

PENGARUH JENIS VAKSIN DAN KONSENTRASI VITAMIN C TERHADAP SINTASAN PASCALARVA UDANG WINDU YANG DIPAPAR DENGAN *WHITE SPOT SYNDROME VIRUS* (WSSV)

Muharijadi Atmomarsono, Muliani, dan Mun Imah Madeali

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis vaksin dan konsentrasi vitamin C (Vit. C) terhadap sintasan pascalarva udang windu yang terpapar dengan *White Spot Syndrome Virus* (WSSV). Penelitian dilakukan di Laboratorium Basah Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros yang terdiri atas beberapa tahap; (1) produksi vaksin WSSV dan vaksin vibrio; (2) Uji LC₅₀ WSSV; (3) aplikasi vaksin dengan metode perendaman; dan (4) uji papar dengan WSSV. Parameter yang diamati meliputi sintasan pascalarva udang windu dan nilai RPS vaksin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sintasan pascalarva udang windu tertinggi pada perlakuan yang menggunakan vaksin vibrio metode formalin + Vit. C 0,05 mg/L. Namun demikian tidak terdapat perbedaan yang nyata terhadap semua perlakuan, kecuali dengan kontrol penggunaan vaksin WSSV + Vit. C 0,01 mg/L, dan penggunaan vaksin vibrio metode formalin + Vit. C 0,03 mg/L. Nilai RPS tertinggi (50%) diperoleh pada perlakuan vaksin vibrio dengan metode formalin+ Vit. C 0,05 mg/L. Hal ini menunjukkan bahwa jenis vaksin vibrio + Vit. C 0,05 mg/L lebih efektif sebagai immunostimulan dibanding dengan jenis vaksin lainnya yang digunakan.

ABSTRACT: *Effect of different vaccine and Vit. C concentration on survival rate of tiger shrimp postlarvae, challenged with White Spot Syndrome Virus (WSSV). By: Muharijadi Atmomarsono, Muliani, and Mun Imah Madeali*

The objective of research is to know the effect of different vaccine and Vit. C concentration on survival rate of tiger shrimp postlarvae challenged with White Spot Syndrome Virus (WSSV). Research was conducted in the wet laboratory of Research Institute for Coastal Aquaculture (RICA), consists of several activities, i.e. (1) production of WSSV and Vibrio vaccines; (2) LC₅₀ Test for WSSV virus; (3) immersed vaccine and Vit. C and (4) challenge test with WSSV virus. The parameters observed were survival rate of tiger shrimp postlarvae and RPS of value of vaccine. The results of experiment showed that the highest survival rate was achieved by tiger shrimp postlarvae treated with vibrio vaccine + Vit. C 0.05 mg/L. Statistical analysis showed that the survival rates of tiger shrimp postlarvae were mostly not significantly different within the treatments, but there were significantly different with control, the use virus vaccine + Vit. C 0.01 mg/L and vibrio vaccine + Vit. C 0,05 mg/L. The highest RPS value was showed in vibrio vaccine + Vit. C 0.05 mg/L. It is concluded that the vibrio vaccine + Vit. C 0.05 mg/L was the most effective immunostimulant among the vaccines tested in this experiment.

KEYWORDS: *vaccine, vitamin C, tiger shrimp, White Spot Syndrome Virus*

PENDAHULUAN

Berbagai kasus penyakit di tambak telah dilaporkan oleh petani tambak, mulai dari penyakit udang lumutan, udang menyala, insang merah, udang berkepala kuning, sampai pada penyakit udang bintik putih. Demikian halnya di panti benih dilaporkan adanya kasus penyakit udang menyala (berpendar) yang disebabkan oleh *Vibrio harveyi* yang menyebabkan kematian massal pada larva udang windu. Madeali *et al.* (1998) melaporkan bahwa ada tiga jenis virus yang telah diidentifikasi menyerang

udang di Sulawesi Selatan baik di panti perbenihan maupun di tambak pembesaran yaitu *Monodon Baculo Virus* (MBV), *White Spot Syndrome Virus* (WSSV), dan *Hepatopancreatic Parvo-like Virus* (HPV). Albaladejo *et al.* (1998) melaporkan bahwa sebanyak 250 ekor sampel udang dari beberapa daerah pertambakan di Filipina, dengan metode Enzym Immunoassay (EIA) dideteksi 41 sampel di antaranya positif terserang *Yellow Head Virus* (YHV). Di India, sebanyak 630 sampel udang yang terdiri atas pascalarva dan yuwana, 53% di antaranya positif terserang WSSV (Vaseeharan *et al.*, 2003). Beberapa

jenis virus (*Baculo-like viruses*) ditemukan menyerang udang di Taiwan dan Jepang sehingga menurunkan produksi udang di kedua negara tersebut. Di Taiwan misalnya, produksi udang windu menurun dari 90.000 MT pada tahun 1987 menjadi 20.000 MT pada tahun 1989, dan sampai sekarang produksi udang di negara tersebut belum pulih kembali (Maeda, 1999).

WSSV merupakan salah satu jenis virus yang paling banyak menimbulkan kematian udang di tambak (Peng *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003). Menurut Chang *et al.* (1998), WSSV dapat mengakibatkan mortalitas pada udang windu sebesar 100% dalam waktu 2—7 hari. Pada udang yang terserang virus ini secara morfologi terdapat bintik putih.

Berbagai usaha telah dilakukan untuk menanggulangi penyakit udang di Indonesia, di antaranya melalui penggunaan vaksin dan immunostimulan. Menurut Kamiso (1996), vaksin adalah suspensi patogen hidup yang sudah dilemahkan, patogen yang sudah dimatikan, bagian dari patogen atau substrat yang merupakan produk patogen yang bersifat antigenik, immunogenik, dan protektif. Syarat dari suatu vaksin harus bersifat immunogen, artinya harus dapat merangsang dalam pembentukan antibodi yang bertujuan untuk mendapatkan kekebalan secara aktif, di mana antigen tersebut bersama dengan sel limfoid membentuk antibodi (Supriyadi, 1990; Brock *et al.*, 1994; Madigan *et al.*, 2000). Selanjutnya Kamiso (1996) menyatakan bahwa vaksinasi adalah proses memasukkan antigen (vaksin) ke dalam tubuh ikan/udang untuk mendapatkan kekebalan spesifik dan non-spesifik sehingga ikan / udang kebal terhadap patogen tertentu. Dari hasil penelitian sebelumnya terlihat bahwa vaksin virus walaupun belum mampu menekan kematian udang, namun dari uji ELISA menunjukkan nilai kerapatan optikal (OD) yang lebih rendah pada benur yang lebih sering divaksin. Penambahan vitamin C pada dosis 0,05 mg/L yang diberikan setiap 4 hari juga dapat meningkatkan kekebalan benur windu terhadap serangan WSSV.

Pengujian dan pemanfaatan vaksin vibrio dengan penambahan vitamin C masih perlu dilakukan dan dikaji lebih lanjut. Hal ini dimaksudkan untuk lebih meningkatkan efektivitas penggunaannya dalam meningkatkan ketahanan udang terhadap serangan penyakit. Dengan demikian sintasan larva udang windu dapat ditingkatkan dan pada gilirannya akan menaikkan produksi udang windu.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis vaksin dan konsentrasi Vitamin C terhadap sintasan larva udang windu yang dipapar dengan virus WSSV.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan Vaksin

Vaksin (*crude vaccine*) WSSV dibuat dengan cara mematikan antigen virus dengan formalin (Fryer *et al.*, 1976 dalam Wolf, 1988) yaitu dari sampel udang windu yang secara morfologi mempunyai tanda bintik putih yang disebabkan oleh virus WSSV (Gambar 1). Karapas udang dikerik dan digerus hingga halus, kemudian dihomogenkan, disentrifugasi, dan disaring dengan filter milipore 450 nm. Filtranya (virus) kemudian dimatikan dengan formalin 1% selama 24 jam pada suhu 4°C. Kemudian disentrifugasi dan dicuci 3 kali dengan larutan fisiologis (NaCl 0,85%). Adapun vaksin bakteri (*V. harveyi*) dibuat berdasarkan modifikasi dari metode Kamiso (1996) yaitu dari Antigen (Ag) tidak murni sebagai berikut:

1. Seluruh (Ag H atau flagella) dibuat dari kultur murni cair (*broth*) dimatikan dengan formalin 1% selama 24 jam pada suhu 4°C, kemudian dipanen dan dicuci 3 kali dengan 0,85% larutan garam NaCl dengan sentrifugasi (> 3.000 rpm selama 20 menit).
2. Ag-O atau LPS yang diperoleh dari kultur murni cair *Vibrio* dipanaskan pada suhu 100°C selama 20 menit. Selanjutnya dipanen dan dicuci 3 kali dengan 0,85 % larutan garam NaCl dengan sentrifugasi (> 3.000 rpm selama 20 menit).

Uji LC₅₀ Virus WSSV terhadap Pascalarva Udang Windu

Penelitian ini dilakukan pada skala laboratorium dengan menggunakan stoples kaca berkapasitas 3 L yang masing-masing diisi 2 L air dengan salinitas 27—28 ppt yang telah disterilkan memakai kaporit dan dinetralkan dengan natrium tiosulfat. Tiap stoples diisi 30 ekor benur windu PL-20 yang sebelumnya telah diaklimatisasikan terhadap suhu dan salinitas air. Untuk uji LC₅₀ WSSV terhadap larva udang windu digunakan 9 tingkatan konsentrasi yaitu; (1) 0 mL (kontrol); (2) 1,78 mL; (3) 3,1 mL; (4) 5,62 mL; (5) 10 mL; (6) 17,78 mL; (7) 31,62 mL; (8) 56,23 mL; dan (9) 100 mL per 2 liter air media. Masing-masing konsentrasi diulang tiga kali. Kematian pascalarva udang windu diamati setelah 24 jam perendaman. Penghitungan dosis mematikan 50% pascalarva udang windu dilakukan menggunakan analisis probit (Steel & Torrie, 1981).

Perendaman dengan Immunostimulan dan Uji Papar dengan WSSV

Penelitian ini dilakukan pada skala laboratorium dengan menggunakan stoples kaca berkapasitas 3 L yang masing-masing diisi 2 L air bersalinitas 27—28

ppt yang telah disterilkan dengan kaporit dan dinetralkan dengan natrium tiosulfat. Tiap stoples diisi 30 ekor benur windu PL-20 yang sebelumnya telah diaklimatisasikan terhadap suhu dan salinitas air. Dalam penelitian ini digunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial, masing-masing dengan tiga ulangan. Faktor A (jenis immunostimulan) meliputi: 1) LPS vibrio metode ekstraksi air-phenol panas (produksi Balai Riset Perikanan Budi Daya Air Tawar, Bogor); 2) vaksin vibrio metode suhu (produksi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros); 3) vaksin vibrio metode formalin (produksi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros); 4) vaksin virus WSSV metode formalin (produksi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros). Sedangkan faktor B (dosis vitamin C Polyphosphat) adalah: 1) 0,00 mg/L; 2) 0,01 mg/L; 3) 0,03 mg/L; dan 4) 0,05 mg/L. Keempat jenis immunostimulan diaplikasikan dengan frekuensi 3 kali, yaitu pada hari ke-1, ke-5, dan ke-9. Sedangkan penambahan vitamin C ke dalam media dilakukan setiap hari hingga hari ke-8. Uji papir (infeksi buatan) dengan WSSV pada konsentrasi LC_{50} (konsentrasi virus yang mematikan 50% udang yang tidak divaksin dan tidak diberi vitamin C) dilakukan pada hari ke-12. Pengamatan kematian benur windu dilakukan 24 jam setelah uji papir.

ANALISIS HASIL

Sintasan Pascalarva Udag Windu

Sintasan pascalarva udang dianalisis ragamnya dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (Steel & Torrie, 1981). Sebelum dianalisis ragam, data sintasan pascalarva udang windu dinormalkan dengan transformasi *Arcsine* (Fowler & Cohen, 1990).

Tingkat Sintasan Relatif (*Relative Percent Survival*)

Untuk mengetahui efikasi vaksinasi, maka dilakukan penghitungan tingkat sintasan relatif atau *relative percent survival* (RPS) pascalarva udang windu dengan menggunakan rumus Ellis (1988) sebagai berikut:

$$RPS = \left(1 - \frac{\% \text{Mortalitas udang yang divaksin}}{\% \text{Mortalitas udang kontrol}} \right) \times 100\%$$

Jika nilai RPS-nya 50% atau lebih maka vaksin tersebut efektif untuk digunakan (Ellis, 1988).

HASIL DAN BAHASAN

Penampakan udang yang terserang WSSV yang dikoleksi sebagai sumber vaksin dan sumber WSSV pada uji tantang disajikan pada Gambar 1.

Hasil analisis probit terhadap data kematian pascalarva udang windu di laboratorium menunjukkan bahwa konsentrasi WSSV yang mematikan 50% pascalarva udang windu setelah 24 jam perendaman adalah 46,27 mL/2L air media. Konsentrasi ini selanjutnya digunakan untuk uji papir pada penelitian pengaruh penggunaan immunostimulan dan penambahan Vit. C terhadap pascalarva udang windu. LC_{50} % WSSV yang didapatkan pada penelitian ini sedikit lebih tinggi dibanding LC_{50} % WSSV yang didapatkan tahun sebelumnya (30 mL/2 air media). Hal ini menunjukkan bahwa penyimpanan telah menurunkan tingkat virulensi WSSV terhadap pascalarva udang windu.

Penggunaan vaksin vibrio metode formalin dengan penambahan Vit. C 0,05 mg/L memberikan sintasan



Gambar 1. Penampakan udang windu yang terserang *White Spot Syndrome Virus* (WSSV)
Figure 1. *Tiger shrimp performance infected by White Spot Syndrome Virus* (WSSV)

pascalarva udang windu tertinggi yaitu sebesar 52,22%, kemudian menyusul penggunaan vaksin WSSV dengan penambahan vitamin C 0,03 mg/L sebesar 43,33% dan terendah pada kontrol (tanpa immunostimulan) yaitu 5,55% (Tabel 1). Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa tingkat sintasan tertinggi larva udang windu yang dipapar dengan WSSV didapatkan pada pemberian LPS vibrio dengan konsentrasi 30 g/kg pakan (Hamzah, 2001) sebesar 52,33%.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara sintasan pascalarva udang windu pada perlakuan penggunaan vaksin vibrio metode formalin + Vitamin C 0,04 mg/L dengan kontrol (tanpa immunostimulan) dan perlakuan yang menggunakan vaksin WSSV + Vitamin C 0,01 mg/L. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin vibrio yang digunakan memberikan efek yang lebih baik terhadap terbentuknya kekebalan tubuh pada pascalarva udang windu, sehingga lebih tahan terhadap serangan WSSV. Meskipun vaksinasi hasilnya hanya baik untuk hewan bertulang belakang seperti ikan, akan tetapi vaksinasi di sini juga dapat meningkatkan pertahanan

humoral (terbentuknya Ab protektif) dan pertahanan humoral pada krustase dapat dibentuk melalui *anti-bacterial protein* seperti LPS dan B-glukan (Soderhall, 1998; Kamiso, 1996). Selanjutnya dikatakan bahwa walaupun sistem kekebalan tubuh pada udang tidak spesifik, namun sistem kekebalan tersebut terbentuk jika bersentuhan dengan benda asing. Takahashi *et al.* (1998) melaporkan bahwa fucoidan, semacam sulfat polysakarida dari alga coklat dapat mencegah serangan WSSV pada udang.

Menurut Vargas-Albores *et al.* (1998), Lipopolisakarida dari bakteri dan b-glukan dari jamur dapat mengaktifkan pertahanan selular pada udang dengan meningkatkan sifat fagositosis, melanisasi, enkapsulasi, dan koagulasi pada udang, sedangkan menurut Roux *et al.* (2002), Lipopolisakarida dan B-1,3 glukan binding protein (LGBP) memegang peranan penting dalam sistem pertahanan pada krustase dan invertebrata. Devaraja *et al.* (1998) melaporkan bahwa immunostimulasi pada udang windu dapat ditingkatkan dengan pemberian bakterisidal dari bakteri vibrio (yang dimatikan dengan pemanasan) yang dikombinasikan dengan b-glukan. Sedangkan

Tabel 1. Sintasan pascalarva udang windu (%) setelah 24 jam perendaman dengan virus WSSV
 Table 1. Survival rate (%) of tiger shrimp postlarvae after 24 hours exposed with WSSV virus

| Jenis vaksin (Kinds of vaccine) | Dosis Vit. C (mg/L) Dosage of Vit. C (mg/L) | Sintasan (%) larva udang windu Survival rate (%) of tiger shrimp larvae |
|--|---|---|
| LPS vibrio metode ekstraksi air phenol panas <i>Hot water-phenol-extracted vibrio LPS</i> | 0.00 | 38.00 ^{ab} |
| | 0.01 | 31.11 ^{ab} |
| | 0.03 | 19.98 ^{ab} |
| | 0.05 | 15.55 ^{ab} |
| Vaksin vibrio metode pemanasan pada suhu 100°C <i>100°C heat-killed vibrio</i> | 0.00 | 38.89 ^{ab} |
| | 0.01 | 33.33 ^{ab} |
| | 0.03 | 26.67 ^{ab} |
| | 0.05 | 36.66 ^{ab} |
| Vaksin vibrio metode formalin <i>Formalin-killed vibrio</i> | 0.00 | 20.00 ^{ab} |
| | 0.01 | 12.22 ^{ab} |
| | 0.03 | 8.89 ^b |
| | 0.05 | 52.22 ^a |
| Vaksin WSSV metode formalin <i>Formalin-killed WSSV</i> | 0.00 | 14.44 ^{ab} |
| | 0.01 | 7.78 ^b |
| | 0.03 | 43.33 ^{ab} |
| | 0.05 | 24.22 ^{ab} |
| Tanpa vaksinasi <i>Without vaccine</i> | - | 5.55 ^b |

^{a)} Nilai rata-rata diikuti huruf yang sama dalam kolom yang sama, tidak menunjukkan perbedaan nyata pada taraf nyata ($P > 0,05$)

^{b)} Values in the column followed by the same superscript are not significantly different ($P > 0.05$)

Tabel 2. Tingkat Sintasan Relatif (*RPS*) pascalarva udang windu setelah 24 jam perlakuan
 Tabel 2. *Relative Percent Survival (RPS) value of tiger shrimp postlarvae after 24 hours treatment*

| Jenis vaksin <i>Kinds of vaccine</i> | Dosis Vit. C (mg/L) <i>Dosage of Vit. C (mg/L)</i> | Nilai <i>RPS</i> (%) <i>RPS value (%)</i> |
|--|---|--|
| LPS vibrio metode ekstraksi air-phenol panas <i>Hot water-phenol-extracted vibrio LPS</i> | 0.00 | 26 |
| | 0.01 | 27 |
| | 0.03 | 5 |
| | 0.05 | 11 |
| Vaksin vibrio metode pemanasan pada suhu 100°C <i>100°C heat-killed vibrio</i> | 0.00 | 35 |
| | 0.01 | 29 |
| | 0.03 | 22 |
| | 0.05 | 33 |
| Vaksin vibrio metode formalin <i>Formalin-killed vibrio</i> | 0.00 | 15 |
| | 0.01 | 7 |
| | 0.03 | 4 |
| | 0.05 | 50 |
| Vaksin WSSV metode formalin <i>Formalin-killed WSSV</i> | 0.00 | 9 |
| | 0.01 | 2 |
| | 0.03 | 40 |
| | 0.05 | 20 |

menurut Sung *et al.* (1994), B-glukan dapat meningkatkan aktivitas phenoloksidase pada hemosit udang. Berdasarkan hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pertahanan intraseluler udang dapat dirangsang dengan meningkatkan sistem immunostimulasinya.

Hasil analisis nilai *RPS* larva udang windu pada semua perlakuan disajikan pada Tabel 2. Pada tabel tersebut terlihat bahwa nilai *RPS* tertinggi dihasilkan oleh vaksin vibrio + Vitamin C 0,05 mg/L yaitu sebesar 50% dan terendah dihasilkan oleh vaksin WSSV metode formalin + 0,01 Vitamin C mg/L. Hal ini menunjukkan bahwa jenis vaksin ini memiliki efikasi paling tinggi. Menurut Ellis (1988), vaksin dapat dikatakan efektif jika nilai *RPS*-nya 50% atau lebih. Beberapa hal dapat dilakukan untuk meningkatkan efikasi vaksin di antaranya adalah memberikan *buster* yaitu vaksinasi ulang setelah selang beberapa waktu (Kamiso, 1996). Berdasarkan hal tersebut maka dalam penelitian ini pemberian immunostimulan dilakukan sebanyak tiga kali yaitu pada hari ke-3, ke-5, dan ke-9. Cara lain yang dapat dilakukan untuk meningkatkan efikasi vaksin adalah dengan penambahan Vitamin C dan Vitamin E. Hasil penelitian Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau (BRPBAP) sebelumnya menunjukkan, bahwa penambahan Vitamin C yang terbaik adalah 0,05 mg/L setiap 4 hari

Menurut Ellis (1988), penambahan Vit. C 500—1.500 mg dan Vitamin E 40 iu/100 g pakan ternyata dapat meningkatkan efikasi vaksin. Dalam penelitian

ini setiap jenis vaksin dikombinasi dengan penambahan Vitamin C dengan tingkatan konsentrasi yaitu 0,01 mg/L; 0,03 mg/L; dan 0,05 mg/L. Namun dari hasil perhitungan *RPS* (Tabel 2), terlihat bahwa tidak ada korelasi antara konsentrasi Vitamin C yang ditambahkan ke dalam setiap jenis immunostimulan (vaksin) dengan nilai *RPS* setiap jenis vaksin (sebagai salah satu indikasi dari tingkat efikasi dari satu jenis vaksin). Hal ini diduga karena konsentrasi Vitamin C yang digunakan masih terlalu rendah jika dibandingkan dengan yang ditambahkan dalam pakan 500—1.500 mg/100 g pakan (Ellis, 1988). Oleh karena itu, perlu dilakukan pengkajian yang lebih jauh tentang peranan Vitamin C dalam meningkatkan nilai efikasi dari suatu jenis vaksin (immunostimulan) untuk lebih meningkatkan pertahanan nonspesifik pada hewan uji.

KESIMPULAN

Kombinasi vaksin vibrio metode formalin dengan penambahan Vitamin C 0,05 mg/L lebih efektif dibandingkan immunostimulan lainnya dalam meningkatkan sintasan pascalarva udang windu dan Tingkat Sintasan Relatif (*RPS*)

DAFTAR PUSTAKA

- Albaladejo, J.D., L.M. Tapay, V.P. Migo, C.G. Alfafara, J.R. Somga, S.L. Mayo, R.C. Miranda, K. Natividal, F.O. Magbanua, T. Itami, M. Matsumura, E.C.B. Nadala, and P.C. Loh. 1998. Screening for shrimp viruses in the Philippines. In Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in*

- Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 252—253.
- Brock, T.D., M.T. Madigan, J.M. Martinko, and J. Parker. 1994. *Biology of Microorganism*. Seventh edition. Prentice Hall International, Inc., 909 pp.
- Chang, Poh-Shing, C. Hsiao-Chao, dan W. Yu-Chi. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobster by in situ hybridization. *Aquaculture* 164: 233—242.
- Devaraja, T.N., S.K. Ota, G. Shubha, I. Karunasagar, P. Tauro, and I. Karunasagar. 1998. Immunostimulation of shrimp through oral administration of *Vibrio* bacteria and yeast glucan. In Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 167—170.
- Ellis, A.E. 1988. *Fish Vaccination*. Academic Press, San Diego, 247 pp.
- Fowler, J. and L. Cohen. 1990. *Practical Statistic for Field Biology*. Open University Press. Milton. Keynes. Philadelphia, 227 pp.
- Hamzah, A. 2001. *Stimulasi Lipopolisakarida terhadap Peningkatan Kekebalan Tubuh Udang Windu (Penaeus monodon Fab.) dari Serangan White Spot Syndrome Virus (WSSV)*. Tesis Pascasarjana. Universitas Hasanuddin, 67 pp.
- Kamiso, H.N. 1996. Metode pencegahan hama dan penyakit ikan karantina dengan penggunaan vaksin. *Makalah Disampaikan pada Seminar Hama dan Penyakit Ikan Karantina tanggal 13 Desember 1996*, Cipanas, Bogor, 18 pp.
- Li, Q., F. Yang, J. Zhang, and Y. Chen. 2003. Proteomic analysis of protein that bands specifically to the homologous repeat regions of white spot syndrome virus. *Biol. Pharm. Bull.*, 26: 1,517—1,522.
- Maeda, M. 1999. *Microbial Process in Aquaculture*. National Research Institute of Aquaculture. Narsei, Mie. 516—0193, Japan, 102 pp.
- Madeali, M.I., A. Tompo, dan Muliani. 1998. Diagnosis penyakit viral pada udang windu, *Penaeus monodon* secara histopatologis dan antibodi poliklonal dengan metode ELISA. *J. Pen. Per. Indonesia IV (3):11-18*
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker. 2000. Brock: *Biologi of Microorganisms*. Ninth Edition. Prentice Hall. Southern Illinois University Carbondale.
- Peng, S.E., C.F. Lo, S.C. Lin, L.L. Chen, Y.S. Chang, K.F. Liu, M.S. Su, and G.H. Kou. 2001. Performance of WSSV-infected and WSSV-negative *Penaeus monodon* postlarvae in culture ponds. *Dis. Aquat. Org.*, 46: 165—172.
- Roux, M.M., A. Pain, K.R. Klimpel, and A.K. Dhar. 2002. The Lipopolysaccharide b-1,3-Glucan Binding Protein gene is upregulated in White Spot Virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Journal of Virology*, 76: 7,140—7,149.
- Soderhall, K. 1998. Review of Crustacean Immunity. In Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 135—136.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1981. *Principles and Procedures of Statistics*. A biometrical Approach (2nd edition). International Student Edition. McGraw-Hill International Book Company, 633 pp.
- Supriyadi, H. 1990. Pencegahan penyakit bakterial pada usaha budidaya perikanan. *Bahan Kuliah pada Pelatihan Karantina Ikan 21 Mei-4 Agustus 1990*. Ciawi, Bogor, 11 pp.
- Sung, H.H., G.H. Kou, and Y.L. Song. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, 1: 11—17.
- Takahashi, Y., K. Uehara, R. Watanabe, T. Okumura, T. Yamashita, H. Omura, T. Yomo, T. Kawano, A. Kanemitsu, H. Narasaka, N. Suzuki, and T. Itami. 1998. Efficacy of oral administration of fucoidan, a sulfated polysaccharide, in controlling White Spot Syndrome in kuruma shrimp in Japan. In Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 171—173.
- Vargas-Albores, F., J. Hernandez-Lopez, T. Gallas-Galvan, K. Montano-Perez, F. Jimenez-Vega, and G. Yepiz-Plascencia. 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. In Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 161—166.
- Vaseeharan, B., R. Jayakumar, and P. Ramasamy. 2003. PCR-base detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. *Lett. Appl. Microbiol.*, 37: 443—447.
- Wolf, K. 1988. *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Comstock Pub. Assoc, New York, 476 pp.