

Penelitian

Prevalensi dan Karakterisasi Molekuler *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) di Sentra Budidaya Udang Vaname (*Litopenaeus Vannamei*) Propinsi Banten

(Prevalence and Molecular Characterization of *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) in White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) Farm in Banten Province)

Rona Choiruz Zaujat^{1*}, Surachmi Setiyaningsih², Angela Mariana Lusiastuti³

¹Program Studi Mikrobiologi Medik, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680.

²Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680.

³Instalasi Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan, Kementerian Kelautan dan Perikanan, Depok 16436.

*Penulis untuk korespondensi: rona.khoir@gmail.com

Diterima 20 Agustus 2016, Disetujui

ABSTRAK

Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) adalah virus yang umum menyerang udang putih (*Litopenaeus vannamei*) dalam industri budidaya udang di dunia. Di Indonesia, penyakit myonecrosis pertama kali diketahui terjadi pada udang putih dari pertambakan di Situbondo, Jawa Timur, pada tahun 2006 dengan prevalensi 11.11% dan gejala klinis serupa dengan kejadian wabah myonecrosis di Brazil pada tahun 2002. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui prevalensi dan karakteristik molekuler IMNV di sentra budidaya udang vaname di Propinsi Banten. Sampel udang dikumpulkan selama periode Maret hingga Juni 2015. Sebanyak 24 sampel diperoleh dari 24 area pertambakan aktif kemudian di-pool dan diuji menggunakan metode *Real Time Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil uji menunjukkan bahwa prevalensi IMNV secara keseluruhan di Propinsi Banten adalah sebesar 33,3% dengan rincian: Kota Serang 0%; Kabupaten Serang 0%; Kabupaten Tangerang 14,3% dan Kabupaten Pandeglang 100%. Analisis perbandingan genom IMNV pada ORF1 parsial menunjukkan bahwa isolat lapang Banten, isolat Indonesia dan Brazil memiliki persentase kemiripan 97,4-100%. Analisis sekuens asam amino menunjukkan persentase kemiripan 97,6-100%. Analisis filogenetik sekuens nukleotida menunjukkan bahwa telah terjadi diversifikasi genetik antara IMNV Indonesia dan Brazil dan antar isolat Indonesia sendiri.

Kata kunci: prevalensi, IMNV, *Litopenaeus vannamei*, real time PCR, filogenetik

ABSTRACT

Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) commonly infects white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in shrimp industry worldwide. In Indonesia, the disease was firstly discovered in Situbondo shrimp farms, East Java, in 2006 with the prevalence of 11.11% with the clinical symptoms similar to the myonecrosis outbreak occurred in Brazilian shrimp farms in 2002. The aim of this study was to investigate the prevalence of IMNV infection in shrimp farm in Banten province and to analyze the molecular characteristics of the virus. A total of 120 shrimp samples were collected during March to June 2015 from 24 active shrimp farms in four districts and they were pooled and tested by real time polymerase chain reaction (PCR) method. The results reveal that overall prevalence of IMNV in Banten province was 33.3% consisting of Serang city 0%; Serang district 0%; Tangerang district 14.3%; and Pandeglang district 100%. Pairwise comparison analysis of partial ORF1 showed that Banten isolate shared 97.4-100% nucleotide similarity and or 97.6-100% amino acid sequence similarity with other Indonesia and Brazil isolates. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences demonstrated a clear genetic diversification of IMNV between Indonesia and Brazil, as well as within Indonesia isolates.

Keywords: prevalence, IMNV, *Litopenaeus vannamei*, real time PCR, phylogenetic

PENDAHULUAN

Udang putih vaname (*Litopenaeus vannamei*) mulai diintroduksi ke Indonesia tahun 1999 sebagai alternatif udang budidaya selain spesies udang lokal yaitu udang windu (*Penaeus monodon*) dan udang jerbung (*P. merguensis*). Pemerintah Indonesia memperbolehkan impor udang vaname pada tahun 2000 untuk keperluan penelitian. Udang vaname kemudian diimpor dari Taiwan dan Hawaii. Berdasarkan Keputusan Menteri No.4/2001, impor udang vaname diizinkan untuk dibudidayakan tetapi hanya induk udang berkualitas unggul dan bebas penyakit yang boleh diimpor. Akhir tahun 2007 udang vaname telah dibudidayakan secara intensif setidaknya di 17 provinsi di Indonesia (Jawa Timur, Jawa Tengah, Jawa Barat, Yogyakarta, Banten, Bali, Nusa Tenggara Barat, Lampung, Sumatera Selatan, Riau, Bengkulu, Sumatera Barat, Sumatera Utara, Sulawesi Selatan, Kalimantan Selatan, Kalimantan Timur, dan Kalimantan Barat (Tauhid & Nuraini, 2009).

Masalah yang dihadapi dalam budidaya udang vaname secara intensif adalah kerentanan udang tersebut terhadap penyakit seperti *infectious myonecrosis virus* (IMNV). Infeksi IMNV mampu membunuh hingga 70% populasi udang dan myonecrosis ini menjadi salah satu penyakit penting yang telah memengaruhi industri budidaya udang vaname baik di Indonesia maupun di dunia. Di Indonesia, penyakit myonecrosis pertama kali dilaporkan terjadi di Situbondo pada tahun 2006, dengan gejala klinis serupa dengan kejadian wabah myonecrosis di Brazil berupa jaringan otot berwarna putih akibat nekrosis ekstensif, khususnya bagian punggung dan ekor (Senapin *et al.*, 2007).

Penyakit myonecrosis biasanya terjadi secara akut di tambak dengan tingkat kematian yang tinggi dan gejala klinis pada udang muda, kemudian perjalanan penyakit menjadi kronis dengan tingkat kematian mencapai 40-70% (Lightner *et al.*, 2004). Penularan IMNV terjadi secara horizontal karena kanibalisme dan melalui air, sedangkan penularan secara vertikal diduga terjadi dari induk ke benur (Naim *et al.*, 2014).

Hasil surveilans aktif pada tahun 2006 di Jawa Timur menunjukkan bahwa myonecrosis hanya terdeteksi di Situbondo dengan tingkat prevalensi sebesar 11,11%, sedangkan di daerah lainnya di Jawa Timur dan Bali belum terdeteksi (Nuraini *et al.*, 2007). Namun, penelitian tahun 2008 menyebutkan bahwa myonecrosis sudah meluas ke daerah lain di Jawa Timur dengan tingkat prevalensi berkisar antara 5-23% (Nuraini, 2008).

Keberadaan IMNV di Indonesia diduga berasal dari Brazil melalui impor induk atau benur untuk kepentingan budidaya udang. Sumber asli infeksi belum diketahui tetapi penyebaran trans-benua hampir dapat dipastikan menjadi penyebab kejadian myonecrosis di Indonesia karena tingginya frekuensi perdagangan induk udang vaname (Senapin *et al.*, 2007; Walker & Winton, 2010; Naim *et al.*, 2014). Hasil sekuensing sampel IMNV isolat lapang yang berasal dari Situbondo dan Lampung menunjukkan bahwa keduanya memiliki kemiripan genom hingga 99% dengan isolat Brazil dan Indonesia lainnya dengan gejala klinis pada kedua isolat tersebut mirip dengan gejala klinis IMNV Brazil (Widowati, 2013).

Propinsi Banten memiliki empat kawasan minapolitan sebagai sentra budidaya perikanan dengan udang vaname sebagai satu di antara komoditas perikanan lainnya. Penetapan sebagai kawasan minapolitan perikanan budidaya pada tahun 2010 berdasarkan Surat Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI Nomor: KEP.32/MEN/2010 tentang Penetapan Kawasan Minapolitan. Penelitian surveilans untuk mengetahui prevalensi IMNV di Propinsi Banten dan karakterisasi molekuler IMNV isolat lapang perlu dilakukan. Tujuan penelitian ini untuk menduga prevalensi IMNV dan karakterisasi molekuler isolat IMNV di sentra budidaya udang vaname di Propinsi Banten.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan dan Penyiapan Sampel Peneliti

Jumlah sampel ditentukan menggunakan rumus penduga prevalensi menurut Nuraini (2008) yaitu $n = 4PQ/L^2$ dengan prevalensi dugaan 10%, tingkat kepercayaan 90%, dan galat 10% sehingga $n = 4 \times 0.1(0.9)/0.1^2$ diperoleh sebanyak 36 sampel. Berdasarkan data survei di lapangan, sebagian besar tambak udang vaname sedang tidak aktif akibat terkena penyakit pada siklus produksi sebelumnya atau sedang dalam masa persiapan produksi. Sampel kemudian dikoleksi dari area pertambakan aktif yang berada di empat sentra budidaya udang vaname di Propinsi Banten, yaitu di Kota Serang 1 tambak, Kabupaten Serang 9 tambak, Kabupaten Tangerang 7 tambak, dan Kabupaten Pandeglang 7 tambak. Total jumlah tambak udang vaname aktif di Propinsi Banten pada saat penelitian sebanyak 24 tambak dan dari masing-masing tambak dipilih 1 petak sebagai sampel sehingga total terkumpul 24 sampel. Sampel udang diambil dari satu petak per

tambak berdasarkan satu blok tambak aktif memiliki perairan (saluran inlet dan outlet) yang sama. Satu petak tambak terpilih kemudian diambil masing-masing sebanyak 5 ekor udang sebagai sampel dan di-pool kemudian sampel diuji di laboratorium menggunakan metode real time PCR (qRT-PCR) (OIE, 2015).

Deteksi IMNV menggunakan metode Real Time PCR (qRT-PCR)

Metode pengujian qRT-PCR digunakan sebagai uji penapisan awal yang terdiri dari 2 tahapan yaitu proses ekstraksi dan amplifikasi RNA. Proses ekstraksi RNA sampel dilakukan menggunakan metode *Total RNA Mini Kit* sesuai prosedur standar kit. Tahap pertama pengambilan organ target IMNV yaitu segmen abdominal terakhir tubuh udang dan pleopod sebanyak 25 mg, kemudian dilakukan *pooling* dan dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml. Ke dalam tabung ditambahkan 400 µl RB Buffer dan 4 µl β-mercaptoethanol, digerus dengan mikropes-tel, didiamkan 3 menit dalam suhu ruang, dipindah ke tabung koleksi 2 ml dan disaring menggunakan *filter column*, disentrifugasi 1000×g selama 30 detik, dibuang *filter column* kemudian dipindah ke tabung 1,5 ml yang baru. Ke dalam tabung kemudian ditambahkan 400 µl ethanol 70%, dihomogenkan dengan perlahan, dipindah ke tabung koleksi 2 ml menggunakan RB *column*, disentrifugasi 13000 × g selama 1 menit dan dibuang larutannya, kemudian ditambahkan 400 µl W1 Buffer, disentrifugasi 13000 × g selama 30 detik, dan dibuang larutannya. Selanjutnya ke dalam tabung ditambahkan 600 µl *wash buffer*, disentrifugasi 13000×g selama 30 detik, dibuang larutannya, disentrifugasi 13000×g selama 3 menit untuk mengeringkan RB *column* kemudian dipindahkan RB *column* ke tabung 1,5 ml baru. Ke dalam tabung ditambahkan 50 µl RNase-free water, didiamkan 2 menit, dan disentrifugasi 13000×g selama 1 menit. Ekstrak RNA yang diperoleh disimpan di dalam freezer -20 °C hingga siap digunakan.

Proses amplifikasi terdiri dari 3 tahap, tahap 1 menyiapkan standar IMNV, tahap 2 membuat *master mix* PCR untuk IMNV, dan tahap 3 qRT-PCR menggunakan *Applied Biosystems One Step Real-Time PCR IMNV Kit* sesuai prosedur standar kit. Tahap 1 dilakukan dengan melakukan 5 pengenceran berseri ($10^5 - 10^1$) standar IMNV. Tahap 2 menyiapkan *master mix* IMNV dengan komponen yaitu 2× Multiplex RT-PCR Buffer 12.5 µl, 10× Multiplex

RT-PCR Enzyme Mix 2.5 ml, 25× IMNV Primer Probe Mix 1 µl dan RT-PCR *grade water* 1 µl dengan total 17 µl *master mix* per reaksi, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi 1.5 ml. *Master mix* di-vortex 5 detik dan di-spin 5 detik dan dimasukkan ke dalam tiap sumuran *plate*. Ditambahkan 8 µl RT-PCR *grade water* untuk sumuran *No Template Control* (NTC), 8 µl untuk setiap konsentrasi Standar, 8 µl ekstrak RNA sebagai sampel target. Total volume per reaksi sebanyak 25 µl. Profil amplifikasi yang digunakan yaitu suhu 48 °C selama 10 menit, suhu 95 °C selama 10 menit, 95 °C selama 15 detik dan suhu 60 °C selama 1 menit 40 siklus.

Amplifikasi Gen ORF1 IMNV

Tahap pertama karakterisasi molekuler adalah amplifikasi IMNV menggunakan metode reverse transcriptase PCR (RT-PCR) dan Qiagen® *One Step RT-PCR Kit* sesuai prosedur standar kit. Campuran reaksi amplifikasi pada tabung mikro adalah Qiagen *One Step RT-PCR Master Mix* 2.5 µl, Qiagen *One Step RT-PCR buffer* 0.5 µl, *Q-Solution* 2.5 µl, dNTP Mix 10 mM 0.5 µl, RNase free water 2.5 µl, primer forward IMNV 95F (5'- AGAAAGTTTGTTCGTAGAGCGAGA-3') dan primer reverse IMNV 474R (5'-AAAGGTGGC AGGTGTCCATACTGA-3') masing-masing sebanyak 1 µl, ekstrak RNA sebagai templat 2 µl. Total volume reaksi 12.5 µl. Sekuens primer IMNV untuk amplifikasi dengan *One Step PCR* berdasarkan dari susunan genom IMNV (*GenBank accession no.* EF061744) (Senapin et al., 2007). Profil amplifikasi yang digunakan sesuai metode Loy et al. (2012) yaitu suhu 95 °C selama 10 menit, 35 siklus PCR pada suhu 95 °C selama 15 detik, dan suhu 60 °C selama 1 menit.

Produk PCR dielektroforesis menggunakan 1.5% gel agarose. Gel diletakkan dalam *electrophoresis chamber* dan direndam buffer TAE 1x hingga tertutup seluruh permukaannya. Sumur pada gel diisi secara berurutan dengan *marker* (DNA ladder) 100 bp (Promega), kontrol negatif, kontrol positif IMNV, dan produk PCR (amplikon) sebanyak 10 µl per sumuran gel dari masing-masing sampel yang telah ditambahkan sebelumnya dengan 3 µl *mass loading dye*. Mesin elektroforesis diatur pada 220V selama 30 menit. Pita DNA kemudian tervisualisasi dalam gel agarose. Gel kemudian direndam pada ethidium bromide (EtBr) selama 10 menit. Sampel positif IMNV ditandai dengan munculnya pita pada 400 bp. Pita produk PCR didokumentasikan menggunakan Gel Doc UV Transilluminator.

Sekuensing DNA

Amplikon positif qRT-PCR dikirim ke *First Base Laboratories*, Selangor, Malaysia untuk proses sekuensing DNA. Sekuensing DNA dilakukan menggunakan BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit. Tahap pertama purifikasi produk PCR menggunakan etanol absolut di dalam Centricon®-100 columns. Sebanyak 2 ml ddH₂O dimasukkan ke dalam column, ditambahkan sampel produk PCR, kemudian disentrifugasi 3000× g selama 10 menit. Wadah penampung ampas dibuang dan tabung baru diletakkan di dalam column. Column selanjutnya dibalik dan disentrifugasi 270× g selama 2 menit. Tahap kedua adalah PCR sequencing dengan campuran reaksi 4 µl 2× Ready Reaction Premix, 2 µl 5× BigDye sequencing buffer, primer dengan konsentrasi 3.2 pmol/µl sebanyak 1 µl, 3-10 ng templat, dan ddH₂O sampai volume 20 µl. Profil amplifikasi yang digunakan yaitu pada suhu 96 °C selama 1 menit, 25 siklus 96 °C 10 detik, 50 °C 5 detik, dan 60 °C selama 4 menit. Tahap ketiga adalah purifikasi produk PCR menggunakan Centri-Sep™ spin columns dengan menambahkan 2 µl sodium dodecyl sulfate 2.2% kemudian dipanaskan pada suhu 95 °C selama 5 menit. Campuran produk ekstensi kemudian dimasukkan ke dalam spin column dan disentrifugasi 750×g selama 2 menit untuk mengkoleksi sampel. Tahap keempat adalah cycle sequencing, sampel dibaca susunan oligonukleotidanya menggunakan mesin sequencer ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Analisis Data

Hasil analisis qRT-PCR diolah untuk mengetahui prevalensi IMNV di sentra budidaya udang vaname di Propinsi Banten dengan rumus berdasarkan Cameron (2002) sebagai berikut: Hasil sekuensing DNA dianalisis menggunakan perangkat lunak Bioedit 7.2.5. Isolat IMNV pembanding didapatkan dari pusat data GenBank menggunakan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Analisis perbandingan filogenetik neighbor-joining(distance) dilakukan menggunakan MEGA6 dengan metode maximum composite likelihood dan branch support ditentukan dengan bootstrapping (1000 ulangan). Analisis filogenetik maximum-likelihood dilakukan menggunakan program MEGA6 dengan metode nearest neighbor interchange (NNI) dan initial tree for ML dengan NJ/BioNJ (Naim et al., 2014). Hubungan kekerabatan isolat IMNV Banten dan isolat pembanding dianalisis secara deskriptif.

HASIL

Deteksi qRT-PCR dan Prevalensi IMNV Provinsi Banten

Berdasarkan hasil deteksi IMNV menggunakan qRT-PCR, 8 sampel dari total 24 sampel menunjukkan hasil positif IMNV. Jumlah salinan IMNV yang terdeteksi dengan qRT-PCR pada sampel positif masih sangat sedikit yaitu $3,44-24,72 \times 10^1$ salinan IMNV/µl dan kisaran siklus amplifikasi (Ct) adalah 36,01-39,09. Sampel asal Kecamatan Tegalpapak Kabupaten Pandeglang memiliki jumlah salinan IMNV paling tinggi ($24,72 \times 10^1$ salinan IMNV/µl) dibandingkan sampel positif lainnya. Hasil deteksi IMNV menggunakan qRT-PCR disajikan pada Tabel 1. Metode qRT-PCR merupakan salah satu metode gold standard yang ditetapkan oleh OIE 2015 untuk mendeteksi IMNV secara molekuler pada udang. Uji qRT-PCR mampu mendeteksi keberadaan IMNV sebelum gejala klinis infeksi myonecrosis muncul karena metode ini dapat mendeteksi sedikitnya 10 salinan RNA pada setiap mikroliter (µl) total RNA (Andrade, 2009; OIE, 2015). Prevalensi IMNV secara keseluruhan di Propinsi Banten sebesar 33,3%. Prevalensi IMNV di masing-masing sentra budidaya udang vaname yaitu Kota Serang 0%, Kabupaten Serang 0%, Kabupaten Tangerang 14,3% dan Kabupaten Pandeglang 100% (Tabel 2).

Karakterisasi Molekuler IMNV Isolat Lapang Banten

Sampel positif IMNV dari Kabupaten Tangerang dan Pandeglang di amplifikasi menggunakan metode RT-PCR untuk keperluan sekuensing, tetapi visualisasi amplikon tersebut tidak memperlihatkan adanya pita 400 bp karena tingkat sensitivitas RT-PCR lebih rendah dibandingkan dengan qRT-PCR. Metode RT-PCR hanya dapat mendeteksi 100 salinan virus/µl, sementara limit deteksi qRT-PCR hingga 1 salinan virus/µl (Widowati, 2013). Upaya amplifikasi kemudian dilakukan terhadap sampel koleksi asal Kecamatan Tegalpapak Kabupaten Pandeglang dengan gejala klinis myonecrosis dari wabah bulan Maret 2015 dengan asumsi IMNV yang ditemukan sama. Deteksi qRT-PCR menunjukkan sampel koleksi positif IMNV ($1,99 \times 10^5$ salinan/µl). Sampel kemudian di amplifikasi menggunakan PCR konvensional dan visualisasi menggunakan elektroforesis yang memperlihatkan adanya pita 400 bp. Sampel kemudian dikirim ke laboratorium *First Base Laboratories*, Selangor, Malaysia untuk proses sek-

Tabel 1. Deteksi IMNV menggunakan *Real Time* PCR (qRT-PCR)

	Kabupaten	Kecamatan	Salinan IMNV/ μ l	Ct
1	Tangerang	Kemiri	7.61×10^1	37.85
2	Pandeglang	Panimbang	6.91×10^1	38.00
3	Pandeglang	Panimbang	8.06×10^1	37.76
4	Pandeglang	Panimbang	4.44×10^1	38.69
5	Pandeglang	Panimbang	3.44×10^1	39.09
6	Pandeglang	Panimbang	4.18×10^1	38.79
7	Pandeglang	Tegalpapak	18.81×10^1	36.44
8	Pandeglang	Tegalpapak	24.72×10^1	36.01

uensing DNA. Sekuensing fragmen gen ORF1 IMNV isolat lapang bertujuan untuk identifikasi posisi genom parsial ORF1 dan melihat kemiripan IMNV isolat lapang Banten dengan isolat pembanding.

Hasil sekuensing menunjukkan bahwa posisi genom parsial berukuran panjang 379 bp dan berada pada daerah 740-1118 fragmen ORF 1 IMNV. Untuk menganalisis fragmen ORF1 parsial ini maka dilakukan penyejajaran majemuk dan isolat pembanding dipotong secara manual hingga batas daerah tersebut. Isolat pembanding dalam penelitian ini adalah IMNV isolat BZ-03-1 (AY570982), BZ-03-2 (KJ556923), BZ-09 (KR815474), BZ-13 (KT003689), ID-EJ-06-1 (EF061744), ID-EJ-06-2 (KF836757), ID-EJ-12 (KJ636783), dan ID-LP-11 (KJ636782). Isolat-lapang Banten diberi kode ID-BT-15.

Hasil pairwise comparison alignment (PSA) fragmen ORF1 sekuens nukleotida IMNV isolat Brazil dan isolat lapang Banten memiliki persentase kemiripan 97,9-99,2% dan sekuens asam amino menunjukkan persentase kemiripan 99,2-100%. Hasil PSA fragmen ORF1 sekuens nukleotida IMNV isolat Indonesia dan isolat lapang Banten memiliki persentase kemiripan 98,9-99,7% dan sekuens asam amino menunjukkan persentase kemiripan 98,4-100% (Tabel 3). Hasil PSA antar isolat Brazil sejak tahun 2003 hingga 2013 menunjukkan persentase kemiripan 98,1-100% atau terdapat perubahan 0-7 per pasangan sekuens nukleotida (<1 substitusi/genom/tahun) dan antar isolat Indonesia sejak tahun 2006 hingga 2015 menunjukkan persentase kemiripan 98,7-100% atau terdapat perubahan 0-5 per pasangan sekuens nukleotida (<1 substitusi/genom/tahun).

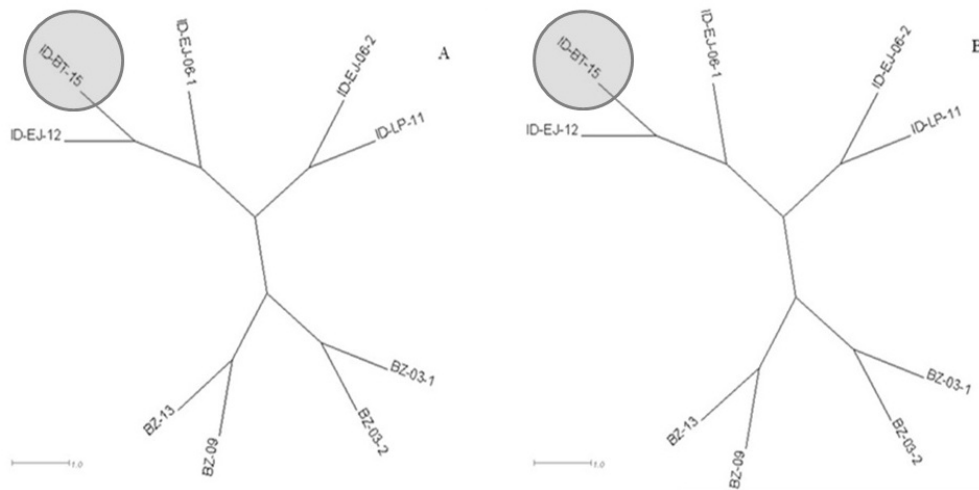
Pola kekerabatan isolat Brazil dan Indonesia serta isolat lapang Banten juga diamati dengan pohon filogenetik menggunakan sekuens nukleotida karena keragaman yang terbatas pada sekuens asam amino (Townsend et al., 2008). Konstruksi pohon filogenetik menggunakan dua pendekatan yang

berbeda yaitu *neighbor joining (distance)* dan *maximum likelihood* dengan hasil serupa yang menunjukkan konsistensi percabangan filogenetik. Kedua pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat Indonesia dan Brazil tersusun dari dua cluster yang terpisah dan masing-masing cluster saling membentuk percabangan tersendiri (Gambar 1).

PEMBAHASAN

Hasil deteksi IMNV menggunakan metode qRT-PCR mendapatkan 8 sampel positif IMNV, tetapi jumlah salinan IMNV masih sangat sedikit karena pada saat dilakukan pengambilan sampel infeksi masih terjadi di fase awal. Udang yang diambil sebagai sampel belum menunjukkan gejala klinis myonecrosis berupa nekrosis ekstensif berwarna putih pada jaringan otot khususnya pada bagian punggung dan ekor atau berubah menjadi berwarna kemerahan menyerupai udang rebus (OIE 2015). Namun, kemudian diketahui ada kematian akibat infeksi myonecrosis di tambak dalam periode 1-2 bulan setelah waktu pengambilan sampel.

Perbandingan jumlah salinan IMNV antar kecamatan menunjukkan bahwa sampel asal Kecamatan Tegalpapak Kabupaten Pandeglang memiliki jumlah salinan IMNV lebih tinggi dibandingkan lokasi lainnya. Umur udang sampel diduga menjadi faktor penyebab tingginya jumlah salinan IMNV di Kecamatan Tegalpapak Kabupaten Pandeglang. Umur udang dari enam lokasi di sentra budidaya Propinsi Banten berumur kurang dari 40 hari sedangkan umur udang dari dua lokasi di Kecamatan Tegalpapak berumur di atas 40 hingga 80 hari sehingga jumlah salinan IMNV terdeteksi lebih banyak. Penyakit IMNV berkembang secara perlahan dalam tubuh udang dengan kemunculan gejala klinis myonecrosis 40 hari pasca infeksi dengan mortalitas kumulatif mencapai 40-70% (Andrade,



Gambar 1 Perbandingan Filogenetik Isolat IMNV dalam Bentuk Radial Phylogram. (A) Neighbor joining (distance) (B) Maximum Likelihood.

2009). Menurut Loy (2014), jika udang terinfeksi IMNV di tambak sejak umur 20 hari dan berat tubuh 1 gram, memerlukan waktu hingga 2 bulan hingga muncul gejala klinis dan terjadi kematian akibat infeksi IMNV. Pada fase akut, jumlah salinan IMNV yang terdeteksi pada udang vaname sebesar 105 salinan/ μ l (Silva *et al.*, 2014), sedangkan pada fase kronis jumlahnya sebesar 105-108 salinan/ μ l (Silva *et al.*, 2011).

Tabel 2 menunjukkan perbedaan angka prevalensi pada masing-masing sentra budidaya vaname di Propinsi Banten. Hasil survei lapangan di Kota Serang hanya terdapat satu tambak dan letaknya jauh dari lokasi tambak lain. Tambak ini menerapkan sistem budidaya intensif dengan padat tebar tinggi akan tetapi karena jumlah petakan yang sedikit dan dilindungi lahan mangrove sehingga potensi transmisi horizontal IMNV antar tambak relatif kecil. Kabupaten Serang merupakan lokasi percontohan budidaya udang vaname di Banten tetapi saat ini banyak tambak yang tidak operasional akibat terkena penyakit di tahun 2013. Tambak aktif yang diambil sampelnya lokasinya tidak berdekatan dan saat ini menerapkan sistem budidaya semi intensif

dengan padat tebar rendah untuk meminimalisir stres pada udang yang dapat memicu infeksi virus. Kabupaten Tangerang merupakan lokasi percontohan budidaya udang vaname kedua di Banten setelah Kab. Serang tetapi banyak tambak yang tidak operasional akibat terkena penyakit. Saat ini tambak udang vaname yang aktif di Kab. Tangerang juga menerapkan sistem budidaya semi intensif dengan padat tebar rendah. Kabupaten Pandeglang saat ini merupakan sentra budidaya udang vaname yang menerapkan sistem budidaya intensif dengan padat tebar tinggi dan jarak tambak relatif berdekatan sehingga potensi transmisi horizontal IMNV lebih tinggi dibandingkan daerah lain. Transmisi horizontal IMNV di pertambakan diduga juga terjadi akibat perairan lepas yang sudah terkontaminasi IMNV. Tambak yang terinfeksi IMNV biasanya membuang air dan udang mati langsung ke laut tanpa perlakuan sterilisasi terlebih dahulu sehingga dapat mengontaminasi pertambakan lain yang berada di kawasan tersebut yang juga mengambil air laut yang sudah terkontaminasi sehingga infeksi virus semakin meluas.

Tabel 2 Prevalensi IMNV di Sentra Budidaya Udang Vaname

	Lokasi	Tambak Aktif/Total	Tambak +/n	Prevalensi (%)
1	Kota Serang	1/1	0/1	0.0
2	Kab. Serang	9/9	0/9	0.0
3	Kab. Tangerang	7/7	1/7	14.3
4	Kab. Pandeglang	7/7	7/7	100.0
Prevalensi rata-rata		24/24	8/24	33.3

Tabel 3 Persentase Kemiripan (*Similarity*) Senkuens IMNV Isolat Banten dengan Isolat Pembanding

	BZ-03-1	BZ-03-2	BZ-09	BZ-13	ID-EJ-06-1	ID-EJ-06-2	ID-EJ-12	ID-LP-11	ID-BT-15-1
BZ-03-1		100	98.7 (5)	98.1 (7)	99.5 (2)	99.2 (3)	98.9 (4)	99.2 (3)	99.2 (3)
BZ-03-2	100 ^a		98.7 (5)	98.1 (7)	99.5 (2)	99.2 (3)	98.9 (4)	99.2 (3)	99.2 (3)
BZ-09	99.2 (1) ^b	99.2 (1)		99.5 (2)	98.7 (5)	97.9 (8)	98.1 (7)	97.9 (8)	98.4 (6)
BZ-13	99.2 (1)	99.2 (1)	100		98.1 (7)	97.4 (10)	97.6 (9)	97.4 (10)	97.9 (8)
ID-EJ-06-1	99.2 (1)	99.2 (1)	100	100		99.2 (3)	99.5 (2)	99.2 (3)	99.7 (1)
ID-EJ-06-2	99.2 (1)	99.2 (1)	98.4 (2)	98.4 (2)	98.4 (2)		98.7 (5)	100	98.9 (4)
ID-EJ-12	98.4 (2)	98.4 (2)	99.2 (1)	99.2 (1)	99.2 (1)	97.6 (3)		98.7 (5)	99.2 (3)
ID-LP-11	99.2 (1)	99.2 (1)	98.4 (2)	98.4 (2)	98.4 (2)	100	97.6 (3)		98.9 (4)
ID-BT-15	99.2 (1)	99.2 (1)	100	100	100	98.4 (2)	99.2 (1)	98.4 (2)	

^aSkor (%): nukleotida di atas diagonal, asam amino di bawah diagonal

^bAngka di dalam kurung: jumlah substitusi per pasangan isolat

Keberadaan IMNV di Indonesia diduga berasal dari Brazil (Senapin et al., 2007; OIE, 2015). Udang vaname telah dibudidayakan sejak tahun 1983 di Brazil sedangkan di Indonesia baru pada tahun 2001 (Briggs et al., 2004) dan IMNV muncul lebih awal di Brazil tahun 2002 (Andrade, 2009) sedangkan IMNV terdeteksi di Indonesia pada tahun 2006 (Nuraini et al., 2007; Senapin et al., 2007) konsisten dengan kemungkinan bahwa IMNV di Indonesia berasal dari Brazil. Mekanisme transmisi IMNV dari Brazil ke Indonesia belum diketahui secara pasti akan tetapi diduga kuat transmisi lintas negara terjadi melalui induk dan benur udang vaname yang masuk ke Indonesia secara ilegal (Senapin et al., 2007) sehingga genom IMNV Brazil dan Indonesia memiliki kemiripan yang tinggi. Diversifikasi genetik antara IMNV isolat Brazil dan Indonesia yang terlihat pada Gambar 1 juga menunjukkan bahwa saat ini sudah tidak terjadi lagi transmisi horizontal IMNV lintas benua sebagai hasil dari upaya pencegahan yang baik dari pihak terkait dalam pembatasan penyebaran infeksi IMNV.

Penyakit myonecrosis di Indonesia pertama kali dilaporkan di Situbondo Jawa Timur pada tahun 2006 (Nuraini et al., 2007; Senapin et al., 2007). Karena tidak ada laporan wabah IMNV di daerah lain pada tahun itu, Naim et al., (2014) menyimpulkan bahwa Jawa Timur merupakan sumber wabah IMNV di Indonesia dan kemudian menyebar ke daerah lain di Indonesia. Analisis filogenetik menggunakan fragmen genom IMNV dengan panjang sekuens 379 bp pada penelitian ini menunjukkan variasi isolat Indonesia yang masing-masing berkembang membentuk cabang tersendiri. Dua isolat Indonesia, ID-EJ-06-2 dan ID-LP-11, berada pada subclade yang terpisah dengan isolat Indonesia lainnya sesuai dengan nilai persentase kemiri-

pan yang rendah pada hasil *pairwise sequence alignment* (Tabel 3). Penyimpangan isolat ID-LP-11 pada pohon filogenetik sesuai dengan hasil penelitian Naim et al. (2014) yang menyatakan bahwa isolat tersebut memang secara konsisten berada pada *subclade* yang berbeda pada isolat IMNV Indonesia. Konsistensi filogenetik isolat Indonesia perlu diuji lebih lanjut menggunakan sekuens nukleotida yang lebih panjang ~ 600 bp (Min & Hickey, 2007) untuk meningkatkan akurasi pohon filogenetik.

Faktor lingkungan atau praktek budidaya udang vaname yang berbeda di tiap daerah dapat berpengaruh kuat terhadap keragaman genetik IMNV secara regional di Indonesia. Pertukaran IMNV secara alamiah antar regional juga dapat terjadi melalui hewan carrier, bangkai udang mati, sumber air maupun udara yang terkontaminasi (Fegan & Clifford, 2001). Pembawa patogen (*carrier*) dalam suatu sistem budidaya meliputi inang terinfeksi (benih, induk, vektor, dan inang perantara), karier inang biologis lainnya (burung, anjing, serangga dan manusia) serta perantara lain (air, mobil, ember, sepatu, jaring, pakaian) yang masuk ke dalam sistem budidaya melalui air, udara maupun sarana transportasi (jalan). Penularan melalui air meliputi air yang terkontaminasi dari saluran inlet dan outlet serta inang alami di perairan sedangkan penularan darat melalui aktivitas manusia, hewan, mobil dan peralatan lapangan (Nuraini, 2008).

Uji qRT-PCR mampu mendeteksi infeksi dini IMNV. Prevalensi IMNV di Propinsi Banten secara keseluruhan sebesar 33,3% sedangkan prevalensi di masing-masing sentra budidaya udang vaname yaitu Kota Serang 0%, Kabupaten Serang 0%, Kabupaten Tangerang 14,3% dan Kabupaten Pandeglang 100%. Hasil *pairwise comparison* fragmen ORF1 sekuens nukleotida IMNV isolat Brazil dan

isolat lapang Banten memiliki persentase kemiripan 97,9-99,2% dan sekuens asam amino menunjukkan persentase kemiripan 99,2-100%. Hasil *pairwise comparison fragmen* ORF1 sekuens nukleotida IMNV isolat Indonesia dan isolat lapang Banten memiliki persentase kemiripan 98,9-99,7% dan sekuens asam amino menunjukkan persentase kemiripan 98,4-100%. Percabangan pohon filogenetik menunjukkan bahwa telah terjadi diversifikasi genetik antara IMNV Indonesia dan Brazil. Analisis filogenetik juga menunjukkan terjadi variasi pada isolat Indonesia yang masing-masing berkembang membentuk cabang tersendiri terpisah dari kelompok isolat Brazil.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada pe-tambak dan penyuluh perikanan di sentra budidaya udang vaname di Propinsi Banten, staf Laboratorium Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan (LP2IL) Serang dan Instalasi Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan, Badan Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar Kementerian Kelautan dan Perikanan (IP4I BPPBATKPP) Depok yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrade TPD. 2009. Development and application of novel quantitative and qualitative molecular techniques for detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Disertasi S3. Department of Veterinary Science and Microbiology. University of Arizona. USA. p18-59.
- Briggs M, Smith SF, Subasinghe R, Phillips M. 2004. Introduction and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and The Pacific. RAP Publication 2004/10.
- Fegan DF, Clifford HC. 2001. Health management for viral diseases in shrimp farms. The New Wave, Proceedings of The Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. p168-198.
- Lightner DV, Pantoja CR, Poulos BT, Tang KFJ, Redman RM, Andrade TP, Bonami JR. 2004. Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate* 7: 85.
- Loy DS. 2014. Host-virus interactions in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Disertasi S3. Iowa State University. USA. p35-50.
- Min XJ, Hickey DA. 2007. Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Notes* 7: 365-373.
- Naim S, Brown JK, Nibert ML. 2014. Genetic diversification of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus between Indonesia and Brazil. *Virus Research* 189: 97-105.
- Nuraini YN, Hanggono B, Subyakto S, Triastutik G. 2007. Surveilien aktif *infectious myonecrosis virus* (IMNV) pada udang vanamei (*Litopenaeus vannamei*) yang dibudidayakan di Jawa Timur dan Bali. *Jurnal Perikanan Universitas Gajah Mada. Yogyakarta*. Vol. 1: 25-31.
- Nuraini YN. 2008. Prevalensi dan perubahan histopatologik *infectious myonecrosis* (IMN) pada udang putih (*Litopenaeus vannamei*) di Jawa Timur. Tesis. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- [OIE]Office International des Epizooties/World Animal Health Organization. 2015. Infectious myonecrosis (IMNV). *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*: Chapter 2.2.3.
- Senapin S, Phewsaiya K, Briggs M, Flegel TW. 2007. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Journal of Aquaculture* 266: 32-38.
- Silva SMBC, Rocha J, Martins P, Galvez A, dos Santos F, Andrade H, Coimbra M. 2014. Experimental infection of infectious myonecrosis virus (IMNV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture International* 23: 563-576.
- Silva S, Pinheiro A, Coimbra M. 2011. Quantitation of infectious myonecrosis virus in different tissues of naturally infected Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, using real-time PCR with SYBR Green chemistry. *Journal of Virology Methods* 177: 197-201.
- Tauhid, Nuraini YL. 2009. Infectious myonecrosis virus (IMNV) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Indonesia. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 61: 255-262.

- Townsend JP, López-Giráldez F, Friedman R. 2008. The phylogenetic informative-ness of nucleotide and amino acid sequences for reconstructing the vertebrate tree. *Journal of Molecular Evolution* 67: 437-447.
- Walker PJ, Winton JR. 2010. Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Veterinary Research* 41: 51.
- Widowati Z. Pengembangan real time RT-PCR dan karakterisasi molekuler untuk deteksi infectious myonecrosis virus (IMNV) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Tesis. Program Studi Mikrobiologi Medik. Institut Pertanian Bogor.