

Deteksi Molekuler Infeksi *Taura Syndrome Virus* Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) dan Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii*)

Molecular Detection of Taura Syndrome Virus Infections in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Giant Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

Fariha Wilisiani¹, Nur Rohmah¹, Irma Nur Rahmawati¹, Nastiti Wijayanti¹

¹Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
 Email: nur_rohmah@y7mail.com

Abstract

Giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*) are types of shrimp that became excellent commodities in the fisheries sector. However, one of the obstacles in the vaname shrimp aquaculture is a disease caused by the infection of Taura Syndrome Virus (TSV). One of the consequence of raising the vaname shrimp in Indonesia is the possibility of spreading TSV infection in another shrimp species. TSV infection in giant prawns in Indonesia has not been reported. The aims of this study were: 1. To determine the resistance of giant prawns toward TSV infection and 2. To detect molecularly using RT-PCR technique the presence of viruses TSV on vaname shrimp or giant prawns infected with 3 different doses (0.05 ml; 0.10 ml and 0.15 ml) of TSV inoculum using a pair of specific primers for TSV 9992F (5'-AAG CTT GCG TAG ACA GCC-3') and 9195R (5'-TCAAGAATG GCT TCC TGG-3'). The research results showed that vaname shrimp mortality infected by 0.05 ml; 0.10 ml and 0.15 ml TSV inoculums were 14.28%, 42.86%, and 57.14%, respectively. Whereas the giant prawns mortality that were infected using the same dose of TSV inoculums were 0%, 8.33%, and 8.33%, respectively. Positive result was detected molecularly only from haemolymph of vaname shrimp infected using 0.15 ml of TSV inoculum. On the other hand, positive results were detected in pleopod and the gill of vaname shrimp infected using 0.05 ml; 0.10 ml or 0.15 ml of TSV inoculums. In giant prawns, infection using 3 different doses of TSV inoculums causes negative result molecularly. Based on all of the facts, it can be concluded that, giant prawns has the higher resistance to TSV infection than that of vaname shrimp.

Key words: TSV, vaname shrimp, giant prawns, RT-PCR, haemolymph

Abstrak

Udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) dan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan jenis udang yang menjadi komoditas unggulan dalam sektor perikanan. Salah satu kendala dalam budidaya udang vaname adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Taura Syndrome Virus* (TSV). Dengan dibudidayakannya udang vaname di Indonesia, memungkinkan terjadinya penyebaran infeksi TSV pada udang jenis lain. Hingga saat ini, infeksi TSV pada udang galah belum pernah dilaporkan. Tujuan dari penelitian ini adalah: 1. Mempelajari ketahanan udang galah terhadap infeksi TSV dan 2. Mendeteksi secara molekuler virus TSV dengan metode RT-PCR pada udang galah dan udang vaname yang diinfeksi dengan dosis inokulum TSV yang berbeda (0,05 ml; 0,1 ml dan 0,15 ml) menggunakan pasangan primer spesifik untuk TSV yaitu 9992F (5'-AAG TAG ACA ACA GCC GCG CTT-3') dan 9195R (5'TCA ATG AGA GCT TGG TCC-3'). Hasil penelitian menunjukkan bahwa mortalitas udang vaname akibat infeksi virus TSV dengan dosis 0,05 ml; 0,1 ml dan 0,15 ml masing-masing adalah 14,28%, 42,86% dan 57,14%. Sedangkan mortalitas pada udang galah yang diinfeksi virus TSV dengan dosis yang sama masing-masing adalah 0%, 8,33% dan 8,33%. Hasil positif secara molekuler terdeteksi dari sampel hemolimfa udang vaname yang diinfeksi 0,15 ml inokulum TSV. Sebaliknya, hasil positif terdeteksi dari sampel pleopod dan insang udang vaname yang diinfeksi 0,05 ml, 0,1 ml dan 0,15 ml inokulum TSV. Pada udang galah, infeksi menggunakan inokulum TSV dengan 3 dosis yang berbeda secara molekuler hasilnya negatif. Berdasarkan semua fakta dapat disimpulkan bahwa udang galah memiliki ketahanan terhadap infeksi TSV yang lebih tinggi dibandingkan udang vaname.

Kata kunci : TSV, udang vaname, udang galah, RT-PCR, hemolimfa

Pendahuluan

Udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) dan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan jenis udang yang menjadi komoditas unggulan dalam sektor perikanan. Udang galah adalah udang lokal yang telah banyak dibudidayakan, sementara udang vaname adalah udang 'pendatang/introduksi' yang juga telah banyak dibudidayakan. Udang vaname memiliki potensi yang besar untuk dibudidayakan di Indonesia karena pertumbuhannya cepat dan lebih toleran/tahan terhadap perubahan lingkungan. Dengan sifat-sifatnya tersebut, tidak menutup kemungkinan udang vaname akan menggantikan keberadaan udang lokal. Akan tetapi, salah satu kendala dalam budidaya udang vaname adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Taura Syndrome Virus* (TSV). Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang telah terinfeksi TSV dapat mengalami kematian 80-85% sehingga dapat menimbulkan kerugian dalam pembudidayanya. Kerusakan (luka) yang disebabkan oleh virus tersebut dapat terlihat dari warna tubuh yang menjadi kemerahan, terutama pada ekor udang yang mati. Bercak hitam (melanisasi) yang tidak beraturan di bawah lapisan kutikula akan tampak pada udang yang masih bertahan hidup tetapi udang ini kemudian menjadi pembawa (*carrier*) virus tersebut (Rufiati, 2008).

Data *Office International des Epizooties* (OIE) pada tahun 2009 menyebutkan bahwa udang vaname merupakan salah satu jenis udang yang dapat menjadi hospes dari virus tersebut. Selain itu udang *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. monodon*, *P. chinensis*, *P. japonicus*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, dan *Metapenaeus ensis* juga pernah dilaporkan terinfeksi

oleh TSV (OIE, 2009). Dengan dibudidayakannya udang vaname di Indonesia, kemungkinan penyebaran infeksi TSV pada udang-udang lokal dapat terjadi. Meskipun demikian, sampai saat ini belum diketahui dan belum pernah dilaporkan adanya infeksi TSV pada udang galah. Ketahanan udang galah terhadap infeksi TSV sampai saat ini belum diketahui. Sehingga perlu adanya penelitian untuk mempelajari tingkat morbiditas akibat infeksi TSV pada kedua jenis udang tersebut.

Deteksi infeksi *Taura Syndrome Virus* secara morfologi hanya dapat dikerjakan oleh orang-orang yang sudah berpengalaman dan dengan tingkat validitas yang tidak dapat diukur. Oleh karena itu diperlukan metode yang dapat mendeteksi ada tidaknya infeksi virus tersebut dengan tepat dan cepat. Penelitian yang pernah dilakukan pada *Macrobrachium rosenbergii* yaitu dilaporkan oleh Hameed *et al.* (2004), yang melakukan penelitian udang galah yang terkena penyakit *White Tile Disease* (WTD) dengan RT-PCR. Deteksi molekuler *Taura Syndrome Virus* pada *Litopenaeus vannamei* dan *Macrobrachium rosenbergii* dengan RT-PCR belum pernah dilakukan dan dipublikasikan. Deteksi molekuler dengan teknik *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) akan digunakan dalam penelitian ini untuk mendeteksi keberadaan TSV dan juga untuk mengetahui tingkat kekebalan udang galah terhadap virus TSV.

Materi dan Metode

Litopenaeus vannamei dan *Macrobrachium rosenbergii* sehat masing-masing sebanyak 40 ekor dengan berat ± 5 sampai 10 gram per ekor digunakan sebagai materi penelitian. *Litopenaeus vannamei*

diambil dari daerah Sundak, Gunungkidul Yogyakarta, sedangkan *Macrobrachium rosenbergii* diambil dari Balai Budidaya Udang Galah (BBUG) Samas Yogyakarta. Udang yang digunakan sebagai materi penelitian diaklimatisasi selama 1 minggu. *Litopenaeus vannamei* dipelihara dalam akuarium air payau sementara *Macrobrachium rosenbergii* dipelihara dalam akuarium air tawar. Pakan yang diberikan berupa pelet sintetik sebanyak 5% dari biomasnya dan diberikan 2x sehari (Modifikasi Song *et al.*, 2003).

Insang *Litopenaeus vannamei* yang positif terserang TSV diperoleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Insang tersebut digerus sampai halus, ditambah akuades (1:9) dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Bagian supernatan kemudian dipindahkan ke dalam tabung baru disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan dari hasil sentrifugasi tersebut siap digunakan sebagai inokulum (Song *et al.*, 2003).

Tiga dosis inokulum TSV (0,05 ml; 0,10 ml dan 0,15 ml) masing-masing diinfeksi pada udang vaname (7 ekor tiap kelompok perlakuan) dan udang galah (12 ekor tiap kelompok perlakuan). Jaringan yang digunakan untuk deteksi adanya TSV pada masing-masing jenis udang pada penelitian ini adalah hemolimfa, pleopod dan insang. Sedangkan metode deteksi TSV yang digunakan adalah *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) menggunakan pasangan primer spesifik untuk TSV yaitu 9992F (5'-AAG TAG ACA GCC GCG CTT-3') dan 9195R (5'-TCA ATG AGA GCT TGG TCC-3') .

Hasil dan Pembahasan

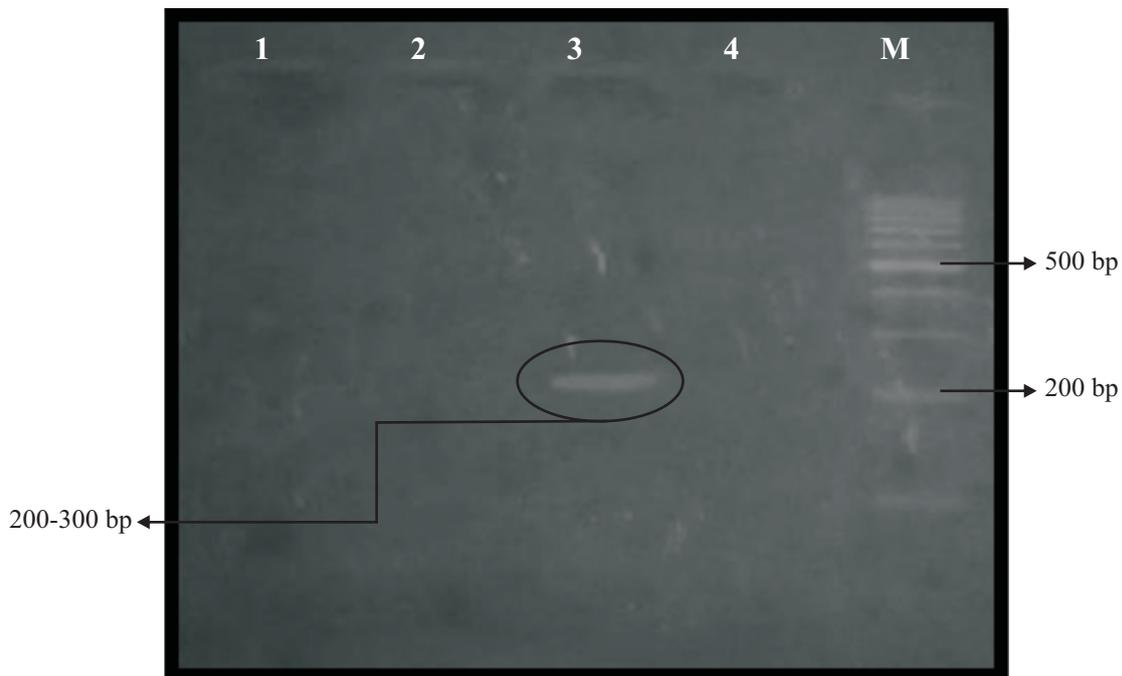
Taura syndrome merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Taura Syndrome Virus*. Selama ini diketahui penyakit tersebut menjadi salah satu kendala dalam budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Infeksi virus tersebut dapat menyebabkan kematian 80-85% dari populasinya (Rufiati, 2008). Menurut OIE (2009), udang vaname merupakan salah satu host dari *Taura Syndrome Virus*. Udang vaname merupakan jenis udang introduksi yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Budidaya udang tersebut memungkinkan adanya penyebaran infeksi *Taura Syndrome Virus* pada jenis udang lokal yang juga banyak dibudidayakan di Indonesia, salah satunya adalah udang galah. Selama ini belum pernah ada laporan mengenai adanya infeksi *Taura Syndrome Virus* pada udang galah karena tidak ada pemeriksaan TSV terhadap udang tersebut sehingga ketahanan udang galah terhadap infeksi TSV belum diketahui secara pasti.

Dalam penelitian ini dilakukan deteksi ada tidaknya infeksi TSV pada udang vaname dan udang galah dengan metode *one step* RT-PCR. Metode tersebut dapat mendeteksi ada tidaknya infeksi virus dengan tepat dan cepat. Tahapan RT dan PCR dalam penelitian ini dilakukan dalam satu reaksi sehingga dapat meminimalkan kemungkinan kontaminasi, selain itu waktu deteksi relatif cepat. Menurut Tu *et al.* (1999), deteksi ada tidaknya infeksi *Taura Syndrome Virus* juga dapat diketahui dengan beberapa metode, yaitu dengan pengamatan morfologi. Kelemahan dari metode tersebut adalah membutuhkan waktu yang relatif lama dan dapat bersifat subyektif untuk mendeteksi ada tidaknya

infeksi TSV. Sedangkan untuk mengetahui kerusakan sel atau jaringan yang telah ditimbulkan oleh virus tersebut, dapat dilakukan dengan analisa histopatologis dengan mengamati kerusakan jaringan secara mikroskopis akibat infeksi (Sukenda dkk., 2008). Penelitian oleh Nunan *et al.* (1998) membandingkan deteksi TSV pada udang vaname secara histologi dan molekuler, yaitu RT-PCR. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa metode RT-PCR lebih sensitif daripada metode histologi dalam mendeteksi adanya infeksi TSV pada vaname. Selain itu, deteksi virus dengan RT-PCR dapat dilakukan dengan pengujian hemolimfa sehingga tidak menyebabkan kematian udang tersebut. Hal ini berkaitan dengan fungsi hemolimfa pada *Crustaceae* sebagai respon imun tubuhnya (Tu *et al.*,

1999).

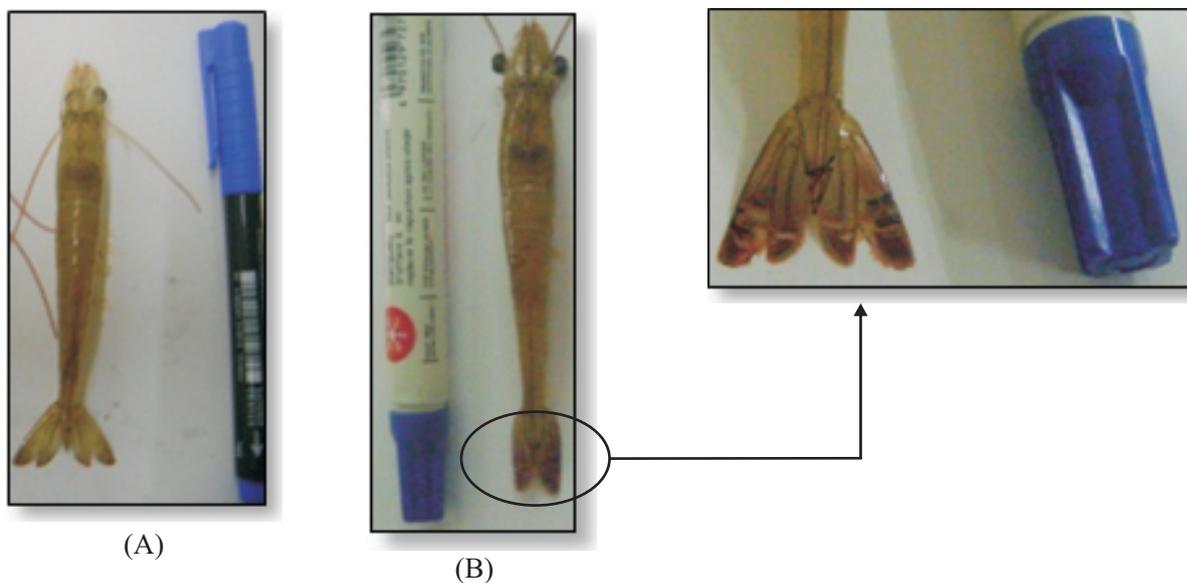
Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa mortalitas udang vaname yang diinfeksi inokulum TSV dengan dosis 0,05 ml; 0,10 ml dan 0,15 ml masing-masing adalah 14,28%, 42,86%, dan 57,14%. Sedangkan mortalitas udang galah yang diinfeksi inokulum TSV dengan dosis yang sama (0,05 ml; 0,10 ml dan 0,15 ml) masing-masing adalah 0%, 8,33%, dan 8,33%. Dari hasil tersebut dapat diambil kesimpulan bahwa udang galah memiliki ketahanan lebih tinggi terhadap infeksi TSV dibandingkan udang vaname. Hasil amplifikasi TSV dengan metode RT-PCR menggunakan sampel hemolimfa udang vaname yang diinfeksi inokulum TSV dengan dosis 0,15 ml menunjukkan bahwa



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk RT-PCR untuk deteksi TSV pada hemolimfa udang vaname. Lajur 1-2: Negatif TSV dari udang vaname yang diinfeksi TSV dengan dosis 0,05 ml dan 0,10 ml; Lajur 3 Positif TSV dari hemolimfe udang vaname yang diinfeksi TSV dengan dosis 0,15 ml; Lajur 4: Kontrol (-) dan M: DNA marker 100 bp.

Dari Gambar 1 diketahui bahwa pada perlakuan III positif terdeteksi TSV yang dibuktikan dengan adanya pita DNA dengan ukuran 200-300 bp. Dalam penelitian ini untuk deteksi TSV digunakan pasangan primer 9992F dan 9195R yang diketahui memiliki produk RT-PCR sebesar 231 bp. Sehingga pita sebesar 200-300 bp yang tampak pada

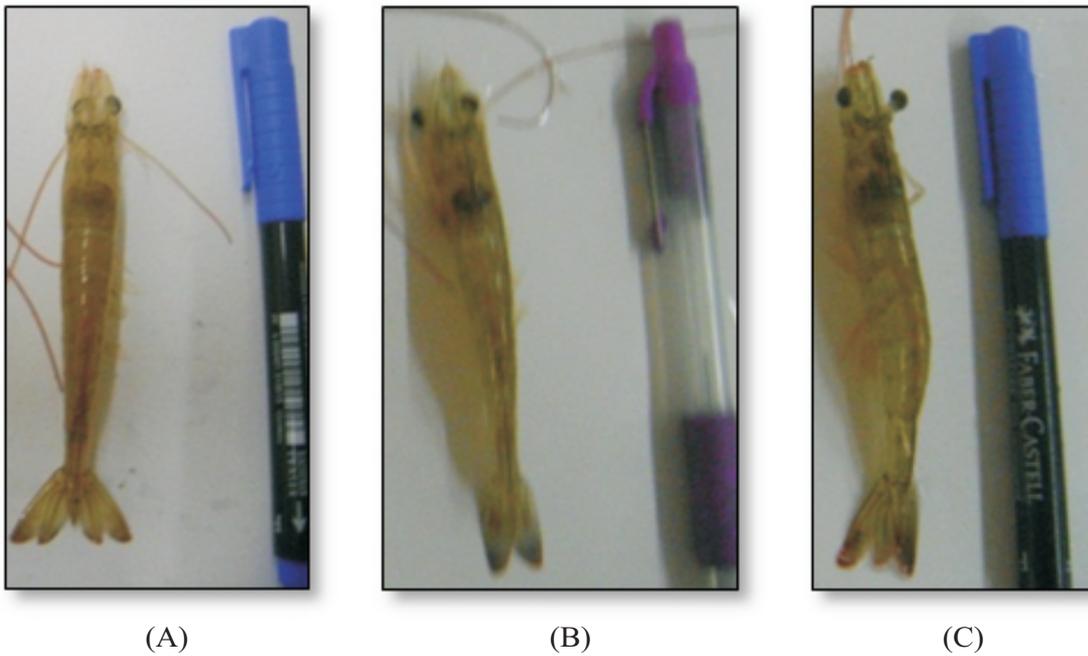
Gambar 1 tersebut kemungkinan besar merupakan cDNA dari TSV. Bila dilihat dari morfologinya, udang yang diinfeksi dengan inokulum TSV sebanyak 0,15 ml (perlakuan III) ekornya tampak berwarna merah dan terdapat bercak hitam di tubuhnya (Gambar 2), seperti yang pernah dilaporkan oleh Hasson *et al.* (1999) dan Rufiati (2008).



Gambar 2. Morfologi udang vaname tanpa perlakuan (A) dan udang vaname positif TSV (B)

Dari Gambar 2 terlihat ekor udang vaname yang diinfeksi dengan 0,15 ml inokulum TSV (B) berwarna lebih merah dibandingkan dengan udang tanpa perlakuan (A). Selain itu, tubuh udang juga terlihat lebih gelap dan ada beberapa bintik hitam di bagian pangkal ekor, kepala, dan ruas-ruas segmen tubuhnya. Bintik hitam pada tubuh udang vaname merupakan sel-sel tubuh udang yang mengalami nekrosis (Hasson *et al.*, 1999). Hal ini membuktikan bahwa udang vaname yang diinfeksi dengan 0,15 ml inokulum TSV positif terinfeksi virus tersebut.

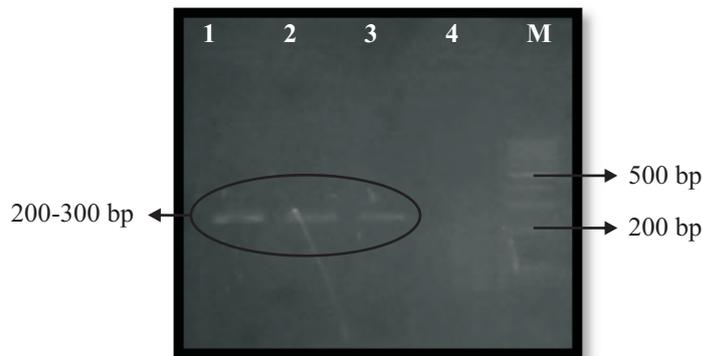
Hasil perlakuan I dan II yaitu udang yang diinfeksi inokulum TSV masing-masing sebesar 0,05 ml dan 0,1 ml secara molekuler negatif TSV (Gambar 1). Terbukti dengan tidak terlihat pita DNA sebesar 200-300 bp pada lajur 1 (perlakuan I) dan lajur 2 (perlakuan II). Sampel yang digunakan untuk uji molekuler pada Gambar 1 adalah hemolimfa. Akan tetapi, bila dilihat secara morfologi udang yang mendapat perlakuan I dan II tampak terinfeksi TSV (Gambar 3.).



Gambar 3. Morfologi udang vaname dengan tanpa perlakuan (A), perlakuan 0,05 ml (B), dan 0,10ml (C) inokulum TSV

Gambar 3 menunjukkan bahwa sampel udang vaname pada perlakuan I (B) dan II (C) secara morfologik berbeda dibandingkan dengan kontrol negatif(A) yaitu memiliki ekor berwarna kemerahan dan di bagian tubuhnya tampak adanya bintik-bintik hitam. Hal tersebut membuktikan bahwa secara

morfologik terjadi infeksi TSV pada perlakuan I dan II. Berdasarkan hal tersebut kemudian dilakukan deteksi ulang secara molekuler dengan menggabungkan sampel pleopod dan insang udang vaname untuk meningkatkan jumlah RNA. Gambar 4 di bawah ini menunjukkan hasil deteksi molekuler TSV pada insang dan pleopod udang vaname :

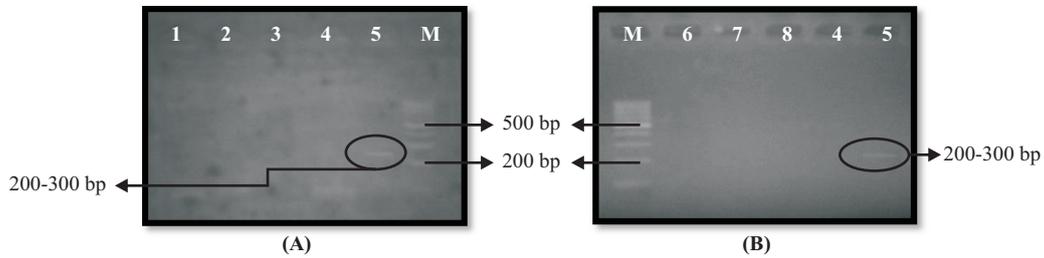


Gambar 4. Hasil elektroforesis produk RT-PCR untuk deteksi TSV pada hemolimfa udang vaname.Lajur 1-3: Positif TSV dari sampel pleopod dan insang udang vaname yang diinfeksi TSV dengan dosis 0,05 ml (lajur 1); 0,10 ml (lajur 2) dan 0,15 ml (lajur 3). Lajur 4: Kontrol (-) dan M: DNA marker 100 bp.

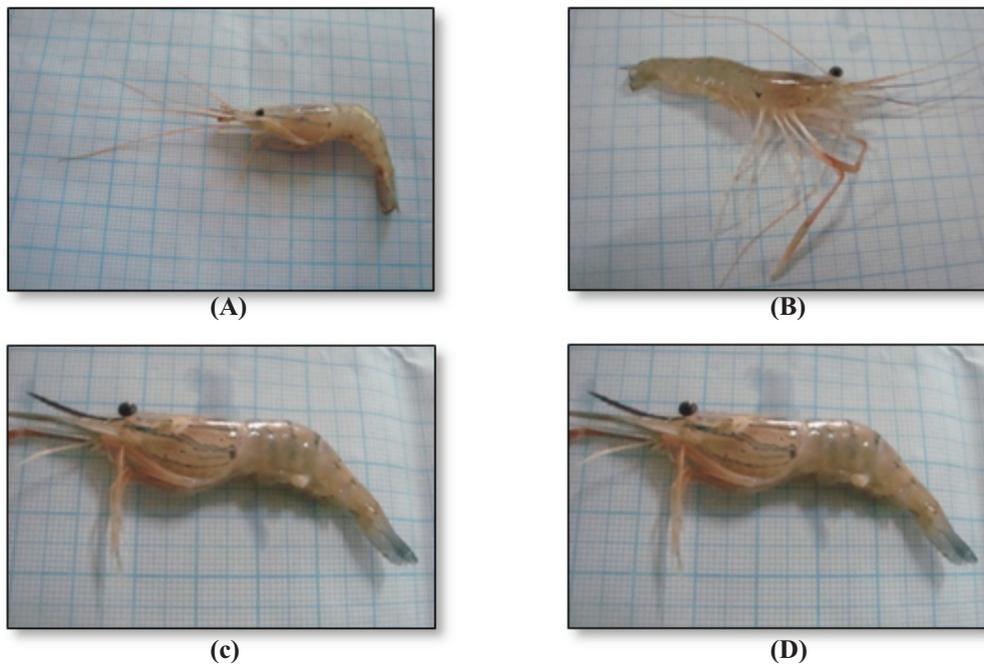
Dari Gambar 4 diketahui bahwa pada perlakuan I, II, dan III dengan sampel pleopod dan insang udang vaname terlihat pita DNA sebesar 200-300 bp yang berarti positif TSV. Menurut OIE (2009), deteksi TSV dapat dilakukan dengan RT-PCR menggunakan sampel hemolimfa, pleopod, insang, dan seluruh tubuh larva udang. Bila dibandingkan dengan hasil deteksi TSV dengan sampel hemolimfa udang vaname (Gambar 1), perlakuan I dan II menggunakan sampel pleopod dan insang juga

menunjukkan hasil positif terinfeksi TSV. Hal ini memperkuat dugaan bahwa RNA yang diperoleh dari hasil isolasi pleopod dan insang lebih banyak dibandingkan isolasi RNA dari hemolimfa sehingga produk DNA dari hasil amplifikasi RT-PCR juga lebih banyak.

Dalam penelitian ini juga dilakukan deteksi TSV pada hemolimfa, pleopod dan insang udang galah, tetapi hasilnya berdasarkan uji RT-PCR (Gambar 5) maupun morfologik tubuh udang (Gambar 6) semuanya negatif.



Gambar 5. Hasil elektroforesis produk RT-PCR deteksi TSV pada hemolimfa (a), pleopod dan insang (b) udang galah. Ket. M: marker 100 bp ladder, lajur 1-3 : sampel hemolimfa udang galah dengan perlakuan 0,05 ml (lajur 1), 0,1 ml (lajur 2), dan 0,15 ml (lajur 3) inokulum TSV, lajur 4 : kontrol (-) TSV, lajur 5 : kontrol (+) TSV, lajur 6-8 : sampel pleopod dan insang udang galah dengan perlakuan 0,05 ml (lajur 6), 0,1 ml (lajur 7), dan 0,15 ml (lajur 8) inokulum TSV.



Gambar 6. Morfologi udang galah yang diinfeksi dengan inokulum TSV sebanyak 0,05 ml (a), 0,1 ml (b), dan 0,15 ml (c) serta kontrol negatif (d).

Pada Gambar 6, udang galah perlakuan atau tanpa perlakuan tidak menunjukkan adanya kemerahan pada ekornya. Adanya bintik hitam pada tubuh udang galah di kedua bagian sisi samping tubuh dekat abdomen pada udang galah bukan merupakan tanda melanisasi karena TSV tetapi merupakan ciri normal yang dimiliki oleh udang galah. Tidak diketemukannya infeksi TSV secara morfologi dan molekuler dengan RT-PCR dimungkinkan bahwa udang galah memiliki ketahanan tubuh yang lebih tinggi terhadap virus TSV dibandingkan dengan udang vaname.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih kepada Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara atas bantuan bahan inokulum TSV yang diberikan. Penelitian ini dilakukan atas biaya Hibah dana Masyarakat, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada tahun anggaran 2010.

Daftar Pustaka

- Hameed, A.S.S., Yoganandha, K., Widada S.J. and Bonami, J.R. (2004) Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) and its associated Extra Small Virus (ESV). *Dis. Aquat. Org.* 62: 191-196.
- Hasson, K.W., Lightner, D.V., Mahney, L.L., Redman, K.M. and White, B.M. (1999) A role of lymphoid organ spheroids in chronic *Taura Syndrome Virus* (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.* 161: 38-105.
- Nunan, L.M., Poulos, B.T. and Lightner, D.V. (1998) The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp aquaculture. *Dis. Aquat. Org.* 160: 19-30.
- OIE. (2009) *Taura syndrome*. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal pp. 106-107.
- Rufiati, I. (2008) *Taura Syndrome Virus (TSV) dan Channel Catfish Disease Virus (CCDV)*. Panduan Mata Kuliah Parasit dan Penyakit Ikan, Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta.
- Song, Y.L., Chun, I.Y., Tzu-Wen, L., Chih-Cheng, H. and Min-Nan, L. (2003) Haemolymph parameters of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura Syndrome Virus. *Fish Shellfish Immunol.* 14: 317-331.
- Sukenda, S. H., Winanti, D dan Yuhana, M. (2008) Keberadaan *white spot syndrome virus* (WSSV), *taura syndrome virus* (TSV) dan *infectious hypodermal haematopoietic necrosis virus* (IHHNV) di tambak intensif udang vaname *Litopenaeus vannamei* di Bakauheni, Lampung Selatan. *J. Akuakultur Ina.* 8: 1-8.
- Tu, C., Hsu-Tien, H., Sheng-Hsiung, C., Jung-Ping, H., Shu-Ting, K., Nan-Jung, L., Tien-Lai, H., Ming-Chang, L. and Shih-Yuh, L. (1999) Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 38: 159-161.