

EFEKTIVITAS PERLINDUNGAN UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) TERHADAP INFEKSI WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) DENGAN SUPLEMENTASI NATRIUM ALGINAT *Sargassum* sp. DARI PERAIRAN LAMPUNG DAN KOMBINASI DENGAN VITAMIN C

THE EFFECTIVENESS OF PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) PROTECTION AGAINST WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) INFECTION BY SUPPLEMENTATION OF SODIUM ALGINATE OF *Sargassum* sp. FROM LAMPUNG WATERS AND COMBINATION WITH VITAMIN C

Muhammad Darmawan¹, Agus Setyawan^{1,2,3*},
Ni Luh Gede Ratna Juliasih^{1,4}, Hilma Putri Fidyandini²

¹Magister Manajemen Wilayah Pesisir dan Laut, Universitas Lampung

²Jurusan Perikanan dan Kelautan, Universitas Lampung

³Pusat Penelitian Pesisir, Kelautan, dan Perikanan, Universitas Lampung

⁴Jurusan Kimia, Universitas Lampung

Jl. Prof. Dr. Ir. Sumantri Brojonegoro No.1, Bandar Lampung, 35145, Lampung, Indonesia

Email: agus.setyawan@fp.unila.ac.id

ABSTRAK

White spot syndrome virus (WSSV) merupakan salah satu penyakit infeksi virus yang dapat menyebabkan tingginya mortalitas pada budidaya udang vaname. Natrium alginat terbukti dapat merangsang dan meningkatkan respon imun nonspesifik pada udang. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas pemberian natrium alginat *Sargassum* sp. dari perairan Lampung dan kombinasi dengan vitamin C sebagai perlindungan terhadap serangan white spot syndrome virus (WSSV) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Udang (± 19 g) dipelihara dalam 9 kontainer dengan kepadatan masing-masing 10 ekor/kontainer dan diberi pakan 3% dari bobot biomassa setiap hari. Udang dikelompokkan menjadi tiga perlakuan dengan masing-masing 3 ulangan yaitu pakan tanpa suplementasi alginat sebagai kontrol, suplementasi pakan natrium alginat *Sargassum* sp. dengan dosis 1 g/kg pakan + vitamin C 0,2 g/kg pakan, dan suplementasi pakan natrium alginat *Sargassum* sp. dengan dosis 2 g/kg pakan. Setelah 14 hari diberi perlakuan, udang diinjeksikan filtrat *white spot syndrome virus* dan *phosphate buffer saline* (PBS) dengan perbandingan 1:1 untuk uji tantang. Parameter yang diamati meliputi kelangsungan hidup, *relative percent survival* (RPS), *mean time to death* (MTD), tingkah laku dan gejala klinis udang, histologi hepatopankreas, identifikasi *white spot syndrome virus* dengan PCR, dan kualitas air. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suplementasi natrium alginat *Sargassum* sp. melindungi udang terhadap *white spot syndrome virus* 14,80 jam lebih lama dalam kelangsungan hidup dibandingkan dengan kelompok kontrol. Namun suplementasi natrium alginat *Sargassum* sp. dari perairan Lampung belum mampu melindungi udang terhadap *white spot syndrome virus* setelah 72 jam terinfeksi. Perlu pengujian konsentrasi virus (LD50) sebelum uji tantang untuk menghindari konsentrasi virus yang terlalu tinggi saat uji tantang.

Kata kunci : *Imunoproteksi, udang vaname, Sargassum* sp., *natrium alginat, white spot syndrome virus*

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV) is a viral infectious disease that can cause high mortality in Pacific white shrimp culture. Sodium alginate proven to stimulate and increase nonspecific immune response in shrimp. This study aims to evaluate the effectiveness of oral administration of sodium alginate *Sargassum* sp. from Lampung waters and in combination with vitamin C to protect Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against white spot syndrome virus (WSSV). The shrimp (± 19 g) were reared in 9 containers with a density each of 10 shrimp/container and fed with shrimp feed at 3% of biomass daily. Shrimp were grouped into three treatments each with triplicate, namely feeding without alginate supplementation as a

control, supplementation with sodium alginate supplementation of *Sargassum* sp. with a dose of 1 g/kg of feed + 0.2 g/kg feed of vitamin C, and supplementation of sodium alginate *Sargassum* sp. at a dose of 2 g/kg of feed. After 14 days of treatment, shrimp were injected with white spot syndrome virus filtrat in phosphate buffer saline (PBS) (1:1 v/v) for challenge assay. Several parameters were observed included survival rate (SR), relative percent survival (RPS), mean time to death (MTD), shrimp behaviour and clinical symptoms, hepatopancreatic histology, confirmation of white spot syndrome virus infection by PCR, and water quality. The results showed that supplementation of sodium alginate *Sargassum* sp. protected shrimp against white spot syndrome virus 14.80 hours longer in survival compared to the control group. However the supplementation of sodium alginate *Sargassum* sp. from Lampung waters not yet to protect shrimp against white spot syndrome virus after 72 hours infection. There is needed the LD₅₀ dose of white spot syndrome virus copy number to ensure the appropriate dose in challenge assay.

Keywords : Immunoprotection, pacific white shrimp, *Sargassum* sp., sodium alginate, white spot syndrome virus

PENDAHULUAN

Udang vaname merupakan salah satu produk ekspor perikanan yang memiliki banyak peminat dan juga permintaan. Menurut Kementerian Kelautan dan Perikanan (2020) produksi udang nasional per tahun berada pada kisaran 800 ribu ton sementara kebutuhan dunia mencapai 13 sampai 15 juta ton. Tingginya permintaan terhadap udang vaname menyebabkan produksi dari budidaya harus terus ditingkatkan. Penerapan teknologi budidaya intensif dan ketersediaan benih *specific pathogen free* (SPF) menjadi kunci keberhasilan untuk dapat terus meningkatkan produksi dari budidaya udang vaname (Suwoyo & Mangampa, 2010). Namun penerapan sistem budidaya intensif tidak selamanya berdampak baik karena limbah yang dihasilkan memiliki dampak buruk bagi udang maupun lingkungan budidaya.

Salah satu dampak buruk yang ditimbulkan dari penerapan budidaya intensif adalah munculnya penyakit pada udang seperti white spot syndrome virus (WSSV). Menurut Rahma et al. (2014) pada udang windu (*Panaeus monodon*) penyakit white spot syndrome virus menyebabkan kematian massal dalam waktu singkat antara 6-11 hari pasca gejala klinis. Upaya yang dapat dilakukan untuk dapat mencegah dan menanggulangi penyakit pada udang adalah dengan meningkatkan sistem pertahanan tubuh udang menggunakan imunostimulan (Rosyida et al., 2022). Imunostimulasi yang umum dilakukan adalah dengan pemberian komponen mikrobial seperti β -glukan dan lipopolisakarida atau sel bakteri yang telah dimatikan (Ekasari et al., 2016). Namun jenis imunostimulan tersebut memiliki harga yang relatif mahal, sehingga diperlukan alternatif imunostimulan lain untuk penanganan penyakit pada udang tersebut.

Salah satu sumber imunostimulan yang relatif lebih murah dan mudah penerapannya

adalah dari alga coklat *Sargassum* sp. Dinding sel pada *Sargassum* sp. diketahui terdapat suatu substansi yang memiliki aktivitas immunomodulator yakni alginat. Pemanfaatan alginat *Sargassum* sp. pada bidang perikanan sudah cukup umum digunakan untuk meningkatkan respon imun baik pada ikan maupun udang. Penelitian oleh Isnansetyo et al. (2014) mengungkapkan bahwa alginat *Sargassum* sp. dari spesies lokal Indonesia mampu meningkatkan ketahanan nonspesifik pada ikan lele (*Clarias batrachus*). Aplikasi natrium alginat *Sargassum siliquosum* pada udang vaname juga terbukti dapat mengaktifkan sel dan respon imun humoral, serta ekspresi gen terkait kekebalan tubuh sehingga udang terlindungi dari infeksi white spot syndrome virus (Yudiati et al., 2016; Yudiati et al., 2019). Perairan Lampung merupakan salah satu sumber habitat *Sargassum* dan sejauh ini masih sedikit pemanfaatannya. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa suplementasi beberapa jenis alginat seperti kalsium alginat (Setyawan et al., 2020) maupun natrium alginat (Setyawan et al., 2021) dari Perairan Lampung secara efektif mampu meningkatkan respon imun udang vaname yang dipelihara skala laboratorium.

Peningkatan respon imun nonspesifik udang vaname juga dapat dilakukan dengan penambahan suplemen lainnya seperti vitamin C. Aplikasi vitamin C telah terbukti efektif meningkatkan respon imun nonspesifik dan tingkat kelulushidupan pada udang (Maharani, 2014; Wu et al., 2016). Meskipun penelitian pemanfaatan natrium alginat *Sargassum* sp. dan vitamin C pada bidang perikanan telah banyak dilakukan, namun masih sangat sedikit sekali informasi mengenai dosis efektif dari natrium alginat *Sargassum* sp. tersebut terutama spesies alga coklat lokal dari perairan Lampung maupun kombinasi dengan vitamin C yang mampu mencegah serangan white spot syndrome virus khususnya pada udang

vaname. Oleh karena itu penting untuk mengkaji potensi natrium alginat dari *Sargassum* sp. dan vitamin C sebagai antivirus penyakit *white spot syndrome virus* pada udang vaname.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-Maret 2021, bertempat di Laboratorium Budidaya Perikanan, Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Bahan dan alat yang digunakan meliputi: udang vaname dengan bobot 19 gram, air laut, *Sargassum* sp., etanol 96%, asam klorida (HCl) 12N, natrium karbonat (Na_2CO_3), kalium klorida (KCl) 0,13 M, alcohol 70%, progol, akuades, pakan komersil dengan kandungan protein 30%, Asam etilenadiaminatetraasetat (EDTA) 2N, vitamin C, *phosphate buffer saline* (PBS), formalin 10%, wadah berupa kontainer bervolume 70 L dengan ukuran 54 x 36 x 29 cm, syringe 1 cc, spatula, centrifuge Hanil MF-300, gelas ukur Iwaki pyrex, erlenmeyer Iwaki pyrex, toples kaca 2 L, tabung falcon, oven Memmer UN 260, mikroskop DM500 Leica, shacker PSU-15i, corong kaca, DO meter, pH meter ATC pH-009, blower Turbo 2HP, selang dan batu aerasi, refractometer Atago Hand-Held, dan timbangan digital.

Metode penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 3 ulangan yang terdiri dari: Perlakuan 1: Pakan komersial tanpa penambahan natrium alginat (kontrol); Perlakuan 2: Pakan komersial dengan penambahan natrium alginat 1 g/kg pakan + vitamin C 0,2 g/kg pakan; Perlakuan 3: Pakan komersial dengan penambahan natrium alginat 2 g/kg pakan. Setelah 14 hari diberi perlakuan, udang diinjeksikan filtrat *white spot syndrome virus* dan *phosphate buffer saline* (PBS) dengan perbandingan 1:1 untuk ujiantang.

Variabel yang diamati meliputi rendemen alginat *Sargassum* sp., gejala klinis, kelangsungan hidup, kelangsungan hidup relatif atau *relative percent survival* (RPS), rerata waktu kematian atau *mean time to death* (MTD), uji PCR, dan histologi jaringan. Parameter kualitas air yang diukur meliputi: suhu, pH, oksigen terlarut, dan salinitas. Data kelangsungan hidup, *relative percent survival* (RPS), dan rerata waktu kematian atau *mean time to death* (MTD) diuji secara statistik menggunakan Anova dan uji lanjut Duncan dengan bantuan program SPSS 26.0. Data kualitas air (suhu,

pH, oksigen terlarut, dan salinitas) dianalisis secara deskriptif.

Rendemen natrium alginat *Sargassum* sp. dihitung menggunakan rumus (Dharmayanti et al., 2021):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

Kelangsungan hidup (KH) udang dihitung menggunakan rumus Daniels et al. (2010):

$$\text{KH} = \frac{N_t}{N_o} \times 100\%$$

Keterangan: KH = kelangsungan hidup (%); N_t = jumlah udang akhir (ekor); N_o = Jumlah udang awal (ekor); jumlah udang pada awal masa pemeliharaan (ekor)

Relative percent survival (RPS) dihitung dengan menggunakan rumus Marbun et al. (2019):

$$\text{RPS} = \left(1 - \frac{\% \text{ kematian ikan yang divaksin}}{\% \text{ kematian ikan yang tidak divaksin}}\right) \times 100\%$$

Keterangan: RPS = *relative percent survival*

Rerata waktu kematian dihitung menggunakan rumus Olga dan Fatmawaty (2016):

$$\text{MTD} = \frac{\sum_{i=1}^n a_i b_i}{\sum_{i=1}^n b_i}$$

Keterangan: MTD = *mean time to death* (rerata waktu kematian); a_i = waktu kematian pada waktu ke- i (jam); b_i = jumlah ikan uji yang mati pada jam ke- i (ekor)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan dari hasil ekstraksi yang telah dilakukan pada 100 g bubuk *Sargassum* sp. dari perairan Lampung didapatkan total berat kering natrium alginat sebanyak 12,02 gram dan rendemen 12,02%. Hasil rendemen *Sargassum* sp. pada penelitian ini termasuk lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. Menurut Amir et al. (2016), *Sargassum* sp. yang diekstraksi dengan metode konvensional dapat menghasilkan rendemen natrium alginat sebesar 19,25%. Yudiati et al. (2016), menyatakan bahwa rendemen *Sargassum siliquosum* yang diekstraksi dengan metode yang sama menghasilkan rendemen natrium

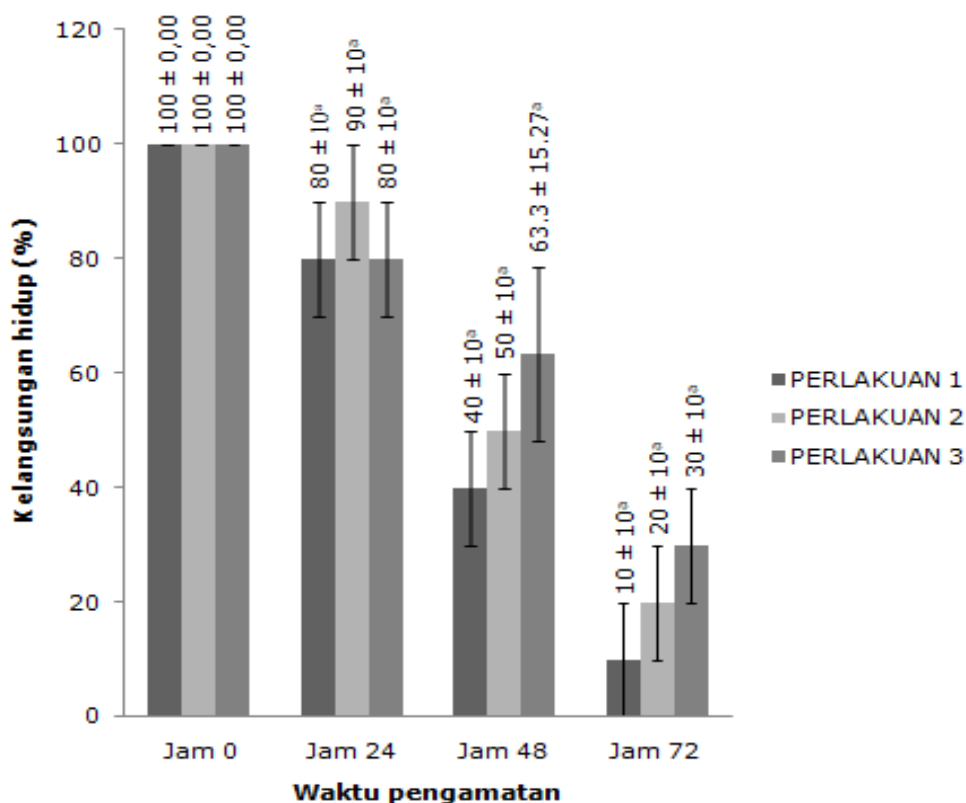
alginate sebesar 40,34%. Adapun penelitian Rifandi et al. (2014), menyatakan bahwa ekstraksi *Sargassum* sp. dengan konsentrasi Na_2CO_3 7% rendemen natrium alginat yang didapatkan sebanyak 8,24-15,14% untuk perairan Teluk Awur dan 7,19-14,44% untuk perairan Portunggal.

Jumlah rendemen suatu ekstrak yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu ukuran simplisia, jenis pelarut, tingkat kepolaran pelarut, dan lama maserasi (Hidayat et al., 2017). Menurut Jayanudin et al. (2014), menambahkan bahwa kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya kenaikan hasil rendemen, hal ini karena semakin tinggi suhu ekstraksi maka konversi asam alginat menjadi natrium alginat akan semakin tinggi. Besar kecilnya nilai rendemen natrium alginat juga dapat dipengaruhi oleh jenis, iklim dan habitat rumput laut, serta metode ekstraksi yang digunakan (Rhein-Knudsen et al., 2017). Selain itu, konsentrasi Na_2CO_3 juga dapat berpengaruh terhadap tinggi rendahnya rendemen natrium alginat yang dihasilkan. Hal ini karena semakin banyak Na_2CO_3 yang digunakan pada proses ekstraksi maka semakin banyak alginat yang dilarutkan menjadi natrium alginat (Tambunan et al., 2013).

Kelangsungan Hidup

Tingkat kelangsungan hidup udang vaname setelah injeksi *white spot syndrome virus* dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan pada pengamatan yang dilakukan, pada 24 jam setelah injeksi *white spot syndrome virus* baik kontrol maupun yang diberi perlakuan suplementasi natrium alginat memiliki tingkat kelangsungan hidup yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Selanjutnya pada 48-72 jam setelah diinjeksi *white spot syndrome virus*, udang yang diberi pakan dengan suplementasi natrium alginat sebanyak 2 g/kg menghasilkan tingkat kelangsungan hidup tertinggi. Namun pada 48-72 jam setelah injeksi *white spot syndrome virus* tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada udang kontrol maupun udang yang diberi natrium alginat dengan dosis yang berbeda ($p > 0,05$).

Suplementasi natrium alginat dengan dosis yang berbeda telah menunjukkan mekanisme perlindungan yang cukup baik pada awal infeksi *white spot syndrome virus*, namun pertahanan tubuh udang tidak bertahan lama. Pemberian dosis natrium alginat *Sargassum* sp. yang lebih tinggi dimungkinkan dapat lebih meningkatkan kelangsungan hidup udang vaname.



Gambar 1. Kelangsungan hidup udang vaname setelah infeksi *white spot syndrome virus*

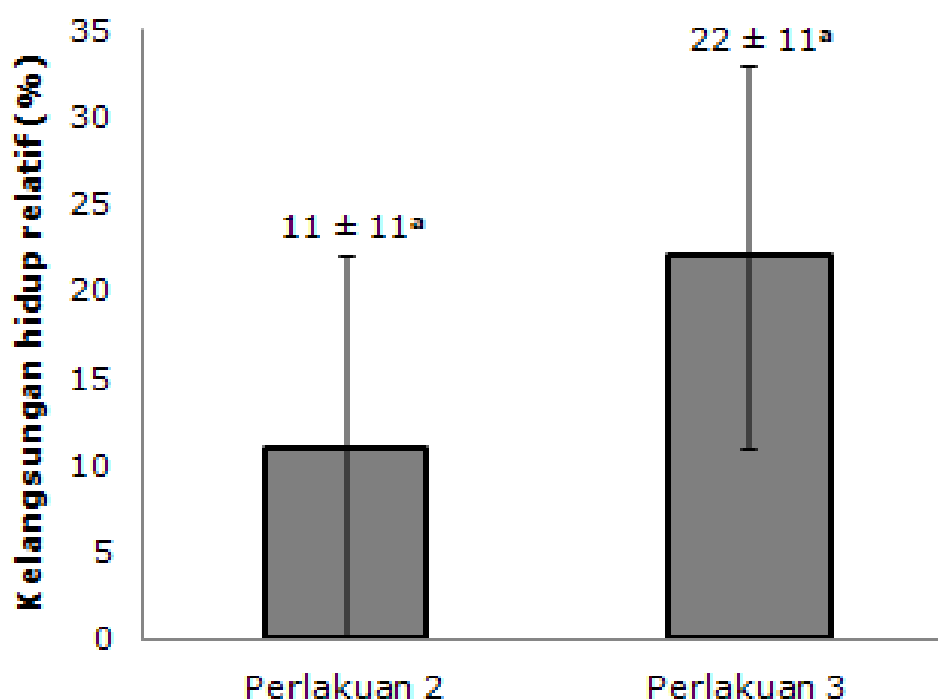
Penelitian Yudiati *et al.* (2019) melaporkan bahwa udang vaname yang disuplementasi natrium alginat *Sargassum siliquosum* dengan dosis 4 g/kg pakan dan 6 g/kg pakan menghasilkan tingkat kelangsungan hidup >50% setelah 72 jam diinfeksi *white spot syndrome virus*. Pemberian alginat *Sargassum sp.* dengan dosis sebesar 6 g/kg pakan pada udang vaname juga terbukti menghasilkan nilai kelangsungan hidup >50% setelah 96 jam uji tantang *white spot syndrome virus* (Yudiati, 2016). Selain itu, dilaporkan juga bahwa natrium alginat *Sargassum wightii* yang diaplikasikan pada PL udang windu dengan dosis 100, 200, 300, dan 400 mg/L melalui pengkayaan pakan dengan artemia juga mampu meningkatkan resistensi terhadap *white spot syndrome virus* (Immanuel *et al.*, 2012).

Kelangsungan Hidup Relatif

Pengamatan RPS pada penelitian ini dilakukan di akhir penelitian setelah pemeliharaan udang selama 14 hari dengan pemberian natrium alginat *Sargassum sp.* dengan dosis yang berbeda-beda. Berdasarkan hasil uji T, diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antara pemberian natrium alginat 1 g/kg pakan + vitamin C 0,2 g/kg pakan dengan natrium alginat 2 g/kg pakan

terhadap nilai kelangsungan hidup relatif udang vaname yang diuji tantang dengan virus *white spot syndrome virus* ($p > 0,05$). Dimana nilai RPS perlakuan 2 sebesar $10 \pm 10\%$ dan nilai RPS perlakuan 3 $20 \pm 10\%$ (Gambar 2).

Nilai RPS berdasarkan pada mortalitas udang, jika respon imun meningkat maka mortalitas udang rendah, karena meningkatkan ketahanan udang terhadap infeksi virus. Pada penelitian ini mortalitas udang belum dapat ditekan dengan pemberian perlakuan natrium alginat *Sargassum sp.* maupun dengan pemberian kombinasi *Sargassum sp.* dan vitamin C yang dibuktikan dengan rendahnya nilai RPS. Menurut Ellis (1988), pemberian suatu perlakuan dianggap efektif apabila nilai RPS pasca vaksinasi memiliki nilai >50%. Berdasarkan acuan tersebut maka perlakuan 2 dan 3 belum cukup efektif untuk melindungi udang vaname dari infeksi *white spot syndrome*. Menurut Rahmawati (2017), nilai kelangsungan hidup relatif dipengaruhi oleh respon imun, semakin meningkatnya respon imun maka nilai kelangsungan hidup relatif juga akan meningkat. Semakin rendah nilai kelangsungan hidup relatif maka semakin kecil kemampuan perlakuan tersebut untuk melindungi udang vaname dari infeksi *white spot syndrome*.

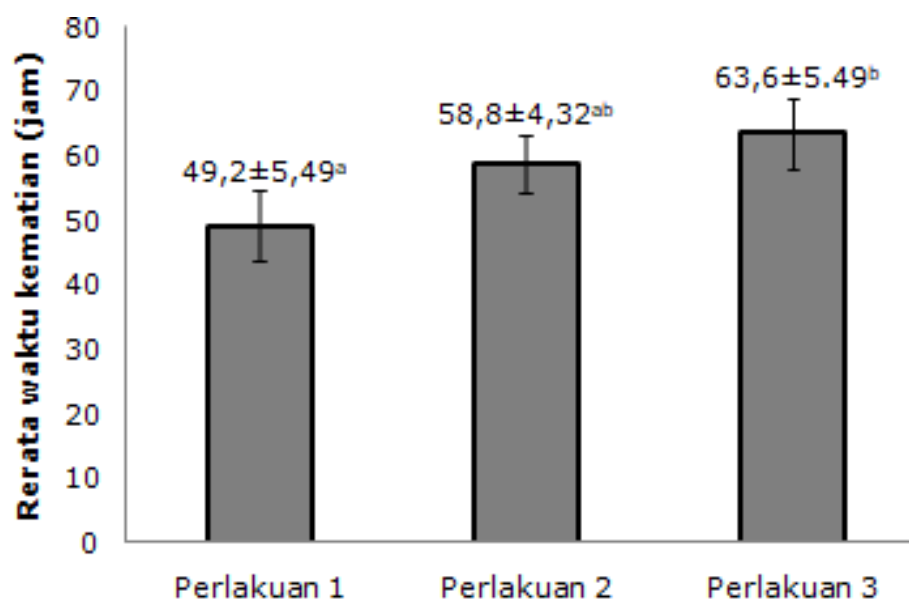


Gambar 2. Kelangsungan hidup relatif udang vaname setelah infeksi infeksi *white spot syndrome virus*

Rerata Waktu Kematian

Perhitungan rerata waktu kematian diperlukan untuk mengetahui perbedaan rata-rata waktu kematian udang vaname yang diberi pakan tanpa natrium alginat *Sargassum* sp. (perlakuan 1), pakan dengan natrium alginat *Sargassum* sp. 1 g/kg pakan + vitamin C 0,2 g/kg pakan (perlakuan 2), dan pakan dengan natrium alginat *Sargassum* sp. 2 g/kg pakan (perlakuan 3) pasca uji tantang oleh virus *white spot*. Hasil perhitungan *mean time to death* setelah 5 hari uji tantang menunjukkan bahwa udang vaname yang diberi pakan *Sargassum* sp. 2 g/kg pakan memiliki rerata waktu kematian tertinggi yakni $64 \pm 6,15$ jam. Nilai tersebut 14,80 jam lebih tinggi dibandingkan udang vaname yang tidak diberi natrium alginat *Sargassum* sp. yakni dengan nilai rerata waktu kematian $49,20 \pm 5,49$ jam. *Mean time to death*/rata-rata waktu kematian udang vaname setelah injeksi *white spot syndrome virus* dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan uji statistik diketahui bahwa pemberian natrium alginat *Sargassum* sp. terhadap rerata waktu kematian udang vaname yang terinfeksi virus *white spot syndrome virus* berbeda nyata ($P < 0,05$). Hasil uji lanjut Duncan diketahui bahwa pemberian pakan dengan natrium alginat *Sargassum* sp. 2 g/kg dan pakan dengan natrium alginat *Sargassum* sp. 1 g/kg pakan + vitamin C 0,2 g/kg pakan tidak berbeda nyata, namun perlakuan natrium alginat *Sargassum* sp. 2 g/kg berbeda nyata dengan perlakuan kontrol/tanpa pemberian natrium alginat *Sargassum* sp.



Gambar 3. Rerata waktu kematian udang vaname setelah infeksi infeksi virus *white spot*

Pengamatan Histologi

Pengamatan histologi dilakukan untuk dapat memberikan informasi tingkat kerusakan jaringan organ akibat infeksi bakteri (Li et al., 2012). Berikut hasil pemeriksaan histologi hepatopankreas pada udang setelah diinjeksi *white spot syndrome virus* dapat dilihat pada Gambar 4.

Hasil pengamatan gambaran histologi hepatopankreas udang uji pada semua perlakuan yang diinfeksi *white spot syndrome virus* terlihat adanya perubahan histologis berupa badan inklusi. Terjadinya badan inklusi atau hipertrofi pada inti sel dimungkinkan terjadi akibat serangan *white spot syndrome virus*. Badan inklusi merupakan timbunan benda asing yang bentuk dan ukurannya bervariasi, berwarna merah keunguan, eosinofilik, basofilik ataupun amfofilik yang umumnya terdapat di dalam nukleus atau intranuklear (Madeali et al., 1998). Lightner (1996) menambahkan jika badan inklusi dapat terbentuk akibat serangan virus. Menurut Nazaruddin et al. (2014), infeksi virus dalam suatu jaringan dapat membentuk area-area kosong yang menjadi tempat sel-sel virus hidup, akan tetapi area kosong tersebut ditinggalkan oleh virus dan inti sel kemudian mengalami hipertrofi basofilik.

Berdasarkan pengamatan histologi diketahui bahwa terjadi perubahan jaringan pada organ hepatopankreas yang ditandai dengan adanya sebagian besar sel memperlihatkan badan inklusi berbentuk

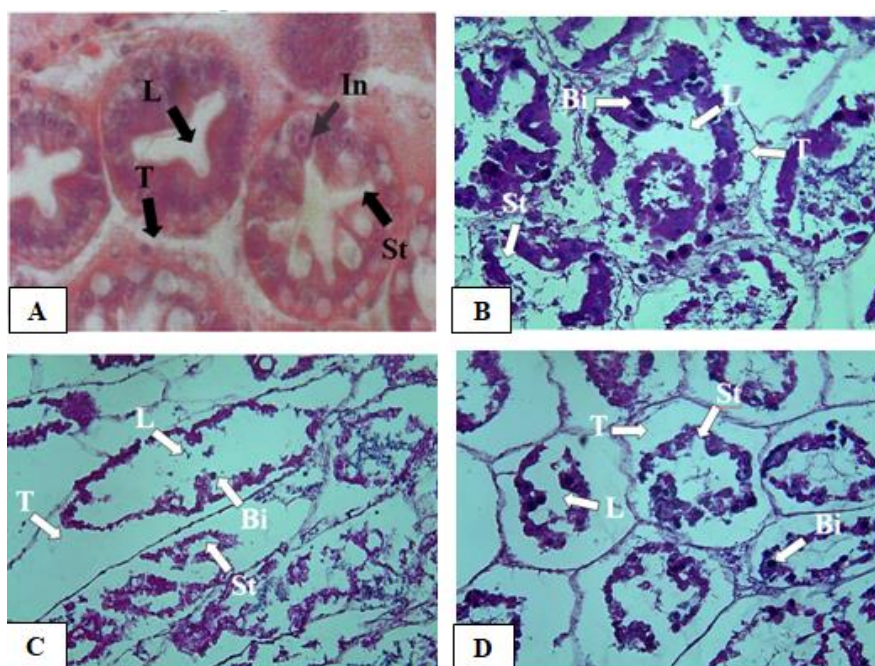
bulat dengan berwarna kebiruan di dalam nukleus dan letaknya tidak teratur. Nukleus tersebut membesar melebihi dari ukuran normalnya dengan berwarna kebiruan (basofilik) karena dominan menyerap basofil. Hal ini menunjukkan bahwa baik udang uji kontrol maupun tersuplementasi natrium alginat dan kombinasi dengan vitamin C setelah diinfeksi *white spot syndrome virus* belum mampu melindungi diri dari serangan virus, akibatnya organ hepatopankreas tersebut mengalami kerusakan. Menurut Nazaruddin et al. (2014), semakin tinggi tahap infeksi juga dapat menyebabkan semakin pekat warna dan besar diameter badan inklusi.

Identifikasi WSSV dengan Uji PCR Konvensional pada Masing-Masing Perlakuan

Hasil identifikasi virus *white spot* dengan PCR konvensional akan didapatkan berupa gambar hasil akhir dari proses elektroforesis. Hasil pendokumentasian gel elektroforesis pada sampel udang dapat dilihat pada Gambar 5. Hasil pendokumentasian gel elektroforesis akan

menentukan sampel udang positif atau negatif terserang virus *white spot*. Berdasarkan hasil identifikasi virus *white spot* pada udang vaname dengan PCR menunjukkan bahwa semua sampel teridentifikasi positif (+) virus *white spot*. Hal ini dibuktikan dengan adanya perpedaran band yang sejajar dengan kontrol positif yang berukuran 296 bp pada sumuran 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, sehingga disimpulkan bahwa semua udang uji baik perlakuan kontrol maupun dengan suplementasi natrium alginat semuanya terinfeksi virus *white spot*. Positif standar virus *white spot* yang digunakan sebagai kontrol positif merupakan stok kontrol positif virus *white spot* Laboratorium Penguji Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Lampung.

Hasil elektroforesis biasanya tidak hanya pita DNA hasil saja, tetapi juga DNA genom akan menunjukkan adanya materi ikutan lain (*smear*) yang masih terbawa. Menurut Mulyani et al. (2011), proses homogenisasi menggunakan vortex mix akan sangat membantu pada proses pelisisan, namun juga dapat menyebabkan DNA terpotong-potong sehingga menyebabkan terbentuknya



Gambar 4. Histologi hepatopankreas setelah infeksi *white spot syndrome virus* pada masing masing perlakuan

Keterangan : Tanda panah dengan huruf In = inti sel normal; St = saluran tubulus; T = tubulus; L = lumen; Bi = badan inklusi. Perbesaran 40x. A = hepatopankreas udang normal (Sukenda et al., 2009); B = hepatopankreas udang setelah infeksi virus *white spot* pada perlakuan 1; C = hepatopankreas udang setelah infeksi virus *white spot* pada perlakuan 2; D = hepatopankreas udang setelah infeksi virus *white spot* pada perlakuan 3

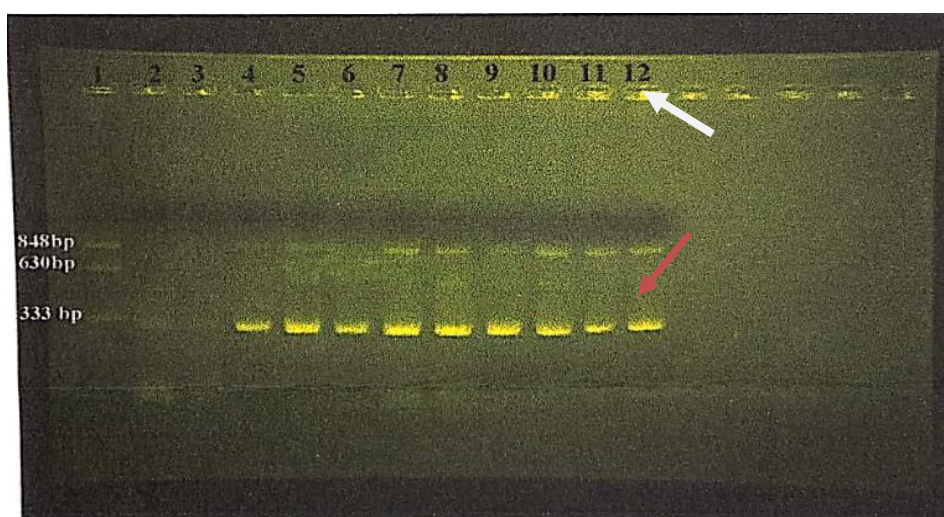
beberapa pita DNA (*smear*) ketika di elektroforesis. Kualitas DNA yang baik ditentukan oleh beberapa faktor yang mempengaruhi seperti suhu penyimpanan dan lamanya waktu penyimpanan. Suhu penyimpanan yang lebih efektif untuk mempertahankan DNA agar tetap baik dan tidak rusak yaitu pada suhu -20°C dibandingkan dengan suhu 4°C (Ngaliyatun et al., 2013). Virus *white spot* umumnya menginfeksi udang pada tingkat rendah dan pada beberapa tingkatan. Infeksi tingkat rendah terjadi jika DNA virus hanya ada dan sejajar pada pendaran band 296 bp yang berarti terdapat 20 copies, infeksi tingkat sedang sejajar pada band 650 bp dan 296 bp yang berarti terdapat 200 copies, dan infeksi tingkat berat terdapat pendaran band pada 910, 650, dan 296 bp yang berarti terdapat 2000 copies (Rahma et al., 2014).

Gejala Klinis Udang Vaname Pasca Infeksi *White Spot Syndrome Virus*

Gejala klinis awal yang teramati pada udang pasca 24 jam diinfeksi virus *white spot* antara lain pergerakan yang tidak terlalu aktif, penurunan konsumsi pakan dan respon terhadap gangguan, tetapi warna tubuh masih putih segar. Perubahan tingkah laku udang uji pasca 24 dan 72 jam diinfeksi virus *white spot* dapat dilihat pada Tabel 1. Gejala-gejala klinis yang teramati setelah 24 jam udang diinfeksi virus *white spot* dapat

diketahui bahwa udang belum menunjukkan gejala bintik putih maupun kemerahan pada tubuhnya namun secara umum udang-udang tersebut telah terinfeksi virus *white spot*. Hal ini sesuai dengan ciri gejala klinis serangan *white spot* yang dilaporkan oleh Vlax et al. (2002), yaitu terjadi letargi pada udang yang terinfeksi virus *white spot* seperti penurunan nafsu makan dan aktifitas renang. Menurut Lilisuriani (2020), udang yang sudah terinfeksi virus *white spot* namun belum terdapat tanda bintik putih, dikategorikan pada tipe III (kronis) dimana infeksi masih dialami oleh jaringan rendah sehingga bintik putih dan kemerahan pada udang tidak tampak. Selanjutnya dilakukan pengamatan gejala klinis pada udang vaname pasca 72 jam diinfeksi virus *white spot*.

Setelah 72 jam udang vaname diinfeksi virus *white spot*, udang-udang uji kontrol yang masih hidup seluruh bagian tubuhnya mengalami kemerahan, dengan nafsu makan dan respon terhadap gangguan menurun serta pergerakan yang pasif. Adapun udang yang disuplementasi natrium alginat 1 g/kg pakan + vitamin C 0,2 g/kg pakan yang masih hidup menunjukkan pergerakan yang cukup aktif, nafsu makan menurun, warna tubuh putih segar dengan respon terhadap gangguan normal. Selanjutnya untuk udang uji pada perlakuan natrium alginat 2 g/kg pakan yang masih hidup menunjukkan pergerakan yang cukup aktif, nafsu makan menurun, warna tubuh putih segar dengan



Gambar 5. Hasil gel elektroforesis sampel udang

Keterangan: Tanda panah putih merupakan sumuran dan tanda panah merah merupakan perpendaran band yang dihasilkan oleh masing-masing sampel. Sumuran 1 = DNA marker 848 bp, 630 bp, 333 bp; Sumuran 2 = kontrol positif; Sumuran 3 = kontrol negatif; Sumuran 4-6 : sampel uji perlakuan 1 dengan 3 kali ulangan; Sumuran 7-9 = sampel uji perlakuan 2 dengan 3 kali ulangan; Sumuran 10-12 = sampel uji perlakuan 3 dengan 3 kali ulangan

respon terhadap gangguan menurun. Menurut Lilisuriani (2020) gejala klinis pada udang vaname yang terserang virus *white spot* tidak hanya bintik putih namun juga terdapat gejala klinis lainnya seperti kemerahan pada bagian tubuh udang vaname. Hameed et al. (1998), menambahkan bahwa udang yang terinfeksi virus *white spot* menunjukkan perubahan tingkah laku yaitu terjadi penurunan konsumsi makan, lemah, warna kemerahan pada abdomen dan bintik putih.

Kualitas Air

Kualitas air merupakan salah satu faktor yang penting karena menjadi penentu ke-berhasilan dalam budidaya udang vaname. Selama penelitian, kualitas air yang diamati meliputi suhu, oksigen terlarut, pH dan salinitas. Pengamatan kualitas air selama penelitian diamati pada hari ke-1, 7, 14 dan 17. Hasil pengamatan kualitas air dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil pengukuran kualitas air selama penelitian, suhu yang didapatkan yakni berkisar antara 27,3-29,3°C, nilai ini menunjukkan bahwa suhu air masih berada dalam kisaran normal yang masih dapat ditoleransi oleh udang vaname untuk hidup. Hal ini sesuai dengan pendapat Rakhfid et al. (2019), yang menyatakan bahwa suhu yang optimal untuk kelangsungan hidup udang vaname berada pada kisaran 28-32°C. Menurut Anita et al. (2017), laju

pertumbuhan pada udang meningkat sejalan dengan kenaikan suhu, dimana semakin tinggi suhu maka semakin rendah oksigen terlarut dalam air sedangkan kebutuhan oksigen bagi udang semakin besar karena tingkat metabolisme semakin tinggi. Oksigen terlarut atau *dissolved oxygen* (DO) pada lingkungan budidaya baik ikan maupun udang sangat diperlukan untuk proses pernapasan, proses metabolisme atau pertukaran zat yang kemudian menghasilkan energi untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan (Salmin, 2005). Berdasarkan pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa kadar DO selama pemeliharaan yaitu berkisar antara 4,2-5,6 mg/l. Menurut Arsad et al. (2017) udang dapat hidup dengan baik di lingkungan yang memiliki kandungan oksigen terlarut >4 mg/l.

Adapun nilai pH pada wadah pemeliharaan udang selama penelitian berkisar antara 7,5-7,9. Nilai pH tersebut masih cukup optimal untuk pertumbuhan udang karena nilai pH yang optimal berkisar antara 7,5-8 (Supono, 2019). pH pada suatu perairan dapat dijadikan sebagai indikator dari keseimbangan unsur-unsur kimia, ketersediaan unsur-unsur kimia dan unsur-unsur hara yang sangat bermanfaat bagi kehidupan organisme akuatik (Sahrijanna dan Septiningsih, 2017). Salinitas juga merupakan parameter lingkungan yang penting karena dapat mempengaruhi laju pertumbuhan, jumlah makanan yang dikonsumsi, nilai konversi makanan, dan

Tabel 1. Perubahan tingkah laku udang vaname pasca 24 dan 72 jam diinjeksi virus *white spot*

No	Tingkah laku	Waktu (jam)	Perlakuan		
			Kontrol	Natrium alginat 1 g/kg pakan + vitamin C 0,2 g/kg pakan	Natrium alginat 2 g/kg pakan
1	Pergerakan	24	Pasif	Cukup aktif	Cukup aktif
		72	Pasif	Cukup aktif	Cukup aktif
2	Nafsu makan	24	Menurun	Normal	Normal
		72	Menurun	Menurun	Menurun
		24	Putih segar	Putih segar	Putih segar
3	Warna tubuh	72	Udang yang masih hidup seluruh tubuhnya mengalami kemerahan	Udang yang masih hidup warna tubuhnya putih segar	Udang yang masih hidup warna tubuhnya putih segar
4	Respon terhadap gangguan	24	Menurun	Normal	Menurun
		72	Menurun	Normal	Menurun

Tabel 2. Kualitas air media pemeliharaan udang vaname selama penelitian

Parameter	Kisaran	Kisaran optimum
Suhu (°C)	27,3-29,3	28-32 ^a
Oksigen terlarut (mg/l)	4,2-5,6	> 4 ^b
pH	7,5-7,9	7,5-8 ^c
Salinitas (ppt)	34-35	0,5-35 ^c

Keterangan sumber: a. Rakhfid et al. (2019); b. Arsad et al. (2017); c. Supono(2019)

daya kelangsungan hidup (Sahrijanna dan Septiningsih, 2017). Salinitas yang terukur selama penelitian berkisar antara 34-35 ppt. Nilai salinitas yang didapatkan selama penelitian ini sudah optimal untuk pemeliharaan udang. Hal ini disebabkan umumnya udang hidup dan tumbuh optimal salinitas pada kisaran 0,5-35 ppt (Supono, 2019).

KESIMPULAN

Suplementasi 2 g/kg pakan natrium alginat *Sargassum* sp. pada udang vaname yang diinfeksi *white spot syndrome virus* efektif meningkatkan ketahanan udang vanamei berdasarkan rerata waktu kematian udang yang secara signifikan lebih lama. Namun, infeksi *white spot syndrome virus* efektif akut dengan dosis tinggi belum menunjukkan perbedaan signifikan dalam laju sintasan dan rerata waktu kematian udang vanamei.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana atas bantuan hibah penelitian DIPA Fakultas Pertanian tahun 2021. Terima kasih kami ucapkan kepada Hanesty Resta, S.Pi, Bu Dwi, Bu Untari atas bantuan dan kerjasamanya selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

Amir, A., Wiraningtyas, A., Ruslan. & Annafi, N. 2016. Perbandingan metode ekstraksi natrium alginat: metode konvensional dan microwave assisted extraction (MAE). *Chempublish Journal*. 1(2):7-13.

Anita, A.W. Agus, M. & Mardiana, T.Y. 2017. Pengaruh perbedaan salinitas terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup larva udang vanamei (*Litopenaeus vannamei*) PL-13. *Pena Akuatika*. 17(1):12-19. DOI: 10.31941/penaakua tika.v17i1.614.

Arsad, S., Ahmad, A., Atika, P.P., Betrina, M.V., Dhira, K.S., & Nanik, R.B. 2017. Studi Kegiatan Budidaya Pembesaran Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan Penerapan Sistem Pemeliharaan Berbeda. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 9(1):1-14. DOI: 10.20473/jipk.v9i1.7624.

Daniels, C.L., Merrifield, D.L., Boothroyd, D.P., Davies, S.J., Factor, J.R. & Arnold, K.E. 2010. Effect of dietary *Bacillus* sp. and mannan oligosaccharides (MOS) on european lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. *Aquaculture*. 304(1-4):49-57. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.03.018.

Dharmayanti, N., Mufida, N., Permadi, A., Asriani, Salampessy, R. B., Nurbani, S. Z. & Indrianti, N. 2021. Penambahan konsentrasi alginat dari *Sargassum polycystum* untuk formulasi krim lulur. *Jurnal Akuatek*. 2(2):81-94. DOI: 10.24198/akuatek.v2i2.37489.

Ekasari, J., Napitupulu, J. L. F. & Surawidjaja, E.H. 2016. Immunity and growth of freshwater prawn fed with dietary β -glucan supplementation. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 15(1):41-48. DOI: 10.19027/1/6.

Ellis, A. E. 1988. General Principles of Fish Vaccination. dalam: Ellis AE, editor. Fish vaccination. Academic Press, London. 19 hlm.

Hameed, A.S.S., Anilkumar, M., Raj, M.L.S. & Jayaraman, K. 1998. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture*. 160(1-2):31-45. DOI: 10.1016/S0044-8486(97)00221-4.

Hidayat, R.C., Suwarno. & Mahasri, G. 2017. Evaluasi pemberian crude protein Zoothamnium penaei terhadap laju pertumbuhan, respon imun dan kelulushidupan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) di tambak. *Jurnal Biosains*

- Pascasarjana*. 19(2):111-132. DOI: 10.20473/jbp.v19i2.2017.111-126.
- Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., Balasubramanian, V. & Palavesam, A. 2012. Sodium alginate from *Sargassum wightii* retards mortalities in *Penaeus monodon* postlarvae challenged with white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. (99):187-196. DOI: 10.3354/dao02466.
- Isnansetyo, A., Irpani, H.M., Wulansari, T.A. & Kasanah, N. 2014. Oral administration of alginate from a tropical brown seaweed, *Sargassum* sp. to enhance non-specific defense in walking catfish (*Clarias* sp.). *Aquacultura Indonesiana*. 15(1):14-20. DOI: 10.21534/ai.v15i1.29.
- Jayanudin., Lestari, A. Z. & Nurbayanti, F. 2014. Pengaruh suhu dan rasio pelarut ekstraksi terhadap rendemen dan viskositas natrium alginat dari rumput laut cokelat (*Sargassum* sp). *Jurnal Integrasi Proses*. 5(1):51-55. DOI: 10.36055/jip.v5i1.35.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2020. Menteri Edhy: Pantai Selatan Jawa Berpotensi Jadi Sentra Budidaya Udang. <https://kkp.go.id/artikel/20632-menteri-edhy-pantai-selatan-jawa-berpotensi-jadi-sentra-budidaya-udang>. Diakses 13 Oktober 2020.
- Li, S., Zhang, Z., Li, C., Zhou, L., Liu, W. & Li, Y. 2012. Molecular cloning and expression profiles of nitric oxide synthase (NOS) in mud crab *Scylla paramamosain*. *Fish Shellfish Immunology*, 32:503-12. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.12.002.
- Lightner, D. V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA. 304 hlm.
- Lilisuriani. 2020. Serangan penyakit virus pada udang di tambak tanpa memperlihatkan gejala klinis. *Octopus : Jurnal Ilmu Perikanan*, 9(1):25-32.
- Madeali, M.I., Tompo. & Muliani, A. 1998. Diagnosis penyakit viral pada udang windu *Penaeus monodon* secara histopatologi dan antibodi poliklonal dengan metode elisa. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. 4:11-18. DOI: 10.15578/jppi.4.3.1998.11-18.
- Maharani, L. 2014. Pengaruh Penambahan Vitamin C sebagai Suplemen Pakan terhadap Kelulushidupan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). (Tesis). Universitas Brawijaya. Surabaya. 93 hlm.
- Marbun, J., Harpeni, E. & Wardyanto. 2019. Penanganan penyakit white feces pada udang vaname *Litopenaeus vannamei* menggunakan aplikasi pakan yang dicampur ekstrak lengkuas merah *Alpinia purpurata* K. Shum. *Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan, Pesisir dan Perikanan*. 8(2):76-86. DOI: 10.13170/depik.8.2.13570.
- Mulyani, Y., Purwanto, A. & Nurruhwati, I. 2011. Perbandingan beberapa metode isolasi DNA untuk deteksi dini koi herpes virus (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*. 8(11):1-16.
- Nazaruddin., Aliza, D., Aisyah, S., Zainuddin. & Syafrizal. Histopathological changes of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hepatopancreas infected by hepatopancreatica parvovirus (HPV). *Jurnal Kedokteran Hewan*, 8(1):27-29. DOI: 10.21157/j.ked.hewan.v8i1.1251.
- Ngaliyatun., Widiyanti, T. & Syaifudin, M. 2013. Uji daya infektivitas *Plasmodium berghei* iradiasi pada hati, limpa mencit menggunakan nested-PCR. *Unnes Journal of Life Science*, 2(2):111-117.
- Olga. & Fatmawaty. 2016. route of vaccine efficacy *Aeromonas hydrophila* asb-01 on snakehead fish (*Ophiocephalus striatus*). *Fish Scientiae*. 4(6):131-144. DOI: 10.20527/fs.v3i6.1143.
- Rakhfid, A., Erna., Rochmady., Fendi., Ihu, M. Z. & Karyawati. 2019. Survival rate and growth of juvenile vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in different media water salinity. *Jurnal Akuakultur, Pesisir, dan Pulau-Pulau Kecil*. 3(1):23-29. DOI: 10.29239/j.akuatikisle.3.1.23-29.
- Rahma, H.N., Prayitno, S.B. & Haditomo, A.H.C. 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.
- Rahmawati, E. 2017. Ketahanan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) yang diberi probiotik *Bacillus* sp. D2.2 terhadap infeksi *Vibrio alginolyticus*. (Skripsi). Fakultas Pertanian Universitas Lampung, Lampung. 56 hlm.
- Rifandi, R.A., Santosa, G.W. & Ridlo, A. 2014. Pengaruh konsentrasi asam klorida (HCl) terhadap mutu alginat rumput laut coklat *Sargassum* sp. dari perairan Teluk Awur Kab. Jepara dan Poktunggal Kab. Gunungkidul. *Journal of Marine*

- Research, 3(4):676-684. DOI: 10.14710/jmr.v3i4.11430.
- Rosyida, A., Setyowati, D.N. & Azhar F. 2022. The effect of adding white tumeric (*Curcuma zedoaria*) extract on the immune system of vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*) tested against *Vibrio harveyi* bacteria. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 27(2):136-144. DOI: 10.31258/jpk.27.2.136-144.
- Rhein-Knudsen, N., Ale, M.T., Ajallouei, F. & Meyer, A.S. 2017. Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: *Sargassum* spp. and *Padina* spp. *Food Hydrocolloids*, 71:236-244. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.05.016.
- Sahrijanna, A. & Septiningsih, E. 2017. Variasi waktu kualitas air pada tambak budidaya udang dengan teknologi integrated multitrophic aquaculture (IMTA) di Mamuju Sulawesi Barat. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*. 8(16):52-57.
- Salmin. 2005. Oksigen terlarut (DO) dan kebutuhan oksigen biologi (BOD) sebagai salah satu indikator untuk menentukan kualitas perairan. *Oseana*, 30(3):21-26.
- Setyawan, A., Supono, Safitri, Y.B., Hudaidah, S. & Fidyandini, H.P. 2020. Suplementasi kalsium alginat *Sargassum* sp. dari perairan Lampung untuk memicu respon imun *Penaeus vannamei*. *Prosiding Semnaskan UGM XVII, Departemen Perikanan UGM. Yogyakarta*, 4 September 2020, p.41-47.
- Setyawan, A., Riana, Supono, Hudaidah, S. & Fidyandini, H.P. 2021. Non-specific immune response of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* by supplementation of sodium alginate of *Sargassum* collected from Lampung Indonesia. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 890: p.012015 DOI: 10.1088/1755-1315/890/1/012015.
- Supono. 2019. Budidaya Udang Vaname Salinitas Rendah: Solusi untuk Budidaya di Lahan Kritis. Yogyakarta (ID): Graha Ilmu, 131 Hal.
- Suwoyo, H.S. & Mangampa, M. 2010. Aplikasi Probiotik dengan Konsentrasi Berbeda pada Pemeliharaan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. p.487-494.
- Tambunan, A.P.M., Rudiyanasyah & Harlia. 2013. Pengaruh konsentrasi Na₂CO₃ terhadap rendemen natrium alginat dari *Sargassum cristaefolium* asal perairan Lemukutan. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 2(2):112-117.
- Vlak, J.M., Jean-Robert, B., Tim, W.F., Guang-Hsiung, K., Donald, V.L., Chu-Fang L., Philip, C.L. & Peter, J.W. 2002. A New Virus Family Infecting Aquatic Invertebrates. *XIIth International Congress Of Virology*. Paris. 398 hlm.
- Wu, Y.S., Liao, S.Y., Huang, C.T. & Nan, F.H. 2016. Beta 1,3/1,6-glucan and vitamin C immunostimulate the non-specific immune response of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 57:269-277. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.08.046.
- Yudiati, E. 2016. Ekspresi gen dan laju sintasan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang tersuplementasi dengan alginat secara oral untuk resistensi penyakit white spot syndrome virus. *Buletin Oseanografi Marina*, 5(2):135-142. DOI: 10.14710/buloma.v5i2.15734.
- Yudiati, E., Isnansetyo, A., Murwantoko., Ayuningtyas., Triyanto. & Handayani, O. R. 2016. Innate immune-stimulating and immune genes upregulating activities of three types of alginate from *Sargassum siliquosum* in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. 54:46-53. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.03.022.
- Yudiati, E., Isnansetyo, A., Murwantoko., Triyanto. & Handayani, O.R. 2019. Alginate from *Sargassum siliquosum* simultaneously stimulates innate immunity, upregulates immune genes, and enhances resistance of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against white spot syndrome virus (WSSV). *Marine Biotechnology*, 21(4):503-514. DOI: 10.1007/s10126-019-09898-7.