

Zoea Syndrome (ZS) pada Larva Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*)

Rubiyanto Widodo Haliman¹⁾, Tommy Hemawan¹⁾, Lilik Wirastiani²⁾,
Dicky Prania Al Amurullah²⁾, Muhammad Murdjani³⁾, Yani Lestari
Nur'aini³⁾, dan Gemi Triastutik³⁾

¹ PT. Tirtamutiara Makmur Kotak Pos 14, Besuki-Situbondo 68356; ² Akademi Perikanan Kotak Pos 1, Sedati, Sidoarjo; ³ Balai Budidaya Air Payau Kotak Pos 5, Panarukan Situbondo 68351

Diterima Mei 2004 disetujui untuk diterbitkan Januari 2005

Abstract

White shrimp (Litopenaeus vannamei) culture in Indonesia has been well developed since 1999. Among the problems occurred during the culture period in the hatchery, Zoea Syndrome (ZS) is the most serious. An observation has been done to determine the prevalence and the clinical signs of this syndrome. Nauplii were collected from hatcheries in East Java (3 hatcheries) and Central Java (1 hatchery) and subject to PCR test in order to obtain TSV free nauplii. The results showed that TSV free nauplii could also be infected by ZS, where the prevalence could reach 100%. There was also a possibility that Vibrio sp. was involved in ZS infection.

Key words: zoea syndrome, larvae, *Litopenaeus vannamei*

Pendahuluan

Udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) merupakan udang introduksi (Haliman, 2003) dari perairan Amerika Latin (Elovaara, 2001). Udang ini mulai dibudidayakan di Indonesia sejak tahun 1999 dan mendapat sambutan yang antusias dari masyarakat pembudidaya udang di Indonesia, sebagai salah satu spesies alternatif pengganti udang windu (*Penaeus monodon*).

Beberapa keunggulan udang vannamei adalah kemampuannya untuk dibudidayakan dengan padat penebaran yang tinggi, memanfaatkan pakan dengan efisien sehingga nilai nisbah konversi pakannya relatif rendah, dan masa pemeliharaan yang lebih singkat dibandingkan dengan udang windu (Haliman, 2003).

Sungguhpun demikian budidaya udang vannamei bukanlah tanpa permasalahan. Salah satu masalah serius yang kerap terjadi di pembenihan udang vannamei adalah kasus Zoea Syndrome (ZS). Hingga kini belum banyak penjelasan yang tersedia tentang status penyakit ZS (Elovaara, 2001), selain disebutkan bahwa terjadi kematian masal pada stadia zoea larva udang vannamei, yang ditandai pula dengan kosongnya saluran pencernaan larva. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui prevalensi dan gejala klinis ZS yang menginfeksi larva udang vannamei.

Bahan dan Metode

Nauplius vannamei diperoleh dari pembenihan udang vannamei yang berada di pesisir utara Jawa Timur (3 perusahaan pembenihan) dan Jawa Tengah (1 perusahaan). Sebelum dimasukkan ke dalam bak pemeliharaan larva, dilakukan seleksi nauplius dengan metoda PCR dua tahap (*Nested PCR Test*) menurut sistem IQ2000TM (Farming IntelliGene Technology Corp., Taipei, Taiwan) untuk mendapatkan nauplius bebas Taura Syndrome Virus (TSV).

Dari setiap kelompok nauplius diambil 150 ekor nauplius, dimasukkan ke dalam tabung mikro ukuran 2 ml yang berisi 500 µl larutan RNA *Extraction Solution* (Farming IntelliGene), dihancurkan dengan sumpit bambu, kemudian dидiamkan selama 5 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan 100 µl larutan CHCl₃ (Merck) dan dilakukan pengadukan dengan bantuan *vortex mixer* selama 20 detik, dидiamkan pada suhu ruang

selama 3 menit, kemudian disentrifusi dengan kecepatan 12.000 ppm selama 15 menit. Sebanyak 200 μ l supernatan hasil sentrifusi dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung mikro baru yang berisi 200 μ l larutan metanol (*Merck*), dihomogenkan dengan *vortex mixer*, kemudian disentrifusi kembali selama 10 menit pada kecepatan 12.000 ppm. Setelah proses sentrifusi selesai metanol dibuang, dan akan terbentuk butiran RNA pada dinding tabung mikro. Butiran RNA selanjutnya dilarutkan dengan akuabides sebanyak 200 μ l, dan dihomogenkan dengan bantuan *vortex mixer*.

Hasil proses ekstraksi RNA kemudian digunakan pada proses amplifikasi. Sebanyak 7 μ l RT-PCR *PreMix (Farming IntelliGene)*, 0,5 μ l Iqzyme DNA polymerase (*Farming IntelliGene*), dan 0,5 μ l RT *Enzyme Mix (Farming IntelliGene)* dimasukkan ke dalam tabung mikro ukuran 0,2 ml, kemudian ditambahkan 2 μ l hasil ekstraksi RNA. Untuk kontrol positif digunakan 2 μ l Plasmid P(+) Control, sedangkan untuk kontrol negatif digunakan 2 μ l larutan Yeast tRNA. Semua tabung sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif dimasukkan ke dalam mesin *thermocycler* dan dilakukan proses amplifikasi RNA dengan profil: 42 °C 30 menit, 94 °C 2 menit, lalu 94 °C 20 detik, 62 °C 20 detik, 72 °C 30 detik yang diulang sebanyak 15 siklus, kemudian 72 °C 30 detik, 20 °C 30 detik yang ditambahkan pada siklus terakhir. Setelah proses amplifikasi tahap pertama selesai, tabung-tabung sampel dikeluarkan dari mesin *thermocycler*, dan ke dalam tiap tabung mikro tersebut ditambahkan 14 μ l Nested PCR Premix (*Farming IntelliGene*) dan 1 μ l Iqzyme DNA polymerase (*Farming IntelliGene*). Kemudian tabung-tabung mikro diatur kembali pada mesin *thermocycler* dan dilakukan proses amplifikasi tahap dua dengan profil: 94 °C 20 detik, 62 °C 20 detik, 72 °C 30 detik yang diulang sebanyak 30 siklus, kemudian 72 °C 30 detik, 20 °C 30 detik yang ditambahkan pada siklus terakhir. Setelah proses amplifikasi selesai, hasilnya dapat digunakan pada proses elektroforesis

Hasil elektroforesis yang menunjukkan sampel adalah negatif TSV akan membentuk garis pada berat molekul 680 bp. Larva vannamei yang telah diseleksi dengan metoda PCR dan ternyata negatif TSV dapat segera dimasukkan ke dalam bak pemeliharaan larva yang berupa bak beton dengan kapasitas 15 ton. Larva diberi pakan alami berupa *Skeletonema* sp. berumur 12 jam yang diberikan 3 kali sehari secara *ad libitum* pada pukul 07.00, 14.00, dan 19.00. Pakan buatan (CAR, Frippak; Flake, Heidelberg; *Spirulina*, OSI; CR-2, Frippak; MB-2, BASF) diberikan 6 kali sehari dengan dosis 0,5 – 2 ppm pada pukul 03.00, 06.00, 11.00, 15.00, 18.00, dan 22.00. Suhu air pemeliharaan larva dipertahankan pada kisaran 31-32 °C.

Prevalensi ZS dihitung dengan membandingkan jumlah bak pemeliharaan larva vannamei yang larvanya terinfeksi ZS dengan jumlah keseluruhan bak pemeliharaan larva, yang dinyatakan dalam persen (Hadiroseyani, 1990).

Gejala klinis ZS diamati secara manual dan mikroskopis dengan bantuan mikroskop cahaya (*Nikon*). Parameter yang diamati meliputi kondisi usus larva dan warna bangkai larva, yang diamati sejak larva memasuki stadia zoea-1. Pengamatan dilakukan setiap hari pada pukul 09.00.

Parameter kualitas air yang diamati adalah pH (pH meter, *Eutech*) dan nilai alkalinitas total yang dihitung dengan metoda titrasi. Pengukuran dilakukan setiap hari pada pukul 08.00.

Jumlah total bakteri *Vibrio* sp. pada air media pemeliharaan larva dihitung dengan cara menginokulasikan 0,025 ml air media pemeliharaan larva vannamei pada permukaan agar TCBS (*Merck*), kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh, dan dinyatakan dalam cfu/ml. Penghitungan dilakukan sebelum nauplius dimasukkan ke dalam bak pemeliharaan dan ketika dijumpai adanya bangkai.

Data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar, dan dianalisis secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Dari seluruh sampel yang diuji PCR ternyata semua sampel negatif TSV, sehingga nauplius dapat dimasukkan ke dalam bak pemeliharaan larva. Namun setelah dipelihara selama 2 hari, mulai muncul tanda-tanda kematian larva. Tabel 1 menunjukkan asal nauplius, hasil uji PCR, dan prevalensi ZS. Tampak bahwa ZS menyerang larva dari semua pembenihan, namun berbeda pada nilai prevalensinya. Dari empat pembenihan, tiga diantaranya mencapai angka prevalensi hingga 100 %, baik dari pembenihan yang berada di Jawa Timur (2 pembenihan) maupun Jawa Tengah (1 pembenihan). Kondisi ini menunjukkan bahwa infeksi ZS tidak mengenal wilayah spesifik.

Tabel 1. Asal *nauplius*, hasil uji PCR, dan prevalensi zoea syndrome
Table 1. The origin of *nauplius*, result of PCR test, and prevalency of zoea syndrome

Asal nauplius	Hasil uji PCR	Jumlah bak/sampel	Jumlah bak yang terinfeksi ZS	Prevalensi (%)
PT. A, Jawa Timur	Negatif	20	4	20
PT. B, Jawa Timur	Negatif	6	6	100
PT. C, Jawa Timur	Negatif	2	2	100
PT. D, Jawa Tengah	Negatif	23	23	100

Demikian pula halnya dengan hasil uji PCR yang negatif, ternyata tidak berbanding lurus dengan infeksi ZS. Walaupun semua sampel menunjukkan hasil uji PCR yang negatif TSV, namun infeksi ZS masih bisa terjadi. Kondisi ini menunjukkan bahwa nauplius yang negatif TSV masih memiliki kemungkinan untuk terinfeksi ZS.

Pada saat ditebar ke dalam bak pemeliharaan larva, nauplius menunjukkan kondisi fisik yang baik, yang ditandai dengan sifat fototaksis positif. Pada bak pemeliharaan yang terinfeksi ZS, larva mulai menunjukkan gejala serangan ZS sejak stadia zoea-1 seperti tercantum pada Tabel 2.

Tabel 2. Gejala klinis larva *vannamei* yang terinfeksi zoea syndrome
Table 2. Clinical indication of *vannamei* larva infected by zoea syndrome

Stadia	Gejala klinis yang teramati
Nauplius 5-6	Larva tampak sehat, aktif berenang, fototaksis positif
Zoea-1	20-30 % populasi larva menunjukkan kondisi usus yang kosong
Zoea-2	70-80 % populasi larva menunjukkan kondisi usus yang kosong, mulai ditemukan bangkai larva yang berwarna putih
Zoea-3	Pada beberapa bak terjadi kematian masal hingga 100%, pada bak-bak lain larva masih bertahan hidup namun tidak bisa berganti stadia menjadi misis (terkadang membutuhkan waktu 3-6 hari untuk berubah dari stadia zoea-3 menjadi misis-1)

Zoea Syndrome selalu diawali dengan kondisi larva yang tidak mau makan dan apabila diperiksa dengan mikroskop, usus larva tampak kosong (gambar 1). Keadaan ini menyebabkan larva menjadi lemah sehingga pada stadia zoea-2 sudah mulai terjadi kematian. Pada stadia zoea-3 umumnya larva yang terinfeksi ZS sudah tidak dapat bertahan hidup, sehingga dijumpai kematian masal hingga 100%. Apabila larva masih bertahan hidup, larva membutuhkan waktu 3-6 hari untuk berpindah stadia dari zoea-3 menjadi misis-1. Pada akhirnya larva tersebut juga mengalami kematian masal. Pada larva yang sehat aktivitas makan berjalan dengan baik, usus tampak penuh dengan pakan dan larva bisa bertahan hidup hingga siap panen (PL-10).



Gambar 1. Larva vannamei yang terinfeksi ZS pada stadium zoea-1, usus tampak kosong (200 x)
 Figure 1. Vannamei larva infected by ZS at stadium zoea-1, intestine looked empty (200x)

Tabel 3 menunjukkan kisaran nilai hasil pengukuran parameter kualitas air. Berdasarkan rujukan dari Chanratchakool *et al.* (1994) tampak bahwa nilai pH dan alkalinitas total air media pemeliharaan larva vannamei berada pada kisaran yang layak untuk kelangsungan hidup larva vannamei.

Tabel 3. Kisaran nilai parameter kualitas air
 Table 3. Ranges of parameter value of water quality

Parameter	Kisaran nilai	Nilai rujukan
Nilai pH	7,64 – 8,08	7,5 – 8,5
Alkanilitas total (ppm)	80 – 152	> 80

menurut Chanratchakool *et al.* (1994)

Tabel 4 menunjukkan hasil isolasi bakteri *Vibrio* sp. dari air media pemeliharaan larva vannamei. Hasil isolasi bakteri *Vibrio* sp. mengindikasikan adanya peran bakteri *Vibrio* sp. pada saat terjadi kasus *Zoea Syndrome*. Diduga bakteri *Vibrio* sp. memanfaatkan kondisi larva yang lemah akibat tidak mau makan, mengingat *Vibrio* sp adalah bakteri yang bersifat oportunistik dan bertindak sebagai penginfeksi sekunder (Hjeltnes & Roberts, 1993). Bakteri ini dapat dijumpai di berbagai habitat, terutama daerah dengan kandungan bahan organik tinggi. Larva vannamei yang tidak mau makan menyebabkan sisa pakan dalam air media pemeliharaan menjadi bertumpuk, yang dapat dimanfaatkan oleh bakteri *Vibrio* sp. untuk berkembang. Hal ini tampak pada bak-bak larva yang terinfeksi ZS, dimana jumlah bakteri *Vibrio* sp. yang diisolasi dapat mencapai 2000 cfu/ml.

Tabel 4. Hasil isolasi bakteri *Vibrio* sp. dari air media pemeliharaan larva vannamei
 Table 4. The results of isolation of *Vibrio* sp bacteria from water of vannamei larva media

Asal Nauplius	Nomor bak	Terinfeksi ZS/tidak	Jumlah bakteri <i>Vibrio</i> sp. (cfu/ml)	
			Saat penebaran Nauplius	Saat infeksi ZS
PT. A, Jawa Timur	B-3	Tidak	160	-
	B-4	Tidak	120	-
	B-5	Tidak	0	-
	B-10	Tidak	0	-
	B-11	Tidak	0	-
	B-12	Tidak	40	-
	B-13	Tidak	0	-
	B-14	Tidak	0	-
	A-24	Tidak	0	-
	B-3	Tidak	40	-
	B-10	Tidak	160	-
	B-11	Tidak	0	-
	B-4	Tidak	80	-
	B-7	Tidak	360	-
	B-6	Tidak	0	-
	B-13	Tidak	0	-
	A-7	Terinfeksi	0	40
	A-8	Terinfeksi	0	0
A-11	Terinfeksi	0	1760	
A-12	Terinfeksi	0	1250	
PT. B, Jawa Timur	A-1	Terinfeksi	0	160
	A-2	Terinfeksi	0	40
	A-3	Terinfeksi	0	80
	A-4	Terinfeksi	0	0
	A-5	Terinfeksi	0	0
	A-6	Terinfeksi	0	0
PT. C, Jawa Timur	A-9	Terinfeksi	0	120
	A-10	Terinfeksi	0	40
PT. D, Jawa Tengah	A-1	Terinfeksi	0	160
	A-2	Terinfeksi	0	40
	A-3	Terinfeksi	0	400
	A-4	Terinfeksi	40	0
	A-5	Terinfeksi	0	400
	A-6	Terinfeksi	0	360
	A-7	Terinfeksi	0	360
	A-8	Terinfeksi	0	1440
	A-9	Terinfeksi	0	1480
	A-10	Terinfeksi	0	2000
	A-11	Terinfeksi	0	1250
	A-12	Terinfeksi	0	880
	A-13	Terinfeksi	0	360
	A-14	Terinfeksi	0	400
	A-15	Terinfeksi	0	1220
	A-16	Terinfeksi	0	800
	A-17	Terinfeksi	120	0
	A-18	Terinfeksi	0	0
	A-19	Terinfeksi	0	160
	A-20	Terinfeksi	0	40
	A-21	Terinfeksi	0	40
	A-22	Terinfeksi	0	80
	A-23	Terinfeksi	0	880

(-) : Tidak dilakukan isolasi bakteri *Vibrio* sp.

Kesimpulan

Zoea Syndrome ditandai dengan kosongnya usus larva karena larva tidak mau makan sejak stadia zoea-1, yang akhirnya menyebabkan terjadinya kematian masal larva hingga mencapai 100%. Prevalensi ZS juga relatif tinggi, yang dapat mencapai 100%.

Diduga terdapat hubungan antara ZS dengan keberadaan bakteri *Vibrio* sp., dimana jumlah bakteri ini pada bak yang terinfeksi ZS dapat mencapai 2000 cfu/ml. Larva vannamei yang negatif TSV masih memiliki kemungkinan untuk terinfeksi ZS.

Daftar Pustaka

- Chanratchakool, P., J.F. Turnbull, S. Funge-Smith, C. Limsuwan. 1994. Health Management in Shrimp Ponds. 2nd edition. Aquatic Animal Health Research Institute. Bangkok. Hal. 51.
- Elovaara, A.K. 2001. Shrimp Farming Manual: Practical Technology for Intensive Shrimp Production. Caribbean Press, Ltd. British West Indies, USA.
- Hadiroseyani, Y. 1990. Informasi Praktikum Parasit Ikan. Fakultas Perikanan Institut Pertanian Bogor. Bogor. Hal. 39.
- Haliman, R.W. 2003. Status Terkini Budi Daya Udang Penaeid di Indonesia. Hayati 10 (4) : 151-153.
- Hjetnes, B., R.J. Roberts. 1993. Vibriosis. *Dalam* Inglis, V., R.J. Roberts, N.R. Bromage (ed.). Bacterial Diseases of Fish. Blackwell Science. Hal. 109.