

Deteksi *White Spot Syndrome Virus* pada Lobster menggunakan Primer Kit IQ2000™

Detection of White Spot Syndrome Virus in Lobsters with Primer Kit IQ2000™

Nandar Hidayat¹, Andi Magfira Satya Apada¹, Danawir Alwi¹, Rini Amriani², Fedri Rell^{2*}

¹Program Profesi Dokter Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

²Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

*Corresponding author, Email: fedrirell@unhas.ac.id

Naskah diterima: 9 Agustus 2022, direvisi: 7 September 2023, disetujui: 20 Oktober 2023

Abstract

Lobster is one type of food that is the highest export commodity. Lobsters can be infected by White Spot Syndrome Virus which causes death and economic loss. This study was to detect the presence of *White Spot Syndrome Virus* infection in lobsters at the Makassar Fish Quarantine and Quality Control Center. A total of 3 samples of lobster *Panulirus spp* were examined molecularly. The detection of *White Spot Syndrome Virus* was carried out using the *Primer Kit IQ2000™* on the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) machine. Positive samples infected with *White Spot Syndrome Virus* were indicated by bands on the agar gel with sizes of 296 bp and 550 bp, negative samples if the band formed was at 848 bp. The results obtained after electrophoresis of samples on 1% agaros gel were found to have bands measuring 848 bp which showed negative results. Based on the test results above, it can be concluded that the three lobster samples examined at the Makassar Fish Quarantine and Quality Control Center were not infected with the *White Spot Syndrome Virus*.

Keywords: lobster; PCR; Primer Kit IQ2000™; WSSV

Abstrak

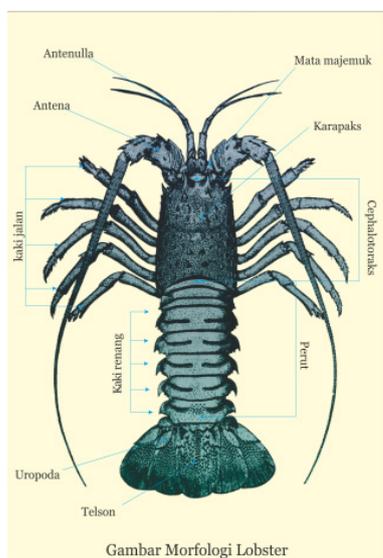
Lobster adalah salah satu jenis bahan pangan yang menjadi komoditas ekspor tertinggi. Lobster dapat diinfeksi oleh *White Spot Syndrome Virus* yang menyebabkan kematian dan kerugian ekonomi. Penelitian ini untuk mendeteksi adanya infeksi *White Spot Syndrome Virus* pada lobster di Balai Besar Karantina Ikan dan Pengendalian Hasil Mutu Makassar. Sebanyak 3 sampel lobster *Panulirus spp* diperiksa secara molekuler. Deteksi *White Spot Syndrome Virus* dilakukan dengan menggunakan *Primer Kit IQ2000™* pada mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sampel positif terinfeksi *White Spot Syndrome Virus* ditandai dengan pita pada agar gel yang terbentuk dengan ukuran 296 bp dan 550 bp, sampel negatif jika pita yang terbentuk berada pada 848 bp. Hasil yang diperoleh setelah elektroforesis sampel pada gel agaros 1% ditemukan adanya pita yang berukuran 848 bp yang menunjukkan hasil negatif. Berdasarkan hasil pengujian di atas dapat disimpulkan bahwa ketiga sampel lobster yang diperiksa di Balai Besar Karantina Ikan dan Pengendalian Hasil Mutu Makassar tidak terinfeksi *White Spot Syndrome Virus*.

Kata kunci: lobster; PCR; Primer Kit IQ2000™; WSSV

Pendahuluan

Lobster merupakan salah satu jenis bahan pangan yang dikonsumsi oleh masyarakat luas baik lokal maupun internasional. Kebutuhan dan permintaan lobster di Indonesia terus meningkat tiap tahunnya. Indonesia menjadi negara utama pengekspor lobster di ASEAN. Terdapat enam jenis lobster di perairan Indonesia yang berasal dari marga *Panulirus spp.* Pesatnya perkembangan kegiatan budidaya laut di beberapa kawasan dapat mengakibatkan kerusakan habitat ataupun ekosistem laut jika tidak dikelola dengan arif dan bijaksana (Setyowati *et al.*, 2013).

Lobster merupakan salah satu kelompok *crustacea*. Lobster merupakan jenis hewan invertebrata yang memiliki kulit yang keras dan tergolong dalam kelompok *arthropoda*, memiliki 5 fase hidup mulai dari proses produksi sperma telur, kemudian fase larva, post larva, juvenil, dan dewasa. Secara umum (gambar 1) lobster dewasa dapat ditemukan pada hamparan pasir yang terdapat spot-spot karang dengan kedalaman antara 5–100 meter, bersifat nokturnal, dan melakukan proses *moulting* (pergantian kulit) (Baharawi *et al.*, 2015).



Gambar 1. Bagian-Bagian Tubuh Lobster (Baharawi *et al.*, 2015)

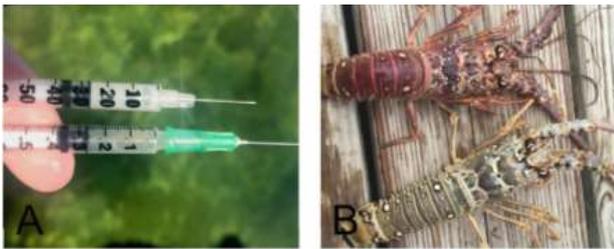
Berbagai masalah dapat ditemukan dalam budidaya lobster mulai dari manajemen pakan dan kebutuhan oksigen hingga adanya agen infeksi. Adanya agent penyakit akan mengganggu kesehatan yang menyebabkan kualitas daging lobster menurun bahkan dapat

menimbulkan kematian. Salah satu agen penyakit yang sering dilaporkan menginfeksi lobster yaitu infeksi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV).

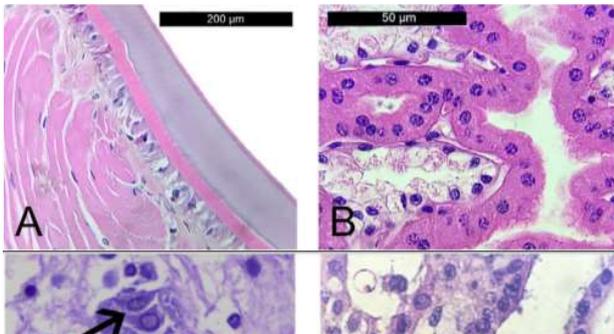
White Spot Syndrome Virus (WSSV) merupakan patogen yang sering menginfeksi bangsa krustasea. Virus ini memiliki ukuran panjang antara 210 - 420 nm dengan diameter 70 – 167 nm. Materi genetik virus tersusun atas asam deoksiribonukleat untai ganda (double stranded DNA) yang dibungkus amplop. Infeksi oleh WSSV pada lobster ditandai dengan adanya bercak – bercak putih dengan diameter 0,5-2 mm pada bagian *cephalothorax* sampai menyebar ke seluruh tubuh. Dampak infeksi WSSV dapat menyebabkan kematian hingga 100% (Pranawaty *et al.*, 2012).

White Spot Syndrome Virus (WSSV) adalah penyakit utama pada udang dan lobster, yang telah menyebabkan tingkat kematian yang tinggi dan kerugian ekonomi bagi negara-negara petani udang besar di Asia Tenggara, Amerika Tengah, dan Amerika Selatan bagian selatan. WSSV adalah patogen yang ditemukan dalam spesies udang *penaeidae* yang berbeda termasuk *P. monodon*, *P. japonicus*, dan *L. vannamei*, serta krustasea lainnya, seperti lobster, kepiting, dan udang karang (OIE, 2013). Organ yang terinfeksi virus yaitu kaki renang, kaki jalan, insang, lambung, otot abdomen, gonad, intestinum, karapas, dan jantung sehingga menimbulkan infeksi yang sistematis atau menyeluruh (Yanti *et al.*, 2017).

Lobster yang terinfeksi WSSV akan menunjukkan tanda klinis letargi, anoreksia, dan kematian. Infeksi lanjutan dari WSSV dapat menyebabkan penurunan total hemosit dan kegagalan penggumpalan *hemolymph* (Gambar 2). Tanda klinis lain yang muncul adalah karapas yang kotor dan berwarna matang kemerahan serta bintik – bintik putih yang tertanam pada karapas disertai perubahan warna menjadi merah muda atau coklat kemerahan. Pemeriksaan histologis insang, kelenjar antena, usus, dan epitel kutikula lobster yang terinfeksi WSSV (Gambar 3) menunjukkan sel-sel yang mengalami degenerasi yang ditandai dengan oleh inti hipertrofi atau tidak teratur dengan badan inklusi intranuklear basofilik (Ross *et al.*, 2019).



Gambar 2. (a) *Hemolymph*. *Hemolymph* yang terinfeksi WSSV terlihat berwarna putih keruh (*syringe* atas) sedangkan yang normal berwarna biru keabuan jernih (*syringe* bawah). (b) Karapas. Karapas yang terinfeksi menunjukkan warna merah (atas) dibandingkan dengan lobster normal (bawah) (Ross *et al.*, 2019).



Gambar 3. Gambaran histologi infeksi WSSV. (a) Jaringan epitel kutikula dan karapas yang normal. (b) Kelenjar antenna yang normal. (c) Epitel kutikula dan jaringan ikat di bawahnya yang terinfeksi WSSV. (d) Epitel kelenjar antenna yang terinfeksi WSSV. Sel yang terinfeksi ditandai dengan tanda panah hitam (Ross *et al.*, 2019) (Pewarnaan Harris-Hematoxylin dan Alcoholic Eosin) (50 µm).

White Spot Syndrome Virus (WSSV) dapat menular melalui air dari tambak udang yang melakukan panen lebih awal oleh karena terserang WSSV dan membuang air tambak ke saluran tanpa treatment terlebih dahulu. Demikian pula adanya penggantian air secara rutin tanpa memperhatikan aktivitas yang dilakukan oleh tambak di sekitarnya, sehingga akan memperbesar peluang penularan virus tersebut. Hal ini disebabkan oleh karena saluran pemasukan dan pembuangan digunakan secara bersamaan. Esparza *et al.*, (2009) dalam Tampangallo *et al.*, (2017) melaporkan bahwa air dari tambak yang positif terdeteksi mengalami infeksi WSSV dapat menginduksi terjadinya infeksi WSSV. Penyebaran virus WSSV menjadi sangat mudah oleh karena beberapa organisme air telah dilaporkan dapat menjadi pembawa virus ini seperti kepiting dan ikan liar dalam saluran air/tambak (Tompo *et al.*, 2013 dalam Tampangallo *et al.*, 2017).

Identifikasi keberadaan virus dapat dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik ini yang bekerja secara spesifik dan sensitif terhadap agen penyebab penyakit. Agen penyebab penyakit yang belum menunjukkan gejala klinis dapat terdeteksi menggunakan teknik tersebut karena materi genetik penyebab penyakit dapat digandakan sehingga dapat terdeteksi keberadaannya (Sukenda *et al.*, 2009 dalam Kurniawan *et al.*, 2015). Deteksi diawali dengan melakukan ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA memiliki fungsi sebagai *template* untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. *Template* DNA dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid, ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA *template* tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju (Handoyo and Rudiranto, 2000).

Deteksi WSSV pada lobster yang dipasarkan dengan menggunakan teknik PCR sangat penting dilakukan karena tanda klinis berupa perubahan yang terlihat pada *eksoskeleton* bukan menjadi metode diagnostik yang andal. Hasil deteksi dengan teknik PCR ini akan menambah khazanah ilmiah mengenai adanya infeksi WSSV pada lobster di Makassar sehingga dapat menjadi bahan pertimbangan bagi instansi terkait dalam penanggulangan penyakit pada lobster serta peningkatan pengawasan lalu lintas perdagangan hasil budidaya perikanan.

Materi dan Metode

Pengambilan sampel dilakukan pada tambak lobster yang akan dikirim ke daerah lain. Deteksi *White Spot Syndrome Virus* pada insang lobster menggunakan teknik PCR dengan *primer kit* IQ2000™ (gambar 4) di Balai Besar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan Makassar. Sampel adalah 3 ekor lobster dari marga *Panulirus spp.* Sampel berupa insang lobster diperiksa dan dipreparasi untuk pemeriksaan virus secara bertahap yaitu: (1) Ekstraksi DNA virus. Tahap pemeriksaan WSSV dengan teknik PCR dimulai dengan ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan metode *DNeasy Blood and Tissue Kit*. Insang lobster dipotong sebanyak 100-200 mg dan digerus. Setelah proses ekstraksi selesai dengan durasi sekitar 2 jam 8 menit maka larutan dari

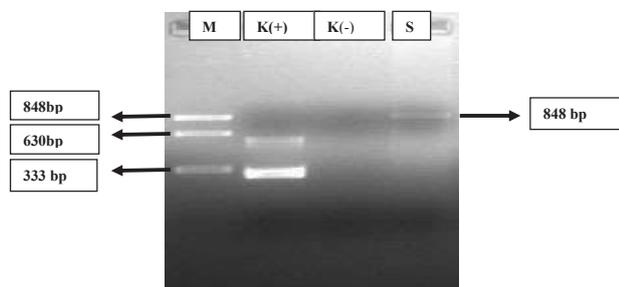
hasil sentrifugasi akhir dilanjutkan dengan amplifikasi pada mesin PCR. (2) Amplifikasi. Amplifikasi dilakukan dengan metode *nested* PCR. Proses amplifikasi ini terdiri atas dua tahap (*nested* PCR) yang dilakukan berdasarkan OIE (2009). Hasil amplifikasi DNA virus pada mesin PCR dilanjutkan dengan teknik elektroforesis. (3) Elektroforesis. Tahap ini merupakan tahap terakhir untuk melihat pita – pita DNA virus pada pada gel agarose 1%. Setelah proses elektroforesis selesai, maka dilakukan pembacaan pita DNA yang muncul menggunakan *UV-transiluminator*.



Gambar 4. *Primer Kit IQ2000™*. (a) *First PCR PreMix*, *Nested PCR PreMix*, P(+) Standard, IQzyme DNA Polimerase. (b) Kit IQ2000™ WSSV (dokumentasi pribadi).

Hasil dan Pembahasan

Hasil pemeriksaan dengan PCR yang telah dielektroforesis pada gel agarose 1% menunjukkan bahwa pita yang muncul pada sampel berukuran 848 bp (base pair) (gambar 5). Ukuran pita DNA yang muncul pada sampel adalah pita DNA yang dimiliki oleh lobster dan bukan DNA WSSV.



Gambar 5. Hasil elektroforesis. M. marker : penanda ukuran pita (333 bp, 630 bp, 848 bp); K(+). Kontrol Positif (296 bp, 550 bp); K(-). Kontrol negatif; dan S. Sampel

Deteksi WSSV pada lobster menggunakan teknik PCR merupakan salah satu teknik mendiagnosa mutakhir. Teknik ini memiliki spesifitas dan sensitivitas yang tinggi untuk

mendeteksi agen penyakit. Materi genetik yang terbaca pasca elektroforesis bersifat spesifik sehingga hasilnya tidak dapat ditolak.

Deteksi materi genetik WSSV diawali dengan melakukan ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA bertujuan untuk *template* pembentukan molekul DNA baru yang sama. *Template* DNA berbeda – beda untuk setiap jenis agen penyakit. Proses ekstraksi DNA dilakukan dengan mengambil sampel berupa insang lobster yang telah dipreparasi sebanyak 20 mg ke dalam *microtube* 1,5 ml kemudian ditambahkan dengan 500 µl *lysis buffer* yang berguna untuk menjaga struktur DNA selama proses lisis dan pemurnian (Iqbal *et al.*, 2016). Insang merupakan organ predileksi virus sehingga isolasi WSSV banyak dilaporkan diambil dari organ tersebut. DNA virus diperoleh setelah sel insang lisis.

Teknik PCR merupakan proses amplifikasi atau perbanyakan rantai DNA WSSV. Amplifikasi atau perbanyakan DNA target dimaksudkan untuk meningkatkan jumlah DNA target yang ada sehingga dapat dideteksi dengan elektroforesis. Amplifikasi DNA dilakukan dengan bantuan *thermocycler* atau yang lebih dikenal dengan alat PCR. Proses PCR terdiri beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA *template*; (2) denaturasi DNA *template*; (3) penempelan primer pada *template* (*annealing*); (4) pemanjangan primer (*extension*) dan (5) pemantapan (*post extension*). Tahap ini berulang pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Pranawaty *et al.*, 2012). Duplikasi DNA bertujuan agar untai DNA WSSV menjadi banyak dan terbaca pada saat dielektroforesis.

Elektroforesis atau polimorfisme protein merupakan salah satu metode cepat yang dapat digunakan untuk mendapatkan informasi keragaman genetik melalui pola-pola protein dan enzim yang ditunjukkan. Metode ini juga dikenal sebagai genetik marka, yaitu suatu cara pelacakan material genetik dari suatu cara pelacakan material genetik dari suatu protein atau enzim sebagai pengendali gen pada individu. Hasil elektroforesis yang terlihat adalah terbentuknya pita yang merupakan fragmen DNA hasil amplifikasi (Kurniawan and Kurniawan., 2012). Adapun hasil yang diperoleh ketika melakukan pengujian WSSV terhadap insang lobster yaitu bernilai negatif, dikarenakan sampel yang diuji berada pada 848 bp. Menurut

OIE (2014), sampel akan bernilai positif jika pita terbentuk pada 296 bp dan/atau 550 bp dan bernilai negatif jika pita yang terbentuk berada pada 848 bp. Hal ini menunjukkan bahwa lobster yang diperiksa tidak terinfeksi virus WSSV.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh setelah melakukan pengujian WSSV terhadap insang lobster di Balai Besar Karantina Ikan dan Pengendali Hasil Mutu Makassar diperoleh hasil yaitu pita yang terbentuk pada pembacaan PCR berada pada 848 bp. Hasil ini menunjukkan bahwa lobster yang diperiksa bebas dari infeksi virus WSSV.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih banyak kepada Kepala Balai Besar Karantina Ikan dan Pengendali Hasil Mutu Makassar yang telah membarikan izin mahasiswa pendidikan profesi dokter hewan untuk melaksanakan kegiatan magang sehingga dapat melakukan pemeriksaan terhadap lobster di laboratorium penguji. Penulis juga tidak lupa mengucapkan terima kasih banyak kepada para pembimbing yang telah menuntun dalam penulisan dan penerbitan jurnal ini.

Daftar Pustaka

Baharawi, S., Lutfy, A., Rustam, E., Duranta D., Kembaren., Fuad, H., Warsito., Siswanto., Jimmi., and Prabowo. (2015). *Seri Panduan Perikanan Skala Kecil Perikanan Lobster Laut Panduan Penangkapan dan Penanganan*. WWF-Indonesia, Jakarta Selatan.

Handoyo, D., and Rudiretna, A. (2000). Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (*Pcr*) [General Principles And Implementation Of Polymerase Chain Reaction]. *Unitas*. Vol. 9. No. 1. PP: 19-29

Iqbal, M., Ibnu, D.B., and Nia, K. (2016). Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus (WSSV) Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan Kelautan*. 7 (1): 54-65.

Kurniawan, A and Kurniawan, A. (2012). Analisis Variasi Genetik Ikan di Kolong Pascatambang Timah dengan Metode Elektroforesis. *Jurnal Sumberdaya Perairan* . 6 (2): 6-10.

Kurniawan, K., Arifuddin, T., and Ince, A.K.K. (2015). Kajian Masa Kritis Penyakit WSSV di Saluran Pertambakan Kecamatan Pulokerto, Pasuruan dan Kecamatan Pasir Putih, Situbondo. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. 489-497.

OIE. (2013). IQ2000™ WSSV Detection and Prevention System Instruction Manual. Office International des Epizooties (OIE). Retrieved Juni 2021. <https://www.oie.int/app/user27s-manual-iq2000>

OIE. (2009). *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 6th Ed*. World Organization for Animal; 6th edition, Paris.

Pranawaty, R.N., Ibnu, D.B., and Evi, L. (2012). Aplikasi Polymerase Chain Reaction (PCR) Konvensional dan Real Time PCR untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus pada Kepiting. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 3 (4): 2088-3137.

Rahma, H.N., Slamet, B.P., and Alfabetian, H.C.H. (2014). Infeksi White Spot Syndrom Virus (WSSV) pada Udang Windu (*Penaeus monodon* fabr.) yang Dipelihara pada Salinitas Media yang Berbeda. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3 (3): 25-34.

Ross, E.P., Behringer, D.C., and Bojko, J. (2019). White Spot Syndrome Virus and the Caribbean Spiny Lobster, *Panulirus argus*: Susceptibility and Behavioral Immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 162 : 1-9

Setyowati, D.N., Diniarti, N., and Waspodo, S. (2013). Budidaya Lobster (*Panulirus Homarus*) dan Abalon (*Haliotis* sp.) dengan Sistem Integrasi di Perairan Teluk Ekas. *Jurnal Kelautan*. 6 (2): 1337-141.

Sunarno., Fauzul, M., Nyoman, F., Amarila, M., Anis, K., and Amin, S. (2014). Metode

- Cepat Ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheriae* untuk Pemeriksaan PCR. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 42 (2): 85 – 92.
- Tampangallo, B.R., Herlinah and Muhammad, C.U. (2017). Insidensi dan Prevalensi Infeksi White Spot Syndrome Virus pada Plankton di Tambak Budidaya Udang. *Jurnal Riset Akuakultur*. 12 (4) : 361-367.
- Wahyuni, K.D. (2019). Analisis Kualitatif DNA Virus Hepatitis B dari Sampel Darah Hepatitis B Surface Antigen Positif dengan Teknik Polymerase Chain Reaction. *Skripsi*. Politeknik Kesehatan Kemenkes Denpasar, Bali.
- Yanti, M.E.G., Nurlaila, E.H., Bertoka F.S.P.N., Maya, A.F.U. (2017). Deteksi Molekuler White Spot Syndrome Virus (WSSV) pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) di PT. Hasfam Inti Sentosa. *Jurnal Enggano*. 2 (2) : 2527-5186.