PREVALENSI, INTENSITAS, DAN TRANSMISI *WHITE SPOT SYNDROME VIRUS* (WSSV) PADA BUDI DAYA UDANG WINDU, *Penaeus monodon*

Muliani, Andi Parenrengi, Sulaeman, dan Muharijadi Atmomarsono

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat prevalensi, intensitas, dan transmisi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada budi daya udang windu, *Penaeus monodon*. Berbagai jenis sampel dikoleksi dari tahapan budi daya yang berbeda yakni dari perbenihan meliputi: induk, telur, pakan induk, artemia, larva, dan air pemeliharaan sedangkan dari pembesaran di tambak meliputi: yuwana udang windu, air, sedimen, pakan alami, pakan buatan, udang-udang liar, jembret, trisipan, kepiting liar, moluska liar, lumut, dan ikan-ikan liar yang hidup di dalam tambak. Sampel-sampel tersebut diekstraksi untuk mendapatkan DNA total dengan menggunakan kit ekstraksi DNA kemudian deteksi WSSV dilakukan dengan menggunakan kit amplifikasi spesifik WSSV (*IQ 2000™ WSSV Detection and Prevention System*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 136 sampel yang diamati, 37 di antaranya atau sekitar 27,2% terserang penyakit WSSV dengan tingkat prevalensi tertinggi pada artemia (100%), kemudian disusul oleh ikan-ikan liar yang hidup di tambak (80%) dan udang yang dipelihara di tambak (47,6%). Intensitas serangan WSSV tertinggi dijumpai pada udang yang dibudidayakan di tambak. Transmisi WSSV pada kasus kematian udang di tambak terjadi secara horizontal.

ABSTRACT: ***Prevalence, intensity, and transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in tiger shrimp, Penaeus monodon culture. By: Muliani, Andi Parenrengi, Sulaeman, and Muharijadi Atmomarsono***

The objective of the research was to know prevalence, intensity, and transmission of WSSV in tiger shrimp culture. Numbers of samples were collected from different rearing levels i.e. from hatchery including: brood stock, brood stock feed, egg, brine shrimp larvae, shrimp larvae, water and from rearing ponds including: cultured shrimp, pond water, pond sediment, natural food, commercial feed, wild shrimp, ***Mesopodopsis*** *sp., wild crabs, mollusk, algae, and wild fish. The DNA of samples was extracted using DNA extraction kit before the WSSV disease was detected by the use of WSSV specific sequence amplification kit (IQ 2000™ WSSV Detection and Prevention System). The result showed that, among 136 samples investigated, 37 samples (27.2%) were infected by WSSV, brine shrimp was the highest prevalence, (100%), followed by the wild fish (80%) and pond cultured shrimp (47.6%). The highest intensity of WSSV was found in the cultured shrimp. WSSV in tiger shrimp diseases outbreak in pond culture is transmitted horizontally.*

KEYWORDS: ***prevalence, intensity, transmission, WSSV, tiger shrimp***

PENDAHULUAN

Kematian udang windu di tambak-tambak pembesaran akibat infeksi virus semakin merebak dan menyebabkan kegiatan budi daya udang windu di sebagian besar pertambakan di Indonesia terhenti dalam beberapa tahun terakhir. Serangan virus pada budi daya udang tidak hanya terjadi di Indonesia, tetapi juga di negara-negara lain seperti Thailand (Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Chanratchakool & Limsuwan, 1998; Sukhumsirichart *et al.*, 1998), Taiwan (Kou *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1998), Filipina (Albaladejo *et al.*, 1998; Loh *et al.*, 1998), India (Karunasagar, 2003), Australia (Spann *et al.*, 1995), Jepang (Itami *et al.*, 1998; Kono *et al.*, 2004; Maeda *et al.*, 2004.), dan Amerika (Dhar *et al.*, 2001). Albaladejo *et al.* (1998) melaporkan bahwa sebanyak 250 ekor sampel udang dari beberapa daerah pertambakan di Filipina, dengan metode *Enzyme Immunoassay* (EIA) dideteksi 41 sampel di antaranya positif terserang *Yellow Head Virus* (YHV). Beberapa jenis virus (*Baculo-like viruses*) ditemukan menyerang udang di Taiwan dan Jepang, sehingga menurunkan produksi udang di kedua negara tersebut. Di Taiwan misalnya, produksi udang windu menurun dari 90.000 MT pada tahun 1987 menjadi 20.000 MT pada tahun 1989, dan sampai sekarang produksi udang di negara tersebut belum pulih kembali (Maeda, 1999).

Peneliti pada Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros

Virus merupakan agen penyakit terkecil (diameter 20—30 nm) dan merupakan molekul sel tunggal yang terdiri atas DNA atau RNA dan hanya bisa menggandakan diri pada sel hidup. Selama dalam siklus penggandaan, sejumlah asam nukleat dan mantel (*coat*) protein diproduksi. Mantel protein yang terbentuk selanjutnya bergabung menjadi satu dan dapat melekat serta menembus sel yang lain (Maeda, 1999). Beberapa jenis virus yang telah diketahui menginfeksi udang di antaranya adalah *White Spot Syndrome Virus* (WSSV), *Monodon Baculo Virus* (MBV), *Baculoviral Midgut Necrosis Virus* (BMNV), *Infectious Hypodermal and Haemotophoeitic Necrosis Virus* (IHHNV), *Spawner Mortality Virus* (SMV), dan *Hepatopancreatic Parvo-like Virus* (HPV) (Walker & Cowley, 2003). WSSV dalam bahasa Indonesia dikenal juga dengan penyakit bintik putih.

Berdasarkan informasi dari beberapa petani tambak, serangan penyakit bintik putih pada udang windu terjadi pada udang berumur 40—70 hari pemeliharaan. Madeali *et al.* (2000) melaporkan bahwa berdasarkan hasil deteksi penyakit virus menggunakan poliklonal antibodi dengan teknik ELISA dan secara histopatologi dari 51 ekor induk udang yang dikumpulkan dari beberapa panti perbenihan, 27,45% di antaranya positif terinfeksi WSSV, MBV, HPV. Dari hasil tersebut diduga virus tersebut memegang andil yang cukup besar terhadap timbulnya penyakit pada panti-panti perbenihan dan di tambak-tambak pembesaran.

WSSV merupakan salah satu jenis virus yang paling banyak menimbulkan kematian udang di tambak (Hulten *et al.*, 2000; Anonimus, 2001; Peng *et al.*, 2001; dan Li *et al.*, 2003). Virus ini dapat menyebabkan kematian pada udang windu sebesar 100% dalam waktu 2—7 hari (Chang *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1998) dengan tanda-tanda morfologi terdapat bintik putih di seluruh karapas.

Demikian halnya pada panti perbenihan, selain serangan bakteri *Vibrio*, kini para pengelola panti perbenihan diresahkan oleh adanya serangan penyakit bintik putih (WSSV) pada benur. Meskipun di panti perbenihan jarang terjadi peledakan serangan dari jenis virus ini, namun efeknya dapat dilihat setelah ditebar di tambak. Hasil diagnosis yang dilakukan Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau (BRPBAP) menunjukkan adanya indikasi bahwa serangan virus yang tejadi di tambak pembesaran berkaitan erat dengan kondisi benur yang digunakan yang tentunya juga berkaitan dengan kondisi induk yang digunakan (Madeali *et al.*, 2000).

Walaupun peledakan penyakit pada suatu sistem usaha budi daya udang windu dianggap terkait satu sama lain, namun informasi secara ilmiah tentang hal ini belum banyak tersedia. Hal ini disebabkan mekanisme penularan suatu jenis patogen pada sistem budi daya udang windu belum banyak dikaji, sehingga model transmisi suatu jenis penyakit belum diketahui. Oleh karena itu, penelitian ini dimaksudkan selain untuk melihat tingkat prevalensi dan intensitas serangan WSSV juga akan menelaah mekanisme transmisinya pada budi daya udang windu.

BAHAN DAN METODE

Pengumpulan Sampel

Pengumpulan sampel untuk deteksi WSSV berasal dari beberapa panti perbenihan dan pertambakan di Sulawesi Selatan. Sampel yang dikumpulkan meliputi induk udang, pakan induk, artemia, larva, air pemeliharaan, udang yang dipelihara di tambak, air tambak, sedimen tambak, pakan alami, pakan buatan, lumut, dan biota liar yang hidup di tambak (udang liar, jembret, trisipan, kepiting, moluska, dan ikan-ikan liar). Sampel-sampel dikumpulkan menggunakan botol sampel yang telah diisi alkohol 70% dan selanjutnya dibawa ke laboratorium BRPBAP, Maros untuk proses lebih lanjut.

Ekstraksi DNA

DNA dari sampel udang budi daya, udang liar, dan kepiting liar diekstraksi dari kaki renang, kaki jalan, karapas, insang, dan ekor. Untuk ikan-ikan liar diambil insang, organ dalam dan sirip-sirip, sedangkan untuk benur di bawah PL-12 diambil utuh. Sekitar 10 mg dari sampel tersebut dimasukkan ke dalam tabung mikro steril volume 1,5 mL dan DNA diekstraksi menurut Anonymous (2002). Sampel-sampel lainnya yang berupa organisme liar seperti ikan liar, trisipan, sedimen, pakan alami, dan moluska, ekstraksi DNA dilakukan dengan metode fenol (Yuasa *et al.*, 2001) dengan sedikit modifikasi sesuai jenis sampel yang diekstrak.

Deteksi WSSV dengan PCR

Virus WSSV dideteksi dengan menggunakan kit spesifik untuk WSSV, "*IQ 2000™ WSSV Detection and Prevention System*" dengan kondisi reaksi "first PCR" 94°C selama 30 detik; 62°C selama 30 detik; 72°C selama 30 detik sebanyak 5 siklus, kemudian 94°C selama 15 detik; 62°C selama 15 detik; 72°C selama 20 detik, sebanyak 15 siklus, selanjutnya siklus terakhir adalah 72°C selama 30 detik; 20°C selama 30 detik. Sedangkan tahap "nested PCR" adalah 94°C selama 20 detik; 62°C selama 20 detik; 72°C selama 30 detik; sebanyak 25 siklus, dan siklus terakhir adalah 72°C selama 30 detik; 20°C selama 30 detik (Anonim, 2002).

Untuk mengetahui apakah suatu sampel terinfeksi dengan WSSV atau tidak, maka hasil PCR sebanyak 5 mL dalam 5 mL *loading dye* dilarikan dalam gel elektroforesis mini bersama-sama dengan DNA marker, kontrol positif, dan kontrol negatif (*IQ 2000™ WSSV Detection and Prevention System*). Konsentrasi gel agarose yang digunakan adalah 1,5%—2% dalam *buffer* 1XTAE dengan kekuatan arus 55 volt selama 3 jam. Setelah elektroforesis selesai gel direndam dalam larutan ethidium bromida (konsentrasi 1 mg/mL) selama 10 menit. Gel kemudian dicuci dengan merendam dalam akuades selama 15 sampai 20 menit. Untuk mengetahui ada tidaknya infeksi WSSV terhadap sampel-sampel yang dideteksi maka gel hasil elektroforesis diamati menggunakan *gel documentation* dengan bantuan sinar UV dan sekaligus dilakukan dokumentasi untuk keperluan pelaporan (Suwanto *et al.,* 2000; Anonymous, 2002; Sulandari & Zei, 2003).

HASIL DAN BAHASAN

Pengamatan WSSV pada Udang secara Morfologi

Hasil pengamatan secara visual terhadap beberapa sampel udang menunjukkan adanya serangan WSSV yang ditandai adanya bintik putih di seluruh permukaan karapas (Gambar 1). Bintik putih pada permukaan tubuh udang yang merupakan tanda-tanda morfologi adanya infeksi WSSV pada udang (Chang *et al*., 1998; Hulten *et al*., 2000; dan Rodriguez *et al*., 2003), selanjutnya dikonfirmasi dengan hasil deteksi menggunakan PCR. Hasil deteksi WSSV menunjukkan bahwa pada umumnya udang yang di permukaan tubuhnya terdapat bintik putih memperlihatkan adanya serangan virus parah (*level* 3) berdasarkan perbandingan dengan pita-pita DNA pada sampel positif dari *IQ 2000 system.* Sampel udang dengan kategori serangan WSSV parah tersebut umumnya diambil dari tambak Maranak (Maros), di mana pada waktu pengambilan sampel terjadi kematian udang secara massal.

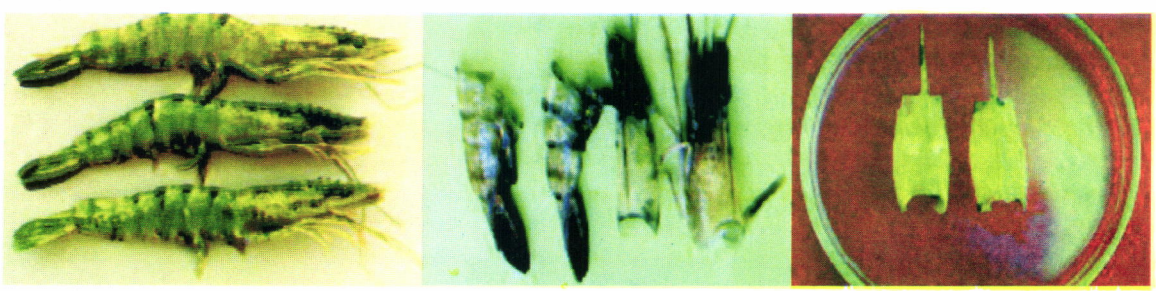
Tingkat Prevalensi Serangan WSSV

Dari 136 sampel yang diamati, 37 (27,2%) di antaranya positif terserang WSSV dengan tingkat prevalensi masing-masing berkisar antara 0%—100% (Tabel 1). Tingkat prevalensi tertinggi setelah larva artemia dan ikan liar (80%) adalah udang yang dipelihara di tambak yakni 47,6%. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan yang didapatkan di India oleh Vaseeharan *et al*. (2003) yang telah melakukan deteksi WSSV dengan metode *Single Step PCR* terhadap 630 sampel yang terdiri atas 280 post larva dan 350 sampel udang umur 40—60 hari, dan 53% positif terinfeksi WSSV. Dengan metode yang sama mereka melakukan deteksi terhadap 419 sampel yang terdiri atas induk udang, *Penaeus monodon*, larva *Penaeus indicus*, *Metapenaeus* spp., *Scylla serata*, dan *Squilla mantis* yang ditangkap dari alam, dan 23% di antaranya juga positif terinfeksi oleh WSSV.

Adanya WSSV yang terdeteksi pada artemia sebagai salah satu pakan alami yang biasa digunakan di panti perbenihan, merupakan salah satu indikasi semakin beragam dan meluasnya inang WSSV. Hal ini akan lebih memudahkan penyebaran WSSV di panti perbenihan dan pada akhirnya akan menyebar ke tambak pembesaran. Demikian pula halnya dengan ikan-ikan liar yang hidup di tambak diduga memegang andil yang cukup besar dalam transmisi penyakit WSSV yang terjadi pada budi daya udang windu. Selain ikan-ikan liar, moluska, dan udang liar juga diduga memegang andil terhadap penyebaran WSSV di tambak, terlihat dari tingkat prevalensi WSSV pada kedua organisme tersebut cukup tinggi yaitu masing-masing 30% dan 28,6%.

Tingkat Intensitas Serangan WSSV

Dari 37 sampel yang positif terserang WSSV, secara deskriptif terlihat bahwa 13 sampel tergolong parah (+++), 10 sampel tergolong sedang (++), dan 14 sampel tergolong ringan (+) (Tabel 2) dengan perkiraan jumlah DNA WSSV *template* pada reaksi RCR masing 10^3, 10^2, dan 10^1 *copy* (Peng *et al.,* 2001).



Gambar 1. Penampakan udang windu dan karapas udang windu yang terserang WSSV
Figure 1. Appearances of tiger shrimp and their carapaces infected by White Spot Syndrome Virus (WSSV)

Penampakan pita-pita DNA WSSV pada beberapa sampel yang positif dan negatif WSSV dibandingkan dengan kontrol positif, kontrol negatif, dan DNA marker setelah proses PCR dengan metode *Single-step nested PCR* menggunakan *WSSV spesific sequence amplification kit* dari produk *IQ2000 system* disajikan pada Gambar 2.

Model Transmisi WSSV pada Budi Daya Udang Windu

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penyebaran dan transmisi WSSV pada budi daya udang windu cenderung terjadi secara horizontal. Hal ini dapat dilihat dari keragaman organisme yang terinfeksi oleh WSSV.

Pada salah satu kasus kematian udang windu di tambak, hasil deteksi WSSV pada induk udang dan pasca larva yang digunakan tidak ditemukan adanya infeksi WSSV, namun setelah ditelusuri sampai ke tambak hingga udang berumur 40 hari ternyata ditemukan adanya infeksi WSSV pada udang windu. Demikian pula pada organisme liar seperti ikan liar, kepiting liar, udang liar, dan dari jenis moluska yang hidup di tambak tersebut juga ditemukan adanya infeksi WSSV. Hal ini menunjukkan bahwa WSSV menyebar secara horizontal melalui organisme liar yang ada di tambak.

Hal ini juga dijumpai pada kasus kematian udang di Maros, di mana setelah dideteksi dengan metode yang sama sedikitnya ada 10 sampel yang positif terinfeksi oleh WSSV bahkan dalam hal ini serangannya tergolong parah (Tabel 2), padahal deteksi WSSV terhadap benur yang digunakan yang dilakukan sebelum penebaran menunjukkan tidak adanya gejala-gejala infeksi WSSV. Hal yang serupa dilaporkan oleh Withyachumnarnkul (1999) bahwa larva udang windu yang pada awalnya dideteksi dengan PCR negatif terinfeksi WSSV setelah dipelihara di tambak selama kurang lebih satu bulan positif terinfeksi WSSV.

Pada kasus yang lain dalam waktu yang sama deteksi WSSV pada induk udang ditemukan adanya infeksi WSSV dan tergolong parah (+++) namun dengan metode yang sama, pada benurnya tidak ditemukan adanya infeksi WSSV. Hal ini diduga bahwa WSSV pada induk tersebut merupakan hasil transmisi secara horizontal dari media pemeliharaan induk.

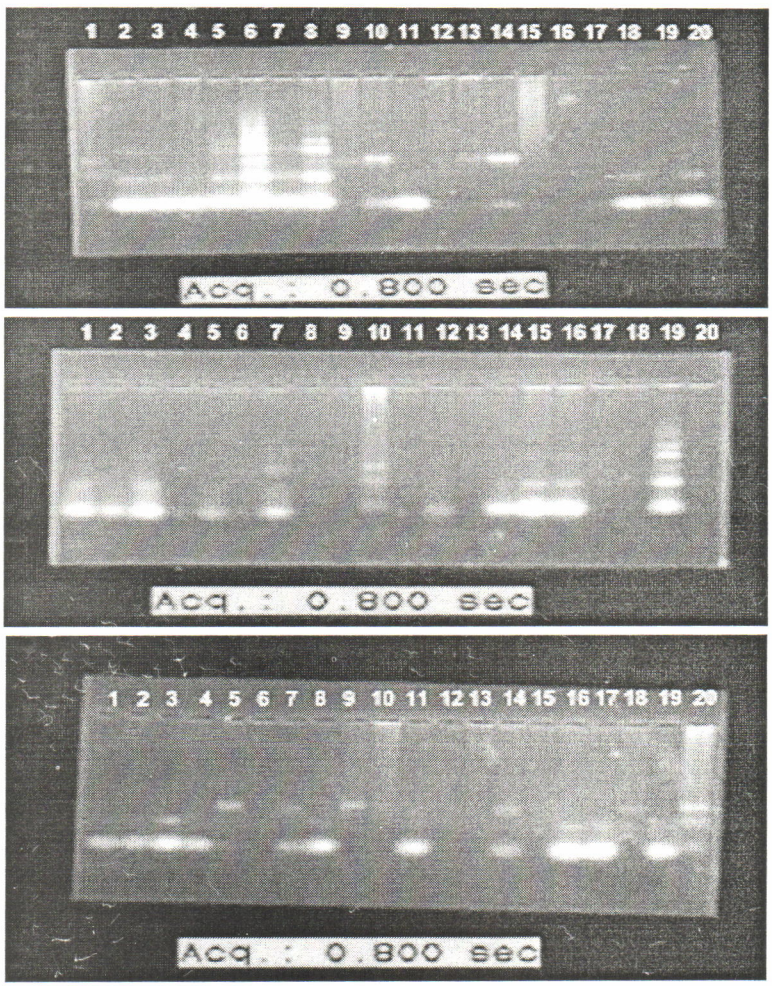
Dari kasus-kasus tersebut dapat diketahui bahwa penyebaran dan transmisi WSSV pada udang windu terjadi secara horizontal, namun demikian transmisi secara vertikal pun masih memungkinkan mengingat tidak adanya standardisasi jumlah terkecil partikel virus yang dapat dideteksi dan terbatasnya sensitivitas oleh suatu metode, termasuk metode yang digunakan dalam penelitian ini. Menurut Shariff *et al.* (2003), ada beberapa hal yang sering menyebabkan adanya kesalahan dalam menginterpretasi hasil deteksi WSSV menggunakan PCR di antaranya adalah tidak adanya standar yang baku dan terbatasnya sensitivitas prosedur-prosedur yang digunakan. Seperti halnya dilaporkan oleh Karunasagar (2003) bahwa terdapat perbedaan antara hasil deteksi WSSV pada larva udang windu dengan menggunakan teknik *Single-Step*

Tabel 1. Prevalensi serangan WSSV (%) pada masing-masing sampel yang dideteksi dengan metode *PCR*
Table 1. The prevalence (%) of WSSV infections of different samples detected by PCR method

Jenis sampel *Kinds of sample*	Jumlah sampel *Number of samples*	Jumlah sampel yang positif WSSV *Number of sample infected WSSV*	Prevalensi (%)/ *Prevalence (%)*
Induk udang (*Shrimp broadstock*)	22	2	9.1
Pakan induk (*Broadstock feed*)	2	0	0.0
Telur (*Egg*)	2	0	0.0
Pascalarva (*Postlarvae*)	10	0	0.0
Pakan pascalarva (*Postlarvae feed*)	9	0	0.0
Artemia (*Brineshrimp*)	2	2	100.0
Udang PL45 (*PL45 shrimp*)	2	0	0.0
Udang/40 hari (*40-day shrimp*)	42	20	47.6
Udang liar (*Wild shrimp*)	7	2	28.6
Ikan liar (*Wild fish*)	5	4	80.0
Pakan alami (*Natural food*)	16	3	18.7
Kepiting liar (*Wild crab*)	5	1	20.0
Moluska (*Mollusc*)	10	3	30.0
Sedimen tambak (*Pond sediment*)	2	0	0.0

PCR dengan *Double-Step PCR*, di mana pada *single-Step PCR* hanya 5% yang positif terinfeksi WSSV sedangkan dengan *Double-Step PCR*, 48% larva udang terinfeksi WSSV. Hal ini menunjukkan bahwa hasil deteksi WSSV dengan PCR sangat ditentukan oleh sensitivitas metode yang digunakan.

Untuk lebih memastikan model penyebaran dan transmisi penyakit WSSV pada budi daya udang windu ada dua hal yang bisa dilakukan yaitu melakukan sekuensing DNA WSSV yang menginfeksi sampel sehingga dapat dipastikan bahwa WSSV yang terdeteksi pada suatu jenis sampel identik atau tidak dengan yang terdeteksi pada sampel-sampel lain. Hal ini diperlukan karena WSSV yang menyerang udang sudah banyak mengalami mutasi gen sehingga banyak sekali strain-strain baru yang terdeteksi.



Gambar 2. Beberapa foto gel hasil elektroforesis yang menampilkan hasil deteksi WSSV pada beberapa sampel dengan teknik PCR A= nomor sumur 10: Marker, 1—3: kontrol positif, 4: kontrol, negatif 5; 7,11—12; 14—16; dan 19: sampel yang positif terinfeksi, 6, 8—9; 11; 13; 17—18; dan 20: sampel yang tidak terinfeksi. B= nomor sumur 1—3: kontrol positif, 18: kontrol, negatif, 20: marker, 4; 7—8; 11; 14; 16—17; dan 19: sampel yang positif terinfeksi, dan 5—6; 9—10; 12—13; dan 15: sampel yang tidak terinfeksi. C= nomor sumur 1: marker, 18—20: kontrol positif, 17: kontrol,negatif, 2—8; 10—11; dan 14: sampel yang positif terinfeksi, dan 9; 12—13; 15—16: sampel yang tidak terinfeksi

Figure 2. Photos of electrophoresis gel visualize the detection of WSSV in several samples by PCR method A= well num. 10: Marker, 1—3: Positive control, 4: negatve control, 5, 7.11—12, 14—16, and 19: positively infected samples) 6, 8—9, 11, 13, 17—18, and 20: uninfected samples. B= well num. 1—3: positive control, 18: Negative control, 20: marker, 4, 7—8, 11, 14, 16—17, and 19: positively infected Samples, and 5—6, 9—10, 12—13, and 15: uninfected samples.C= well num. 1: marker, 18—20: positive control, 17: negative control, 2—8, 10—11, and 14: positively infected samples, and 9, 12—13, 15—16: uninfected samples

Tabel 2. Intensitas serangan WSSV (%) pada masing-masing sampel yang dideteksi dengan metode PCR
Table 2. Intesity of WSSV in each sample detected by PCR method

Jenis sampel *Kinds of sample*	Organ yang dideteksi *Detected organs*	Asal sampel *Source*	Jumlah sampel *Number of samples*	Intensitas *Intesity*
Induk udang *Broodstock*	Campuran antara karapas, insang, kaki renang, dan kaki jalan	Barru	2	+++
Udang budi daya *Cultured shrimp*	Campuran antara karapas, insang, kaki renang, dan kaki jalan	Malili	5	+++ = 16.7% ++ = 33.3% + = 50%
		Mamuju	1	++
		Maros	14	+++ = 71.4% ++ = 21.4% + = 7.2%
Kepiting liar *Wild crab*	Campuran kaki dan insang	Malili	1	+
Ikan liar (*wild fish*)	Campuran insang dan sirip	Malili	2	+
		Mamuju	2	+ = 50% ++ = 50%
Udang liar *wild shrimp*	Campuran antara karapas, insang, kaki renang, dan kaki	Malili	2	++ = 50% + = 50%
Plankton (*Plankton*)	Sel utuh	Malili	2	+
Moluska *Mollusc*	Isi	Mamuju	2	+ + = 50% + = 50%
Lumut (*Algae*)	Lumut	Maros	1	+
Artemia (*Brine shrimp*)	Sel utuh	Takalar	2	++

Sedangkan yang kedua adalah melakukan standardisasi jumlah terkecil partikel virus yang dapat terdeteksi pada penggunaan berbagai macam metode. Menurut Adams (2003), standardisasi prosedur sangat penting dilakukan karena akan menentukan ketepatan hasil deteksi PCR.

KESIMPULAN

Prevalensi serangan WSSV pada usaha budi daya udang windu di beberapa lokasi di Sulawesi Selatan sebesar 27,2% dengan intensitas serangan tertinggi pada udang yang dibudidayakan di tambak. Trisipan, ikan-ikan liar, kepiting, dan udang liar merupakan pembawa (*carrier*) WSSV bagi udang budi daya. Transmisi WSSV pada kasus kematian udang di tambak Maranak, Maros terjadi secara horizontal.

SARAN

Selain pemilihan benur yang bebas WSSV, penerapan *biosecurity* pada budi daya udang windu perlu diperketat mengingat organisme liar yang hidup di tambak merupakan agen pembawa WSSV sehingga dapat menularkan virus tersebut pada udang.

DAFTAR PUSTAKA

Adams, A. 2003. *Rapid Detection and Identification of Fish Pathogens*. Institute of Aquaculture, University of Stirling FK9 4LA, Scotland, UK, 3 pp.

Albaladejo, J.D., L.M. Tapay, V.P. Migo, C.G. Alfafara, J.R. Somga, S.L. Mayo, R.C. Miranda, K. Natividad, F.O. Magbanua, T. Itami, M. Matsumura, E.C.B. Nadala, and P.C. Loh. 1998. Screening for shrimp viruses in the Philippines. *In* Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology. BIOTEC*. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 252—253.

Anonymous. 2001. Comments on bio security and shrimp farming. *Aquaculture Magazine*. 27 (4), 5 pp.

Anonymous. 2002. *Instruction Manual*. Detection and Prevention System for White Spot Syndrom Virus (WSSV). Taiwan, 18 pp.

Chang, P.S., C. Hsiao-Chao, and W. Yu-Chi. 1998. Detection of white spot syndrome assosiated

baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobster by in situ hyridiztion. *Aquaculture* 164: (233—242).

Chanratchakool, P., and C. Limsuwan. 1998. Application of PCR and Formalin treatment to prevent White Spot Disease in Shrimp. *In* Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology. BIOTEC*. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 287—289.

Dhar, A.K., M.M. Roux, and K.R. Klimpel. 2001. Detection and Quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and White spot Syndrome Virus in shrimp using Real-Time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. of Clinic. Microbiol*, 39: 2,835—2,845.

Hulten, M.C.W.V., W. Goldbach, and J.M. Vlak. 2000. Three fungtion diverged major structural proteins of white spot syndrome virus eveloved by gene duplication. *J. Gen. Virol.*, 81: 2,525—2,529.

Itami, T, M. Maeda, N. Suzuki, K. Tokushige, A. Nakagawa, O. Henning, M. Kondo, J. Kasornchandra, I. Hirono, T. Aoki, Kusuda, and Y. Takahashi. 1998. Possible prevention of White Spot Syndrome Virus(WSSV) in kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan. *In* Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology. BIOTEC*. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p: 291—295.

Karunasagar, I. 2003. *Application of Polymerase Chain Reaction for Detection of Shrimp Pathogens in India*. Department of Fishery Microbiology, University of Aquacultural Sciences, College of Fisheries, Mangalore-575 002, India, 3 pp.

Kono, T., R. Savan, and T. Itami. 2004. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, 115: 59—65.

Kou, G.H., S.E. Peng, Y.L. Chiu, and C.F. Lo. 1998. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. *In* Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology. BIOTEC*. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 267—271.

Li, Q., F. Yang, J. Zhang, and Y. Chen. 2003. Proteomic analysis of protein that bands specifically to the homologous repeat regions of white spot syndrome virus. *Biol. Pharm. Bull.*, 26: 1,517—1,522.

Lo, C.F., Y.S. Chang, C.T. Cheng, and G.H. Kou. 1998. PCR monitoring of cultured shrimp for White Spot Syndrom Virus (WSSV) infection in growth ponds. *In* Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology. BIOTEC*. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 281—286.

Loh, P.C., E. Cesar, B. Nadala Jr., L.M. Tapay, and Y. Lu. 1998. Recent developments in Immunologically-Based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogen. *In* Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in shrimp biotechnology. BIOTEC*. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 255—259.

Madeali, M.I., M. Atmomarsono, dan E. Susianingsih. 2000. Diagnosis penyakit viral secara Uji ELISA dan histopatologis terhadap induk udang windu yang digunakan oleh panti perbenihan di Sulawesi Selatan. *Dalam* Suparno *et al.* (Ed.). *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Perikanan. Jakarta*, p. 153—157.

Maeda, M. 1999. *Microbial Process in Aquaculture*. National Research Institute of Aquaculture. Nansei, Mie. 516—0193. Japan, 102 pp.

Maeda, M., H. Saitoh, E. Mizuki, T. Itami, and M. Ohba. 2004. Replication of white spot syndrome virus in ovarian primary cultures from the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *J. Virol. Methods*, 116: 89—94.

Peng, S.E., C.F. Lo, S.C. Lin, L.L. Chen, Y.S. Chang, K.F. Liu, M.S., Su, and G.H. Kou. 2001. Performance of WSSV-infected and WSSV-negative *Penaeus monodon* postlarvae in culture ponds. *Dis. Aquat. Org*. 46: 165—172.

Rodriguez, J., B. Bayot, Y. Amano, Panchana, I. de Blas, V. Alday, and J. Calderon. 2003. White spot syndrome virus infection in culture *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *J. Fish Dis.*, 26: 439—450.

Shariff, M., S. Soon, K.L. Lee, and L.T. Tan. 2003. *Practical Problems with PCR Detection in ASIA: The Importance of Standardization*. Aquatic Animal Health Unit, Faculty of Veterinary Medicine, University Putra Malysia, 43.400 Serdang, Selangor, Malaysia, 12 pp.

Spann, K.M., J.E. Vickers, and R.J.G. Lester. 1995. Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon* from Australia. *Dis. Aquat.Org.*, 23: 127—134.

Sukhumsirichart, W., C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim, S. Sriurairatana, B. Withyachumnarnkul, and T.W. Flegel. 1998. Genome organization and detetion of Hepatopancreatic Parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *In* Flegel TW. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology. BIOTEC*. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 261—262.

Sulandari, S. dan M.S. Zei. 2003. *Panduan Praktis Laboratorium DNA*. Bidang Zoologi. Pusat Penelitian Biologi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, 125 pp.

Suwanto, A., Yogiara, D. Suryanto, I. Tan, and E. Puspitasari. 2000. Selected protocols. *Training Course on Advances in Molecular Biology Techniques to Assess Microbial Diversity*. Bogor, 28 pp.

Vaseeharan, B., R. Jayakumar, and P. Ramasamy. 2003. PCR-base detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. *Lett. Appl. Microbiol.*, 37: 443—447.

Walker, P.J. and J.A. Cowley. 2003. *Viral Genetic Variation: Implications for Disease Diagnosis and Detection of Shrimp Pathogens*. Co-operative Research Centre for Aquaculture, CSIRO Tropical Aquaculture, PMB3 Indooroopily, Q 4068, Australia, 5 pp.

Withyachumnarnkul, B. 1999. Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, 39: 21—27.

Wongteerasupaya, C., S. Sriurairatana, J.E. Vickers, A. Akrajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, and T.W. Flegel. 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Diseases of Aquat. Org.*, 22: 45—50.

Yuasa, K., I. Koesharyani, K. Mahardika, F. Jhonny, and Zafran. 2001. *Manual for PCR Procedure*. Rapid diagnosis on viral nervous necrosis in Groupers. Gondol Research Institute for Mariculture and Japan International Cooperation Agency, 35 pp.