



LAPORAN PENELITIAN
DIPA PNBP UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 2006

**KAJIAN KEMAMPUAN HEMAGLUTINASI ISOLAT White Spot
Virus PENYEBAB PENYAKIT PADA UDANG**

Peneliti:

Wahyu Tjahjaningsih, M.Si.,drh.
Nanik Sianita Widjaja, S.U., drh.

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh DIPA Penerimaan Negara Bukan Pajak
Universitas Airlangga Tahun 2006
SK Rektor Universitas Airlangga Nomor 4017/J03/PP/2006
Tanggal 2 Juni 2006
Nomor Urut 46

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2006

- HEMAGGLUTINATION TESTS.
- SHRIMPS - VIRUSES.



LAPORAN PENELITIAN
DIPA PNBP UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 2006

KAJIAN KEMAMPUAN HEMAGGLUTINASI ISOLAT White Spot Virus PENYEBAB PENYAKIT PADA UDANG

Peneliti:

Wahyu Tjahjaningsih, M.Si., drh.
Nanik Sianita Widjaja, S.U., drh.

KKC
KK
LP 137/08

Tja
k

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh DIPA Penerimaan Negara Bukan Pajak
Universitas Airlangga Tahun 2006

SK Rektor Universitas Airlangga Nomor 4017/J03/PP/2006

Tanggal 2 Juni 2006

Nomor Urut 46

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2006





**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT**

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066
E-mail : infolemlit@unair.ac.id - http : //lppm.unair.ac.id

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN**

1. Judul Penelitian : **Kajian Kemampuan Hemaglutinasi Isolat White Spot Virus
Penyebab Penyakit Pada Udang**

a. Macam Penelitian : Fundamental, Terapan, Pengembangan, Institusional

b. Katagori Penelitian : I II III IV

2. Kepala Proyek Penelitian

a. Nama Lengkap dan Gelar : Ir. Wahyu Tjahjaningsih, M.Si.

b. Jenis Kelamin : Wanita

c. Pangkat/Golongan dan NIP: Penata Tk. I (Gol. III/d) 131569354

d. Jabatan Sekarang : Lektor

e. Fakultas/Puslit/Jurusan : Fakultas Kedokteran Hewan

f. Univ./Inst. /Akademi : Universitas Airlangga

g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Virologi

3. Jumlah Tim Peneliti : 2 (dua) orang

4. Lokasi Penelitian : Lab. Virologi dan Imunologi FKH Unair

5. Kerjasama dengan Instansi Lain

a. Nama Instansi : -

b. Alamat : -

6. Jangka Waktu Penelitian : 5 (lima) bulan

7. Biaya Yang Diperlukan : 7.500.000,00

8. Seminar Hasil Penelitian

a. Dilaksanakan Tanggal :

b. Hasil Penelitian : Baik Sekali Baik
 Sedang Kurang

Surabaya, September 2005



Mengetahui/Mengesahkan :

a.n. Rektor

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS.
NIP. 130 701 125

RINGKASAN

KAJIAN KEMAMPUAN HEMAGLUTINASI ISOLAT WHITE SPOT VIRUS PENYEBAB PENYAKIT PADA UDANG

Wahju Tjahjaningsih, Nanik Sianita Widjaja
Fakultas Kedokteran Hewan - Universitas Airlangga
Kampus C Jl. Mulyorejo – Surabaya, 60115. Telp. 031-5992785

White spot virus (WSV) merupakan virus penyebab penyakit bintik putih pada udang yang dapat menimbulkan kematian sampai 100% dalam waktu 3 – 10 hari. Salah satu cara untuk mengendalikan penyakit tersebut adalah dengan melakukan penebaran benih udang bebas WSV melalui deteksi WSV pada benih udang. Guna mendukung pengembangan metode pengendalian penyakit secara efektif, maka beberapa informasi dasar tentang virus penyebab penyakit terutama tentang sifat virus tersebut harus diketahui terlebih dahulu, sehingga dapat diperoleh informasi kemungkinan pendeteksian benih udang terhadap WSV dengan metode selain *polymerase chain reaction* (PCR) yang tentunya lebih sederhana dibanding PCR, tidak mahal dan akurat

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui (1) kemungkinan telur ayam berembrio (TAB) dapat digunakan sebagai media untuk mengisolasi virus penyebab penyakit *white spot* pada udang, (2) kemampuan hemaglutinasi dari isolat WSV yang telah dipasasekan pada TAB dengan sel eritrosit berbagai spesies hewan, kecepatan elusi dari hemaglutinasi yang terjadi, termostabilitas hemaglutinin dan (3) hambatan hemaglutinasi oleh antiserum WSV.

Prosedur penelitian terdiri dari beberapa tahap, meliputi : isolasi dan pasase isolat WSV pada telur ayam bertunas umur 8 hari, pembuatan antiserum terhadap WSV dengan menggunakan kelinci, uji hemaglutinasi isolat WSV dengan sel eritrosit ayam, cavia, dan domba, waktu elusi, termostabilitas hemaglutinin, dan uji hambatan hemaglutinasi dengan antiserum WSV.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa WSV dapat dibiakkan pada TAB, dimana pada pasase yang ketiga terdapat kematian embrio ayam pada hari keempat. Cairan alantois hasil pasase dari isolat WSV dapat mengaglutinasi sel eritrosit ayam, cavia, dan domba, dimana kemampuan mengaglutinasi sel eritrosit ayam tampak lebih jelas daripada sel eritrosit cavia dan domba. Waktu elusi menunjukkan bahwa hemaglutinasi dari isolat WSV masih tampak setelah inkubasi 24 jam pada suhu 4° C, dan hasil uji termostabilitas

hemaglutinin menunjukkan bahwa isolat WSV masih mampu mengaglutinasi eritrosit ayam setelah dipanaskan pada suhu 56° C selama 5 menit. Hasil uji hambatan hemaglutinasi menunjukkan bahwa antiserum WSV dapat menghambat isolat WSV dalam mengaglutinasi sel eritrosit.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa : (1) *white spot virus* dapat dibiakkan pada telur ayam berembrio, (2) isolat *white spot virus* hasil pasase pada telur ayam berembrio dapat mengaglutinasi sel eritrosit ayam, cavia, dan domba, dimana hemaglutinasi yang terjadi lambat untuk elusi serta termostabilitas hemaglutininnya hanya stabil selama 5 menit, (3) kemampuan isolat WSV mengaglutinasi sel eritrosit dapat dihambat oleh antiserum WSV.

(Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Sumber Dana : DIP-A dengan SK Rektor Nomor : 4017/JO3/PP/2006, tanggal 2 Juni 2006)

Kata kunci : Hemaglutinasi ; *white spot virus* ;
penyakit pd udang.

SUMMARY

STUDY OF THE ABILITY OF HEMAGGLUTINATION OF WHITE SPOT VIRUS CAUSED OF DISEASE AT SHRIMP

Wahiu Tiahjaningsih, Nanik Sianita Widjaja
Faculty of Veterinary Medicine - University of Airlangga
Campus - C Mulyorejo Street - Surabaya, 60115. Telp. 031-5992785

White Spot virus (WSV) caused white blot disease at shrimp which can generate death until 100% during 3 - 10 day. One of ways to control the disease is conducted free shrimp larva dispersion of WSV through detecting WSV at shrimp larva. Utilize to support development method of disease eradication, hence some elementary information about disease cause virus especially about the characteristic of the virus have to be known before, so that information of possibility of shrimp larva detection to WSV with method besides polymerase chain reaction (PCR) which it is more simple compared to PCR, accurate and cost-effective.

The aims of this study are to know (1) the possibility of chicken's embryonated egg serve the purpose of the media for isolation of virus which cause white spot at shrimp, (2) ability of WSW isolate to hemagglutinate which have been passage to chicken's embryonated eggs with erythrocyte cell of various animal species, speed of elusion from hemagglutination that happened, hemagglutinine thermostability and (3) inhibition of hemagglutination by WSV antiserum.

Research procedure consisted of several phase, covering : isolation and WSV isolate passage at chicken's embryonated egg age of 8 day, preparing antiserum to WSV by using rabbit, hemagglutination test of WSV isolate with chicken, cavia, and sheep erythrocyte cell, elusion time, hemagglutinine thermostability, and hemagglutination inhibition test by antiserum towards WSV.

The result of this research indicate that WSV can be grow in chicken's embryonated egg. where at the third passage occurred death of embryo of chicken on fourth day. Allantois solution result of WSV passage can be able to agglutinate chicken's erythrocyte cell. cavia and sheep erythrocyte cells, where the ability of hemagglutination of erythrocyte cell of chicken is more visible clear than erythrocyte cell of cavia and sheep. Result of elusion time showed that hemagglutination of WSV was still visible after 24 hours of incubation at temperature 4° C and the result of hemagglutinine thermostability

test indicate that WSV isolate was still able to agglutinate chicken erythrocyte after heated at temperature 56° C during 5 minutes. Result of hemagglutination inhibition test showed that antiserum toward WSV can inhibit hemagglutination of erythrocyte cell by WSV.

Based to the result of research, concluded that: (1) white spot virus can be grow at chicken's embryonated egg, (2) white spot virus result of chicken's embryonated egg passage can be able to agglutinate chicken, cavia and sheep erythrocyte cell, but only slow hemagglutination happened for elution and also thermostability of hemagglutinine was only stabilize for 5 minutes, (3) ability of WSV to agglutinate erythrocyte cell can be inhibit by WSV antiserum.

(Faculty of Veterinary Medicine - Unair, Funded by: DIP-A with recommendation letter SK Rector Number: 4017/JO3/PP/2006, date June 2, 2006)

KATA PENGANTAR

Disertai rasa syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala karuniaNya, maka tersusunlah laporan hasil penelitian dengan judul : **Kajian Kemampuan Hemaglutinasi Isolat White Spot Virus Penyebab Penyakit Pada Udang**. Penelitian ini dilakukan sebagai wujud dari Tri Dharma Perguruan Tinggi yaitu Pengajaran, Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat.

Penelitian ini dapat terlaksana atas bantuan banyak pihak, namun tidak semuanya dapat kami sebutkan. Ucapan terima kasih kami tujukan terutama kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Fasich, Apt.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Dr. Ismudiono, MS, drh.
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Sarmanu, MS, drh.

Dengan kerendahan hati, peneliti menunggu saran dan kritik saudara demi perbaikan makalah ini, semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
SUMMARY	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
II TINJAUAN PUSTAKA	4
III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	8
III.1 Tujuan Penelitian	8
III.2 Manfaat Penelitian	8
IV METODE PENELITIAN	9
IV.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	9
IV.2 Tahapan Penelitian	9
V HASIL DAN PEMBAHASAN	12
VI KESIMPULAN DAN SARAN	16
VI.1 Kesimpulan	16
VI.2 Saran	16
DAFTAR PUSTAKA	17

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1	Kemampuan Isolat WSV dalam Mengaglutinasi Eritrosit Berbagai Spesies Hewan	13

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Penurunan produksi udang dalam tahun-tahun terakhir ini disebabkan oleh berbagai masalah, seperti kesalahan manajemen, menurunnya kualitas lingkungan dan penyakit yang belum dapat ditanggulangi. Secara garis besar, penyakit yang terjadi pada udang, umumnya disebabkan oleh faktor biotik yang merugikan dan faktor abiotik yang mempunyai daya dukung terhadap berkembangnya faktor biotik (organisme patogen) yang tidak menguntungkan (Arifin, 1992).

Diantara organisme patogen, virus sering merupakan infeksi primer atau sekunder dan hingga saat ini banyak menimbulkan kerugian ekonomis bagi petani tambak. Penyebaran virus dapat terjadi secara horizontal dan vertikal. Secara horizontal terjadi melalui air, *carrier* (pembawa penyakit) yaitu ikan dan udang liar, burung sebagai vektor yang memakan bangkai udang yang terinfeksi virus, pakan udang berupa ikan / udang rucah serta pekerja dan peralatan yang terkontaminasi oleh virus. Secara vertikal terjadi melalui induk alami kepada anaknya.

Salah satu penyakit pada udang yang sering ditemukan di lapangan adalah penyakit *white spot* yang disebabkan oleh patogen virus. *White spot virus* (WSV) sebagai penyebab penyakit *white spot* sangat infeksiif untuk beberapa spesies udang golongan penaeid, sehingga semua udang penaeid yang dibudidayakan relatif rentan terhadap infeksi WSV. Menurut beberapa pakar, tingginya serangan WSV di Indonesia, karena terjadinya perluasan areal pertambakan tanpa memperhatikan aspek lingkungan dan teknologi intensif yang tidak ramah lingkungan (Demersal, 2005).



Guna mendukung pengemivangan metode pengendalian penyakit secara efektif, maka beberapa informasi dasar seperti organisme penyebab penyakit harus diketahui terlebih dahulu. Sejauh ini teknik pendeteksian penyakit viral telah dilakukan dengan berbagai cara, baik dari gejala klinis, tingkah laku udang yang terinfeksi maupun teknik pendeteksian secara laboratoris dengan melakukan pengamatan terhadap sediaan histologik dari jaringan udang yang terinfeksi, pengamatan dengan mikroskop elektron dari jaringan yang terinfeksi virus, serta *polymerase chain reaction* (PCR) untuk menguatkan hasil diagnosa.

Walaupun banyak teknik diagnosis secara cepat untuk penyakit virus yang menyerang udang, isolasi virus masih harus digunakan sebagai perbandingan bagi metode yang lebih baru. Menurut Ernawati dan Soelistyanto (1991), isolasi virus dapat dilakukan pada telur ayam berembrio (TAB), perbenihan jaringan dan hewan percobaan. Diantara ketiga media untuk perbenihan virus tersebut yang paling banyak digunakan adalah TAB, karena lebih ekonomis dibandingkan perbenihan jaringan dan hewan percobaan. Meskipun tidak semua virus dapat tumbuh pada jaringan TAB, tetapi virus tertentu dapat diadaptasikan pertumbuhannya tanpa mengalami kesulitan.

Identifikasi isolat virus tergantung pada penentuan sifat antigen dengan antiserum yang telah diketahui dengan menggunakan teknik yang mirip dengan identifikasi langsung dari virus pada bahan pemeriksaan klinis. Bila isolat virus tersebut dapat berikatan dengan sel eritrosit dan menyebabkan hemaglutinasi, maka antibodi spesifik dengan virus dicampur sebelum ditambahkan sel eritrosit dapat menghambat hemaglutinasi. (Fenner dkk, 1993). Sehubungan dengan hal tersebut di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk memastikan bahwa *white spot virus* yang merupakan virus penyebab penyakit *white spot* pada udang dapat ditumbuhkan pada jaringan telur ayam berembrio serta mengkaji kemampuan hemaglutinasi dari isolat virus tersebut yang telah diadaptasikan pada TAB.

1.2 Rumusan Masalah

Bertolak dari latar belakang yang telah diuraikan sebelumnya, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah *white spot virus* yang merupakan penyebab penyakit *white spot* pada udang dapat ditumbuhkan pada telur ayam berembrio ?
2. Apakah isolat *white spot virus* yang telah diadaptasikan pada telur ayam berembrio dapat mengaglutinasi sel eritrosit dari berbagai spesies hewan dan bagaimanakah kecepatan elusi dari hemaglutinasi yang terjadi serta bagaimana termostabilitas hemaglutininnya ?
3. Apakah kemampuan mengaglutinasi sel eritrosit tersebut dapat dihambat oleh antiserum WSV ?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Jenis virus yang dapat menyebabkan penyakit pada udang penaeid ada enam macam, yaitu : *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV), *Baculovirus Penaei* (BP), *Monodon Baculo Virus* (MBV), *Baculovirus Midgut Gland Necrosis* (BMN), *Hepatopancreatic Parvo-like Virus* (HPV) dan *Hepatopancreatic Reo-like Virus* (HPV Reo) (Taslihan dkk., 1991).

Akhir-akhir ini sering ditemukan adanya penyakit bercak putih yang disebabkan oleh *white spot virus* atau disebut juga *Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus* yang menimbulkan kerusakan sel pada organ-organ yang berasal dari jaringan ectoderm dan mesoderm terutama pada organ lymphoid. Kerusakan pada sel epidermis subkutikuler menyebabkan perkembangan sel kulit menjadi abnormal dan muncul dalam bentuk bercak-bercak berwarna putih yang merupakan gejala khas (Sunarto, 1995 dalam Tjahjaningsih, 1996). Menurut Lio-Po *et al.* (2001), bercak putih yang tampak pada exoskeleton dan epidermis dari udang yang sakit tersebut berdiameter 0,5 – 3 mm dan muncul setelah dua hari udang terserang virus.

Penyakit bercak putih (WSD) disebabkan oleh *white spot syndrome virus* (WSSV) atau *white spot virus* (WSV) dan host yang berpotensi dapat diserang oleh WSD adalah golongan crustacean baik yang berasal dari laut, payau, maupun air tawar (www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cei/IW 2004). Menurut S-PAH (2004), WSV sangat infeksius untuk beberapa spesies udang penaeid yang dibudidayakan antara lain : *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. merguensis* dan *P. indicus*, sehingga dapat diasumsikan bahwa semua udang peaneid yang dibudidayakan rentan terhadap infeksi.

Menurut BBPBAP (2003) dan S-PAH (2004), WSV mempunyai genome DNA beruntai ganda dengan panjang kurang lebih 290 kbp, berbentuk batang (*bacilliform*) dan beramplop dengan tambahan filamen tunggal. Dikemukakan pula oleh S-PAH (2004), virus tersebut menjadi inaktif bila dipanaskan pada suhu 50° C selama 10 menit, 70° C selama 5 menit, pengeringan pada suhu 30° C serta sinar ultraviolet. Selain suhu, pH juga sangat berpengaruh terhadap infektivitas dari WSV, dimana pada pH asam dan pH dapat menyebabkan virus tersebut menjadi inaktif.

Menurut Lio-Po *et al.* (2001), *white spot virus* (WSV) dapat menyebabkan kematian sampai 100 % dalam waktu 3 – 10 hari dan biasanya udang dengan berat 4 – 15 gram dan udang yang mengalami *pre-moulting* peka terhadap virus tersebut, tetapi dapat juga menyerang udang mulai stadia mysis sampai *broodstock*. Dikemukakan pula bahwa udang yang terserang WSV menunjukkan penurunan nafsu makan dan karena kondisinya yang lemah akhirnya mengambang di permukaan air dan mengumpul di pematang kolam dengan antenna yang patah. Disamping itu, seluruh tubuh berwarna agak kemerahan dan terdapat bintik putih pada kutikel, terutama pada bagian karapas (www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cei/IW_2004) Dikemukakan pula bahwa bintik putih tersebut tidak selalu terlihat khususnya pada infeksi yang sangat akut dan warna tubuh yang kemerahan juga tidak selalu terlihat.

Menurut BBPBAP (2003), beberapa faktor dapat sebagai pemicu timbulnya penyakit tersebut, yaitu : blooming fitoplankton kemudian mengalami kematian secara mendadak, kadar oksigen rendah, terjadi fluktuasi pH harian yang besar, rendahnya temperatur air, turun hujan secara mendadak dan pengelolaan pakan yang kurang baik. Dikemukakan pula bahwa penularan penyakit juga dapat terjadi melalui perantara karier berupa udang liar, kepiting, rajungan dan benih udang yang ditebar sudah terkontaminasi dari pembenihan, bangkai udang terinfeksi yang termakan oleh udang sehat. Menurut

S-PAH (2004). penyebaran WSV secara cepat dari udang yang terinfeksi dapat melalui air dan kanibalisme saat udang mengalami moulting. Penyebaran melalui air juga ditunjang oleh sifat virus tersebut yang mampu bertahan dalam air kolam pada suhu 25-28° C selama kurang lebih empat hari dan pada air laut suhu 25° C selama 5 hari.

Menurut Lightner *et al.* (1987), virus yang termasuk kelompok Baculovirus dapat menyebabkan perubahan cytopathological pada sel-sel epitel hepatopankreas yang terinfeksi virus, dimana tampak adanya badan inklusi polyhedral dalam nucleus, *nuclear hypertrophy*, kromatin berkurang dan nucleus mengalami perubahan. Sedangkan menurut Provenzano (1983), infeksi virus pada udang dapat diketahui dengan terlihatnya hipertrofi sel-sel hepatopankreas yang mengandung badan inklusi yang besarnya beragam tergantung pada jenis virus yang menyerang udang tersebut. Disamping hepatopankreas, jaringan lainnya seperti pleopod, insang, hemolymph, stomach, otot abdominal, gonad, midgut, jantung, periopod, organ limfoid, integument, jaringan nervous juga merupakan target dari WSV (Lio-Po *et al.*, 2001).

Pengamatan dengan mikroskop elektron dari jaringan yang terinfeksi, PCR, DNA probe, Western Blot digunakan untuk mengkonfirmasi test diagnostik (Lio-Po *et al.*, 2001), walaupun demikian isolasi virus masih harus dipakai sebagai pembanding dan identifikasi yang pasti tergantung kepada penentuan sifat antigen dengan antiserum yang telah diketahui dengan menggunakan teknik yang mirip dengan identifikasi langsung dari virus pada bahan pemeriksaan klinis (Fenner *et al.*, 1993).

Menurut Ernawati dan Soelistyanto (1991), virion dari beberapa keluarga virus bila berikatan dengan sel eritrosit dapat menyebabkan hemaglutinasi, namun ada keluarga virus yang selama pembiakannya menghasilkan hemaglutinin bukan oleh virionnya. Hemaglutinasi tersebut dapat dihambat oleh antiviral antibodi, sehingga hambatan hemaglutinasi merupakan salah satu cara untuk mengidentifikasi virus yang dapat

mengadakan hemaglutinasi (Fenner *et al.*, 1993). Uji hambatan hemaglutinasi adalah salah satu bentuk teknik uji *in vitro* yang merupakan salah satu bentuk interaksi antigen dan antibodi sekunder (Kresno, 1996). Dikemukakan pula bahwa uji hambatan hemaglutinasi merupakan modifikasi dari teknik aglutinasi yang digunakan untuk mendeteksi antigen yang larut. Pada teknik ini, antigen virus direaksikan terlebih dahulu dengan antibody spesifik, sehingga antigen virus tersebut tidak mampu berikatan dengan reseptor pada permukaan partikel, berarti terdapat hambatan hemaglutinasi (reaksi positif). Apabila antigen virus yang diuji tidak berikatan dengan antibodi, maka antigen virus yang bebas dapat berikatan dengan reseptor pada permukaan partikel dan menimbulkan aglutinasi (reaksi negatif).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

III.1 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui : (1) kemungkinan telur ayam berembrio digunakan sebagai media untuk mengisolasi virus penyebab penyakit *white spot* pada udang, (2) kemampuan hemaglutinasi dari isolat *white spot virus* (WSV) yang telah dipasasekan pada telur ayam berembrio dengan sel eritrosit berbagai spesies hewan, kecepatan elusi dari hemaglutinasi yang terjadi, termostabilitas hemaglutininnya dan (3) hambatan hemaglutinasi oleh antiserum WSV.

III.2 Manfaat Penelitian

Diharapkan hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang penyakit pada udang, sehingga nantinya dapat dilakukan pendeteksian penyakit *white spot* dengan uji yang sederhana, tidak mahal dan akurat.

BAB IV

METODE PENELITIAN

IV.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Virologi dan Imunologi Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian berlangsung selama empat bulan, mulai dari bulan Juli 2006 sampai dengan bulan Oktober 2006.

IV.2 Tahapan Penelitian

IV.2.1 Isolasi *White Spot Virus* (WSV)

Sampel udang yang positif terinfeksi WSV berdasarkan hasil diagnosa dengan PCR diambil jaringannya dan dibuat suspensi 10 % dengan larutan NaCl fisiologis dan selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Supernatan sebelum diinokulasikan pada telur ayam berembrio (TAB) umur 8 hari, terlebih dahulu difilter untuk menghilangkan kontaminan. Inokulasi dilakukan pada cairan allantois dari TAB yang *specific pathogen free* (SPF) dengan dosis 0,2 ml untuk setiap TAB dan selanjutnya diinkubasi selama lima hari pada suhu 37°C. Setelah hari kelima, cairan allantois dipanen, disentrifuse, difilter dan hasil filtrasi tersebut disimpan dalam *storage vial* untuk selanjutnya diinokulasikan kembali pada TAB yang SPF umur 8 hari serta diuji kemampuan hemaglutinasinya dengan sel eritrosit. Pasase pada TAB SPF tersebut dilakukan sebanyak empat kali untuk mendapatkan jumlah virus yang banyak.

IV.2.2 Pembuatan Antiserum terhadap WSV

Untuk membuat serum anti WSV yang hiperimun digunakan tiga ekor kelinci yang disuntik dengan isolat WSV yang telah diperbanyak pada TAB dengan cara pasase

berulang. Selanjutnya isolat WSV tersebut disuntikkan pada kelinci secara subkutan dan intravena tanpa penambahan adjuvant dengan total dosis sebagai berikut : 0,5 ml . 0,5 ml . 0,75 ml . 0,75 ml . 1 ml . dan 1 ml. Penyuntikan dilakukan pada hari pertama, kedua, keempat, kelima, ketujuh, dan kedelapan dan selanjutnya dua minggu setelah penyuntikan yang terakhir dilakukan pengambilan serum darah.

IV.2.3 Uji Hemaglutinasi Isolat WSV

Untuk mengetahui kemampuan hemaglutinasi dari isolat WSV tersebut, masing-masing hasil pasase pada TAB, dilakukan uji hemaglutinasi (*rapid HA test*) dengan sel eritrosit 10 % dari ayam, cavia, dan domba. Reaksi positif ditandai dengan adanya hemaglutinasi. Selain *rapid HA test*, juga dilakukan uji hemaglutinasi secara mikroteknik untuk mengetahui titer dari antigen virus hasil pasase pertama sampai kelima. Pada HA test mikroteknik, dilakukan pengenceran antigen WSV dan konsentrasi eritrosit yang digunakan adalah 0,5%.

IV.2.4 Waktu Elusi

Waktu elusi dari isolat WSV diamati dengan uji HA mikroteknik pada suhu 4° C. Setelah prosedur HA test mikroteknik, selanjutnya mikroplate tersebut disimpan di dalam kulkas selama 24 jam. Bila sampai 24 jam belum terjadi elusi, dilakukan resuspensi eritrosit dan diamati 2 jam kemudian. Bila hemaglutinasi sudah tidak terlihat lagi setelah 24 jam baik sebelum atau sesudah resuspensi dinyatakan dengan *rapid eluter* dan bila masih tetap terlihat setelah 24 jam baik sebelum atau sesudah resuspensi dinyatakan *slow eluter*. Bila hemaglutinasi sudah tidak terlihat setelah dilakukan resuspensi, maka dinyatakan *intermediate eluter* (Hitchner *et al.*, 1980).

IV.2.5 Termostabilitas Hemaglutinin

Isolat WSV dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 56° C selama 5, 10, 15, 30, dan 60 menit. Setelah periode pemanasan tersebut, isolat didinginkan dalam es dan dibiarkan selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan pengukuran titer hemaglutinin dengan uji hemaglutinasi (HA) test mikroteknik.

IV.2.6 Uji Hambatan Hemaglutinasi

Bila cairan alantois hasil pasase isolat WSV menunjukkan reaksi positif pada uji hemaglutinasi, maka dilakukan uji hambatan hemaglutinasi mikroteknik dengan menggunakan antiserum WSV. Reaksi positif ditandai dengan adanya hambatan hemaglutinasi oleh antiserum WSV.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Telur ayam berembrio (TAB) merupakan salah satu media yang dapat digunakan untuk mengisolasi virus. Berdasarkan hasil isolasi virus dari udang yang terinfeksi *white spot virus* (WSV) pada cairan alantois TAB dan dilanjutkan dengan pasase berulang dari isolat WSV pada cairan alantois menunjukkan pada pasase yang ketiga menunjukkan adanya kematian embrio pada hari keempat. Hal ini menunjukkan bahwa WSV dapat diadaptasikan pada cairan alantois melalui pasase berulang. Hal ini sesuai dengan pendapat Ernawati dan Soelistyanto (1991) yang menyatakan bahwa meskipun tidak semua virus dapat tumbuh pada jaringan TAB, tetapi virus tertentu dapat diadaptasikan pertumbuhannya tanpa mengalami kesulitan. Hasil penelitian Tjahjaningsih dkk (1996) menunjukkan bahwa monodon baculovirus (MBV) yang termasuk golongan baculovirus ternyata juga dapat diadaptasikan pada TAB, dimana pada pasase pertama dan kedua terdapat lesi pock pada selaput chorioalantois dari TAB. Demikian pula virus *Viral Nervous Necrotic* (VNN) yang menyerang ikan kerapu juga dapat diadaptasikan pada TAB, dimana pada pasase yang ketiga terdapat hemoragis pada selaput chorioalantois dari TAB (Tjahjaningsih dan Widjaja, 2005).

Cairan alantois hasil pasase pertama, kedua dan ketiga dari isolat WSV selanjutnya diuji kemampuan virus tersebut untuk mengaglutinasi eritrosit berbagai spesies, yaitu eritrosit ayam, domba, dan cavia. Hasil *rapid HA test* menunjukkan reaksi hemaglutinasi dengan menggunakan eritrosit cavia dan domba konsentrasi 10 % kurang jelas bila dibandingkan dengan eritrosit ayam. Sedangkan pada HA test mikroteknik dengan menggunakan eritrosit ayam, cavia, dan domba konsentrasi 0,5% , diperoleh hasil seperti yang tertera pada Tabel 1.



Tabel 1. Kemampuan Isolat WSV dalam Mengaglutinasi Eritrosit Berbagai Spesies Hewan

Isolat WSV	Titer HA (Log ₂) terhadap Eritrosit		
	Ayam	Cavia	Domba
Pasase I	6	5	3
Pasase II	9	8	7
Pasase III	9	8	7

Pada Tabel 1, terlihat titer hemaglutinasi dari isolat WSV baik hasil pasase pertama, kedua, dan ketiga dengan menggunakan eritrosit ayam lebih tinggi dibanding eritrosit cavia dan domba. Perbedaan titer hemaglutinasi tersebut, karena kemungkinan media yang digunakan untuk mempasasekan isolat WSV adalah TAB, sehingga kemampuan mengaglutinasi eritrosit ayam lebih jelas daripada eritrosit cavia dan domba, tampak dari hasil *rapid HA test*. Dugaan ini ditunjang dari hasil penelitian Widjaja dkk (2003) yang menunjukkan bahwa isolat virus *Newcastle Disease* (virus pada unggas) mempunyai kemampuan hemaglutinasi eritrosit ayam lebih tinggi dari pada eritrosit bebek, kuda, babi, domba dan sapi.

Kemampuan hemaglutinasi atau aglutinasi eritrosit dari isolat WSV diduga adanya hemaglutinin yang dihasilkan selama pembiakan virus dan bukan dari virionnya. Menurut Ernawati dan Soelistyanto (1991), beberapa golongan virus tertentu mempunyai hemaglutinin yang terdapat pada virionnya, seperti miksovirus, reovirus, togavirus dan enterovirus, sedangkan pada poxvirus menghasilkan hemaglutinin selama pembiakan virus. Mekanisme terbentuknya hemaglutinasi disebabkan karena terjadinya adsorpsi yang cukup kuat dari hemaglutinin dengan reseptor mukopolisakarida yang terdapat pada permukaan sel eritrosit (Fenner *et al.*, 1993).

Hasil uji termostabilitas hemaglutinin menunjukkan bahwa isolat WSV hanya stabil selama 5 menit, artinya isolat WSV masih mampu mengaglutinasi eritrosit ayam setelah dipanaskan pada suhu 56° C selama 5 menit. Walaupun masih mampu mengaglutinasi

eritrosit ayam, titer hemaglutinasi yang dihasilkan turun dari yang semula (\log_2) 9 menjadi (\log_2) 3. Sedangkan bila dipanaskan pada suhu 56°C selama 10 menit, isolat WSV sudah tidak dapat mengaglutinasi eritrosit ayam. Hal ini menunjukkan bahwa hemaglutinin yang diduga merupakan hasil pembiakan dari WSV mudah rusak karena faktor pemanasan.

Hasil pengamatan terhadap elusi dari isolat WSV menunjukkan bahwa hemaglutinasi dari isolat WSV masih tetap terlihat setelah 24 jam pada suhu 4°C . Bahkan setelah dilakukan resuspensi eritrosit dan diamati 2 jam kemudian masih terlihat adanya hemaglutinasi. Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan elusi dari isolat WSV lambat. Pada penelitian Widjaja dkk (2003), menunjukkan bahwa dari 3 isolat ND menunjukkan kecepatan elusi yang berbeda, yaitu *slow eluter*, dan *intermediate eluter*. Menurut Hitchner *et al.*, (1980) yang dimaksud dengan *slow eluter* adalah bila hemaglutinasi masih tetap terlihat setelah 24 jam baik sebelum atau sesudah resuspensi, sedangkan *intermediate eluter* adalah hemaglutinasi tidak terlihat setelah dilakukan resuspensi. Dikemukakan lebih lanjut, bila hemaglutinasi sudah tidak terlihat lagi setelah 24 jam (baik sebelum atau sesudah resuspensi) dinyatakan *rapid eluter*.

Kemampuan hemaglutinasi dari isolat WSV tersebut ternyata juga dapat dihambat oleh antiserum WSV. Hal ini tampak pada uji hambatan hemaglutinasi (HI) mikroteknik dengan menggunakan antigen WSV sebanyak 8 HA unit dan eritrosit ayam 0,5 % menunjukkan titer dari antiserum WSV tersebut adalah (\log_2) 7. Bila antiserum WSV dan isolat WSV dicampur sebelum ditambahkan dengan sel eritrosit, maka akan terjadi hambatan hemaglutinasi oleh antiserum WSV. Menurut Fenner *et al.* (1993), uji HI ini sederhana, tidak mahal dan cepat dan oleh karena itu dapat merupakan prosedur serologi pilihan untuk mengidentifikasi isolat virus yang dapat menyebabkan hemaglutinasi.

Terbuktinya kemampuan hemaglutinasi dari isolat WSV hasil pembiakan pada TAB dapat digunakan untuk mendeteksi benih udang terhadap WSV sebelum dilakukan

penebaran benih. Menurut S-PAH (2004), menebar benih udang yang bebas WSV merupakan salah satu cara pencegahan penyakit *white spot* pada udang. Sejauh ini deteksi benih udang terhadap WSV dilakukan dengan PCR di laboratorium yang dilengkapi dengan peralatan lengkap. Menurut Fenner *et al.* (1993), walaupun PCR sensitif dan dapat diterapkan pada semua virus, namun memiliki resiko tercemarnya DNA pada PCR. Dibanding dengan PCR yang relatif cepat, deteksi WSV dengan uji hambatan hemaglutinasi memerlukan waktu yang lebih lama, karena harus dilakukan terlebih dahulu isolasi virus dari sampel benih udang. Walaupun demikian uji hambatan hemaglutinasi memiliki kelebihan, yaitu sederhana, tidak mahal dan juga sensitif.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa :

1. *White spot virus* yang merupakan penyebab penyakit *white spot* pada udang dapat ditumbuhkan pada telur ayam berembrio
2. Isolat *white spot virus* yang telah diadaptasikan pada telur ayam berembrio dapat mengaglutinasi sel eritrosit ayam, cavia, dan domba, dimana hemaglutinasi terhadap eritrosit lambat untuk elusi dan termostabilitas hemaglutinannya hanya stabil selama 5 menit.
3. Kemampuan mengaglutinasi sel eritrosit tersebut dapat dihambat oleh antiserum WSV

VI.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka uji hambatan hemaglutinasi dapat mendeteksi WSV pada udang dengan antibodi anti-WSV, sehingga dapat diaplikasikan pada laboratorium yang tidak dilengkapi dengan peralatan canggih.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifin, S. 1992. Mengenali Penyakit Udang dan Pengendaliannya. Primadona. Edisi Agustus. Laksmi Studio. Jakarta.
- Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau. 2003. Cegah bercak putih (WSSV) yang menyerang udang di tambak. Dep. Kelautan dan Perikanan RI.
- Demersal, 2005. Tambak Udang di Jawa Diambang Kenangan. Volume 1 Bulan April. Pusinfoyanmas Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Ernawati, R. dan Soelistyanto. 1991. Virologi Veteriner. Laboratorium Virologi dan imunologi. Fak. Kedokteran Hewan Unair. Surabaya.
- Fenner, FJ., EPJ. Gibbs, FA. Murphy, R. Rott, MJ. Studdert dan DO. White. 1993. Virologi Veteriner. (Terjemahan oleh DK. Harya Putra dan KG. Suaryana). IKIP Press. Semarang.
- Hitchner, SB., CH. Domermuth, HG. Purchase, JE. Williams. 1980. Newcastle Disease. In solatiom and Identification of Avian Pathogens. Creative Printing Comp. Inc. New York.
- Kresno, SB. 1996. Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Fak. Kedokteran UI. Jakarta.
- Lightner, DV., RP. Hedrick, JL. Fryer. 1987. A survey of cultured Penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. Fish Path. 22 : 127-140.
- Lio-Po, G., CR. Lavilla, ER. Cruz-Lacierda. 2001. Health management in aquaculture. Aquaculture Departement. Phillipines.
- Provenzano, AJ. 1983. The Biology of Crustacean. Vol. 6 : Pathobiology. Academic Press. New York.
- Schering-Plough Animal Health. 2004. Product and Disease Directory. White Spot Syndrome. Schering-Plough Aquaculture.
- Taslihan, A., B. Sumartono, IBM Suastika Jaya. 1991. Pengendalian Penyakit Pembenuhan Udang Windu. Balai Budidaya Air Payau. Jepara.
- Tjahjaningsih, W., R. Ernawati, N. Sianita, J. Rahmahani, Suwarno. 1996. Diagnosa virologik dari suatu kasus penyakit viral pada udang windu. Lembaga Penelitian Unair. Surabaya.
- Tjahjaningsih, W. dan NS. Widjaja. 2005. Deteksi Antigen Viral Dari Ikan Kerapu Yang Terinfeksi Virus Dengan Agar Gel Immunodiffusion Test. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unair. Surabaya

Widjaja, NS., AP. Rahardjo, J. Rahmahani. 2003. Karakterisasi Biologik dan Protein Virus Newcastle Disease Isolat Lapangan. Fak. Kedokteran Hewan Unair. Surabaya.

www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cei/IW. 2004. White Spot Disease, United States.

