

Full Paper**DETEKSI VIRUS PENYEBAB PENYAKIT KERDIL PADA BENIH UDANG WINDU
(*Penaeus monodon*) DENGAN MULTIPLEKS PCR****DETECTION OF VIRUSES, CAUSATIVE AGENTS OF MONODON SLOW GROWTH
SYNDROME, OF TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*) POST LARVAE USING MULTIPLEX
PCR****Sriwulan* dan Hilal Anshary**

Jurusan Perikanan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin.

Jl. Perintis Kemerdekaan KM 10, Tamalanrea, Makassar 90245.

E-mail: sriwulancinga@yahoo.com/hilal_an@yahoo.com

*Penulis untuk korespondensi

Abstrak

Fenomena penyakit kerdil pada udang monodon yang umum dikenal sebagai *monodon slow growth syndrome* (MSGs) telah dilaporkan menyebabkan kerugian yang signifikan terhadap produksi udang di banyak negara termasuk Indonesia. Sindrom pertumbuhan yang lambat dari *P. monodon* disebabkan karena infeksi virus, monodon baculovirus (MBV), *infection hypodermal and hematopoietic necrosis virus* (IHHNV) dan hepatopancreatic parvovirus (HPV). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis terjadinya infeksi virus yang dikaitkan dengan gejala pertumbuhan lambat serta untuk mengukur prevalensi infeksi virus benih udang di Sulawesi Selatan, khususnya di Kabupaten Takalar, dengan menggunakan teknik deteksi multipleks PCR (MPCR). Teknik multipleks PCR merupakan teknik yang relatif baru yang digunakan untuk mendeteksi secara bersamaan lebih dari satu agen virus dalam satu tabung reaksi. Dalam penelitian ini, 3 pasang primer spesifik digunakan untuk proses amplifikasi IHHNV, MBV dan HPV. Setelah melakukan optimasi beberapa kali pada suhu *annealing*, deteksi virus ini dengan teknik MPCR pada benih udang menunjukkan bahwa ketiga virus, sebagai agen penyebab MSGs, ditemukan pada tempat penetasan yang diamati. Produk PCR IHHNV terbaca di 302 bp, MBV pada 261 bp dan HPV pada 595 bp. Prevalensi infeksi IHHNV, MBV dan HPV masing-masing adalah 50%, 62% dan 44%. Prevalensi dari ketiga virus dianggap tinggi dan bisa menjadi sumber penularan virus di tambak udang tanpa seleksi benih yang tepat.

Kata kunci: benih udang, multipleks PCR, pembenihan, pertumbuhan lambat, virus.**Abstract**

Phenomenon of monodon slow growth disease which is commonly recognized as monodon slow growth syndrome have been reported to cause significant losses of shrimp productions in many countries including Indonesia. The slow growth syndrome of *P. monodon* was due to infection of viruses; monodon baculovirus (MBV), infection hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), and hepatopancreatic parvovirus (HPV). The purposes of this research was to analyze occurrence of viruses infection associated with slow growth syndrome, and to measure prevalence of virus infection of shrimp seed in South Sulawesi, particularly in Takalar Regency, using multiplex PCR detection technique (MPCR). Multiplex PCR is relatively new technique to simultaneously detect more than one virus agents in one reaction tube. In this study, 3 pairs of specific primer were applied to amplify IHHNV, MBV, and HPV. After performing several times optimization of annealing temperature, detection of these viruses with MPCR technique of shrimp seeds showed that the three viruses, as causative agents of slow growth syndrome, did exist in hatcheries observed. The PCR product of IHHNV was read at 302 bp, MBV at 261 bp and HPV at 595 bp. Prevalence of infection of IHHNV, MBV and HPV was 50%, 62% and 44%, respectively. The prevalence of these three viruses was considered high and could becoming the source of viruses transmission in shrimp ponds without proper selection of seed.

Key words: hatchery, multiplex PCR, shrimp seed, slow growth, virus.

Pengantar

Penyakit udang kerdil di Sulawesi Selatan telah banyak menyebabkan kerugian pada petani tambak karena ukuran udang yang tidak bisa mencapai ukuran standar sesuai umur udang tersebut. Produktivitas udang windu jauh dari target produksi udang nasional yang berkisar 2 ton/ha/tahun. Dari hasil pantauan peneliti terhadap seorang petambak yang memiliki lahan sekitar 20 ha, ternyata hanya mampu memproduksi sekitar 1 ton/20 ha (Anshary *et al.*, 2005).

Penyakit udang kerdil telah diteliti di negara Thailand, India dan Taiwan. Di Indonesia penelitian tentang penyakit udang kerdil belum banyak dipublikasikan terutama deteksi virus yang berasosiasi dengan penyakit kerdil tersebut secara molekuler. Oleh sebab itu, penelitian ini sangat penting mengingat Sulawesi Selatan sebagai salah satu sentra produksi udang windu di Indonesia. Di Thailand kerugian akibat penyakit udang kerdil 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). Penyebab udang kerdil adalah akibat multiple infeksi virus MBV, HPV dan IHHNV (Chayaburakul *et al.*, 2004), dan dikenal dengan gejala *Monodon Slow Growth Syndrome* (MSGs).

Keberadaan virus penyakit kerdil di tambak diduga berasal dari benih yang ditebar. MBV, IHHNV dan HPV adalah virus yang telah dilaporkan dapat menginfeksi larva udang windu sampai udang dewasa. Deteksi virus MBV, IHHNV dan HPV pada benih udang windu sangatlah penting untuk memastikan bahwa penyakit kerdil udang windu di tambak disebabkan oleh benih yang terinfeksi virus-virus tersebut. Keberadaan virus di tambak disebabkan oleh virus yang terbawa oleh benih, dari karier, air tambak, feses dan pemangsa udang yang terinfeksi. Deteksi dini pada benih dapat mencegah peledakan populasi virus penyakit kerdil di tambak.

Di Indonesia, meskipun sudah dilaporkan adanya virus MBV, HPV dan IHHNV pada udang windu, penelitian yang mempelajari keterkaitan antara virus tersebut

dengan penyakit udang kerdil belum dilaporkan. Penelitian terdahulu telah melaporkan keberadaan virus tersebut berdasarkan informasi histopatologi (Madeali *et al.*, 2000; Yanto, 2006), namun laporan deteksi secara molekuler terhadap virus-virus tersebut terutama deteksi virus tersebut secara bersamaan atau simultan menggunakan metode multiplex PCR belum banyak dipublikasi. Penggunaan multiplex PCR pada deteksi beberapa jenis virus sangatlah menguntungkan dari segi efisiensi waktu, tenaga kerja dan *reagen* jika dibandingkan dengan monopleks yang lebih mahal dan membutuhkan sumberdaya yang lebih besar (Yang *et al.*, 2006). Jika pendeteksian beberapa virus dengan cepat dapat dilaksanakan, maka antisipasi terhadap penyakit virus dapat segera dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis jenis-jenis virus dan prevalensi virus yang berasosiasi dengan penyakit kerdil pada benih udang windu di Sulawesi Selatan khususnya Kabupaten Takalar dengan menggunakan multiplex PCR (MPCR).

Bahan dan Metode

Pengambilan Hewan Uji

Penelitian ini dilaksanakan mulai Oktober 2010-Januari 2011. Hewan uji pada penelitian ini adalah benih udang windu ukuran pascalarva. Hewan ini diperoleh dari lima pembenihan yang terletak di Kabupaten Takalar. Jumlah sampel untuk setiap pembenihan adalah 300 ekor benur, kemudian diangkut ke laboratorium. Benur tersebut dibagi menjadi 10 subkelompok (30 ekor/subkelompok), Dari subkelompok diambil secara acak 1 ekor benih sehingga hewan uji yang di PCR setiap pembenihan adalah 10 ekor benih.

Ekstraksi DNA

Untuk mendeteksi keberadaan virus MBV, IHHNV dan HPV terlebih dahulu dilakukan persiapan DNA virus melalui ekstraksi DNA. Sampel yang akan diekstraksi terlebih dahulu dihomogenasi dengan menggerus seluruh bagian tubuh benih udang windu sampai halus menggunakan *tissue grinder* steril, selanjutnya ekstraksi mengikuti prosedur pabrikan. Ekstraksi DNA pada penelitian ini menggunakan kit yaitu QiaAmp DNA MiniAmp Kit (Qiagen).

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA virus MBV, IHHNV dan HPV dengan M-PCR dilakukan pada kondisi PCR seperti predenaturasi 95°C selama 15 menit, denaturasi 94°C

selama 30 detik, *annealing* 59°C selama 1 menit 30 detik, ekstension 72°C selama 1 menit 30 detik dan final ekstension 72°C selama 10 menit, dengan 35 siklus. Komposisi PCR (25 µL): Master Mix 12.5 µL, primer mix 2.5 µL, Q-solution 2.5 µL, RNA-ase free water 5.5 µL dan template 2.0 µL. Primer untuk membantu mengamplifikasi ketiga jenis virus tersebut adalah:

HPV 2F/2R 5'-GGAAGCCTGTGTTCTGACT-3',
5'-CGTCTCCGATTGCTCTGAT-3'
(595 bp) (Tang *et al.*, 2008)

MBV 261F/R 5'-AATCCTAGGCGATCTTACCA-3'
5'-CGTTCGTTGATGAACATCTC-3'
(261 bp) (Surachetpong *et al.*, 2005)

IHHNV 309F/R 5'-TTTCTCCAAGCCTTCTCAC-3'
5'-TGATGTAAGTAATTCCTCTCT
GT-3' (302 bp) (Kawshak *et al.*,
2008)

Sebelum M-PCR diaplikasikan, terlebih dahulu dilakukan optimasi, terutama suhu *annealing*. Optimasi ini dilakukan untuk menghindari adanya gangguan primer dimers dan produk nonspesifik lainnya (Loffert *et al.*, 1999).

Prevalensi MBV, IHHNV dan HPV

Prevalensi ketiga jenis virus tersebut diukur untuk melihat tingkat infeksi virus tersebut pada populasi benih udang windu di Kabupaten Takalar. Prevalensi merupakan persentase udang yang terinfeksi virus dalam populasi (jumlah udang yang terinfeksi masing-masing virus per 10 sampel). Analisis data prevalensi dilakukan secara deskriptik dengan bantuan table dan elektroforegram.

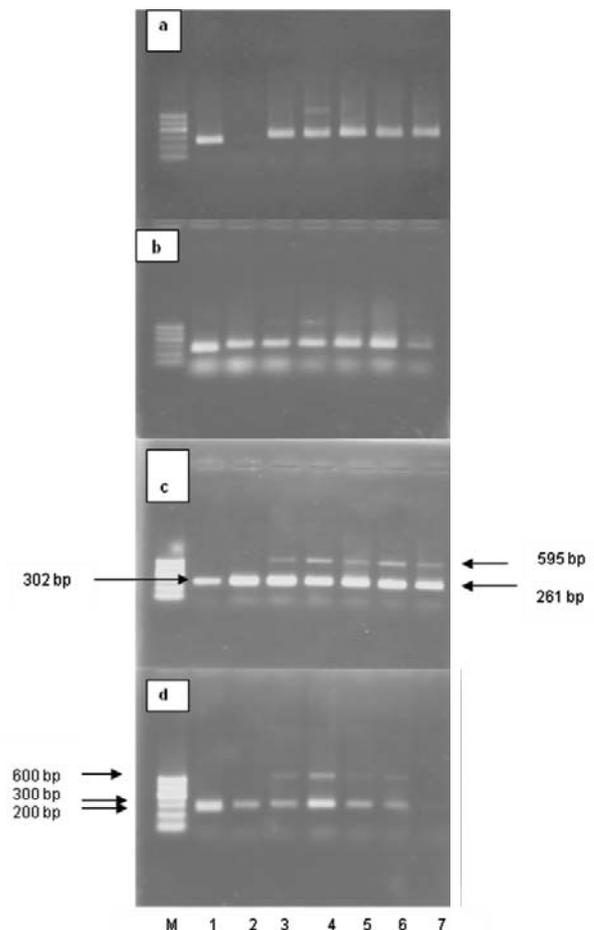
Hasil dan Pembahasan

Optimasi dan Amplifikasi M-PCR

Optimasi suhu *annealing* diperlukan untuk menghindari *mispriming* atau penempelan primer pada tempat yang salah (Yang *et al.*, 2006). Optimasi suhu *annealing* yang dimulai dari suhu 57°C, 58°C, 59°C dan 60°C (Gambar 1a s.d 1d) menunjukkan bahwa suhu *annealing* yang memberikan hasil terbaik adalah suhu 59°C (Gambar 1c). Pada semua suhu yang diuji, pita pada angka 261 bp yang menunjukkan infeksi MBV dapat terbaca dengan jelas, namun untuk virus yang lain memperlihatkan pita yang sangat tipis, sehingga memerlukan optimasi lebih lanjut. Pada optimasi dengan suhu *annealing* 59°C nampak beberapa jenis pita yang terbaca dengan jelas pada

angka pembacaan pasangan basa berbeda yang menunjukkan adanya infeksi yang terjadi secara simultan oleh beberapa virus.

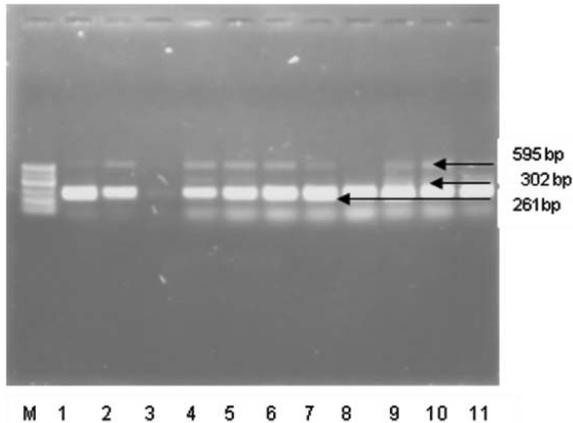
Ketiga jenis primer yang digunakan memperlihatkan spesifitas tinggi dengan hanya mengamplifikasi target yang diharapkan, dan tidak mengamplifikasi DNA selain DNA target untuk ketiga jenis virus tersebut. Hal ini terlihat pada Gambar 1c, dimana pita yang diperoleh telah sesuai dengan panjang nukleotida DNA target yaitu 261 bp untuk MBV (Surachetpong *et al.*, 2005), 302 bp untuk IHHNV (Kawshak *et al.*, 2008) dan 595 bp untuk HPV (Tang *et al.*, 2008).



Gambar 1. Hasil optimasi suhu *annealing*. Ket: a: 57°C; b: 58°C; c: 59°C dan d: 60°C. M: marker, 1-7: sampel.

Berdasarkan hasil optimasi tersebut, suhu *annealing*, 59°C, selanjutnya digunakan pada amplifikasi DNA sampel dari beberapa pembenihan di Kabupaten Takalar. Hasil deteksi dengan MPCR pada pembenihan udang disajikan pada Gambar 2. Primer yang digunakan tersebut, produk PCR untuk virus MBV

dan IHHNV yang terbaca pada masing-masing 261 bp dan 302 bp nampak berimpit dengan pita yang cukup tebal. Untuk membuktikan bahwa ada dua jenis virus yang teramplifikasi, juga dilakukan PCR tunggal secara terpisah untuk mendeteksi masing-masing virus tersebut, dan hasilnya menunjukkan bahwa kedua virus tersebut dapat terdeteksi.



Gambar 2. Elektroforegram sampel benih udang windu dari pembenihan Kabupaten Takalar Sulawesi Selatan. Line 1-11 adalah sampel benih. Line 3 adalah kontrol negatif.

Prevalensi

Deteksi virus penyakit kerdil udang windu dengan M-PCR menunjukkan bahwa virus penyakit kerdil udang windu yaitu MBV, IHHNV dan HPV terdeteksi pada benih udang windu di pembenihan Kabupaten Takalar dengan tingkat prevalensi masing-masing berkisar 30-100% untuk MBV, 20-100% untuk IHHNV dan 20-70% untuk HPV (Tabel 1). Tingkat prevalensi tertinggi ditemukan pada pembenihan D dengan tingkat prevalensi mencapai 100% untuk MBV dan IHHNV dan 70% untuk HPV. Tingginya tingkat prevalensi infeksi oleh virus juga telah dilaporkan oleh beberapa peneliti lainnya. Di India telah dilaporkan

tingkat prevalensi virus MBV pada benih udang berkisar 34-39% (Uma *et al.*, 2005). Umesha *et al.* (2003) melaporkan bahwa tingkat prevalensi HPV pada benih udang windu mencapai 34% dan MBV mencapai 71% dari pembenihan di India.

Keberadaan ketiga jenis virus dengan prevalensi tinggi menunjukkan tingginya kemungkinan sumber infeksi berasal dari benih dan kondisi ini merupakan ancaman usaha budidaya udang windu di tambak, tanpa proses seleksi benih secara ketat. Selama ini, proses seleksi benih yang dilakukan oleh petani terutama hanya ditujukan untuk infeksi WSSV saja, sedangkan deteksi terhadap infeksi oleh virus-virus lainnya termasuk IHHNV, MBV dan HPV belum pernah dilakukan di Sulawesi Selatan. Keberadaan virus di pembenihan sangat terkait dengan tingkat keberadaan virus dari induk. Hasil penelitian menunjukkan bahwa induk dapat terinfeksi oleh virus dengan tingkat prevalensi yang tinggi dari alam yaitu berkisar antara 25-60% dari perairan pantai India (Uma, *et al.*, 2005). Penelitian tingkat infeksi virus MBV dan WSSV telah dilaporkan oleh Anshary *et al.* (2010) dari perairan pantai Sulawesi Selatan.

Penyakit udang kerdil yang terjadi di tambak salah satunya dapat disebabkan oleh benur udang yang telah terinfeksi di pembenihan karena induknya yang terinfeksi dan selanjutnya menimbulkan penyakit setelah dipelihara di tambak sebagaimana telah dilaporkan oleh Uma *et al.* (2005) dari Induk yang ditangkap di Perairan pantai India. 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. Catap & Travina (2005) menyatakan bahwa penyebaran virus dapat terjadi melalui dua cara yaitu secara vertikal maupun secara horizontal. Penyebaran virus secara vertikal terjadi akibat induk udang yang terinfeksi selanjutnya menularkannya pada larva udang, sebagaimana terjadi pada virus

Tabel 1. Prevalensi MBV, IHHNV dan HPV pada Benih Udang Windu Di Kabupaten Takalar

Pembenihan	Jumlah sampel (ekor)	Positif MBV	Prevalensi MBV (%)	Positif IHHNV	Prevalensi IHHNV (%)	Positif HPV	Prevalensi HPV (%)
A	10	3	30	7	70	5	50
B	10	-	-	2	20	2	20
C	10	5	50	5	50	3	30
D	10	10	100	10	100	7	70
E	10	7	70	7	70	5	50
Rata-rata			50		62		44

Keterangan: A, B, C, D dan E adalah lokasi sampling benih udang di Kabupaten Takalar

MBV, IHHNV, 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.

Tingkat prevalensi virus yang tinggi pada beberapa pembenihan udang sebagaimana tercantum dalam Table 1 menjadi indikator bahwa penyakit kerdil yang menurunkan produksi udang windu di tambak Sulawesi Selatan, salah satunya berasal dari benih yang ditebar. Penyakit udang kerdil 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 Sul-Sel belum pernah dilaporkan. Penyakit udang kerdil ini merupakan salah satu penyebab penurunan produksi udang windu selain infeksi WSSV.

Di Thailand kerugian akibat penyakit udang kerdil 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). Di Sulawesi Selatan diduga mengalami kerugian finansial yang kurang lebih sama sebagaimana yang telah dialami oleh beberapa Negara lain.

Monodon Baculovirus (MBV) sebagai salah jenis virus yang dikenal dapat menyebabkan penyakit udang kerdil (Chayaburakul, *et al.*, 2004). 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 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). Infeksi virus MBV dapat ditemukan pada stadia zoea, mysis dan post larva, dengan tingkat infeksi tertinggi ditemukan pada stadia post larva yaitu berkisar 91% (Ramasamy *et al.*, 2000). Tanda-tanda udang yang terinfeksi virus MBV adalah pertumbuhan lambat, hilang nafsu makan,

warna menjadi gelap, banyak organisme penempel yang tumbuh pada udang, infeksi bakteri meningkat (*shell diseases*), dan terjadi kematian.

Selain virus MBV, jenis virus lain yang bertanggung jawab terhadap penyakit kerdil adalah virus IHHNV dan HPV. 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 adalah 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 IHHNV 46% pada *P. stylirostris* alam pada teluk California. Pantoja (1999) IHHNV bertanggungjawab terhadap mortalitas populasi udang alam *P. stylirostris* di Mexico, Panama dan Ecuador. Serangan HPV dengan agen-agen penyakit lainnya ini menyebabkan kematian tinggi pada tahap larva, juvenil, dan dalam 4 minggu dapat mencapai 50-100% (Lightner *et al.*, 1993). Oleh karena HPV jarang teramati sendirian dalam serangan penyakit yang mematikan, kematian akibat HPV sulit ditentukan dengan teknik konvensional (Lightner *et al.*, 1993).

Deteksi dini terhadap benur yang akan ditebar di tambak adalah salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mencegah penyebaran virus kerdil ini di tambak. Aplikasi multipleks PCR pada penelitian ini membuktikan bahwa deteksi secara simultan terhadap MBV, IHHNV dan HPV dapat dilakukan. Dari segi persyaratan primer, ketiga pasang primer tersebut telah memenuhi syarat seperti memiliki suhu *annealing* yang mirip atau sama, memiliki kandungan GC dan suhu *melting* yang hampir sama yaitu primer MBV F&R adalah 50&50°C, primer IHHNV R&F 52&50°C dan primer HPV F&R adalah 52&52°C, tidak memiliki nukleotida yang berulang secara berurutan 3 kali dan tidak memiliki komplement dengan primer lainnya, panjang nukleotida umumnya berkisar 23 – 28 nukleotida dan tidak membentuk primer dimer. Deteksi dengan M-PCR dapat selesai dalam waktu 24 jam atau kurang, menghemat waktu, biaya dan bahan jika dibandingkan dengan ELISA dan monopleks PCR.

Kesimpulan dan Saran

1. Multipleks PCR dengan primer spesifik dan suhu *annealing* yang telah dioptimasi yaitu 59°C dapat mengamplifikasi DNA MBV, IHHNV dan HPV

masing-masing pada ukuran 261, 302 dan 595 bp.

2. Prevalensi virus MBV, IHHNV dan HPV pada benih udang windu di Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan masing-masing sebesar 50%, 62% dan 44%.

Diharapkan hasil penelitian ini bisa dipakai sebagai metode deteksi virus penyakit kerdil (MBV, IHHNV dan HPV) baik untuk benih maupun untuk udang dewasa. Selain itu, diharapkan adanya kebijakan dari pemerintah untuk sertifikasi benih bebas MBV, IHHNV dan HPV selain kebijakan yang sudah ada yaitu sertifikasi benih bebas WSSV karena keberadaan ketiga jenis virus yang berasosiasi dengan penyakit kerdil pada benih udang windu Takalar mengindikasikan adanya potensi penyebaran dan peledakan populasi virus tersebut di tambak di Sulawesi Selatan.

Daftar Pustaka

- Anshary, H., A. Rantetondok, Sriwulan & M. Bunga. 2005. Analisis Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap berjangkitnya WSSV pada udang windu di pertambakan Sulawesi Selatan. Laporan Kerjasama Penelitian antara Badan Penelitian dan Pengembangan Daerah Propinsi Sulawesi Selatan dengan Lembaga Penelitian UNHAS. 90 p.
- Anshary, H., S. Gossalam, A. Tahir & Sriwulan. 2010. Seleksi induk udang windu (*Penaeus monodon*) bebas virus WSSV dan MBV dari berbagai lokasi potensial di Sulawesi Selatan. Laporan Penelitian Hibah Kompetitif Sesuai Prioritas Nasional, DIKTI. 52 p.
- Catap, E.S. & R.D. Travina. 2005. Experimental transmission of Hepatopancreatic Parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* postlarvae. In P. Walker, R. Lester and M.G. Bondad-Reantaso (eds). Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila. Diseases in Asian Aquaculture. 5:415-420.
- Chayaburakul, K., G. Nash, P. Pratanpipat, S. Sriurairatana & B. Withyachumnarnkul. 2004. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. Dis Aquat Org. 60: 89–96.
- Lightner, D.V., R.M. Redman, D.W. Moore & M.A. Park. 2003. Development and applications of a simple and rapid diagnostic method for studying on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. Aquaculture 116: 15-23.
- Loffert, D., S. Karger, G. Twieling, V. Ulber & J. Kong. 1999. Optimization of multiplex PCR. Qiagen Issue No.2. 4 p.
- Madeali, M.I., M. Atmomarsono & E. Susianingsih. 2000. Diagnosis penyakit viral secara uji ELISA dan histopatologis terhadap induk udang windu yang digunakan oleh panti perbenihan di Sulawesi Selatan. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Perikanan Tahun 1999/2000. P 153-157.
- Manivannan, S., S.K. Otta, I. Karunasagar & I. Karunasagar. 2002. Multiple viral infection in *Penaeus monodon* shrimp postlarvae in an Indian hatchery. Dis Aquat Org. 48:233–236.
- Pantoja, C.R. & D.V. Lightner. 2000. A non-destructive method based on the polymerase chain reaction for detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 39: 177-182.
- Ramasamy, P., G.P Brennan & R. Jayakumar. 1995. A record and prevalence of *Monodon baculovirus* from post-larval *Penaeus monodon* in Madras, India. Aquaculture. 130: 129-135.
- Ramasamy, P., P.R. Rajan, V. Purushothaman & G.P. Brennan. 2000. Ultrastructure and pathogenesis of *Monodon baculovirus* (Pm SNPV) in cultured larvae and natural brooders of *Penaeus monodon*. Aquaculture. 184: 45-66.
- Surachetpong, W., B.T. Poulos, K.F.J. Tang & D.V. Lightner. 2005. Improvement of PCR method for the detection of monodon baculovirus (MBV) in penaeid shrimp. Aquaculture. 249: 69–75.
- Tang, K.F.J., C.R. Pantoja & D.V. Lightner. 2008. Nucleotide sequence of a Madagascar hepatopancreatic parvovirus (HPV) and comparison of genetic variation among geographic isolates. Dis. Aquat. Org. 80: 105-112.
- Uma, A., A. Koteeswaran, I. Karunasagar & I. Karunasagar. 2005. Prevalence of white spot syndrome virus and monodon baculovirus in *Penaeus monodon* broodstock and postlarvae from hatcheries in southeast coast of India. Current Science, 89: 1619-1622.
- Umesha, R.K., A. Uma, S.K. Otta, I. Karunasagar & I. Karunasaga. 2003. Detection by PCR of hepatopancreatic parvovirus (HPV) and other viruses in pembenihan-reared *Penaeus*

monodon postlarvae. *Dis Aquat Org.* 57: 141-146.

Yang, B., X-L. Song, J. Huang, C-Y. Shi, Q-H. Liu, & L. Liu. 2006. A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal

and haematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *J. Fish Dis.* 29: 301-305.

Yanto, H. 2006. Diagnosa dan identifikasi penyakit udang asal tambak intensif dan panti benih di Kalimantan Barat. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi.* 7(1): 17-32.