



Jurnal Sains Akuakultur Tropis

Departemen Akuakultur

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan - Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang 50275

Telp. (024) 7474698, Fax.: (024) 7474698

Email: sainsakuakulturtropis@gmail.com, sainsakuakulturtropis@undip.ac.id

STUDI KASUS KEBERADAAN PENYAKIT IMNV (INFECTIOUS MYONECROSIS VIRUS) PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) DI PERTAMBAKAN PEKALONGAN, JAWA TENGAH

*A Case Study About The Presence of IMNV (Infectious Myonecrosis Virus) Disease
in Vaname Shrimp (Litopenaeus vannamei) on Brackish Water Ponds in Pekalongan, Central Java*

Humidah Sarah, Slamet Budi Prayitno^{*}, Alfabetian Harjuno Condro Haditomo

Departemen Akuakultur

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah – 50275, Telp/Fax. +6224 7474698

^{*}Corresponding author (Email: sbudiprayitno@gmail.com)

ABSTRAK

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) menjadi salah satu spesies andalan bagi pertambakan di Indonesia. Salah satu kendala pada pembudidayaan udang vaname saat ini adanya penyakit IMNV (Infectious Myonecrosis Virus). Pekalongan merupakan salah satu produksi udang vaname yang cukup penting di Jawa Tengah. Pemantauan penyakit penting seperti IMNV sangat perlu dilakukan untuk mengetahui potensi resiko tertular dan tersebarnya penyakit IMNV di Pekalongan. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji status kesehatan udang khususnya dari infeksi IMNV pada tambak intensif di Kota Pekalongan. Metode penelitian yang dilakukan adalah menggunakan metode studi kasus, dengan melakukan pengambilan sampel udang melalui *purposive random sampling* dan wawancara kepada pemilik tambak. Jumlah udang 144 ekor dari 8 tambak terpilih. Hasil *real time* PCR dan analisa histopatologi terhadap organ daging bagian ekor menunjukkan bahwa 25% tambak contoh terinfeksi IMNV yaitu di desa Krapyak dan desa Kandang Panjang, sedangkan hasil histopatologi menunjukkan bahwa jaringan daging udang mengalami nekrosis. Berdasarkan hasil di atas, tambak intensif di Kota Pekalongan memiliki potensi terinfeksi IMNV pada tahap sedang.

Kata kunci: udang vaname, IMNV, PCR, histopatologi

ABSTRACT

Vaname shrimp (Litopenaeus vannamei) became a prime species cultivated in brackish water ponds in Indonesia. The problem that are often found in field, is IMNV (Infectious Myonecrosis Virus) disease. Pekalongan district is one of important shrimp produces in Central Java. Disease monitoring program is an important step that should be carried out especially for IMNV infection. This was to evaluate the potential disease infection and spread into the culture area. The aim of this research was to study the health status of intensive shrimp culture in Pekalongan with regard IMNV infection. 144 shrimp were randomly selected brackish water intensive ponds. The sample were then analysed by real time PCR to correct the present of IMNV. Histopathological study was also found. The research showed that 25% of intensive shrimp ponds samples were infected by IMNV. Furthermore, their caudal flesh demonstrated necrosis. This can be concluded that shrimp ponds in Pekalongan mildly risk of IMNV.

Keywords: vaname shrimp, IMNV, PCR, histopathology

PENDAHULUAN

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) menjadi salah satu spesies andalan bagi pertambakan di Indonesia. Berdasarkan keunggulannya udang vaname relatif tahan terhadap penyakit dan memiliki produktivitas yang relatif tinggi, namun kendala pada pembudidayaan udang saat ini adanya penyakit IMNV di pertambakan. (*Infectious Myonecrosis Virus*) IMNV merupakan salah satu virus menyerang udang vaname pada bagian otot dan hepatopankreas yang mengancam budidaya udang di Indonesia bahkan dunia.

Kota Pekalongan memiliki potensi yang besar dalam pengembangan sektor budidaya udang di Jawa Tengah. Potensi lahan yang besar tersebut juga tidak lepas dari kecenderungan penyebaran virus yang luas. Salah satu tambak di Pekalongan sudah terlihat gejala klinis bahwa vaname tersebut terindikasi IMNV. Hingga saat ini, metode pengobatan infeksi oleh virus belum ditemukan sehingga usaha yang dapat dilakukan adalah pencegahan. Salah satu metode pencegahan yaitu pengetahuan mengenai status penyebaran IMNV, dengan mengetahui status persebaran penyakit IMNV maka kerugian dalam kegiatan budidaya yang disebabkan oleh penyakit IMNV dapat diminimalisir.

Informasi tersebut diperlukan oleh pembudidayaan udang sehingga dilakukan studi kasus keberadaan penyakit IMNV dengan pendeteksi virus berupa metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan analisa histopatologi untuk mengetahui kerusakan sel atau jaringan yang telah ditimbulkan oleh virus tersebut. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu teknik uji terhadap virus melalui hasil reaksi berantai suatu primer dari rangkaian yang menggunakan enzim polymerase, sehingga menjadi amplifikasi DNA secara in vitro (Sunarto *et al.*, 2003). Perubahan bentuk atau struktur pada bagian otot udang yang terkena virus biasanya sulit dilihat. Perubahan struktur ini hanya dapat dilihat bila jaringan tubuh udang tersebut diamati menggunakan mikroskop. Menurut Khaisar, (2006) analisa histologi dapat menjadi parameter yang sangat sensitif dan menjadi sangat penting didalam menentukan perubahan struktur sel yang terjadi di organ dalam.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji status penyebaran IMNV di pertambakan dan memperoleh informasi untuk para petambak tentang status terkini perkembangan penyakit IMNV di Kota Pekalongan, Jawa Tengah.

MATERI DAN METODE

Udang uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah vaname. Jumlah total udang 144 ekor untuk pengambilan di 8 tambak, jadi tiap tambaknya udang vaname diambil 18 ekor dengan ukuran $7,67 \pm 2,80$ cm umur 1-2 bulan yang memiliki riwayat IMNV di Kecamatan Pekalongan Utara. Penelitian dilakukan pada bulan November 2016 sampai pada bulan Januari 2017. Total Lokasi sampling berjumlah 8 tambak dari 16 tambak pada Kecamatan Pekalongan Utara, Jawa Tengah. Tambak yang dijadikan lokasi sampling yaitu 4 tambak perwakilan dari Desa Degayu, 1 tambak dari Desa Kandang Panjang, dan 3 tambak dari Desa Krapyak. Analisis penyakit IMNV dilakukan di Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu Dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Juanda, Surabaya I.

Metode dalam penelitian ini adalah metode studi kasus, sedangkan metode pengambilan sampel menggunakan metode *purposive random sampling*. Prosedur penelitian ini terdapat tahap persiapan meliputi persiapan alat dan survey tempat. Tahap pelaksanaan meliputi wawancara, penentuan lokasi, pengambilan sampel, diagnosa virus menggunakan *Real Time* PCR dan pembuatan preparat histopatologi udang sampel.

Uji *real time* PCR terdiri dari tiga tahap. Tahap pertama menyiapkan standar IMNV dengan melakukan 5 pengenceran berseri (10^5 – 10^1) standar IMNV. Tahap kedua membuat *master mix* PCR untuk IMNV dengan komponen yaitu $2 \times$ *Multiplex* RT-PCR Buffer 12.5 μ l, $10 \times$ *Multiplex* RT-PCR *Enzyme Mix* 2.5 ml, $25 \times$ IMNV Primer Probe Mix 1 μ l dan RT-PCR *grade water* 1 μ l dengan total 17 μ l *master mix* per reaksi, kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* 1.5 ml. *Master mix* di *vortex* 5 detik dan di *spin* 5 detik dan dimasukkan ke dalam tiap sumuran *plate*. Ditambahkan 8 μ l RT-PCR *grade water* untuk sumuran *No Template Control* (NTC), 8 μ l untuk setiap konsentrasi standar, 8 μ l ekstrak RNA sebagai sampel target. Total volume per reaksi sebanyak 25 μ l. Tahap ketiga, amplifikasi IMNV. Profil amplifikasi yang digunakan yaitu suhu 48 °C selama 10 menit, suhu 95 °C selama 10 menit, 95 °C selama 15 detik 40 siklus dan suhu 60 °C selama 1 menit.

Pembuatan preparat histopatologi udang mengacu pada prosedur NWFHS (2009) yaitu, preparasi organ otot, dehidrasi, *clearing*, dan infiltrasi lalu *embedding*, pemotongan jaringan dan terakhir pewarnaan. Pembuatan preparat dilakukan untuk melihat perubahan bentuk atau struktur pada bagian otot udang yang terkena IMNV.

Hasil dari Uji PCR dapat dihitung prevalensi tambak yang terindikasi IMNV. Rumus prevalensi menurut Cameron (2002) yaitu sebagai berikut:

$$\text{Prevalensi} = \frac{\text{Jumlah positif IMNV}}{\text{Jumlah total sampel}} \times 100\%$$

HASIL

Berdasarkan hasil penentuan lokasi sampling dengan tambak yang riwayat terindikasi IMNV di Kecamatan Pekalongan Utara yaitu Desa Degayu, Desa Kandang Panjang dan Desa Krapyak. Jumlah Tambak

untuk lokasi sampling ada 8 tambak. Desa Degayu berjumlah 4 tambak, Desa Kandang Panjang 1 Tambak dan Desa Krpyak berjumlah 3 Tambak. Berikut adalah peta tambak Kecamatan Pekalongan Utara tersaji pada Gambar 1.

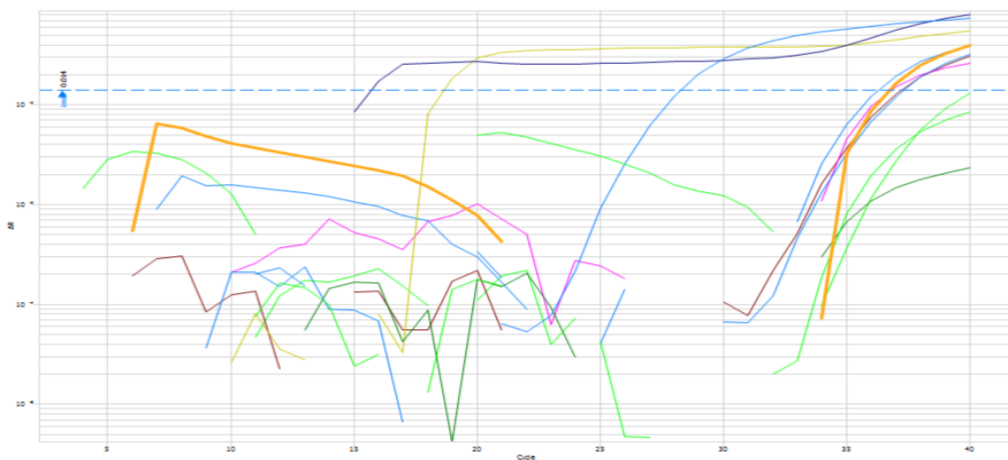


Gambar 1. Peta lokasi tambak Kecamatan Pekalongan Utara; (1) Kandang Panjang, (2) Degayu (3) Krpyak.

Penentuan lokasi sampling berdasarkan pada tambak terindikasi IMNV yang berada di Desa Kandang Panjang, Desa Degayu dan Desa Krpyak yaitu dengan hasil pengambilan undian nomor secara acak 50% dari 16 tambak, berikut adalah tambak yang terpilih sebagai lokasi sampling dengan kode sampel:

- Desa Kandang Panjang = G
- Desa Degayu = A, B, C dan D
- Desa Krpyak = E, F, dan H

Hasil pengujian IMNV pada sampel udang vaname dengan *real time* PCR tersaji pada Gambar 2.




Gambar 2. Hasil Uji IMNV dengan *real time* PCR pada udang vaname

Hasil uji *real time* PCR dapat diketahui nilai Ctnya, Ct adalah jumlah waktu siklus yang dibutuhkan oleh sinyal fluoresen untuk mencapai garis *threshold*. Pada awal siklus sinyal fluoresen masih lemah, kemudian sinyal tersebut akan naik secara eksponensial, jika suatu sampel melewati garis *threshold* dengan Ct < 29 maka dapat dikatakan sampel tersebut positif. Nilai Ct IMNV pada *real time* PCR tersjadi pada Tabel 1.

Tabel 1. Keterangan nilai Ct IMNV pada *real time* PCR.

No	Warna	Sampel	Ct
1.	■	A	36,28
2.	■	B	N/A
3.	■	C	37,2

4.		D	36,8
5.		E	18,58
6.		F	N/A
7.		G	15,65
8.		H	36,7
9.		+ IMNV	28,25
10.		NTC	N/A

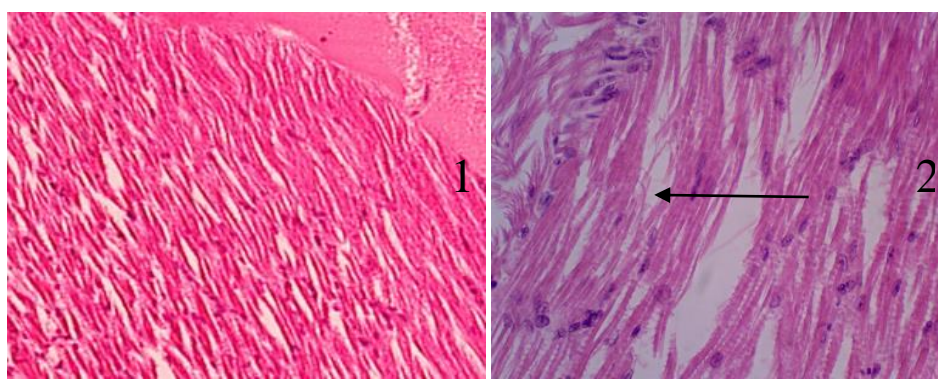
Hasil pemeriksaan sampel menunjukkan sampel E dan G positif karena memotong garis *threshold* IMNV dengan Ct 18,58 dan 15,65. Sampel A, C, D, H nilai Ct berkisar 36 – 37, sampel B dan F negatif penyakit IMNV. Ct digunakan untuk menghitung *copy* DNA. Semakin banyak *copy* DNA semakin sedikit jumlah salinan virus terdeteksi. Jumlah Ct yang banyak menunjukkan adanya virus yang sedikit, dan sebaliknya jumlah Ct yang sedikit menunjukkan adanya virus yang banyak dalam sampel. Berdasarkan hasil PCR dapat dihitung prevalensi tambak yang terindikasi IMNV. Perhitungan prevalensi diperoleh dari jumlah udang yang positif IMNV dibandingkan dengan jumlah seluruh udang yang diambil saat sampling. Perhitungan prevalensi dapat di lihat pada Tabel 2.

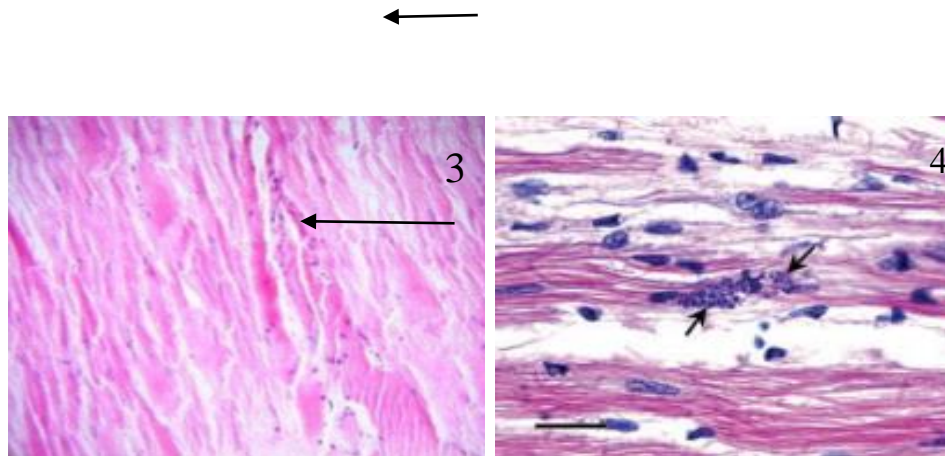
Tabel 2. Perhitungan prevalensi

No	Tambak sampel	Jumlah Udang	Keterangan IMNV
1.	Tambak A	18 ekor	-
2.	Tambak B	18 ekor	-
3.	Tambak C	18 ekor	-
4.	Tambak D	18 ekor	-
5.	Tambak E	18 ekor	+
6.	Tambak F	18 ekor	-
7.	Tambak G	18 ekor	+
8.	Tambak H	18 ekor	-
Jumlah		144 ekor	36 ekor (+)

Berdasarkan hasil dapat diketahui prevalensi dengan jumlah udang yang positif IMNV adalah 36 ekor total udang sampel seluruhnya 144 ekor. Dimasukan kedalam rumus jumlah positif IMNV dibandingkan dengan total sampel seluruhnya, jadi prevalensi tambak sampel di Kecamatan Pekalongan Utara yaitu 25%.

Melalui pembuatan preparat histologi yang telah dilakukan didapatkan hasil gambaran histopatologi otot udang vaname yang positif IMNV. Hasil histopatologi yang didapatkan udang yang terkena IMNV menunjukan adanya nekrosis dan ifiltrasi hemosit pada bagian otot. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Poulus *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa udang vaname menunjukan gejala nekrotik pada otot daging setelah disuntik virion IMNV. Pengamatan preparat pada organ otot udang vaname dengan perbesaran 100x. Hasil histopatologi udang vaname tersaji pada Gambar 3.





Gambar 3. Histopatologi udang vaname; (1) udang sampel tambak kode E (2) udang sampel tambak G (3) menurut Tang *et al.* (2005) (4) menurut Poulos *et al.* (2006). Tanda panah; Jaringan otot mengalami nekrosis disertai infiltrasi hemosit dan badan inklusi.

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh ada beberapa faktor kemungkinan yang menyebabkan tambak tersebut positif IMNV yaitu, desain dan tata letak antar tambak yang tidak sesuai dan tidak teratur menyebabkan virus mudah terjadi. Tidak teratur tata letak dari beberapa lokasi tambak, serta desain *inlet* dan *outlet* dari pertambakan yang juga tidak sesuai mengakibatkan penyebaran virus terjadi di dalam tambak. Ketidaksesuaian penempatan inlet dan outlet dari pertambakan menyebabkan air buangan, yang banyak mengandung limbah dan kemungkinan mengandung bibit penyakit, dari salah satu tambak menjadi air masukan pada *inlet* tambak lain. Air buangan yang digunakan untuk kegiatan budidaya pada tambak lain tersebut memiliki kualitas yang buruk sehingga menyebabkan udang yang dibudidayakan stres dan lebih rentan terserang penyakit. Menurut Subiyakto (2009), menyatakan bahwa faktor yang memicu stress pada udang dan menyebabkan daya tahan tubuh udang menurun. Penurunan daya tahan tubuh mengakibatkan udang lebih mudah terjangkit penyakit. Hal tersebut dapat menjadi salah satu penyebab munculnya IMNV di tambak yang positif IMNV.

Kemampuan metoda diagnosa mendeteksi infeksi penyakit pada tahap awal sangat penting untuk pengendalian penyakit. Metoda deteksi patogen yang cepat, sensitif menjadi prioritas utama dalam pengendalian penyakit. Kemampuan *real time* RT-PCR udang yang terinfeksi IMNV menjadikan metoda deteksi ini sangat dibutuhkan dalam pengendalian infeksi IMNV. Jaringan yang diambil untuk diuji *real time* RT-PCR yaitu pleopod, otot dan insang. Menurut Andrade *et al.* (2007), menyatakan bahwa sampel udang klinis dan sub klinis yang diuji menunjukkan nilai Ct maupun konsentrasi jumlah salinan tertinggi IMNV adalah pada jaringan otot dan pleopod. Jaringan udang yang memiliki jumlah virus terbesar adalah pada haemolim dan otot, diikuti dengan pleopod dan insang. Berdasarkan hasil pengujian PCR pada sampel dengan jumlah delapan sampel menunjukkan sampel E dan G positif IMNV dengan Ct 18,58 dan 15,65. OIE (2009), Ct <29 adalah reaksi positif yang kuat menunjukkan asam nukleat target yang berlimpah dalam sampel. Ct dari 30 - 37 menunjukkan reaksi lemah.

Berdasarkan hasil perhitungan prevalensi dari data penelitian didapatkan prevalensi IMNV di Kecamatan Pekalongan Utara sebesar 25% dari total 8 tambak 2 tambak yang positif IMNV. Dari data sebelumnya nilai prevalensi di tambak Kecamatan Pekalongan Utara 10%. Prevalensi di wilayah sampling 25% dapat dikatakan wilayah sampling memiliki resiko penyakit sedang. Prevalensi 16-25% wilayah secara produksi memiliki resiko penyakit sedang (Prayitno, *personal communication*, 2016).

Tambak yang positif IMNV yaitu tambak sampel E dan tambak sampel G. Ada beberapa faktor nilai prevalensi IMNV di pertambakan Kecamatan Pekalongan Utara meningkat yaitu transmisi horizontal IMNV di pertambakan diduga 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 mengkontaminasi pertambakan lain yang berada di kawasan tersebut yang juga mengambil air laut yang sudah terkontaminasi sehingga infeksi virus semakin meluas. Desain dan tata letak antar tambak yang tidak sesuai dan tidak teratur menyebabkan virus mudah terjadi. Tidak teratur tata letak dari beberapa lokasi

tambak, serta desain *inlet* dan *outlet* dari pertambakan yang juga tidak sesuai mengakibatkan penyebaran virus terjadi di dalam tambak. Ketidak sesuaian penempatan *inlet* dan *outlet* dari pertambakan menyebabkan air buangan yang banyak mengandung limbah dan kemungkinan mengandung bibit penyakit, dari salah satu tambak menjadi air masukan pada *inlet* tambak lain. Air buangan yang digunakan untuk kegiatan budidaya pada tambak lain tersebut memiliki kualitas yang buruk sehingga menyebabkan udang yang dibudidayakan stres dan lebih rentan terserang penyakit. Ada faktor pendukung lain yang mempengaruhi nilai prevalensi IMNV meningkat yaitu adanya perubahan iklim. Perubahan iklim dapat membuat udang menjadi stres dan menyebabkan ketahanan tubuh menurun. Menurut Costa *et al.* (2009), menyatakan bahwa faktor pendukung lain yang mempengaruhi nilai prevalensi IMNV cukup tinggi yaitu adanya dampak dari perubahan iklim. Perubahan iklim yang tercermin dari pergantian cuaca harian yang ekstrim, membuat suhu perairan berfluktuasi. Perubahan cuaca dan suhu perairan tersebut memicu stres pada udang dan menyebabkan daya tahan tubuh udang menurun.

Hasil histopatologi dari sampel yang positif IMNV pada jaringan otot udang vaname terdapat kerusakan jaringan atau nekrosis pada bagian otot udang. Histologi otot udang uji menunjukkan adanya perubahan dibandingkan dengan histologi otot udang normal. Hal ini terlihat dengan terjadinya nekrosis dan adanya infiltrasi hemosit pada jaringan otot. Menurut Takashima *et al.* (1995), menyatakan bahwa nekrosis ialah keadaan dimana sel dan jaringan mengalami penurunan aktivitas dan akhirnya mati. Sel yang mengalami nekrosis terlihat hancur dan akan hilang atau mati. Otot merupakan jaringan yang umum digunakan sebagai sampel untuk pengujian skala sel untuk IMNV. Secara umum udang yang terinfeksi virus IMNV menunjukkan lesi pada otot skeletal, koagulasi nekrosis termasuk nekrosis *multifocal*, kongesti pada *hemocyte*, inflamasi *fibrocytic*, fagositosis dan bodi inklusi sitoplasma serta infiltrasi *hemocyte* (Tang *et al.*, 2005).

KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah status penyebaran penyakit IMNV pada pertambakan Kecamatan Pekalongan Utara yaitu ditemukan hasil positif IMNV pada tambak sampel E dan tambak sampel G dengan prevalensi yang didapatkan 25% yakni tambak tersebut tingkat keberadaan penyakit IMNV memiliki potensi terinfeksi pada tahap sedang.

SARAN

1. Sebaiknya tersedianya bak tandon di tambak untuk sterilisasi air, jika tambak tersebut terkena IMNV, air di sterilisasi terlebih dahulu tidak membuang air ke laut secara langsung.
2. Sebaiknya desain dan tata letak *inlet* maupun *outlet* dibuat teratur seperti saluran *outlet* dari satu tambak tidak menjadi air masukan pada *inlet* tambak lain dan penyusunan yang sesuai dari lokasi beberapa tambak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Dinas Peternakan Perikanan dan Kelautan Pekalongan yang telah mengizinkan tempat dan fasilitas untuk pelaksanaan sampling penelitian ini, Balai Karantina Ikan dan Pengendalian Mutu kelas I Juanda yang telah memberi fasilitas untuk penelitian ini, Novia Cristhi sebagai penyelia histologi dan Fatoni sebagai penyelia PCR, dan semua pihak yang telah membantu kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrade, TPD. Srisuvan. T, Tang KFJ, Lightner, DV. 2007. Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay Using TaqMan probe for Detection and Quantification of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV). *Aquaculture* 264:9–15.
- Cameron, A. 2002. Survey Toolbox for Aquatic Animal Disease- a Practical Manual and Software Package. *ACIAR Monograph*. No. 94. 375p.
- Costa, AM. Buglione, CC, Bezerr, FL, Martins, PCC. Barracco, MA. 2009. Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. *Aquaculture* 291:141-146.
- Khaisar, O. 2006. Kandungan Timah Hitam (Pb) dan Kadmium (Cd) dalam Air, Sedimen dan Bioakumulasi Serta Respon Histopatologis Organ Ikan Alu-alu (*Sphyræna barracuda*) di Perairan Teluk Jakarta. [Skripsi]. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Pp 6-8.
- Mumford, S. 2009. Chapter 13 Histology of Finfish. 5th ed., NWFHS Laboratory Procedures Manual, Washington D.C. 350 p.

- OIE [Office International des Epizooties; World Organisation for Animal Health]. 2009. Infectious Myonecrosis. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 96–104.
- Poulos, B.T., K.F.J. Tang., C.R. Pantoja., J.R. Bonami., D.V. Lightner. 2006. Purification and Characterization of Infectious Myonecrosis Virus of Penaeid Shrimp. *Journal of General Virology*. 87:987-996.
- Takashima. F, Hibiya, T. 1995. *An Atlas of Fish Histology: Second Edition*. Tokyo:Kodansha Ltd. Pp 789-848.
- Tang, KFJ. Pantoja, CR. Poulos, BT. Redman, RM. Lightner, DV. 2005. In Situ Hybridization demonstrates that *Lithopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Dis. Aquat. Org.* 63:261-265.
- Subiyakto, S., Sutende, D., Afandi, M., dan Sofiati 2009. Budidaya Udang *Vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) Semi Intensif dengan Metode Sirkulasi Tertutup untuk Menghindari Serangan Virus. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* Vol 1 No 2. Situbondo.121-127 hal.
- Sunarto, A., T.I. Koesharyani., A. Rukyani. 2003. Prosedur PCR Untuk Diagnosa Cepat Penyakit Bercak Putih Pada Udang. Direktorat Kesehatan Ikan dan Lingkungan . Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya . Jakarta. 20 hlm.