

## **Deteksi *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) pada udang putih (*Litopenaeus vannamei*) dan air tambak dengan metode *Nested PCR***

**Hiskia Sains Assajuly Syamsuddin<sup>1</sup>, Arif Bimantara\*<sup>1</sup>, Dewi Susanti<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Bioteknologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta

<sup>2</sup>SKIPM Yogyakarta

\*Email: [bimantara.arif@unisayogya.ac.id](mailto:bimantara.arif@unisayogya.ac.id)

### **Abstrak**

Udang adalah produk perikanan andalan Indonesia yang menjadi komoditas ekspor, salah satu jenis yang paling dominan untuk diekspor adalah udang putih (*Litopenaeus vannamei*). budidaya udang putih (*Litopenaeus vannamei*) menghadapi kendala dengan munculnya kasus kematian dini yang menyerang udang sekitar hari ke-30 setelah penebaran pada kolam pemeliharaan yang ditandai dengan kerusakan pada hepatopankreas (*Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*). *Vibrio parahaemolyticus* merupakan salah satu bakteri penginfeksi komoditas air laut terutama udang. Bakteri ini adalah penyebab AHPND. Penularan penyakit bakteri dalam lingkungan perairan, dapat terjadi melalui kontak langsung dengan inang yang sakit, alat-alat yang digunakan, bagian sisa tubuh ikan, melalui hewan dan tumbuhan air serta air bekas ikan sakit. Deteksi molekuler masih menjadi hal yang sangat membantu dalam diagnosis AHPND. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana penggunaan metode *nested PCR* sebagai metode deteksi pada udang putih dan air tambak dalam diagnosis AHPND di SKIPM Yogyakarta. *Nested PCR* merupakan pengembangan dari metode PCR dengan reaksi yang dirancang untuk meningkatkan spesifisitas dan mengurangi pengikatan non-spesifik dari produk PCR. Primer yang digunakan dalam metode *nested PCR* pada penelitian ini menggunakan primer AP4. Sampel yang dilakukan deteksi pada penelitian merupakan sembilan sampel udang dan lima sampel air tambak. Sampel sendiri merupakan sampel yang masuk ke SKIPM Yogyakarta. Sampel dilakukan proses isolasi bakteri terlebih dahulu pada media TSB. Ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode ekstraksi menggunakan panas. Hasil ekstraksi kemudian dilakukan amplifikasi menggunakan *nested PCR*. Hasil deteksi AHPND terhadap 14 sampel menggunakan menggunakan *nested PCR* didapatkan hasil 12 sampel positif (tujuh sampel udang dan lima sampel air tambak). Sedangkan hasil negatif didapatkan dua sampel.

**Kata Kunci:** AHPND; *Nested PCR*; udang putih; *Vibrio parahaemolyticus*

### **1. Pendahuluan**

Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Yogyakarta (SKIPM) merupakan lembaga dibawah Kementerian Kelautan dan Perikanan. SKIPM merupakan balai karantina ikan yang memiliki tugas dalam melakukan pengecekan terhadap kesehatan ikan baik yang akan di transportasikan, pemantauan, ataupun pemeriksaan perorangan.

Pelaksanaan pembangunan sektor budidaya ikan laut pada dasarnya dapat dilakukan dengan cepat, efektif dan menguntungkan karena memiliki berbagai kekuatan, peluang dan akses pasar yang cukup luas. Secara fisik, Kusumastanto (2003), menyatakan bahwa Indonesia memiliki potensi yang melimpah untuk pembangunan industri perikanan budidaya. Budidaya komoditas laut memiliki beberapa faktor yang memengaruhi keberhasilan budidaya. Faktor keberhasilan diantaranya adalah kualitas benih, kualitas air (suhu, pH, salinitas). Penghambat juga menjadi salah satu faktor yang dapat mengurangi produktifitas budidaya. Salah satu hambatan utama dalam keberlanjutan produksi budidaya adalah kematian yang diakibatkan oleh infeksi mikroorganisme patogen. Penyakit yang menyerang komoditas air dapat disebabkan oleh virus, bakteri, dan jamur (Mulyani *et al.*, 2022).

Udang adalah produk perikanan andalan Indonesia yang menjadi komoditas ekspor, salah satu jenis yang paling dominan untuk diekspor adalah udang vaname. Pada tahun 2009 di Negara Cina, budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) menghadapi kendala dengan munculnya kasus kematian dini yang menyerang udang sekitar hari ke-30 setelah penebaran pada kolam pemeliharaan yang ditandai dengan kerusakan pada hepatopankreas (*Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*) (Nainggolan *et al.*, 2020). *Vibrio parahaemolyticus* merupakan salah satu bakteri penginfeksi komoditas air laut terutama udang. Bakteri ini adalah penyebab penyakit *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND). Bakteri patogen menyerang bagian hepatopankreas pada udang. Penularan penyakit bakteri dalam lingkungan perairan, dapat terjadi melalui kontak langsung dengan

inang yang sakit, alat-alat yang digunakan, bagian sisa tubuh ikan, melalui hewan dan tumbuhan air serta air bekas ikan sakit. Udang yang terkena AHPND menunjukkan gejala *anoreksia*, saluran pencernaan kosong, dan hepatopankreas pucat. Penyakit ini menyebabkan kerugian hingga dengan tingkat mortalitas sebesar 100 % pada udang berumur 20-30 hari. Sehingga identifikasi faktor virulensi bakteri dan perubahan seluler spesifik AHPND ditambah dengan tanda-tanda klinis kasar dianggap membantu untuk diagnosis konfirmasi AHPND pada udang (Kumar *et al.*, 2021).

Salah satu teknik identifikasi molekuler yang dapat digunakan sebagai sarana diagnosis penyakit adalah teknik amplifikasi DNA. Teknik ini mampu melipatgandakan untai DNA sampel sehingga dapat dianalisis dengan lebih jelas. Sejak awal ditemukannya, teknik amplifikasi DNA yang digunakan adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR atau reaksi berantai polimerase adalah suatu metode enzimatik dalam bidang biologi molekuler yang bertujuan untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan jumlah kelipatan ribuan hingga jutaan salinan secara *in vitro* (Feranisa, 2016).

Metode *Nested* PCR merupakan pengembangan dari metode PCR dengan reaksi yang dirancang untuk meningkatkan spesifisitas dan mengurangi pengikatan non-spesifik dari produk PCR. *Nested* PCR sendiri secara komponen memiliki persamaan dengan metode PCR, tetapi berbeda dalam jumlah primer yang digunakan dan jumlah proses amplifikasi yang dilakukan. Dalam teknik *Nested* PCR menggunakan dua pasang primer, satu primer digunakan di amplifikasi pertama (first PCR), yang kemudian diikuti oleh amplifikasi kedua (*Nested* PCR) menggunakan hasil dari first PCR menggunakan set primer yang kedua (Trasia, 2020).

Berdasarkan uraian di atas penggunaan deteksi molekuler dalam diagnosis AHPND sangat diperlukan guna mengetahui lebih awal terkait infeksi bakteri penyebab AHPND. Lebih awalnya deteksi bakteri patogen pada udang dapat mempercepat proses antisipasi. Penelitian tentang penggunaan metode deteksi molekuler untuk deteksi AHPND perlu dilakukan guna mengetahui efektifitas metode deteksi yang digunakan.

## 2. Metode Penelitian

### 2.1. Persiapan Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah: *disecting set*, mikrotub, vorteks, mikropipet, LAF (*Laminar Air FLOW*), *thermal cycler*, cetakan gel, elektroforesis, dokumentasi gel UV, dan *drybath heater*, autoklav. Sedangkan bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah: Promega® Go Taq Green, primer AP4 F1 (5'- ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC-3'), AP4 F2 (5'-TTGAGAATACGGGACGTGGG-3'), AP4 R1 (5'- ACGATTTTCGACGTTCCCAA -3'), AP4 R2 (5'-GTTAGTCATGTGAGCACCTTC -3'), *nuclease free water*, TAE buffer, agarosa, DNA staining, DNA marker. Tsb, NAACL 2,5%, serta sampel pemeriksaan.

### 2.2. Pembuatan Media

Pada pembuatan media sendiri digunakan media *Tryptic Soy Broth* (TSB) sebagai media pertumbuhan dari bakteri AHPND. TSB merupakan media cair yang mana merupakan media yang dapat digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri untuk keperluan identifikasi lebih lanjut. Dalam pembuatannya media TSB dibuat berdasarkan rumus  $TSB = \frac{\sum \text{jumlah ml yang dibutuhkan}}{1000 \text{ ml}} \times 30 \text{ gr.}$  Bahan-bahan yang dibutuhkan sebanyak 15 gr TSB kemudian diletakan pada erlenmeyer. Selain dari TSB, bahan lainnya adalah ditambakkannya NaCl sebanyak 2,5 gram, kemudian diaduk menggunakan *hot plate stirer* hingga homogen. Media yang sudah homogen, kemudian dilakukan proses sterilisasi menggunakan autoklaf.

### 2.3. Nekropsi

Udang yang masuk SKIPM Yogyakarta setelah pendataan kemudian dilakukan proses nekropsi. Proses nekropsi dilakukan untuk sampel udang sedangkan sampel air tambak tidak dilakukan proses nekropsi. Nekropsi dilakukan menggunakan *disecting set* dengan mengambil bagian hepatopankreas dari udang *L.vannamei*. Sampel yang akan dideteksi dapat dilihat pada **Tabel 1**.

**Tabel 1.** Sampel Deteksi

No.	Sampel	Kode Sampel
1	Sampel Udang	PM/160223/54, PM/160223/55, PM/160223/56, PM/160223/57, PM/160223/58, PM/160223/59, PM/160223/60, PM/160223/61, N/200223/77,
2	Sampel Air Tambak	PM/160223/63, PM/160223/64, PM/160223/65, PM/160223/66, PM/160223

## 2.4. Isolasi Bakteri

Isolasi pada sampel kali ini dilakukan menggunakan media cair sebagai media pertumbuhannya. Media cair yang digunakan adalah media *Tryptic Soy Broth* (TSB). Sampel isolasi menggunakan sampel udang (hasil nekropsis) dan sampel air tambak. Sampel udang yang sudah di nekropsis, kemudian dilakukan isolasi dengan cara diambil sedikit dari sampel hasil nekropsis menggunakan jarum ose, kemudian jarum ose diaduk kedalam media TSB. Isolasi sampel air tambak juga dilakukan cara yang sama dengan isolasi sampel udang. Sampel yang sudah diisolasi, kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 24 jam.

## 2.5. Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA dilakukan dengan pengambilan sampel dari hasil isolasi pada media *Tryptic Soy Broth* (TSB) sebanyak 500 µl kedalam mikrotub. Sampel pada mikrotub, kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm dengan rentang waktu 5 menit. Supernatan pada sampel kemudian dibuang menggunakan mikropipet hingga tersisa peletnya saja. *Nuclease Free Water* sebanyak 100 ml ditambahkan lalu dihomogenkan menggunakan vorteks. Inkubasi dilakukan setelah homogen dengan suhu 95°C lalu di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit, lalu supernatan dipindahkan kedalam mikrotub yang baru.

## 2.6. Amplifikasi

Hal pertama yang harus dilakukan adalah membuat campuran reagen (untuk satu sampel) First PCR dan *Nested* PCR. Volume reagen yang dibutuhkan dapat dilihat pada **Tabel 2**.

**Tabel 2.** Komponen Reagen Untuk Proses Deteksi First PCR Dan *Nested* PCR

Reagen	First (µl)	Nested (µl)
Go taq Green	12,5	12,5
Primer Forward (AP4F1 Untuk First PCR dan AP4F2 Untuk <i>Nested</i> PCR)		1
Primer Backward (AP4R1 Untuk First PCR dan AP4R2 Untuk <i>Nested</i> PCR)		1
<i>Nuclease free water</i>	6,5	8,5
DNA Template (kultur TSB untuk first PCR, amplicon first PCR untuk <i>Nested</i> PCR)	4	2
<b>Total</b>	<b>25µl</b>	<b>25 µl</b>

PCR tub disiapkan sebanyak jumlah sampel dengan mikrotub yang digunakan untuk kontrol positif dan negatif masing-masing satu buah. PCR tub yang telah disiapkan kemudian diberi penanda. Reagen yang sudah disiapkan selanjutnya dimasukkan kedalam masing-masing tub sesuai dengan volume yang ditunjukkan pada **Tabel 2**. menggunakan mikropipet. PCR tub yang sudah terisi dengan reagen setelah itu dimasukkan kedalam *thermal cycler* dengan program yang terdapat pada **Tabel 3**.

**Tabel 3.** Suhu Amplifikasi First PCR dan *Nested* PCR

First dan Nested PCR			
<i>Initial denaturation</i>	94°C	30 detik	
<i>Denaturation</i>	94°C	30 detik	30 siklus
<i>Annealing</i>	55°C	30 detik	30 siklus
<i>Ekstention</i>	72°C	90 detik	30 siklus
<i>Final ekstention</i>	72°C	2 menit	
<i>Hold/end</i>	4°C		

## 2.7. Elektroforesis

Gel agarosa 1,5% dibuat dengan menimbang 0,75 g agarosa dalam Erlenmeyer serta ditambahkan 50 ml buffer TAE. Bahan-bahan tadi kemudian dipanaskan menggunakan *microwave* hingga larut. Sembari menunggu gel agarosa yang dimasukan kedalam *microwave* cetakan gel dengan sisi yang sudah terpasang disiapkan. Gel agarosa yang sudah dilarutkan kemudian ditambahkan 4µl pewarnaan DNA (*ethidium bromide*). Gel agarosa yang sudah diberikan pewarna kemudian digojok perlahan setelah itu, dituang kedalam cetakan dengan sisir yang sudah terpasang. Tunggu hingga mengeras dan ambil sisir secara perlahan pada suhu ruang.

Tempatkan gel agarosa ke dalam alat elektroforesis dengan posisi sumur di kutub negatif. Tambahkan buffer TAE 1x sampai menutupi sumur gel. Masukkan 5µl penanda DNA 100 bp ke dalam sumur pertama. Masukkan hasil PCR sebanyak 10 µl ke dalam sumuran. Setelah semua sampel dimasukkan ke dalam sumuran, hidupkan elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 100 volt.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1. Nekropsi

Nekropsi merupakan teknik pembedahan pada hewan uji yang digunakan dalam diagnosa penyakit. Sifat pemeriksaan hasil nekropsi adalah berdasarkan pada perubahan patologi anatomi. Proses nekropsi umumnya dilakukan untuk mengamati dan mengambil organ target pada sampel. Organ target yang biasa diambil dalam pemeriksaan dan diagnosa Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) pada udang vaname yaitu hepatopankreas (**Gambar 1.**) dengan cara memotong bagian tersebut secara langsung menggunakan dissecting set (Setyawan, 2021). Pada proses nekropsi sendiri organ target yang sudah diambil kemudian dihancurkan menggunakan mortar. Hal ini, bertujuan guna mempermudah dalam proses isolasi bakteri.



**Gambar 1.** Proses Nekropsi

### 3.2. Isolasi Bakteri

Isolasi pada sampel kali ini dilakukan menggunakan media cair sebagai media pertumbuhannya. Media cair yang digunakan adalah media Tryptic Soy Broth (TSB). Media TSB adalah media umum yang digunakan untuk isolasi pertumbuhan mikroorganisme yang telah diperkaya berbagi nutrisi sehingga dapat mendorong pertumbuhan mikroorganisme (Suprpto et al., 2016).

Kandungan dari TSB terdiri atas agar, tryptone, soytone dan sodium chloride. Berdasarkan komposisi penyusun TSB, ada alternatif pengganti penyusun media nonselektif bakteri yang dapat juga digunakan untuk bakteri akuatik. Secara umum kultur media bakteri harus mengandung sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, vitamin atau bahan-bahan yang dapat mendorong pertumbuhan bakteri seperti ekstrak daging atau ragi. Ekstrak daging mengandung pepton atau protein terhidrolisi yang

banyak mengandung senyawa nitrogen sederhana. Selain pepton, keberadaan elemen mikro seperti Ca, Mn, Na, Mg, Zn, Co, Fe, Cu juga dibutuhkan (Dwinanti, 2014).

Isolasi mikroba ialah memisahkan atau memindahkan mikroba tertentu dari lingkungan alamiahnya dan menumbuhkannya pada media buatan sehingga diperoleh kultur murni. Kultur murni adalah kultur yang sel-sel mikrobaanya berasal dari pembelahan dari satu sel tunggal. Kultur murni sangat berguna di dalam mikrobiologi yaitu untuk menelaah dan mengidentifikasi mikroorganisme dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam media (Mikdarullah dan Nugraha 2017). Proses isolasi yang dilakukan pada kegiatan ini adalah dengan cara mengaduk menggunakan jarum ose yang sebelumnya sudah terdapat sedikit dari sampel kedalam media TSB. Proses isolasi dapat dilihat pada **Gambar 2**.



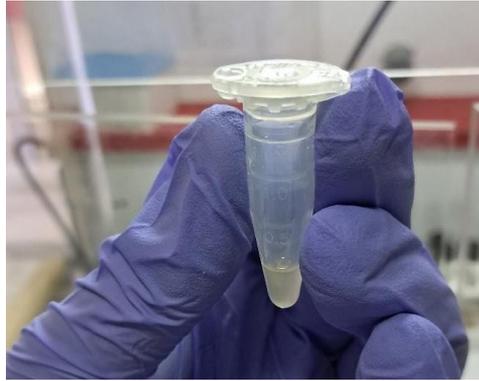
**Gambar 2.** Proses Isolasi Bakteri

Menurut Jufri (2020), beberapa faktor yang perlu dipertimbangkan dalam melakukan isolasi mikroba antara lain; sifat setiap jenis mikroba yang akan di isolasi, tempat hidup atau asal mikroba, media pertumbuhan yang tepat, dan cara menginokulasi mikroba. Kehadiran mikroba dalam media menunjukkan bahwa mikroba mampu menunjukkan bahwa mikroba mampu memanfaatkan nutrisi yang ada dalam medium. Kebutuhan sumber energi mikroba dapat berasal dari cahaya (fototrof) dan karbon organik (kemoorganotrof), sumber karbon dalam bentuk karbon anorganik (seperti kalium nitrat) dan nitrogen organik (dalam bentuk protein dan asam amino), unsur non-logam seperti belerang dan fosfor, unsur logam (seperti potasium, natrium, magnesium, besi, tembaga, dll.), air untuk fungsi metabolisme dan pertumbuhan (Hidayah dan Shovitri, 2012).

### 3.3. Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi pada dasarnya adalah untuk membebaskan DNA dari masa sel dan komponen-komponen lain di dalam sel. Pada ekstraksi kali ini tidak dilakukan langsung dari organ hewan target, melainkan menggunakan isolat bakteri yang telah ditumbuhkan dalam media selama 24 jam dalam suhu ruang. Penggunaan metode ini dilakukan guna menghemat bahan yang digunakan semasa ekstraksi. Karena, proses ekstraksi akan lebih singkat dilakukan dan lebih efisien bahan yang digunakan. Ekstraksi DNA merupakan serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. Ekstraksi merupakan tahap awal yang paling penting dalam penelitian molekuler. Secara umum proses ekstraksi meliputi penghancuran membran sel menggunakan *Sodium Dodecil Sulphate* (SDS)/ sejenis detergen, penghilangan protein dan RNA menggunakan Proteinase K & RNase, pengendapan DNA, dan pemanenan DNA (Ariyanti dan Sianturi, 2019).

Metode ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini adalah metode ekstraksi menggunakan pemanasan menggunakan *drybath heater*. Metode ekstraksi dengan pemanasan merupakan metode yang sangat sederhana, dengan menggunakan suhu tinggi hingga sel pecah. Metode ini mudah, murah, dan biasa digunakan untuk ekstraksi isolat bakteri dari kultur yang telah murni. Metode ini cukup baik dalam mengisolasi DNA bakteri dalam jaringan sel yang terinfeksi sehingga terdapat 82% sampel yang menghasilkan pita positif. Namun DNA yang dihasilkan masih mengandung banyak kontaminan dan inhibitor, terutama pada jaringan yang mengandung banyak protein seperti otak dan hati (Gardenia dan Isti, (2011). Hasil ekstraksi dapat dilihat pada **Gambar 3**.



**Gambar 3.** Hasil Ekstraksi DNA

Tingkat kemurnian DNA yang rendah disebabkan oleh masih tingginya komponen pengotor (protein) yang terukur, diduga pada proses ekstraksi DNA, protein tidak terdegradasi seluruhnya. Kontaminasi yang disebabkan oleh protein dapat berasal dari komponen sel yang tidak lisis selama proses ekstraksi. Tingkat kemurnian yang rendah juga dapat disebabkan oleh adanya komponen pengotor lainnya, yaitu RNA, lipid, dan polisakarida (Setiaputri., *et al* 2020).

### **3.4. Hasil Deteksi AHPND Menggunakan *Nested* PCR**

Metode deteksi yang dilakukan untuk deteksi AHPND pada udang vanname adalah menggunakan metode *Nested* PCR. PCR adalah reaksi polymerase yang dilakukan secara berulang-ulang yaitu proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal, hibridisasi primer untuk mengawali replikasi DNA dilanjutkan dengan proses penambahan basa pada cetakan DNA oleh enzim polymerase, untuk melakukan kegiatan ini dibutuhkan tabung PCR yang bersifat responsif dengan perubahan suhu dan mesin *thermal cycler*, suatu mesin yang mampu menaikkan dan menurunkan suhu dengan cepat. Indonesia termasuk negara yang belum mengalami dampak buruk tersebarnya penyakit AHPND. Diagnosa penyakit menggunakan metode PCR pada benur maupun induk yang didatangkan dari negara lain merupakan salah satu langkah pencegahan yang dilakukan untuk meminimalisir tersebarnya penyakit tersebut (Hanggono dan Junaidi, 2015). *Nested* PCR sendiri merupakan pengembangan dari metode PCR dengan reaksi yang dirancang untuk meningkatkan spesifisitas dan mengurangi pengikatan non-spesifik dari produk PCR. *Nested* PCR sendiri secara komponen memiliki persamaan dengan metode PCR, tetapi berbeda dalam jumlah primer yang digunakan dan jumlah proses amplifikasi yang dilakukan. Dalam teknik *Nested* PCR menggunakan dua pasang primer, satu primer digunakan di amplifikasi pertama (first PCR), yang kemudian diikuti oleh amplifikasi kedua (*Nested* PCR) menggunakan hasil dari first PCR menggunakan set primer yang kedua (Trasia, 2020).

Dalam proses deteksi menggunakan *Nested* PCR, primer yang digunakan merupakan dua pasang primer AP4 pada dua proses amplifikasi. Amplifikasi yang pertama menggunakan primer AP4F1 dan AP4R1. Amplifikasi yang kedua menggunakan pasang primer AP4F2 dan AP4R2. Amplifikasi pertama menghasilkan panjang ampikon sebesar 1.269 bp sedangkan *Nested* PCR menghasilkan ampikon sebesar 230 bp. AP4 ini sendiri memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi untuk mendeteksi AHPND daripada primer-primer generasi sebelumnya dan juga dapat mencegah terjadinya kontaminasi reaksi silang DNA sampel dengan DNA bakteri non- AHPND atau DNA inang potensial. Metode baru ini cocok sebagai opsi alternatif untuk deteksi langsung bahan di mana kultur pengayaan sebelum analisis tidak memungkinkan (Dangtip *et al.*, 2015).

Proses PCR sendiri yang digunakan dalam identifikasi kali ini adalah *nested* PCR. *Nested* PCR ini merupakan pengembangan dari PCR reaksi yang dirancang untuk meningkatkan spesifisitas dengan mengurangi pengikatan non-spesifik (non-spesifik) dari produk PCR. Teknik ini membutuhkan hal yang sama komponen sebagai PCR konvensional, tetapi berbeda dalam jumlah primer yang digunakan dan jumlah PCR proses yang dilakukan. Dalam teknik *nested* PCR menggunakan dua pasang primer, satu primer digunakan di reaksi PCR pertama, yang kemudian diikuti oleh reaksi PCR kedua menggunakan PCR pertama produk dan dengan set primer kedua (Trasia, 2020). Hasil visualisasi dapat dilihat pada **Gambar 4**.



**Gambar 4.** Hasil Visualisasi *Nested* PCR menggunakan elektroforesis (Sampel udang 1-9, sampel air tambak 10-14), 1) PM/160223/54, 2) PM/160223/55, 3) PM/160223/56, 4) PM/160223/57, 5) PM/160223/58, 6) PM/160223/59, 7) PM/160223/60, 8) PM/160223/61, 9) N/200223/77, 10) PM/160223/63, 11) PM/160223/64, 12) PM/160223/65, 13) PM/160223/66, 14) PM/160223/67

Berdasarkan hasil elektroforesis (**Gambar 4**) sampel didapatkan bahwa 12 sampel dinyatakan positif terindikasi AHPND dari 14 sampel (1-14). Sampel udang sendiri yang terindikasi positif berjumlah 7, dan sampel air tambak yang terindikasi positif berjumlah 5. Untuk hasil visualisasi dapat dilihat pada **Gambar 4**. Untuk sampel positif sendiri dapat dilihat dari ukuran band sampel yang berada pada besaran 230 bp dan sejajar dengan band yang muncul pada kontrol positif. Sementara hasil negatif ditunjukkan dengan tidak adanya band yang terlihat dan sejajar dengan kontrol negatif. Untuk hasil negatif terdapat pada sumuran ke- 3, dan 9. Terlihat juga dari hasil elektroforesis masih banyak terdapat *smear* yang terlihat. Hasil elektroforesis DNA genom secara keseluruhan selain terlihat pita DNA menunjukkan adanya *smear* yang terbawa. *Smear* dapat disebabkan karena masih terdapatnya kontaminan seperti protein atau terbawanya sisa larutan pada proses isolasi. Menurut Mulyani *et al.* (2011), *smear* tersebut bisa merupakan sisa dari larutan-larutan yang masih terbawa selama proses isolasi atau juga dapat berupa DNA yang terdegradasi pada proses isolasi (Iqbal *et al.*, 2016).

Banyak sekali faktor yang dapat memengaruhi keberhasilan amplifikasi PCR mulai dari bahan sampel yang digunakan sampai dengan komponen-komponen bahan kimia yang digunakan dalam proses amplifikasi itu sendiri. Maka dari itu diperlukan ketelitian dalam melakukan proses identifikasi dengan PCR agar tidak terjadi kegagalan atau kontaminan sehingga hasil identifikasi benar akurat dan terpercaya, sehingga hasilnya dapat diterbitkan untuk perizinan usaha budidaya ataupun pengiriman. Selain dari faktor identifikasi yang baik sebagai penjegahan udang terjangkit AHPND, Cara Budidaya Ikan Yang Baik (CBIB) juga wajib diterapkan oleh para petani. CBIB wajib diterapkan oleh para petani dikarenakan menurut Erbianysah. (2021) penularan penyakit bakteri dalam lingkungan perairan, dapat terjadi melalui kontak langsung dengan inang yang sakit, alat-alat yang digunakan, bagian sisa tubuh ikan, melalui hewan dan tumbuhan air, serta air bekas ikan sakit.

#### 4. Kesimpulan

Kesimpulan penelitian deteksi AHPND menggunakan metode *nested* PCR menunjukkan hasil deteksi AHPND terhadap 14 sampel, menggunakan menggunakan *nested* PCR didapatkan hasil 12 sampel positif (7 sampel udang dan 5 sampel air tambak). Sedangkan hasil negatif didapatkan 2 sampel.

#### 5. Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih kepada SKIPM Yogyakarta yang sudah berkenan menjadi tempat pelaksanaan penelitian ini. Terimakasih juga kepada Program Studi Bioteknologi Universitas 'Asyiyah Yogyakarta yang telah mendukung jalannya penelitian ini..

## Daftar Pustaka

- Ariyanti, Y., & Sianturi, S. (2019). Ekstraksi DNA total dari sumber jaringan hewan (Ikan Kerapu) menggunakan metode kit for animal tissue. *Journal of Science and Applicative Technology*, 3(1), 40-45.
- Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., ... & Flegel, T. W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, 2, 158-162.
- Dwinanti, S. H. (2014). Modification of non-selective-solid media for aquatic bacteria. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 13(2), 163-166.
- Erbiansyah. (2021). Uji Tantang *Vibrio Parahaemolyticus* Pada Pl-20 Udang WINDU (*Penaenus monodon*) Yang Diberikan Ekstrak Daun Karamunting (*Melastoma malabathricum*). Skripsi. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Universitas Borneo Tarakan Tarakan.
- Gardenia, L., & Koesharyani, I. (2011). Metode isolasi deoxyribo nucleic acid bakteri dari organ ikan nila (*Oreochromis niloticus*) untuk diagnosa Streptococcociasis dengan teknik Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Riset Akuakultur*, 6(3), 469- 477.
- Hanggono, B., & Junaidi, M. (2015). Viral Disease Detection In *Vannamei* Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Method Polymerase Chain Reaction (PCR). *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan*, 6(1) : 1-13.
- Hidayah, N., & Shovitri, M. (2012). Adaptasi Isolat Bakteri Aerob Penghasil Gas Hidrogen pada Medium Limbah Organik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 1(1), E16-E18.
- Iqbal, M., Buwono, I. D., & Kurniawati, N. (2016). Analisis perbandingan metode isolasi DNA untuk deteksi white spot syndrome virus (WSSV) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan Kelautan*, 7(1).
- Jufri, R. F. (2020). Microbial isolation. *Journal La Lifesci*, 1(1), 18-23.
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Bossier, P., & Das, B. K. (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis And Mitigation Strategies In Shrimp Aquaculture. *Toxins*, 13(8) : 524.
- Mikdarullah, dan Aditya, N. (2017). Teknik Isolasi Bakteri Proteolitik Dari Sumber Air Panas Ciwidey, Bandung. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultu*. 15(1). 11- 14.
- Mulyani, R., Sumantriyadi, S., Sari, L. P., Sari, Y. P., Mayasari, S., & Humairani, H. (2022). Peningkatan Produksi Ikan Konsumsi Berbasis Kearifan Lokal Dengan Teknologi Culture Based Fisheries (CBF) Di Ma Bahrul Ulum Muliarsari, Banyuasin. *Jurnal Abdi Insani*, 9(2), 590-597.
- Mulyani, Y., Purwanto, A., & Nurruhwati, I. (2011). Perbandingan Beberapa Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi Dini Koi Herpes Virus (KHV) Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio L.*). *Jurnal Akuatika*, 2(1).
- Setiaputri, A. A., Barokah, G. R., Sahaba, M. A. B., Arbajayanti, R. D., Fabella, N., Pertiwi, R. M., ... & Abdullah, A. (2020). Perbandingan metode isolasi DNA pada produk perikanan segar dan olahan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(3), 447-458.
- Setyawan, A., Hudaidah, S., & Fidyandini, H. P. (2021). Evaluasi suplementasi alginat *Sargassum* dari Perairan Lampung dalam menanggulangi penyakit white disease pada udang *vannamei* *Litopenaeus vannamei*. Laporan Penelitian. Fakultas Pertanian. Universitas Lampung.
- Suprpto, H., Sudarno, S., & Tito, I. M. (2016). Isolasi dan identifikasi bakteri kitinolitik yang terdapat pada cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*)[Isolation and identification of chytinolytic bacteria from the crayfish (*Cherax quadricarinatus*) Shell]. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*.
- Trasia, R. F. (2020). Nested Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR) As A Diagnostic Technique for Intestinal Helminth Infection. *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi*, 5(4), 183.