

MIPA

LAPORAN PENELITIAN UNGGULAN STRATEGIS NASIONAL



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

STUDI MOLEKULER SEQUENCE DNA MITOKONDRIA
UDANG PUTIH (*Penaeus vannamei*) DI JAWA;
SEBAGAI USAHA MENCARI BIBIT UNGGUL UDANG

Oleh:

Prof. Win Darmanto, M.Si., Ph.D

Yuni Kilawati.S.Pi.,M.Si

UNIVERSITAS AIRLANGGA

OKTOBER 2009

MIPA

LAPORAN PENELITIAN UNGGULAN STRATEGIS NASIONAL



klc
klcc
UP.47/10
Dar
S

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

STUDI MOLEKULER SEQUENCE DNA MITOKONDRIA
UDANG PUTIH (*Penaeus vannamei*) DI JAWA;
SEBAGAI USAHA MENCARI BIBIT UNGGUL UDANG

Oleh:

Prof. Win Darmanto, M.Si., Ph.D

Yuni Kilawati.S.Pi.,M.Si

UNIVERSITAS AIRLANGGA

OKTOBER 2009

RINGKASAN DAN SUMMARY

Tujuan jangka panjang dari penelitian ini adalah mendukung kebijakan pemerintah untuk mengurangi import dan meningkatkan ekspor non migas dengan menampilkan udang putih (*Penaeus vannamei*) pada pemeliharaan tambak di Jawa yang tahan terhadap penyakit sehingga bisa direkomendasikan menjadi bibit unggul dengan kualitas yang tidak kalah dengan produk import. Target khusus yang ingin dicapai adalah menganalisis karakteristik genetic dari DNA mitokondria melalui metode PCR-RFLP (Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polimorphism) dan menganalisis sequeunce DNA mitokondria udang putih (*Penaeus vannamei*) tahan penyakit pada pemeliharaan di lingkungan dengan tingkat salinitas yang berbeda. Latar belakang dari penelitian ini adalah apakah ada perbedaan sequence DNA mitokondria udang putih (*Penaeus vannamei*) yang dipelihara pada lingkungan dengan tingkat salinitas berbeda yang diinfeksi dengan penyakit.

Metode yang digunakan adalah eksperimental. Sepuluh ekor pascalarva udang putih (*Penaeus vannamei*) sehat yang telah dipelihara dengan salinitas A) 0-5 ppt B) 20-25 ppt dan C) 40-45 ppt ditantang dengan virus WSSV melalui perendaman dengan dosis 1 ml/10 liter air laut dengan 3 kali ulangan. Setelah 7 hari masa pemeliharaan dilakukan penghitungan survival rate sampel udang, kemudian masing-masing diuji keberhasilan infeksi dengan menggunakan primer spesifik ICP11 dan diamati karakteristik DNA mitokondria untuk mengetahui genotipnya. Selanjutnya dilakukan sequencing untuk masing-masing udang tersebut.

Kata Kunci: Studi molekuler; DNA mitokondria; Udang putih (*Penaeus vannamei*); sequencing

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

1. Judul Penelitian : STUDI MOLEKULER SEQUENCE DNA MITOKONDRIA UDANG PUTIH (*Penaeus vannamei*) DI JAWA; SEBAGAI USAHA MENCARI BIBIT UNGGUL UDANG

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Prof. Win Darmanto, M.Si., Ph.D
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. NIP. : 131 653 741
- d. Jabatan Fungsional : Guru Besar
- e. Jabatan Struktural : Wakil Dekan I FSAINTEK
- f. Bidang Keahlian : Biologi Molekuler dan Teratologi
- g. Fakultas/Jurusan : F. Sains dan teknologi/ Biologi
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
- i. Tim Peneliti

NO.	Nama	Bidang Keahlian	Fak/Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Yuni Kilawati, S.Pi., M.Si	Fish molecular	Perikanan/ MSP	Univ. Brawijaya

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
- b. Biaya total yang diusulkan : Rp. 100.000.000,-
- c. Biaya yang disetujui tahun 1 : Rp. 60.000.000,-

Surabaya, 30 Oktober 2009

Mengetahui,
Dekan
Fakultas Sain dan Teknologi

Ketua Peneliti.

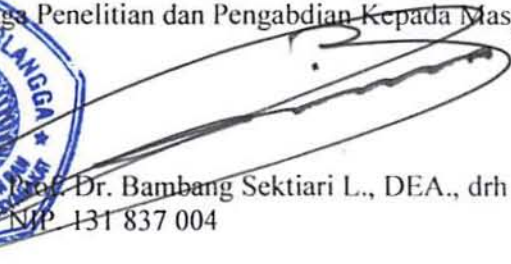


Drs. Salamum, M.Kes
NIP. 131 696 506



Prof. Win Darmanto, M.Si., Ph.D
NIP. 131 653 741

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat



Dr. Bambang Sektiari L., DEA., drh
NIP. 131 837 004

ABSTRACT

Long-range target of this research is to support policy of government to lessen import and improve export of non migas presented characteristic of genetic of white prawn mains (*Penaeus Vannamei*) so that this product can be yielded in Indonesia with high quality which do not fail with import product. Special goals wishing to be reached at this research is to analyze the genetic characteristic mitochondria DNA with PCR-RFLP (Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polimorphism) and health white prawn mitochondria DNA squencing that cultured in different salinity. The background of this research was difference among white prawn mitochondria DNA sequence that cultured in different salinity and infected by viruses.

With experimental methods ten healthy post larva of white prawn cultured in : A) 0-5 ppt B) 20-25 ppt C) 40-45 ppt and invected by WSSV virus in 1ml/10 l marine water dossage with three time replication. After 7 days in culture: survival rate white shrimp were count. To know these infection, the sample were analyze with specific primer ICP11 and mitochondria DNA and than squencing procces.

Keyword: *White Spot Syndrom Virus* (WSSV), mitochondria DNA, white shrimp (*Penaeus vannamei*), PCR-RFLP

PRAKATA

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah swt, atas limpahan rahmat dan hidayahnya, sehingga tim peneliti mampu menyelesaikan serangkaian kegiatan dalam rangka Penelitian Strategi Nasional dengan judul : **STUDI MOLEKULER SEQUENCE DNA MITOKONDRIA UDANG PUTIH (*Penaeus vannamei*) DI JAWA; SEBAGAI USAHA Mencari Bibit Unggul Udang**

Penelitian ini dibiayai melalui Hibah Penelitian Unggulan Strategis Nasional tahun Anggaran 2009 Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional.

Penelitian ini bertujuan mendukung kebijakan pemerintah untuk mengurangi import dan meningkatkan eksport non migas dengan mencari strain udang putih (*Penaeus vannamei*) yang tahan terhadap penyakit sehingga bisa direkomendasikan menjadi bibit unggul dengan kualitas yang tidak kalah dengan produk import.

· Pada kegiatan ini peneliti menyadari adanya keterbatasan dan kekurangan oleh sebab itu kritik, saran atau penelitian lanjutan yang bertujuan melengkapi hasil penelitian ini agar lebih sempurna dan bermanfaat bagi ilmu pengetahuan sangat kami harapkan.

Akhirnya kami mengucapkan banyak terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu agar penelitian ini terselesaikan dengan baik.

Surabaya, Oktober 2009

DAFTAR ISI

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
ABSTRACT.....	iv
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	2
BAB II . TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1. Udang Putih (<i>Penaeus vanamei</i>).....	3
2.2. Penyakit WSSV (White Spot Sindrome Virus).....	4
2.3. Salinitas.....	6
2.4. Keragaman Genetik.....	7
2.5. Tinjauan tentang Mitokondria DNA (mt-DNA).....	7
2.6. Tinjauan tentang Diversitas Genetik.....	9
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	11
3.1. Tujuan Khusus.....	11
3.2. Manfaat Penelitian.....	11
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	12
4.1. Ruang Lingkup Penelitian.....	12
4.2. Tahapan Penelitian.....	12
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	19
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	31
DAFTAR PUSTAKA.....	32

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1.	Site restriksi yang dimiliki enzim restriksi yang digunakan pada penelitian.....	21
Tabel 2.	Jumlah genotif teramati (observed), nilai harapan (expected) Hardy Weinberg dan Frekuensi Alel pada lokus polimorfik <i>P.vannamei</i> (Nla III) menggunakan RFLP.....	22
Tabel 3.	Variasi genetik <i>P monodon</i> dan <i>P vannamei</i> berdasarkan hasil RFLP	23
Tabel 4.	Analisa populasi <i>P vannamei</i> (Nla III) berdasarkan hasil RFLP	23
Tabel 5.	Hasil pemotongan DNA <i>P monodon</i> dan <i>P vannamei</i> dengan enzim restriksi	23

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Hasil amplifikasi PCR dengan primer spesifik ICP11	20
Gambar 2. Hasil RFLP pada <i>P. Vannamae</i> menggunakan enzyme <i>Nla III</i>	22
Gambar 3. Distribusi negatif charge dari ICP11 yang menyerupai bentuk B DNA helix.....	26
Gambar 4. ICP11 yang terletak pada histone H3 dan histone H2A.x in vivo.	28

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Data kualitas media	34
Lampiran 2. Data kematian udang yang telah diinfeksi WSSV	43
Lampiran 3. Sequence asal Primer ICP11 diambil dari NCBI (Reference Sequence: NC_003225.1)	45
Lampiran 4. Hasil RFLP pada P. Vannamei.....	46
Lampiran 5. Skoring hasil RFLP	47
Lampiran 6. Perhitungan frekuensi alel, genotif harapan dan uji chi Square	48
Lampiran 7. Analisis data variasi genetik P. Vannamei berdasarkan hasil RFLP.....	49

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang putih (*Penaeus vannamei*) adalah salah satu produk unggulan komoditi perikanan yang memiliki nilai gizi yang tinggi dan banyak disukai oleh konsumen baik dari dalam maupun luar negeri. Kandungan gizi yang terkandung pada udang segar dalam 100 gram berat adalah : Protein 21 g, Lemak 0.2 g, Karbohidrat 0.1g, Kalsium 136 mg dan Besi 8.0 mg (Andryan,2008).

Di dalam budidaya udang putih (*Penaeus vannamei*), masih sering dijumpai kematian massal yang penyebab utamanya adalah virus. Salah satu penyakit yang disebabkan virus yang menyerang udang vannamei adalah *White Spot Syndrom Virus* (WSSV) atau biasa disebut bintik putih (*white spot*). Menurut Haliman dan Adijaya (2005), penyakit WSSV banyak menyerang udang vannamei, dengan gejala klinis yang muncul berupa bintik-bintik putih pada bagian karapas. Udang yang telah diserang, tidak efektif dilakukan pengobatan, karena waktu penularan yang relatif sangat singkat yaitu membutuhkan waktu 1 sampai 2 hari. Sumber lain mengatakan, hingga saat ini belum ditemukan jenis obat yang efektif untuk mengobati penyakit WSSV secara tuntas, sehingga petambak hanya bisa melakukan tindakan pencegahan dan penanggulangan dengan menerapkan kaidah pemeliharaan yang baik serta pemilihan benur dan pemberian pakan yang bermutu tinggi, di samping memperbaiki mutu lingkungan (Amri, 2006).

Berdasarkan hasil survey yang dilakukan pada bulan Agustus 2008, ditemukan beberapa tambak udang vanamei di Jawa yang memiliki salinitas ekstrim (± 5 ppt dan ± 40 ppt). Seperti disebutkan oleh Haliman dan Adijaya, 2006, pada salinitas tinggi pertumbuhan udang menjadi lambat karena proses osmoregulasi terganggu. Osmoregulasi merupakan proses pengaturan penyeimbang tekanan osmosis antara di dalam dan di luar tubuh udang. Apabila salinitas meningkat maka pertumbuhan udang akan melambat karena energi lebih banyak terserap untuk proses osmoregulasi dibandingkan pertumbuhan. Sebaliknya pada media dengan salinitas rendah biasanya udang memiliki karapas yang relative kurang keras dibandingkan udang yang

dipelihara pada kisaran salinitas normal. Keberhasilan molting juga berpengaruh langsung terhadap kerentanan udang pada serangan penyakit. Oleh sebab itu hubungan antara salinitas lingkungan pemeliharaan dengan ketahanan udang terhadap penyakit sangatlah erat. Kemampuan udang yang hidup pada salinitas ekstrim tersebut menimbulkan dugaan bahwa populasi ini menyimpan ketahanan terhadap penyakit. Untuk itu diperlukan penelitian agar diperoleh informasi tentang karakteristik udang putih (*Penaeus vannamei*) tahan penyakit WSSV dalam upaya untuk mencari bibit unggul.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Udang putih (*Penaeus vannamei*)

Udang penaeid merupakan anggota phylum terbesar dari Artropoda, yang dicirikan dengan adanya anggota badan yang sepasang dan kutikula (eksoskeleton) yang menutupi seluruh tubuhnya. Sub phylum Crustacea meliputi 42.000 spesies aquatic dengan anggota 10 class (Brusca and Brusca, 1990). Klasifikasi *Penaeus vannamei* adalah:

Phylum	: Arthropoda
Sub Phylum	: Crustacea
Class	: Malacostraca
Sub Class	: Denrobranchiata
Ordo	: Decapoda
Famili	: Penaeidae
Genus	: Litopenaeus
Species	: Litopenaeus vannamei Atau Penaeus vannamei

Penaeus vannamei, adalah species udang yang banyak mendominasi perairan Ekuador. Sedangkan asal-usul udang tersebut adalah dari negara Nikaragua Amerika Selatan (Kompas, 2002). Pada awalnya udang tersebut mempunyai *old name* *P. vannamei* akan tetapi pada tahun 1997, Dr. Isabel Perez Forfante dan Dr. Brian Kensley memberikan nama baru yaitu *L. vannamei* mempunyai ukuran yang lebih kecil daripada udang windu, dengan kelebihan yaitu daya tahan tubuhnya yang relatif tinggi, lebih mudah dibudidayakan dan daya kelangsungan hidup bisa mencapai rata-rata 85 % dibandingkan dengan udang windu yang hanya rata-rata 50 %. Hal ini yang membuat budidaya semakin luas keluar dari negara aslinya, bahkan ke negara China, taiwan, Malaysia dan Thailand. Udang putih Amerika *L. vannamei* merupakan salah satu pilihan jenis udang yang dapat dibudidayakan di Indonesia.

Tubuh udang diselubungi karapas keras maka dalam pertumbuhannya selalu ganti karapas dan membentuk yang baru dengan ukuran lebih besar untuk memberi ruang bagi penambahan volume tubuhnya. Proses ini sering disebut dengan

moulting. Pada awalnya karapas lunak, tetapi mengeras dengan kecepatan yang proporsional dengan ukuran udang. Udang kecil mengeras hanya beberapa jam, tetapi udang yang besar dapat membutuhkan waktu satu atau dua hari. Laju pertumbuhan udang menurut Wyban and Sweeney (1991), seperti pada arthropoda secara umum tergantung dua factor yaitu frekuensi moulting (waktu antara moulting) dan kenaikan pertumbuhan (seberapa banyak pertumbuhan udang pada setiap moulting berikutnya. Frekuensi moulting terkait dengan ukuran udang. Pada stadium

larva, moulting terjadi setiap 30-40 jam (suhu 28°C). Juvenil dengan ukuran 1-5

gram dapat moulting setiap 4-6 hari, tetapi pada juvenile ukuran 15 gram interval moulting setiap 2 minggu. Kondisi lingkungan dan factor nutrisi akan berdampak pada frekuensi moulting. Salah satunya adalah pengaruh salinitas, hal ini berhubungan dengan ketersediaan kalsium dalam media yang dimanfaatkan sebagai bahan penyusun karapas bagi udang.

2.2 Penyakit WSSV (*White Spot Syndrome Virus*)

Penyakit merupakan salah satu faktor penting yang dapat menyebabkan kegagalan usaha budidaya perikanan. Beberapa jenis penyakit yang menyerang udang disebabkan oleh parasit, bakteri, jamur dan virus. Parasit mudah menyerang udang bila kualitas air kurang baik, terutama pada kondisi kandungan bahan organik yang tinggi. Parasit akan menempel pada insang, kaki renang, dan kaki jalan. Pada kondisi yang lebih parah, parasit bisa menempel pada permukaan tubuh udang. Parasit akan terlepas dari tubuh udang bila udang tersebut mengalami ganti kulit (*moulting*).

Penyakit akibat bakteri yang perlu diwaspadai pada budidaya udang yaitu bakteri vibrio yang menyebabkan penyakit vibriosis. Gejala klinis yang bisa dilihat pada penyakit vibriosis yaitu, nafsu makan udang turun dan timbul warna merah pada tubuh udang.

Penyebab penyakit yang lain adalah jamur atau cendawan. Infeksi cendawan lebih sering menyerang tubuh udang bagian luar, seperti karapas dan insang bagian

dalam. Umumnya, cendawan menyerang sebagai infeksi sekunder dari serangan utama oleh bakteri atau virus .

Salah satu agen penyakit yang paling berbahaya adalah virus karena penularan virus sangat cepat dan dapat mengakibatkan kematian massal bagi ikan maupun udang. Virus resisten terhadap senyawa bahan kimia tertentu atau antibiotik karena partikel virus di dalam sel tubuh dilindungi oleh koagulasi protein plasma dan protein sel (Putri, 2006). Virus merupakan parasit obligate intraselluler, ukuran sangat kecil bergaris tegah kira-kira 10-20 mikrometer dan panjang 20-400 mikrometer (Yanuhar, 2006).

Beberapa penyakit udang yang disebabkan oleh virus adalah *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV), *Taura Syndrome Virus* (TSV) dan *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) (Haliman dan Dian, 2005).

Virus penyebab penyakit pada udang vanamei adalah baculo virus (BP), Monodon Baculo Virus (MBV), White Spot Syndrome Virus (WSSV), Baculovirus Midgut Glant Necrosis (BMN), Infectious Hypodermal dan hematopoietic necrosis Virus (IHHNV), Hepatopancreatic Parvo Like Virus (HPV) dan Hepatopancreic Reo Like Virus (HBVERO). Monodon Baculovirus (MBV) dan (Amri, 2006).

WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) biasa disebut dengan bintik putih (white spot), penyakit ini pertama kali menyerang udang budidaya di Shanghai Cina tahun 1993 (Kordi, 2006). Penyakit ini dapat menyerang udang windu maupun udang vanamei, gejala klinis yang muncul berupa bintik-bintik putih pada bagian carapas (Haliman dan Adijaya, 2006). Penyakit ini dapat mengakibatkan kematian massal waktu kematian sangat cepat umumnya antara 2-3 hari. Tanda-tanda WSSV apabila bagian kepala terlihat adanya bercak putih. Udang yang terinfeksi virus biasanya berenang kepinggir kemudian mati. Kematian udang terjadi secara drastis, dimulai dari beberapa udang pada hari pertama dan meningkat hingga terjadi kematian massal. Udang yang mati terlihat sekujur tubuhnya dipenuhi bercak putih (Taslihan et.al, 2005).

Menurut Lightner (1996), bahwa WSSV disebabkan oleh virus SEMBV yang tergolong virus berbahan genetik DNA (Dioxyribonucleic Acid) berbentuk batang (Bacilliform) Secara morfologi, ukuran, patologi selular dan asam nukleat, WSSV (Pm NoBII-Type) dikelompokkan pada Non-occluded Baculovirus, subfamili Nudibaculoviridae dan famili Baculoviridae (Mahardika et al., 2004). Kemudian virus ini mempunyai virion yang berupa partikel berbentuk batang dengan ukuran

305 30 x 127 11 nm, dan dalam nukleusnya terdapat satu nukle-osom yang akan bergabung awal replikasi (Wang *et al.*, 1997).

Penyakit ini ditandai adanya bintik putih pada bagian carapace dan dapat menimbulkan kematian massal dalam beberapa hari setelah gejala pertama muncul. Penyakit ini muncul terutama pada umur 2 bulan pemeliharaan di tambak. Munculnya penyakit bintik putih dipicu oleh banyak faktor : kondisi stress akibat lingkungan yang kurang memungkinkan serta kondisi tubuh udang yang melemah, dapat memicu munculnya penyakit terutama bila pathogen WSSV masuk ke dalam system budidaya melalui berbagai cara yaitu melalui bibit, air, udara, serta karier pathogen, atau bisa juga berasal dari induk udang (Ansharyet *al.*, 2004).

2.3 Salinitas

Salinitas merupakan salah satu aspek kualitas air yang memegang peranan penting karena mempengaruhi pertumbuhan udang (Haliman dan Adijaya, 2006). Kadar garam (salinitas) menggambarkan kandungan garam-garam yang terlarut dalam air yang membedakan jenis menjadi air tawar, payau, laut. Salinitas air yang mempunyai pengaruh langsung terhadap tekanan osmotik air semakin tinggi salinitas maka akan semakin besar pula tekanan osmotiknya (Sutaman, 1994). Pengukuran salinitas dilakukan dengan alat salinometer (Murtidjo, 1991). Salinitas yang cocok bagi kehidupan dan pertumbuhan udang vanamei adalah antara 15-30 promil (Taslihan *et al.*.,2005).

Pada salinitas tinggi pertumbuhan udang menjadi lambat karena proses osmoregulasi terganggu. Osmoregulasi merupakan proses pengaturan penyeimbang tekanan osmosis antara di dalam dan di luar tubuh udang. Apabila salinitas meningkat maka pertumbuhan udang akan melambat karena energi lebih banyak terserap untuk proses osmoregulasi dibandingkan pertumbuhan (Haliman dan Adijaya, 2006).

Pada media dengan salinitas rendah biasanya udang memiliki karapas yang relative kurang keras dibandingkan udang yang dipelihara pada kisaran salinitas normal. Keberhasilan molting juga berpengaruh langsung terhadap kerentanan udang pada serangan penyakit. Oleh sebab itu hubungan antara salinitas lingkungan pemeliharaan dengan ketahanan udang terhadap penyakit sangatlah erat.

2.4 Keragaman Genetik

Pendekatan bioteknologi molekuler melalui kajian-kajian biodiversitas genetik dengan menggunakan metode-metode bio-molekuler seperti teknologi isozime, teknologi sidik jari DNA untuk pemetaan gen seperti *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Goodier and Davidson, 1993), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Sukoso *et al.*, 2001) yang melibatkan teknologi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan kloning akan mampu memetakan kualitas keragaman genetik suatu organisme sehingga mampu dijadikan sebagai landasan *breeding* untuk menghasilkan benih yang unggul.

Keragaman genetik (genotip) dan keragaman fisik (fenotip) dapat berbeda bagi turunan induk yang secara geografis berbeda (Taniguchi *et al.*, 1996). Keragaman spesies banyak disebabkan oleh faktor lingkungan yang mempengaruhi timbulnya ciri-ciri yang muncul sebagai fenotip. Terkadang fenotip yang nampak sebagai ciri morfologi dapat berubah selama organisme itu hidup, dimana perubahan mungkin dapat terjadi selama proses perkembangan yang merupakan respon terhadap perubahan lingkungan (Sofro, 1994). Perubahan genotip dan fenotip yang disebabkan oleh perbedaan lingkungan ini juga akan menyebabkan perbedaan respon atau daya tahan terhadap penyakit tertentu.

Pengamatan keragaman genetik dapat dilakukan secara molekuler. Pengamatan keragaman secara morfologi sering mendapatkan hasil yang tidak konsisten karena keragamannya ditentukan selain pengaruh genetik juga dipengaruhi oleh lingkungan. Menurut Purdom (1993) *cit.* Prijono (2000), pengamatan keragaman genetik dengan elektroforesis telah digunakan sebagai marker genetik biokimia dalam biologi perikanan dan akuakultur, seperti pendugaan tingkat keragaman sebuah populasi, identifikasi dari struktur genetik dari populasi di alam, monitoring perubahan genetik spesies dari panti pembenihan, penanda genetik dari seleksi induk ikan.

2.5 Tinjauan tentang Mitokondria DNA (mt-DNA)

Mitokondria memiliki materi genetik sendiri yang karakteristiknya berbeda dengan materi genetik di nukleus. Mt-DNA sesuai dengan namanya, merupakan rantai DNA yang terletak di bagian sel yang bernama mitokondria. Mt-DNA memiliki ciri-ciri yang berbeda dari DNA nukleus ditinjau dari ukuran, jumlah gen, dan bentuknya. Dia memiliki laju mutasi yang lebih tinggi, yaitu sekitar 10-17 kali DNA inti (Wallace *et al.*, 1997). Mt-DNA terdapat dalam jumlah banyak (lebih dari

1000 kopi) dalam tiap sel, sedangkan DNA nukleus hanya berjumlah dua kopi. DNA nukleus merupakan hasil rekombinasi DNA kedua orang tua sementara mt-DNA hanya diwariskan dari ibu.

Besar genom pada mt-DNA relatif kecil apabila dibandingkan dengan genom DNA pada nukleus. Ukuran genom mt-DNA pada tiap-tiap organisme sangatlah bervariasi. Pada manusia ukuran mt-DNA adalah 16,6 kb, sedangkan pada *Drosophila melanogaster* kurang lebih 18,4 kb. Pada khamir, ukuran genom relatif lebih besar yaitu 84 kb.

Mt-DNA tidak memiliki intron dan semua gen pengode terletak berdampingan (Anderson *et al.*, 1981, Wallace *et al.*, 1992, Zeviani *et al.*, 1998).

Daerah yang tidak mengode dari mt-DNA berukuran 1122 bp, dimulai dari nukleotida 16024 hingga 576 dan terletak diantara gen tRNA_{pro} dan tRNA_{phe}. Daerah ini mengandung daerah yang memiliki variasi tinggi yang disebut displacement loop (D-loop). D-loop merupakan daerah beruntai tiga (triple stranded) untai ketiga lebih dikenal sebagai 7S DNA. D-loop memiliki dua daerah dengan laju polymorphism yang tinggi sehingga urutannya sangat bervariasi antar individu, yaitu Hypervariable I (HVS I) dan Hypervariable II (HVS II). Daerah kontrol memiliki tingkat mutasi dan polymorphism yang paling tinggi di dalam genom mt-DNA, HVS I pada urutan nukleotida 16024-16383 dan HVS II yang terletak pada nukleotida 57-372. Dua daerah ini memiliki laju mutasi yang lebih tinggi dari daerah pengode (Howell *et al.*, 1996).

Daerah non-coding juga mengandung daerah pengontrol karena mempunyai origin of replication untuk untai H (OH) dan promoter transkripsi untuk untai H dan L (PL dan PH). Selain itu, daerah non-coding juga mengandung tiga daerah lestari yang disebut dengan conserved sequence block (CSB) I, II, III. Daerah yang lestari ini diduga memiliki peranan penting dalam replikasi mt-DNA (Anderson *et al.*, 1981). Oleh karena sifatnya yang polimorfik, daerah ini sangat beragam antar individu tetapi sama untuk kerabat yang satu garis keturunan ibu.

Laju mutasi sejauh ini diketahui 1:33 generasi, jadi perubahan urutan nukleotida hanya akan terjadi setiap 33 generasi (Hall, 1998). Oleh karena itu, daerah ini sering dianalisis dan sangat penting untuk digunakan dalam proses identifikasi individu.

2.6 Tinjauan tentang Diversitas Genetik

Diversitas genetik terdapat dalam empat level organisasi: di antara spesies, di antara populasi, di dalam populasi dan di dalam individu. Diversitas di antara spesies adalah perbedaan di antara spesies, ini seringkali mudah diamati tanpa mengetahui komposisi gennya. Diversitas genetik di antara populasi dari suatu spesies juga sering sangat besar. Di dunia perikanan misalnya ada berbagai macam komoditi (udang, ikan), meskipun ini hasil rekayasa genetik. Dalam populasi kebanyakan populasi alami, perbedaan genetik di antara individu sering juga besar. Akhirnya diversitas genetik terdapat di dalam suatu individu bilamana ada dua alel untuk gen yang sama (perbedaan konfigurasi DNA yang menduduki lokus yang sama pada suatu khromosom). Bersarnya diversitas di dalam suatu spesies tergantung pada jumlah individu, kisaran penyebaran geografinya, tingkat isolasi dari populasi dan sistem genetiknya. Peran penting juga dilakukan oleh proses-proses seleksi alami dan antropogenik, serta juga faktor-faktor yang berpengaruh pada perubahan spasial dan temporal pada komposisi genetik dari spesies atau populasi.

Diversitas genetik penting bagi kemampuan spesies dan populasi beradaptasi terhadap perubahan kondisi lingkungan dan karena itu merupakan persyaratan bagi kelangsungan hidupnya.

Pada spesies yang berkembang biak secara seksual, setiap populasi lokal mengandung kombinasi gen tertentu. Jadi, suatu spesies merupakan kumpulan populasi yang berbeda secara genetik satu sama lain. Perbedaan genetik ini diwujudkan sebagai perbedaan di antara populasi dalam sifat morfologi, fisiologi, kelakuan, dan sejarah hidup (*life history*). Dengan kata lain, sifat-sifat genetik (genotipe) mempengaruhi sifat-sifat yang diekspresikan (fenotipe).

Seleksi alami pada awalnya bekerja pada level fenotipik, memihak kepada atau tidak menguntungkan untuk sifat-sifat yang diekspresikan (fenotipe). Lukang gen (*gene pool*) – agregat total gen pada suatu populasi pada suatu waktu, akan berubah ketika organisme dengan fenotipe yang kompatibel dengan lingkungan akan lebih mampu bertahan hidup dalam jangka lama dan akan berkembang biak lebih banyak dan meneruskan gen-gennya lebih banyak pula ke generasi berikutnya.

Besarnya diversitas genetik dalam populasi lokal sangat bervariasi. Banyak kegiatan konservasi peduli dengan penjagaan diversitas genetik tumbuhan atau hewan. Populasi kecil yang berbiak secara aseksual dan terisolasi, sering memiliki diversitas genetik yang kecil di antara individu, sedangkan pada populasi besar dan

berbiak secara seksual sering memiliki variasi yang besar. Dua faktor utama yang bertanggung jawab adanya variasi ini, yaitu cara bereproduksi (seksual atau aseksual) dan ukuran populasi.

Pendekatan bioteknologi molekuler melalui kajian-kajian biodiversitas genetik dengan menggunakan metode-metode bio-molekuler seperti teknologi isozime, teknologi sidik jari DNA untuk pemetaan gen seperti Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Goodier and Davidson, 1993), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Sukoso *et al.*, 2001) yang melibatkan teknologi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan kloning akan mampu memetakan kualitas keragaman genetik suatu organisme sehingga mampu dijadikan sebagai landasan *breeding* untuk menghasilkan benih yang unggul.

Heterozigositas sangat erat hubungannya dengan kualitas dan kerentanan terhadap suatu penyakit. Karakteristik gen yang memiliki homozigositas yang tinggi akan lebih rentan terhadap penyakit .

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui:

1. Daya tahan udang yang dipelihara pada tingkat salinitas (A) 0-5 ppt, dari Tuban B) 20-25 ppt, dari Malang Selatan dan C) 40-45 ppt, dari Gresik) terhadap infeksi virus WSSV.
2. Hasil analisa PCR udang putih (*Penaeus vannamei*) yang diinfeksi virus WSSV menggunakan primer ICP11.
3. Hasil analisis PCR-RFLP terhadap DNA mitokondria udang putih (*Penaeus vannamei*) yang diinfeksi virus WSSV.
4. Sequence dari DNA mitokondria udang putih (*Penaeus vannamei*) yang tahan dan tidak tahan terhadap virus WSSV.

3.2 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi tentang daya tahan udang putih (*Penaeus vannamei*) yang dipelihara pada tingkat salinitas (A) 0-5 ppt, dari Tuban B) 20-25 ppt, dari Malang Selatan dan C) 40-45 ppt, dari Gresik) terhadap serangan penyakit WSSV.
2. Memberikan informasi tentang pola genetis udang putih (*Penaeus vannamei*) yang tahan terhadap penyakit WSSV.
3. Memberikan informasi tentang sequence dari DNA mitokondria udang putih (*Penaeus vannamei*) yang tahan dan tidak tahan terhadap virus WSSV

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

Berdasarkan atas tujuan yang akan dicapai dalam penelitian ini, maka ruang lingkup penelitian dibatasi sebagai berikut:

1. Analisa daya tahan udang putih (*Penaeus vannamei*) yang dipelihara pada tingkat salinitas (A) 0-5 ppt, dari Tuban B) 20-25 ppt, dari Malang Selatan dan C) 40-45 ppt, dari Gresik)) terhadap infeksi virus WSSV.
2. Analisa allozim udang putih (*Penaeus vannamei*) yang diinfeksi virus WSSV.
3. Analisa PCR-RFLP terhadap DNA mitokondria udang putih (*Penaeus vannamei*) yang diinfeksi virus WSSV dan Sequencing DNA mitokondria udang putih (*Penaeus vannamei*).

4.2 Tahapan Penelitian

Berdasarkan tujuan penelitian yang akan dicapai, maka penelitian ini direncanakan akan dilaksanakan dalam 3 tahap mono tahun, yaitu:

1. Tahap I

Pascalarva udang putih yang diambil dari Malang Selatan, Gresik dan Tuban masing-masing 50 ekor setelah diaklimatisasi di laboratorium diletakkan pada aquarium dengan air media yang diambil dari tambak asalnya dengan volume masing-masing aquarium sebanyak 25 liter. Semua aspek lingkungan disamakan kecuali salinitas media dibedakan (A) 0-5 ppt, dari Tuban B) 20-25 ppt, dari Malang Selatan dan C) 40-45 ppt, dari Gresik) sesuai dengan habitatnya.

Lay out penelitian di Laboratorium seperti tergambar di bawah ini:

A = 0 - 5 ppt

B = 20 - 25 ppt

C = 40 - 45 ppt

1,2,3,4 = ulangan

n = non infeksi

i = infeksi WSSV

B4n	A3n	C2n	A2n	B1n	C4n
A4n	C3n	B3n	C1n	A1n	B2n

B3i	C4i	C2i	B2i	A4i	C1i
A3i	B1i	A2i	C3i	A1i	B4i

Bahan Penelitian:

- Pascalarva udang putih (*Penaeus vannamei*) SPF (Stock Patogen Free)
- Air media
- Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2
- Membrane filter
- Kaporit 30 ppm
- Pakan udang
- Instrumen Penelitian:
- Sentrifugasi
- Bak percobaan
- Aerasi

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Lokasi dan waktu penelitian:

Lokasi:

1. Pengambilan sample dilakukan di tambak udang tradisional di Tuban, Malang Selatan dan Gresik.
2. Stock virus diperoleh dari Lab. Balai Budidaya Air Payau Bangil.
3. Ujiantang virus WSSV akan dilakukan di Lab. Ilmu-ilmu perairan dan Bioteknologi FPIK, Universitas Brawijaya, Malang.

Waktu: Maret - Mei 2009

Prosedur pengambilan dan pengumpulan data:

- Sampel udang yang diambil dari tambak tradisional di Tuban, Malang Selatan dan Gresik diaklimatisasi pada bak-bak percobaan yang telah dibersihkan dan disinfikasi dengan kaporit dan diisi dengan air yang berasal dari tambak masing-masing sampel.

- Virus WSSV diperoleh dari udang vannamei yang telah terinfeksi virus WSSV, diambil organ tangkai mata, kulit, insang dan daging sebanyak 20 g, kemudian dihaluskan dan ditambahkan 200 mL larutan 10 mM PBS. Sampel disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit, kemudian supernatan yang dihasilkan disaring dengan membran filter 0,45 μ m dan digunakan sebagai sumber inokulum untuk ujiantang (Arimoto *et al.*, 1993).
- Ujiantang dilakukan dengan penginfeksiansampel yang telah diadaptasikan di bak-bak percobaan dengan metode perendaman selama 24 jam pada konsentrasi 0.1ml/ml air laut (Sembiring, 2004). Setelah 7 hari masa pemeliharaan dilakukan penghitungan survival rate sampel udang.

2. Tahap II

Sampel udang yang telah diujiantang dengan WSSV menghasilkan 2 kelompok udang yaitu yang tidak tahan terhadap penyakit ditandai dengan kematian dan yang tahan terhadap penyakit atau survive sampai akhir masa pengamatan. Kedua kelompok ini kemudian dianalisa PCR dengan primer spesifik yaitu ICP11. ICP 11 adalah yang terbanyak diekspresikan oleh non struktural gen/ protein WSSV, yang mana diduga kuat sangat berperan pada infeksi WSSV, namun sampai sekarang fungsinya diabaikan untuk diamati (Wang *et al.*, 2008).

Bahan Penelitian:

- Stok primer
- Aquades
- 10x BD Advantage 2 PCR-Buffer
- dNTP (10 mM)
- 50x BD AdvantageTM2 polymerase mix
- Agarose gel
- TAE
- ETBR
- Loading buffer
- Instrumen Penelitian :
- Mesin PCR
- Vortex

- Refrigerator
- Sentrifuse
- Microwave
- Elektroforesis

Lokasi dan waktu penelitian:

Lokasi:

- Desain primer dilakukan di Laboratorium Charite, Univ. Humbolt, Berlin, Jerman
- Analisis menggunakan primer spesifik di lakukan di Laboratorium Charite, Univ. Humbolt, Berlin, Jerman

Waktu: Mei – Juni 2009

Prosedur pengambilan dan pengumpulan data:

- Udang yang telah diuji tantang virus WSSV, diambil sebagian mewakili kelompok yang tahan terhadap WSSV dan yang tidak tahan diisolasi DNANYA.
- Setelah diperoleh isolat DNA maka dilakukan PCR dengan primer yang telah didesain yaitu ICP 11.

3. Tahap III

Untuk mengetahui keragaman genetik udang yang tahan terhadap penyakit dilakukan analisa keragaman DNA mitokondria (*Penaeus vannamei*) tahan penyakit WSSV dengan metode PCR-RFLP.

Sequencing tidak dapat dilaksanakan pada penelitian tahun ini karena keterbatasan waktu dan dana sehingga diharapkan bisa dilaksanakan pada penelitian berikutnya.

Bahan Penelitian:

- Udang hasil uji tantang virus WSSV
- Aquades steril
- Proteinase K
- RNase A
- Phenol

- SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)
- Chelex 100
- PCR core kit (100 PCR)
- Agarose gel LE
- DNA Marker XIV (100 bp ladder)
- Enzim Restriksi
- Mikrotube (1.5 ml, 0.5 ml, 0.2 ml)
- Blue tip
- Yellow tip (Y.222)
- White tip (T.300)
- Sarung tangan ukuran S
- Tris (hydroxymethyl) aminomethan 500 gr
- Ethanol Absolut pa 2,5 lt
- Sodium Acetat, 250 gr
- EDTA 500 gr
- Ethidium Bromide 50 ml
- Pellet pestle, 500 ml
- Parafilm.
- Instrumen Penelitian:
- Refrigerator
- Sentrifuge
- Thermoblock
- Waterbath
- Mesin PCR
- Spektrofotometer
- Mesin Elektroforesis
- UV Eluminator
- Belkam Polaroid

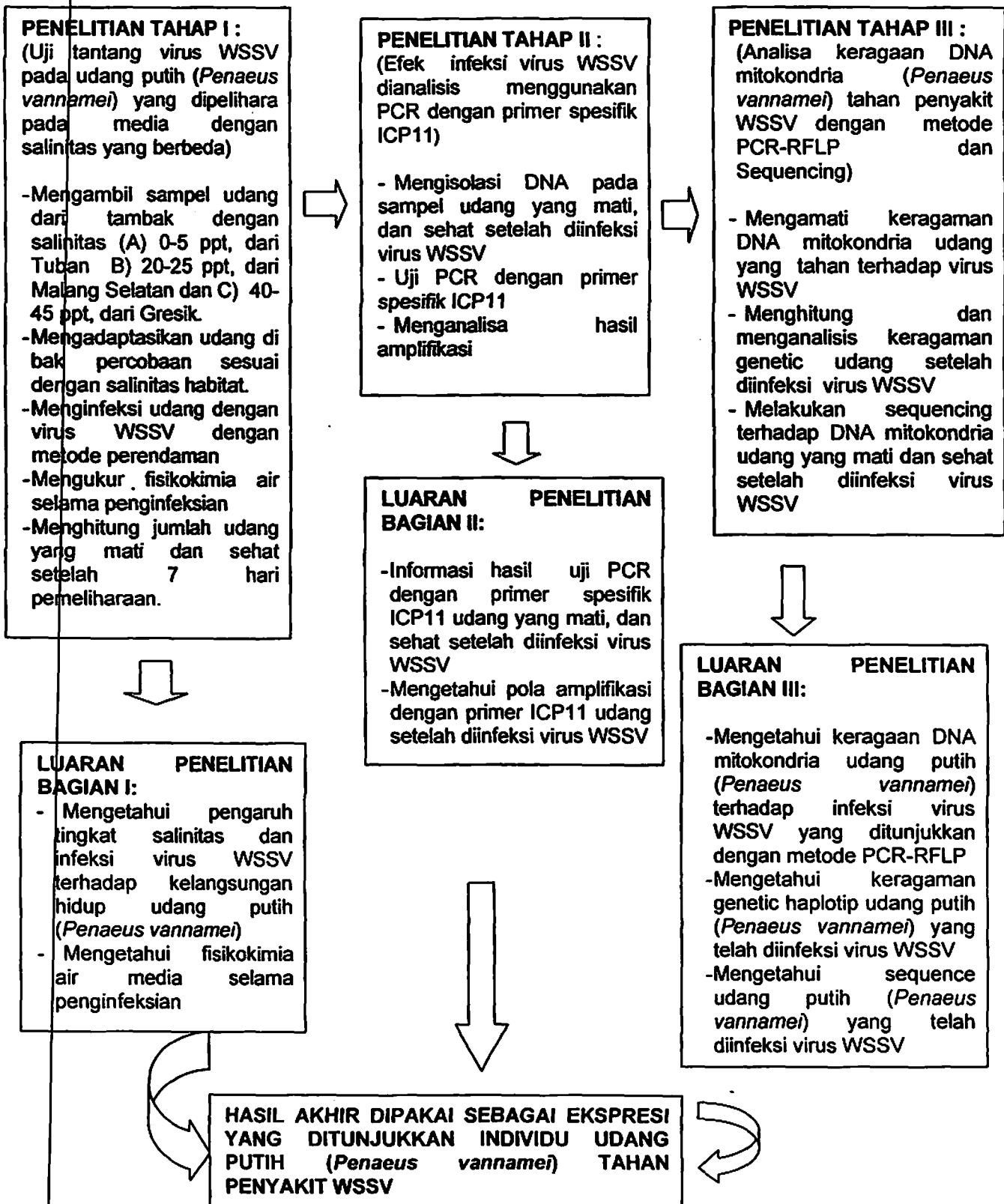
Lokasi dan waktu penelitian:

Analisis DNA mitokondria dengan metode PCR-RFLP dilakukan di Lab. Ilmu-ilmu perairan dan Bioteknologi FPIK, Universitas Brawijaya, Malang.

Prosedur pengambilan dan pengumpulan data:

Kegiatan ini meliputi (Ovenden , 2000) : Isolasi DNA, Purifikasi DNA, PCR dengan primer COIL-COIH, elektroforesis, pendokumentasian dan penentuan band tunggal, pemotongan dengan enzim: Nla III, Hha I pendokumentasian dan penentuan karakteristik mt-DNA yang telah mengalami pemotongan dengan enzim.

Untuk lebih jelasnya tahapan penelitian tersebut dapat dilihat pada Gambar berikut ini:



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian yang diperoleh berdasarkan tahap-tahap yang dilakukan adalah:

1. Ujiantang virus WSSV pada udang putih (*Penaeus vannamei*) yang dipelihara pada media dengan salinitas yang berbeda.

Pascalarva udang putih yang telah diaklimatisasi kemudian dipelihara pada akuarium percobaan di laboratorium dengan kualitas media sama semua kecuali salinitas dan dilakukan ujiantang infeksi WSSV. Data kualitas air selama perlakuan di laboratorium adalah DO 6,56 ppm - 7,23 ppm, suhu 26,02°C - 30,71°C, dan pH 7,62-8,01. Data ini ditunjukkan pada lampiran 1.

Hasil ujiantang pascalarva udang putih terhadap infeksi WSSV secara detail tercantum pada lampiran 2. Dari hasil tersebut diketahui total kematian SPF udang putih yang telah diinfeksi WSSV selama 7 hari pada masing-masing media dengan tingkat salinitas yang berbeda adalah tidak sama. Total mortalitas udang putih pada salinitas 0-5 ppt yang diinfeksi WSSV adalah 23 %, pada salinitas 20-25 ppt adalah 5,5 %, dan pada salinitas 40-45 ppt adalah 33,5 %.

2. Efek infeksi virus WSSV dianalisis menggunakan PCR dengan primer spesifik ICP11.

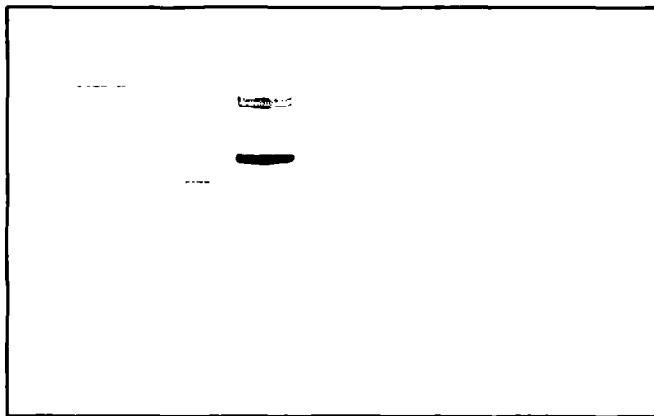
Sampel pascalarva udang putih yang telah diujiantang dengan virus WSSV dianalisis PCR dengan primer spesifik ICP11, dengan tujuan untuk mengetahui apakah virus WSSV sudah masuk kedalam DNA inang.

Primer ICP11 diperoleh dengan mendisain sendiri dari gen yang banyak diekspresikan oleh virus WSSV, diambil dari NCBI (Reference Sequence: NC_003225.1), dengan sequence asal yang tercantum pada lampiran 2.

Hasil desain primer spesifik untuk mengetahui hasil penginfeksi dalam DNA udang putih:

a. ICP11 for forward (Wsv230_19F22)	b. ICP11 for reverse (Wsv230_202R24)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 5' GAC GCC GAT TTC TTG CTG GTG G 3' ✓ A=2, G=8, C=5, T=7 ✓ G-C contain 59% ✓ Melting Point 70°C ✓ Konsentration in 1 ml : 62 µM, ✓ For 50 molar (50 pmol/ µl) dilution in aquades 1249 µl ✓ OD 14.3 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 5' GGG TTG AAT CTC CAG CGT TGA ATC 3' ✓ A=5, G=7, C=5, T=7 ✓ G-C contain 50% ✓ Melting Point 72°C ✓ Konsentration in 1 ml : 45 µM, ✓ For 50 molar (50 pmol/ µl) dilution in aquades 891 µl ✓ OD 11.7

Hasil amplifikasi DNA udang putih (*P.vannamei*) dari kelompok yang tidak tahan terhadap WSSV dan yang tahan dengan menggunakan primer spesifik ICP11 diperoleh pita DNA yang tidak sama. Hasil amplifikasi tersebut bisa dilihat pada lampiran 3. Gambaran skematik pita hasil PCR dapat dilihat pada gambar 1 berikut ini.



M Sn Si

Gambar 1. Hasil amplifikasi PCR dengan primer spesifik ICP11

Keterangan: M ; marker, Sn: sampel yang tidak terinfeksi, Si: Sampel yang terinfeksi

Keterangan : M : marker, 1 dan 2 : nomor sampel (1: DNA udang putih tidak tahan terhadap WSSV dan 2: DNA udang putih tahan terhadap WSSV)

Berdasarkan hasil diatas antara kelompok sampel satu yaitu DNA udang putih tidak tahan terhadap WSSV dan kelompok sampel 2 yaitu DNA udang putih tahan terhadap WSSV memberikan hasil yang berbeda. Pada kelompok satu tidak menghasilkan amplifikasi sejelas pada kelompok dua yang teramplifikasi pada pita DNA 350 bp.

3. Analisa keragaan DNA mitokondria (*Penaeus vannamei*) tahan penyakit WSSV dengan metode PCR-RFLP.

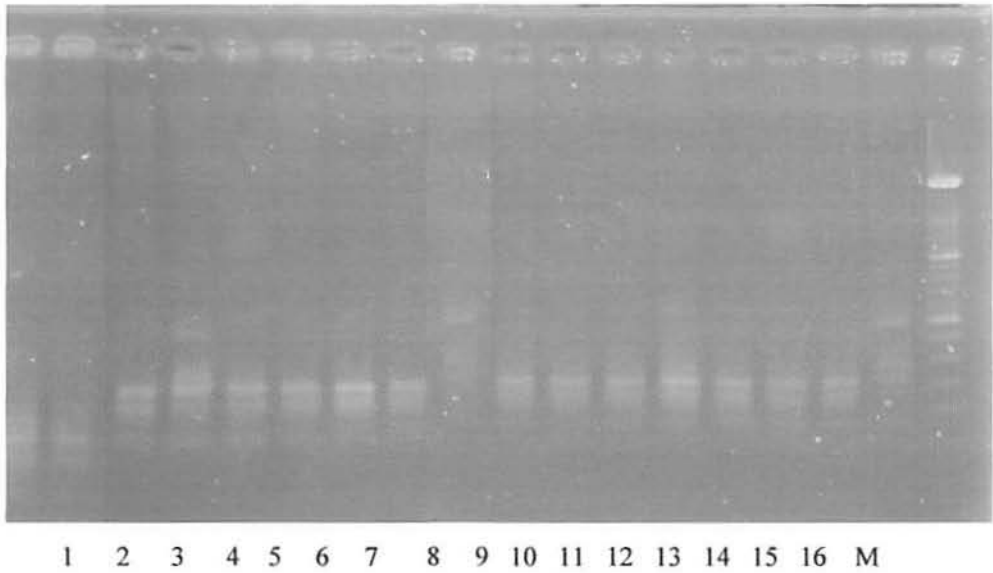
Hasil ampifikasi DNA pada *Penaeus vannamei* dengan menggunakan primer COIL-COIH diperoleh pita DNA tunggal dengan panjang 500 kb. Hasil amplifikasi tersebut dapat dilihat pada Lampiran 1. DNA hasil ampifikasi tersebut kemudian di potong dengan menggunakan 2 enzim restriksi yaitu Nla III dan Hha I. Masing-masing enzim restriksi yang digunakan mempunyai site restriksi yang berbeda seperti yang disajikan pada Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Site restriksi yang dimiliki enzim restriksi yang digunakan pada penelitian ini.

No	Enzim Restriksi	Site restriksi
1.	Nla III	5'...C A T G↓...3' 3'...↑G T A C ...5'
2.	Hha I	5'...G C G↓ C....3' 3'...C↑ G C G ...5'

Dari hasil pemotongan tersebut ternyata enzim restriksi Nla III yang menghasilkan pita DNA yang polimorfis sedangkan enzim restriksi Hha I tidak mempunyai site restriksi yang sesuai dengan DNA hasil amplifikasi.

Gambaran skematik pita hasil RLFP dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2 berikut ini.



Gambar 2. Hasil RFLP pada *P. Vannamei* menggunakan enzim *Nla III*
 Keterangan : 1-16 : nomor sampel, M : marker, 1 & 2 alel E, 3 & 4 alel D,
 5 & 6 alel E

Gambaran skema pita DNA hasil RFLP dapat dilihat pada Lampiran 3, sedangkan scoring hasil RFLP dapat dilihat pada Lampiran 4. Enzim restriksi (lokus) yang digunakan memberikan hasil yang spesifik dalam menganalisa keragaman genetik *P.vannamei* seperti yang disajikan pada Tabel 2.

Dari hasil RFLP dengan enzim restriksi di atas, dapat dilakukan perhitungan untuk mengetahui variasi genetik dalam spesies yang diamati seperti yang bisa dilihat pada Tabel 2, 3 dan 4.

Tabel 2. Jumlah genotif teramati (observed), nilai harapan (expected) Hardy Weinberg dan Frekuensi Alel pada lokus polimorfik *P.vannamei* (*Nla III*) menggunakan RFLP

Lokus : <i>Nla III</i>											
Alel	CC	C D	CE	DD	DE	EE	N	C	D	E	X ²
O	15			2		3.	20	0.75	0.1	0.15	40
E	11.25	3	4.5	0.2	0.6	0.45					

Keterangan : O ; observed, E; expected, N; jumlah sampel, X²; nilai chi-square

Tabel 3. Variasi genetik *P monodon* dan *P vannamei* berdasarkan hasil RFLP

No	Parameter	<i>P vannamei</i>
1	Jumlah sampel yang diamati	20
2	Jumlah lokus yang diamati	7
3	Jumlah lokus polimorfik	1

Tabel 4. Analisa populasi *P vannamei* (Nla III) berdasarkan hasil RFLP

Lokus	Alele	Frek alele	X	qi	Hj(i)
Nla III	C	0.750	0.250	0.502	0.633
	D	0.100	0.900	0.963	0.072
	E	0.150	0.850	0.935	0.122

Keterangan : x : fek. Alel yang tidak teramplifikasi, qi: frek. Null alel, Hj(i) : perbedaan genetik populasi j pada lokus ke i

Pada Tabel 5 dapat dihitung keragaman genetik (heterozogosititas) didalam populasi *P. Vannamei* sebesar 0.041. Cara perhitungan untuk Tabel 3 dan 5 dapat dilihat pada Lampiran 4 dan 5.

Tabel 5. Hasil pemotongan DNA *P monodon* dan *P vannamei* dengan enzim restriksi

Enzim Restriksi	<i>P vannamei</i>	
	Fragmen yang terbentuk (bp)	Pita hasil amplifikasi
Nla III	125	polimorfik
	175	
	225	
	300	
Hha I	500	monomorfik

Lokus target hasil amplifikasi yang telah dipotong dengan enzim restriksi kemudian dilakukan penilaian yang didasarkan atas ada atau tidaknya restriction site. Chow (1998) menyatakan amplifikasi lokus gen tunggal yang digunakan untuk mengasumsikan banyaknya alel pada masing-masing profil enzim restriksi menunjukkan bahwa fragmen yang tidak mempunyai site restriction (uncut) dinyatakan A alel, sedangkan yang mempunyai satu site digunakan B alel dan seterusnya.

Hasil pemotongan dengan enzim HhaI pada *P. vannamei* dalam populasi secara genotif, yang tidak menunjukkan pemotongan yang nampak dari hasil posisi pita DNA sampel yang sejajar dengan kontrol (uncut). Hal ini disebabkan karena dalam sekuen template DNA hasil amplifikasi tersebut tidak ada urutan basa-basa yang dikenali oleh enzim restriksi, sehingga enzim tidak memotong sekuen tersebut.

Dapat disimpulkan enzim Nla III dapat dijadikan penciri (marker), oleh karena mampu mendeteksi polimorfisme yang lebih baik untuk membedakan variasi genetik pada *P. Vannamei*. Dari hasil penghitungan nilai rata-rata keragaman genetik di dalam populasi H(w) pada Lampiran 4 dan 5, diperoleh nilai rata-rata keragaman genetik *P. Vannamei* sebesar 0,050.

Nilai kesamaan genetik dalam suatu populasi menunjukkan kecilnya nilai pertukaran gen yang terjadi, yang bisa dikarenakan ada halangan secara geografis. Menurut Nei dalam Wibowo (2001), ada kecenderungan bahwa populasi lokal yang tertutup dan tidak bermigrasi atau hanya melakukan migrasi jarak pendek akan mempunyai tingkat variasi genetik lebih kecil jika dibandingkan dengan populasi lokal yang penyebarannya terbuka. Menurut Grant dkk (1997) perbedaan frekuensi alel diantara populasi ikan laut berasal dari tiga tekanan yaitu migrasi, random genetic drift (penyimpangan genetik secara acak) dan seleksi alam. Dikatakan pula bahwa sedikitnya atau tidak adanya perbedaan genetik diantara populasi ikan laut dikarenakan besarnya potensi gen flow (pertukaran gen) diantara populasi, berkurangnya penyimpangan genetik dalam populasi yang sangat besar atau kombinasi dari mekanisme ini.

Pembahasan:

Kondisi udang putih (*Penaeus vannamei*) yang dipelihara pada media dengan salinitas yang berbeda dengan infeksi virus WSSW.

Habitat asli udang vannamei adalah dasar perairan cenderung berlumpur (Subaidah, 2003). Biasanya mulai dari garis pantai sampai kedalaman 72 meter, dan juga telah ditemukan pada perairan mangrove. Vannamei dapat beradaptasi dengan baik pada kedua suhu perairan tersebut. Sebagai hewan yang bersifat *euryhaline* udang vannamei mempunyai toleransi yang tinggi terhadap salinitas air, yaitu antara 5 – 30 ppt. Kandungan oksigen terlarut yang baik berkisar 4 – 6 ppm, suhu 26 – 32 °C (Haliman dan Adijaya, 2005).

Pada penelitian ini dilakukan pemeliharaan pada tingkat salinitas media dengan perbedaan yang mencolok yaitu 0-5 ppt, 20-25 ppt dan 40-45 ppt serta dilakukan uji tantang WSSV adalah untuk mengetahui sejauh mana daya tahan udang putih terhadap serangan WSSV pada lingkungan dengan salinitas yang berbeda.

Data kualitas air yang diperoleh selama penelitian sudah sesuai dengan kebutuhan optimal bagi kehidupan udang.

Dari hasil penelitian ternyata mortalitas tertinggi dicapai oleh udang yang dipelihara pada salinitas 40-45ppt kemudian diikuti dengan 0-5 ppt dan terendah pada 20-25 ppt. Hal ini diduga karena salinitas mempengaruhi kehidupan virus WSSV sehingga meskipun udang bersifat euryhaline tetapi ketika mendapatkan serangan virus pada tingkat salinitas yang berbeda akan memberikan respon yang berbeda pula. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Sukoso(2008)* bahwa virus WSSV akan tertekan kehidupannya pada tingkat salinitas rendah. Akan tetapi secara keseluruhan diketahui tingkat kematian SPF udang putih terhadap infeksi WSSV adalah rendah mengingat pada umumnya di tambak serangan WSSV mengakibatkan kematian sampai 100% setelah 2-4 hari.

Efek infeksi virus WSSV

White Spot Syndrome Virus (WSSV) adalah salah satu jenis penyakit yang menyerang spesies udang yang dibudidayakan dan jenis crustacea yang lain. Pada tambak udang, virus ini bisa mengakibatkan total kematian 100% pada 2 sampai 10 hari penyerangan (Wang *et al.*, 2007).

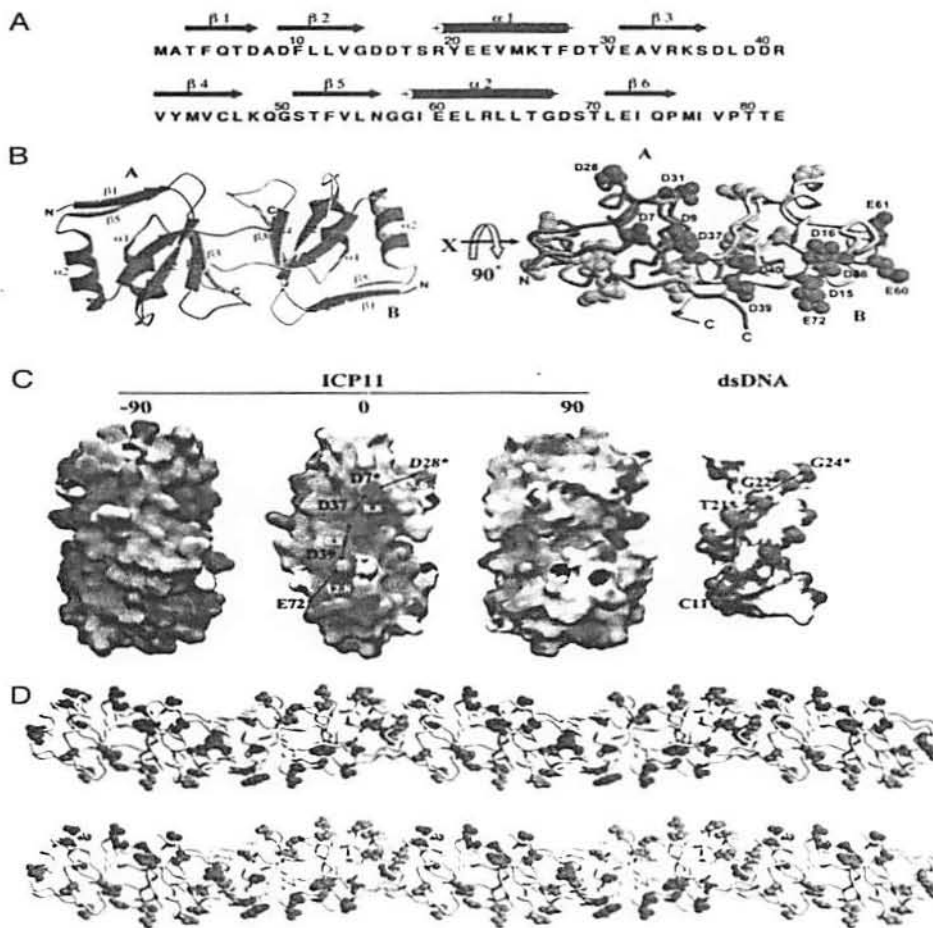
Virus ini memiliki sebuah untai ganda sirkuler DNA dengan ukuran mulai dari 290 sampai 305 kbp tergantung pada sumber isolatnya (van Hulst *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008).

Pada sel organ udang yang terserang WSSV, virus ini ditemukan di sitoplasma (Chen, 2008). Mekanisme penyerangan WSSV ke tubuh udang awalnya bersifat intrasitoplasmik masuk ke dalam sel inang kemudian pada tingkat serangan yang lebih tinggi DNA virus masuk ke dalam DNA inang dan mengambil alih proses transkripsi dan translasi sesuai proses dalam DNA virus.

Replikasi WSSV bisa terjadi pada beberapa bagian sel dengan nucleus sebagai letak utama virus berplikasi (Wang *et al.* 2000). Akan tetapi pertumbuhan dan kematangan partikel-partikel virus setelah diamati secara berkali-kali berada di dalam sitoplasma dari folikel sel (Lo *et al.*, 1997). Pada penelitian yang dilakukan Wang (2004)

bahwa hasil dari imunofluoresen assay dan electron microscopy menunjukkan positif signal VP28 pada sitoplasma sel yang terinfeksi WSSV, positif signal ini kemungkinan disebabkan tidak hanya oleh protein VP28 bebas tapi juga oleh VP28 yang terdapat pada virion. Hal ini konsisten dengan ide bahwa replikasi dan morfogenesis DNA WSSV kemungkinan terjadi di sitoplasma sel udang yang terinfeksi.

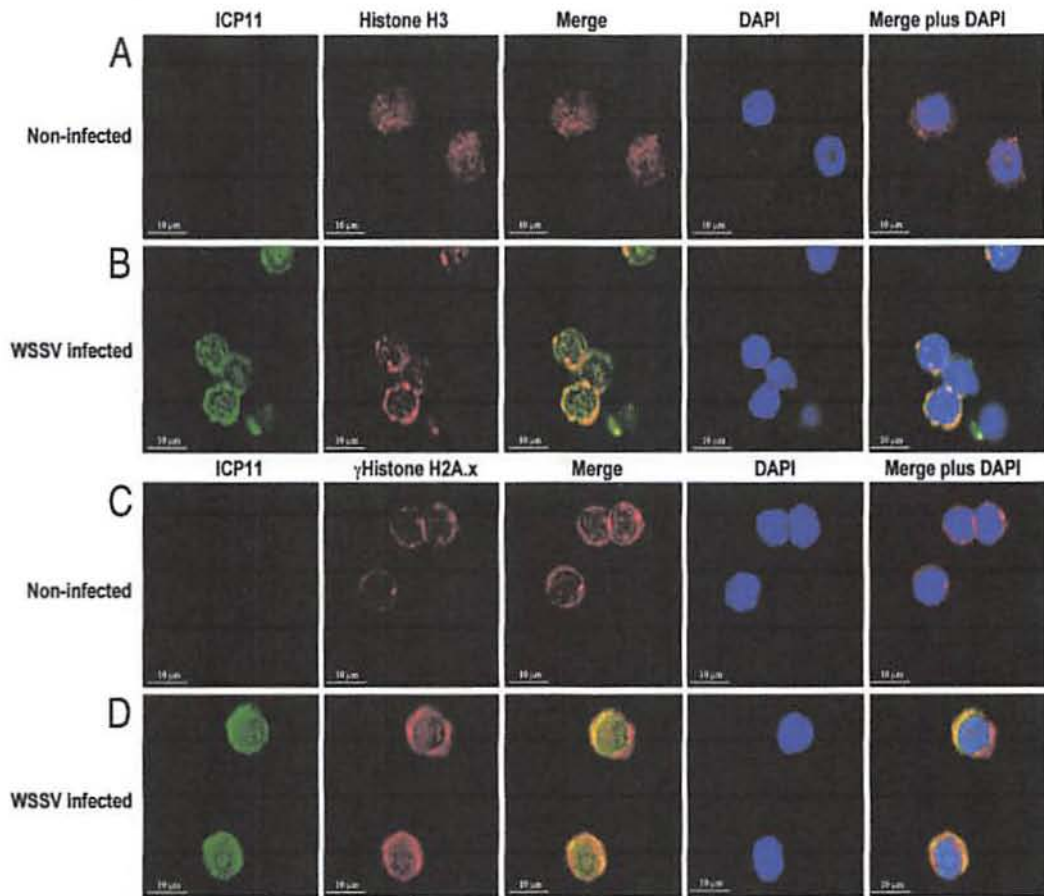
Pada level transkripsi dan translasi yang terjadi pada sel inang yang telah terserang virus WSSV terekspresi suatu protein. Protein ini bersifat non struktural dan menurut Wang *et al.* (2007), dinamakan ICP11.



Gambar 3. Distribusi negatif charge dari ICP11 yang menyerupai bentuk B DNA helik. (A) Elemen struktur sekunder yang ditunjukkan diatas sekuen amino-acid dengan garis bawah hijau dan tabung merah menggambarkan β -strand dan α -heliks (B) Sebuah diagram pita dari dimer ICP11 (kiri). Strands dan heliks dari monomer A on di bagian kanan dan diwarnai biru dan merah. (kanan) sebuah diagram dari dimer ICP11, yang masing-masing asam amino bermuatan negative ditunjukkan sebagai cluster dari bola (kecuali untuk E21 dan E22, yang dihilangkan). (C) Permukaan

molekuler dari dimer ICP11 dan dsDNA. Kode pewarnaan oleh GRASP, dengan merah sampai biru menggambarkan potensial elektrostatik dari $-15 \text{ k}_B T$ sampai $+15 \text{ k}_B T$. Dimer ICP11 ditunjukkan dalam bentuk 3 orthogonal normal ke pasangan axis. Label yang menunjukkan ICP11 titik residu acidic yang saling berhubungan dengan muatan negative pada dsDNA. Bintang menunjukkan ICP11 monomer B atau komplemen strand dari dsDNA. Perkiraan jarak diantara titik ditunjukkan. (D) Persebaran muatan negative amino acid dalam ICP11 helikal filament. Diagram menunjukkan pada kondisi stereo dan diwarnai seperti pada B (Wang *et al.*, 2007).

ICP11 adalah protein non struktural yang terbanyak diekspresikan oleh gen WSSV, yang mana diduga kuat sangat berperan pada infeksi WSSV, namun sampai sekarang fungsinya diabaikan untuk diamati. Pada penelitian yang dilakukan baru-baru ini oleh Wang *et al.*, 2008 menghasilkan ICP11 berperan seperti sebuah DNA. Dalam kristal ICP11 dibentuk oleh sebuah polimer dari dimer dengan 2 baris titik yang bermuatan negatif yang diasumsikan adalah susunan duplek dari kelompok fosfat pada DNA. ICP11 mengikat pada histon protein inang, berfungsi melindungi DNA dari ikatannya terhadap histon protein H2A, H2B, H3 dan H2A.x. Dalam hemocyte udang yang terinfeksi WSSV ICP11 terletak bersama H3 dan diaktifkan oleh H2A.x.



Gambar 4. ICP11 yang terletak pada histone H3 dan histone H2A.x in vivo. Kontrol dan hemocyte udang terinfeksi WSSV yang diawetkan dengan paraformaldehid (72 hpi), pewarna untuk ICP11(FITC, green) dan untuk histone H3 (A dan B) dengan TRITC (merah) dan γ histone H2A.x (C dan D). area hijau menunjukkan letak histone protein dan ICP11 yang terletak pada area yang sama (Wang *et al.*, 2007).

Keragaan DNA mitokondria (*Penaeus vannamei*) tahan penyakit WSSV

Polimorfisme adalah suatu bentuk variasi genetik yang terjadi dalam suatu populasi. Polimorfisme dapat diketahui dari munculnya beberapa pita (band) DNA pada beberapa sampel, yang tidak diketemukan pada sampel DNA lain, atau adanya pergeseran pita DNA tertentu pada beberapa sampel dibandingkan sampel

DNA yang lain (Yuwono, 1992). Menurut Fanning and Gibbs (1997), susunan fragmen yang dihasilkan merupakan karakteristik sesungguhnya dari DNA “template” dan menggambarkan “fingerprint” DNA tersebut. Fragmen polimorfik hasil pemotongan berasal dari perubahan genetik yang dihasilkan oleh mutasi titik, delesi, insersi dan perubahan-perubahan lain.

Hasil amplifikasi primer COIL COIH pada *P. Vannamei* menghasilkan pita yang monomorfik. Keadaan ini menunjukkan bahwa hanya ada satu urutan basa dalam genom DNA yang sesuai dengan “template” dan dikenali oleh primer, sehingga primer dapat melekat ke daerah itu dan proses amplifikasi dapat terjadi. Lebih lanjut dikatakan oleh Fanning and Gibbs (1997), bahwa setiap fragmen hasil PCR (yang memberikan kontribusi pada “fingerprint”) berasal dari interaksi antara “template” dan primer pada tempat yang berbeda-beda, sehingga masing-masing akan mengamplifikasi panjang yang berbeda. Produk hasil amplifikasi yang dihasilkan dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu 1) teramplifikasi pada semua sampel (monomorfik), 2) teramplifikasi hanya pada beberapa sampel (polimorfik), 3) teramplifikasi pada beberapa sampel dengan intensitas yang berbeda (sangat polimorfik). Jadi semakin banyak perbedaan interaksi antara template dengan primer, semakin polimorfik DNA sampel tersebut. Apabila pita yang diperoleh lebih dari satu, menunjukkan banyak daerah yang dikenali sebagai template dan jumlah basa yang teramplifikasi juga akan bervariasi. Akan tetapi hal ini tidak diinginkan pada teknik RFLP, dikarenakan akan menyulitkan dalam interpretasi hasil apabila DNA yang akan dipotong bukan merupakan pita DNA tunggal.

Hasil amplifikasi PCR dengan kedua primer tersebut didapatkan gambaran pita DNA monomorfik yang bervariasi dalam intensitasnya. Hal ini disebabkan karena jumlah fragmen DNA dengan berat molekul yang memiliki konsentrasi dengan tingkat kemurnian yang tinggi, akan menampilkan pita yang jelas, sedangkan DNA dengan konsentrasi yang rendah akan menghasilkan pita yang tipis dan samar atau smear (Susanto, 2002). Menurut Brown (1991), tingkat kemurnian DNA dapat dilihat dari rasio absorbansi 260 nm dan 280 nm (260 nm/280 nm). DNA dinyatakan murni apabila rasio hasil absorbansi 260 nm/280 nm yaitu sekitar 1,8. Bila tingkat kemurnian DNA kurang dari 1,8 dapat dinyatakan adanya kontaminasi oleh protein dan bila tingkat kemurnian di atas 2, kontaminasi yang terjadi disebabkan adanya RNA. Pada penelitian ini, tingkat kemurnian sampel DNA yang digunakan berkisar antara 1,7 – 1,9.

Setelah dilakukan analisa RFLP lebih lanjut pada pita tunggal hasil amplifikasi primer COIL COIH pada *P. Vannamei*, ternyata dari 2 enzim restriksi yang digunakan, hanya lenzim (Nla III) yang mampu menghasilkan hasil pemotongan yang polimorfik. Penggunaan beberapa enzim restriksi (RFLP) disini dimaksudkan untuk mengetahui tingkat polimorfisme dari DNA hasil amplifikasi PCR. Menurut Haryanti *dkk* (2001), amplifikasi dari fragmen tunggal yang digunakan untuk mengasumsikan banyaknya variasi pada masing-masing profil enzim restriksi, menunjukkan bahwa fragmen yang mempunyai banyak sisi restriksi dinyatakan lebih variatif secara genetik dibandingkan dengan yang tidak mempunyai site restriction. Hasil pemotongan yang berbeda (Tabel 6) menunjukkan bahwa pada populasi tersebut terjadi perbedaan variasi genetik yang ditunjukkan adanya pemotongan fragmen yang berbeda pada suatu populasi.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 KESIMPULAN

Dari penelitian ini diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil ujiantang SPF udang putih (*P.vannamei*) terhadap WSSV pada media dengan salinitas yang berbeda memberikan hasil yang berbeda pula. Total mortalitas udang putih pada salinitas 0-5 ppt yang diinfeksi WSSV adalah 23 %, pada salinitas 20-25 ppt adalah 5,5 %, dan pada salinitas 40-45 ppt adalah 33,5 %. Secara umum angka ini rendah mengingat biasanya kematian udang yang disebabkan serangan WSSV mencapai 100 % setelah 2-4 hari.
2. Hasil PCR DNA udang putih (*P.vannamei*) dengan primer spesifik ICP11 pada dua kelompok sampel yang tahan dan tidak tahan terhadap WSSV menghasilkan amplifikasi pita DNA yang berbeda. Pada udang yang tidak tahan amplifikasi pita DNA pada 350 bp.
3. Enzim restriksi yang menghasilkan pemotongan yang polimorfik untuk *P.vannamei* adalah Nla III. Fragmen yang terbentuk dari hasil pemotongan dengan enzim restriksi Nla III untuk *P.vannamei* adalah : 125, 175, 225 dan 300 bp. Heterozygositas *P.vannamei* adalah 0.050. Hal ini menggambarkan SPF *P.vannamei* memiliki variasi genetic yang bagus sehingga cukup tahan terhadap serangan penyakit WSSV, hal ini didukung oleh hasil ujiantang dengan total kematian sampel udang terbesar hanya 33,5 %.
4. Sequencing DNA mitokondria belum dilakukan karena keterbatasan waktu dan dana yang diperoleh pada penelitian tahun ini.

6.2 SARAN

Untuk mendapatkan data lebih detail mengenai SPF udang putih (*P.vannamei*) perlu dilakukan penelitian lanjutan. Penelitian ini dimaksudkan untuk memperoleh sequencing mitokondria SPF udang putih (*P.vannamei*).

DAFTAR PUSTAKA

- Asmanik, 2003. Kajian Variasi Genetik Udang Api-Api (*Metapneus monoceros*, Fab) di Perairan Jawa Timur dan Sulawesi Selatan Dideteksi Melalui analisis RFLP mt-DNA. Tesis. Tidak diterbitkan. Malang: Program Pascasarjana Unibraw.
- Baldwin, J.D., Bass, A.L., Bowen B.W. and Clark, Jr., W.H. 1998. Molecular phylogeni and biogeography of marine shrimp *Penaeus*. *Mol. Phylogent. Evol.* 10, 399-407.
- Brown, T.A., 1991. Pengantar Kloning Gen. Yogyakarta. Yayasan Essensia Edica.
- Chakraborty A., Aranishi F., and Iwatsuki Y. 2005. Molecular Identification of Hairtail Species. (Pisces: *Trichiuridae*) Based on PCR-RFLP Analysis of the Mitochondrial 16S Gene. *Journal of Application Genetic*. Vol. 46. No. 4. pp. 381-385.
- Chow, S. 1998. Universal PCR Primer for Cadmodulin Gene Intron in Fish. *Fisheries Science*. 64. P. 999-1000.
- Corach, D and D'Amato, M.E. 1996. Genetic Diversity of Populations of The Fresh Water Shrimp *Macrobrachium borelli* (Caridea : *Palae monidae*) Evaluated by RAPD Analysis *Crustacean Biology*, 16 (4) : 650-655.
- Fanning, S. & Gibbs, R.A. 1997. PCR in Genome Analysis. ColdSpring Harbor Laboratory Press.
- Haliman.R. W, Dian.A.S.2005. Budidaya Udang Vanamei. Swadaya. Jakarta
- Haryanti. Sugama, K. Moria S.B dan Permana I.G.N. 2001. Keragaman mt DNA Beberapa Mikroalga Sebagai Pakan Alami Larva Ikan Bandeng dan Kerapu. *Teknologi Budidaya Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia*. Jakarta : Departemen Kelautan dan Perikanan. Hal 265-269.
- Khamnamtong B., Klinbunga S., and Menasveta P. 2005. Species Identification of Five Penaeid Shrimp Using PCR-RFLP and SSCP Analyses of 16S Ribosomal DNA. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 38, No. 4, pp. 491-499.
- Lavery , S., Chan, t.y., Tam, Y.K. and Chu, K.H. 2004. Phylogenetic relationship and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus s.l.* derived from mitochondrial DNA. *Mol. Phylogent. Evol.* 31, 39-49
- Ovenden J. 2000. Development of Restriction Enzyme Markers for Red Snapper (*Lutjanus eriptroterus* and *Lutjanus malabaricus*) Stock. Discrimination Using Genetic Variation in mt-DNA. *Molecular*

Fisheries Laboratory, Southern Fisheries Center. Produced for CSIRO Marine Laboratories as Part of The ACIAR Indonesia Snapper Project.

- Subaidah.S, Susetyo.P, Mizab.A.T.I.N, Gede.S, Petrich.N, Sri.C.2003. Pembenuhan Udang Vannamei (*Litopenaeus Vannamei*). Departemen Kelautan dan Perikanan Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Air Payau. Situbondo
- Sugama K. Haryanti. Moria S.B dan Permana I.G.N. 2000. Analisis mt-DNA Sebagai Marker Gen Pertumbuhan dan Ketahanan Penyakit Pada Kerapu Bebek *Cromileptes altivelis*. Laporan Teknis Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut. Bali. 11 Halaman (Inpress).
- Suryani, S.A.M.P. 2001. Hubungan Kekerabatan Tiga Spesies Ikan Kerapu (*Plectropomus spp*) atas Dasar Variasi Genetik. Tesis. Tidak diterbitkan. Malang: Program Pascasarjana Unibraw.
- Susanto, B. 2002. Analisis 16s rDNA sebagai marka genetik variabilitas pertumbuhan Ikan kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) melalui metode PCR-RFLP. Tesis tidak diterbitkan. Yogyakarta. Program Pascasarjana Universitas Gajah Mada.
- Thaewnon-ngiw, B., Klinbunga,S., Phanwichien, K., Sangduen, N., Lauhajinda, N. And Menasveta, P. 2004. Genetic diversity and molecular markers of introduced and native apple snails (Genera *Pomacea and Pila*) in Thailand. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37, 493-502.
- Wang , HC., Hao-Ching Wang, Guang-Hsiung Kou, Chu-Fang Lo, Wei-Pang Huang. 2007. Identification of *icp11*, the most highly expressed gene of shrimp white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*. Vol. 74: 179-189, 2007

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data kualitas media

a. Data kualitas media yang diperoleh dari sampel lapang seperti tercantum di bawah ini:

Lokasi / tambak	Parameter (rata-rata)					
	Sal	Suhu	pH	DO	Tinggi air	Kecerahan
1. Tuban						
Ka1	2	31.2	7.8	3.5	95	14
Ka2	2.6	32.1	7.9	3.9	100	21
Ka3	3.3	31.9	7.8	4.6	110	14
2. Malang Selatan						
B1	21	28	7.51	3.9	130	15
B2	25	29	7.69	3.78	130	15
C1	21	29	7.5	3.9	140	15
C2	29	28	7.8	4.1	140	15
3. Gresik						
P1	41	32.5	8.1	10.369	135	14
P2	40	31	8.0	4.8	125	19
P3	39	31	8.1	3.5	100	19.5
P4	40	32	7.9	3.9	100	16

Lokasi / tambak	Parameter (rata-rata)							
	TOM	pH	PO ₄ ³⁻	NO ₃	NH ₃	CO D	Alkalinitas	Salinitas
Malang Selatan								
B1	410.8	7.51	0.8344	0.2271	0.03	464	144	21
B2	480.32	7.69	0.37157	0.1492	0.10	478	148	25
C1	276.816	7.5	0.3064	0.19205	0.04	441	148	21
C2	235.104	7.82	0.4824	0.14725	0.10	526	152	29
Gresik								
P1	40.448	6.80	0.9673	0.2105	0.09	534	216	34
P2	154.208	6.63	1.4967	0.2963	0.07	508	192	36
P3	91.008	6.55	1.9935	0.2378	0.07	527	194	35
P4	237.632	6.68	1.4183	0.1442	0.11	545	216	35
Tuban								
Ka1	200.976	7.19	0.4510	0.2865	0.20	246	214	2
Ka2	290.72	7.20	1.5033	0.4133	0.19	80	296	3
Ka3	259.12	7.13	2.3987	0.4581	0.25	69	318	3.5

a. Data kualitas media yang pada saat pemeliharaan dan ujiantang di laboratorium seperti di bawah ini :

DATA DO (DISSOLVED OXYGEN) HARIAN YANG DIAMBIL SETIAP PAGI (07.00) DAN SORE (16.00)

KODE	HARI KE-1		HARI KE-2		HARI KE-3		HARI KE-4		HARI KE-5		HARI KE-6		HARI KE-7		RERATA
	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	
A1n	7.09	6.30	6.70	7.00	7.10	6.40	7.00	8.23	7.14	6.60	7.20	7.50	7.21	6.70	7.01
A2n	7.28	7.20	6.80	6.80	6.70	6.80	7.60	7.95	7.60	7.50	7.10	7.69	6.17	6.60	7.13
A3n	6.64	6.60	6.60	6.10	6.20	6.90	6.70	6.67	7.23	6.30	7.00	7.47	7.06	6.90	6.74
A4n	6.55	6.00	6.20	5.90	6.10	6.50	6.20	7.29	6.66	6.20	6.50	6.56	7.09	6.30	6.43
RATA-RATA	6.89	6.53	6.58	6.45	6.53	6.65	6.88	7.54	7.16	6.65	6.95	7.31	6.88	6.63	6.83
B1n	6.72	7.30	7.00	7.00	7.00	7.30	7.10	7.82	7.47	7.20	7.10	7.58	7.83	7.70	7.29
B2n	7.12	5.90	5.80	6.10	6.10	6.10	5.80	7.16	6.61	5.90	6.20	6.56	6.04	6.00	6.24
B3n	6.48	6.30	6.10	6.40	6.40	6.60	6.40	6.41	6.28	5.60	6.20	6.40	6.16	5.60	6.24
B4n	6.40	6.30	6.10	6.00	6.10	6.30	6.60	7.48	7.39	6.30	7.10	7.38	6.98	6.30	6.62
RATA-RATA	6.88	6.45	6.25	6.38	6.40	6.58	6.48	7.22	6.94	6.25	6.65	6.98	6.75	6.40	6.60
C1n	5.99	6.30	6.20	6.00	5.80	6.40	6.50	6.97	6.09	4.90	6.10	7.30	6.80	6.30	6.26
C2n	6.25	6.60	6.20	5.80	5.80	6.40	7.00	7.13	7.14	6.90	7.00	7.12	6.48	6.60	6.60
C3n	6.53	6.10	6.60	6.40	6.50	6.60	7.10	7.48	6.77	7.00	6.90	6.95	7.51	6.50	6.78
C4n	6.67	6.90	5.30	6.10	6.20	7.40	6.50	7.64	6.13	7.40	6.50	6.86	6.29	6.70	6.61
RATA-RATA	6.38	6.48	6.08	6.08	6.08	6.70	6.78	7.31	6.53	6.55	6.83	7.06	6.77	6.53	6.58
A1i	6.35	7.10	6.70	6.40	6.70	7.00	7.00	6.88	6.04	6.40	6.30	6.86	6.11	6.50	6.60
A2i	7.85	7.60	7.80	7.40	8.00	7.70	7.60	8.02	8.07	6.70	7.50	7.78	7.48	7.20	7.62
A3i	7.73	7.60	7.10	7.10	7.40	7.20	7.40	7.54	7.43	6.70	7.20	7.60	7.40	7.20	7.33
A4i	7.45	7.50	7.10	7.20	7.20	7.40	7.80	7.72	7.74	7.00	7.30	7.65	7.47	6.90	7.39
RATA-RATA	7.35	7.45	7.18	7.03	7.33	7.33	7.45	7.54	7.32	6.70	7.08	7.47	7.12	6.95	7.23
B1i	7.56	7.30	7.10	6.90	7.50	7.30	7.20	6.99	7.50	7.00	7.20	7.23	6.75	6.80	7.17

B2i	7.38	6.60	5.50	6.70	6.00	7.30	6.80	6.90	6.85	7.20	7.00	6.70	7.17	7.30	6.81
B3i	6.43	6.90	6.20	7.00	6.00	6.50	6.30	6.65	6.47	5.50	6.00	6.15	6.16	5.00	6.23
B4i	7.25	7.20	6.20	5.50	6.40	6.20	5.80	6.41	6.21	5.50	6.40	5.83	7.42	6.40	6.34
RATA-RATA	7.16	7.00	6.25	6.53	6.48	6.83	6.53	6.74	6.76	6.30	6.65	6.48	6.88	6.38	6.64
C1i	8.29	6.80	6.10	6.90	7.80	7.60	7.60	7.54	7.40	7.20	7.30	7.61	7.43	7.60	7.37
C2i	7.43	7.10	7.00	7.10	7.20	7.50	6.80	7.09	7.39	7.10	7.10	7.56	6.98	6.90	7.16
C3i	7.75	6.30	6.90	6.20	6.80	6.70	6.20	6.94	5.61	6.40	6.10	6.26	5.58	5.70	6.39
C4i	7.81	7.50	6.90	6.90	7.10	6.60	7.20	7.14	6.29	6.70	6.90	7.06	6.99	6.50	6.97
RATA-RATA	7.82	6.93	6.73	6.78	7.23	7.10	6.95	7.18	6.67	6.85	6.85	7.12	6.75	6.68	6.97

DATA SUHU HARIAN YANG DIAMBIL SETIAP PAGI (07.00) DAN SORE (16.00)

KODE	HARI KE-1		HARI KE-2		HARI KE-3		HARI KE-4		HARI KE-5		HARI KE-6		HARI KE-7		RERATA
	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	
A1n	26.3	25.9	25.7	26.1	26.7	25.9	25.5	26.6	25.2	27.1	25	25.7	25.5	26.8	26.00
A2n	26.2	25	25.7	25.9	25.2	26	25.4	26.8	25.9	25.8	28	25.7	25.6	26.1	25.95
A3n	26.5	27	25.7	26.9	27	25.9	25.6	26.9	25.5	25.4	26	25.8	25.6	27.3	26.22
A4n	26.3	25	25.6	25	25.2	27	25.5	25.3	27.1	26.1	25.9	25.7	27	26.1	25.91
RATA-RATA	26.325	26.725	25.675	25.975	26.025	26.2	25.5	26.4	25.925	26.1	26.2	25.7	25.925	26.58	26.02
B1n	27.2	27	24.7	27.1	27.1	27.1	26.4	26.2	27	25.1	26.8	26.6	24.6	24.1	26.21
B2n	27.3	26.9	26.6	26.9	27.1	27	27.5	27.2	27.2	25.1	26	26.8	24.6	24	26.44
B3n	27.3	26.9	26.6	27	27.2	26.9	26.5	27.2	26.1	25.1	26	26.7	24.5	24.2	26.30
B4n	27.6	26.6	26.7	27.1	27.3	26.8	26.7	26.4	25.2	25.4	26	26.8	24.6	24.4	26.26
RATA-RATA	27.35	26.85	26.15	27.025	27.175	26.95	26.775	26.75	26.375	25.2	26.2	26.7	24.575	24.18	26.30
C1n	30.4	31	30.6	31.1	30.1	31	30.5	30.3	31	31.1	31	30.8	30.5	30.2	30.69
C2n	30.4	31	30.5	31	30.2	31.1	30.5	30.3	31	31.1	31	30.8	30.5	30.2	30.69
C3n	30.6	31.1	30.6	31	30.2	31	30.7	30.3	31.1	31.2	31.2	30.7	30.5	30.6	30.77
C4n	30.4	31	30.5	31	30.2	31	30.5	30.1	31.1	31.1	31.1	30.8	30.6	30.3	30.69
RATA-RATA	30.45	31.025	30.55	31.025	30.175	31.025	30.55	30.25	31.05	31.1	31.1	30.8	30.525	30.33	30.71
A1i	28.4	29	28.6	29.1	28.1	29	28.5	28.3	29	29.1	29	28.8	28.5	28.2	28.69
A2i	28.4	29	28.5	29	28.2	29.1	28.5	28.3	29	29.1	29	28.8	28.5	28.2	28.69
A3i	28.6	29.1	28.6	29	28.2	29	28.7	28.3	29.1	29.2	29.2	28.7	28.5	28.6	28.77
A4i	28.4	29	28.5	29	28.2	29	28.5	28.1	29.1	29.1	29.1	28.8	28.6	28.3	28.69
RATA-RATA	28.45	29.025	28.55	29.025	28.175	29.025	28.55	28.25	29.05	29.1	29.1	28.8	28.525	28.33	28.71
B1i	26.4	27	26.6	27.1	26.1	27	26.5	26.3	27	27.1	27	26.8	26.5	26.2	26.69
B2i	26.4	27	26.5	27	26.2	27.1	26.5	26.3	27	27.1	27	26.8	26.5	26.2	26.69
B3i	26.6	27.1	26.6	27	26.2	27	26.7	26.3	27.1	27.2	27.2	26.7	26.5	26.6	26.77

B4i	26.4	27	26.5	27	26.2	27	26.5	26.1	27.1	27.1	27.1	26.8	26.6	26.3	26.69
RATA-RATA	26.45	27.025	26.55	27.025	26.175	27.025	26.55	26.25	27.05	27.1	27.1	26.8	26.525	26.33	26.71
C1i	26.4	27	26.6	27.1	26.1	27	26.5	26.3	27	27.1	27	26.8	26.5	26.2	24.69
C2i	26.4	27	26.5	27	26.2	27.1	26.5	26.3	27	27.1	27	26.8	26.5	26.2	24.69
C3i	26.6	27.1	26.6	27	26.2	27	26.7	26.3	27.1	27.2	27.2	26.7	26.5	26.6	24.77
C4i	26.4	27	26.5	27	26.2	27	26.5	26.1	27.1	27.1	27.1	26.8	26.6	26.3	24.69
RATA-RATA	24.45	25.03	24.55	25.025	24.175	25.025	24.55	24.25	25.05	25.1	25.1	24.8	24.525	24.33	24.71

DATA pH HARIAN YANG DIAMBIL SETIAP PAGI (07.00) DAN SORE (16.00)

KODE	HARI KE-1		HARI KE-2		HARI KE-3		HARI KE-4		HARI KE-5		HARI KE-6		HARI KE-7		RERATA
	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	
A1n	8.14	8	8.02	8.12	8.04	7.99	7.94	7.92	7.98	8.07	8.03	7.8	7.82	7.9	7.98
A2n	8.19	8	8.08	8.19	7.99	8.04	7.9	7.92	7.92	7.93	7.92	7.77	7.77	7.9	7.97
A3n	8.19	7.9	8.11	8.18	7.99	8.08	8.01	8	8.03	8.04	7.99	7.95	7.89	7.9	8.02
A4n	8.1	7.9	8.08	8.16	7.93	7.99	7.87	7.88	7.78	7.88	7.8	7.61	7.5	7.8	7.88
RATA-RATA	8.155	7.95	8.073	8.163	7.99	8.025	7.93	7.93	7.93	7.98	7.94	7.78	7.75	7.875	7.96
B1n	7.83	7.6	7.74	7.82	7.72	7.77	7.73	7.75	7.8	7.84	7.77	7.77	7.73	7.7	7.76
B2n	7.73	7.5	7.56	7.69	7.67	7.49	7.63	7.55	7.7	7.72	7.69	7.7	7.74	7.6	7.64
B3n	7.74	7.6	7.67	7.7	7.58	7.6	7.56	7.55	7.57	7.62	7.6	7.45	7.43	7.5	7.58
B4n	7.83	7.5	7.7	7.78	7.61	7.71	7.63	7.57	7.68	7.71	7.61	7.67	7.06	5.8	7.49
RATA-RATA	7.783	7.55	7.668	7.748	7.65	7.643	7.64	7.605	7.69	7.72	7.67	7.65	7.49	7.15	7.62
C1n	7.75	7.5	7.56	7.71	7.65	7.65	7.59	7.57	7.69	7.72	7.69	7.6	7.56	7.5	7.62
C2n	7.74	7.6	7.63	7.73	7.62	7.65	7.57	7.57	7.61	7.64	7.6	7.51	7.47	7.5	7.60
C3n	7.77	7.6	7.63	7.73	7.66	7.68	7.63	7.61	7.73	7.75	7.68	7.65	7.64	7.6	7.67
C4n	7.74	7.5	7.67	7.63	7.66	7.66	7.61	7.63	7.72	7.74	7.72	7.64	7.62	7.6	7.65
RATA-RATA	7.76	7.55	7.623	7.7	7.65	7.66	7.6	7.595	7.69	7.71	7.67	7.6	7.57	7.55	7.64
A1i	8.13	8	8.05	8.17	7.51	8.04	7.96	7.99	8.02	8.03	7.84	7.57	7.54	7.9	7.91
A2i	8.2	8	8.05	8.22	7.72	8.11	8.04	8.05	8.09	8.13	8.13	7.98	7.99	8	8.05
A3i	8.18	8	8.06	8.18	7.72	8.08	8.04	8.02	8.12	8.17	8.14	7.98	7.98	8	8.05
A4i	8.19	7.9	8.04	8.21	7.74	8.08	8	8.02	8.06	8.11	8.09	7.9	7.92	8	8.02
RATA-RATA	8.175	7.98	8.05	8.195	7.67	8.078	8.01	8.02	8.07	8.11	8.05	7.86	7.86	7.975	8.01
B1i	7.81	7.6	7.68	7.82	8.09	7.69	7.68	7.65	7.76	7.79	7.77	7.64	7.64	7.6	7.73
B2i	7.81	7.6	7.71	7.82	7.68	7.66	7.69	7.66	7.76	7.78	7.74	7.49	7.52	7.6	7.68
B3i	7.79	7.6	7.66	7.75	7.73	7.69	7.76	7.71	7.8	7.84	7.81	7.72	7.66	7.7	7.72

B4i	7.67	7.9	7.63	7.68	7.62	7.63	7.62	7.65	7.71	7.71	7.72	7.57	7.57	7.6	7.66
RATA-RATA	7.77	7.68	7.67	7.768	7.78	7.643	7.69	7.658	7.76	7.78	7.76	7.61	7.6	7.625	7.70
C1i	7.78	7.5	7.61	7.78	8.03	7.69	7.68	7.68	7.77	7.78	7.78	7.65	7.67	7.6	7.71
C2i	7.78	7.5	7.63	7.72	7.69	7.63	7.64	7.64	7.7	7.74	7.71	7.58	7.57	7.6	7.65
C3i	7.69	7.5	7.62	7.71	8.09	7.52	7.41	7.35	7.43	7.47	7.44	7.17	7.19	7.3	7.49
C4i	7.79	7.6	7.62	7.73	7.71	7.65	7.68	7.65	7.75	7.76	7.73	7.64	7.63	7.6	7.68
RATA-RATA	7.76	7.53	7.62	7.735	7.88	7.623	7.6	7.58	7.66	7.69	7.67	7.51	7.52	7.625	7.64

DATA SALINITAS HARIAN YANG DIAMBIL SETIAP PAGI (07.00) DAN SORE (16.00)

KODE	HARI KE-1		HARI KE-2		HARI KE-3		HARI KE-4		HARI KE-5		HARI KE-6		HARI KE-7		RERATA
	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE	
A1n	4	5	5	5	5	3	4	5	5	5	4	4	5	5	4.57
A2n	4	5	5	5	5	2	3	5	5	5	3	3	5	5	4.29
A3n	4	5	5	4	5	3	3	5	4	5	4	4	4	4	4.21
A4n	4	5	5	5	5	3	4	5	5	3	4	4	5	6	4.50
RATA-RATA	4	5	5	4.75	5	2.75	3.5	5	4.75	4.5	3.75	3.75	4.75	5	4.39
B1n	21	21	21	21	21	21	21	21	21	19	23	23	21	21	21.14
B2n	21	25	25	25	25	19	20	25	25	19	20	20	25	22	22.57
B3n	21	24	24	24	24	20	20	24	24	21	21	21	24	22	22.43
B4n	21	21	20	20	20	20	19	20	20	22	21	21	21	19	20.36
RATA-RATA	21	22.8	22.5	22.5	22.5	20	20	22.5	22.5	20.3	21.3	21.3	22.8	21	21.63
C1n	40	41	41	41	40	38	39	41	41	41	40	40	41	41	40.36
C2n	41	40	40	40	40	43	39	40	41	40	41	41	41	37	40.29
C3n	41	40	40	41	41	39	43	41	41	45	40	20	41	41	39.57
C4n	41	40	40	40	41	40	39	40	40	39	40	40	40	41	40.07
RATA-RATA	40.75	40.3	40.25	40.5	40.5	40	40	40.5	40.8	41.3	40.3	35.3	40.8	40	40.07
A1i	4	5	5	5	5	4	3	5	5	3	4	5	5	5	4.50
A2i	4	5	5	5	5	4	3	5	5	4	4	4	5	6	4.57
A3i	4	5	5	5	5	3	8	5	5	4	4	4	5	5	4.79
A4i	4	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	5	4	4.64
RATA-RATA	4	5	5	5	5	4	4.75	5	5	3.75	4	4.25	5	5	4.63
B1i	21	20	20	20	21	20	21	20	20	20	22	22	20	21	20.57
B2i	21	20	20	21	24	20	21	20	21	16	21	21	21	20	20.50
B3i	21	24	25	25	25	20	19	25	25	21	23	23	25	21	23.00

B4i	21	20	20	20	21	20	20	20	20	20	20	21	21	20	23	20.50
RATA-RATA	21	21	21.25	21.5	22.8	20	20.3	21.25	21.5	19.3	21.8	21.8	21.5	21.25	21.14	
C1i	41	40	40	41	40	45	40	40	41	39	41	41	41	45	41.07	
C2i	41	40	40	41	41	40	42	41	41	40	41	41	41	40	40.71	
C3i	41	41	40	41	41	40	39	40	41	40	42	41	41	40	40.57	
C4i	41	41	41	40	41	40	43	40	40	41	41	41	40	40	40.71	
RATA-RATA	41	40.5	40.25	40.75	40.6	41.25	41	40.25	40.8	40	41.3	41	40.8	41.25	40.77	

Lampiran 2. Data kematian udang yang telah diinfeksi WSSV

DATA HARIAN UDANG YANG MATI

KODE	HARI KE-1	HARI KE-2	HARI KE-3	HARI KE-4	HARI KE-5	HARI KE-6	HARI KE-7	TOTAL	MR (%) AKHIR
A1n	0	0	0	0	0	0	4	4	8
A2n	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3n	0	0	0	2	0	0	0	2	4
A4n	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATA-RATA	0	0	0	0.5	0	0	1	1.5	3
B1n	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2n	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3n	0	1	0	0	0	0	0	1	2
B4n	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATA-RATA	0	0.25	0	0	0	0	0	0.25	0.5
C1n	0	0	0	0	0	0	2	2	4
C2n	1	2	0	0	0	0	0	3	6
C3n	1	0	0	0	0	0	0	1	2
C4n	0	0	0	0	0	0	4	4	8
RATA-RATA	0.5	0.5	0	0	0	0	1.5	2.5	5
A1i	2	0	4	6	0	0	6	16	32
A2i	1	1	0	1	0	2	7	12	24
A3i	1	0	3	4	2	0	2	12	24
A4i	0	0	0	0	0	3	3	6	12
RATA-RATA	1	0.25	1.75	2.75	0.5	1.25	4.5	11.5	23
B1i	0	0	0	0	0	0	6	6	12

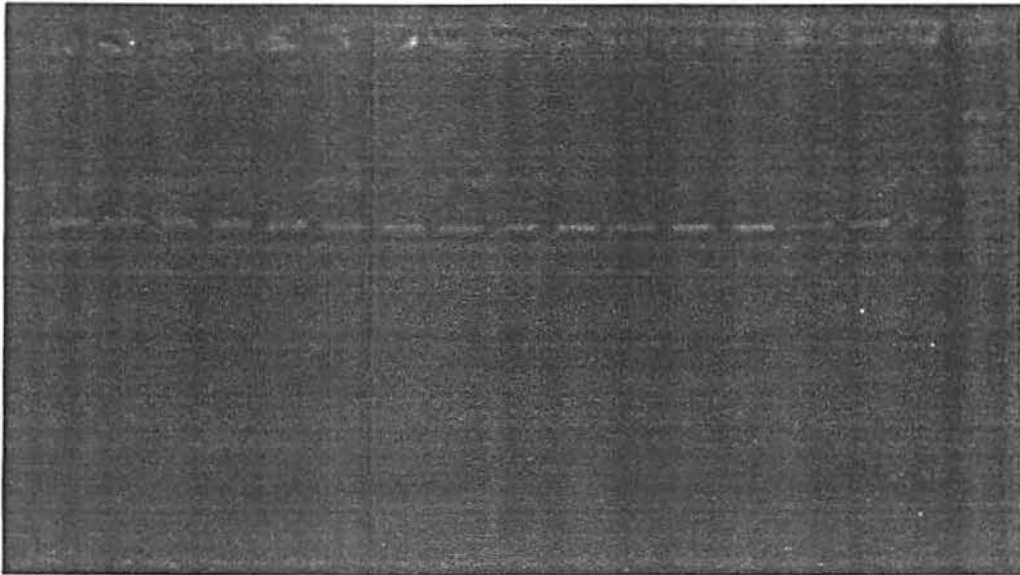
B2i	0	0	0	0	0	0	2	2	4
B3i	1	0	0	0	0	0	0	1	2
B4i	0	0	0	0	0	0	2	2	4
RATA- RATA	0.25	0	0	0	0	0	2.5	2.75	5.5
C1i	1	0	4	3	7	2	4	21	42
C2i	1	1	4	2	2	1	3	14	28
C3i	2	1	2	2	6	2	2	17	34
C4i	0	1	1	1	3	3	6	15	30
RATA- RATA	1	0.75	2.75	2	4.5	2	3.75	16.75	33.5

Lampiran 3. Sequence asal Primer ICP11 diambil dari NCBI (Reference Sequence: NC_003225.1).

gi|17158105:c129006-127159 Shrimp white spot syndrome virus, complete genome
ATGGAAATACATTGGAGAGAAAAACAATAACCCTGTTAGTAATGAAAGTGTATCAGAAAAGGAGTTAAAC
TAAGATCGTCATTCCCTGATGATCGGGAAGAAAAACAAGTAAATATGAGCAAGTCATGGGTGTTTATGAAGC
TATCGAATCTATAAGACAAAGCGAATTGTCCGAAGACACATTTGTTGTACATGTGAAGAAAGATAAACAA
CTCAATTCGCAAGAGGGTTAAAAAGATTACAAGAATTGGTAGAAGATGACTCTTTAAGAATTGAACGGA
TAAGTGTGCCCCCTCTGAACCTGGACATTTATTCAAAGATGATGCTGGGCACGTTACTGACGAGGAATG
GCTTGCAACGCAAGAAGAAGACGTGCGTAAAATCAATACAATAGTCAAGGAAAAATTA AACGAAAAGAC
AAGGACTTTAAATTCAGTCAATTATACAGGTACATGAGCAATAGTCTTTCTGAAGCAGTAGAAAAAAC
ACGATTTGTATGATAATAAGTTCGGATTTCTTAATCGGTTTAGGTTTCAGTACAATGAACGTCACGCACGC
TTTAAAGTCAATGGAGAGAATATGCAGAAACATGGTTTTCAAGGATATGATGGTCCCATTGGTTGAAATT
TGTCACCGTACCCATTACAAAGGAGAAATATATAGCCAATCCTATTTTCAAGAGCCATTCTTCACATTGCT
TGATTTCCCTTGTATGGTGGCGGGCGTTTTTGTCAAGGAGCGCACACCCTTCTGCTGCAAGCATTGA
AATGTACCTTTTCGACACTAGCCTACGCTGTTATCTTATACAGTGATGAAAAGCAACGCCAGATACGCGAA
GAGTTGGCTAGGAAAAATTTACAAATAAAAAGAGGAACTAGAAAACCAGGTCGAAAAGACCACAAAAGTTG
AAAAGGAACTAGAAACACAAGTAGTAAAGACCACAAAAGTTGAAAAGGAACTAGAAAACACAAGTAGTAAA
GAAAGAGGAGTACAAAACTCGTATATCGAACTGAACAACCTTTCAAAGTCTCTGAGGAACAAAAAGAA
TCTCTCAGAAATGTACACAAGAAATCTTCCAATGCGACCTTCAGATACGACAGCGGCTCTTGTCTCGTCT
TCTCGATATCCTCTACAGAATCTACTTGTGTGCAGGACAGACAAAAGTGGTTCCTTTGAACTGCAAC
AGAAAATGGTTTGTAGGTACATTTTCTCCCCATAAAACAAGAAAAGGGATACTGCAGGTATGAGGCCCAGA
CTCATCATGGCCTGACTGGCTGTGACGCACCTATCGCTTGCAACGACAGTATCAAACACCAAAACAAGT
TCAAGGTATTAATAATGTAACCGATCAAGTATAGTTTTCCAGACCCCTCCAAGTGATGAAGATTTGAAGGG
TATTGTACAAAAGTGACAGGTTCTGATATCCGAATCTTTATGAATGATGGCACCGTCTATCAAGATGGG
CAGAGGATAGACATCTCTTCGCCTCAAGAACTTGATGAAGAAAATATGACCCAATTTGAAATTTGAACAAC
AAAGGAAGCTCCATTCCATGATGGGAAACACATCAAAAATTTGCTACTAGGTACAACAAGGAAAGACATTT
GACCACAAGGAAGCTCGTACGAGAAACAAGACCGAAAAGTGGTTTGAGAAGGTAAAAGAAGAGGGAGGAA
CAAAAGAAGCGAGAAAATGGAGAACAGTCTACCAGTGAACAGGAGCAAAGGGGAGTAAAAGGACCTGGG
AAAACGACAATGAATTTGATAGCGACGTAGAAAGAAGAAGATGGAAAACAACACTCAAGAACAACAGCG
TGTAAGAGACATGCCATTTCTGTGTAA

Lampiran 4. Hasil RFLP pada *P. Vannamei*

a. Hasil RFLP pada *P. Vannamei* menggunakan enzim Hha I



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M

Keterangan : 1-16 : sampel, M : marker

Lampiran 5. Skoring hasil RFLP

No sampel	P. Vannamei	
	Enzim restriksi (lokus)	
	Nla III	Hba I
1	B	A
2	B	A
3	D	A
4	B	A
5	B	A
6	B	A
7	B	A
8	B	A
9	C	A
10	B	A
11	B	A
12	B	A
13	B	A
14	B	A
15	B	A
16	D	A
	P	M

Keterangan : P : Polimorfik, M: monomorfik

Lampiran 6. Perhitungan frekuensi alel, genotif harapan dan uji chi square

us: III	Genotip						N	Frek Alel			
	BB	BC	BD	CC	CD	DD		B	C	D	X2
	13			1		2	16	00,813	0,063	00.125	32
	10,563	1,625	3,250	0,063	0,250	0,250					

Keterangan : O ; observed, E; expected, N; jumlah sampel, X2; niai chi-square

Perhitungan untuk lokus Nla III :

a. Frekuensi alel B = $13/16 = 0,813$; C = $1/16 = 0,063$; D = $2/16 = 0,125$

b. Genotif harapan untuk :

$$BB = (0,813)^2 \times 16 = 10,563$$

$$CC = (0,063)^2 \times 16 = 0,063$$

$$DD = (0,125)^2 \times 16 = 0,250$$

$$BC = 2 \times 0,938 \times 0,125 \times 16 = 0,102$$

$$BD = 2 \times 0,938 \times 0,188 \times 16 = 0,203$$

$$CD = 2 \times 0,125 \times 0,188 \times 16 = 0,016$$

Chi squire dengan derajat bebas (db) = 2

$$X^2 = \sum (O - E)^2/E$$

$$= 32$$

Jadi X^2 hitung > x^2 tabel db 2 , taraf kepercayaan 0,05

Lampiran 7. Analisis data variasi genetik P. Vannamei berdasarkan hasil RFLP

1. Proporsi alel yang tidak teramplifikasi (x) untuk alel B

$$= 1 - 0,813 = 0.188$$

dengan cara yang sama dapat dicari nilai x dari allele yang lain

2. mencari varians dari x:

$$s^2 = 1 / (n - 1) \sum_{i}^{n} (x(i) - \bar{x})^2$$

dimana :

n = banyaknya alel pada semua lokus

x = proporsi alel yang tidak teramplifikasi

xrata = nilai x rata-rata

a) x rata-rata untuk P. *vannamei* = 32

b) $S^2 = 0.038437$

3. Fekuensi null alele (qi) untuk alel B

$$= \sqrt{x(1 - \text{var } x / 8x)^{-1}}$$

$$= 0.435$$

4. varian qi sama dengan mencari varian x = 0.096

5. Keragaman genetik populasi J pada lokus Nla III alel B

$$H_m(i) = 2 q_i (1 - q_i) + 2 \text{ var } q_i$$

$$= 0,684$$

dengan cara yang sama diperoleh untuk alel C dan D

6. Rata rata perbedaan genetik di dalam populasi P. *vannamei*

$$H_w = 1/n \sum H_m(i), \text{ dimana n adalah jumlah individu dalam populasi}$$

$$= 0,050$$

