

WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) DAN BAKTERI *Vibrio* SP. PADA PAKAN SEGAR YANG DIBERIKAN SEBAGAI RANSUM INDUK UDANG WINDU, *Penaeus monodon*

White Spot Syndrome Virus (WSSV) and *Vibrio* sp. in the Fresh Feed Used as Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*, Broodstock Diet

R.W. Haliman

PT. Tirtamutiara Makmur, Kotak Pos 14, Besuki-Situbondo 68356, Indonesia

ABSTRACT

The experiment was conducted to evaluate the presence of white spot syndrome virus (WSSV) and *Vibrio* sp. in clam, oyster crabs, squid and sea worm as fresh feed for tiger shrimp, *Penaeus monodon*, Broodstock. The presence of WSSV was detected by using polymerase chain reaction (PCR) method, while the *Vibrio* sp. was grown in TCBS agar and counted as cfu/g fresh feed. The result shows that all the feed have already infected by WSSV with light infection level. *Vibrio* sp. can be isolated from all samples and their population were 1.5×10^3 - $1,8 \times 10^4$ cfu/g fresh feed.

Key words: WSSV, *Vibrio* sp., fresh feed, tiger shrimp broodstock

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keberadaan *white spot syndrome virus* (WSSV) dan *Vibrio* sp. pada pakan segar untuk induk udang windu, *Penaeus monodon*. Pakan segar yang dievaluasi terdiri dari kerang, tiram, kepiting, cumi-cumi dan cacing laut. WSSV dideteksi dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Kandungan *Vibrio* sp. dihitung dengan menginokulasikan 0,1 ml suspensi pakan segar pada agar TCBS, kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dihitung dan dinyatakan dalam cfu/g pakan. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semua jenis pakan segar terinfeksi WSSV pada skala ringan. *Vibrio* sp. dapat diisolasi dari semua jenis pakan segar, dan jumlah populasinya $1,5 \times 10^3$ - $1,8 \times 10^4$ cfu/g pakan.

Kata kunci: WSSV, *Vibrio* sp., pakan segar, induk udang windu

PENDAHULUAN

Dalam usaha pengembangan budidaya hewan-hewan akuatik, penyakit merupakan salah satu mata rantai penyebab kegagalan produksi, termasuk pada budidaya udang windu, *Penaeus monodon*. Infeksi viral dan infeksi bakterial adalah penyebab utama terjadinya kematian masal udang windu, baik pada saat pembenihan maupun pembersaran.

White spot syndrome virus (WSSV) dan bakteri *Vibrio* sp. merupakan patogen yang sering menginfeksi udang windu. WSSV adalah penyakit viral yang sangat virulen dan dapat menyerang berbagai jenis udang (Lightner 1996). Penyakit ini menjadi salah satu masalah penting pada kegiatan budidaya udang (Chen *et al.* 2000). Pada kasus penyakit bakterial, *Vibrio* sp. dilaporkan sebagai bakteri yang paling dominan dan umum (Lin 1995), serta sebagai penyakit paling serius pada pembenihan udang (Haryanti *et al.* 2000).

Pemeliharaan induk udang windu membutuhkan pakan segar sebagai ransum pakan, yang biasanya berupa kerang, tiram, kepiting, cumi-cumi, cacing laut, rebon dan hati sapi (Anonim 1987). Di sisi lain, penyakit dapat menular secara horisontal melalui pakan yang dimakan oleh organisme. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keberadaan *white spot syndrome*

virus (WSSV) and *Vibrio* sp. pada pakan segar untuk induk udang windu, *Penaeus monodon*.

BAHAN DAN METODE

Penyediaan Suspensi Pakan Segar (SPS)

Pakan uji berupa kerang, tiram, kepiting dan cumi-cumi diperoleh dari pasar ikan Besuki, Jawa Timur, sedangkan cacing laut diperoleh dari pengumpul cacing di pesisir Jabung, Probolinggo, Jawa Timur.

Untuk membuat SPS, sebanyak 1 g dari setiap pakan segar digiling halus dengan mortir, dihomogenkan dengan menambahkan 10 ml air laut steril, kemudian dilakukan pengenceran serial 100 kali menurut Hadioetomo (1990).

Penghitungan Jumlah *Vibrio* sp.

Dari hasil pengenceran serial tersebut, diambil 0,1 ml SPS dan diinokulasikan pada media agar TCBS (Merck), lalu diinkubasikan selama 24 jam pada suhu ruang. Jumlah koloni bakteri *Vibrio* sp. yang muncul dihitung dan hasilnya dinyatakan dalam cfu/g pakan.

Pendeteksian WSSV dengan Metode PCR

Pendeteksian WSSV dengan PCR dilakukan menurut sistem IQ2000™ (Farming IntelliGene Tech. Corp., Taipei, Taiwan). Sistem ini terdiri dari proses ekstraksi DNA, amplifikasi DNA dan elektroforesis produk PCR.

Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA diawali dengan memasukkan sebanyak 100 mg setiap jenis sampel ke dalam tabung mikro 1,5 ml yang telah berisi 500 µl larutan lysis buffer. Sampel tersebut kemudian dihancurkan dengan sumpit bambu, diinkubasi selama 10 menit pada balok pemanas dengan suhu 95 °C, lalu disentrifusi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Dari hasil sentrifusi tersebut diambil 200 µl supernatan, dan dimasukkan ke dalam tabung mikro baru 1,5 ml yang telah berisi 400 µl larutan etanol 95%, lalu dihomogenkan dengan bantuan *vortex* dan disentrifusi kembali dengan kecepatan yang sama selama 5 menit. Setelah sentrifusi selesai, larutan etanol dibuang, sedangkan butiran DNA yang terbentuk dilarutkan dalam 200 µl akuabides dan siap untuk diamplifikasi.

Amplifikasi DNA

Proses amplifikasi dilakukan dalam 2 tahap (Nested PCR Test) dengan bantuan primer-primer. Primer yang digunakan dalam proses amplifikasi tahap 1 adalah 7,5 µl First PCR Premix dan 0,5 µl IQzyme DNA Polymerase untuk setiap sampel, sedangkan untuk amplifikasi tahap 2 digunakan 14 µl Nested PCR Premix dan 1 µl IQzyme DNA Polymerase. Kontrol positif menggunakan plasmid DNA WSSV, sedangkan kontrol negatif menggunakan akuabides. Ke dalam setiap tabung mikro 0,2 ml dimasukkan 2 µl sampel DNA hasil ekstraksi, kontrol positif dan kontrol negatif, kemudian dimasukkan 8 µl primer untuk proses amplifikasi tahap 1, lalu dilakukan proses amplifikasi pada mesin *thermocycler*. Setelah proses amplifikasi tahap 1 selesai, ke dalam tiap tabung mikro tadi dimasukkan 15 µl primer untuk proses amplifikasi tahap 2, kemudian dilakukan proses amplifikasi

kembali. Setelah proses amplifikasi selesai selanjutnya ditambahkan 5 µl Loading Dye untuk setiap tabung mikro, dan hasil amplifikasi ini siap untuk dielektroforesis.

Elektroforesis DNA

Elektroforesis dilakukan dengan bantuan media agar Agarose (2%, Amresco). Ke dalam setiap lubang kecil pada salah satu sisi agar yang direndam dalam larutan TAE Buffer (1 x, Amresco) dimasukkan 8 µl hasil amplifikasi. Pada lubang tersendiri dimasukkan pula *DNA marker* yang berfungsi sebagai penanda berat molekul DNA. Proses elektroforesis dilakukan selama 25 menit, kemudian agar direndam dalam larutan Etidium Bromida (10.000 x, Amresco) selama 10 menit, dibilas dengan akuades, dan hasilnya siap diperiksa dengan lampu ultra violet.

Analisis Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan gambar, dan kemudian dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah *Vibrio* pada Pakan Uji

Jumlah bakteri *Vibrio* sp. pada semua jenis pakan uji ditampilkan dalam Tabel 1. Jumlah *vibrio* tertinggi didapatkan pada cumi-cumi ($1,8 \times 10^4$ cfu/g pakan). Adapun jumlah *Vibrio* sp. terendah terobservasi pada kepiting ($1,5 \times 10^3$ cfu/g pakan), kemudian dan tiram ($4,6 \times 10^3$ cfu/g pakan). Jumlah *Vibrio* sp. pada kerang dan cacing laut berada pada kisaran medium dibandingkan dengan pakan lainnya.

Infeksi WSSV pada Pakan Uji

Tingkat infeksi WSSV pada semua jenis pakan uji disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 1. Hasil PCR menunjukkan bahwa semua pakan segar terinfeksi oleh WSSV pada skala ringan.

Tabel 1. Jumlah *Vibrio* sp. pada agar TCBS yang dinokulasi suspensi beberapa pakan segar untuk induk udang windu, *Penaeus monodon*.

Ulangan	Jumlah <i>Vibrio</i> sp. (cfu/g pakan)				
	Kerang	Tiram	Kepiting	Cumi-cumi	Cacing laut
1	$1,7 \times 10^4$	3×10^3	3×10^3	1×10^4	$7,9 \times 10^3$
2	$1,4 \times 10^3$	$6,2 \times 10^3$	0	$2,5 \times 10^4$	1×10^4
Rata-rata	$9,3 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$1,8 \times 10^4$	9×10^3

PEMBAHASAN

Semua pakan uji ternyata mengandung *Vibrio* sp. (Tabel 1) dan terinfeksi WSSV (Tabel 2). *Vibrio* sp. merupakan spesies flora mikro yang umum dijumpai pada organisme akuatik laut (Hjeltnes & Roberts 1993) maupun air laut (Suwanto 2002). Hal inilah yang menjelaskan adanya *Vibrio* pada semua pakan uji. Oleh karena itu, proses penyiapan pakan segar sebagai ransum untuk induk udang windu haruslah disiapkan dengan baik dan hati-hati. Demikian pula halnya dengan keberadaan WSSV pada pakan uji. Hampir semua pakan uji (kecuali cacing laut pada pengujian ulangan kedua) menunjukkan adanya infeksi WSSV dengan skala ringan. Hal ini menunjukkan bahwa di alam bebas telah terjadi infeksi WSSV sebagaimana yang dilaporkan oleh Chen *et al.* (2000).

Mengingat semua jenis pakan segar telah terinfeksi WSSV dan mengandung *Vibrio*, perlu dilakukan upaya meminimalisir terjadinya infeksi horisontal melalui pakan segar. Beberapa cara yang dapat dilakukan misalnya pencucian pakan dengan air bersih yang mengalir, menyimpan pakan yang telah disiapkan pada lemari pendingin, dan pengukusan bahan pakan pada suhu 50-60 °C selama 50-60 menit untuk mengeliminir *Vibrio* (Nitimulyo 1998). Beberapa praktisi pembenihan udang mencoba mem-

berikan pakan buatan untuk memelihara induk udang, namun hasil yang diperoleh kurang begitu menggembirakan, sehingga pembenih udang kembali menggunakan pakan segar. Satu hal yang mungkin menjadi alasan adalah aroma dan tekstur alami pakan segar yang lebih menarik induk udang daripada pakan buatan.

Pada Tabel 1 tampak bahwa kandungan *Vibrio* pada cumi-cumi mencapai jumlah tertinggi, yaitu $1,8 \times 10^4$ cfu/g pakan, sedangkan pada pakan segar yang lain jumlah *Vibrio* lebih rendah satu unit logaritma pada kisaran $1,5 - 9,3 \times 10^3$ cfu/g pakan. Pakan segar yang digunakan pada penelitian ini adalah pakan yang diperoleh langsung dari pasar ikan, sehingga jumlah *Vibrio* yang ada relatif tinggi. Oleh karenanya perlu dilakukan pengamatan lebih lanjut tentang keberadaan *Vibrio* dan WSSV pada pakan segar yang telah diolah lebih lanjut, seperti pencucian pakan, penyimpanan pada lemari pendingin dan pengukusan pakan.

Lo *et al.* (1996) menyebutkan bahwa amplifikasi dua tahap pada uji PCR akan memberikan hasil uji yang lebih sensitif dibandingkan dengan hasil amplifikasi satu tahap. Hasil yang diperoleh lebih sensitif dan spesifik, sehingga secara keseluruhan hasil yang diperoleh akan lebih akurat. Sungguhpun demikian, kontrol positif dan kontrol negatif tetap diperlukan untuk mengetahui validitas pengujian.

Tabel 2. Tingkat infeksi *white spot syndrome virus* (WSSV) pada pakan beberapa pakan segar untuk induk udang windu, *Penaeus monodon*, yang diperiksa dengan metode PCR*

Ulangan	Tingkat Infeksi				
	Kerang	Tiram	Kepiting	Cumi-cumi	Cacing laut
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-

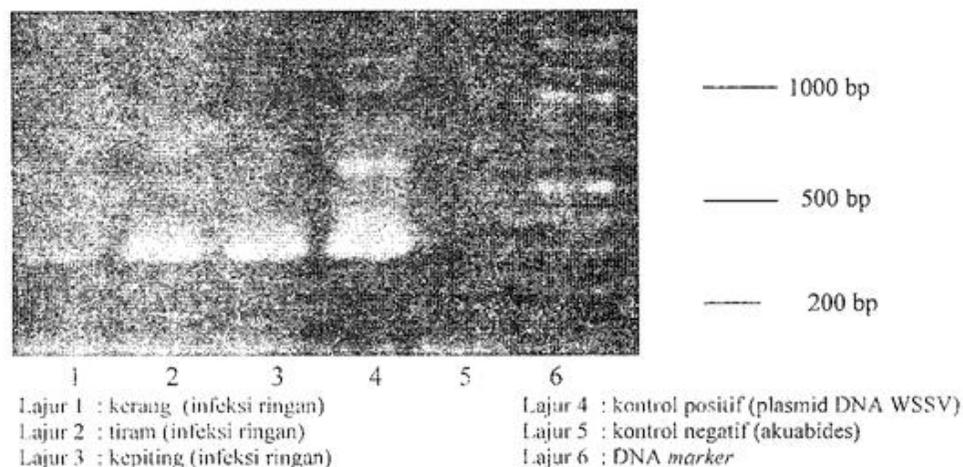
* : skala infeksi berdasarkan Farming IntelliGene Tech. Corp., Taipei, Taiwan

+ : infeksi skala ringan

++ : infeksi skala sedang

+++ : infeksi skala berat

- : tak terinfeksi



Gambar 1. Hasil elektroforesis beberapa sampel pakan segar bagi induk udang windu, *Penaeus monodon*, yang menunjukkan terinfeksi pakan tersebut oleh WSSV pada skala ringan

Gambar 1 menunjukkan hasil elektroforesis beberapa sampel pakan segar, yaitu kerang, tiram, dan kepiting, yang menunjukkan adanya infeksi WSSV dengan skala infeksi ringan. Pada kondisi tersebut, berat molekul pita DNA pada lajur 1,2, dan 3 adalah 296 bp. Kontrol positif menggunakan plasmid DNA WSSV, sehingga setelah proses elektroforesis berakhir, akan tampak pita-pita DNA sesuai dengan konsentrasi plasmid yang dipakai. Pada lajur kontrol negatif, setelah proses elektroforesis selesai akan tampak bersih tanpa ada pita-pita DNA.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa semua jenis pakan segar yang diuji (kerang, tiram, kepiting, cumi-cumi, dan cacing laut) ternyata telah terinfeksi *Vibrio* dan WSSV. Kandungan *Vibrio* terbanyak terdapat pada sediaan cumi-cumi, yang mencapai $1,8 \times 10^4$ cfu/g pakan. Infeksi WSSV dengan skala ringan ditemukan pada semua sampel, sehingga perlu dilakukan upaya penyediaan/penyiapan pakan segar yang baik sebagai ransum pakan induk udang windu, untuk menghindari terjadinya infeksi horisontal.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1987. Petunjuk Teknis bagi Pengoperasian Unit Usaha Pembenuhan (Hatchery) Udang Windu. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Jakarta. 71 hal.
- Chen, L.L., C.F. Lo, Y.L. Chiu, C.F. Chang & G.H. Kou. 2000. Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. Dis. Aquat. Org., 40: 157-161
- Hadioetomo, R.S. 1990. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek, Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. Gramedia, Jakarta. 163 hal.
- Haryanti, K. Sugama, S. Tsumura & T. Nishijima. 2000. Potentiality of bacteria isolated from sea water as biological control agent for vibriosis in black tiger shrimp *Penaeus monodon* larvae, p: 182-189. In L. Hardjito (Ed.). Proceedings of the International Symposium on Marine Biotechnology. Center for Coastal and Marine Resources Studies-IPB, Bogor.
- Hjeltnes, B. & R.J. Roberts. 1993. Vibriosis, pp: 109-121. In V. Inglis, R.J. Roberts & N.R. Bromage (Eds.). Bacterial Diseases of Fish. The University Press, Cambridge.
- Lightner, D.V. (Ed.). 1996. A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- Lin, C.K. 1995. Progression of intensive marine shrimp culture in Thailand, p: 13-23. In C.L. Browdy & J.S. Hopkins (Eds.). Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana.
- Lo, C.F., C.H. Ho, S.E. Peng, C.H. Chen, H.C. Hsu, Y.L. Chiu, C.F. Chang, K.F. Liu, M.S. Su, C.H. Wang & G.H. Kou. 1996. white spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Dis. Aquat. Org., 27: 215-225.
- Nitimulyo, K.H. 1998. Penggunaan Bibit Udang Bebas *Vibrio* dan Vaksinasi Polivalen untuk Penanggulangan Penyakit Vibriosis. Laporan Riset Unggulan Terpadu IV. Dewan Riset Nasional, Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi. 70 hal.
- Suwanto, A. 2002. Strategi Baru dalam Mengendali-kan Penyakit Infeksi: Memahami Bahasa Bakteri. Harian Kompas, 8 November 2002. Hal.36.