

**MULTI INFEKSI PADA UDANG *Litopenaeus vannamei*:
DIAGNOSIS DENGAN POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)
DAN REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION
(RT-PCR)**

Isti Koesharyani, Lila Gardenia, dan Hambali Supriyadi

Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan Budidaya

Jl. Ragunan 20, Pasar Minggu, Jakarta Selatan 12540

E-mail: *isti@cria.indosat.net.id*; *istisugama@yahoo.com*

(Naskah diterima: 19 April 2011; Disetujui publikasi: 15 Februari 2012)

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan karena adanya masalah yang dihadapi seperti pertumbuhan udang yang tidak seragam (ukuran bervariasi), penampakan klinis yang abnormal dan organ yang tidak sempurna. Gejala tersebut akibat dari infeksi penyakit yang disebabkan oleh virus. Untuk mengetahui jenis virus yang menyerang udang tersebut, maka dilakukan analisis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan berbagai jenis spesifik primer WSSV, IHNV, MBV, TSV, IMNV, dan PvNV. Sampel udang yang secara visual normal dan abnormal diambil lalu disimpan dalam larutan pengawet 90% Ethanol dan RNAlater kemudian dianalisis di laboratorium dengan metode yang sudah dikembangkan oleh Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan Budidaya. Hasilnya menunjukkan bahwa udang yang tumbuh lambat dan mempunyai rostrum bengkok dan warna otot daging memutih ternyata tidak hanya diserang oleh satu virus namun dua virus IHNV dan IMNV. Hasil penelitian ini juga mengindikasikan bahwa udang yang terserang IHNV akan tumbuh lambat walaupun tidak mematikan, sedangkan udang yang diserang IMNV otot daging di tubuh memutih terutama pada bagian punggung dan dapat menimbulkan kematian.

KATA KUNCI: multi infeksi *Litopenaeus vannamei*, IHNV, IMNV, WSSV, PCR, RT-PCR

ABSTRACT: *Multi infection of Litopenaeus vannamei shrimp: detection by using Polymerase Chain Reaction (PCR) and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method. By: Isti Koesharyani, Lila Gardenia, and Hambali Supriyadi*

This research was done due to the problems found in the field such as shrimp with abnormal growth (dwarf). Those symptoms caused the disease outbreak by viruses. To know the type of virus that infected to the shrimp, the samples be analyze by using Polymerase Chain Reaction (PCR) and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method with primers of specific WSSV, IHNV, MBV, TSV, IMNV, and PvNV. Samples of normal and abnormal shrimp were taken and stored in a preservative solution 90% ethanol and RNAlater and then analyzed in the laboratory with a method that has been developed by The Research Center for Aquaculture. The results showed that the shrimp that grow slowly and have a curved rostrum and the white flesh muscle was infected by two type of viruses IHNV and IMNV. The results also indicate

that IHNV infected shrimp will grow slowly, although there are not mortality. While the shrimp are IMNV infected by shown muscle white body, especially on the back and can cause mortality

KEYWORDS: multi infection *Litopenaeus vannamei*, IHNV, IMNV, WSSV, PCR, RT-PCR

PENDAHULUAN

Budidaya udang telah diketahui sangat menguntungkan, bila produksi tidak mengalami kegagalan baik dalam produksi larva di hatcheri maupun pada saat proses pertumbuhan di tambak. Namun, kenyataan yang ada di lapangan seringkali terjadi berbagai masalah, kasus tersebut adalah adanya infeksi patogen baik bakteri, jamur, maupun patogen lain yaitu virus. Patogen yang disebabkan oleh virus disinyalir merupakan kasus yang sering ditemukan dan menyebabkan kerugian karena tingkat kematian dapat mencapai 100% seperti pada kasus infeksi *white spot syndrome virus* (WSSV) pada budidaya udang *P. monodon*. Virus tersebut mempunyai inang yang sangat luas, dapat menyerang berbagai jenis udang peneaid, di antaranya *P. monodon*, *P. japonicus*, *P. chinensis*, *P. Indicus*, *P. marguensis*, dan *L. vannamei* (Kasornchandra *et al.*, 1998, Koesharyani *et al.*, 2001; Flegel, 1999; Kimura *et al.*, 1996; Inouye *et al.*, 1994; Rodriguez *et al.*, 2003).

Beberapa kasus kematian massal yang disebabkan oleh penyakit pada udang vaname pernah dilaporkan terjadi di beberapa tambak baik di Jawa maupun di luar Jawa. Adapun gejala-gejalanya yang pernah dilaporkan sesuai dengan jenis penyakit yang disebabkan oleh patogen virus. Menurut OIE (*Aquaculture Asia Pacific*, 2010), ada beberapa jenis penyakit virus yang menyerang udang dan perlu diwaspadai diantaranya (ada 9 jenis penyakit), yaitu *White Spot Syndrome Virus* (WSSV), *Infectious Hypodermal* dan *Haematopoietic Necrosis* (IHNV), *Penaeus monodon-type baculovirus* (MBV), *Taura syndrome virus* (TSV), *Yellow head virus* (YHV), *Infectious myonecrosis virus* (IMNV), *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV), *Gill associated virus* (GAV), dan *Macrobrachium rosenbergii noda virus* (MrNV). Di mana dari kesembilan jenis virus tersebut enam jenis virus (WSSV, IHNV, MBV, YHV, IMNV, dan TSV) sudah menginfeksi secara definitif pada budidaya udang *P. monodon* dan *L. vannamei* di Indonesia. Namun tidak tertutup kemungkinan akan adanya infeksi

penyakit baru yang akan menginfeksi bila pencegahan dengan cara diagnosis rutin tidak dilakukan. Sementara infeksi jenis virus tersebut diketahui sangat mematikan sehingga dapat menimbulkan kerugian ekonomi yang tidak sedikit.

Infeksi WSSV sangat ganas dan mematikan pada budidaya udang windu *P. monodon*, sedangkan pada udang *L. vannamei* yang berasal dari Amerika ternyata rentan terhadap serangan penyakit *Taura Syndrome Virus* (TSV) infeksi. Penyakit ini diketahui sejak tahun 1992 di Ecuador (Poulos *et al.*, 1999). Penyakit lain yang dapat menyerang udang *L. vannamei* adalah *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) dan diketahui sejak tahun 2004 di Brazil. Kasus IMNV pertama di Indonesia dilaporkan telah menginfeksi budidaya udang *L. vannamei* pada tahun 2006 di Situbondo Jawa Timur (Senapin *et al.*, 2007) dan infeksi tersebut sampai saat ini masih sering ditemukan pada tambak yang bermasalah. Penyakit lain yang dianggap terbaru yang sudah diketahui di Belize pada tahun 2004 juga menyerang udang putih ini adalah *Penaeus vannamei Noda Virus* (PvNV), serangan virus ini dapat mengakibatkan nekrosis pada daging atau muscle necrosis, gejala ini hampir sama seperti serangan IMNV (Tang *et al.*, 2007b). Umumnya udang *L. vannamei* ini rentan terhadap infeksi golongan RNA virus (TSV, IMNV, dan PvNV) dan beberapa golongan DNA virus seperti WSSV dan IHNV (OIE, 2006). Untuk virus lain seperti YHV dan MBV masing-masing pernah ditemukan, tetapi intensitas infeksi tidak seperti pada virus lainnya. Pada tahun 2009 kasus infeksi MBV masih ditemukan pada budidaya udang *P. monodon* organik di Sidoarjo, Jawa Timur (Koesharyani *et al.*, 2009 *unpublish*).

Dengan banyaknya kejadian infeksi penyakit di lapangan khususnya virus, maka perlu dilakukan pemantauan dan diagnosis guna mencegah masuknya patogen baru yang akan memperparah kondisi perudangan di Indonesia. Oleh karena itu, untuk mengetahui adanya patogen maka perlu dilakukan analisis

deteksi rutin menggunakan PCR dan RT-PCR menggunakan berbagai macam spesifik primer. Diharapkan hasil yang diperoleh dapat menentukan status penyakit sehubungan dengan pengembangan udang introduksi *L. vannamei*.

BAHAN DAN METODE

Sampel Udang *L. vannamei*

Sampel udang *L. vannamei* normal dan abnormal yang berumur \pm 2 bulan berasal dari lokasi budidaya udang di Situbondo, Jawa Timur. Sampel udang diambil dengan gejala seperti ukuran yang tidak seragam walaupun berumur sama, abnormalitas bentuk rostrum (memendek dan bengkok) serta warna tubuh yang memutih. Sampel selanjutnya disimpan dalam dua larutan pengawet yang berbeda yaitu pada 90% Ethanol untuk digunakan dalam pengujian DNA virus dengan metode PCR, dan RNA^{later}[®] (Qiagen), untuk digunakan dalam analisis RNA virus dengan metode RT-PCR. Pada setiap individu sampel udang kemudian diekstrak DNA dan RNA nya. (Ekstraksi DNA dan RNA dilakukan pada setiap individu sampel udang).

Ekstraksi DNA

Persiapan lysate: Masing-masing sampel udang uji diambil jaringan insang/pleopod seberat 10 mg, dimasukkan dalam (2 mL) mikrotube Precellys Ceramic ditambahkan 250 μ L *Lysis buffer* (*Mole product*). Jaringan udang dihancurkan dengan alat Homogenizer PeqLab dengan kecepatan 5000 rpm selama 3 menit dengan penghentian kecepatan tiap 1 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya homogenat diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Sebanyak 10 μ L Rnase A (Dnase & Protease *Free*) 10mg/mL ditambahkan untuk menghilangkan RNA dan protein sebagai penghambat amplifikasi dan inkubasikan kembali pada suhu 37°C selama kurang lebih 45 menit kemudian ditambahkan 10 μ L Proteinase-K (10 mg/mL) dan diinkubasi pada suhu 55°C satu malam, selanjutnya lysate yang diperoleh akan digunakan pada proses isolasi genom DNA.

Isolasi genom DNA: Isolasi genom DNA dilakukan dengan Gen Mole Strip[™] DNA Tissue secara Robotik, yaitu dengan memindahkan sebanyak \pm 200 μ L Lysate (supernatan) yang telah diperoleh dari ekstraksi ke dalam tabung Strip Mole dan ditempatkan sedemikian rupa

dalam rak pada mesin robotik kemudian diprogram dan dioperasikan selama 45 menit. Hasil akhir berupa 100 μ L genom DNA, selanjutnya dipindahkan ke dalam mikrotube steril (DNase & Rnase *Free*). Genom DNA digunakan untuk amplifikasi DNA virus target dengan menggunakan PCR dan spesifik primer.

Ekstraksi RNA

Persiapan lysate: Sampel udang uji diambil jaringan insang/pleopod seberat 25 mg, dimasukkan dalam (2 mL) mikrotube Precellys Ceramic ditambahkan 600 μ L *Lysis Buffer* (*Mole product*). Jaringan udang dihancurkan dengan alat Homogenizer PeqLab dengan kecepatan 5000 rpm selama 3 menit sebanyak 2 kali, homogenat diinkubasikan pada suhu ruang selama 10-15 menit, kemudian di-sentrifugasi dengan kecepatan 14 000 rpm selama 1 menit. Sebanyak 600 μ L supernatan diambil dan ditempatkan ke dalam mikrotube baru dan ditambahkan 600 μ L Ethanol 80%.

Isolasi Genom RNA: Isolasi genom RNA dilakukan dengan menggunakan SurePrep[™] True Total[™] RNA purification Kit (*Fisher Bio Reagent*), proses awal isolasi adalah pengikatan genom RNA dengan memasukkan 2 x 600 μ L lysate dalam spin column dan disentrifugasi masing-masing dengan kecepatan 14 000 rpm selama 1 menit, setelah RNA terikat pada *spin column* selanjutnya dilakukan proses pencucian RNA.

Pencucian (*washing*), ke dalam *spin column* ditambahkan 400 μ L *wash solution* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 1 menit. Proses tersebut dilakukan sebanyak tiga kali pada pencucian yang ketiga, lama sentrifugasi menjadi 2 menit. *Column* dibiarkan sebentar hingga kering kemudian dilanjutkan dengan proses pencairan RNA.

Pencairan RNA (*RNA Elution*). Pada proses pencairan RNA *column* dipindahkan ke dalam mikrotube steril (DNase & RNase *Free*) dan ditambahkan 100 μ L pelarut RNA yang ada dalam kit. Kemudian mikrotube berisi *column* disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 2 menit. Sentrifugasi dilanjutkan dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Genom RNA yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk amplifikasi cDNA dengan RT-PCR menggunakan spesifik primer.

Tabel 1. Primer spesifik yang digunakan dalam mendeteksi beberapa jenis virus yang menginfeksi udang *L. vannamei*

Table 1. The specific primers used to detect of several types of viruses infected on *L. vannamei shrimp*

Jenis virus <i>Type of virus</i>	Sekuen primer 5' ~ 3' <i>Primers sequences 5' ~ 3'</i>	Ukuran amplicon <i>Amplicon size</i> (bp)
WSSV	R: 5'-AgA Tag CgA AAC AAC ATC CAA C-3' F: 5'-ATg gTA CAT TTT CCg ggC g -3'	113 Gen Bank U50923.1
IHHNV	R: 5' -ggC CAA gAC CAA AAT ACg AA -3' F: 5' -Cgg AAC ACA ACC CGA CTT TA -3'	389 Tang <i>et al.</i> (2007) (a) Gen Bank.AF218266
MBV	R: 5' -Tgg CAT gCA CTC CCT gAg AT -3 F: 5' -CAT ATC ggC CgA ATA gTg gTC -3'	526 Jena Germany
TSV	R: 5'-AAg TAg ACA gCC gCg CTT gC-3' F: 5'-TCA ATg AgA gCT Tgg TCC-3'	231 Nunan <i>et al.</i> (1998) Gen Bank AF277675 Nt.6910-7140
IMNV	R: 5'-TgA AAA, ATA AGC TgT gCC CCA TgT T-3' F: 5'-ggC AAT TTC AAC CTA ATT CTA AAA C-3'	600 Senapin <i>et al.</i> (2007) Gen Bank EF061744
PvNV	R: 5'-CCg TTT gAA TTT CAg CAA CA -3' F: 5'-CTg TCT CAC Agg CTg gTT CA-3'	339 Tang <i>et al.</i> (2007) (b)

Konsentrasi DNA/RNA: DNA diukur kualitas dan kuantitasnya dengan menggunakan alat pengukur DNA "nanodrop". Kemurnian DNA diukur pada panjang gelombang 260 dan 280 nm ($OD_{260/280} = 1.6-1.8$). DNA dan RNA yang baik dalam jumlah dan kemurniannya selanjutnya digunakan pada proses amplifikasi dengan PCR.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi PCR untuk jenis infeksi dari virus DNA dilakukan dengan menggunakan 5x *Green GoTaq Flexi Reaction Buffer* (Promega). Amplifikasi dilakukan dengan total reaksi 10 µL. Sebanyak 1 µL DNA (10 ng) ditambahkan *mastermix* dengan konsentrasi 3,5 mM MgCl₂, 0,3 mM dNTP mix, 0,5 pM masing-masing *Reverse* dan *Forward* primer, 0,5 U *GoTaq Polymerase* (Promega) dan 1 x *Green GoTaq Reaction Buffer* (Promega). Proses amplifikasi menggunakan mesin PCR *SpeedyCycler* (Tretiakov & Saluz US Patent 6.556.940). Profil amplifikasi untuk masing-masing virus IHHNV

dan MBV dapat dilihat pada Tabel 2, sedangkan untuk WSSV dapat dilihat pada Tabel 3.

Amplifikasi c-DNA dengan RT-PCR

Amplifikasi untuk virus-virus RNA dilakukan dengan menggunakan AccssQuick™ RT-PCR System Promega. Amplifikasi dilakukan dengan total reaksi sebanyak 10 µL: 2 µL DNA (10 ng) ditambahkan *mastermix* dengan konsentrasi, 0,5 pM masing-masing *Reverse* dan *Forward* primer, dan 0,2 x AccssQuick™ Master mix (Promega). Untuk mendiagnosa atau meng-amplifikasi c-DNA virus menggunakan mesin PCR *SpeedyCycler* (Tretiakov & Saluz US Patent 6.556.940) profil amplifikasi untuk masing-masing virus IMNV, TSV, dan PvNV dapat dilihat pada Tabel 4.

Elektroforesis

Hasil amplifikasi selanjutnya dielektroforesis pada 2% agarose gel, dengan larutan SB-Buffer (10 x 100 mM NaOH yang di-

Tabel 2. Profil suhu amplifikasi untuk mendeteksi IHHNV dan MBV dengan PCR

Table 2. Temperature profile amplification for IHHNV and MBV detection by PCR

Kondisi <i>Condition</i>	Temperatur <i>Temperature</i> (°C)	Waktu (detik) <i>Time</i> (second)	Siklus <i>Cycle</i>
Denaturasi awal <i>Pre-denaturation</i>	95	120	1
Denaturasi <i>Denaturation</i>	95	10	45 (IHHNV)
Penempelan <i>Annealing</i>	58	10	
Pemanjangan <i>Extension</i>	72	20	35 (MBV)
Pemanjangan akhir <i>Final elongation</i>	72	120	1

Tabel 3. Profil suhu amplifikasi untuk mendeteksi WSSV dengan PCR

Table 3. Temperature profile amplification for WSSV detection by PCR

Kondisi <i>Condition</i>	Temperatur <i>Temperature</i> (°C)	Waktu (detik) <i>Time</i> (second)	Siklus <i>Cycle</i>
Denaturasi awal <i>Pre-denaturation</i>	95	120	1
Denaturasi <i>Denaturation</i>	95	5	
Penempelan/Pemanjangan <i>Annealing/Extension</i>	60	20	45
Pemanjangan akhir <i>Final elongation</i>	72	120	1

Tabel 4. Profil suhu amplifikasi untuk mendeteksi IMNV, TSV, dan PvNV dengan PCR

Table 4. Temperature profile amplification for IMNV, TSV, and PvNV detection by PCR

Kondisi <i>Condition</i>	Temperatur <i>Temperature</i> (°C)	Waktu (detik) <i>Time</i> (second)	Siklus <i>Cycle</i>
Transkripsi terbalik <i>Reverse transcription</i>	48	120	
	95	20	1
Denaturasi awal <i>Pre-denaturation</i>	95	10	
Penempelan <i>Annealing</i>	58 (IMNV & TSV)	10	40
	55 (PvNV)	10	
Pemanjangan <i>Extension</i>	72	20	
Pemanjangan akhir <i>Final elongation</i>	72	120	1

tambahkan H_3BO_3 atau Boric Acid sampai pH 8). Hasil elektroforesis selanjutnya didokumentasikan menggunakan Geldoc.

HASIL DAN BAHASAN

Sampel udang yang diperoleh pada bulan Juli 2009 dengan lama pemeliharaan sekitar 2 bulan berasal dari tambak dengan dasar beton, menggunakan sistem sirkulasi dan tandon. Benih udang *L. vannamei* yang ditebar di tambak sekitar PL 10-12, berasal dari induk *Spesifik Pathogen Free* (SPF) dengan kepadatan berkisar 80-100 ekor/m².

Gejala udang sakit yang ditemukan di lapangan adalah adanya nekrosa pada otot bagian atas perut dan ekor disertai warna

putih pada bagian otot punggung ke arah ekor juga nekrosia di ujung-ujung ekor (Gambar 1). Hasil pengamatan juga diperoleh adanya pertumbuhan udang yang tidak seragam atau ukuran yang bervariasi dan disertai bentuk rostrum yang abnormal atau bengkok (Gambar 2). Kondisi udang di lapangan hampir semua menampakkan gejala yang sama, seperti telah dijelaskan di atas. Oleh karena itu, untuk pengujian dalam penelitian hanya diambil beberapa contoh (8 ekor udang) yang dapat mewakili kondisi atau keadaan udang di lapangan.

Berdasarkan sampel yang diperoleh baik yang sehat secara visual maupun yang sakit, setelah dilakukan diagnosa beberapa jenis virus (WSSV, IHHNV, MBV, TSV, IMNV, dan PpNV)



Gambar 1. Sampel udang *L. vannamei* dengan gejala warna udang putih (*opaque*) dan kerdil (A) disertai nekrosia pada ekor (B)

Figure 1. Samples of *L. vannamei* shrimp with symptoms of white shrimp color (*opaque*) and stunted (A), necrosia accompanied on the tail and (B)



Gambar 2. Sampel udang *L. vannamei* yang digunakan (A) normal, abnormal dan ukuran udang yang tidak seragam, (B) rostrum yang bengkok

Figure 2. Samples of *L. vannamei* shrimp were used testing (A) healthy, normal, abnormal and the size of shrimp that are not uniform, (B) and a bend rostrum

menggunakan teknik PCR dan RT-PCR dengan spesifik primer (Tabel 1) ternyata menunjukkan adanya infeksi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa 75% sampel terinfeksi oleh IMNV dan 100% sampel terinfeksi IHHNV. Dari perhitungan diagnosa ternyata tidak sedikit (75%) udang uji terinfeksi oleh kedua jenis virus secara bersamaan IHHNV dan IMNV (Tabel 5). Kasus natural multi infeksi ini sering ditemukan pada udang penaeid, walaupun variasi jenis virus berbeda pada setiap kasus. Hal ini ditunjukkan seperti pada kasus multi infeksi WSSV dan MBV yang ditemukan pada budidaya udang *P. monodon* di Philippine (Natividad *et al.*, 2006). Bahkan ditemukan kasus 'triple infection', 3 jenis virus MBV, HPV, dan WSSV pada *P. monodon* di India walaupun MBV dan HPV difinitif positif dengan pemeriksaan histopatologi dan WSSV positif dengan *single step* PCR (Manivannan *et al.*, 2002).

Infeksi IMNV pada budidaya tambak udang *L. vannamei* sampai saat ini masih sering terjadi dengan intensitas yang cukup tinggi terjadi hampir setiap tahun baik di Jawa maupun di luar Jawa. *Monitoring* yang dilakukan pada awal tahun 2010 diperoleh kasus kematian dengan gejala TSV dan IMNV pada tambak *L. vannamei* di Banyuwangi, Jawa Timur (Laporan *monitoring* 2010 *unpublish*). Infeksi IMNV pada budidaya udang *L. vannamei* yang teridentifikasi pada tahun 2004 juga merupakan kasus infeksi yang cukup merugikan. Keberadaan penyakit tersebut akan terus berada selama dalam pertumbuhan udang di tambak, dan secara kumulatif akibat infeksi

IMNV ini dapat mematikan udang budidaya sampai dengan 70% (Nunes *et al. dalam* Poulos *et al.*, 2006; Poulos & Lightner, 2006). Hasil pengujian infeksi buatan terhadap infeksi IMNV menunjukkan bahwa IMNV dapat menginfeksi pada ketiga jenis udang *L. vannamei*, *L. stylirostris*, dan *P. monodon* walaupun mempunyai efek yang berbeda (Tang *et al.*, 2005) dan kemungkinan dapat menyerang udang penaid lainnya. Dalam nomenklatur virus, IMNV ini termasuk ke dalam RNA virus *double-stranded, family Totaviridae*, yang tidak beramplop (*non-enveloped*), berbentuk icosahedral dengan diameter virion 40 nm (Senapin *et al.*, 2007).

Akurasi deteksi virus agar mendapatkan hasil yang maksimal dengan menggunakan teknik PCR/RT-PCR, yang ditentukan oleh beberapa faktor, seperti penyimpanan sampel pada larutan yang tepat dan ketepatan jenis primer yang digunakan. Penyimpanan jaringan untuk pemeriksaan virus dari gol RNA seperti TSV, IMNV, dan PvNV dan lain-lain dalam larutan ethanol 90% bisa mengalami kerusakan sehingga tidak dapat dideteksi kembali adanya patogen virus. Sebaiknya sampel untuk golongan RNA virus disimpan dalam larutan RNAlater, dari hasil percobaan ternyata RNAlater dapat menjaga kestabilan RNA dan dari hasil pengamatan preservasi penggunaan sampel jaringan yang disimpan selama 1 tahun dalam larutan RNAlater pada suhu -20°C keadaan RNA masih tetap baik dan stabil dibandingkan dengan penyimpanan jaringan dalam larutan Ethanol 90% (Novita *et al.*, 2009).

Tabel 5. Hasil diagnosa enam jenis virus WSSV, MBV, IHHNV, TSV, IMNV, dan PvNV pada udang *L. vannamei*

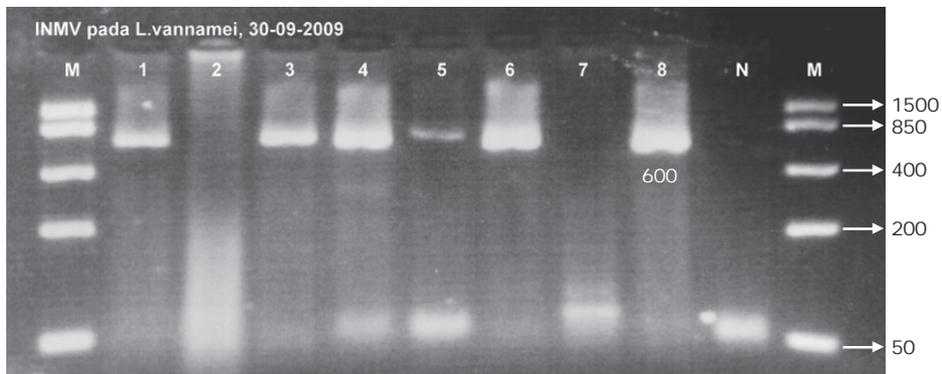
Table 5. Diagnostic results of six types of viruses WSSV, MBV, IHHNV, TSV, IMNV, and PvNV on *L. vannamei* shrimp

Sampel udang vaname <i>Shrimp samples L. vannamei</i>	Diagnostik virus (<i>Viruses detection</i>)					
	WSSV	MBV	IHHNV	TSV	IMNV	PvNV
Normal	-	-	+	-	+	-
Abnormal (<i>Dwarf</i>)	-	-	+	-	-	-
Normal	-	-	+	-	+	-
Abnormal (<i>Whitish</i>)	-	-	+	-	+	-
Normal	-	-	+	-	+	-
Abnormal (<i>Whitish</i>)	-	-	+	-	+	-
Abnormal curved-rostrum	-	-	+	-	-	-
Abnormal (<i>Whitish</i>)	-	-	+	-	+	-

Pemilihan dan ketepatan primer juga sangat menentukan hasil diagnosa. Ada beberapa jenis primer yang dapat digunakan dalam mendiagnosa IMNV. Dalam percobaan ini, primer IMNV yang digunakan adalah primer yang didesain oleh (Senapin *et al.*, 2007) dengan target berat molekul 600 bp. Primer tersebut mempunyai sensitivitas yang lebih baik dibandingkan primer lain yang pernah ada (Poulos & Lightner, 2006). Pada penelitian ini penggunaan spesifik primer dengan target berat molekul 600 bp. merupakan hasil sekuen dari udang *L. vannamei* yang terinfeksi IMNV di Indonesia sehingga keberhasilan dalam mendeteksi adanya IMNV akan lebih spesifik dan tidak menghasilkan *false negative* (negatif palsu). Sekuen susunan nukleotida yang berasal dari IMNV Indonesia ini sudah dimasukkan ke dalam *Gen Bank* dengan accession no. EF061744 (Senapin *et al.*, 2007). Hasil analisis sampel uji dengan RT-PCR menggunakan primer IMNV dapat dilihat pada Gambar 3.

Kasus lain yang ditemukan pada penelitian ini yaitu adanya infeksi IHNV. Dari sampel yang diperoleh dari lapangan baik itu udang yang terlihat sehat maupun sakit, ternyata sampel uji tersebut terinfeksi 100% (8/8) oleh IHNV. Diketahui bahwa IHNV dapat

mematikan dan sangat patogen terhadap udang jenis *L. stylirostris* (Lightner & Redman, 1998). Virus tersebut diketahui tidak mematikan bila menginfeksi udang *L. vannamei* atau *P. monodon*, namun IHNV hanya menyebabkan pertumbuhan yang lambat dan pertumbuhan rostrum yang abnormal (bengkok) (Tang *et al.*, 2007a; Bonnichon *et al.*, 2006; Flegel *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2003; Kalagayan *et al.*, 1991). Hal tersebut sama seperti kasus yang diperoleh dalam penelitian ini, udang menampakkan gejala pertumbuhan yang tidak normal dengan beragam ukuran disertai bentuk rostrum yang abnormal atau bengkok (Gambar 2). Walaupun infeksi IHNV tidak mematikan pada udang tetapi dapat menimbulkan kerugian ekonomi oleh karena terjadi peningkatan *Feed Conversion Ratio* (FCR) pakan. Berdasarkan karakteristik morfologi dan biokimia, IHNV termasuk ke dalam golongan Parvoviridae dengan bentuk icosahedral DNA non-enveloped yang berdiameter 22 nm (Bonami *et al.*, 1990). Dari hasil penelitian menyatakan bahwa penyebaran virus IHNV dapat diturunkan secara vertikal melalui induk betina, yaitu pada ovarium udang betina yang terinfeksi. Sementara dari sperma udang jantan yang positif IHNV tidak menurunkan IHNV. Dengan demikian IHNV ini diturunkan dari induk betina yang positif



Gambar 3. Profil amplifikasi PCR sampel udang *L. vannamei* yang terinfeksi IMNV pada target berat molekul 600 bp. 1: Normal; 2: Abnormal/*dwarf*; 3: Normal; 4: Abnormal/*whitish*; 5: Normal; 6: Abnormal/*whitish*; 7: Abnormal/*curved rostrum*; 8: Abnormal/*whitish*, N: *Negative Control*, M: *Marker Low Range*

Figure 3. Profile of PCR amplification of shrimps samples *L. vannamei* infected IMNV on the target molecular weight of 600 bp. 1: Normal; 2: Abnormal/*dwarfs*; 3: Normal; 4: Abnormal/*whitish*; 5: Normal; 6: Abnormal/*whitish*; 7: Abnormal/*curved rostrum*; 8: Abnormal/*whitish*, N: *Negative Control*, M: *Marker Low Range*

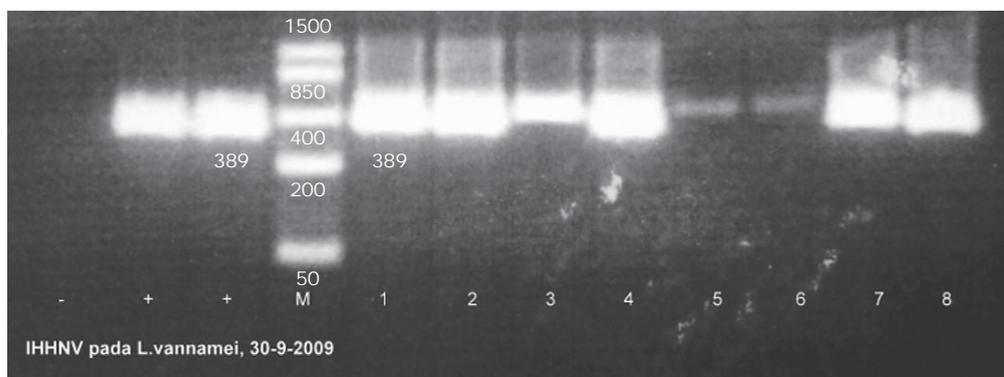
terinfeksi IHNV (Motte *et al.*, 2003). Oleh karena itu, dalam persiapan perbenihan udang, pemeriksaan induk yang akan digunakan untuk produksi larva dalam hatchery harus benar-benar diperhatikan terutama dalam mendeteksi ada-tidaknya infeksi khususnya IHNV pada induk betina yang akan digunakan dalam pembenihan.

Ada beberapa jenis primer yang dapat digunakan dalam deteksi secara rutin terhadap IHNV (OIE, 2006; Tang *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2007a) dan teknik deteksi lain seperti *Ramification Amplification Assay* (RAM) yang bisa digunakan dalam alternatif deteksi (Teng *et al.*, 2006). Dalam penelitian diagnostik IHNV, digunakan spesifik primer yang sangat sensitif dan tercatat dalam *Gen Bank* dengan Asseccion No AF 218266 dengan target berat molekul 389 bp. Primer ini bisa digunakan untuk mendiagnosa semua jenis IHNV dari lokasi berbagai negara serta dapat digunakan untuk deteksi rutin (Tang *et al.*, 2007a). Telah dijelaskan di atas bahwa sampel udang yang kelihatan sehat (normal) dan abnormal pada penelitian ini ternyata positif terinfeksi IHNV. Hasil diagnostik dapat dilihat dari hasil amplifikasi dengan PCR (Gambar 4).

Infeksi IHNV yang ditemukan bersamaan dengan infeksi IMNV pada sampel *L. vannamei* ini, tidak menyebabkan kematian yang berarti. Fenomena ini kemungkinan disebabkan oleh

adanya kompetisi atau perbedaan pola replikasi virion pada kedua virus tersebut di dalam seluler tubuh udang. Kasus seperti ini pernah terjadi pada percobaan infeksi buatan WSSV pada *L. vannamei* yang positif IHNV, dimana tingkat kematian adanya infeksi WSSV dapat dihambat karena kemungkinan terganggunya WSSV dalam mereplikasi didalam tubuh udang dibandingkan dengan infeksi WSSV ke *L. vannamei* yang negatif terinfeksi IHNV. (Bonnichon *et al.*, 2006; Melena *et al.*, 2006). Kondisi ini sama dengan apa yang ditemukan pada kasus yang terjadi pada udang sampel yang dianalisis pada tulisan ini. Di mana kematian yang terjadi tidak terlalu banyak, kemungkinan kasus ini adanya fenomena tersebut di atas. Akibatnya adalah ukuran udang yang sangat bervariasi karena adanya infeksi IHNV dan penampilan udang yang tidak begitu cerah akibat infeksi IMNV. Oleh karena itu, kualitas penggunaan induk sangat perlu diperhatikan didalam melakukan pembenihan udang vanname. Pencegahan adalah tindakan yang harus dilakukan dengan cara melakukan deteksi dan *monitoring* adanya patogen penyakit.

Untuk pencegahan dapat dilakukan dengan cara mendeteksi dengan baik dan benar. Saat ini telah berkembang teknik deteksi atau diagnosa dengan *Real-Time* PCR atau *Quantitatif* PCR (Q-PCR). Teknik tersebut



Gambar 4. Profil amplifikasi PCR sampel udang *L. vannamei* yang terinfeksi IHNV pada target berat molekul 389 bp. 1: normal; 2: abnormal/*dwarf*; 3: Normal; 4: abnormal/*whitish*; 5: normal; 6: abnormal/*whitish*; 7: abnormal/*curved rostrum*; 8: abnormal/*whitish*, M: *marker low range*, (-): *negative control*, (+): *positive control*

Figure 4. Profile PCR amplification samples of shrimps IHNV-infected *L. vannamei* on the target molecular weight of 389 bp. 1: normal; 2: abnormal/*dwarfs*; 3: normal; 4: abnormal/*whitish*; 5: normal; 6: abnormal/*whitish*; 7: abnormal/*curved rostrum*; 8: abnormal/*whitish*, M: *marker low range*, (-): *negative control*, (+): *positive control*

mempunyai keunggulan yaitu tingkat sensitivitas yang sangat tinggi selain mendeteksi secara kualitatif juga dapat mengetahui kwantitas virion di dalam individu yang terinfeksi oleh suatu virus. Pada individu dengan serangan awal suatu infeksi virus, maka dengan mudah dapat diketahui adanya infeksi walaupun dalam jumlah virion sangat sedikit/kecil. Teknik tersebut dapat diaplikasikan pada ikan atau hewan lain yang bersifat *carrier*. Teknik *Real-Time* PCR ini sudah banyak diterapkan di antaranya dalam mendiagnosa virus IHHNV dan WSSV pada udang (Dhar *et al.*, 2001), sedangkan pada ikan tawar Koi digunakan dalam mendeteksi infeksi KHV (Gilad *et al.*, 2004).

Selain itu menurut Tang *et al.* (2007b), mengatakan bahwa terdapat kasus infeksi baru yang dapat menyerang udang yang dinamakan *P. vannamei* Nodavirus atau PvNV. Walaupun sampai saat ini di Indonesia kasus infeksi PvNV tersebut belum pernah ditemukan, namun tidak tertutup kemungkinan akan adanya penyebaran, sehingga dapat berakibat merugikan dalam budidaya udang *L. vannamei*. Dengan ketersediaan induk *L. vannamei* yang sudah didomestikasi dan tersertifikasi bebas virus (WSSV, IHHNV, TSV, IMNV, dan PvNV), diharapkan dapat menghindari introduksi penyakit virus di Indonesia.

KESIMPULAN

1. Hasil diagnosa yang diperoleh memperlihatkan bahwa 75% *sample* terinfeksi IMNV, 100% terinfeksi IHHNV dan 75% kasus multi infeksi IHHNV dan IMNV pada budidaya udang *L. vannamei*.
2. Kasus multi infeksi IHHNV dan IMNV tidak menimbulkan kematian massal pada udang *L. vannamei*.
3. Penggunaan sampel dengan preservasi yang tepat dan primer spesifik, dapat meningkatkan validitas diagnosa

SARAN

1. Dalam kebijakan kedepan harus diupayakan standarisasi diagnosa untuk seluruh laboratorium yang ada di Indonesia.
2. Perlu adanya pemantauan rutin dengan standar diagnosa akan adanya infeksi virus pada udang introduksi *L. Vannamei*.
3. Perlu adanya kontrol yang ketat terutama import udang jenis *L. vannamei* untuk mencegah introduksi penyakit baru.

UCAPAN TERIMA KASIH

Diucapkan terima kasih kepada laboratorium beserta staf Hans-Knoll Institute (HKI) Jena Germany yang sudah memberikan kesempatan dalam melakukan diagnosis dalam penelitian tersebut di atas.

DAFTAR ACUAN

- Aquaculture Asia Pacific March/April. 2010. Real-time PCR shrimp virus detection, 6(2): 46.
- Bonnichon, V., Lightner, D.V., & Bonami, J.R. 2006. Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, 72: 179-184.
- Bonami, J.R., Trumper, B., Mari, J., Brehelin, M., & Lightner, D.V. 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J. Gen Virol.*, 71: 2,657-2,664.
- Dhar, A.K., Roux, M.M., & Klimpel, K.R. 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2,835-2,845.
- Flegel, T.W., Nielsen, L., Thamavit, V., Kongtim, S., & Pasharawipas, T. 2004. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. *Aquaculture*, 240. 55-68.
- Flegel, T.V. 1999. An overview of prawn viral disease work in Thailand: PCR for shrimp disease diagnosis. Molecular diagnostic for shrimp viruses in The Asian Region. ACIAR-Mahidol Univ. Thailand, L3-1-L3-11.
- Gilad, O., Yun, S., Zagmutt-vergara, F.J., Leutenegger, C.M., Bercovier, H., & Hedrick, R.P. 2004. Concentration of a koi herpesvirus (KHV) in tissue of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TagMan PCR. *Diseases of Aquatic Organism*, 60:179-187.
- Inouye, K., Miwa, S., Oseko, N., Nakano, H., Kimura, T., Momoyama, K., & Hiraoka, M. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: Elektron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathology*, 29(2): 149-158.

- Kasornchandra, J., Boonyaratpalin, S., & Itami, T. 1998. Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid in Asia. Microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 164: 243-251.
- Kalagayan, H., Godin, D., Kana, R., Hagino, G., Sweeney, J., Wyben, J., & Brook, J. 1991. IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *Journal World Aquaculture Society*, 22: 235-243.
- Kimura, T., Yamano, K., Nakano, H., Momoyama, K., Hiraoka, M., & Inouye, K. 1996. Detection of Penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV) by PCR. *Fish Pathology*, 31(2): 93-98.
- Koesharyani, I., Supriyadi, H., Gardenia, L., Mufidah, T., & Aryati, Y. 2009. Aplikasi dan validasi metode diagnostik DNA virus udang IHNV, MBV dan WSSV secara paralel dan multiplex. Laporan Penelitian APBN 2009 *unpublish*.
- Koesharyani, I., Roza, D., Mahardika, K., Johnny, F., Zafran, & Yuasa, K. 2001. Manual for fish disease diagnosis-II (Marine fish and Crustacean diseases in Indonesia. Gondol Research Institute for Mariculture and Japan International Cooperation Agency, 49 pp.
- Lightner, D.V. & Redman, R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic method. *Aquaculture*, 164: 201-220.
- Manivannan, S., Otta, S.K., Karusanagar, I., & Karusanagar, I. 2002. Multiple viral infection in *Penaeus monodon* shrimp postlarvae in an Indian hatchery. *Dis. Aquat. Org.*, 48: 233-236.
- Mote, E., Yugcha, E., Luzardo, J., Castro, F., Leclercq, G., Miranda, P., Borja, O., Serrano, J., Terreros, M., Montalvo, K., Narvaez, A., Tenorio, N., Cedeno, V., Mialhe, E., & Boulo, V. 2003. Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 219: 57-70.
- Melena, J., Bayot, B., Betancourt, I., Amano, Y., Panchana, F., Alday, V., Calderon, J., Stern, S., Roch, Ph., & Bonami, J.R. 2006. Pre-exposure to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus or to inactivated white spot syndrome virus (WSSV) confers protection against WSSV in *Penaeus vannamei* (Boone) post-larvae. *Journal of Fish Diseases*, 29: 589-600.
- Natividad, K.D.L., Migo, M.V.P., Albaladejo, J.D., Magbanua, J.P.V., Nomura, N., Matsumura, M. 2006. Simultaneous PCR detection of two shrimp virus (WSSV and MBV) in post larvae of *Penaeus monodon* in the Philippines. *Aquaculture*, 257: 142-149.
- Novita, H., Mufidah, T., & Koesharyani, I. 2009. Perbandingan penggunaan berbagai preservasi RNA jaringan dengan RNAlater, alkohol dan alkohol-glislerol untuk deteksi IMNV dengan PCR. *J. Ris. Akuakultur*, 4(3): 377-383.
- OIE. 2006. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal, World Organisation for Animal Health, 414 pp.
- Poulos, B.T., Kibler, R., Bradley, D., Dunlop, Mohny, L.L., & Liggtener, D.V. 1999. Production and use of antibodies for detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, 37: 99-106.
- Poulos, B.T., Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Bonami, J.R., & Lightner, D.V. 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology*, 87: 987-996.
- Poulos, B.T. & Lightner, D.V. 2006. Detection infection with infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Dis. Aquat. Org.*, 73: 69-72.
- Rodriguez, J., Bayot, B., Amano, Y., Panchana, F., I de Blas, Alday, V., & Caledron, J. 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *Journal of Fish Diseases*, 26: 439-450.
- Senapin, S., Phewsaiya, K., Briggs, M., & Flegel, T.W. 2007. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, 266: 32-38.
- Teng, P.H., Lee, P.Y., Lee, F.C., Chien, H.W., Chen, M.S., Sung, P.F., Su, C., & Ou, B.R. 2006. Detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in *Litopenaeus vannamei* by ramification amplification assay. *Dis. Aquat. Org.*, 73: 103-111.
- Tang, K.F.J., Navarro, S.A., & Lightner, D.V. 2007a. PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, 74: 165-170.
- Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Redman, R.M., & Lightner, D.V., 2007 b. Development of in

situ hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, 75: 183-190.

Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Poulos, B.T., Redman, R.M., & Lightner, D.V. 2005. *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris*, and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Dis. Aquat. Org.*, 63: 261-265.

Tang, K.F.J., Poulos, B.T., Wang, J., Redman, R.M., Shih, H.H., & Lightner, D.V. 2003. Geographic variation among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis. Aquat. Org.*, 53: 91-99.

Tretiakov, A. & Saluz, H.P. US Patent 6,556,940). SpeedyCycler PCR Machine.