

BAB IV

HASIL dan PEMBAHASAN

4.1 Keadaan Umum Lokasi Praktek Kerja Lapang

4.1.1 Sejarah Berdirinya BBAP Situbondo

Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo pada awalnya bernama Sub Center Udang Jawa Timur dengan fasilitas untuk pemeliharaan udang windu. Proyek ini terletak di desa Blitok kecamatan Bungatan kabupaten Situbondo dan berdiri pada tahun 1986. Berdasarkan SK Menteri Pertanian no.264/ Kpts/ 07/ 210/ 4/ 94 tanggal 18 April 1994, proyek Sub Center Udang melepaskan diri dari BBAP Jepara dan berganti nama menjadi Loka Budidaya Air Payau (LBAP) Situbondo. LBAP Situbondo merupakan Unit Pelaksana Teknis (UPT) Direktorat Jenderal Perikanan di bidang pengembangan produksi budidaya perikanan air payau yang berada di bawah dan bertanggungjawab kepada Direktur Jenderal Perikanan. Berdasarkan SK Menteri Kelautan dan Perikanan no.KEP.26 D/ MEN/ 2001, sejak tanggal 1 Mei 2001 status Loka Budidaya Air Payau dinaikkan menjadi Balai Budidaya Air Payau (BBAP) karena beban tugas dan tanggungjawab yang semakin meningkat. Tugas BBAP Situbondo berdasarkan SK tersebut di atas adalah melaksanakan penerapan teknik pembenihan dan pembudidayaan ikan air payau serta pelestarian sumberdaya induk/ benih ikan dan lingkungan sedangkan fungsi dari BBAP Situbondo adalah sebagai berikut :

- a. Pengkajian, pengujian dan bimbingan penerapan standart perbenihan dan pembudidayaan ikan air payau,

- b. Pengkajian standart dan pelaksanaan sertifikasi sistem mutu dan sertifikasi personil perbenihan dan pembudidayaan ikan air payau,
- c. Pengkajian sistem dan tata laksana produksi serta pengelolaan induk penjenis dan induk dasar ikan air payau,
- d. Pelaksanaan pengujian teknik perbenihan dan pembudidayaan ikan air payau,
- e. Pengkajian standart pengawasan benih, pembudidayaan serta pengendalian hama dan penyakit ikan air payau,
- f. Pengkajian standart pengendalian lingkungan dan sumberdaya induk/ benih ikan air payau,
- g. Pelaksanaan sistem jaringan laboratorium pengujian, pengawasan benih dan pembudidayaan ikan air payau,
- h. Pengelolaan dan pelayanan informasi serta publikasi perbenihan dan pembudidayaan ikan air payau,
- i. Pelaksanaan urusan tata usaha dan rumah tangga.

Sejak tahun 1996, BBAP Situbondo telah berhasil memproduksi benih kerapu tikus yang pertama kali di Indonesia dan terus mengembangkan beberapa spesies lain yang memiliki nilai ekonomis.

4.1.2 Letak Astronomis dan Geografis

Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo terletak pada $113^{\circ}55'56''$ BT- $114^{\circ}00'00''$ BT dan $07^{\circ}42'32''$ LS- $07^{\circ}42'35''$ LS, terdiri dari 3 divisi yaitu divisi ikan sekaligus sebagai kantor utama BBAP Situbondo yang berlokasi di dusun Pecaron desa Klatakan kecamatan Kendit (20 km dari ibukota kabupaten Situbondo ke arah barat) seluas 4,39 hektar, divisi udang yang berlokasi di desa



Blitok kecamatan Mlandingan (10 km dari kantor utama ke arah barat) seluas 1,45 hektar, divisi budidaya (pembesaran ikan dan udang) yang berlokasi di desa Pulokerto kecamatan Kraton kabupaten Pasuruan (100 km dari kantor utama) seluas 53,37 hektar dan unit Karamba Jaring Apung (KJA) di dusun Gundil desa Klatakan kecamatan Kendit (6 km dari kantor utama ke arah timur). BBAP Situbondo berada pada ketinggian 0-10 meter di atas permukaan laut dan memiliki batas : sebelah timur dengan perumahan penduduk dan pembenihan udang windu (BAJA dan PT. Windu Raya), sebelah barat serta selatan dengan perumahan penduduk dan sebelah utara dengan Selat Madura.

4.1.3 Susunan Organisasi

a. Kepala Balai

Mempunyai tugas merumuskan kegiatan, mengkoordinasikan dan mengarahkan tugas penerapan teknik perbenihan dan pembudidayaan ikan air payau serta pelestarian sumberdaya induk/ benih ikan air payau sesuai dengan prosedur dan peraturan yang berlaku untuk kelancaran pelaksanaan tugas.

b. Seksi Standarisasi dan Informasi

Mempunyai tugas menyiapkan bahan standart teknik dan pengawasan perbenihan serta pembudidayaan ikan air payau, pengendalian hama dan penyakit ikan, sumberdaya induk/ benih serta pengelolaan jaringan informasi dan perpustakaan.

c. Seksi Pelayanan Teknik

Mempunyai tugas memberikan pelayanan teknik kegiatan pengembangan, penerapan serta pengawasan teknik perbenihan dan pembudidayaan ikan air payau.

d. Sub Bagian Tata Usaha

Mempunyai tugas di bidang administrasi keuangan, kepegawaian, persuratan, perlengkapan dan rumah tangga serta pelaporan.

e. Kelompok Jabatan Fungsional

Mempunyai tugas melaksanakan kegiatan perekayasaan, pengujian, penerapan dan bimbingan penerapan standart, sertifikasi perbenihan dan pembudidayaan ikan air payau, pengendalian hama penyakit ikan, pengawasan benih, budidaya dan penyuluhan serta kegiatan lain yang sesuai dengan tugas masing-masing jabatan fungsional berdasarkan peraturan perundangan yang berlaku.

Kelima jabatan tersebut di atas dalam pelaksanaan tugasnya wajib menerapkan prinsip koordinasi, integrasi dan sinkronisasi masing-masing maupun antar unit kerja dengan instansi lain di luar departemen eksplorasi laut dan perikanan.

4.1.4 Kegiatan Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo

a. Kegiatan Produksi

Kegiatan produksi merupakan salah satu kegiatan BBAP Situbondo yang bermuara pada program intensifikasi pembudidayaan ikan/ udang (INBUDKAN) terutama untuk tiga komoditas unggulan yaitu udang, kerapu dan rumput laut.

Kegiatan produksi benih ikan dan *broodstock center* udang vanamei dilakukan pada divisi ikan. Produksi benih udang baik windu maupun vanamei dilaksanakan pada divisi udang. Kegiatan pembudidayaan kerapu dilakukan pada KJA dan rumput laut pada divisi budidaya. Kegiatan produksi ini juga membantu dalam hal penyediaan telur ikan.

b. Kegiatan Perekayasaan

Kegiatan perekayasaan teknologi merupakan kegiatan dalam rangka menghasilkan paket-paket teknologi budidaya perikanan yang mudah diadopsi oleh masyarakat.

c. Pelayanan Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan

Pelayanan diagnosa penyakit ikan dan udang yang meliputi identifikasi parasit, bakteri dan jamur, deteksi penyakit viral, analisa histopatologis dan analisa kualitas air. Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan BBAP Situbondo sedang dipersiapkan untuk memperoleh akreditasi laboratorium uji dalam rangka program sertifikasi.

d. Pelayanan Laboratorium Nutrisi

Penyediaan pakan buatan untuk ikan dan analisa proksimat pakan dalam rangka pemantauan kualitas pakan yang beredar di masyarakat.

e. Pelayanan Laboratorium Pakan Alami

Menyediakan bibit phytoplankton murni (15 jenis) untuk *starter* kultur murni, *intermediate* dan massal untuk menunjang keberhasilan produksi benih ikan dan udang di masyarakat.

f. Desiminasi Teknologi

1. Bimbingan dan pendampingan teknologi kepada masyarakat, budidaya tambak udang dan artemia di tambak serta *Hatchery* Skala Rumah Tangga (HSRT) ikan kerapu,
2. Pelatihan teknis pembenihan dan budidaya ikan multispecies,
3. Magang bagi instansi pemerintah/ swasta, mahasiswa dan siswa,
4. Praktek Kerja Lapang (PKL) bagi mahasiswa dan siswa,
5. Pelayanan kunjungan dan konsultasi teknis budidaya.

g. Broodstock Udang Vanamei

Kegiatan ini untuk memenuhi kebutuhan induk udang vanamei agar tidak bergantung pada induk import.

h. Lembaga Sertifikasi Sistem Mutu (LSSM)

Melakukan sertifikasi sistem mutu kepada unit usaha pembenihan agar dapat memproduksi benih bermutu yang bersaing di pasar global.

i. Pengelolaan Informasi

Meliputi kegiatan dokumentasi, jaringan informasi, publikasi dan pengelolaan perpustakaan.

j. Administrasi

Meliputi bidang kepegawaian, keuangan dan rumah tangga.

4.1.5 Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia (SDM)

BBAP Situbondo mengirim beberapa karyawan dan karyawan untuk mengikuti kegiatan pelatihan dan apresiasi, baik yang bersifat teknis maupun non teknis dalam rangka peningkatan kualitas sumberdaya manusia.

4.1.6 Sarana dan Fasilitas

Selain petak tambak dan bak-bak pembenihan, pembesaran serta bak pakan alami, sarana pokok lainnya yang juga sangat penting adalah sebagai berikut :

a. Sumber Air

Hal yang harus diperhatikan mengenai air adalah kecukupan kualitas dan kuantitas agar organisme yang dipelihara dapat hidup dan tumbuh dengan baik.

Cara memperoleh dan pengolahan (treatment) merupakan faktor yang sangat berpengaruh untuk kualitas air.

BBAP Situbondo mengambil air laut sejauh 250 meter dari garis pantai melalui pipa PVC berdiameter 8 inchi yang memiliki klep (sistem buka tutup secara otomatis) dan terdapat filter berdiameter 4 inchi pada ujung pipa. Air dihisap menggunakan elektromotor berkekuatan 20 PK. Kemudian air laut diendapkan pada petak tandon berukuran $4 \times 4 \times 2 \text{ m}^3$ yang dilengkapi dengan bak filter berukuran $2 \times 1 \times 0,5 \text{ m}^3$ dengan susunan bahan penyaring (dari bawah ke atas) berturut-turut adalah pasir, waring $500 \mu\text{m}$, ijuk, arang, kerikil dan batu kali. Air yang telah melewati saringan fisik ini diharapkan telah terbebas dari kotoran-kotoran atau benda yang berukuran besar. Setelah dari bak filter, air dialirkan ke tandon dengan bantuan pompa berkapasitas 7,5 PK dan melewati pipa berukuran 4 inchi. Tandon inilah yang menjadi sumber air ke bak-bak pembenihan, akuarium dan bak kultur pakan alami. Air dialirkan dengan sistem gravitasi sebab posisi tandon berada lebih tinggi dari bak-bak yang lain (1,5 m dari tanah). Untuk keperluan tambak dan sirkulasi bak induk, air laut yang digunakan tanpa melalui bak penampungan namun hanya melalui filter di ujung pipa pengambilan air laut.

Air tawar diperoleh dari dua buah sumur dengan kedalaman 10 meter dan dihisap dengan pompa air tawar kemudian dialirkan menuju tandon untuk kegiatan pembenihan, keperluan karyawan, air minum dan asrama.

b. Oksigen

Konsentrasi oksigen dalam air sangat berpengaruh terhadap kehidupan ikan dan organisme lainnya. Agar kebutuhan oksigen terlarut dapat terpenuhi

sesuai kebutuhan, maka jaringan instalasi aerasi harus direncanakan dengan baik. Di BBAP Situbondo menggunakan satu buah blower 2 KVA dan dua buah blower 3 KVA. Dalam pendistribusiannya menggunakan pipa PVC berukuran 1,5-2 inci dan peralatan lain seperti selang, kran aerasi dan batu aerasi. Selang yang biasa digunakan terbuat dari bahan plastik PE (*polyethylen*) berukuran 3/8 inci dengan pemasangan pada 9 titik aerasi. Regulator/ kran aerasi berfungsi sebagai pengatur besar kecilnya volume udara yang keluar dari pipa distribusi yang berhubungan langsung dengan selang aerasi. Batu aerasi digunakan untuk memperhalus gelembung udara yang keluar dan dipasang pada ujung selang aerasi. Agar posisi batu aerasi tidak mengapung dan tetap pada posisinya, ujung selang diberi pemberat dari bahan timah.

Sarana/ fasilitas penunjang yang dimiliki oleh BBAP Situbondo guna memperlancar kegiatan budidaya diantaranya sebagai berikut :

a. Sumber listrik

Sumber energi listrik yang digunakan oleh BBAP Situbondo berasal dari PLN cabang Situbondo sebesar 80 KVA. Selain itu juga terdapat sebuah genset berkapasitas 80 KVA sebagai cadangan tenaga listrik bila sewaktu-waktu terjadi gangguan aliran listrik.

b. Sistem Transportasi

BBAP Situbondo memiliki 3 buah kendaraan roda empat untuk mendukung kegiatan mobilitas. Kegiatan ini juga diperlancar dengan letak balai yang sangat strategis yaitu di tepi jalan raya yang menghubungkan kota Probolinggo dan Situbondo. Terlebih lagi jalan ini merupakan jalan propinsi dan

berbagai jenis kendaraan melewati jalan ini. Kondisi tersebut di atas sangat mendukung kelancaran usaha terutama dalam hal transportasi.

c. Sistem Komunikasi

Sistem komunikasi di BBAP Situbondo dapat dilakukan melalui pos dengan alamat PO BOX 5 Panarukan Situbondo 68351. Juga dapat melalui telepon di nomor (0338) 673328 atau faximili di nomor (0338) 390255 dan juga E-mail bbapstbd@rad.net.id.

d. Laboratorium

BBAP Situbondo memiliki tiga buah laboratorium yaitu Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan seluas 243 m², Laboratorium Nutrisi dan bangsal pakan buatan seluas 270 m² serta Laboratorium Pakan Alami seluas 304 m².

e. Fasilitas Pendukung Lainnya

Sarana administrasi kantor dan perlengkapannya seluas 680 m², aula pertemuan seluas 300 m², perpustakaan seluas 150 m², wisma tamu seluas 100 m², 15 unit rumah karyawan, asrama pelatihan (15 kamar) seluas 450 m², mushola seluas 30 m², rumah genset seluas 24 m² dan rumah blower seluas 12 m².

4.2 Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan

4.2.1 Ruang Lingkup

Kemampuan Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan BBAP Situbondo meliputi diagnosa mikrobiologi (menghitung total bakteri, *presumptive*

jumlah vibrio dan identifikasi bakteri vibrio), histologi dan parasitologi, pengobatan dan *rapid* diagnosis benur/ pemeriksaan kualitas benur, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (deteksi WSSV, TSV, IHNV dan VNN), analisa kualitas air (oksigen terlarut, salinitas, pH, alkalinitas, nitrit, amonia, fosfat, asam sulfida, asam sianida, kesadahan, bahan organik, kadar logam berat seperti Hg, Cd, As, Fe, Cu, Pb, Mn, Ca, K) dengan AAS (*Atomic Absorbtion Spektrofotometer & Accesories*) serta analisa kandungan antibiotik melalui *High Performance Liquid Chromatografi* (HPLC).

4.2.2 Wilayah Kerja

Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan BBAP Situbondo dikategorikan pada level II yaitu berada pada lingkup Unit Pelaksana Teknis (UPT) Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya yang memiliki wilayah kerja monitoring masalah penyakit di propinsi Jawa Timur dan Bali dengan tugas serta fungsi sebagai berikut :

- a. Melakukan pelayanan diagnosa penyakit ikan secara mikrobiologis (parasitologi, mikologi, bakteriologi), histopatologis, analisa PCR dan analisa lingkungan perairan budidaya,
- b. Memberikan rekomendasi dan penerapan teknik penanggulangan penyakit ikan serta lingkungan perairan budidaya secara sistematis, komprehensif dan terintegrasi,
- c. Melakukan pemantauan daerah sebar dan perkembangan penyakit ikan di wilayah kerjanya,

- d. Melakukan desiminasi teknologi penanggulangan penyakit ikan serta lingkungan perairan budidaya,
- e. Melakukan pembinaan pada laboratorium level I serta menyediakan informasi status penyakit ikan di wilayah kerjanya,
- f. Melakukan pengujian penggunaan bahan kimia/ antibiotik/ *herbal therapy* dan material lainnya bagi pengobatan penyakit ikan secara *invitro* dan *invivo*,
- g. Menyediakan koleksi, preservasi, penyimpanan spesimen dan mengirim ke laboratorium level III,
- h. Menunjang dan membina kerjasama antar laboratorium (level I, II, III) antar instansi baik di dalam maupun luar negeri.

4.2.3 Keadaan Fisik

a. Luas Bangunan dan Ruangan

Bangunan induk Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan BBAP Situbondo seluas 243 m² (9 m x 27 m) terdiri dari beberapa ruangan antara lain : Laboratorium Kimia, Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium HPLC, Laboratorium Histologi dan Parasitologi, ruang ekstraksi dan amplifikasi DNA, ruang elektroforesis, ruang staf dan administrasi, ruang tamu, ruang preparasi media dan pencucian alat.

b. Jumlah dan Jenis Sarana Pokok

Upaya yang telah ditempuh untuk mendukung tugas dan fungsi tersebut di atas adalah mempersiapkan sarana pokok laboratorium sebagai berikut :

1. Laboratorium Mikrobiologi

Sarana yang dimiliki antara lain : 2 buah kotak isolasi dan *refrigerator*, 1 buah *analytical balance* 20 gram, *analytical balance max* 200 gram, *colony counter*, *hot plate* dan *stirer*, *autoclave*, mikropipet P 1000, mikropipet P 100, almari dinding kayu, almari penyimpanan media, *mikrosentrifuge* dan *stabilizer*, 1 unit *glasswares* dan *disecting sets*.

2. Laboratorium Histologi dan Parasitologi

Sarana yang dimiliki antara lain : 1 unit *glasswares* dan *staining glass*, 1 buah *automatic staining*, mikrotome, *waterbath*, mikroskop trinokular dilengkapi kamera, *inverted* mikroskop dilengkapi kamera digital dan komputer, mikroskop binokular, *tissue prosessor*, *embedding machine*, *waterbath*, almari asam, almari kaca 3 pintu dan *stabilizer*, 4 buah kotak penyimpanan preparat dan 2 buah stereomikroskop.

3. Laboratorium PCR

Sarana yang dimiliki antara lain : 2 buah mikropipet P 1000, mikropipet P 200, mikropipet P 100, *polaroid camera gel* dan UPS 2000 VA, 3 buah mikropipet P 10, rak mikrotipe, rak mikrotube dan almari dinding kayu, 1 unit *appendorf* 1,5 ml, *appendorf* 250 μ l, *glasswares*, *disecting sets* dan *gel documentation*, 6 buah *cryostorage boxes* 1,5 ml dan 0,5 ml, 1 buah *refrigerated mikrosentrifuge*, *mikrosentrifuge*, *thermal cycler*, *deep freezer* (-20°C), *transiluminator*, sistem elektroforesis vertikal dan horisontal, *vacuum desicator*, *mikrowave*, *vortex*, *power supplay* elektroforesis, *autoclave electric*, *laminar flow*

Biohazard class II, heating block, deep freezer GFL (-85°C), CO₂ dan LN₂ safety cooling device, refrigerator, pH meter, GeneQuant Pro RNA/ DNA calculator dan stabilizer.

4. Laboratorium Kimia

Sarana yang dimiliki antara lain : 2 buah spektrofotometer dan DO meter, 1 unit *Atomic Absorbtion Spektrofometer & Assesories (AAS)* dan *test kit*, 1 buah pH meter, pH tanah, 3000 *water quality logger*, refraktometer, refraktor bumi, *analitic balance, hot plate* dan *stirer* serta almari dinding kaca.

5. Laboratorium Analisa Kandungan Antibiotik

Sarana yang dimiliki antara lain : 1 unit *glasswares*, 1 buah *HPLC Isocratic System, data processor, sample preparation kit, coloum*, inkubator dan almari kayu.

4.2.4 Kegiatan di Laboratorium PCR

a. Sterilisasi Alat

Peralatan yang digunakan di Laboratorium PCR BBAP Situbondo disterilisasi menggunakan *autoclave electric*. Peralatan tersebut meliputi : *disection sets, glasswares, mikrotipe, mikrotube, tabung appendorf dan pellet pestel. Disection sets, glasswares dan pellet pestel* dicuci terlebih dahulu dengan sabun dan dibilas dengan air bersih, dikeringkan, dibungkus kertas dan siap disterilisasi. Khusus untuk *pellet pestel*, setelah dicuci bersih terlebih dahulu direndam dalam larutan chlorin (dosis tidak pasti karena sesuai kebutuhan) selama

± 24 jam. Setelah itu dibilas dengan air hingga bau chlorin hilang. Sterilisasi *dissection sets*, juga bisa menggunakan alkohol 76% (sebagai desinfektan) setelah alat-alat tersebut dicuci bersih. Hal ini dilakukan karena jumlah alat yang terbatas dan pada satu kesempatan jumlah sampel yang diperiksa sangat banyak. Tabung *appendorf* dan mikrotube ditempatkan pada tempat yang tahan panas (dalam toples kaca) kemudian dibungkus kertas. Mikrotipe diletakkan pada rak mikrotipe dan siap disterilisasi.

Sterilisasi menggunakan *autoclave* adalah cara sterilisasi dengan uap panas bertekanan tinggi yaitu pada suhu 121°C dan tekanan 1 atmosfer selama kurang lebih 15 menit. Laboratorium PCR BBAP Situbondo menggunakan *autoclave electric* yang memiliki kelebihan antara lain : tanda waktu berakhirnya proses, mekanisme penurunan tekanan dan suhu dengan cepat serta penggunaan *aquadest* untuk proses sterilisasi tersebut. Kekurangan dari *autoclave* ini adalah kapasitasnya yang terbatas karena bentuknya yang lebih kecil.

b. Pengolahan Sampel Organ

Jumlah sampel dan cara pengambilan atau cara pengawetan sampel sangat penting dalam pemeriksaan PCR. Sampel yang rusak atau jumlah yang tidak mencukupi akan menyulitkan dalam pemeriksaan dan tentu saja berpengaruh terhadap hasil akhir. Pada dasarnya, semua bagian tubuh ikan atau udang dapat dipakai sebagai bahan untuk pemeriksaan PCR kecuali bagian tubuh yang keras karena sulit untuk dilakukan ekstraksi (Sunarto, 2003).

Berikut ini adalah jumlah dan jenis sampel sebagai bahan untuk pengujian

PCR :

No	Jenis Sampel	Jumlah	Pengolahan sampel
1.	Udang besar	-	Dipotong sebagian kaki renang/ lamela insang
2.	Post larva (PL)	150-200 ekor PL hidup untuk setiap bak pembenihan	-
3.	Naupli, zoea, mysis	@ 200 ekor	-
4.	Tokolan udang	30 ekor	-
5.	Telur ikan	150-200 butir	-
6.	Larva ikan	Minimal 30 ekor	-
7.	Benih ikan (> 4 cm)	-	Diambil organ mata dan otak

(Sumber : Laboratorium Kesehatan Ikan & Lingkungan BBAP Situbondo, 2005)

Keterangan :

- a. Tanda (-) pada kolom tiga berarti jumlah sampel tergantung dari jumlah bak sampel tersebut berasal.
- b. Tanda (-) pada kolom empat berarti semua organ/ semua bagian tubuh dapat dijadikan sebagai sampel.

Kondisi sampel bisa dalam keadaan hidup, mati (<12 jam), beku atau fiksasi dengan alkohol 96%. Ikan atau udang yang telah lama mati tidak dapat digunakan sebagai sampel. Panjang benih ikan diukur terlebih dahulu sebelum memulai proses ekstraksi.

4.2.5 Prosedur Operasional PCR

Saat ini telah banyak berkembang teknologi untuk mendeteksi dini adanya virus pada ikan maupun udang guna menghindari penyebaran yang lebih luas. Teknologi tersebut berkembang mulai dari histologi yang sederhana sampai dengan pengamatan mikroskop elektron. Metode yang saat ini berkembang pesat adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yaitu deteksi virus menggunakan material protein DNA/ RNA. Metode ini telah diterapkan secara luas baik pada udang maupun ikan karena tingkat akurasi yang cukup tinggi dan waktu yang cepat. Berikut ini disajikan mengenai keunggulan PCR dibanding metode deteksi virus yang lain (Murdjani *dkk*, 2003) :

No.	Metode Deteksi	Spesifitas	Sensitifitas	Biaya	Kecepatan & Waktu
1.	Histologi	++	+	+	+
2.	<i>Immuno-assay</i>	+++	++	+++	++++
3.	Hibridisasi	++	+	+	+
4.	PCR	++++	++++	++++	++++

Beberapa hal yang berkaitan dengan prosedur operasional PCR antara lain sebagai berikut :

a. Tujuan

1. Memberi petunjuk kepada pengguna tentang uji PCR dalam mendiagnosa penyakit ikan dan udang yang disebabkan oleh virus secara cepat.
2. Uji PCR digunakan untuk mendeteksi dini (*early warning system*) sebelum timbul gejala klinis pada benih ikan dan udang akibat penyakit yang disebabkan oleh virus.

3. Hasil uji PCR dapat digunakan untuk pernyataan sertifikasi benur/ benih bebas virus tertentu.

b. Teknik Operasional PCR

PCR merupakan teknik amplifikasi DNA sekuen tertentu melalui tiga tahapan yaitu ekstraksi asam nukleat, amplifikasi DNA dan elektroforesis. BBAP Situbondo menggunakan metode PCR IQ 2000TM yang diadopsi dari Farming IntelliGene Tech. Corp Taiwan. Keunggulan dari metode ini adalah dapat menentukan tingkat serangan (berat, sedang, ringan) dari sampel yang diuji dan membandingkannya dengan plasmid standart. Hasil dari PCR ini dapat diperoleh dalam waktu \pm 5-6 jam.

c. Hasil PCR

Hasil sintesa DNA dalam satu siklus dapat berperan sebagai cetakan (*template*) pada siklus berikutnya sehingga jumlah DNA target menjadi berlipat ganda pada akhir siklus. DNA target meningkat secara eksponensial sehingga setelah 30 siklus akan terjadi milyaran (2^{30}) amplifikasi DNA target dan DNA virus yang telah berlipat ganda jumlahnya tersebut dapat dideteksi dengan elektroforesis gel agarose. Hasil elektroforesis yang berupa band DNA dapat dilihat dengan alat *UV transiluminator* dan diabadikan dengan kamera polaroid setelah diwarnai dengan *Ethidium Bromide* (EtBr).

4.2.6 Materi dan Metode

a. Alat

No.	Alat	Fungsi
1.	<i>Disecting sets</i>	Mengambil organ/ sampel dan memotongnya menjadi bagian yang lebih kecil.
2.	<i>Pellet pestel</i>	Menghaluskan/ menggerus sampel dalam tabung <i>appendorf</i> .
3.	Penggaris	Mengukur panjang benih ikan sebelum proses ekstraksi.
4.	Tabung <i>appendorf</i>	Tempat sampel.
5.	Mikropipet	Mengambil dan mencampur <i>reagen</i> .
6.	Mikrotipe	Alat ukur dalam mengambil <i>reagen</i> .
7.	Mikrotube	Tempat hasil ekstraksi yang bercampur dengan reagen untuk proses amplifikasi.
8.	<i>Glasswares</i>	Tempat bahan-bahan kimia/ <i>reagen</i> .
9.	<i>Analitical balance</i>	Menimbang bahan.
10.	<i>Centrifuge</i>	Memisahkan antara endapan dan supernatan.
11.	<i>Vortex</i>	Menghomogenkan larutan.
12.	Panci kecil dan termometer	Menginkubasi sampel pada suhu 95°C saat ekstraksi DNA.
13.	<i>Thermal cycler</i>	Proses amplifikasi DNA.
14.	Unit elektroforesis	Proses elektroforesis.
15.	Gel dokumentasi	Untuk membaca dan mendokumentasikan hasil PCR.
16.	<i>Autoclave electric</i>	Sterilisasi peralatan.
17.	<i>Deep freezer (-20°C)</i>	Menyimpan sampel dan <i>test kit</i> PCR.
18.	<i>Hot plate</i> dan <i>stirer</i>	Pemanas (dilengkapi pengaduk dari magnet) yang berguna saat membuat gel agarose.
19.	<i>Laminar flow Biohazard Class II</i>	Ruangan steril untuk penambahan <i>reagen</i> amplifikasi DNA dan sebagai <i>human safety</i> .

20.	Sisir (<i>comb</i>) agarose	Sebagai cetakan untuk membuat gel agarose.
21.	Saringan	Menyaring benih ikan/ udang dari media air pembawanya.

b. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk proses PCR tersebut antara lain : *Lysis buffer*, etanol 95% dan 75%, DEPC ddH₂O, *RNA ext solution*, *chloroform* (CHCl₃), iso propanol (2-propanol), *First PCR premix*, *IQzyme DNA Polymerase*, *Nested PCR Premix*, *TAE buffer*, bubuk agarose, *DNA marker*, plasmid standart (positif standart), *6x Loading dye*, *Ethidium Bromide* (EtBr), *aquadest* dan plastik klip, *premixed reagen*, *RT PCR premix* dan *RT enzym mix*.

c. Metode PCR IQ 2000™

Pengujian PCR dengan metode IQ 2000™ di Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan BBAP Situbondo telah dapat mendeteksi empat macam virus yang menyerang udang dan kerapu yaitu *White Spot Syndrome Virus* (WSSV), *Taura Syndrome Virus* (TSV), *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV) pada udang serta *Viral Nervous Necrosis* (VNN) pada kerapu. Berikut ini adalah tahapan deteksi virus menggunakan metode PCR IQ 2000™ (Farming IntelliGene Tech. Corp, 2002) :

Ekstraksi Asam Nukleat

1. Ekstraksi DNA

- a. Sampel dimasukkan ke dalam *appendorf* 1,5 ml.
- b. 500 µl *Lysis buffer* atau *DNA extraction kit* dimasukkan ke dalam *appendorf*.
- c. Sampel dihancurkan dan diinkubasi pada suhu 95°C selama 10 menit

- d. Sampel disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit.
- e. Supernatan diambil sebanyak 200 μ l dan dipindahkan ke dalam *appendorf* yang baru.
- f. Ethanol 95% sebanyak 400 μ l ditambahkan ke dalam *appendorf* kemudian *divortex*.
- g. Larutan tersebut disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit.
- h. Ethanol dibuang dan pellet dikeringkan.
- i. Pellet tersebut dilarutkan dengan DEPC ddH₂O kemudian *divortex*.

Sampel	Volume DEPC ddH ₂ O
Mata	100 μ l
Post larva (PL) dan kaki renang	@ 200 μ l
Insang	50 μ l

2. Ekstraksi RNA

- a. Sampel dimasukkan ke dalam *appendorf* 1,5 ml.
- b. RNA *ext solution* sebanyak 500 μ l ditambahkan ke dalam *appendorf*.
- c. Sampel dihancurkan kemudian didiamkan selama 5 menit.
- d. Ditambah dengan *chloroform* (CHCl₃) sebanyak 100 μ l kemudian *divortex*.
- e. Disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit.
- f. Supernatan sebanyak 200 μ l dipindahkan ke dalam *appendorf* yang baru kemudian ditambah dengan 200 μ l 2-propanol (iso propanol) dan *divortex*.
- g. Disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit kemudian iso propanol dibuang.
- h. Pellet yang tertinggal ditambah 500 μ l ethanol 75% dan disentrifuse dengan kecepatan 9000 rpm selama 5 menit.

- i. Ethanol dibuang dan pellet dilarutkan dengan DEPC ddH₂O kemudian *divortex*.

Sampel	Volume DEPC ddH ₂ O
Post larva (PL)	500 µl
Insang	200 µl

Ekstraksi DNA dilakukan untuk virus DNA yaitu WSSV dan IHNV sedangkan untuk ekstraksi RNA dilakukan untuk virus RNA yaitu TSV dan VNN.

Amplifikasi DNA

- Sampel atau larutan standart sebanyak 2 µl dimasukkan ke dalam mikrotube 200 µl.
- Reagen First PCR* sebanyak 8 µl ditambahkan ke dalam masing-masing tube kemudian *divortex*.
- Proses amplifikasi dimulai pada tahap 1 (*First PCR*).
- Setelah tahap 1 berakhir ditambah dengan *Nested PCR* sebanyak 15 µl dan *running* untuk proses amplifikasi tahap 2.
- Setelah tahap 2, masing-masing sampel dalam tube ditambah dengan 5µl *Loading dye* dan setelah tercampur sampel siap dielektroforesis.

Reagen Amplifikasi DNA :

Reagen	WSSV	IHNV	TSV	VNN
<i>First PCR</i>	<i>First PCR</i>	<i>Pre-mixed</i>	RT PCR	RT PCR
	<i>Premix 7,5 µl,</i> <i>IQzyme DNA</i>	<i>reagent 12,5</i> <i>µl, IQzyme</i>	<i>Premix 7,0 µl,</i> <i>IQzyme DNA</i>	<i>Premix 7,0 µl,</i> <i>IQzyme DNA</i>

	<i>polymerase</i>	DNA	<i>polymerase</i>	<i>polymerase</i>
	0,5 μ l	<i>polymerase</i>	0,5 μ , RT	0,5 μ , RT
		0,5 μ l	<i>enzym mix</i> 0,5 μ l	<i>enzym mix</i> 0,5 μ l

Catatan :

1. Amplifikasi DNA untuk IHHNV hanya melalui 1 tahap saja (1 *step*) dan larutan *reagen* sebanyak 13 μ l.
2. *Reagen Nested PCR* untuk WSSV, TSV dan VNN adalah sama yaitu : *Nested PCR Premix* 14 μ l dan *IQzyme DNA polymerase* 1 μ l.

Suhu Amplifikasi DNA :

1. WSSV

a). *First PCR*

- I. 94°C x 30 detik 62°C x 30 detik 72°C x 30 detik 5x
- II. 94°C x 15 detik 62°C x 15 detik 72°C x 20 detik 15x
- III. 72°C x 30 detik 20°C x 30 detik
- IV. 4°C

b). *Nested PCR*

- I. 94°C x 20 detik 62°C x 20 detik 72°C x 30 detik 30x
- II. 72°C x 30 detik 20°C x 30 detik
- III. 4°C

2. IHHNV

- I. 94°C x 20 detik 70°C x 20 detik 10x
- II. 94°C x 20 detik 56°C x 20 detik 72°C x 30 detik 35x
- III. 72°C x 30 detik 20°C x 30 detik
- IV. 4°C

3. TSV

a). *First* PCR

- I. 42°C x 30 detik 94°C x 2 menit
- II. 94°C x 20 detik 62°C x 20 detik 72°C x 30 detik 15x
- III. 72°C x 30 detik 20°C x 30 detik
- IV. 4°C

b). *Nested* PCR

- II. 94°C x 20 detik 62°C x 20 detik 72°C x 30 detik 30x
- III. 72°C x 30 detik 20°C x 30 detik
- IV. 4°C

4. VNN

a). *First* PCR

- I. 42°C x 30 menit 94°C x 2 menit
- II. 94°C x 30 detik 62°C x 30 detik 72°C x 30 detik 20x
- III. 72°C x 30 detik 20°C x 30 detik
- IV. 4°C

b). *Nested* PCR

II. 94°C x 20 detik 62°C x 20 detik 72°C x 30 detik 30x

III. 72°C x 30 detik 20°C x 30 detik

IV. 4°C

Elektroforesis

- a. 0,5 TAE *buffer* dimasukkan ke dalam *gel box*.
- b. Agarose dimasukkan ke dalam *gel box*.
- c. Sampel/ standart yang telah tercampur dengan *Loading dye* diambil sebanyak 8µl dan dimasukkan ke dalam sumur agarose.
- d. DNA marker sebanyak 5µl dimasukkan ke dalam sumur agarose dan *running* selama 25 menit.

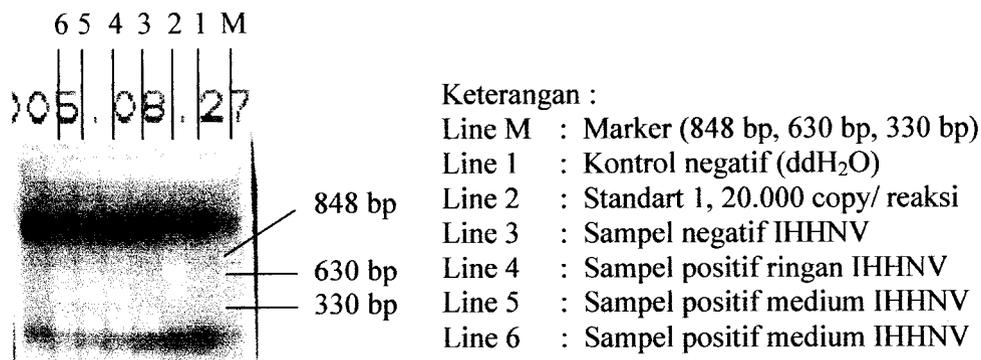
Pewarnaan dan Pembacaan Hasil Elektroforesis

- a. Larutan stok *Ethidium Bromide* (EtBr) sebanyak 10 µl dimasukkan ke dalam 100 ml *aquadest*.
- b. Agarose hasil elektroforesis direndam dengan larutan EtBr tersebut dalam plastik klip selama 10 menit.
- c. Agarose dikeluarkan dan dicuci dengan *aquadest* selama 10 menit (pencucian berulang).
- d. Agarose diamati di atas UV *transiluminator*.
- e. Dokumentasi dilakukan dengan *polaroid gel documentation*.

Catatan : Setelah beberapa kali penggunaan, TAE *buffer* dalam tangki elektroforesis dan juga larutan stok EtBr harus diganti. Penggunaan

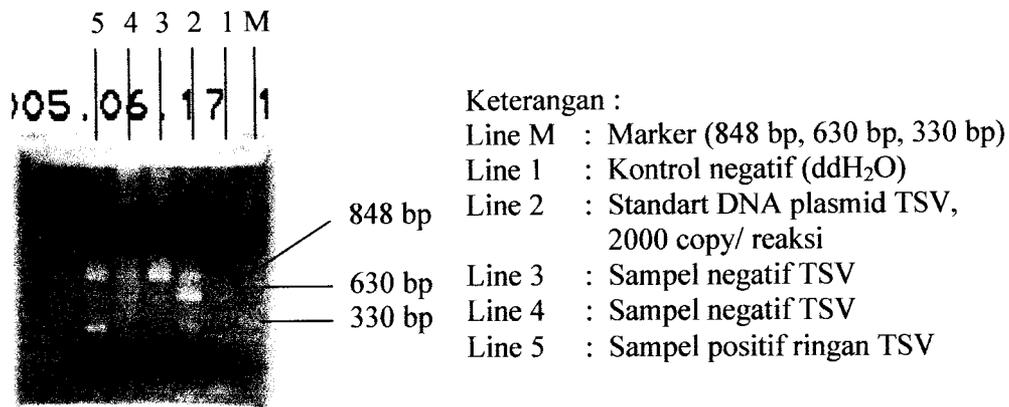
sarung tangan mutlak dilakukan mengingat EtBr bersifat karsinogenik.

Berikut ini adalah beberapa hasil elektroforesis baik dari WSSV, IHHNV, TSV maupun VNN dimana pembacaan hasil tersebut didasarkan pada instruksi manual dari Farming IntelliGene Tech. Corp tahun 2002.



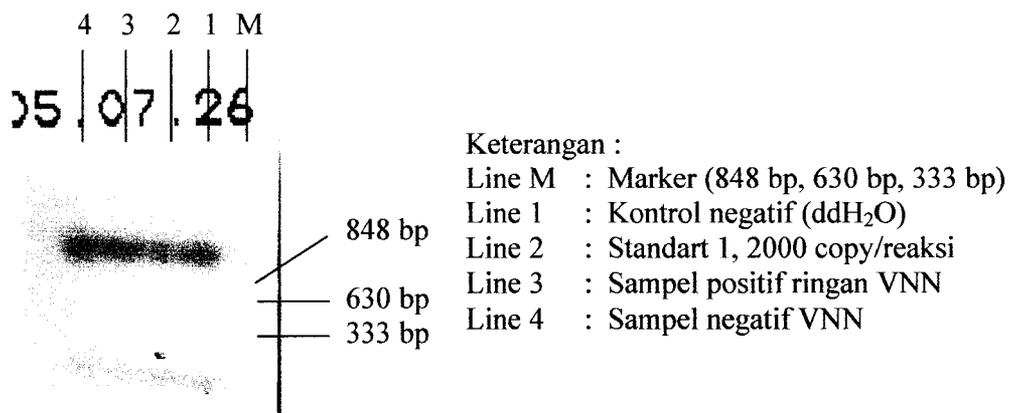
Gambar 1. Hasil Elektroforesis IHHNV

Line 2 merupakan kontrol positif berat IHHNV dimana dua dari tiga band DNA terletak pada 438 dan 644 bp. Line 4 adalah sampel udang yang terinfeksi IHHNV pada taraf ringan dimana band DNA yang terbentuk sejajar dengan kontrol positif pada 438 bp sedangkan infeksi medium IHHNV pada line 5 dan 6, band DNA berada pada 438 dan 644 bp sejajar dengan kontrol positif. Pada line 3 merupakan sampel yang tidak terinfeksi IHHNV dimana band DNA yang terbentuk terletak pada 243 bp sebagaimana pula pada line 4, 5 dan 6 yang tidak sejajar dengan kontrol positif adalah DNA udang yang masih terbawa dari hasil ekstraksi DNA dan ikut teramplifikasi.



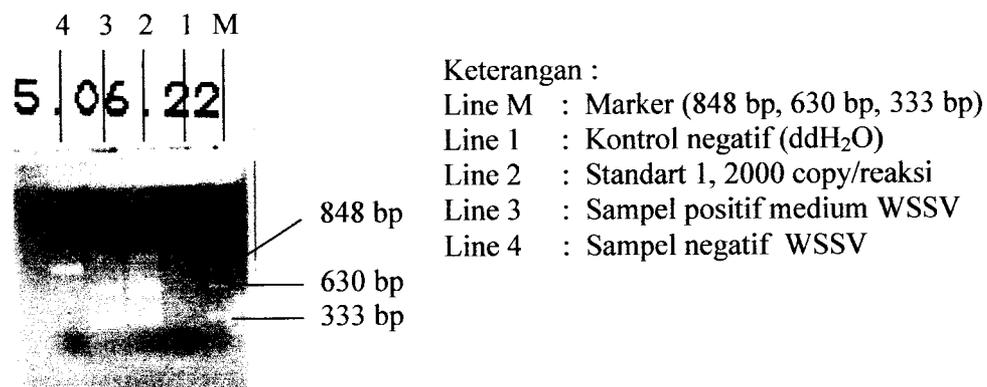
Gambar 2. Hasil Elektroforesis TSV

Line 2 sebagai kontrol positif berat TSV, dua dari tiga band DNA terletak pada 284 dan 476 bp. Line 3 menunjukkan sampel udang yang tidak terinfeksi TSV meskipun letak band sejajar dengan kontrol positif namun band tersebut berada pada 680 bp, dimana merupakan mRNA untuk β -actin dari udang sedangkan line 5 menunjukkan sampel yang terinfeksi TSV pada taraf ringan dimana salah satu band yang terbentuk berada pada 284 bp sejajar dengan kontrol positif.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis VNN

Line 2 merupakan kontrol positif berat VNN dimana band-band DNA terletak pada 289, 479 dan 1160 bp. Line 3 adalah sampel kerapu yang terinfeksi VNN pada taraf ringan dimana band yang terbentuk pada 289 bp letaknya sejajar dengan kontrol positif sedangkan pada line 4 adalah sampel negatif VNN dimana band yang letaknya tidak sejajar dengan kontrol positif pada 665 bp merupakan DNA dari kerapu.



Gambar 4. Hasil Elektroforesis WSSV

Line 2 adalah kontrol positif berat WSSV dimana dua dari tiga band DNA terletak pada 296 dan 550 bp. Line 3 menunjukkan sampel udang yang terinfeksi WSSV pada taraf medium karena dua band DNA yang terbentuk terletak pada 296 dan 550 bp sejajar dengan kontrol positif sedangkan line 4 adalah sampel negatif WSSV karena band terletak pada 848 bp yang merupakan DNA udang.

Selama bulan Agustus 2005 terdapat kejadian positif WSSV sebanyak 9,47% dari 95 sampel, positif IHNV sebanyak 45,16% dari 45 sampel, positif TSV sebanyak 8,14% dari 86 sampel udang (post larva, naupli, tokolan dan induk) serta positif VNN sebanyak 8,18% dari 22 sampel kerapu (benih kerapu tikus dan kerapu macan serta telur). Meskipun jumlah sampel turut berpengaruh

dalam penghitungan prosentase kejadian positif, dapat dikatakan bahwa persen kejadian positif terbanyak adalah IHHNV yaitu sebesar 45,16% (mendekati 50%) dibanding ketiga jenis virus lainnya yang rata-rata hanya memiliki persen kejadian positif kurang dari 10%. Hal ini dapat terjadi karena IHHNV untuk *Litopenaeus vanamei* termasuk penyakit udang yang bersifat kronis. *Runt Deformity Syndrome* (RDS) yang ditemukan pada spesies tersebut ternyata mengarah ke IHHNV. Juvenil udang dengan gejala RDS menunjukkan tanda-tanda antara lain : perubahan bentuk pada rostum, antenula mengalami pengkerutan serta kutikula udang menjadi kasar. Juvenil udang dengan gejala RDS relatif banyak terjadi pada ukuran udang yang lebih kecil dari yang semestinya, dimana koefisien variasi atau CV (ditentukan dari nilai rata-rata sekelompok udang dengan ukuran tertentu dalam populasi) untuk populasi dengan gejala RDS ternyata lebih dari 30% dan hampir mencapai 50% sedangkan untuk untuk populasi yang bebas IHHNV hanya berkisar antara 10-30% (Lightner,1996).

Sampel-sampel tersebut mayoritas berasal dari Situbondo dan Banyuwangi karena pada daerah tersebut banyak terdapat sentra pembenihan dan budidaya. Namun dari kesemuanya yang terpenting adalah sudah ada kesadaran dari para pembudidaya untuk melakukan *screening* benih ikan maupun udang sebelum tebar.

4.2.7 Permasalahan atau Hambatan

a. Permasalahan Teknis

Pembacaan hasil PCR merupakan tahap akhir sekaligus sebagai penentu keberhasilan pengujian dengan PCR. Semua proses dilakukan pada kondisi

aseptis. Bila terjadi kontaminasi, keseluruhan proses akan terganggu dan harus dilakukan pengujian ulang. Permasalahan teknis yang sering muncul adalah sebagai berikut :

1. Muncul pita (*band*) pada kontrol negatif yang seharusnya tidak memunculkan *band*. Hal ini disebabkan karena terjadi kontaminasi saat penambahan *reagen* untuk proses amplifikasi DNA.
2. *Band* DNA terlihat melebar (*smear*). Hal ini dapat terjadi karena pengenceran hasil ekstraksi dengan DEPC ddH₂O masih terlalu pekat dan jika terjadi sebaliknya, maka *band* DNA terlihat samar.

b. Permasalahan Non Teknis

Permasalahan non teknis yang dihadapi adalah masih kurangnya jumlah sumberdaya manusia dan kualitas sumberdaya manusia yang sudah ada perlu ditingkatkan lagi.

4.2.8 Rekomendasi

a. Tindakan Preventif

Sampai sejauh ini pengendalian penyakit viral hanya dapat dilakukan dengan cara deteksi dan pencegahan dini. Tindakan-tindakan tersebut antara lain :

1. Menggunakan benih dan induk yang unggul yaitu *Specific Pathogen Free* (SPF) dan *Specific Pathogen Resistance* (SPR),
2. Menggunakan air, peralatan dan sarana lainnya yang benar-benar steril,

3. Mengurangi penyebab stres (meminimalkan tingkat kepadatan ikan, fluktuasi suhu air dan ketinggian air, penggunaan aerasi serta pemberian pakan yang berkualitas).
4. Pemantauan secara rutin di tambak,
5. Meningkatkan daya tahan tubuh ikan maupun udang (pemberian vitamin, vaksinasi serta immunostimulan).

b. Monitoring

1. Penggunaan benih yang unggul (SPF dan SPR),
2. *Screening* benih sebelum tebar. Jika hasil PCR negatif, perlu dilakukan tes ulang PCR setelah 4 minggu atau bila terlihat gejala abnormal pada ikan atau udang. Benih dapat terus ditebar/ dibudidayakan jika hasil PCR positif ringan dengan syarat perbaikan manajemen lingkungan, perbaikan kualitas pakan, pemberian immunostimulan dan *feed additive* lain yang dapat meningkatkan kekebalan benih terhadap serangan virus. Selanjutnya, tes ulang PCR dilakukan setiap 2 minggu sekali. Jika hasil PCR positif berat, benih tersebut tidak layak tebar dan harus segera dimusnahkan.
3. Melakukan pemantauan secara rutin di tambak dan kegiatan *sampling* selama masa pemeliharaan atau pembudidayaan,
4. Kegiatan tebar benih dapat dilakukan lagi satu bulan setelah panen karena sebelumnya tambak harus direklamasi (pembalikan tanah, pengeringan, pengapuran dan pemupukan) agar daya dukung tanah tersebut tetap optimal bagi usaha budidaya.