

**DETEKSI MOLEKULER DAN ANALISIS JENIS-JENIS VIRUS
PENYEBAB PENYAKIT Kerdil PADA
UDANG WINDU (*Penaeus monodon*, Fabricius)
DI SULAWESI SELATAN**

***MOLECULAR DETECTION AND ANALYSES OF VIRUSES
CAUSING MONODON SLOW GROWTH SYNDROME ON
TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*, Fabricius)
IN SOUTH SULAWESI***

SRIWULAN



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2012**

**DETEKSI MOLEKULER DAN ANALISIS JENIS-JENIS VIRUS
PENYEBAB PENYAKIT Kerdil
PADA UDANG WINDU (*Penaeus monodon*, Fabricius)
DI SULAWESI SELATAN**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi

Ilmu Pertanian

Disusun dan diajukan oleh

SRIWULAN

kepada

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2012**

PENGESAHAN UJIAN PROMOSI

DETEKSI MOLEKULER DAN ANALISIS JENIS-JENIS VIRUS
PENYEBAB PENYAKIT KERDIL
PADA UDANG WINDU (*Penaeus monodon*, Fabricius)
DI SULAWESI SELATAN

Disusun dan diajukan oleh

SRIWULAN

Nomor Pokok P0100307009

Menyetujui
Komisi Penasihat

Prof. Dr. Akbar Tahir, M.Sc.

Promotor

Prof. Dr. Ir. A. Rantetondok, M.Fish.Sc.

Kopromotor

Ketua Program Studi
Ilmu Pertanian

Prof. Dr. Ir. Baharuddin, Dipl. Ing.

Kopromotor

Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin

Prof. Ir. Saleh S. Ali, M.Sc., Ph.D.

Prof. Dr. Ir. Mursalim

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sriwulan
Nomor mahasiswa : P0100307009
Program Studi : Ilmu Pertanian

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 30 Juni 2012
Yang menyatakan

Sriwulan

PRAKATA

Alhamdulillah, puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan Rahmat dan Inayah-Nya untuk memperkenankan penulis menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi ini. Penelitian ini bermula dari kenyataan di lapangan bahwa produksi udang windu semakin menurun karena menghadapi dua masalah besar yaitu kematian akibat virus WSSV dan ukuran udang yang kerdil sehingga petambak sudah banyak yang beralih ke udang vanamei. Penyakit kerdil disebabkan oleh tiga jenis virus DNA (MBV, IHNV dan HPV). Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan mengembangkan metode deteksi tiga jenis virus penyakit kerdil secara simultan yaitu dengan Multiplex PCR pada benih yang akan ditebar dan udang di tambak, mengkarakterisasi virus IHNV Sulawesi Selatan, menganalisis hubungan jenis virus penyakit kerdil di pembenihan dengan di tambak, menganalisis tingkat prevalensi ketiga virus tersebut pada pembenihan dan di tambak pada musim hujan dan kemarau serta melihat hubungan antara tingkat prevalensi virus dengan parameter kualitas air berdasarkan musim. Diharapkan hasil penelitian ini dapat bermanfaat dalam penanggulangan penyakit kerdil udang windu. Penulis menyadari bahwa penelitian dan penulisan disertasi ini dapat terlaksana dan rampung atas bantuan beberapa pihak.

Pertama-tama penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya kepada Bapak Prof. Dr. Akbar Tahir, M.Sc. sebagai promotor, Bapak Prof. Dr. Ir. Alexander Rantetondok, M.Fish. Sc. dan Bapak Prof. Dr. Ir. Baharuddin, Dipl. Ing. sebagai ko-promotor, atas segala bimbingan, dorongan, semangat dan masukan yang diberikan dalam penelitian dan penulisan disertasi ini.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Ibu Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, M.Sc, Bapak Dr. Ir. Gunarto Latama, M.Sc., Bapak Dr. Ir. Doddy Dharmawan T. J., M.Sc. dan Bapak Dr. Ir. Rahman Syah, M.Si. dari Balai Riset Pengembangan Penelitian dan Budidaya Air Payau Maros atas segala saran dan masukan pada penelitian dan penulisan disertasi ini.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Bapak Rektor UNHAS, Dekan, Ketua Jurusan dan Ketua Program Studi yang telah memberikan izin untuk melanjutkan studi.

Terima kasih yang setinggi-tingginya kepada Direktur, Asisten Direktur, Ketua Program Studi Ilmu Pertanian dan seluruh staf pengajar serta staf administrasi Program Pascasarjana UNHAS atas segala petunjuk, bimbingan dan bantuan selama menempuh studi di PPs UNHAS, juga terima kasih yang sebesar-besarnya kepada DIKTI atas kesempatan penulis menerima bea siswa BBPS.

Terima kasih juga disampaikan kepada seluruh teman sejawat di Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan atas segala masukan dalam penelitian dan penulisan disertasi ini. Kepada saudara Rahmi, S.Pi, M.P., Muh, Nur Akib Putera, S.Pi., Nugroho, S.Pi., Muh. Iqbal, S.Pi., Sri Suryanti, S.Pi., Ardiyanti dan Indra Chandra, S.Pi. diucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala bantuannya selama penelitian. Teman-teman Angkatan 2007 Program Studi Ilmu Pertanian Pascasarjana UNHAS (Dr. Ir. Abd. Rahim, M.P., Dr. Ir. Ida Suryani, M.P., Dr. Ir. Ahmad Fathoni, M.S., Dr. Ir. Mauli Kasmi, M.S., Dr. Nurliah, S.Pi., M.Si., Dr. Ir. Aidah A. Ala Husain, M.Sc., Dr. Ir. Shinta Werorilangi, M.Sc., Dr. Ir. Arniati, M.Si. dan Dr. Ir. Ismaya Paranwangsa, M.P.) diucapkan terima kasih atas segala perhatian, motivasi dan bantuan serta kebersamaan selama studi.

Ucapan terima kasih juga dihaturkan kepada DIKTI, IMHERE UNHAS dan COREMAP II- Mitra Bahari yang telah membantu dalam penelitian masing-masing dalam bentuk dana Hibah Disertasi Doktor, *Research Grant* dan Bea Siswa Penulisan Disertasi.

Ucapan terima kasih yang setinggi-tingginya disampaikan kepada kedua orangtua tercinta dan mertua serta seluruh keluarga atas dukungan moril dan doa restunya yang selalu menyertai penulis. Terkhusus kepada suami tercinta Dr. Ir. Hilal Anshary, M.Sc. dan anakku tersayang Ainun Jariah Hilal.Anshary atas segala bantuan dan pengertiannya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan. Kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan diucapkan terima kasih banyak atas segala bantuannya.

Penulis menyadari bahwa disertasi ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga masukan dan saran yang bersifat meningkatkan kualitas karya ilmiah ini sangat diharapkan. Semoga disertasi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan umat manusia.

Makassar, Juni 2012

Sriwulan

ABSTRAK

SRIWULAN. *Deteksi Molekuler dan Analisis Jenis-Jenis Virus Penyebab Penyakit Kerdil pada Udang Windu (*Penaeus monodon*, Fabricius) Di Sulawesi Selatan.* (dibimbing oleh Akbar Tahir, Alexander Rantetondok dan Baharuddin).

Penelitian ini bertujuan: 1) melakukan optimasi MPCR sebagai metode deteksi molekuler dini dan cepat virus penyakit kerdil udang windu (MSGs) secara simultan, 2) mengkarakterisasi jenis virus IHHNV asal Sulawesi Selatan, 3) menganalisis hubungan jenis-jenis virus penyakit kerdil udang windu di pembenihan dengan jenis virus penyakit kerdil udang windu di tambak hasil deteksi dengan MPCR di Sulawesi Selatan dan 4) menganalisis hubungan antara musim (suhu, salinitas dan pH) terhadap prevalensi virus udang kerdil udang windu pada pembenihan dan tambak di Sulawesi Selatan.

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan UNHAS. Hewan uji adalah benih berukuran pascalarva dari Takalar, Barru dan Pinrang dan udang dewasa berumur 3-4 bulan dari Takalar, Maros, Pangkep, Barru dan Pinrang berukuran normal dan kerdil. Sampling dilakukan pada musim hujan dan kemarau. Primer spesifik untuk mengamplifikasi virus MBV, IHHNV dan HPV berukuran masing-masing 261 bp, 302 bp dan 595 bp. Data prevalensi ketiga jenis virus dan tipe infeksi virus pada musim kemarau dan hujan pada udang normal dan kerdil dianalisis dengan Chi-square, hubungan musim dengan prevalensi virus dianalisis dengan analisis korelasi. Data optimasi MPCR, jenis virus dan karakterisasi IHHNV dianalisis secara deskriptif.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa MPCR dapat mengamplifikasi tiga DNA jenis virus MSGs secara simultan, penyakit kerdil di tambak berasal dari benih yang sudah terinfeksi virus MSGs baik dalam bentuk infeksi tunggal, ganda maupun tripel. Virus IHHNV pada penelitian ini adalah IHHNV non infeksius tipe A. Prevalensi virus MSGs pada benih dipengaruhi oleh musim dan virus MSGs bertanggungjawab terhadap kekerdilan udang windu di tambak.

Kata Kunci : Deteksi molekuler, Musim, Penyakit kerdil udang windu, Sulawesi Selatan, Virus.

ABSTRACT

SRIWULAN. Molecular detection and analyses of viruses causing slow growth syndrome on tiger shrimp (*Penaeus monodon*, Fabricius) in South Sulawesi. (Supervised by Akbar Tahir, Alexander Rantetondok and Baharuddin).

The purposes of these researches were to: 1). optimize multiplex PCR (MPCR) technique as a tool for early and rapid detection of the monodon slow growth syndrome (MSGs) viruses simultaneously, 2). characterize IHHNV type, 3). analyze relationship on the occurrence of the viruses in shrimp hatcheries and in shrimp ponds, 4) analyze relationship between season (temperature, salinity and pH) and the prevalence of viruses in shrimp hatcheries and ponds in South Sulawesi.

These researches were conducted at the Laboratory of Parasites and Diseases of Fish, UNHAS. Samples of shrimp seed were obtained from Takalar, Barru and Pinrang Regencies, and 3 – 4 months old shrimp cultured in shrimp ponds, consists of normal and dwarf performance, were obtained from Takalar, Maros, Pangkep, Barru and Pinrang Regencies. Sampling was conducted at dry and wet seasons. Specific primers to amplify the viruses MBV, IHHNV and HPV with nucleotide size of 261 bp., 302 bp., and 595 bp., respectively. Prevalence of viruses and their of infection type at dry and wet seasons was analyzed using Chi-square. Relationship between seasons and prevalence of viruses was tested using correlation analysis. MPCR optimization, type of viruses and characterize IHHNV type were analyzed descriptively.

Results showed that MPCR could amplify the three MSGS viruses simultaneously. Viruses detected in shrimp ponds could be derived from seeds which had been previously infected in hatcheries either in single infection or multiple infections type. IHHNV found was IHHNV non infectious type A. Prevalence of viruses infection in shrimp hatcheries was influenced by seasons and viruses were responsibility to stunted growth of shrimp in ponds.

Key Words: Molecular detection, season, monodon slow growth syndrome, South Sulawesi, viruses.

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	7
C. Tujuan Penelitian	11
D. Manfaat Penelitian	11
E. Ruang Lingkup Penelitian	12
F. Defenisi dan Istilah	15
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	21
A. Penyakit Kerdil pada Udang Windu	21
B. Multipleks PCR (MPCR)	52
C. Faktor Lingkungan untuk Perkembangan Virus	55
D. Kualitas Air untuk Kebutuhan Udang Windu	57
E. Kerangka Konseptual Penelitian	61

F. Hipotesis Penelitian	62
BAB III. METODE PENELITIAN	63
A. Waktu dan Lokasi	63
B. Bahan dan Alat	64
C. Populasi dan Sampel	68
D. Variable Penelitian	70
E. Teknik Pengumpulan Data	73
F. Teknik Analisis	77
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	79
A. Optimasi Multipleks PCR	79
1. Spesifisitas MPCR	79
2. Sensitifitas MPCR	91
B. Karakterisasi Virus IHHNV Isolat Sulawesi Selatan	94
C. Hubungan Jenis dan Prevalensi Virus Di Pembenihan dan Tambak	102
1. Jenis Virus MSGS Di Pembenihan	102
2. Jenis Virus MSGS Di Tambak	103
3. Tipe Infeksi Virus Penyakit Kerdil Di Pembenihan dan Tambak	110
D. Hubungan Musim dengan Prevalensi Virus Di Pembenihan dan Tambak	113
1. Prevalensi Virus MSGS Di Pembenihan pada Musim Hujan dan Kemarau	113
2. Prevalensi Tipe Infeksi Virus MSGS Di Pembenihan pada Musim Hujan dan Kemarau	115
3. Prevalensi Virus MSGS Di Tambak pada Musim Hujan dan Kemarau	121
4. Prevalensi Tipe Infeksi Virus MSGS Di Tambak pada Musim Hujan dan Kemarau	127

BAB V. PENUTUP	133
A. Kesimpulan	133
B. Saran	135
DAFTAR PUSTAKA	137
LAMPIRAN	150
CURRICULUM VITAE	182

DAFTAR TABEL

nomor		halaman
1.	Nama primer, panjang basa, susunan oligonukleotida, suhu dan nomor akses primer yang digunakan pada penelitian ini (Khawsak <i>et al.</i> , 2008)	64
2.	Jumlah dan ukuran sampel benih udang windu	69
3.	Jumlah dan ukuran sampel udang windu dari tambak	69
4.	Tipe infeksi virus penyakit kerdil udang windu pada pembenihan di Sulawesi Selatan	111
5.	Tipe infeksi virus penyakit kerdil udang windu di tambak di Sulawesi Selatan	111

DAFTAR GAMBAR

nomor		halaman
1.	Pengaruh berbagai patogen terhadap produksi udang dunia berdasarkan data FAO tahun 2005 (Flegel <i>et al.</i> , 2008)	22
2.	Mikrograf transmisi elektron MBV (Flegel, 2006)	28
3.	Fotomikrograf MBV. (A) <i>occlusion body</i> (panah) pada kutikula PL diamati langsung dengan mikroskop cahaya. (B). Fotomikrograf jaringan yang memperlihatkan tahap awal sampai akhir infeksi MBV (H&E) (Flegel, 2006)	31
4.	Daerah penyebaran MBV di dunia (McClennen, 2004)	35
5.	Virion IHHNV pada udang (Flegel, 2006)	36
6.	Kelainan bentuk rostrum <i>P. vanamei</i> akibat <i>runt deformity diseases</i> . Atas, rostrum udang melengkung ke bawah, sedang gambar bawah, rostrum melengkung ke atas dan keduanya ukuran rostrumnya lebih pendek dari normal (A. Flegel, 2006 dan B. Rai <i>et al.</i> , 2009)	38
7.	Inklusi cowdry type A IHHNV di dalam nukleus sel kelenjar antenna <i>P. monodon</i> (Flegel, 2006)	40
8.	Penyebaran IHHNV di dunia (McClennen, 2004)	44
9.	Virion HPV pada <i>P. monodon</i> (Flegel, 2006)	45
10.	Gejala umum infeksi HPV. Udang kecil adalah terinfeksi HPV, sementara yang lebih besar tidak terinfeksi (Flegel, 2006)	47

11.	Histopatologi HPV pada sel epitel tubule hepatopankreas <i>P. monodon</i> dari Thailand. Tahap awal inclusion adalah lebih eosinofilik daripada basofilik. Beberapa nukleus mempunyai dua nucleoli atau munculnya dua atau lebih inklusion HPV yang bergabung bersama (Flegel, 2006)	50
12.	Kerangka Konseptual Penelitian	61
13.	Hasil MPCR suhu <i>annealing</i> 56°C. M adalah marker DNA 100 bp. Lane 1 kontrol negatif, lane 2-7 sampel negatif	82
14.	Hasil MPCR suhu <i>annealing</i> 55°C dimana pita yang muncul diperkirakan pita positif IHHNV dan MBV yang berhimpit (Lane 1,2,3,4,5,6, lane 7 kontrol negatif, M adalah marker 1000 bp)	82
15.	Hasil PCR dengan primer tunggal. M adalah Marker 1000 bp; Lane 1, 2 primer MBV, lane 3, 4 primer IHHNV, lane, 5, 6 primer HPV dan lane 7 kontrol negatif)	83
16.	Fotograf jaringan benih udang windu asal Takalar yang terinfeksi virus . A. HPV, B. IHHNV dan C. MBV. H&E (100x)	85
17.	a. Fotograf jaringan benih udang windu Pinrang yang terinfeksi virus A. HPV, B. MBV dan C. IHHNV. b. MBV (tanda panah). H&E (400x)	86
18.	a. Fotograf jaringan benih udang windu Barru (A adalah IHHNV, B adalah MBV), b. Jaringan benih udang windu Pinrang (A. IHHNV dan B adalah HPV). H&E (a. 400x, b. 1000x)	87
19.	Hasil optimasi suhu <i>annealing</i> : a. 57°C; b. 58°C; c. 59°C dan d. 60°C. M adalah marker 100 bp, lane 1-7 adalah sampel	90
20.	Hasil uji sensitifitas primer pada MPCR. M adalah Marker 1000 bp, lane 1-6 adalah dilusi DNA templat 10 ⁰ -10 ⁻⁵ , lane 7 kontrol negatif	92

21.	Hasil BLAST sekuensing nukleotida IHHNV isolat Sulawesi Selatan (Query) dengan nukleotida IHHNV yang ada di Bank Gen (Sbjct)	98
22.	Pohon pilogeni IHHNV isolate Sulawesi Selatan	100
23.	Hasil MPCR sampel benih udang windu asal Pinrang. M adalah Marker 100 bp. Lane 1 kontrol negatif, lane 2-11 sampel benih. Lane 3 (MBV+IHHNV+HPV), lane 4 (MBV), 5 dan 6 (IHHNV + HPV), lane 7 (IHHNV), Lane 8 dan 11 (MBV + IHHNV).	102
24.	Hasil MPCR sampel benih udang windu asal Takalar. M adalah Marker 100 bp dan Lane 1, 2, 4-11 adalah sampel benih. Lane 3 adalah kontrol negatif. Lane 1 dan 8 (MBV+IHHNV), Lane 2 dan 4 (IHHNV+HPV), lane 5,6,7,9,10 dan 11 (MBV+IHHNV+HPV)	103
25.	Hasil MPCR sampel udang windu dari tambak Takalar. M adalah marker 100 bp, lane 1 (kontrol negatif), lane 2, 4, 5 dan 16 (MBV+IHHNV), lane 3 dan 9 (IHHNV), Lane 13 (MBV), Lane 8, 10, 14 dan 15 (MBV+IHHNV+HPV)	104
26.	Hasil MPCR sampel udang windu dari tambak Pinrang. M adalah marker 100 bp, lane 1 (IHHNV+HPV)), lane 3 (IHHNV), lane 9, 14 (MBV), lane 8, 15, 16 (MBV+IHHNV), Lane 11, 13, 17 (MBV+IHHNV+HPV)	105
27.	Hasil MPCR sampel udang windu dari Pangkep. M adalah marker 1000 bp, lane 8,9,10 adalah sampel positif MBV, lane 11 kontrol negatif	105
28.	Hasil MPCR sampel udang windu dari tambak Maros. M adalah marker 1000 bp, lane 1– 9 adalah sampel positif MBV, lane 11 kontrol negatif	106
29.	Prevalensi virus MBV, IHHNV dan HPV di pembenihan Sulawesi Selatan pada musim kemarau dan hujan ($P<0.0$).	114
30.	Prevalensi virus MSGS di pembenihan di Sulawesi	115

Selatan pada A. musim hujan dan B. musim kemarau
($P < 0.05$)

- | | | |
|-----|--|-----|
| 31. | Prevalensi tipe infeksi virus MSGS pada pembenihan di Sulawesi Selatan pada musim hujan dan kemarau ($P > 0.05$) | 116 |
| 32. | Prevalensi tipe infeksi virus MSGS pada benih di musim hujan ($P < 0.05$) | 117 |
| 33. | Prevalensi tipe infeksi virus MSGS di benih pada musim kemarau ($P < 0.05$) | 118 |
| 34. | Prevalensi tipe tidak terinfeksi dan terinfeksi virus MSGS di benih pada musim hujan dan kemarau ($P < 0.05$) | 118 |
| 35. | Prevalensi virus MSGS di tambak pada udang normal dan kerdil pada musim hujan dan kemarau ($P > 0.05$) | 122 |
| 36. | Prevalensi virus MBV, IHNV dan HPV di Sulawesi Selatan (Takalar dan Pinrang) untuk udang normal dan kerdil pada musim hujan (A) dan kemarau (B) ($P > 0.05$) | 123 |
| 37. | Prevalensi tipe infeksi virus MSGS di tambak Sulawesi Selatan | 128 |
| 38. | Prevalensi tipe infeksi virus MSGS di tambak Sulawesi Selatan (Takalar dan Pinrang). A. pada musim hujan ($P > 0.05$) dan B. musim kemarau ($P < 0.05$) | 129 |
| 39. | Prevalensi tipe infeksi tidak ada virus/tidak terinfeksi dengan terinfeksi pada udang normal dan kerdil di musim hujan dan kemarau ($P < 0.05$) | 130 |

DAFTAR LAMPIRAN TABEL

nomor		halaman
1.	Frekuensi kemunculan tipe infeksi virus penyakit kerdil udang windu pada pembenihan di Sulawesi Selatan	150
2.	Frekuensi kemunculan tipe infeksi virus penyakit kerdil udang windu di Tambak Sulawesi Selatan	151
3.	Prevalensi virus MBV, IHHNV dan HPV pada benih udang windu pada musim hujan dan kemarau	153
4a.	Prevalensi virus MBV, IHHNV dan HPV pada udang windu di tambak pada musim hujan dan kemarau	153
4b.	Prevalensi virus MBV, IHHNV dan HPV pada udang windu di tambak pada musim hujan dan kemarau	154
5.	Hasil analisis korelasi antara kualitas air pembenihan dengan prevalensi virus MBV, IHHNV dan HPV pada musim hujan	154
6.	Hasil analisis korelasi Spearman antara kualitas air pembenihan dengan prevalensi virus MBV, IHHNV dan HPV pada benih di musim kemarau	155
7.	Analisis korelasi antara kualitas air dengan prevalensi virus MBV, IHHNV dan HPV pada udang normal di musim hujan	155
8.	Analisis korelasi antara kualitas air dengan prevalensi virus MBV, IHHNV dan HPV pada udang normal di musim kemarau	156
9.	Analisis korelasi antara kualitas air dengan prevalensi virus MBV, IHHNV dan HPV pada udang kerdil di musim hujan	156

10.	Analisis korelasi antara kualitas air dengan prevalensi virus MBV, IHHNV dan HPV pada udang kerdil di musim kemarau	157
11.	Analisis prevalensi virus HPV pada benih berdasarkan musim	157
12.	Analisis prevalensi virus IHHNV pada benih berdasarkan musim	158
13.	Analisis prevalensi virus MBV pada benih berdasarkan musim	158
14.	Analisis prevalensi MBV, IHHNV dan HPV pada benih antara musim hujan dengan kemarau	159
15.	Analisis prevalensi tidak ada virus dengan terinfeksi pada musim hujan dan kemarau	159
16.	Analisis prevalensi tipe infeksi virus pada benih di musim hujan	160
17.	Analisis prevalensi tipe infeksi virus pada benih antara musim hujan dan kemarau	160
18.	Analisis prevalensi tipe infeksi virus pada benih pada musim kemarau	160
19.	Analisis prevalensi virus pada udang kerdil antara musim hujan dengan kemarau	161
20.	Analisis prevalensi virus pada udang normal antara musim hujan dengan kemarau	161
21.	Analisis prevalensi virus antara normal dengan kerdil pada musim hujan	162
22.	Analisis prevalensi virus antara normal dengan kerdil pada musim kemarau	162
23.	Analisis prevalensi tipe tidak terinfeksi dengan terinfeksi pada udang kerdil di musim hujan	163

24.	Analisis prevalensi tipe tidak terinfeksi dengan tipe infeksi pada udang kerdil di musim kemarau	163
25.	Analisis prevalensi tipe tidak terinfeksi dengan terinfeksi pada udang normal di musim hujan	163
26.	Analisis prevalensi tipe tidak terinfeksi dengan terinfeksi pada udang normal di musim kemarau	164
27.	Analisis prevalensi tipe infeksi antara udang normal dan kerdil pada musim hujan	164
28.	Analisis prevalensi tipe infeksi antara udang normal dan kerdil pada musim kemarau	164
29.	Analisis prevalensi tipe infeksi pada udang kerdil di musim hujan	165
30.	Analisis prevalensi tipe infeksi pada udang kerdil antara musim hujan dengan kemarau	165
31.	Analisis tipe infeksi virus udang kerdil pada musim kemarau	165
32.	Analisis tipe infeksi virus udang normal pada musim hujan	166
33.	Analisis tipe infeksi virus udang normal antara musim hujan dengan kemarau	166
34.	Analisis prevalensi tipe infeksi virus udang normal pada musim kemarau	166
35.	Nilai kualitas air untuk pembenihan	167
36.	Nilai kualitas air tambak untuk udang normal	167
37.	Nilai kualitas air tambak untuk udang kerdil	168
38.	Nilai kualitas air berdasarkan kebutuhan optimal udang windu	168

DAFTAR LAMPIRAN GAMBAR

nomor		halaman
1.	Prosedur Ekstraksi DNA Sesuai Petunjuk QiaAMP DNA Mini Kit	169
2.	Peta Lokasi Penelitian	172
3.	Hasil BLAST IHHNV asal Sulawesi Selatan	173

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Udang windu (*Penaeus monodon* Fabr) merupakan salah satu komoditi unggulan dari sub-sektor perikanan yang telah memberikan kontribusi yang sangat besar terhadap peningkatan devisa negara. Peningkatan produksi udang terutama sangat pesat di era tahun 1980 an, sampai awal tahun 1990. Setelah itu, produksi udang mengalami penurunan yang sangat drastis dan sampai saat ini permasalahan tersebut belum dapat diatasi sepenuhnya. Semenjak munculnya WSSV (*white spot syndrome virus*), agen penyakit bintik putih, produksi udang mengalami penurunan menjadi hanya sekitar 50.000 ton pada tahun 2000 dari sekitar lebih dari 200.000 ton pada tahun 1994/1995. Kerugian diperkirakan mencapai trilyunan rupiah dari potensial lahan dan produksi yang dimiliki (Wahyono, 1999 *dalam* Rukyani, 2000). Selain penyakit WSSV, penyakit kerdil pada udang windu juga merupakan momok terbesar dalam industri budidaya udang windu. Publikasi data pengaruh penyakit kerdil terhadap produksi udang windu di Sulawesi Selatan belum ada, namun kenyataan di lapangan bahwa penyakit ini banyak dialami oleh para petani tambak.

Saat ini produktivitas udang windu sangat rendah bukan karena hanya diusahakan dengan cara tradisional, tetapi juga disebabkan karena terinfeksi oleh virus, baik infeksi tunggal maupun berupa multiinfeksi oleh berbagai jenis virus. Produktivitas udang windu jauh dari target produksi udang nasional yang berkisar 2 ton/ha/tahun. Dari hasil pemantauan terhadap seorang petambak tradisional yang memiliki lahan sekitar 20 ha, ternyata hanya mampu memproduksi sekitar 1 ton/20 ha/tahun pada tahun 2005.

Penyakit udang sampai saat ini merupakan hambatan utama terhadap perkembangan budidaya udang windu di tambak. Diantara berbagai jenis penyakit yang telah dilaporkan dari golongan parasit, bakteri, jamur dan virus, penyakit virus udang merupakan masalah paling serius yang telah menghancurkan industri udang di berbagai negara dan sampai saat ini masih merupakan ancaman terhadap perkembangan industri perudangan secara global ke depan. Perkembangan penyakit virus ini sejalan dengan intensifikasi udang yang mulai berkembang sejak tahun 1980-an. Berbagai jenis virus telah dilaporkan menginfeksi udang windu di Indonesia sejak saat itu, diantaranya adalah WSSV, *monodon baculovirus* (MBV), *hepatopancreatic parvovirus* (HPV), *yellow head virus* (YHV), *infectious myonecrosis virus* (IMNV), *infectious hypodermal and hematopietik necrosis virus* (IHHNV) dan *Laem-Singh virus* (LSNV) (Lightner, 2007).

Perkembangan akhir-akhir ini memperlihatkan bahwa udang windu yang dipelihara di tambak menghadapi dua masalah utama, yaitu terjadinya kematian massal udang pada umur mencapai 1 sampai 2 bulan akibat infeksi WSSV dan gejala pertumbuhan yang sangat lambat sehingga meskipun telah mencapai usia panen (100 – 120 hari pemeliharaan) ukuran udang masih tetap kerdil. Penyebab udang kerdil ini diduga akibat infeksi beberapa jenis virus yaitu MBV, HPV dan IHHNV (Chayaburakul *et al.*, 2004), dan dikenal dengan gejala *Monodon Slow Growth Syndrome* (MSGs). Penyakit ini pertama kali dikenal di Thailand dan juga di India serta beberapa negara lainnya. Di Indonesia, gejala penyakit udang kerdil ini juga merupakan masalah serius bagi para petani tambak. Salah satu alasan sehingga budidaya semi-intensif atau intensif udang windu tidak lagi dilakukan di Indonesia dan menggantinya dengan udang spesies introduksi dari Amerika (*Litopenaeus vannamei*) adalah munculnya gejala penyakit udang bintik putih dan gejala udang kerdil/*stunted growth* atau MSGs.

Gejala penyakit kerdil yang seringkali muncul pada udang windu, pada awalnya diduga disebabkan oleh infeksi virus MBV saja. Namun dari penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa penyakit kerdil udang windu ini seringkali berasosiasi dengan berbagai jenis virus, antara lain MBV, HPV dan IHHNV (Chayaburakul *et al.*, 2004). Gejala penyakit kerdil udang windu yang ditemukan di India dan Thailand diduga disebabkan oleh adanya virus baru selain dari ketiga jenis virus yang telah dilaporkan

(Manivannan *et al.*, 2002; Chayaburakul *et al.*, 2004). Penelitian terakhir menunjukkan bahwa virus LSNV, sebuah virus RNA, diduga merupakan salah satu penyebab terjadinya penyakit MSGS (Sritunyalucksana *et al.*, 2006).

Virus IHHNV sebagai salah satu virus penyebab penyakit kerdil pada udang windu sering menjadi perhatian para peneliti di bidang biomolekuler karena IHHNV mempunyai strain yang berbeda berdasarkan letak geografis dan inangnya. IHHNV terbagi atas dua kategori yaitu IHHNV infeksius dan IHHNV non infeksius. IHHNV infeksius adalah IHHNV yang dapat menyebabkan infeksi pada udang sedangkan IHHNV non infeksius adalah IHHNV yang tidak menyebabkan infeksi atau disebut dengan infeksi laten. IHHNV infeksius umumnya menyerang *P. stylirostris* di Hawaii, Thailand, Philipina dan Taiwan. IHHNV non infeksius terbagi atas dua tipe yaitu tipe A yang umumnya berasal dari udang windu Australia dan Madagaskar dan tipe B umumnya berasal dari udang windu Tanzania (Tang and Lightner, 2007; Rai *et al.*, 2009: 2011). Oleh sebab itu, IHHNV asal Sulawesi Selatan perlu dikarakterisasi untuk mengetahui kesamaan/kemiripan dengan IHHNV yang sudah ada di negara lain.

Perkembangan virus pada inang dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti faktor lingkungan, keberadaan vektor serta kondisi inang sendiri. Perkembangan atau replikasi virus IHHNV pada *L. vannamei* yang dipelihara pada air hangat (32.8°C dan 31.1°C) memperlihatkan tingkat replikasi yang lebih rendah dibanding dengan yang dipelihara pada suhu

dingin (24.4-26.3°C) (Montgomery-Brock *et al.*, 2007). Begitupula dengan WSSV dan *taura syndrome virus* (TSV), tidak bisa bereplikasi pada udang yang dipelihara dalam air hangat (32°C) dibanding pada udang yang dipelihara pada suhu dingin (25°C) (Montgomery-Brock *et al.*, 2004). Pada musim hujan populasi virus WSSV pada udang windu meningkat karena kekeruhan yang tinggi dan salinitas yang rendah (Karunasagar and Karunsagar 1997). Namun, berbeda dengan hasil penelitian Tendencia *et al.* (2010), pemaparan suhu dan salinitas tinggi pada udang windu adalah faktor yang sangat penting untuk peledakan penyakit WSSV. Hal ini memperlihatkan bahwa dinamika perkembangan virus sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan.

Penyakit kerdil udang windu yang terjadi di tambak dapat disebabkan oleh benur udang yang telah terinfeksi di pembenihan karena induknya yang terinfeksi dan selanjutnya menimbulkan penyakit setelah dipelihara di tambak. Selain itu, penyakit udang yang sangat sering muncul di tambak terjadi akibat terinfeksi oleh virus yang terbawa bersama air atau bersama karier yang masuk ke dalam tambak. Menurut Catap and Travina (2005), penyebaran virus dapat terjadi melalui dua cara yaitu secara vertikal dan horizontal. Penyebaran virus secara vertikal terjadi akibat induk udang yang terinfeksi selanjutnya menularkannya pada larva udang, sebagaimana terjadi pada virus MBV, IHNV, WSSV, HPV dan beberapa jenis virus lainnya. Sedangkan penyebaran secara horizontal

terjadi akibat virus terbawa melalui air atau hewan karier dan selanjutnya menginfeksi udang sehat.

Di Indonesia, meskipun sudah dilaporkan adanya virus MBV, HPV dan IHNV pada udang windu, penelitian yang mempelajari keterkaitan antara penyakit udang kerdil dengan infeksi virus belum dilaporkan. Penelitian terdahulu hanya melaporkan keberadaan virus tersebut berdasarkan informasi histopatologi (Madeali, 2000; Yanto, 2006), dan belum ada laporan deteksi secara molekular terhadap virus-virus penyakit tersebut terutama deteksi beberapa jenis virus secara bersamaan atau simultan menggunakan metode multipleks PCR (MPCR). Penggunaan MPCR untuk mendeteksi penyakit udang sudah dilakukan oleh beberapa peneliti di negara lain, namun di Indonesia, khususnya untuk mendeteksi secara simultan penyakit udang belum begitu populer. Tsai *et al.* (2004) mengembangkan *multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction* (mRT-PCR) untuk mendeteksi secara simultan WSSV dan TSV pada udang *P. vannamei*, Dhar *et al.* (2001) mengembangkan *real-time PCR* (RT-PCR) untuk menghitung beban virus TSV dan YHV pada udang dan Xie *et al.* (2008) mengembangkan RT-MPCR untuk mendeteksi infeksi tiga patogen virus pada udang yaitu TSV, WSSV dan IHNV, sementara Khawsak *et al.* (2008) menggunakan *reverse transcriptase-multiplex polymerase chain reaction* (RT-MPCR) untuk mendeteksi 6 jenis virus pada udang windu yaitu WSSV, IHNV, MBV, HPV, TSV dan YHV.

Penggunaan MPCR pada diagnosis penyakit virus sangatlah menguntungkan dari segi efisiensi waktu dan biaya. Jika pendeteksian beberapa virus dengan cepat dapat dilaksanakan maka antisipasi terhadap penyakit virus dapat segera dilakukan. Namun demikian, sebelum MPCR diaplikasikan, terlebih dahulu dilakukan optimasi, baik kondisi maupun komposisi MPCR. Optimasi bertujuan untuk mendapatkan kondisi dan komposisi MPCR yang optimal sehingga metode ini menjadi standar. Optimasi ini dilakukan untuk menghindari adanya gangguan primer dimers dan produk non spesifik lainnya seperti adanya hasil positif dan negatif palsu. Amplifikasi secara spesifik juga sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti konsentrasi *buffer* MPCR dan konsentrasi primer (Loffert, *et al.* (1999).

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini akan menganalisis keberadaan virus MBV, IHHNV dan HPV penyebab penyakit kerdil udang windu di pembenihan dan yang dipelihara di tambak pada musim kemarau dan musim hujan di Sulawesi Selatan secara molekuler dengan MPCR yang memerlukan optimasi MPCR serta untuk mengkarakterisasi virus IHHNV asal Sulawesi Selatan.

B. Rumusan Masalah

Penyakit kerdil udang windu di Sulawesi Selatan sebenarnya telah banyak menyebabkan kerugian pada petani tambak karena ukuran udang yang tidak bisa mencapai ukuran standar sesuai umur udang tersebut,

namun laporan tentang kerugian ekonomi yang dialami usaha budidaya di Sulawesi Selatan belum pernah dilaporkan. MSGS telah diteliti di Negara Thailand, India dan Taiwan.

Di Thailand kerugian akibat penyakit MSGS adalah dari 255.568 ton (US\$ 2467 juta) pada tahun 2001 menjadi 212.091 ton (US\$ 1846 juta) dan hal ini berlanjut sampai tahun 2003. Udang yang dipelihara di tambak selama 4 bulan memperlihatkan pertumbuhan yang kerdil dengan laju pertumbuhan harian sekitar 0.07 sampai 0.15 g/hari atau hanya mencapai berat sekitar 16.8 g/ekor, jika dibandingkan dengan pertumbuhan udang normal yang laju pertumbuhan hariannya sekitar 0.2 g/hari dengan berat badan sekitar 24 g/ekor setelah dipelihara selama 4 bulan (Chayaburakul *et al.*, 2004).

Penyakit kerdil udang windu yang telah dilaporkan di beberapa negara disebabkan oleh beberapa jenis patogen seperti virus dan parasit microsporidian. Jenis virus yang berasosiasi dengan penyakit kerdil adalah virus MBV, HPV, IHNV serta LSNV (Chayaburakul *et al.*, 2004; Sritunyalucksana *et al.*, 2006). Sementara jenis parasit yang berasosiasi dengan penyakit kerdil adalah microsporidian dan gregarine (Poulpanich and Withyachumnarnkul, 2009) yang terdapat pada usus udang yang pada infeksi berat menyebabkan penurunan laju pertumbuhan, perubahan warna menjadi kuning dan terjadi perforasi dan hiperflasia pada epitelium usus tengah/midgut (Lightner 1993 dan 1996). Virus IHNV sebagai salah satu virus penyakit kerdil telah banyak diteliti

terutama mengenai sekuen nukleotida berdasarkan letak geografis dan inangnya. IHHNV memiliki dua kelompok yaitu IHHNV infeksius dan non infeksius, dimana non infeksius terdiri atas dua strain yaitu IHHNV tipe A dan B. Hal ini sangat menarik untuk diteliti lebih jauh khususnya IHHNV pada penelitian ini.

Keberadaan agen penyakit pada kondisi budidaya dipengaruhi oleh banyak faktor. Kualitas media pemeliharaan merupakan hal yang sangat berpengaruh terhadap populasi patogen. Virus WSSV misalnya, populasinya meningkat pada musim hujan, dimana pada musim hujan kekeruhan tinggi dan salinitas rendah (Karunasagar *and* Karunsagar 1997) dan virus IHHNV tingkat replikasinya lebih tinggi pada udang yang dipelihara pada suhu yang lebih rendah dibanding dengan suhu tinggi. Oleh sebab itu, penelitian ini akan melihat perbedaan musim yang mempengaruhi parameter kualitas air media budidaya terhadap keberadaan virus-virus penyebab udang kerdil.

Di Indonesia penelitian tentang penyakit udang kerdil belum banyak dipublikasi terutama deteksi cepat virus penyakit kerdil secara molekuler pada pembenihan dan tambak di dua musim yang berbeda yaitu musim hujan dan kemarau. Oleh sebab itu, perlu dikembangkan metode deteksi dini dan cepat untuk virus-virus ini. Salah satu metode deteksi yang cepat adalah MPCR karena dapat mendeteksi beberapa jenis virus secara bersamaan pada waktu yang sama dan dalam suatu reaksi yang sama (simultan).

Multipleks PCR adalah suatu metode deteksi molekuler beberapa agen penyakit secara simultan dalam satu reaksi yang sama. MPCR membantu dalam tindakan pengendalian yang tepat. Dengan mengetahui jenis virus MSGS pada benih udang windu, dapat dilakukan tindakan pencegahan penebaran terhadap udang tersebut untuk menghindari peledakan populasi virus penyakit kerdil ini di tambak. Selain itu, dengan mengetahui agen penyakit MSGS tindakan pencegahan dapat dilakukan seperti melakukan sertifikasi benih bebas virus-virus penyakit kerdil, vaksinasi atau pemberian probiotik.

Aplikasi MPCR sebagai suatu metode deteksi standar harus melalui proses optimasi. Optimasi pada MPCR meliputi optimasi kondisi seperti suhu *annealing* dan optimasi komposisi MPCR seperti konsentrasi templat atau DNA target dan konsentrasi primer.

Dari uraian di atas maka masalah penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Apakah MPCR sebagai metode deteksi molekuler cepat dapat diaplikasikan dalam mendeteksi jenis virus MSGS di Sulawesi Selatan secara simultan?
2. Apakah virus IHHNV asal Sulawesi Selatan secara genetik sama dengan virus IHHNV yang ada di negara-negara lain ?
3. Apakah benih udang windu dari pembenihan merupakan salah satu sumber penyebaran virus MSGS di tambak ?

4. Apakah musim berpengaruh terhadap prevalensi virus MSGS pada benih dan udang windu dewasa di tambak?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Melakukan optimasi MPCR sebagai metode diagnosis molekuler dini dan cepat secara simultan untuk virus MSGS.
2. Mengkarakterisasi jenis virus IHHNV yang menginfeksi udang windu di Sulawesi Selatan.
3. Menganalisis hubungan jenis-jenis virus MSGS di pembenihan dengan jenis virus MSGS di tambak hasil deteksi dengan MPCR di Sulawesi Selatan.
4. Menganalisis hubungan antara musim (suhu, salinitas dan pH) dengan prevalensi virus MSGS pada pembenihan dan tambak di Sulawesi Selatan.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

1. Sebagai dasar rekomendasi kebijakan pencegahan penyakit kerdil udang windu di Sulawesi Selatan.
2. Sebagai informasi tentang jenis atau strain virus IHHNV yang menginfeksi udang windu di Sulawesi Selatan.
3. Sebagai sumber informasi tentang jenis dan tingkat prevalensi virus-virus MSGS di pembenihan dan tambak di Sulawesi Selatan.

4. Sebagai informasi tentang waktu yang tepat untuk budidaya udang windu di tambak sehubungan musim dengan keberadaan virus penyakit kerdil udang windu pada udang windu.

E. Ruang Lingkup Penelitian

Penyakit kerdil udang windu disebabkan oleh beberapa asosiasi agen penyakit seperti beberapa jenis virus DNA yaitu IHHNV, MBV, HPV dan virus RNA yaitu LSNV, serta parasit seperti microsporidian dan Gregarine serta genetika (Chayaburakul *et al.*, 2004; Sritunyalucksana *et al.*, 2006; Pratoomthai *et al.*, 2007; Poulpanich and Withyachumnarnkul, 2009). Namun agen yang paling dominan pada penyakit kerdil udang windu adalah virus. Virus merupakan agen penyakit udang yang sangat berbahaya karena transmisinya secara vertikal melalui induk udang ke anaknya dan horizontal melalui lingkungan dengan reservoir inang adalah semua jenis krustase air laut dan krustase air tawar. Selain itu, infeksi virus tidak bisa diobati karena virus merupakan mikroorganisme intraselluler yang tidak dapat dijangkau oleh sistem peredaran darah udang sehingga penggunaan antibiotik untuk virus adalah tidak cocok.

Perkembangan infeksi virus sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kondisi lingkungan dan kondisi inang/udang. Kondisi lingkungan seperti suhu, salinitas, dan pH sangat dipengaruhi oleh musim yang mempengaruhi perkembangan virus dan kondisi udang sebagai inang.

Agen penyakit yang dianalisis sebagai penyebab udang windu kerdil dengan MPCR pada penelitian ini adalah tiga jenis virus DNA yaitu IHHNV, MBV dan HPV, sementara LSNV tidak dianalisis karena LSNV adalah virus RNA yang tidak bisa dideteksi secara bersamaan dengan virus DNA menggunakan MPCR. MPCR digunakan untuk mendeteksi beberapa jenis virus DNA saja secara simultan. Jika virus DNA dan virus RNA dideteksi secara bersamaan atau mendeteksi beberapa virus RNA saja maka MPCR yang digunakan adalah *Reverse Transcriptase Multiplex PCR* (RT- MPCR). MPCR mempunyai kelebihan dengan PCR tunggal karena MPCR dapat menghemat tenaga, reagen dan waktu karena deteksi dilakukan secara simultan dalam satu tabung dan reagen yang sama serta meminimalkan kontaminasi akibat pemipetan. Namun demikian, MPCR sebelum ditetapkan sebagai metode standar, kondisi dan komposisi PCR harus dioptimasi terlebih dahulu. Hal ini bertujuan untuk menjadikan metode ini metode yang standar sehingga dapat dilakukan/diulang kapan, siapa dan dimana saja.

Karakterisasi virus IHHNV yang berasal dari Sulawesi Selatan juga dilakukan pada penelitian ini untuk melihat sekuens nukleotida IHHNV yang diamplifikasi oleh primer spesifik untuk IHHNV dengan ukuran 302 bp sama dengan primer yang digunakan pada MPCR. Karakterisasi IHHNV dilakukan karena virus IHHNV adalah salah satu jenis virus yang mempunyai beberapa strain berdasarkan inang dan sebaran geografis. IHHNV terbagi atas dua kategori yaitu IHHNV infeksius dan IHHNV non

infeksius. IHHNV non infeksius terdiri atas tipe A dan tipe B. IHHNV asal Australia dan Madagaskar umumnya adalah IHHNV tipe A sementara IHHNV Tanzania adalah IHHNV tipe B sedangkan IHHNV infeksius adalah IHHNV asal Hawaii, Philipina, Thailand, Taiwan dan India. IHHNV pada udang windu dan vannamei umumnya adalah IHHNV non infeksius dan pada udang *P. stylirostris* adalah IHHNV infeksius. Hal ini berbeda dengan virus HPV yang terdiri atas empat strain berdasarkan inangnya yaitu HPV_{chin} yang menginfeksi *P. chinensis* di Korea, HPV_{mon} menginfeksi *P. monodon* di Thailand dan HPV_{merg} menginfeksi *P. merguensis* di Australia serta HPV_{semi} menginfeksi *P. semisulcatus* di India, sedangkan virus MBV belum ada laporan tentang keberadaan strain MBV.

Sampel yang dianalisis adalah benih udang windu dari pembenihan dan udang yang dipelihara di tambak. Hal ini untuk melihat apakah virus penyakit kerdil udang windu pada udang windu di tambak terbawa dari benih yang ditebar. Sementara untuk mengetahui dinamika infeksi virus penyakit kerdil udang windu pada benih dan udang windu dewasa, sampling dilakukan pada musim hujan dan kemarau. Lokasi sampling untuk benih adalah pada sentra penghasil benur di Sulawesi Selatan yaitu Takalar, Barru dan Pinrang dan untuk udang dewasa pada sentra produksi udang windu di Sulawesi Selatan yaitu Takalar, Maros, Pangkep, Barru dan Pinrang. Sampel-sampel tersebut merupakan sumber templat DNA pada MPCR. Ekstraksi DNA sampel udang windu menggunakan kit komersil.

Deteksi virus MSGS dengan MPCR menggunakan dua set primer yaitu set primer I dan II yang masing-masing digunakan dalam optimasi primer. Hasil amplifikasi DNA virus MSGS dengan set primer I dengan MPCR, jika tidak optimal maka akan diganti dengan set primer II. Namun sebelum mengganti primer yang tidak optimal mengamplifikasi ketiga virus MSGS, dilakukan uji konfirmasi dengan uji histologi untuk mendapatkan performa kesehatan yang lebih akurat.

F. Definisi dan Istilah

Akut :	Infeksi atau dampak klinis dari penyakit yang terjadi dalam periode waktu yang sangat singkat dan sangat mematikan.
Anoreksia :	Kehilangan nafsu makan
<i>Annealing</i> :	Penempelan primer sebagai DNA komplemen dengan nukleotida templat.
Basofilik :	Reaksi basa terhadap pewarna histologi yaitu hematoxylin yang ditandai dengan penampilan sel/jaringan berwarna biru sampai ungu.
<i>Cowdry tipe A</i> :	Suatu bentuk/massa seperti titik yang asidofilik yang dikelilingi oleh <i>halo</i> yang jelas dalam nukleus dengan kromatin yang terpinggirkan ke membran nuklear seperti pada udang yang terinfeksi IHHNV.

Denaturasi :	Proses pemutusan rantai DNA menjadi rantai tunggal sebagai awal dalam proses replikasi DNA.
Diagnosis :	Penentuan sifat-sifat alami suatu penyakit.
<i>Deoxyribonucleic Acid (DNA) :</i>	Asam nukleat yang mengandung informasi genetik yang digunakan dalam pengembangan dan fungsi semua organisme hidup. Terdapat dalam sel yang mengandung asam fosfat, D-2 deoksiribosa, adenin, guanin, sitosin dan timin.
DNA polymerase :	Suatu enzim yang menambahkan nukleotida dan mensintesis DNA pada suatu arah.
Eosinofilik :	Reaksi asam terhadap pewarna histologi Eosin yang ditandai dengan penampakan sel/jaringan berwarna pink sampai merah.
Ekstension :	Proses pemanjangan nukleotida pada PCR
<i>Enzootic :</i>	Menggambarkan atau berkenaan dengan suatu penyakit yang menjangkiti hewan di dalam suatu area geografik yang terbatas.
<i>Epizootic :</i>	Menggambarkan atau berkenaan dengan penyakit yang merembes secara luas dan menyebar dengan cepat yang menjangkiti banyak hewan sejenis sama.
<i>Elektroforesis :</i>	Teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik. Teknik ini digunakan dengan memanfaatkan

muatan listrik yang ada pada makromolekul, misalnya DNA yang bermuatan negatif. Dengan elektroforesis dapat diukur laju perpindahan atau pergerakan partikel-partikel bermuatan dalam suatu medan listrik.

- Facultative parasite:* Patogen/parasit yang bisa hidup dengan atau tanpa inang
- Histology :* Ilmu atau studi yang berhubungan dengan struktur yang sangat kecil, komposisi dan fungsi jaringan
- Histopathology :* Perubahan struktural dan fungsional jaringan atau organ tubuh disebabkan oleh suatu penyakit yang terlihat setelah diproses dengan histologi
- Hyperplasia :* Peningkatan ukuran jaringan atau organ secara abnormal karena penambahan jumlah sel.
- Hyperthropic nuclei :* Pembesaran tidak normal inti sel akibat pembengkakan yang terjadi karena inti sel kemasukan partikel asing atau mikroorganisme intraselluler
- Ikosaedral :* Bentuk geometris virion yang terdiri atas 20 muka segitiga dan 12 sudut.
- Inclusion body :* Badan asing non spesifik ditemukan dalam sitoplasma atau inti sel, biasanya virus atau mikrokoloni bakteri
- Infeksius :* Kemampuan patogen untuk menularkan atau menyebabkan infeksi.
- Infeksi :* Serangan atau multiflikasi organisme infeksius ke dalam jaringan inang yang menyebabkan kerusakan

	sel atau jaringan.
<i>Interselluler</i> :	Parasit/patogen yang berada di antara sel.
<i>Intraselluler</i> :	Parasit/patogen yang berada di dalam sel.
Fenomena <i>Interference</i> :	Fenomena dimana keberadaan suatu virus pada suatu organisme/inang menghambat masuknya jenis virus yang lain ke organisme/inang yang sama.
Karier :	Hewan yang membawa organisme penyebab penyakit dalam tubuhnya, namun hewan tersebut terlihat sehat sehingga menjadi pembawa atau penyebar infeksi.
Kisaran inang:	Kisaran hewan-hewan yang dapat diinfeksi oleh patogen.
Ko-infeksi :	Suatu kondisi dengan mana suatu individu tidak terinfeksi menjadi terinfeksi dengan dua atau lebih agen penginfeksi yang berbeda.
Kronis :	Infeksi dalam jangka waktu yang panjang dengan atau tanpa tanda-tanda klinis yang nyata.
<i>Monodon Slow Growth Syndrome (MSG)</i> :	Suatu penyakit pada udang windu yang disebabkan oleh beberapa agen penyakit seperti virus (IHHNV, MBV, HPV dan LSNV), parasit microsporidian dan gregarine dan genetik. Kriteria udang windu terinfeksi MSGS adalah terjadi warna hitam yang tidak normal, terdapat segmen tubuh seperti ruas bambu, laju pertumbuhan harian < 0.15 g/h dan antena udang

	getas atau mudah patah.
<i>Multiplex PCR (MPCR)</i> :	Teknik biologi molekuler untuk mengamplifikasi beberapa DNA target dalam satu kali percobaan dengan menggunakan beberapa pasang primer.
Nukleotida :	Suatu senyawa yang terbentuk dari masing-masing satu molekul gula (pentose), asam fosfat dan basa purin atau pirimidin.
<i>Obligate parasite</i> :	Patogen/parasit yang tidak bisa hidup tanpa inang
<i>Occlusion body</i> :	Badan asing non spesifik ditemukan dalam sitoplasma atau inti sel biasanya virus.
<i>Open Reading Frame (ORF)</i> :	Kerangka baca terbuka adalah sekuen DNA yang mengandung kodon inisiasi dan terminasi sehingga dapat mengkode suatu protein.
Pascalarva (PL) :	Tahap metamorfosis udang antara zoea ke juvenile dalam siklus hidup udang.
Patogenisitas :	Kemampuan untuk dapat menyebabkan terjadinya penyakit.
Primer :	Primer adalah suatu oligonukleotida yang memiliki 10 sampai 40 pb (pb = pasangan basa) dan merupakan komplementer dari DNA target.
Prevalensi :	Persentase udang yang terinfeksi patogen/penyakit dalam satu populasi.
<i>Running</i> :	Proses pemisahan muatan listrik DNA pada

	elektroforesis.
<i>Syndrome</i> :	Sejumlah gejala penyakit yang tergabung menunjukkan suatu penyakit tertentu.
Sekeunsing DNA :	Sekuensing DNA adalah proses penentuan urutan nukleotida pada suatu fragmen DNA. Sekuensing DNA akan menghasilkan sekuens DNA yang digambarkan sebagai untaian abjad lambang nukleotida-nukleotida penyusun DNA, yaitu "A" (nukleotida berbasis adenin), "T" (nukleotida berbasis timin), "G" (nukleotida berbasis guanin), dan "C" (nukleotida berbasis sitosin).
Templat DNA :	Cetakan DNA sebagai tempat primer melekat pada proses PCR.
<i>Temperature Melting (T_m)</i> :	Suhu pada saat setengah dari molekul DNA mengalami denaturasi.
Vektor :	Hewan yang menjadi perantara organisme penyebab penyakit dari inang yang satu ke inang yang lain. Contoh : siput, burung.
Virulensi :	Derajat patogenisitas suatu mikroorganisme/patogen.

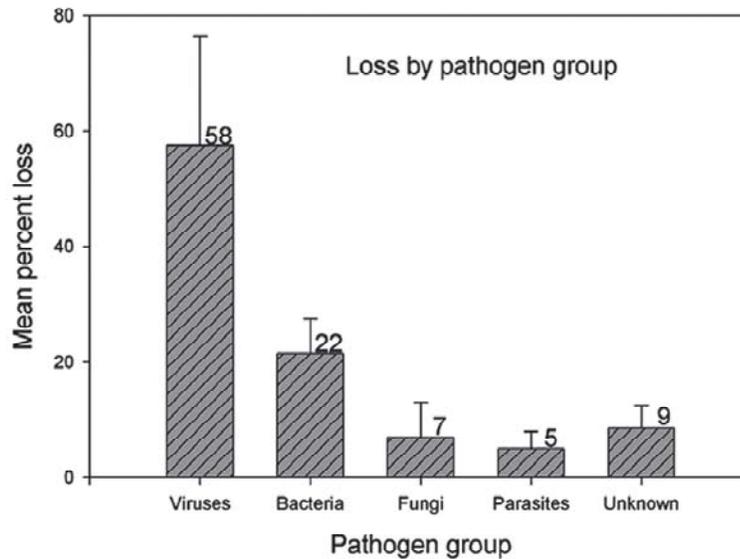
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Penyakit Kerdil Udang Windu

Penyakit yang timbul akibat infeksi oleh virus telah memberikan dampak yang cukup serius terhadap perkembangan budidaya udang di berbagai negara penghasil udang, seperti Thailand, Philipina dan India termasuk Indonesia. Agen penyakit virus yang menyebabkan masalah kematian udang di suatu wilayah atau negara akan menyebar dengan cepat ke wilayah atau negara lain dengan dampak kematian udang yang sama. Penurunan produksi udang dunia akibat virus mencapai 58% dan oleh bakteri 22% (Flegel *et al.*, 2008) (Gambar 1).

Virus merupakan agen biologi yang paling banyak pada lingkungan laut dan diketahui bahwa krustase laut dapat diinfeksi oleh lebih dari satu macam virus secara bersamaan (Flegel, 2001; Flegel *et al.*, 2004). Sekitar 20 jenis virus sekarang ini diketahui terdapat pada udang penaeid (Lightner, 1996; Loh *et al.*, 1997; Lightner and Redman, 1998) dan sering menyebabkan tidak ada tanda penyakit khususnya jika pada lingkungan alami (Flegel, 2001). Pada kondisi lingkungan yang penuh dengan tekanan seperti kondisi budidaya, beberapa virus dapat menjadi sangat virulen dan menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat nyata karena mortalitas atau pertumbuhan yang rendah.



Gambar 1. Pengaruh berbagai patogen terhadap produksi udang dunia berdasarkan data FAO tahun 2005 (Flegel *et al.*, 2008)

Virus merupakan patogen obligat yang hanya dapat hidup dan berkembang dalam jaringan inang. Virus mengalami beberapa tahap perkembangan dalam sel inang sebagaimana digambarkan oleh Brock *et al.* (1994); (1) Virion umumnya masuk ke dalam sel dengan cara menempel pada permukaan sel yang disebut dengan reseptor. Reseptor biasanya meliputi protein, polisakarida, atau kompleks lipoprotein-polisakarida. (2) Selanjutnya komponen virus (genome) melakukan penetrasi ke dalam sel inang sedangkan sampulnya tetap berada di luar sel. Pada saat itu, virus melakukan tahap perkembangan awal. Pada saat awal perkembangan virus, mesin biosintesis inang diubah oleh virus untuk kebutuhan biosintesisnya, (3) Setelah mengalami perbanyakkan genome, selanjutnya melakukan sintesa protein untuk digunakan sebagai pembungkus virus, (4) Tahap selanjutnya terjadi penggabungan antara

genome dengan bahan pembungkus virus membentuk virus baru, (5) Tahap dimana virus lepas dari satu sel dengan cara lisis lalu menginfeksi sel-sel lainnya dalam tubuh inang. Menurut Malole (1988) infeksi pada sel-sel lainnya oleh virus terutama virus Herpes bisa juga terjadi tanpa harus keluar dari sel yang terinfeksi, sehingga penyebaran virus dapat terjadi dengan cepat meskipun banyak antibodi atau komponen-komponen pertahanan inang terdapat dalam cairan tubuh di luar sel.

Sampai saat ini belum ada obat-obatan yang tersedia yang dapat diberikan pada udang yang terinfeksi oleh virus, sehingga pengendalian yang paling mungkin untuk mengatasi penyakit ini hanyalah dengan cara pencegahan agar tidak masuk dalam sistem budidaya (Lightner dan Redman, 1998) seperti penggunaan vaksin dan pengembangan benih SPF dan SPR. Sriwulan dkk. (2004) mencoba menggunakan virus WSSV utuh yang telah dilemahkan dengan formaldehid sebagai vaksin, dimana dosis 20% dengan frekuensi pemberian 3 kali sehari dapat mengurangi kematian udang hanya sampai 30 jam setelah uji tantang dengan virus WSSV. Kelemahan vaksin virus dengan menggunakan virus utuh yang dilemahkan adalah kemungkinan virusnya masih aktif, bilamana vaksin virus tidak dapat dilemahkan dengan sempurna. Selanjutnya dilakukan pengembangan vaksin untuk pengendalian WSSV yaitu dengan pengembangan vaksin rekombinan menggunakan gen virus WSSV yang dapat menstimulasi sistem imun udang seperti gen VP 28. Sriwulan dan Irmawati (2006) menunjukkan bahwa gen VP 28 WSSV isolat Sulawesi

Selatan mampu diisolasi, disekuensing dan dikloning dalam plasmid vektor yang selanjutnya akan digunakan sebagai vaksin rekombinan.

Beberapa negara terutama di benua Amerika telah mengembangkan suatu produk benih yang berlabel *Specific Pathogen Free* (SPF) dan *Specific Pathogen Resistance* (SPR), terutama untuk virus Taura Syndrome dan IHHNV dan terbukti telah memberikan kontribusi terhadap peningkatan produksi udang di negara-negara Benua Amerika. Di Indonesia, seharusnya ada upaya terutama untuk menghasilkan benih bebas patogen ganas yang dapat dimulai melalui seleksi induk dan keturunannya.

Sejak budidaya udang mulai berkembang pada era tahun 80-an, berbagai jenis virus telah dilaporkan menginfeksi udang windu di Indonesia. Sejak saat itu, diantaranya adalah virus *white spot syndrome virus* (WSSV), *monodon baculovirus* (MBV), *hepatopancreatic parvovirus* (HPV), *yellow head virus* (YHV), *infectious myonecrosis virus* (IMNV), *infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus* (IHHNV) dan *Laem-Singh virus* (LSNV) (Sritunyalucksana *et al.*, 2006). Jenis-jenis virus yang terdapat pada udang penaeid dapat dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu virus DNA dan virus RNA. Virus DNA meliputi virus golongan Parvovirus (seperti IHHNV, HPV), Baculovirus (seperti MBV, WSSV) dan Iridovirus. Virus jenis Virus RNA meliputi Picornavirus (TSV), Reovirus, Toga-like virus dan Rhabdovirus (YHV). Teknik deteksi antara

kedua jenis virus tersebut berbeda. Virus-virus tersebut mempunyai distribusi geografis yang cukup luas (Lightner and Redman, 1998)

Distribusi atau transmisi virus dapat terjadi melalui dua cara yaitu secara vertikal maupun secara horizontal. Penyakit virus secara vertikal terjadi akibat induk udang yang terinfeksi selanjutnya menularkannya pada larva udang melalui embrio. Sedangkan penyebaran secara horizontal terjadi akibat virus terbawa melalui air (*water bond transmission*) atau hewan karier, kotoran udang terinfeksi serta pemangsaan udang yang terinfeksi (Catap and Travina, 2005). Namun penyebaran virus yang paling cepat adalah melalui kanibalisme (Wu *et al.*, 2003).

Penyakit kerdil udang windu yang dikenal dengan istilah *Monodon slow growth syndrome* (MSGs) merupakan permasalahan utama budidaya udang windu di tambak saat ini, selain terjadinya kematian massal udang pada umur 1 sampai 2 bulan akibat infeksi WSSV. Gejala MSGS adalah pertumbuhan yang sangat lambat yaitu pertumbuhan harian udang hanya sekitar 0.007- 0.15 g per hari sehingga ukuran udang menjadi sangat bervariasi meskipun telah mencapai usia panen (100 – 120 hari pemeliharaan), sementara udang yang pertumbuhannya normal memiliki pertumbuhan harian sekitar 0.2 sampai 0.3 g per hari. Di Indonesia, gejala penyakit kerdil udang windu ini seringkali ditemukan dan telah menyebabkan kerugian finansial yang sangat besar bagi petani tambak. Salah satu alasan sehingga budidaya semi-intensif atau intensif udang windu tidak lagi berkembang di Indonesia dan bahkan beralih ke

udang spesies introduksi dari Amerika (*L. vannamei*) adalah karena sering munculnya gejala penyakit udang bintik putih dan gejala udang kerdil/stunted growth atau MSGS. Udang windu umumnya mengalami gejala pertumbuhan yang sangat lambat dan ukuran yang sangat bervariasi di tambak meskipun benur diperoleh dari pembenihan yang menerapkan sistem pembenihan yang baik dan benur telah mengalami pemeriksaan secara morfologi maupun secara mikroskopis dan bahkan melalui deteksi virus WSSV. Berbagai spekulasi muncul terhadap penyakit kerdil udang windu ini, antara lain diduga disebabkan karena kualitas lingkungan yang kurang mendukung, adanya infeksi oleh bakteri *Vibrio* spp., dan karena faktor genetik yang ada pada benur udang windu yang cenderung mengalami penurunan. Namun demikian, belum ada data yang tersedia tentang keterkaitan faktor-faktor tersebut dengan gejala udang kerdil di tambak.

Udang windu yang mengalami penyakit kerdil udang windu atau MSGS memiliki kriteria seperti warna gelap yang tidak biasa, laju pertumbuhan harian < 0.1 g/hari dalam 4 bulan pemeliharaan, adanya warna kuning yang tak lazim, adanya segmen abdominal seperti segmen bambu dan antena yang kaku dan mudah patah/getas (Withyachumnarnkul *et al.*, 2005; Sritunyalucksana *et al.*, 2006). MSGS pertamakali ditemukan di Thailand pada tahun 2001, dimana pada waktu itu, fenomena ini dianggap tidak berkaitan dengan patogen yang sudah diketahui selama ini ada pada udang, namun karena penyebarannya yang

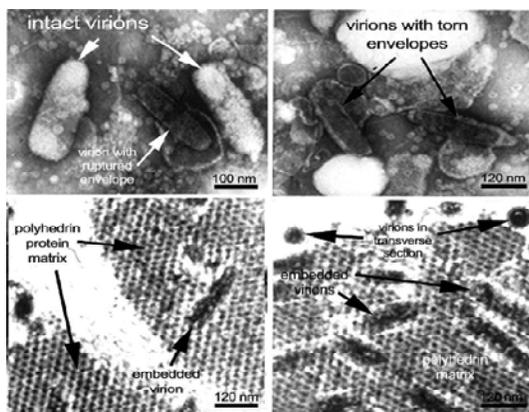
sangat cepat ke beberapa negara menunjukkan bahwa MSGS ini disebabkan oleh patogen yang belum diketahui dan disebut dengan MSGS *agent* (MSGSA). Di Thailand penyakit kerdil telah menyebabkan kerugian petani sekitar dari 255.568 ton (US\$ 2467 juta) pada tahun 2001 menjadi 212.091 ton (US\$ 1846 juta) (Chayaburakul *et al.*, 2004). Kondisi ini tidak jauh berbeda dengan Indonesia. Namun dengan perkembangan penelitian tentang MSGS ini, penyakit kerdil udang windu oleh banyak ahli mengatakan bahwa penyakit ini disebabkan oleh beberapa jenis virus yaitu *monodon baculovirus* (MBV), *infection hypodermal and hematopoietic necrosis virus* (IHHNV), dan *hepatopancreatic parvovirus* (HPV) (Chayaburakul *et al.*, 2004) dan *Laem-Singh virus* (LSNV) (Sritunyalucksana *et al.*, 2006). Virus LSNV ditemukan berasosiasi dengan udang tetapi dianggap sebagai virus yang tidak berbahaya dan ditemukan pada udang yang menunjukkan gejala MSGS dan non-MSGS (Sritunyalucksana *et al.*, 2006). Namun demikian, telah diketahui bahwa virus ini menginfeksi organ spesifik pada *fasciculated zone* dan *onion bodies* pada organ *bellonci* dari mata udang yang mengalami MSGS memberikan indikasi bahwa LSNV ini mungkin salah satu dari penyebab MSGS (Pratoomthai *et al.*, 2007).

1. *Monodon Baculovirus* (MBV)

a. Klasifikasi dan Morfologi MBV

Virus MBV adalah anggota dari Genus *Baculovirus* subgroup A. partikel MBV berbentuk batang (Gambar 2), mempunyai sampul tunggal,

dan bereplikasi di dalam inti sel. Nukleokapsid MBV berukuran 42 ± 3 nm x 246 ± 15 nm, sementara sampul virion berukuran 75 ± 4 nm x 324 ± 33 nm (Lightner *et al.*, 1983). MBV adalah baculovirus yang memiliki DNA polimerase dan dapat bereplikasi di dalam sel B (*Blisterlike*), F (*Fibrilar*) dan R (*Resorptive*) hepatopankreas.



Gambar 2. Mikrograf transmisi elektron MBV. Kiri atas, virion dengan sampul lengkap; Kanan atas, patahan sampul menampakkan nukleokapsid; Kiri dan kanan bawah, irisan tipis jaringan yang ditanam di dalam matriks polyhedron protein memperlihatkan bentuk batang virion (Flegel, 2006).

b. Patogenitas MBV

Penyakit yang disebabkan oleh MBV disebut monodon baculovirus yang telah ditemukan pada PL udang windu di beberapa daerah di Baratdaya Pasifik. Target organ dan jaringan MBV adalah tubule hepatopankreas dan epitelium dari udang ukuran PL, juvenil dan dewasa dan anterior epitel usus tengah pada PL yang sangat muda. Penyakit MBV dapat menyebabkan kerugian serius pada populasi

khususnya pada PL dan juvenil muda, tetapi pada kondisi inang yang kurang baik akan menyebabkan kematian. Patogenesis MBV dikelompokkan ke dalam tiga tahap. Tahap I: pada hepatopankreas terdapat *hypertrophied nuclei* yang sangat sedikit, tetapi tidak mengandung *occlusion body* dan sedikit virion yang lengkap; Tahap II: pada inti sel juga terdapat *hypertrophied nuclei* dan *occlusion body* serta virion lengkap; Tahap III: inti sel mengandung *occlusion body* yang matang dan jumlah virion lengkap yang sudah bebas di dalam sel dan yang masih di dalam inti sel melimpah. Nekrosis sel dan sitolisis atau pelepasan virus dan *occlusion body* ke dalam lumen usus diikuti perkembangan tahap III di dalam inang hidup (Lightner *et al.*, 1983).

Infeksi oleh virus MBV dapat menyebabkan kematian tinggi pada larva dan juvenil udang windu. Ramasamy *et al.* (1995) melaporkan adanya kematian mencapai 90% pada pascalarva udang, dan kematian massal pada juvenil serta induk udang.

Infeksi virus MBV dapat ditemukan pada stadia zoea, mysis dan pascalarva, dengan tingkat infeksi tertinggi ditemukan pada stadia pasca larva yaitu berkisar 91% (Ramasamy *et al.*, 2000). Lebih lanjut dilaporkan bahwa MBV ditemukan pada bagian hepatopankreas, dan sel-sel *epithel anterior midgut* larva dan pascalarva udang, serta hanya ditemukan pada bagian hepatopankreas juvenil dan udang dewasa. Infeksi MBV akut menyebabkan hilangnya tubule hepatopankreas dan epitel usus tengah dan akibatnya akan menyebabkan kehilangan fungsi dari organ-organ

tersebut (Sindermann and Lightner, 1988). Lebih lanjut dikatakan bahwa tanda-tanda yang nampak pada udang yang terinfeksi MBV adalah udang menjadi *lethargi*, warna menjadi lebih gelap, dan terdapat infeksi berat pada insang dan permukaan tubuh oleh parasit epikomensal.

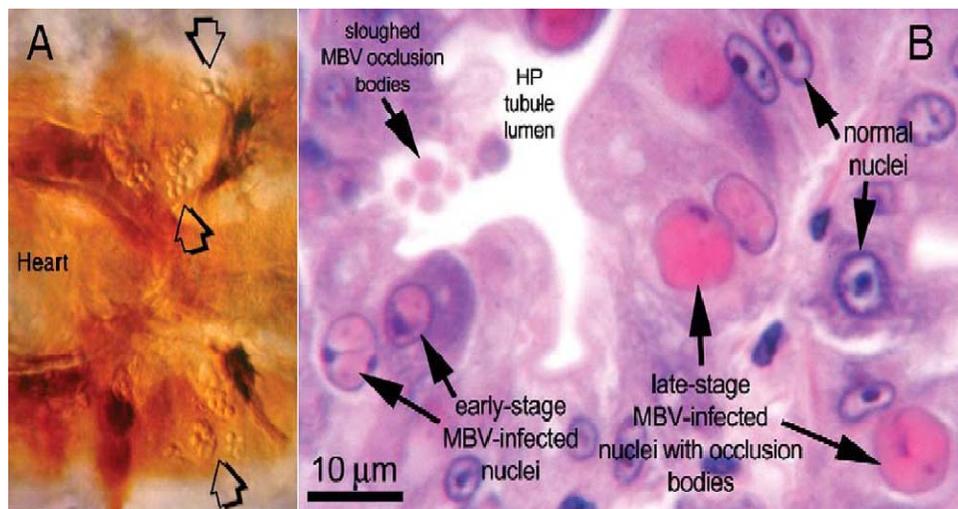
Virus MBV relatif lebih ditolerir oleh udang windu (Fegan *et al.*, 1991) tetapi dapat menyebabkan kematian massal pada udang windu yang dibudidayakan pada kepadatan yang tinggi (Fulks and Man, 1992). Mortalitas akibat MBV pada udang windu budidaya juga telah dilaporkan di Indonesia (Nash *et al.*, 1988) di Thailand (Thikiew, 1990), Malaysia (Anderson *et al.*, 1987), Jepang (Fukuda *et al.*, 1985) dan India (Ramasamy *et al.*, 1995; Karunasagar *et al.*, 1998).

c. Diagnosis MBV

Gejala penyakit ini adalah nafsu makan berkurang, laju pertumbuhan, aktivitas udang berkurang, dan permukaan insang udang berwarna gelap. Sekarang ini tidak ada treatment untuk penyakit ini, walaupun pencegahan dan deteksi telah dilakukan untuk mengurangi mortalitas. Penyakit MBV menyebabkan kematian yang tinggi ketika populasi mengalami stress, kondisi lingkungan atau prevalensi penyakit lain (Flegel, 2006).

Virus MBV mempunyai karakteristik *occlusion body* yang beragregasi membentuk seperti buah anggur pada organ terinfeksi, dan bersifat eosinofilik, sehingga dapat dideteksi dengan analisis histologi (Lightner, 1988). Sel hepatopankreas terinfeksi memperlihatkan terjadinya

peningkatan volume sebesar 300% pada *hypertropied nuclei*. Sel-sel terinfeksi oleh MBV akan mengalami nekrosis, lisis dan rusaknya sel-sel yang akhirnya akan tersebar ke lumen tubule (Ramasamy *et al.*, 2000; Flegel, 2006) (Gambar 3).



Gambar 3. Fotomikrograf MBV. (A) *occlusion body* (panah) pada kutikula PL diamati langsung dengan mikroskop cahaya. (B). Fotomikrograf jaringan yang memperlihatkan tahap awal sampai akhir infeksi MBV (H&E) (Flegel, 2006).

Diagnosis MBV secara molekuler seperti PCR dan dot blot sekarang ini sangat berkembang karena tingkat akurasinya lebih tinggi karena pendeteksian berdasarkan DNA bersifat sangat spesifik. Untuk pertama kali deteksi MBV dengan PCR dilaporkan dari Australia (Vickers *et al.*, 1992) kemudian dari Taiwan yang sudah lengkap primer sekuensingnya (Chang *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1995). Metode ini dirancang berdasarkan daerah yang terkonservasi pada gen polihedrin insekta. Primer ini juga pernah digunakan untuk menganalisis fragmen 600 bp

untuk digunakan sebagai DNA *probe* untuk *Dot Blot* Hibridisasi dan untuk *in situ* hibridisasi. Namun berdasarkan pengalaman telah menunjukkan bahwa primer Taiwan tidak bisa mengamplifikasi DNA MBV dari Thailand dan Australia (Belcher, 1998; Satidkanitkul *et al.*, 2005). Produk PCR pada 533 bp dan 361 bp memperlihatkan sensitifitas yang tinggi yaitu sekitar 0.01 fg DNA MBV dari DNA pascalarva udang windu (Flegel, 2006). Sementara primer dengan ukuran 261 bp yang dirancang oleh Surachetpong *et al.* (2005) telah digunakan untuk mengamplifikasi DNA MBV pada udang windu dari alam di Brunei oleh Claydon *et al.* (2010) dengan metode MPCR. Primer ini juga telah digunakan oleh Tang and Lightner (2011) untuk menentukan sampel (udang windu) positif MBV dari Indonesia, Malaysia dan Thailand sebelum digunakan sebagai templat dalam *duplex realtime* PCR.

d. Penyebaran MBV

Monodon Baculovirus (MBV) adalah salah satu jenis virus yang dikenal dapat menyebabkan penyakit yang disebut penyakit udang kerdil (Chayaburakul *et al.*, 2004) pertama kali dilaporkan di Taiwan, selanjutnya menyebar dengan cepat ke Thailand, India dan Indonesia (Ramasamy *et al.*, 1995; Ramasamy *et al.*, 2000). Virus ini telah menyebabkan penyakit epizootik pada larva maupun udang windu dewasa (Ramasamy *et al.*, 1995) dan telah dilaporkan menyebar secara luas pada induk maupun larva udang windu di beberapa negara di Asia, seperti Taiwan, Thailand, India, Malaysia (Umesha *et al.*, 2003), serta induk udang windu dari alam

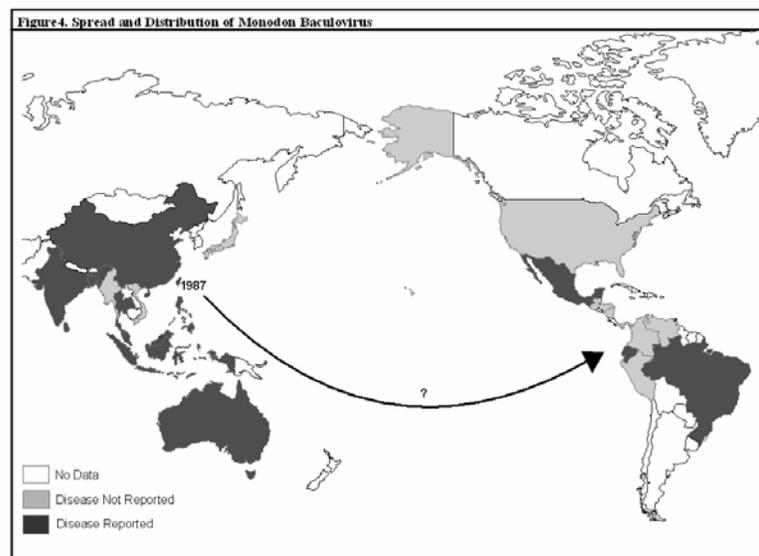
di Sulawesi Selatan, Indonesia (Anshary *et al.*, 2010). Di India, virus ini menyebabkan kematian mencapai 90% terhadap larva udang windu (Ramasamy *et al.*, 1995; Manivannan, 2002). Virus ini telah dilaporkan di Indonesia pada tahun 1980-an dan menyebabkan kematian massal pada pembenihan di Indonesia. Walaupun dampak infeksi virus MBV ini mulai berkurang dan jarang menimbulkan kematian massal, tetapi produktivitas udang menjadi sangat rendah akibat infeksi virus ini (Chayaburakul *et al.*, 2004).

MBV adalah tipe virus DNA dengan pengaruh dan mortalitas yang sangat besar pada larva, pascalarva dan juvenil di budidaya udang. Virus MBV telah ditemukan pada pembenihan maupun tambak yang ada di Sulawesi Selatan, serta induk-induk yang digunakan oleh panti pembenihan skala industri dan rumah tangga di Sul-Sel (Madeali *et al.*, 2000). MBV pertama ditemukan pada awal 1980-an pada *P. monodon*, dan penyakit ini sekarang telah menyebar ke beberapa spesies udang: *Penaeus merguensis*, *Penaeus semisulcatus*, *Penaeus kerathurus*, *Penaeus vannamei*, *Penaeus esculentus*, *Penaeus penicillatus*, *Penaeus plebejus* dan *Metapenaeus ensis* (Karunasagar *et al.*, 1998).

Setelah tahun 1980-an, Taiwan muncul dalam dekade pengembangan akuakultur sebagai pelopor dalam produksi udang beserta China. Sebagai industri yang berkembang dalam pulau kecil maka terjadi tekanan untuk mengintensifkan produksi. Sepanjang pantai Barat Taiwan pada tahun 1987 dan 1988 pertambakan udang mulai mengalami

kematian. Penyakit mulai melumpuhkan industri, dan segera petani Taiwan meninggalkannya (McClennen, 2004). Taiwan adalah negara yang dihancurkan oleh penyakit ini dengan menurunkan produksi. Pada negara lain, penyakit MBV ini lebih sulit untuk dihitung dampak makroekonomi, walaupun mortalitas sangat besar telah dilaporkan di China, Thailand dan Philipina (McClennen, 2004).

Virus MBV terdeteksi sejak 1986 di Indonesia dan 1988 di Sri Lanka dan Malaysia. Pada fase awal ini, pengetahuan tentang pengendalian dan kepedulian untuk penyakit ini sangat sedikit. Sekarang, sangat mungkin untuk meningkatkan udang terinfeksi melalui siklus produksi udang beserta MBV, jika tindakan pencegahan yang lebih baik tidak diambil. Beberapa laporan mengindikasikan bahwa MBV telah diintroduksi ke Amerika Latin (Gambar 4).



Gambar 4. Daerah Penyebaran MBV di Dunia (McClennen, 2004)

2. *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)*

a. Klasifikasi dan Morfologi

Group : Group II (ssDNA)

Family : Parvoviridae

Subfamily : Densovirinae

Genus : Brevidensovirus

Species : ***IHHN virus***

Virus IHHNV (Gambar 5) merupakan suatu virus terkecil, tidak bersampul, bentuk morfologi ikosahedral dengan ukuran diameter 22-23 nm dengan sebuah genom DNA untai tunggal lurus yang berukuran panjang 4.1 kb (Bonami *et al.*, 1990; Mari *et al.*, 1993; Shike *et al.*, 2000). Berdasarkan ukuran, morfologi dan struktur biokimia, IHHNV digolongkan ke dalam famili Parvoviridae. Hampir 100% dari sekuens genom IHHNV dan 3 *open reading frame* (ORF 1, 2 dan 3) telah ditentukan. ORF 1 (nukleotida 816 sampai 2813) mengkode 666 polipeptida asam amino, dan diprediksi menjadi suatu protein non struktural (Nunan *et al.*, 2000). Sementara Shike *et al.* (2000) menambahkan bahwa ORF kiri (ORF 1) mengkode protein non struktural, ORF kanan (ORF 2) mengkode protein kapsid, dan fungsi ORF tengah (ORF 3) belum diketahui. Sekarang ini IHHNV diklasifikasikan sebagai *Penaeus stylirostris brevidensovirus* (PstDNV) (Tattersall *et al.*, 2005).

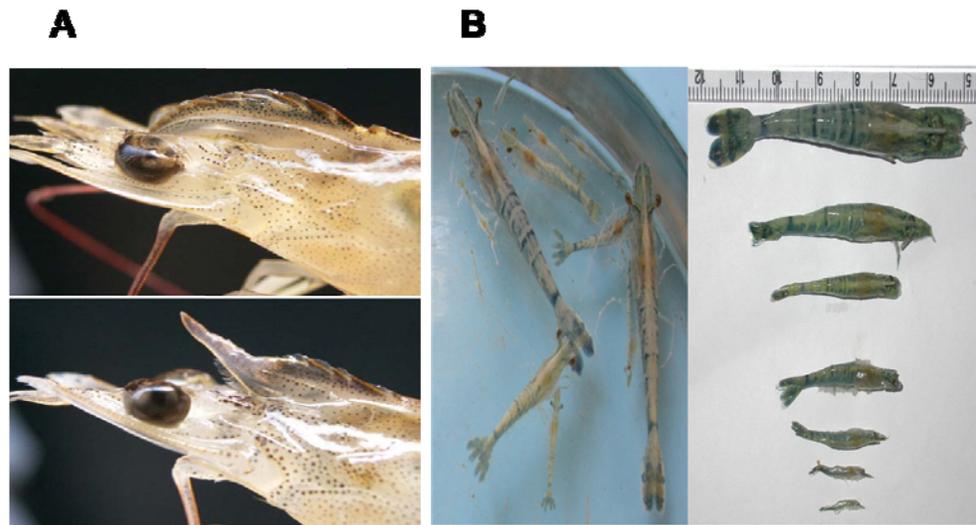


Gambar 5. Virion IHHNV pada udang (Flegel, 2006).

b. Patogenitas IHHNV

Udang *P. stylirostris* adalah spesies penaeid yang paling rentan dengan IHHNV dan menyebabkan kematian 90% pada pascalarva dan juvenil (Lightner *et al.*, 1983). Pada tahun 1979 produksi budidaya *P. stylirostris* Amerika Latin berkurang 20%, tahun 1989 berkurang menjadi 9.2% dan tahun 1999 menjadi 6.2%, karena kelemahan spesies ini menghadapi penyakit. Beberapa tulisan melaporkan kerugian ekonomi pada beberapa pembudidaya di dunia, karena pertumbuhan yang terhambat antara 10-50% (McClennen, 2004). Sebagai tambahan, *P. monodon* dan 12 udang komersial lainnya telah terinfeksi dengan penyakit ini, tetapi tidak satu pun dengan tingkat mortalitas seperti pada udang *P. stylirostris*.

Lightner *et al.* (1983) mengemukakan bahwa IHHNV adalah suatu jenis virus yang mendapat perhatian sejak tahun 1981 karena telah menyebabkan mortalitas lebih dari 90% pada budidaya *P. stylirostris* di Hawaii. *P. vannamei* dan *P. monodon* juga dapat terjangkit oleh penyakit ini, tetapi gejalanya hanya menyebabkan pertumbuhan menurun dan cacat, seperti *runt deformity syndrome* (RDS) (Gambar 6). Ciri khusus dari RDS adalah terjadi deformiti pada rostrum, antenna mengkerut, kutikular menjadi kasar dan terjadi abnormal pada ruas 6 tubuh dan ekor kipas. Kelambanan pertumbuhan adalah lebih besar 30% untuk beberapa populasi dan mungkin mencapai 90% sehingga menyebabkan kehilangan keuntungan secara ekonomi. Udang yang bertahan hidup akan menjadi karier virus selama hidupnya dan akan menularkan ke keturunannya dan populasi lain melalui transmisi vertikal dan horizontal (Bell and Lightner, 1984; Kalagayan *et al.*, 1991; Lightner *et al.*, 1992; Wyban *et al.*, 1992; Lotz, 1997). Virus IHHNV bertanggungjawab terhadap pergantian komoditi akuakultur di Amerika Latin dari *P. stylirostris* dan beralih ke *P. vanamei*, spesies yang lebih resisten, lebih kuat terhadap infeksi WSSV dan IHHNV di akhir tahun 1990-an.



Gambar 6. A. Kelainan bentuk rostrum *P. vanamei* akibat runt deformity diseases. Atas, rostrum udang melengkung ke bawah, sedang gambar bawah, rostrum melengkung ke atas dan keduanya ukuran rostrumnya lebih pendek dari normal (Flegel, 2006) dan B. Ukuran udang yang tidak seragam (Rai *et al.*, 2009a).

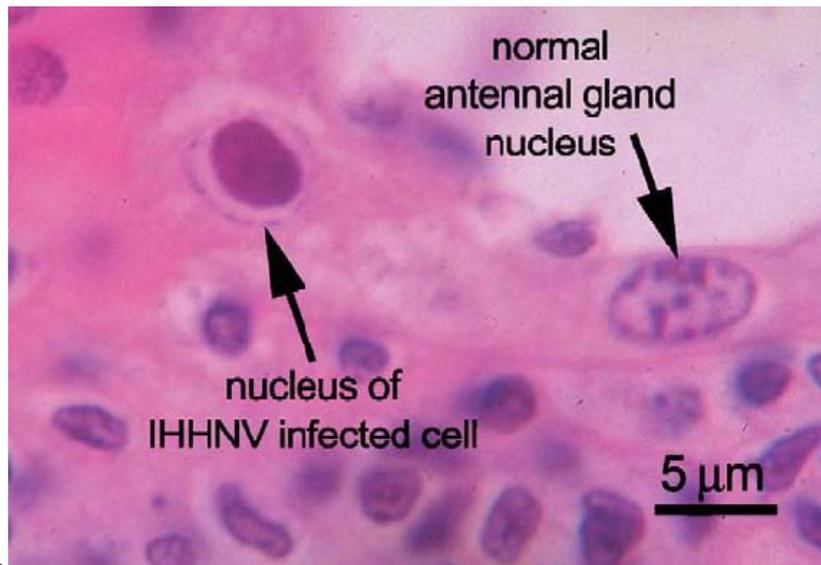
Rai *et al.* (2009b) mengobservasi prevalensi pascalarva udang yang terinfeksi IHNV adalah lebih tinggi yaitu 67.4% dibanding udang dewasa yaitu 34%. Hal ini berhubungan dengan patogenisitas IHNV dan umur udang. IHNV, seperti parvovirus yang lain, menginfeksi pada suatu tahap/stage ketika hewan tersebut mempunyai laju pertumbuhan yang cepat. Parvovirus seperti IHNV, tidak mengkode suatu DNA polymerase sehingga tergantung pada sel inang untuk memberikan atau menyediakan mesin replikasi DNA. Oleh karena itu, virus-virus ini umumnya menginfeksi populasi sel yang berkembangbiak atau melipatganda secara cepat. Pascalarva dan juvenil udang mempunyai aktifitas membelah sel yang tinggi, yang bisa membuat mereka lebih

rentan terhadap infeksi IHHNV dibanding udang dewasa (Bell and Lightner, 1988; Kalagayan *et al.*, 1991; Lightner, 1996).

c. Diagnosis IHHNV

Udang yang terinfeksi IHHNV dapat didiagnosis secara histologi yang ditandai dengan adanya intranuklear yang menonjol, *inklusi Cowdry type A* jika sampel difiksasi dengan larutan Davidson. Dengan pewarnaan H&E, *cowdry tipe A* ini terdapat pada *hypertrophied nuclei* dan bersifat eosinofilik, kadang terdapat lingkaran mengelilingi inklusi dan kromatin berada di pinggir pada jaringan ektodermal dan mesodermal (Gambar 7). *Cowdry type A* hanya dapat terlihat jika larutan fiksatif yang digunakan adalah larutan Davidson (Flegel, 2006).

Selain histologi, diagnosis IHHNV yang lain adalah diagnosis secara molekuler seperti PCR dan dot blot. Diagnosis dengan PCR yang dilakukan oleh Saksmerprom *et al.* (2010) untuk mendeteksi IHHNV di pertambakan Australia menunjukkan bahwa DNA dari *P. monodon* Thailand dan 7 dari Australia memberikan hasil yang positif (ukuran ampikon 309 bp) dengan primer IHHNV309F/R yang dirancang oleh Tang *et al.* (2007). Hasil ini mengindikasikan keberadaan IHHNV tipe infeksi dan tidak terinfeksi tipe A dan B di Australia.



Gambar 7. Inklusi *cowdry type A* IHHNV di dalam nukleus sel kelenjar antenna *P. monodon* (Flegel, 2006).

Hal serupa dilakukan oleh Rai *et al.* (2009b) pada udang windu di India, beberapa sampel udang windu yang negatif IHHNV secara histologi, tetapi positif pada PCR dengan primer spesifik IHHNV309F/R, kemungkinan karena dibutuhkan muatan virus yang lebih besar untuk menyebabkan perubahan secara histologi. Primer IHHNV309F/R mempunyai 9-12 nukleotida yang tidak cocok dengan sekuens IHHNV tipe non infeksius dan dapat digunakan untuk deteksi spesifik IHHNV tipe infeksius (Tang *et al.*, 2007).

Primer IHHNV309F/R dapat membedakan antara sekuens IHHNV tipe infeksius dengan sekuens tipe non infeksius (yang terkait/bergabung dengan genom udang). Primer ini spesifik untuk isolasi IHHNV berasal dari bumi belahan Barat. Philipina (type Hawaii) dan dari Taiwan dan

Thailand. Oleh sebab itu, hasil positif infeksi IHHNV dengan prevalensi 67.4% untuk pascalarva dan 34% untuk udang dewasa oleh primer IHHNV309F/R mencerminkan prevalensi IHHNV tipe infeksius di India. Persentase hasil positif yang tinggi dengan primer yang lain seperti dengan primer IHHNV392F/R dan IHHNV389F/R dianggap berasal dari keberadaan sekuens yang berkaitan dengan integrasi virus pada genom udang windu di India (tipe non infeksius). Untuk memastikan lebih jauh hasil negatif dengan primer IHHNV309F/R apakah disebabkan oleh beban virus yang rendah, maka dilakukan nested PCR dengan mengamplifikasi pada 648 bp untuk PCR tahap pertama dan IHHNV309F/R pada reaksi nested PCR. Hasilnya adalah 5 PL dan 8 udang dewasa positif dengan nested PCR menandakan bahwa udang tersebut membawa virus tapi dalam level yang sangat rendah. Primer 77012F/77353R gagal mendeteksi IHHNV pada beberapa sampel yang ada/positif ketika dikonfirmasi dengan primer IHHNV309F/R dan analisis histologi. Oleh karena itu, diduga bahwa primer tersebut tidak cukup sensitif untuk mendeteksi semua varian genetik IHHNV (Rai *et al.*, 2011). Primer-primer tersebut telah digunakan untuk mendeteksi IHHNV dengan PCR tunggal.

Khawsak *et al.* (2008), mendeteksi enam jenis virus (MBV, IHHNV, HPV, WSSV, TSV dan YHV) pada udang windu dengan metode RT-MPCR. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA IHHNV adalah primer spesifik yang mempunyai ukuran 302 bp, nomor akses di bank gen adalah NP_03923 dan urutan nukleotidanya adalah IHHNVF

5'-ATT TCT CCA AGC CTT CTC ACC-3' dan IHHNVR 5'-TGA TGT AAG TAA TTC CTC TCT GT-3'. Primer ini memperlihatkan hasil yang sangat bagus mengamplifikasi DNA IHHNV dan mampu mengamplifikasi DNA IHHNV pada kondisi MPCR.

Rai *et al.* (2011), saat ini hanya dua sekuens genom komplit dari PstDNV tersedia yaitu dari Hawaii (nomor akses di Bankgen No. AF218266; 3909 bp) dan dari China (nomor akses di Bank Gen No. EF633688; 3833 bp). Sementara sekuens parsial juga tersedia dari Mexico (nomor akses di Bank Gen AF273215; 3873 bp), Taiwan (nomor akses di Bank Gen AY355307, AY355306, dan AY355308), Thailand (nomor akses di Bank Gen AY362547, dan AY102034), Equador (nomor akses di Bank Gen AY362548) dan Australia (nomor akses di Bank Gen GQ475529). Oleh sebab itu, Rai *et al.* (2011) melakukan penelitian untuk PstDNV dari India dan hasilnya menunjukkan bahwa PstDNV isolat India secara pilogenitik hubungannya lebih dekat 94,8% dengan isolat Taiwan (AY355307) dan 94.2% dengan isolat AY362547 and 96.2% dengan AY102034 dari Thailand. Genom ini telah dideposit di Bank Gen dengan nomor akses GQ411199.

d. Penyebaran IHHNV

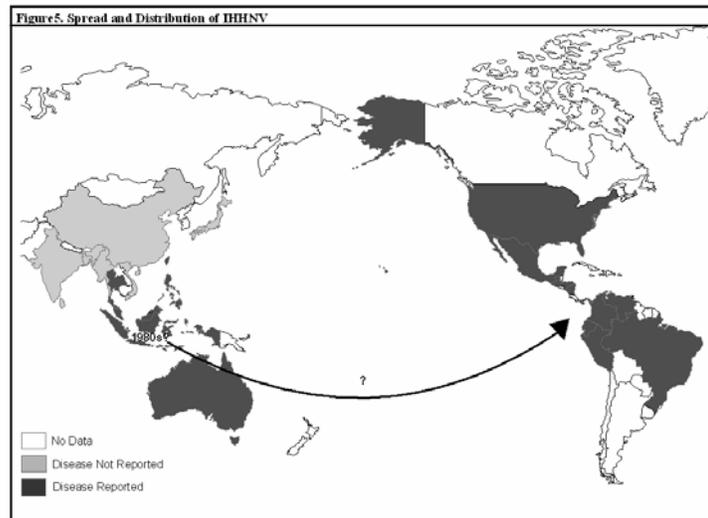
Virus IHHNV adalah suatu virus kosmopolitan, dilaporkan pada hampir semua udang penaeid (Lightner, 1996). IHHNV menyebar pada spesies udang penaeid di alam dan budidaya di Amerika, Asia dan

Oceania. Selanjutnya McClennen (2004) mengatakan bahwa virus IHHNV awalnya dideteksi pada *P. stylirostris* pada awal tahun 1980-an. Spesies ini paling rentan terhadap penyakit, dengan laju mortalitas tinggi pada udang budidaya dan populasi alam.

Virus IHHNV sebagai salah satu jenis virus yang berasosiasi dengan penyakit kerdil, pertama kali ditemukan pada udang biru *P. stylirostris* dan udang putih *P. vannamei* di Amerika pada awal tahun 1980-an yang dipercaya diintroduksi oleh udang windu hidup untuk eksperimen yang diimpor dari Asia Tenggara (Saksmerprome *et al.*, 2010). Rentang inang IHHNV adalah beberapa spesies udang dari alam dan budidaya seperti *P. japonicas*, *P. monodon*, *P. semisulcatus* dan *P. vannamei* (Felix and Devaraj, 1993; Flegel, 1997; Morales-Covarrubias *et al.*, 1999) dan udang air tawar *Macrobrachium rosenbergii* (Hsieh *et al.*, 2006).

Transmisi penyakit ini adalah secara horizontal dengan mengkonsumsi organisme lain yang terinfeksi, dan secara vertikal melalui telur betina. Karena deteksi yang kurang atau dampak ekonomi yang signifikan pada *P. stylirostris*, penyebaran IHHNV lebih susah untuk didokumentasikan pada spesies yang lain. Sekarang telah menyebar ke seluruh dunia yang awalnya berasal dari perairan Asia Tenggara. Di Amerika Latin dideteksi menyebabkan mortalitas yang serius. Pada perairan Mexico pada tahun 1990 dideteksi 46% IHHNV pada *P. stylirostris* dari alam pada Teluk California. Menurut Pantoja (1999),

IHHNV bertanggungjawab terhadap mortalitas populasi udang alam *P.stylirostris* di Mexico, Panama dan Ecuador (Gambar 8).



Gambar 8. Penyebaran IHHNV di dunia (McClennen, 2004)

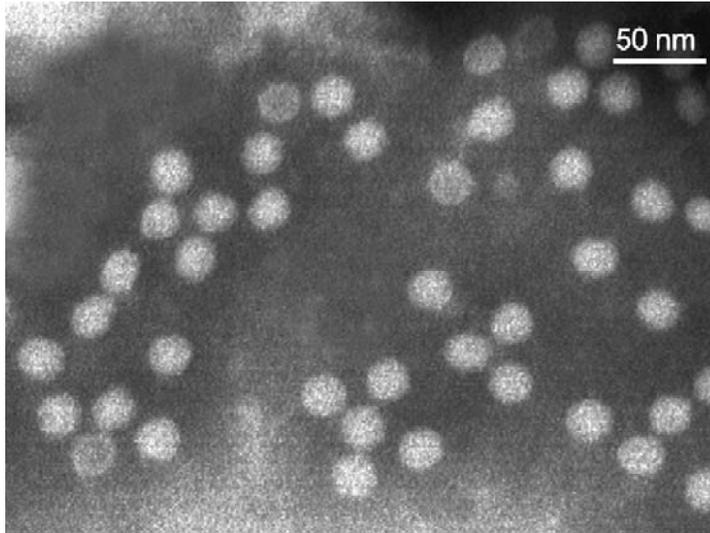
3. *Hepatopancreatic Parvovirus* (HVP)

a. Klasifikasi dan Morfologi HPV

Virus HPV pertama kali ditemukan oleh petani di Singapura (Chong and Loh, 1984). Penyebab penyakit HPV adalah parvovirus DNA berukuran kecil dengan diameter 22-24 nm (Lightner, 1996).

Virus HPV adalah suatu virus ikosahedral (Gambar 9) yang tidak bersampul dengan diameter rata-rata 22-23 nm dan mengandung DNA untai tunggal lurus (ssDNA). HPV termasuk ke dalam famili Parvoviridae dalam kelompok Densovirus. Dua tipe HPV di Asia telah dikarakterisasi

secara molekuler yaitu satu dari *P. chinensis* dari Korea (Bonami *et al.*, 1995) dan satu lagi dari *P. monodon* dari Thailand (Sukhumsirichart *et al.*, 1999), dua tipe tersebut berbeda dalam panjang total genom, masing-masing kira-kira 4 dan 5 kb. Sementara menurut Berns *et al.* (1995), HPV adalah virus dalam famili Parvoviridae dan merupakan virus ikosahedral kecil, tidak bersampul, berukuran 18 - 26 nm dan mempunyai DNA untai tunggal lurus dari 3,9 sampai 5,9 kb.



Gambar 9. Virion HPV pada *P. monodon* (Flegel, 2006)

b. Patogenitas HPV

Virus HVP atau *Penaeus monodon densovirus* (PmDENV) adalah salah satu jenis virus yang menginfeksi hepatopankreas udang windu yang mana virus ini oleh banyak peneliti dinyatakan sebagai virus yang berasosiasi dengan penyakit kerdil udang windu yang menyebabkan kerugian bagi petani tambak (Flegel *et al.*, 1999; Nimitphak *et al.*, 2008).

Virus HPV telah ditemukan di Thailand selama beberapa tahun (Flegel *et al.*, 1995) tetapi susah untuk mendapat informasi yang jelas tentang prevalensi. Data awal (Flegel *et al.*, 1995) menunjukkan bahwa HPV telah menyebabkan larva udang mati pada bulan pertama setelah penebaran. Tetapi beberapa hasil penelitian sekarang (Flegel *et al.*, 1999) meneliti hubungan antara infeksi HPV dengan pertumbuhan kerdil udang windu yang memberikan hasil bahwa panjang rata-rata udang windu yang terinfeksi HPV saja dan yang terinfeksi HPV dan MBV signifikan lebih pendek dari pada yang tidak terinfeksi. Hasil ini menunjukkan bahwa udang kerdil lebih rentan terhadap HPV dan HPV memberikan kontribusi terhadap kekerdilan. Selain itu, hasil ini memperlihatkan secara statistik hubungan yang sangat nyata antara infeksi HPV dengan ukuran udang yang kecil. Sebagian besar udang yang terinfeksi HPV, tumbuh sangat lambat dan pertumbuhan berhenti pada panjang sekitar 6 cm dengan berat sekitar 5 g (200 ekor per kg) (Gambar 10). Tetapi udang kecil yang terinfeksi HPV, juga sering memperlihatkan kondisi normal (Flegel, 2006).

Menurut Lightner (1993), organ utama yang diserang HPV adalah sel-sel epitel dari bagian anterior usus tengah dan hepatopankreas udang, tetapi kadang-kadang juga menyerang organ insang dan usus. Tanda-tanda udang yang terserang jika tingkat serangannya sudah cukup tinggi adalah tubuh udang menjadi berwarna pucat dan hepatopankreas berwarna coklat. Bahkan kotoran yang dikeluarkan udang menjadi berwarna putih. Hal ini terkait kerusakan dan pembusukan serta disfungsi

hepatopankreas sebagai pusat metabolisme tubuh. Kemudian pertumbuhan menjadi lambat dan bahkan mengalami kematian. Lightner (1996), gejala serangan HPV ini tidak spesifik, namun pada beberapa kasus tampak bahwa hepatopankreas berwarna keputihan dan atropi, pertumbuhan lambat, anoreksia, gerakan lambat, cenderung naik ke permukaan, dan insang dihinggapai organisme-organisme komensalisme, dan infeksi kedua oleh organisme-organisme patogen oportunistik seperti *Vibrio* spp. Oleh karena HPV jarang teramati sendirian dalam serangan penyakit yang mematikan, kematian akibat HPV sulit ditentukan (Lightner, 1996). Umesha *et al.* (2006) juga menemukan bahwa HPV pada udang windu di tambak di India dengan uji PCR tidak pernah muncul sebagai infeksi tunggal, tetapi muncul sebagai infeksi ganda dengan MBV atau WSSV dan infeksi tripel dengan MBV dan WSSV. Serangan HPV dengan agen-agen penyakit lainnya ini menyebabkan kematian tinggi pada tahap juvenil, dan dalam 4 minggu dapat mencapai 50-100% (Lightner, 1996).



Gambar 10. Gejala umum infeksi HPV. Udang kecil adalah terinfeksi HPV, sementara yang lebih besar tidak terinfeksi (Flegel, 2006).

Lightner & Redman (1985) dan Lightner (1996), HPV lebih memilih menginfeksi sel-sel E (embryonalzellen) dari hepatopankreas. Sejak HPV tidak mengkode DNA polymerase, HPV sangat bergantung pada aktivitas sel inang untuk replikasi. Infeksi HPV tahap awal pada udang budidaya dan dari alam dapat menyebabkan kerugian ekonomi secara serius. Infeksi HPV tidak menunjukkan tanda-tanda klinik, oleh karena itu tidak dapat dideteksi secara visual. Ketidakmampuan ini dapat menyebabkan penyebaran yang cepat virus tersebut. Oleh karena itu diperlukan diagnosis secara molekuler yang cepat dan akurat, baik untuk udang dari alam maupun di budidaya.

c. Diagnosis HPV

Diagnosis untuk infeksi HPV adalah histologi (Lightner, 1996; Catap *et al.*, 2003), mikroskop transmisi elektron (TEM), *in situ* hibridisasi (Pantoja and Lightner, 2001; Phromjai *et al.*, 2002), *polimerase chain reaction* (PCR) (Sukhumsirichart *et al.*, 1999; Pantoja and Lightner, 2000; Phromjai *et al.*, 2001) *nested* PCR (Manjanaik *et al.*, 2005), *real-time* PCR (La Fauce *et al.*, 2007), *polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay* (PCR-ELISA) (Sukhumsirichart *et al.*, 2002) dan *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) (Nimitphaka *et al.*, 2008). TEM dan histologi adalah teknik diagnosa yang dapat dipercaya tapi membutuhkan teknisi yang mempunyai pengalaman dan keahlian tinggi. *In situ hybridization* adalah spesifik tapi sensitifitasnya rendah dan membutuhkan probe analisis yang sangat spesifik. PCR sangat sensitif

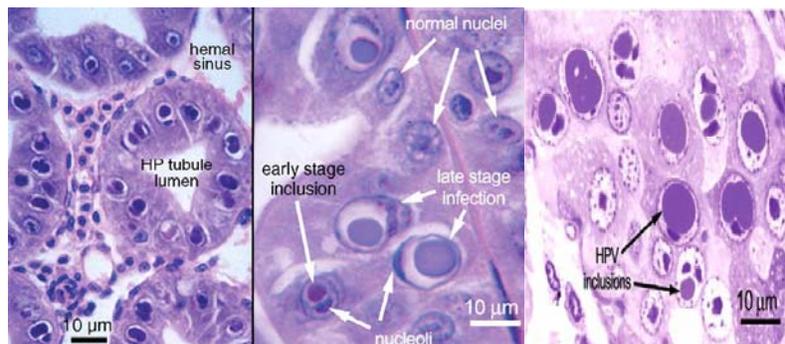
tetapi analisis hasil PCR dengan gel agarose elektroforesis membuatnya tidak cocok untuk aplikasi di lapangan dimana beberapa sampel butuh pengujian secara bersamaan.

Ketiadaan tanda-tanda klinis spesifik dari HPV membuat sulit didiagnosis terutama jika terdapat patogen lain (Manivannan *et al.*, 2002; Chayaburakul *et al.*, 2004). Pada pemeriksaan dengan TEM, partikel HPV sulit untuk divisualisasi karena ukuran dan bentuknya sangat mirip dengan komponen seluler normal seperti ribosom (Pantoja and Lightner, 2001).

Selama pertumbuhan lambat kemungkinan disebabkan oleh berbagai faktor, maka tanda-tanda klinis yang nampak tidak cukup untuk diagnosis HPV maka analisis histologi dan uji PCR dibutuhkan. HPVchin dari Korea dan HPVmon dari Thailand berbeda jauh dalam sekuens DNA sehingga disarankan primer PCR yang digunakan untuk mendeteksi keduanya juga berbeda. Primer komersial untuk HPVchin (5' TGG AGG TGA GAC AGC AGG 3' dan 5' CCA ACT GTC CTC GCT CTT 3' dari DiagXoticsCo. Ltd.,Wilton, CT) dengan ukuran ampikon sebesar 350 bp yang sangat sensitif untuk HPVchin tetapi ampikon 732 bp lebih rendah sensitifitasnya dengan HPVmon (Phromjai *et al.*, 2002). Primer yang didesain khusus untuk HPVmon menghasilkan ukuran ampikon 441 bp dan menunjukkan sangat efektif untuk HPV pada *P. monodon* dari India (Phromjai *et al.*, 2002) tetapi sangat berbeda dengan hasil penelitian Umesha *et al.* (2003) yang mendesain primer baru untuk HPVchin (5' GGT GAT GTG GAG GAG AGA 3' and 5' GTA ACT ATC GCC GCC AAC 3')

tidak bisa mendeteksi HPV dari India. HPV India kemungkinan besar hubungannya lebih dekat ke HPV dari Thailand dibanding HPV dari Korea. Oleh sebab itu, perbandingan sekuens genom dibutuhkan untuk menentukan variasi tipe HPV yang terjadi karena perbedaan spesies udang. Sementara primer HPV dengan ukuran 595 bp telah digunakan oleh Tang and Lightner (2011) untuk mendeteksi sampel udang windu dari Malaysia, Indonesia dan Thailand yang positif untuk selanjutnya digunakan sebagai templat pada *duplex realtime PCR*.

Catap *et al.* (2003), secara histologi, HPV ditandai dengan adanya intranuklear tubuh inklusi yang bersifat basofilik (Gambar 11). HPV memproduksi tubuh inklusi basofilik tunggal di dalam *hypertrophied nuclei* atau/dan beberapa sel pada *distal tubule* menunjukkan 2 inklusion. Hal serupa telah ditemukan oleh Sukhumsirichart *et al.* (1999) pada udang windu yang terinfeksi HPV di Thailand. Ukuran tubuh inklusi di dalam *hypertrophied nuclei* berdasarkan pengamatan TEM berkisar 4-11 μm .



Gambar 11. Histopatologi HPV pada sel epitel tubule hepatopankreas *P. monodon* dari Thailand. Tahap awal inklusion adalah lebih eosinofilik daripada basofilik. Beberapa nukleus mempunyai dua nukleoli atau munculnya dua atau lebih inklusion HPV yang bergabung bersama (Flegel, 2006).

d. Penyebaran HPV

Virus HPV aslinya berasal dari Indo-Pasifik, tetapi akhir-akhir ini menyebar ke udang di alam di Amerika melalui impor udang hidup dari Asia untuk budidaya (Lightner, 1996). Sekarang ini telah menyebar ke seluruh dunia.

Penelitian tentang model transmisi HPV masih kurang, namun eksperimen tentang infeksi secara oral atau lewat makanan pada larva udang windu dengan memberikan makanan berupa larva terinfeksi HPV terhadap PL 16 udang windu, telah dilaporkan Catap *et al.* (2003) dan memperlihatkan bahwa larva tersebut dapat terinfeksi HPV 30% sehari setelah pemberian pakan dan 100% setelah 7 hari pemberian pakan. Hal ini membuktikan bahwa infeksi HPV secara horizontal yaitu bisa melalui makanan yang dimakan atau melalui kanibalisme. Sementara Lightner (1996) melaporkan transmisi HPV secara vertikal membuktikan bahwa induk udang *P. chinensis* yang terinfeksi HPV menghasilkan keturunan F1 positif terinfeksi HPV dan hal ini didukung oleh hasil penelitian di India bahwa HPV menginfeksi larva udang di pembenihan (Manivannan *et al.*, 2002; Umesha *et al.*, 2003). Namun berbeda dengan hasil penelitian di Thailand yang menginformasikan bahwa larva udang terinfeksi HPV hanya setelah dipindahkan ke pemeliharaan di ruang terbuka (Flegel *et al.*, 2004). Ini membuktikan bahwa infeksi terjadi karena transmisi horizontal dari berbagai karier yang belum diketahui. Oleh sebab itu, Lightner and

Redman (1992) menyatakan bahwa transmisi HPV adalah secara vertikal dan horizontal.

Rentang inang virus HPV dilaporkan kurang lebih pada 10 jenis udang penaeid di dunia dan udang air tawar *M. rosenbergii* (Lightner and Redman, 1985; Gangnonngiw *et al.*, 2009).

Virus HPV telah ditemukan pada beberapa jenis udang yaitu: *P. semisulcatus*, *P. merguensis*, *P. monodon*, *P. esculentus*, *P. indicus*, *P. chinensis*, *P. penicillatus* dan *P. vannamei*. HPV terdapat pada udang budidaya dan udang alam di Thailand (Flegel *et al.*, 1997), Afrika dan Amerika (Lightner and Redman, 1992) dan Negara-negara Asia (Lightner and Redman, 1985). Penyebaran HPV secara vertikal dari induk ke anaknya dan secara horizontal dari lingkungannya (Brock and Lightner, 1990), namun dari dua penelitian pada induk udang yang ditangkap di Thailand tidak ada satupun yang menunjukkan karakteristik HPV secara histopatologi (Flegel *et al.*, 1997).

B. Multipleks PCR (MPCR)

Beberapa metode PCR telah dikembangkan untuk mendeteksi beberapa jenis virus pada udang seperti PCR konvensional dan RT-PCR, PCR-ELISA dan real-time PCR. Namun, PCR ini hanya dapat mendeteksi suatu infeksi virus tunggal, padahal kemungkinan besar secara alami udang mengalami multiinfeksi oleh beberapa jenis virus. Manivannan *et al* (2002) melaporkan bahwa PL *P. monodon* di pembenihan di India diinfeksi

secara simultan oleh tiga jenis virus yaitu WSSV, MBV dan HPV. Oleh karena itu, perlu dikembangkan MPCR sebagai metode diagnosis virus secara simultan. MPCR dapat digunakan untuk mendeteksi lebih dari 6 jenis virus yang menyebabkan kematian dan pertumbuhan tidak normal pada udang. Metode deteksi ini dapat digunakan untuk menyeleksi larva udang bebas virus sebelum ditebar untuk mencegah kerugian secara ekonomi akibat virus. Selain itu, metode ini juga dapat digunakan untuk studi epidemiologi virus pada udang dan karier (Khawsak *et al.*, 2008).

Multiplex PCR adalah varian dari PCR di mana dua atau lebih lokus yang bersamaan diamplifikasi dalam reaksi yang sama. Sejak deskripsi pertama pada tahun 1988, metode ini telah berhasil diterapkan dibanyak bidang tes DNA, mutasi dan polimorfisme, atau pengujian kuantitatif dan *reverse transcription* PCR (Henegariu *et al.*, 1997). Selanjutnya dikatakan bahwa perancangan primer MPCR dilakukan dengan menggunakan data yang tersedia pada bank gen, selanjutnya melakukan optimasi MPCR dengan software misalnya MPprimer 1.3. Langkah pertama adalah memilih primer yang memiliki kondisi yang sama. Primer seharusnya memiliki suhu *annealing* yang mirip atau sama, memiliki kandungan GC dan suhu melting yang hampir sama, perbedaanya tidak lebih dari 5°C, tidak memiliki nukleotida yang berulang secara berurutan 3 kali dan tidak memiliki komplemen dengan primer lainnya, panjang nukleotida umumnya berkisar 23 – 28 nukleotida dan tidak membentuk primer dimer.

Menurut Adam & Thompson (2011), metode MPCR menjadi sangat populer sebagai alat diagnostik. Metode ini memiliki keuntungan seperti sebuah sampel dapat diperiksa untuk berbagai jenis patogen dalam reaksi tunggal, tetapi standarisasi pengujian bisa menjadi sangat susah. Pengujian ini dirancang menggunakan beberapa pasang primer untuk mendeteksi sekuens DNA spesifik patogen dalam suatu reaksi PCR tunggal, dan amplicon-amplicon reaksi-reaksi ini divisualisasikan sebagai pita bermacam-macam ukuran di gel agarose. Optimasi pengujian bisa menjadi lama karena suhu *annealing* harus ditentukan untuk masing-masing primer, ukuran produk-produk harus cukup berbeda sehingga dapat dibedakan satu sama lain pada gel elektroforesis dan spesifisitas dan sensitifitas pada uji multipleks PCR perlu ditentukan untuk setiap patogen dalam penelitian. RT-MPCR juga sudah dikembangkan untuk mendeteksi berbagai jenis patogen, termasuk virus penyakit udang

Penggunaan MPCR untuk mendeteksi penyakit udang sudah dilakukan oleh beberapa peneliti di negara lain, namun di Indonesia, khususnya untuk mendeteksi secara simultan penyakit udang belum begitu populer. Tsai *et al.* (2004) mengembangkan *multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction* (mRT-PCR) untuk mendeteksi secara simultan WSSV dan TSV pada udang *P. vannamei*. Dhar *et al.* (2001) mengembangkan *real-time* RT-PCR untuk menghitung beban virus TSV dan YHV pada udang, Yang *et al.* (2006) mendiagnosis WSSV dan IHNV dengan *Single-step multiplex* PCR dan Xie *et al.* (2008)

mengembangkan RT-MPCR untuk mendeteksi infeksi tiga patogen virus pada udang yaitu TSV, WSSV dan IHHNV, sementara Khawsak *et al.* (2008) menggunakan RT-MPCR untuk mendeteksi 6 jenis virus (IHHNV, MBV, HPV, WSSV, TSV dan YHV) pada udang windu, Tang and Lightner (2011) mendeteksi MBV dan HPV dengan metode *duplex real-time* PCR pada udang windu.

Umesha *et al.* (2003), virus HPV, MBV dan WSSV dapat menginfeksi benih udang windu di India. Prevalensi HPV lebih rendah dibanding MBV dan WSSV pada penelitian tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh sensitifitas uji yang digunakan untuk mendeteksi virus. Selanjutnya dikatakan bahwa HPV dan MBV sering ditemukan sebagai multiinfeksi virus, sementara WSSV lebih sering ditemukan sendiri.

C. Faktor Lingkungan untuk Perkembangan Virus

Virus IHHNV adalah patogen serius yang sejak 24 tahun bertanggung jawab pada pengaruh negatif terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup beberapa spesies udang budidaya. Virus ini dapat menyebabkan pertumbuhan rendah dan kelainan fisik bagi populasi yang terinfeksi. Belum diketahui treatment dan metode budidaya untuk menanggulangi IHHNV ini. Montgomery-Brock *et al.* (2007) meneliti replikasi IHHNV pada udang *L. vannamei* yang dipelihara pada suhu yang berbeda yaitu suhu panas $32.8 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ dan pada suhu dingin $24.4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ menunjukkan bahwa replikasi IHHNV pada suhu panas lebih rendah dari

pada yang dipelihara pada suhu dingin. Sementara untuk Taura Syndrome Virus (TSV), Montgomery-Brock *et al.* (2002) menyatakan bahwa *L. vannamei* yang telah diinfeksi dengan TSV dan dipelihara pada suhu panas $30\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ memperlihatkan kelangsungan hidup 85%, sementara yang dipelihara pada suhu dingin $27\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ kelangsungan hidupnya sekitar 30%.

Vidal *et al.* (2001) menemukan bahwa kondisi pemeliharaan bersuhu panas dapat dilakukan untuk mengontrol mortalitas *L. vannamei* dari WSSV. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa udang yang diinfeksi dengan WSSV dan dipelihara pada suhu dingin $26\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ mempunyai kelangsungan hidup 0%, sementara yang dipelihara pada suhu panas $32\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ kelangsungan hidupnya 93%. de la Pena *et al.* (2008), prevalensi MBV pada induk udang alam di Philipina dipengaruhi oleh musim karena sebagian besar wilayah di Philipina memperlihatkan bahwa prevalensi MBV lebih rendah pada musim kering dan hanya satu wilayah yang menunjukkan bahwa prevalensi MBV lebih tinggi pada musim hujan.

Menurut You *et al.* (2010), *M. japonicus* dewasa pada suhu yang lebih tinggi (31°C) memperlihatkan aktifitas Phenoloksidase (PO) dan *Total Haemocyte Count* (THC) yang sangat berbeda yaitu lebih tinggi dibandingkan pada suhu lingkungan (27°C). THC dan PO yang tinggi dapat mengurangi replikasi WSSV pada udang. Suhu air yang tinggi 31°C mencegah serangan penyakit dan mortalitas oleh WSSV pada *M. japonicus* dengan menghambat replikasi virus. Penelitian terdahulu

tentang sensitif mutan baculovirus terhadap suhu menunjukkan bahwa pada suhu tinggi mutasi dalam protein kinase-1 (Fan *et al.*, 1996 *dalam* You *et al.*, 2010) atau di dalam RNA polymerase (Shikata *et al.*, 1998 *dalam* You *et al.*, 2010) mengakibatkan kurangnya ekspresi protein akhir virus seperti protein sampul. Penelitian ini mengindikasikan bahwa suhu tinggi dapat mempengaruhi aktivitas enzim selama replikasi awal virus pada fase berbeda dari dsDNA virus. Berbeda dengan Gao *et al.* (2010), hipertemia (35°C) dan hipotermia (15°C) signifikan menurunkan proliferasi WSSV, sementara 25°C adalah suhu optimum replikasi WSSV. Suhu rendah adalah faktor yang sangat efisien untuk mengontrol replikasi WSSV dan mortalitas akibat infeksi WSSV, sebab jumlah *copy* WSSV hanya 0.626/ng otot pada suhu 15°C, sementara 5.94 *copy* pada suhu 35°C. Selanjutnya dikatakan bahwa kondisi optimal untuk proliferasi WSSV adalah pada suhu 30°C, salinitas 35 ppt dan pH 8.0, dan sebaliknya kondisi yang buruk untuk proliferasi WSSV adalah pada suhu 15°C, salinitas 35 ppt dan pH 9.0.

Beberapa hasil penelitian di atas menunjukkan bahwa proliferasi atau replikasi virus TSV, WSSV, MBV dan IHHNV pada udang *L. vannamei*, *M. japonicus* dan *P. monodon* sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan.

D. Kualitas Air untuk Kebutuhan Udang Windu

Jasad patogen merupakan faktor yang sangat berpengaruh terhadap kehidupan udang, namun kualitas air juga merupakan salah satu

faktor penting yang harus diperhatikan untuk mendukung kehidupan udang windu. Kualitas air dapat berpengaruh secara langsung atau tidak langsung terhadap kehidupan udang. Oleh karena itu, faktor-faktor yang berhubungan dengan lingkungan hidup udang harus dijaga dan diperhatikan. Beberapa parameter kualitas air yang dapat mempengaruhi kehidupan udang windu adalah: temperatur, salinitas, oksigen terlarut, keasaman (pH) air, bahan organik terlarut (BOT) dan amoniak.

Kisaran suhu yang optimal bagi udang windu berkisar antara 26 - 31°C (Poernomo, 1979). Wardoyo dan Djokosetyanto (1988) mengatakan udang windu hidup normal pada kisaran suhu air 21 - 32°C, dengan kisaran suhu optimal $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Udang mengalami stres pada suhu 20°C atau kurang dan 32°C atau lebih, serta mengalami kematian pada suhu 35°C.

Salinitas optimal untuk kehidupan larva udang windu berkisar 28-30 ppt (Cholik, 1986). Larva udang (PL30-50) mati dalam air tawar dalam 5 jam (Chien, 1992). Selanjutnya, dikatakan bahwa salinitas di bawah 10 ppt menyebabkan penurunan laju pertumbuhan dan tingkat kematian yang tinggi. Secara umum udang windu tumbuh baik pada salinitas 10 - 25 ppt dan pertumbuhan normal udang windu tercapai pada salinitas 15 - 35 ppt (Chien, 1976).

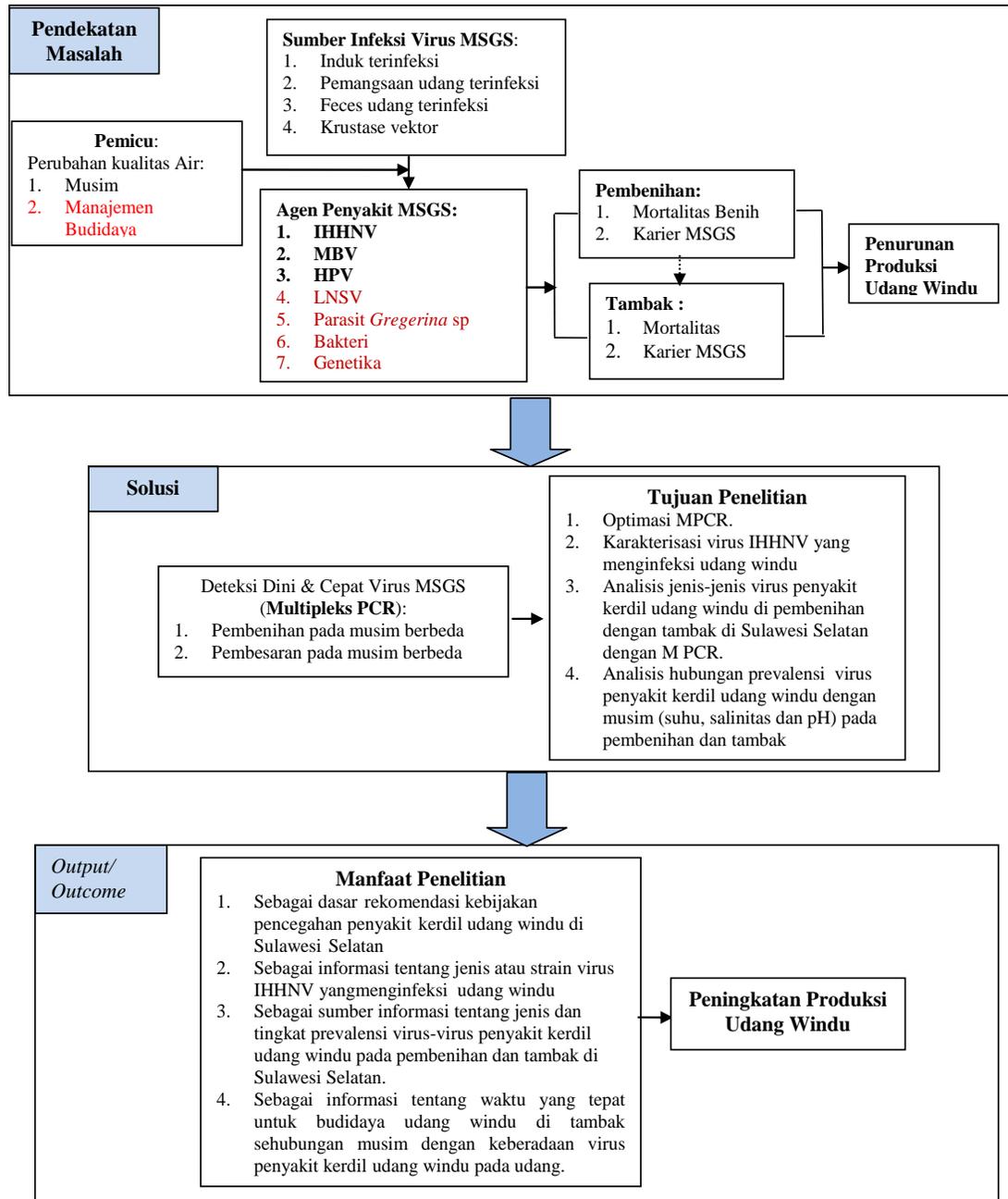
Salinitas adalah faktor lingkungan yang sangat penting mempengaruhi sintasan, pertumbuhan dan fungsi fisiologis lainnya. Pan dan Jiang (2002) melaporkan bahwa selama perubahan singkat salinitas

10 jam dari 30‰ ke 15‰, begitupula dengan fluktuasi pH dari 8,5-7.0 atau ke 9.5 aktivitas bakteriolitik dan aktifitas antibakteri dari dua udang (*Fenneropenaeus chinensis* dan *Litopenaeus vannamei*) secara bertahap berkurang, sementara aktivitas PO meningkat. Li *et al.* (2002), THC *Marsupenaeus janpolicus* menurun ketika salinitas berubah dari 25‰ ke 9‰ atau ke 33‰ antara 4 dan 8 hari tetapi aktivitas PO meningkat. Penelitian ini menunjukkan bahwa suatu perubahan salinitas tiba-tiba dapat menyebabkan penurunan immunokompetens udang dan diikuti dengan suatu pemulihan secara bertahap. Pan *et al.* (2005), pengaturan sistem imun *L. vannamei* dapat pulih dari beberapa perubahan salinitas dalam waktu 6 hari dan pemulihan tidak tergantung pada tingkat perubahan salinitas dan sebaiknya perubahan salinitas tidak lebih dari 5‰. Begitupula dengan perubahan pH tidak lebih dari 5 skala dari optimal. Dan beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kondisi stress, THC krustase menurun, aktifitas enzim yang berhubungan dengan resistensi terhadap penyakit menurun dan sensitifitas terhadap pathogen meningkat (Truscott & White, 1990; Vargas-Albores *et al.*, 1998; Le Moullac & Haffner, 2000).

Keasaman atau pH air akan mempengaruhi pertumbuhan atau kehidupan udang secara langsung. Keasaman air yang rendah dapat menyebabkan udang menjadi kropos dan selau lembek karena tidak dapat membentuk kulit baru (Poernomo, 1988). Menurut Wardoyo (1975), keasaman air menyebabkan pengendapan dan penggumpalan lendir pada

insang ikan, dan menyebabkan kerusakan lamella-lamella insang oleh ion hidrogen yang dilepaskan oleh asam tersebut. pH air yang baik untuk pertumbuhan udang adalah 7 - 8,5 (Tiensongrusme, 1980). Pada pH 5,0 atau kurang, kehidupan udang terganggu dan bahkan dapat berakibat fatal, demikian pula pada pH di atas 9,5 (Manik dan Mintardjo 1980). Chien (1992) menyarankan agar pH perairan tambak selama pemeliharaan dipertahankan antara 7,5 - 8,5.

E. Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 12. Kerangka Konseptual Penelitian

F. Hipotesis Penelitian

1. Multipleks PCR dapat diimplementasikan untuk mendeteksi secara simultan ketiga jenis virus MSGS (IHHNV, MBV dan HPV) pada udang windu di Sulawesi Selatan.
2. Virus IHHNV pada udang windu asal Sulawesi Selatan adalah jenis virus IHHNV infeksius.
3. Infeksi virus penyebab MSGS pada udang windu di tambak berasal dari penebaran benih yang sudah terinfeksi virus MSGS.
4. Prevalensi virus MSGS pada udang windu di pembenihan dan tambak dipengaruhi oleh musim.