang Vaname

Sampel uji merupakan jenis udang vaname budidaya yang berasal dari kiriman pengguna jasa di BKIPM Mataram, sampel dikirim dengan kondisi hidup untuk dilakukan uji pemeriksaan virus YHV, pengujian dilakukan selama kurang waktu dua hari di laboratorium Biologi Molekuler BKIPM Mataram. Secara morfologis, pengukuran data fisik dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil Pengukuran Data Fisik Sampel Udang Vaname

Sampel	Bobot	Panjang	Organ
Udang Vaname	31,43 g	17 cm	Insang

#### 3.2 Hasil Deteksi Molekuler YHV

Proses analisis molekuler YHV pada udang vaname dilakukan melalui beberapa tahap yaitu tahap ekstraksi DNA dan amplifikasi DNA. Bagian yang digunakan dari udang ini adalah bagian insang. Deteksi ini menggunakan metode PCR, dimana metode ini telah banyak digunakan untuk deteksi virus, dan memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi, akurat, dan hasilnya dapat diketahui lebih cepat. Pada proses pengambilan sampel digunakan insang sebagai organ target analisis. Kaki renang menjadi salah satu organ target yang mudah terinfeksi YHV diduga karena metode penyebarannya yang melalui media air yang terkontaminasi oleh virus. Insang mengalami kontak yang intensif dengan air lingkungan hidup dan memiliki peran untuk mensuplai oksigen sehingga menjadi salah satu

target YHV menginfeksi inang, yang diperkuat oleh penelitian yang telah dilakukan oleh Koesharyani et al [8] bahwa insang merupakan organ yang mudah untuk diambil dan digunakan sebagai sampel. Terdapat beberapa tahapan dalam metode deteksi YHV menggunakan metode PCR, meliputi proses ekstraksi RNA, amplifikasi, elektroforesis dan visualisasi.

### 3.2.1 Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA adalah proses rilis dari campuran menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi berhenti ketika konsentrasi senyawa dalam pelarut dan konsentrasi dalam sumur mencapai keseimbangan. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan filtrasi. Penggunaan teknik pemisahan yang unik untuk memisahkan senyawa masing-masing sulit untuk memisahkan ekstrak asli. Oleh karena itu, ekstrak asli harus dipisahkan menjadi bagian silang dengan polaritas dan ukuran molekuler yang sama. [9].

Setelah proses lisis secara mekanik (Gambar.5) dengan menggunakan *micropastle*, dilakukan penambahan senyawa berupa  $\beta$ -*mercaptoethanol* yang digunakan dalam beberapa prosedur isolasi RNA untuk menghilangkan *ribonuklease* yang dilepaskan selama lisis sel. Banyak ikatan disulfida membuat *ribonuklease* enzim yang sangat stabil, jadi *2-mercaptoethanol* digunakan untuk mengurangi ikatan disulfida ini dan mengubah sifat protein secara permanen. Senyawa ini mencegah enzim *ribonuklease* mencerna RNA selama prosedur ekstraksi.

Hal ini didukung dengan pendapat Tan dan Yiap [10] bahwa prinsip metode pemisahan RNA dengan *RNeasy Spin Column*, menyebabkan RNA akan terikat karena adanya afinitas tinggi ikatan antara muatan positif pada membran silikon dioksida dan bubuk polisakarida melawan muatan asam ribonukleat. Kation natrium berperan sebagai kation yang dapat menarik ikatan negatif dari oksigen pada rantai fosfat asam nukleat. Kation natrium akan memecah ikatan hidrogen antara atom hidrogen dalam air dan ion atom oksigen pada silika dibawah kondisi garam tinggi ( $\text{pH} \leq 7$ ).



**Gambar 5.** Proses Lisis Sampel Secara Mekanik

Rantai fosfat akan terhidrolisis pada suasana basa sehingga RNA akan terlepas dari ikatan pada serbuk selulosa ataupun membran silika. Penambahan *etanol absolut* dan sodium asetat pada proses presipitasi menghilangkan polisakarida pada asam nukleat selama proses presipitasi RNA, sedangkan pada *RNeasy Mini Kit* tidak dilakukan presipitasi [11].

Langkah selanjutnya, RNA yang terikat pada matriks kemudian dibersihkan menggunakan Buffer RW1 yang mengandung garam guanidin, serta *etanol*. Buffer RW1 digunakan sebagai buffer pencuci yang secara efisien menghilangkan biomolekul seperti karbohidrat, protein, asam lemak yang tidak terikat secara spesifik pada membran silika. Pada saat yang sama, molekul RNA yang berukuran lebih besar dari 200 basa tetap terikat pada kolom. Selanjutnya dilakukan pencucian kolom dengan buffer RPE yang fungsi utamanya adalah menghilangkan sisa-sisa garam yang masih ada di kolom karena buffer yang digunakan sebelumnya dalam protokol. Terakhir RNA dilepaskan dari matriks dengan penyucian menggunakan *RNAse free water*.

### 3.2.2 Amplifikasi PCR

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah proses sintesis enzimatik yang mengalikan (mengamplifikasi) urutan nukleotida tertentu secara *in vitro* [12]. Pada proses amplifikasi RNA dilakukan proses *reverse transcription PCR* (RT PCR), yang merupakan penyempurnaan dari teknik PCR standar yang dapat digunakan untuk mengamplifikasi mRNA. Langkah pertama adalah

menggunakan RNA-dependent DNA *polymerase* (juga disebut *reverse transcriptase*) untuk mengubah mRNA yang diisolasi menjadi molekul cDNA dalam proses yang disebut *reverse transcription* (RT). Primer yang digunakan untuk sintesis cDNA dapat berupa primer yang tidak spesifik sekuen atau primer yang spesifik sekuen. Primer Oligod T melengkapi ekor poli A dari molekul mRNA dan memungkinkan sintesis cDNA dari molekul mRNA saja [13]. Proses amplifikasi melibatkan beberapa tahap, yaitu *pra-denaturasi*, *denaturasi*, *annealing*, *extension*, *final extension* [14].

Proses amplifikasi *semi nested* RNA bertujuan untuk memperbanyak molekul cDNA yang telah disintesis dari proses *first* RT-PCR sebelumnya agar dapat diamati secara jelas. Proses ini menggunakan *Go Taq Green*, primer *forward* dan *reverse*, templat RNA dan *nuclease free water*. Proses amplifikasi terjadi 30 siklus, hal ini bertujuan untuk menghasilkan berjuta-juta DNA target. *Pre-Denaturasi* yaitu tahap ini merupakan tahap untuk mempersiapkan proses berikutnya, yaitu denaturasi (pemanasan).

Pada *first* dan *nested* RT-PCR suhu yang digunakan 94°C, terdiri dari satu siklus selama 2 menit. *Denaturasi* yaitu tahap pemisahan antara untai satu dengan yang lain sehingga masing-masing menjadi untai tunggal. Pada *first* dan *semi nested* RT-PCR suhu yang dipakai 94°C selama 30 detik. Proses yang tidak sempurna dapat memutuskan rantai DNA dan jika terlalu lama dapat menurunkan efektivitas enzim *polimerase*. *Annealing* yaitu tahap terpenting dimana faktor yang mempengaruhi adalah suhu *annealing* dan primer. Suhu yang terlalu rendah dapat mengakibatkan primer tidak dapat melekat pada untai DNA dengan kurang sempurna. Suhu yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan salah sasaran, atau primer melekat pada urutan basa yang salah. Suhu *melting annealing* primer optimum dapat diukur dengan rumus  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ .

Pada *first* dan *semi nested* RT-PCR digunakan suhu 58°C selama 30 detik. *Extension* adalah proses pemanjangan untai DNA yang telah melekat pada primer. Suhu optimal yang dipakai 72°C, bertujuan untuk mengaktifkan enzim *taq polymerase*. *Final*

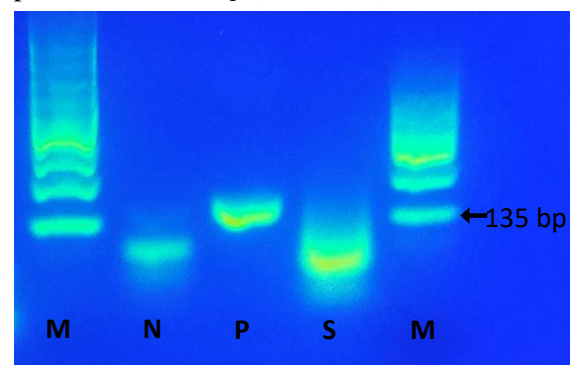
*extension* dilakukan agar proses pemanjangan dengan DNA *polymerase* terjadi secara optimal. *Hold* adalah proses tambahan yang berguna untuk menjaga hasil akhir PCR tetap dalam kondisi baik sehingga digunakan suhu rendah yaitu 4°C.

### 3.2.2 Elektroforesis

Pada tahapan elektroforesis, template sekuen DNA positif YHV digunakan sebagai kontrol positif sedangkan kontrol negatif menggunakan *nuclease free water* tanpa diisi template. *Buffer TAE* memiliki fungsi sebagai penyangga dan media penghantar listrik yang tepat, pewarna *Go Taq Green*, berfungsi sebagai pemberat. DNA *Ladder* ditambahkan pada well (sumuran) gel agar. DNA *Ladder* digunakan sebagai marker.

Thomson and Fritchman [16] Selanjutnya, marker adalah fragmen DNA spesifik dengan ukuran yang diketahui. marker tersebut dapat digunakan sebagai acuan untuk memahami ukuran DNA yang telah diamplifikasi. marker DNA yang terdapat pada situs elektroforesis digunakan sebagai penanda untuk memindahkan posisi pasangan basa molekul DNA.

Berdasarkan hasil deteksi YHV pada udang vaname pada pembacaan gel agarosa dengan UV transilluminator, tidak ditemukan sampel udang vaname yang positif YHV karena tidak terlihat pita DNA (*band*) pada ukuran 135 bp yang berarti bahwa sampel tersebut negatif YHV. Sedangkan, hasil positif apabila terlihat garis perpendaran pita DNA pada ukuran 135 bp (Gambar 6).



**Gambar 6.** Hasil Pembacaan Gel Agarosa Dengan UV Transilluminator Keterangan: M (Marker); P (Kontrol Positif); N (Kontrol Negatif); S (Sampel Udang Vaname)



Hasil pengamatan pengujian ini didasari pada prosedur OIE [6], hasil negatif juga menunjukkan bahwa sampel tidak terinfeksi YHV atau tingkat infeksi YHV lebih rendah dari batas deteksi. Selain itu berdasarkan hasil elektroforesis yang didapat, ketebalan dari band berkorelasi positif dengan konsentrasi DNA sampel. Sehingga semakin tinggi konsentrasi DNA maka semakin tebal band yang terbentuk. Berdasarkan data dapat diketahui bahwa sampel memiliki konsentrasi DNA yang tinggi, dan proses amplifikasi berjalan dengan baik.

Akan tetapi pada kontrol negatif, *band* yang terbentuk menunjukkan hasil yang kurang baik ditunjukkan dengan adanya band yang samar atau smear. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya pengotor atau materi selain DNA yang ikut terisolasi ataupun penggunaan *voltase* yang terlalu tinggi. Hal ini didukung oleh pendapat Budiarto [17], adanya kontaminasi yang berasal dari pengotor yang berasal dari substansi biologi dapat berupa jasad renik (seperti jamur bakteri atau kapang) atau biomolekul konstituen dari suatu organisme seperti asam nukleat (DNA atau RNA), protein, lipida, karbohidrat atau hormon atau produk limbah dari metabolisme organisme atau sel seperti amonia, asam urat, asam karboksilat, asam humat akibat dari proses purifikasi atau sterilisasi yang kurang optimal dan terbawa dan mengkontaminasi lingkungan yang seharusnya tidak dikehendaki.

#### 4. KESIMPULAN

Tahapan dalam deteksi YHV menggunakan metode PCR dimulai dari ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis hingga visualisasi-pembacaan hasil. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa tidak ditemukan sampel udang vaname yang positif YHV karena tidak terdapat *band* DNA pada ukuran 135 bp.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu Dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Mataram sebagai mitra PKL, Dosen pembimbing PKL dan Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta.

#### REFERENSI

- [1] Aristiyani R. Analisis Daya Saing Udang Indonesia Di Pasar Internasional. Universitas Bandar Lampung; 2017.
- [2] Balai Karantina Ikan. Laporan Pemantauan Penyakit Ikan KarantinaTahun 2018. Makassar. 2018.
- [3] Arafani L, Ghazali M, Ali M. Pelacakan Virus Bercak Putih Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Di Lombok Dengan *Real-Time Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Veteriner*. 2016; 17(1): 88-95.
- [4] Thai Agricultural Standard. Diagnosis of *Yellow Head Disease* In Shrimp. Thailand: National Bureau Of Agricultural Commodity And Food Standards Ministry Of Agriculture And Cooperatives. 2009.
- [5] Kurniawati MD, Sumaryam, Nurul H. Aplikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Konvensional Dan *Real Time-PCR* Untuk Deteksi Virus VNN (*Viral Nervous Necrosis*) Pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Jurnal TECHNO-FISH*. 2019; 3(1): 19-30.
- [6] OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 2021. [cited 2021 Apr 21]. Available from: <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-manual-online-access/>
- [7] Suprpto H, Yulia, K. Pemantauan Virus Dengan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Di Pantai Utara Jawa Timur. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 2019; 4(1): 65-71.
- [8] Koesharyani I, Lila G, Hambali S. Multi Infeksi Pada Udang *Litopenaeus Vannamei*: Diagnosis Dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Dan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). *Jurnal Riset Akuakultur*. 2012; 7(1): 73-84.
- [9] Tetti M. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. 2014; 7(2): 361-367.
- [10] Tan SC, Beow, CY. DNA, RNA and Protein Extraction: The Past And The Present. *Journal of Biomedicine And Biotechnology*. 2009; 1-10.





- [11] Endarsih W, Sedyo H, Sri S. Perbaikan Metode Ekstraksi dsRNA Virus secara Sederhana untuk RT-PCR Tiga Virus Tumbuhan. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 2017;21(2):106-113.
- [12] Hasibuan E. Peranan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Terhadap Perkembangan Ilmu Pengetahuan. Universitas Sumatera Utara; 2015.
- [13] Nikiforova MN, Nikiforov YE. *Molecular Anatomic Pathology Diagnostic Immuno histochemistry*. Third Edition). Nature; 2011.
- [14] Handoyo D, Ari R. Prinsip Umum Dan Pelaksanaan *Polymerase ChainReaction* (PCR). *Unitas*. 2000; 9(1): 17-29.
- [15] Walker PJ, Sittidilokratna N. *Yellow Head Virus*. Elsevier Ltd. 2008: 476-483.
- [16] Thomson R, Fritchman B. *Illustrated Guide To Home Biology Experiments: All Lab, No Lecture*. California, O'Reilly. 2012. Media Inc: 1-358.
- [17] Budiarto BR. Bio Kontaminan Penyebab Tidak Tegaknya Diagnosis Molekuler Berbasis Amplifikasi Asam Nukleat. *BioTrends*. 2017; 8(1): 27-33.