

## Optimasi Metode *Nested* PCR untuk Deteksi *Vibrio parahaemolyticus* AHPND pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

### Optimization of *Nested* PCR Method for *Vibrio parahaemolyticus* AHPND Detection in *Vannamei* Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Ratih Khairul Anissa<sup>1\*</sup>, Lisa Lisdiana<sup>1</sup>, Anita Tri Widayanti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya

<sup>2</sup>Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Surabaya II

\*e-mail: [khairulratih@gmail.com](mailto:khairulratih@gmail.com)

**Abstrak.** Budidaya udang vaname memiliki risiko tinggi terjangkit penyakit, salah satunya *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) yang disebabkan oleh *Vibrio parahaemolyticus* strain AHPND. Penyakit ini sangat menular dan memiliki angka kematian hingga 100%. Deteksi dini diperlukan untuk memprediksi penyebaran dan mengurangi risiko kegagalan produksi. Deteksi dapat dilakukan menggunakan metode AP4 *nested* PCR, namun masih banyak hasil PCR yang kurang optimal sehingga perlu dilakukan optimasi metode. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi primer dan suhu *annealing* yang optimal untuk deteksi *V. parahaemolyticus* strain AHPND pada udang vaname pada metode AP4 *nested* PCR. Tahapan penelitian meliputi ekstraksi DNA, amplifikasi, dan elektroforesis. Pada amplifikasi dilakukan optimasi konsentrasi primer (2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M dan 10  $\mu$ M) dan suhu *annealing* (53°C, 58°C dan 63°C). Hasil amplifikasi pada setiap perlakuan memperoleh pita dengan ukuran 230 bp, tidak terdapat *smear*, primer *dimer* dan *mispriming*, namun memiliki variasi ketebalan yang berbeda. Pada suhu *annealing* 58°C dan konsentrasi primer 5  $\mu$ M diperoleh hasil terbaik berupa pita yang paling tebal dan tunggal dibandingkan pada perlakuan yang lain. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa metode AP4 *nested* PCR terbaik adalah menggunakan suhu *annealing* 58°C dan konsentrasi primer 5  $\mu$ M.

**Kata kunci:** *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*; AP4 *nested* PCR; konsentrasi primer; suhu *annealing*; budidaya perairan

**Abstract.** *Vannamei* shrimp culture has a high risk of contracting diseases, one of which is *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) caused by *Vibrio parahaemolyticus* strain AHPND. This disease is highly contagious and has a mortality rate of up to 100%. Early detection is needed to predict deployment and reduce the risk of production failure. Detection can be carried out using the AP4 *nested* PCR method, but many PCR results are not optimal, so it is necessary to optimize the method. The purpose of this study was to determine the optimal primer concentration and annealing temperature of AP4 *nested* PCR method. The steps of the research included DNA extraction, amplification, and electrophoresis. In the amplification, optimization of primer concentration (2.5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, and 10  $\mu$ M) and annealing temperature (53°C, 58°C, and 63°C) was carried out. The amplification results for each treatment obtained a band of 230 bp, no smears, primer dimers and mispriming, but had different thickness variations. At annealing temperature of 58°C and primer concentration of 5  $\mu$ M, the best results were obtained in the form of the thickest and single band compared to the other treatments. In conclusion based on these results that the best optimization method is using an annealing temperature of 58°C and 5  $\mu$ M of primer concentration.

**Keywords:** *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*; AP4 *nested* PCR; primer concentration; annealing temperature; aquaculture

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara produsen udang terbesar keempat di dunia setelah Cina, India dan Vietnam dengan nilai produksi sebesar 315.000 sampai 355.000 ton pada tahun 2018 (FAO, 2019). Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) adalah salah satu komoditas udang yang memiliki tingkat permintaan pasar yang tinggi. Udang vaname merupakan varietas yang memiliki beberapa keunggulan, antara lain memiliki padat tebar cukup tinggi (20-60 PL/m<sup>3</sup>), dapat bertahan hidup pada kualitas lingkungan yang rendah, dan waktu pemeliharaan lebih pendek yakni sekitar 90-100 hari per-siklus (Hakim *et al.*, 2018). Berdasarkan keunggulan tersebut, secara masif domestikasi udang vaname dilakukan di negara-negara penghasil udang termasuk Indonesia. Dengan adanya

domestikasi di seluruh negara penghasil udang budidaya, produksi udang secara global pun meningkat dari 280.298 ton pada 2001 menjadi 4.115.286 ton pada tahun 2016 (FAO, 2020). Namun, masalah penyakit masih merupakan kendala utama pada budidaya udang vaname (Miandare *et al.*, 2017).

Pada tahun 2009, di negara Cina pertama kali dilaporkan terjadi kasus kematian dini yang menyerang budidaya udang vaname. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Vibrio parahaemolyticus* strain AHPND (*Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*). Wabah penyakit yang menyebabkan tingkat kematian tinggi pada budidaya udang ini kemudian merebak hingga ke Vietnam (2010), Malaysia (2011), Thailand (2012), dan Meksiko (2013). Cina mengalami kerugian 80% pada sektor produksi udang vaname karena wabah penyakit ini, sedangkan Vietnam mengalami kerugian ekonomi 570.000 hingga 7.200.000 USD (Lightner *et al.*, 2013). Menurut data FAO (2013), pada tahun 2011 dampak serangan wabah ini pada budidaya udang vaname di Malaysia mengakibatkan kerugian hingga 100 juta USD. Dampak serangan wabah di Thailand pada tahun 2012 mengakibatkan kerugian hingga 109,9 juta USD (Songsangjinda dan Polchana, 2016). Secara global kerugian akibat wabah AHPND ini diperkirakan mencapai 43 miliar USD di seluruh Asia (Cina, Malaysia, Thailand, Vietnam) dan Meksiko (Flegel, 2019).

Penyakit ini menginfeksi udang kurang lebih 30 hari setelah penebaran benur pada kolam pemeliharaan. Gejala klinis udang yang terjangkit penyakit ini adalah tubuh mengecil (atrofi), bintik hitam/garis pada karapas, tubuh putih/kekuningan, perubahan warna menjadi pucat dan kerusakan akut pada hepatopankreas. Penyakit ini dapat menimbulkan kematian 100% yang terjadi dalam 10-35 hari pertama budidaya udang di wilayah Asia Pasifik seperti Cina, Vietnam, Thailand dan Malaysia (Raja *et al.*, 2017). Penelitian Tran *et al.* (2013) menyatakan bahwa penyakit AHPND (*Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*) pada udang vaname disebabkan oleh bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus* strain AHPND. Santos *et al.* (2020) menyatakan bahwa penyakit AHPND disebabkan oleh subtipe spesifik *V. parahaemolyticus* yang memiliki plasmid virulen unik. Plasmid tersebut mengandung gen yang mengkode protein yang mirip dengan *Photobacterium insect-related* (*Pir toxin*). *Pir toxin-like* terdiri atas ToxA (12,7 kDa) dan ToxB (50,1 kDa) yang dikode oleh dua gen yaitu Pir-A dan Pir-B (Taukhid *et al.*, 2019). Toksin yang dihasilkan oleh gen Pir-A dan Pir-B merupakan protein dengan mekanisme *cytotoxin* yang bekerja secara sinergis. Toksin ini membentuk kompleks heterodimerik yang berikatan dengan reseptor pada hepatopankreas udang sehingga menyebabkan nekrosis akut (Lin *et al.*, 2017).

Hingga tahun 2019, Indonesia dinyatakan sebagai negara bebas AHPND. Pada pemantauan Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) pada tahun 2013-2015 tidak ditemukan kasus positif AHPND pada komoditas udang (Hastuti dan Desrina, 2016). Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia menerbitkan Peraturan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. 165 Tahun 2019 tentang Petunjuk Teknis Pencegahan AHPND sebagai langkah preventif dan melakukan sosialisasi kepada pengusaha tambak di daerah (KKP, 2019). Pada tahun 2020 tepatnya bulan Mei, dilaporkan kasus pertama serangan AHPND di Indonesia yang terjadi di Gerokgak, Buleleng, Bali yang mengakibatkan lebih dari 9 hektar tambak udang vaname gagal panen. Hingga pertengahan tahun 2020, penyebaran AHPND hampir merata terjadi di berbagai daerah yang meliputi pesisir selatan Jawa, Sulawesi, Lampung dan Batam. Penyebaran AHPND yang masif ini membuat KKP membentuk Satgas Pengendalian Penyakit Ikan Nasional melalui Keputusan Dirjen Perikanan Budidaya Nomor 184/KEP-DJPB/2020 tentang Pembentukan Gugus Tugas Pengendalian Penyakit Ikan Nasional pada tanggal 20 Mei 2020. Upaya penanggulangan meliputi surveilan/pemantauan, zonasi, peningkatan kapasitas laboratorium pengujian AHPND dan sosialisasi (KKP, 2020).

Upaya antisipasi penyebaran penyakit AHPND dan pengurangan risiko kegagalan produksi memerlukan upaya pencegahan berupa deteksi dini dan pengendalian terhadap keberadaan patogen dengan cara melakukan deteksi secara berkala di kawasan tambak selama masa pemeliharaan. Deteksi dini dapat dilakukan dengan pemanfaatan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang dinilai lebih cepat dan sensitif apabila dibandingkan dengan metode diagnostik tradisional (Saeed dan Ahmad, 2013). Salah satu metode pendeteksian *V. parahaemolyticus* strain AHPND yang dapat dilakukan, yakni metode AP4 *nested* PCR dengan gen target spesifik Pir-A dan Pir-B (Dangtip *et al.*, 2015). Metode *nested* PCR merupakan metode PCR yang menggunakan dua set primer dengan spesifitas yang berbeda. Kedua set primer yang terdiri atas primer *outer* dan primer *inner* tersebut digunakan pada tahapan PCR sehingga dilakukan lebih dari satu kali PCR (Litbang Kemkes, 2021). AP4 *nested* PCR menggunakan dua set primer yang diambil dari marka gen Pir-A dan Pir-B. *Outer* primer akan menghasilkan amplikon sepanjang 1269 bp dan *inner* primer akan menghasilkan panjang

amplikon 230 bp sehingga dapat diperoleh data yang spesifik untuk mendeteksi *V. parahaemolyticus* strain AHPND pada udang vaname (*L. vannamei*) (Dangtip *et al.*, 2015).

Deteksi dini terhadap keberadaan *V. parahaemolyticus* strain AHPND pada udang vaname (*L. vannamei*) harus dilakukan secara cepat dan akurat, namun masih ditemukan hasil PCR yang tidak optimal berupa pita DNA yang tipis dan sulit dianalisis. Hasil pengujian yang optimal dapat diperoleh dengan memodifikasi sejumlah faktor untuk meningkatkan spesifisitas, presisi, dan sensitivitas pengujian (Nolan, 2014). Faktor yang mempengaruhi tingkat keberhasilan deteksi menggunakan metode PCR antara lain konsentrasi primer yang digunakan dan suhu *annealing*. Konsentrasi primer yang terlalu rendah atau terlalu tinggi dapat mempengaruhi sensitivitas reaksi sehingga dapat memberikan hasil negatif palsu (Siswanto *et al.*, 2019). Selanjutnya suhu yang digunakan pada tahap *annealing* harus optimum, suhu yang tidak sesuai dapat menyebabkan kegagalan proses PCR. Suhu yang terlalu rendah akan mengakibatkan terjadinya *mispriming* dan apabila suhu terlalu tinggi maka primer tidak dapat melekat pada DNA target (Amanda, 2019). Penelitian mengenai optimasi metode *nested* PCR khususnya metode AP4 *nested* PCR untuk deteksi bakteri *V. parahaemolyticus* strain AHPND ini masih belum pernah dilaksanakan, sehingga perlu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk memperoleh metode *nested* PCR yang optimal untuk deteksi *V. parahaemolyticus* strain AHPND pada udang vaname.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2022 hingga Januari 2023. Sampel udang vaname diperoleh dari sampel yang masuk Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Surabaya II. Optimasi metode *nested* PCR untuk deteksi *V. parahaemolyticus* strain AHPND pada udang vaname (*L. vannamei*) dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Surabaya II yang berlokasi di Jalan Sawunggaling No. 177 - 183, Ds. Jemundo, Kec. Taman - Sidoarjo, Jawa Timur. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator, *pellet pestle* (Axygen Homogenizer Autoclavable), *analytical balance*, *vortex mixer* (Thermolyne Maxi Mix Plus M63215), *dry block thermostat* (Biosan TDB-100), mikrosentrifus (Eppendorf 5453 Mini Spin Plus), mikrotube ukuran 1,5 ml dan 0,2 ml, mikropipet 0,5-10  $\mu$ l, 2-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l dan 100-1000  $\mu$ l, mikrotip (10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l), *thermal cycler* (SensoQuest Labcycler 48 012-102), *microwave*, *electrophoresis box*, *power supply* dan UV transilluminator (UVITEC Essential V6). Bahan yang digunakan yaitu media APW (*Alkaline Peptone Water*) (OXOID cat# CM1028), 2,5% NaCl, *silica extraction kit* (GeneReach Biotechnology lot# 042822), *agarose* (Genaxxon bioscience lot# D00303), akuades, DNA ladder 100 bp, TAE (*Tris Acetic-EDTA*) *electrophoresis buffer* 50x (Thermo scientific cat# B49), pewarna SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen cat# 33102), AHPND *Nested primer kit step 1* (IDT Inc) -AP4-F1 (52-ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC-32) dan primer AP4-R1 (52-ACGATTCGACGTTCCCAA-32), AHPND *Nested primer kit step 2* (IDT Inc) -AP4-F2 (52-TTGAGAATACGGGACGTGGG-32) dan primer AP4-R2 (52-GTTAGTCATGTGAGCACCTTC-32), TopTaq *master mix* (Qiagen lot# 163045324), 10x Coral Load Concentrate Loading Dye (Qiagen lot# 163045324), kontrol positif DNA *V. parahaemolyticus* strain AHPND (IDT Inc), *Nuclease Free Water* (NFW) dan DNA *template*.

Penelitian dilakukan dalam tiga tahapan yakni ekstraksi DNA, amplifikasi dan elektroforesis. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode *purposive sampling*, yakni teknik pengambilan sampel berdasarkan ciri-ciri khusus. Sampel udang yang digunakan adalah tiga udang dewasa yang diambil dari satu kolam tambak dengan pengujian sebanyak tiga kali ulangan. Sampel udang yang digunakan diduga positif AHPND dengan gejala klinis berupa saluran gastrointestinal yang kosong, hepatopankreas pucat, dan warna keputihan pada bagian abdomen. Sebelum dilakukan tahapan ekstraksi DNA, organ target berupa hepatopankreas dinekropsis dan dilakukan pengayaan *V. parahaemolyticus* untuk mendapatkan jumlah mikroorganisme yang cukup untuk diekstraksi. Pengayaan *V. parahaemolyticus* dilakukan menurut metode Tran *et al* (2013) yang termuat dalam *Manual of Diagnostic Test For Aquatic Animals* oleh OIE (2019) dengan proses pengayaan kultur dari organ target dengan media *Alkaline Peptone Water* (APW) *enrichment broth* dengan penambahan 2,5% NaCl. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada inkubator selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, supernatan dipindahkan sebanyak 1000  $\mu$ l ke dalam mikrotube ukuran 1,5 ml dan dilakukan sentrifugasi selama 3 menit dengan kekuatan 12.000 rpm. Kemudian supernatan dibuang dan dapat dilanjutkan proses ekstraksi DNA.

Ekstraksi dilakukan untuk memperoleh materi genetik berupa DNA dari sampel. Ekstraksi dilakukan dengan penambahan 900  $\mu\text{l}$  GT *buffer*, 40  $\mu\text{l}$  silica, 500  $\mu\text{l}$  GT *buffer* kedua, 1000  $\mu\text{l}$  etanol 70% dan 1000  $\mu\text{l}$  DEPC H<sub>2</sub>O. Ekstraksi diawali dengan penambahan 900  $\mu\text{l}$  GT *buffer* pertama kemudian dilakukan homogenisasi dan dilanjutkan dengan sentrifugasi 12.000 rpm selama 3 menit. Supernatan sebanyak 600  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke *tube* yang berisi 40  $\mu\text{l}$  silica kemudian dilakukan homogenisasi dan dilanjutkan dengan sentrifugasi 12.000 rpm selama 15 detik. Supernatan dibuang sedangkan *pellet* silica ditambahkan 500  $\mu\text{l}$  GT *buffer* kedua kemudian dilakukan homogenisasi dan dilanjutkan dengan sentrifugasi 12.000 rpm selama 15 detik. Supernatan dibuang dan tahap berikutnya adalah penambahan 1000  $\mu\text{l}$  etanol 70% dan dilakukan homogenisasi kemudian sentrifugasi 12.000 rpm selama 15 detik. Tahap terakhir yakni resuspensi *pellet* dengan 1000  $\mu\text{l}$  DEPC H<sub>2</sub>O kemudian dilakukan homogenisasi dan inkubasi pada suhu 55°C menggunakan *dry block thermostat* selama 10 menit. Setelah proses inkubasi selesai, dilakukan sentrifugasi 12.000 rpm selama 2 menit. Supernatan kemudian dipindahkan sebanyak 500  $\mu\text{l}$  ke mikrotube baru ukuran 1,5 ml. Sebelum dilakukan amplifikasi, hasil ekstraksi DNA dilakukan pengujian konfirmasi dengan metode elektroforesis menggunakan gel *agarose* 1%.

Optimasi *nested* PCR dilakukan pada tahapan *first* amplifikasi. Komponen PCR yang dioptimasi meliputi konsentrasi primer dan suhu *annealing*. Variasi suhu *annealing* ditentukan dengan perhitungan rata-rata *melting temperature* primer ( $T_m$ ) primer *forward* dan primer *reverse* kemudian dihitung menggunakan rumus  $(T_m - 5)^\circ\text{C}$  hingga  $(T_m + 5)^\circ\text{C}$  (Obradovic *et al.*, 2013). Pada mesin PCR, *setting* variasi suhu *annealing* ini dilakukan dengan memasukkan program *gradient* (Yuenleni, 2019). Optimasi suhu *annealing* dilakukan dengan memperhatikan rata-rata  $T_m$  primer *outer*. Perhitungan rata-rata  $T_m$  primer *outer* yang terdiri atas primer AP4-F1 dan primer AP4-R1 dilakukan menggunakan perangkat lunak *Thermo Fisher Tm Calculator* dan diperoleh hasil rata-rata  $T_m$  sebesar 58°C, sehingga variasi suhu *annealing* yang digunakan yakni sebesar 53°C, 58°C dan 63°C. Sedangkan pada perlakuan kontrol, suhu *annealing* tahap *first* dilakukan dengan mengacu pada Dangtip *et al.* (2015) yakni sebesar 55°C. Pengenceran primer dilakukan sebagaimana metode Yuanleni (2019) dengan variasi konsentrasi primer 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , dan 2,5  $\mu\text{M}$  dengan mengencerkan stok primer menggunakan NFW (*Nuclease Free Water*). Penghitungan pengenceran primer dilakukan dengan rumus pengenceran larutan  $V_1M_1 = V_2M_2$ . Adapun rincian komposisi pengenceran primer ditunjukkan pada Tabel 1. Bahan reaction mix pada metode pengujian AHPND yang dioptimasi ditunjukkan pada Tabel 2.

**Tabel 1.** Komposisi pengenceran primer (Yuanleni, 2019)

Konsentrasi Primer ( $\mu\text{M}$ )	Stok Primer ( $\mu\text{M}$ )	Volume Primer ( $\mu\text{l}$ )	Volume NFW ( $\mu\text{l}$ )
10	100	10	90
5	10	50	50
2,5	5	50	50

*Reaction mix* yang digunakan dalam satu kali reaksi PCR terdiri atas *master mix*, primer *forward*, primer *reverse*, *template* yang diperoleh dari hasil ekstraksi DNA dan NFW. Adapun komposisi *reaction mix* PCR dalam satu kali reaksi dengan volume total sebesar 10  $\mu\text{l}$  ditunjukkan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** *Reaction mix* PCR dalam pengujian AHPND yang dioptimasi

Bahan <i>step first</i>	Jumlah ( $\mu\text{l}$ )	Bahan <i>step nested</i>	Jumlah ( $\mu\text{l}$ )
<i>Master mix</i>	5	<i>Master mix</i>	5
Primer AP4-F1 (dioptimasi dengan konsentrasi 10 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$ dan 2,5 $\mu\text{M}$ )	0,4	Primer AP4-F2 konsentrasi 10 $\mu\text{M}$	0,4
Primer AP4-R1 (dioptimasi dengan konsentrasi 10 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$ dan 2,5 $\mu\text{M}$ )	0,4	Primer AP4-R2 konsentrasi 10 $\mu\text{M}$	0,4
NFW	3,4	NFW	3,4
<i>Template</i> DNA	0,8	<i>Template</i> (amplikon <i>first</i> amplifikasi)	0,8
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>Total</b>	<b>10</b>

Pengujian validitas deteksi *V. parahaemolyticus* AHPND perlu dilakukan dengan membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan kontrol positif dan kontrol negatif. *Reaction mix*

pada kontrol positif menggunakan pasangan basa oligonuklotida *V. parahaemolyticus* strain AHPND sebagai pengganti DNA *template* (Nainggolan *et al.*, 2020). Sedangkan, pada *reaction mix* kontrol negatif dibuat dengan tanpa penambahan DNA *template*. Sampel, kontrol positif dan kontrol negatif selanjutnya akan dirunning bersama dalam tahapan amplifikasi. Keberhasilan optimasi metode *nested* PCR untuk deteksi *V. parahaemolyticus* AHPND selanjutnya dibandingkan dengan perlakuan kontrol berupa metode AP4 *nested* PCR yang belum dioptimasi (Dangtip *et al.*, 2015).

Keberhasilan optimasi metode *nested* PCR untuk deteksi *V. parahaemolyticus* AHPND selanjutnya dibandingkan dengan perlakuan kontrol berupa metode yang belum dioptimasi dengan komposisi *reaction mix* sebagai berikut.

**Tabel 3.** *Reaction mix* PCR dalam pengujian AHPND pada perlakuan kontrol (Dangtip *et al.*, 2015).

Bahan <i>step first</i>	Jumlah (µl)	Bahan <i>step nested</i>	Jumlah (µl)
<i>Master mix</i>	12,5	<i>Master mix</i>	12,5
Primer AP4-F1 (konsentrasi 10 µM)	1	Primer AP4-F2 konsentrasi 10 µM	1
Primer AP4-R1 (konsentrasi 10 µM)	1	Primer AP4-R2 konsentrasi 10 µM	1
NFW	8,5	NFW	8,5
<i>Template</i> DNA	2	<i>Template</i> (amplikon <i>first</i> amplifikasi)	2
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>Total</b>	<b>25</b>

Profil tahapan amplifikasi dilakukan berdasarkan pada Dangtip *et al.* (2015) untuk pengujian AHPND, yang dijelaskan pada Tabel 4 dan Tabel 5. Tahap *first* dilaksanakan menggunakan primer *reverse* AP4-R1 dan primer *forward* AP4-F1. Profil suhu *annealing* dilakukan dengan perlakuan kontrol 55°C dan perlakuan optimasi 53, 58 dan 63°C. Amplikon yang diperoleh pada amplifikasi *first* ini yakni sepanjang 1269 *base pair*.

**Tabel 4.** Profil amplifikasi *first* AHPND yang dioptimasi

Primer	Tahap	Suhu (°C)	Waktu	Siklus	Amplikon
	<i>Pre-denaturation</i>	94	2 menit	1	
	<i>Denaturation</i>	94	30 detik	30	
AP4-R1/ AP4-F1	<i>Annealing</i>	(kontrol) 55; (dioptimasi) 53, 58 dan 63	30 detik	30	1269 bp
	<i>Extension</i>	72	90 detik	30	
	<i>Final extension</i>	72	2 menit	1	

Selanjutnya profil amplifikasi *nested* yang dijelaskan pada Tabel 5. Tahap *nested* dilaksanakan menggunakan primer *reverse* AP4-R2 dan primer *forward* AP4-F2. Pada tahap ini amplikon yang diperoleh yakni sepanjang 230 *base pair*.

**Tabel 5.** Profil amplifikasi *nested* AHPND

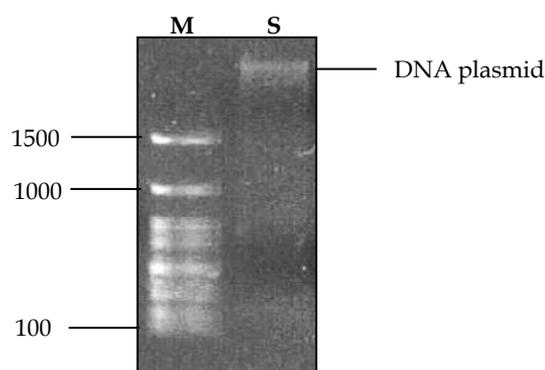
Primer	Tahap	Suhu (°C)	Waktu	Siklus	Amplikon
	<i>Pre-denaturation</i>	94	2 menit	1	
	<i>Denaturation</i>	94	20 detik	25	
AP4-R2/ AP4-F2	<i>Annealing</i>	55	20 detik	25	230 bp
	<i>Extension</i>	72	20 detik	25	
	<i>Final extension</i>	72	2 menit	1	

Tahapan elektroforesis menggunakan gel *agarose* 2% yang dibuat dengan melarutkan 2 gram *agarose* dalam 100 ml TAE 1x kemudian dipanaskan dengan suhu medium selama 15 menit menggunakan *microwave* dan ditambahkan 2  $\mu$ l pewarna SYBR *Safe*. Selanjutnya gel *agarose* dituang ke cetakan hingga memadat. Hasil *nested* yang terdiri atas sampel, kontrol positif dan kontrol negatif sebanyak 3  $\mu$ l (2  $\mu$ l sampel + 1  $\mu$ l *loading dye*) dan DNA *ladder* 100 bp dimasukkan sebanyak 2  $\mu$ l ke dalam sumuran gel *agarose*. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan sebesar 115 V selama 45 menit. Selanjutnya gel *agarose* dipindahkan ke UV transiluminator dan didokumentasikan menggunakan perangkat lunak UVITEC.

Data berupa amplicon DNA hasil elektroforesis selanjutnya dianalisis secara visual. Amplicon yang diperoleh dibandingkan dengan *base pair* yang serupa pada DNA *ladder* dan kontrol positif. Amplicon yang optimal ditandai dengan pita tebal, *single/tunggal*, tidak ada primer dimer, tidak adanya *smear* dan *mispriming*, serta kesesuaian ukuran target amplicon yaitu 230 bp. Selanjutnya dilakukan analisis kualitatif yang bertujuan untuk menjelaskan, menggambarkan, dan menjawab secara lebih rinci permasalahan yang diteliti yakni untuk mengetahui produk PCR yang optimal sebagaimana yang telah dideskripsikan untuk deteksi bakteri *V. parahaemolyticus* strain AHPND pada udang vaname (*L. vannamei*) dengan membandingkan hasil visualisasi DNA yang diperoleh pada setiap perlakuan dengan hasil amplicon DNA untuk pengujian *V. parahaemolyticus* AHPND menggunakan metode *nested* PCR yang tidak dioptimasi.

## HASIL

Hasil elektroforesis (Gambar 1) diperoleh pita DNA plasmid pada bagian atas gel. Pita DNA plasmid terbentuk dengan ukuran lebih dari 1500 bp atau sekitar 3500 bp.



**Gambar 1.** Visualisasi DNA hasil ekstraksi. Keterangan: M= DNA *Ladder* 100 bp, S= sampel hasil ekstraksi DNA.

Hasil amplifikasi pada perlakuan optimasi dan kontrol yang dielektroforesis menggunakan gel *agarose* 2% memperoleh pita sebesar 230 bp dengan beberapa variasi hasil yang ditunjukkan pada Gambar 2.

Hasil amplifikasi pada setiap perlakuan optimasi memperoleh pita sebesar 230 bp, tidak terdapat *smear*, primer *dimer* dan *mispriming*, namun memiliki variasi ketebalan yang berbeda. Penggunaan variasi suhu *annealing* 53°C (Gambar 2A) untuk optimasi pada tahap *first* amplifikasi memperoleh hasil yang baik. Keberhasilan tahap amplifikasi ditandai dengan hasil visualisasi berupa pita *ladder* DNA yang terpisah dengan baik dan munculnya pita DNA pada kontrol positif sebesar 230 bp dan tidak munculnya pita DNA pada kontrol negatif yang menandakan tidak adanya kontaminasi pada proses amplifikasi dan elektroforesis. Hasil pita DNA sampel juga diperoleh pada ukuran spesifik sebesar 230 bp sejajar dengan kontrol positif dengan ketebalan yang berbeda-beda pada setiap perlakuan konsentrasi primer. Pada konsentrasi primer 10  $\mu$ M diperoleh pita yang tebal, tidak ditemukan *smear*, *mispriming* dan primer *dimer*. Pada konsentrasi primer 5  $\mu$ M diperoleh pita yang lebih tipis dari pita pada konsentrasi primer 10  $\mu$ M, tidak ditemukan *smear*, *mispriming* dan primer *dimer*. Pada konsentrasi primer 2,5  $\mu$ M diperoleh pita yang tipis, tidak ditemukan *smear*, *mispriming* dan primer *dimer*.

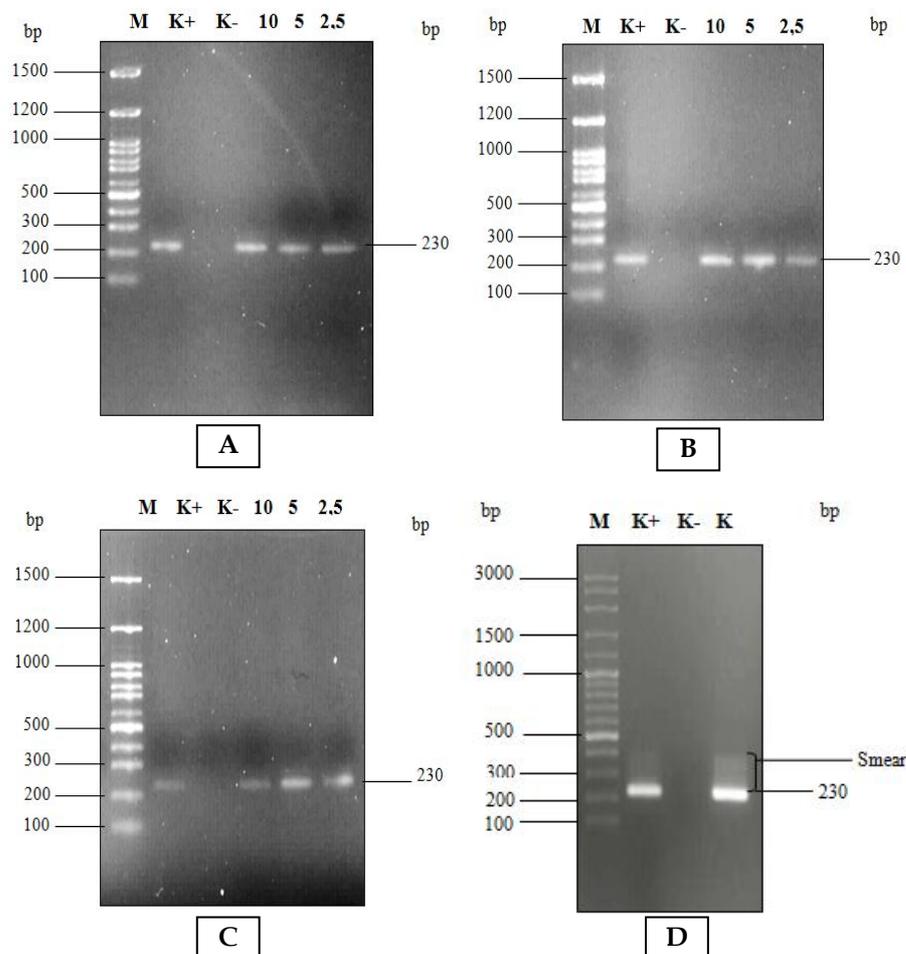
Pada kondisi optimasi suhu *annealing* 58°C (Gambar 2B) untuk optimasi pada tahap *first* amplifikasi memperoleh hasil yang baik. Keberhasilan tahap amplifikasi ditandai dengan hasil visualisasi berupa pita *ladder* DNA yang terpisah dengan baik dan munculnya pita DNA pada kontrol positif sebesar 230 bp serta tidak munculnya pita DNA pada kontrol negatif. Hasil pita DNA sampel

juga diperoleh pada ukuran spesifik sebesar 230 bp dengan ketebalan yang berbeda-beda pada setiap perlakuan konsentrasi primer. Pada optimasi dengan konsentrasi primer 10  $\mu\text{M}$  diperoleh pita yang tebal, tidak ditemukan *smear*, *mispriming* dan primer *dimer*, sedangkan optimasi dengan konsentrasi primer 5  $\mu\text{M}$  diperoleh pita yang tebal, tidak ditemukan *smear*, *mispriming* dan primer *dimer*. Pada optimasi dengan konsentrasi primer 2,5  $\mu\text{M}$  diperoleh pita yang tipis, tidak ditemukan *smear*, *mispriming* dan primer *dimer*.

Perlakuan manipulasi ketiga yakni pada suhu *annealing* 63°C (Gambar 2C) untuk optimasi pada tahap *first* amplifikasi memperoleh hasil yang baik. Keberhasilan tahap amplifikasi ditandai dengan hasil visualisasi berupa pita *ladder* DNA yang terpisah dengan baik dan munculnya pita DNA pada kontrol positif sebesar 230 bp serta tidak munculnya pita DNA pada kontrol negatif. Ukuran spesifik pita DNA sebesar 230 bp juga diperoleh dengan ketebalan yang berbeda-beda pada setiap perlakuan konsentrasi primer. Pada optimasi dengan konsentrasi primer 10  $\mu\text{M}$  diperoleh pita yang tipis, tidak ditemukan *smear*, *mispriming* dan primer *dimer*, sedangkan pada optimasi dengan konsentrasi primer 5  $\mu\text{M}$  diperoleh pita tebal, tidak ditemukan *smear*, *mispriming* dan primer *dimer*. Pada optimasi dengan konsentrasi primer 2,5  $\mu\text{M}$  diperoleh pita yang tipis, tidak ditemukan *smear*, *mispriming* dan primer *dimer*.

Pada kondisi perlakuan kontrol menggunakan suhu *annealing* 55°C (Gambar 2D) memperoleh hasil yang baik. Keberhasilan tahap amplifikasi ditandai dengan hasil visualisasi berupa pita *ladder* DNA yang terpisah dengan baik dan munculnya pita DNA pada kontrol positif sebesar 230 bp serta tidak munculnya pita DNA pada kontrol negatif. Namun pita DNA pada kontrol positif dan sampel terlihat terdapat *smear* dan ukurannya sangat tebal sehingga tidak dapat dianalisis apakah pita tersebut tunggal atau ganda.

Untuk hasil analisis setiap perlakuan optimasi dan kontrol yang diperoleh adalah sebagaimana tersaji pada Tabel 6.



**Gambar 2.** Hasil elektroforesis pada: (A) kondisi suhu *annealing* 53°C, (B) kondisi suhu *annealing* 58°C,

(C) kondisi suhu *annealing* 63°C, dan (D) kondisi kontrol suhu *annealing* 55°C. Keterangan: M = DNA ladder 100 bp; K+ = kontrol positif AHPND; K- = kontrol negatif AHPND; 10 = konsentrasi primer 10 µM; 5 = konsentrasi primer 5 µM; 2,5 = konsentrasi primer 2,5 µM; K= sampel kontrol.

Tabel 6. Analisis hasil pada perlakuan optimasi dan kontrol

Primer	Kondisi Optimasi				Sampel*		
	Konsent. Primer	Suhu (°C)	Ukuran Pita (bp)	Ketebalan	Primer Dimer	Mispriming	Smear
AP4-R1	10	53	230	Tebal	-	-	-
		55 (kontrol)	230	Sangat Tebal	-	-	✓
		58	230	Tebal	-	-	-
		63	230	Tipis	-	-	-
		53	230	Tipis	-	-	-
AP4-F1	5	58	230	Tebal	-	-	-
		63	230	Tebal	-	-	-
		53	230	Tipis	-	-	-
	2,5	58	230	Tipis	-	-	-
		63	230	Tipis	-	-	-
		53	230	Tipis	-	-	-

Keterangan: - = tidak ada, ✓ = ada.

## PEMBAHASAN

Keberhasilan ekstraksi DNA dianalisis secara kualitatif dengan memvisualisasikan DNA menggunakan metode elektroforesis gel *agarose*. Prinsip elektroforesis yaitu pemisahan DNA berdasarkan berat molekul pada gel *agarose* dengan menggunakan muatan listrik. DNA akan bergerak dari arah kutub negatif ke positif pada medan listrik. Konsentrasi gel *agarose* yang digunakan sebesar 1% dengan penambahan 2 µl SYBR *safe*. Penambahan SYBR *safe* berfungsi sebagai pewarna fluoresen yang apabila berikatan dengan molekul DNA dan dilihat di bawah sinar ultraviolet menjadi berpendar terang sehingga pita DNA dapat dengan mudah diamati. Penggunaan SYBR *safe* dinilai lebih sensitif dan lebih aman dibandingkan dengan menggunakan pewarna Etidium Bromida (EtBr) yang bersifat karsinogenik. Selain itu juga dilakukan penambahan *loading dye* pada hasil ekstraksi DNA. Penggunaan *loading dye* yang ditambahkan pada hasil ekstraksi bertujuan untuk memberikan warna yang memudahkan dalam peletakan sampel ke dalam sumuran, sebagai penanda laju migrasi fragmen DNA, serta menambahkan densitas sampel sehingga dapat terbenam di dalam sumuran gel (Lee *et al.*, 2012). Larutan TAE berperan sebagai larutan penyangga sekaligus media penyedia elektrolit saat proses pergerakan arus listrik (Harahap, 2018). Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100 V, 400 mA selama 30 menit.

Konfirmasi keberhasilan ekstraksi DNA menggunakan elektroforesis menunjukkan pita DNA plasmid pada bagian atas gel berukuran lebih dari 1500 bp. Berdasarkan penelitian Prithvisagar *et al.* (2021) mengenai *whole genome analysis*, diperoleh hasil jumlah genom total *V. parahaemolyticus* sebesar 5,2 Mb. Sedangkan gen *pir-A* dan *pir-B* berada di dalam plasmid yang berukuran sekitar 3500 bp atau 3,5 kb (Han *et al.*, 2015). Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui bahwa ekstraksi DNA plasmid dinyatakan berhasil karena memperoleh pita dengan kisaran ukuran 3500 bp.

Pita tebal yang terbentuk menandakan sampel DNA yang dihasilkan memiliki konsentrasi yang tinggi, begitupun sebaliknya apabila terbentuk pita tipis menandakan rendahnya konsentrasi sampel DNA. Berdasarkan analisis dengan menggunakan metode kualitatif, kemurnian DNA juga ditandai oleh tidak terbentuknya *smear* yang menunjukkan ada tidaknya kontaminan seperti RNA atau protein (Hidayati *et al.*, 2016). Visualisasi DNA hasil ekstraksi dalam penelitian ini menunjukkan masih ditemukan adanya *smear*. Selain *smear*, pada hasil visualisasi tersebut juga dapat dianalisis terjadinya fragmentasi pita DNA (Gambar 1). Fragmentasi pita DNA adalah keadaan dimana terjadi pemotongan atau pemisahan untai DNA. Terjadinya fragmentasi DNA pada hasil ekstraksi menandakan DNA dalam keadaan kurang murni. *Smear* yang terbentuk di bagian bawah dekat pita DNA menandakan DNA yang diisolasi tidak utuh atau terfragmentasi. Sementara itu, *smear* yang terletak pada bagian terbawah setiap lajur menunjukkan adanya kontaminasi (Hikmatyar *et al.*, 2015). Menurut Sauer *et al.* (1998) *smear* atau bayangan yang terletak pada bagian paling bawah dari setiap lajur menunjukkan bahwa DNA terkontaminasi. Simamarta dan Rustikawati (2015) menambahkan, tingkat kemurnian DNA juga dipengaruhi oleh penggunaan *kit* isolasi DNA dan penggunaan larutan purifikasi DNA yang berbeda.

Amplifikasi adalah tahap penggandaan rantai DNA target hasil ekstraksi yang sesuai dengan primer. Terdapat beberapa faktor yang dapat menentukan taraf keberhasilan teknik amplifikasi DNA

menggunakan metode PCR. Faktor-faktor tersebut antara lain konsentrasi primer, jumlah deoksiribonukleotida triphosphate (dNTP), komposisi larutan *buffer*, kemurnian *template* DNA, jumlah siklus reaksi, enzim yang digunakan, suhu *annealing*, serta faktor teknis dan non-teknis lainnya, seperti kemungkinan terjadinya kontaminasi (Feranisa, 2016). *Taq* DNA polimerase terdiri atas satu rantai polipeptida yang memiliki berat molekul kurang lebih 95 kD. Enzim ini memiliki kapabilitas polimerisasi DNA yang sangat tinggi, akan tetapi tidak memiliki aktivitas eksonuklease 3' ke 5'. Enzim *Taq* polimerase aktif secara optimal pada pH 9-10. Enzim ini tetap stabil hingga pada suhu mendidih 100°C (Fatchiyah *et al.*, 2011). Sama halnya dengan tahapan replikasi DNA, enzim DNA polimerase juga mensintesis DNA dengan arah dari ujung 5' ke ujung 3' (Pooja *et al.*, 2014). Amplifikasi DNA dengan metode PCR membutuhkan primer oligonukleotida. Primer merupakan suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berguna untuk mengawali proses sintesis rantai DNA. Secara umum, primer yang digunakan terdiri dari 20-30 nukleotida, sedangkan DNA *template* (cetakan) merupakan fragmen DNA yang akan dilipatgandakan (Yusuf, 2010).

Pada proses pengujian AHPND digunakan metode *nested* PCR yakni pada tahapan amplifikasi dilakukan sebanyak dua kali yakni *first step* dan *nested*. Metode *nested* adalah salah satu variasi teknik PCR yang menggunakan dua set primer yang memiliki spesifisitas yang berbeda. Metode ini dilakukan dengan lebih dari satu kali PCR menggunakan dua set primer pada prosedur PCR yang terpisah. Metode ini memiliki beberapa keunggulan yakni akan menghasilkan ampikon yang lebih akurat serta sesuai dengan DNA target yang diinginkan (Litbang Kemkes, 2021).

Pengujian AHPND menggunakan metode AP4 *nested* PCR dilaksanakan dengan menggunakan dua set primer yang mengenali marka gen Pir-A dan Pir-B. Gen Pir-A dan Pir-B diregulasi dalam satu operon dan berada di dalam plasmid pVPA3-1 yang berukuran sekitar 3,5 kb (Han *et al.*, 2015). Kedua set primer akan mengenali bagian awal sekuens Pir-A dan bagian akhir Pir-B. Salah satu toksin biner yang dihasilkan oleh marka gen, yaitu Tox-A berikatan dengan ligan spesifik pada membran sel dan reseptor (misalnya, monosakarida seperti N-acetylgalactosamine (GalNAc) dan oligosakarida) serta memfasilitasi pengenalan target spesifik. Sementara Tox-B mengandung dominan N-terminal (PirBN) dan domain C-terminal (PirBC), menginduksi kematian sel inang melalui pembentukan pori dan terlibat dalam interaksi protein ligan (De Los Santos *et al.*, 2020). Toksin biner yang dihasilkan oleh gen Pir-A dan Pir-B merupakan protein homolog yang bekerja secara sinergis untuk berikatan dengan jaringan epitel hepatopankreas, melalui pengikatan pada ligan tertentu pada membran sel dan reseptor yang menyebabkan oligomerisasi, pembentukan pori dan kematian sel (Lin *et al.*, 2017). Berdasarkan penelitian Kumar *et al.* (2019) melaporkan bahwa racun Tox-A dan Tox-B menginduksi nekrosis fokal secara luas dan merusak enterosit epitel pada retikulum endoplasma kasar. Pada tahap lanjutan, AHPND menyebabkan kerusakan parah pada epitel dan komponen degenerasi nuklei piknotik dan lisis membran sel. Toksin tersebut juga mempengaruhi pencernaan larva *A. franciscana* yang menyebabkan tidak tercernanya makanan yang diberikan (Kumar *et al.*, 2019).

Optimasi kondisi PCR bertujuan untuk mengefisienkan komponen dan kondisi PCR sehingga tahapan deteksi dapat dilaksanakan dengan lebih cepat dan tepat, serta diperoleh kondisi PCR yang sesuai sehingga dihasilkan produk PCR yang optimal berupa pita yang tunggal, tebal, dan sesuai ukuran target (Yuanleni, 2019).

Pada perlakuan optimasi suhu *annealing* sebesar 53°C, hasil terbaik ditunjukkan pada sampel yang diamplifikasi menggunakan konsentrasi primer 10 µM pada suhu *annealing* 53°C. Selanjutnya pada optimasi suhu *annealing* sebesar 58°C, hasil terbaik ditunjukkan pada sampel yang diamplifikasi menggunakan konsentrasi primer 10 µM dan 5 µM pada suhu *annealing* 58°C. Sedangkan pada optimasi suhu *annealing* sebesar 63°C, hasil terbaik ditunjukkan pada sampel yang diamplifikasi menggunakan konsentrasi primer 5 µM.

Pada hasil visualisasi terlihat noda gelap berwarna hitam yang cukup mengganggu pengamatan secara visual. Noda tersebut merupakan sisa pewarna *loading dye*. *Loading dye* yang digunakan adalah 10x *Coral Load concentrate* (Qiagen) tanpa pengenceran dengan perbandingan 2:1 terhadap sampel. Hasil amplifikasi yang akan dielektroforesis ditambah dengan *loading dye* yang berperan untuk memonitor pergerakan DNA pada tahap elektroforesis. *Loading dye* bergerak bersama molekul DNA selama proses *running* elektroforesis (Ausubel *et al.*, 2003). Konsentrasi *loading dye* yang terlalu tinggi menyebabkan munculnya noda pada *agarose* yang akan menyulitkan pembacaan hasil.

Hasil optimasi pada tiga suhu *annealing* dan tiga konsentrasi primer tidak ditemui primer *dimer*, *smear* dan *mispriming* sehingga dapat dikatakan bahwa penempelan primer terjadi secara sempurna dan tidak terjadi reaksi yang tidak spesifik. Namun hasil elektroforesis menunjukkan

menghasilkan ketebalan pita DNA yang berbeda. Menurut Siswanto *et al.* (2019), ukuran pita dapat berbeda karena suhu *annealing* dan konsentrasi primer yang terlalu tinggi akan mempengaruhi efisiensi reaksi serta jumlah amplicon tidak optimal sehingga terlihat berukuran tipis dan tidak jelas saat dielektroforesis.

Primer *dimer* merupakan produk non-spesifik pada proses elongasi atau pemanjangan primer. Selama PCR, pembentukan primer *dimer* bersaing dengan pembentukan produk PCR spesifik sehingga menyebabkan penurunan efisiensi amplifikasi (Abd-Elsalam, 2003). Ujung C, G, CG atau GC menyebabkan hibridisasi lebih stabil, namun perlu dihindari lebih dari tiga basa C atau G pada lima basa terakhir ujung 3' karena akan menyebabkan pelipatan serta membentuk struktur *dimer* yang menyebabkan ujung 3' primer tidak mengikat *template*. Kandungan GC berfungsi untuk meningkatkan tingkat kestabilan primer. Ikatan hidrogen yang kuat pada pasangan basa G dan C membuat primer menjadi lebih stabil untuk menempel pada *template*, oleh karena itu kandungan GC disarankan berkisar antara 40% hingga 60%. Apabila primer memiliki terlalu banyak basa komplementer maka akan terbentuk struktur *dimer*. Ketika ikatan basa komplementer lebih stabil dibandingkan ikatan primer dan *template*, walaupun dengan suhu *annealing* yang tinggi, primer tidak dapat berikatan dengan *template*. Sehingga kualitas produk PCR yang terbentuk akan berkurang secara signifikan (Sasmito *et al.*, 2014).

Penggunaan suhu *annealing* 55°C yang merupakan perlakuan kontrol untuk amplifikasi pada tahap *first* amplifikasi untuk pengujian AHPND memperoleh hasil visualisasi berupa pita *ladder* DNA yang terpisah dengan baik dan munculnya pita DNA pada kontrol positif serta tidak adanya pita pada kontrol negatif yang menandakan tidak terjadinya kontaminasi. Namun pita DNA pada kontrol positif dan sampel terlihat terdapat *smear* dan ukurannya sangat tebal sehingga tidak dapat dianalisis apakah pita tersebut tunggal atau ganda. *Smear* terbentuk akibat RNA dan protein ataupun kontaminan lainnya yang terdapat pada sampel saat proses elektroforesis (Aulia *et al.*, 2021).

Ukuran pita yang terlalu tebal diduga akibat terjadinya penumpukan dengan pita lain pada ukuran amplicon yang berbeda dan tidak sesuai dengan ukuran DNA target, kondisi ini dinamakan dengan *mispriming* yang disebabkan oleh ketidaksesuaian kondisi primer. Primer mempunyai tingkat spesifitas tertentu pada DNA target. Primer yang tidak spesifik dapat menimbulkan *mispriming* atau bahkan tidak mampu mengamplifikasi DNA. Berdasarkan pendapat Hairmansis & Aswidinnoor (2005), dasar dari keberhasilan proses PCR terletak pada kesesuaian primer, efisiensi serta optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik dapat mengakibatkan teramplifikasinya area non-target dalam genom atau sebaliknya tidak terdapat area genom yang teramplifikasi.

Produk PCR dikategorikan optimal apabila menghasilkan pita DNA yang tunggal, tebal, tidak terdapat *smear*, sesuai ukuran target, dan tidak ada reaksi non-spesifik. Berdasarkan hasil yang didapatkan pada perlakuan masih ditemukan produk PCR yang kurang optimal yakni adanya *smear*. Pada kondisi tersebut juga didapatkan pita yang sangat tebal sehingga menyulitkan analisis hasil dan berisiko tinggi mendapatkan hasil *false negative*. Pada sampel yang diberi perlakuan optimasi suhu *annealing* dan konsentrasi primer terdapat perbedaan signifikan pada kondisi ketebalan pita dan waktu yang dibutuhkan untuk amplifikasi. Pada perlakuan suhu *annealing* 53°C didapatkan hasil terbaik pada konsentrasi primer 10 µM. Pada perlakuan ini didapatkan hasil pita DNA yang tebal berukuran 230 bp, tidak terdapat *smear*, primer *dimer* dan *mispriming*. Pada perlakuan suhu *annealing* 58°C didapatkan hasil terbaik pada konsentrasi primer 5 µM. Pada perlakuan ini didapatkan hasil pita DNA yang tebal berukuran 230 bp, tidak terdapat *smear*, primer *dimer* dan *mispriming*. Pada perlakuan suhu *annealing* 63°C didapatkan hasil terbaik pada konsentrasi primer 5 µM. Pada perlakuan ini didapatkan hasil pita DNA yang tebal namun kurang jelas, berukuran 230 bp, tidak terdapat *smear*, primer *dimer* dan *mispriming*. Dari ketiga hasil tersebut didapatkan hasil terbaik pada perlakuan suhu *annealing* 58°C konsentrasi primer 5 µM.

Hasil PCR pada suhu *annealing* 58°C menghasilkan produk PCR terbaik berupa pita yang paling tebal, jelas dan tunggal/*single* dibandingkan pada suhu *annealing* 53°C, 55°C dan 63°C. Suhu *annealing* sangat berperan terhadap tahap pengikatan primer pada *template* DNA. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi mengakibatkan primer tidak berikatan dengan baik pada *template*, kondisi ini ditandai dengan semakin tipisnya pita DNA yang terbentuk, sedangkan suhu *annealing* yang rendah menyebabkan primer akan berikatan pada area penempelan yang tidak spesifik yang kemudian akan mengakibatkan teramplifikasinya fragmen lokus yang tidak diinginkan (Pertiwi *et al.*, 2015). Berdasarkan hasil penelitian juga diperoleh hasil bahwa pada konsentrasi primer 10 µM dan 5 µM didapatkan hasil pita DNA yang baik yakni tebal, tunggal, tidak terdapat *smear*, primer *dimer* dan *mispriming* serta sesuai dengan ukuran target yakni 230 bp. Sedangkan pada konsentrasi primer 2,5

$\mu\text{M}$  didapatkan pita yang tipis dan sulit diamati. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi atau rendah dapat mengakibatkan tidak terjadinya amplifikasi. Semakin tinggi konsentrasi primer menyebabkan terbentuknya pita yang tebal, namun terkadang juga diikuti pembentukan pita yang tidak spesifik (*unspecific band*) (Yuanleni, 2019).

Berdasarkan penelitian Hidayati *et al* (2016), pita DNA yang tunggal atau mengumpul (tidak menyebar), tebal dan terang secara kualitatif mengindikasikan konsentrasi hasil isolasi DNA yang dihasilkan tinggi DNA yang diekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan pita yang tipis mengindikasikan konsentrasi DNA yang dihasilkan kecil dan pita DNA yang tampak menyebar menggambarkan terjadinya pemotongan genom DNA menjadi bagian-bagian kecil yang diakibatkan oleh ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat tahap ekstraksi berlangsung. Terputusnya ikatan antar molekul tersebut dapat diakibatkan oleh adanya gerakan fisik yang berlebihan yang mungkin terjadi dalam proses sentrifugasi, pemipetan, mobilisasi mikrotube, aktivitas bahan-bahan kimia tertentu atau bahkan karena temperatur yang terlalu tinggi. Tahapan optimasi PCR ini perlu dilakukan untuk setiap gen yang akan diuji menggunakan metode PCR karena kondisi sampel, reagen, dan alat-alat yang digunakan di setiap laboratorium tidak sama. Pada penelitian ini diketahui konsentrasi primer yang optimal untuk deteksi *V. parahaemolyticus* menggunakan metode AP4 *nested* PCR adalah sebesar 5  $\mu\text{M}$ . Hasil deteksi akan semakin optimal jika diamplifikasi dengan menggunakan suhu *annealing* 58°C. Hasil yang optimal dikonfirmasi dengan diperolehnya pita yang tebal, tidak terdapat *smear*, primer *dimer* dan *mispriming* pada amplifikasi menggunakan konsentrasi primer dan suhu *annealing* tersebut. Namun penelitian lebih lanjut seperti pengujian hasil optimasi dari penelitian ini untuk deteksi AHPND pada sampel berkualitas rendah (sedimen tambak dan air dari lingkungan hidup udang vaname) dan optimasi pada tahap *nested* agar diperoleh perbandingan hasil yang mungkin lebih optimal.

## SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa optimasi metode AP4 *nested* PCR untuk deteksi *V. parahaemolyticus* strain AHPND pada udang vaname (*L. vannamei*) yakni pada konsentrasi primer 5  $\mu\text{M}$  dan suhu *annealing* 58°C menghasilkan pita DNA paling optimal yakni tebal, tidak terdapat *smear*, primer *dimer* dan *mispriming*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Elsalam KA, 2003. Bioinformatic Tools and Guideline for PCR Primer Design. *African Journal of Biotechnology*; 2(5): 91-95. doi: [10.5897/AJB2003.000-1019](https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1019)
- Amanda K, 2019. Optimasi Suhu *Annealing* Proses PCR Amplifikasi Gen shv Bakteri *Escherichia coli* Pasien Ulkus Diabetik. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*; 4(1): 10-16.
- Aulia SL, Suwignyo RA, dan Hasmeda M, 2021. Optimasi Suhu *Annealing* untuk Amplifikasi DNA Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*. *Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*; 18(1): 44-54. doi: [10.31851/sainmatika.v17i3.5805](https://doi.org/10.31851/sainmatika.v17i3.5805)
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, dan Struhl K, 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. USA: John. Wiley & Sons, Inc.
- Dangtip S, Sirikharin R, Sanguanrut P, Thitamadee S, Sritunyaluksana K, Taengchaiyaphum S, dan Flegel TW, 2015. AP4 Method for Two-Tube Nested PCR Detection of AHPND Isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*; 2(1): 158-162. doi: [10.1016/j.aqrep.2015.10.002](https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.10.002)
- De Los Santos VM, Vibanco-Pérez N, Soto-Rodríguez S, Pereyra A, Zenteno E, dan Cano-Sánchez P, 2020. The B Subunit of PirAB vp Toxin Secreted from *Vibrio parahaemolyticus* Causing AHPND is An Amino Sugar Specific Lectin. *Pathogens*; 9(3): 182. doi: [10.3390/pathogens9030182](https://doi.org/10.3390/pathogens9030182)
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2019. The State of World Fisheries and Aquaculture. *Fisheries and Aquaculture Department*. Rome (IT): FAO.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2020. *L. vannamei*. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food Ontario, Canada. *Fisheries and Aquaculture Department*. Ontario: FAO.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2013. FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304). *FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053*. Hanoi, Vietnam.
- Fatchiyah EL, Arumningtyas S, Widyarti, dan Rahayu S, 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga. Hal. 48-57.
- Feranisa A, 2016. Komparasi Antara Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Loopmediated Isothermal Amplification (LAMP) Dalam Diagnosis Molekuler. *Odonto: Dental Journal*; 3(2): 145-151.
- Flegel T. W. (2019). A Future Vision for Disease Control in Shrimp Aquacultures. *J. World aquac. Soc*; 50(2): 249-266. doi: [10.1111/jwas.12589](https://doi.org/10.1111/jwas.12589)

- Hairmansis A, dan Aswidinnoor H, 2005. Evaluasi Daya Pemulih Kesuburan Padi Lokal dari Kelompok Tropical Japonica. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*; 33(3): 1-6. doi: [10.24831/jai.v33i3.1258](https://doi.org/10.24831/jai.v33i3.1258)
- Hakim L, Supono S, Adiputra YT, dan Waluyo S, 2018. Performa Budidaya Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Semi Intensif di Desa Purworejo Kecamatan Pasir Sakti Kabupaten Lampung Timur. *E-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*; 6(2): 691-698. doi: [10.23960/jrtbp.v6i2.p691-698](https://doi.org/10.23960/jrtbp.v6i2.p691-698)
- Han JE, Tang KFJ, Tran LH, dan Lightner DV, 2015. Photorhabdus Insect-Related (Pir) Toxin-Like Genes in A Plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, The Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of Shrimp. *Dis. Aquat. Org*; 113(1): 33-40. doi: [10.3354/dao02830](https://doi.org/10.3354/dao02830)
- Harahap MR, 2018. Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*; 2(1): 21-26. doi: [10.22373/crc.v2i1.3248](https://doi.org/10.22373/crc.v2i1.3248)
- Hastuti MS. dan Desrina, 2016. Current Status of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and Other Transboundary Diseases of Farmed Shrimps in Indonesia. Submitted at the *Addressing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia: Proceedings of the ASEAN Regional Technical Consultation on EMS/AHPND and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia, Makati City, Philippines, 22-24 February 2016*. (pp. 37-43). Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Hidayati H, Saleh E, dan Aulawi T, 2016. Identifikasi Keragaman Gen BMPR-1b (Bone Morphogenetic Protein Receptor Ib) pada Ayam Arab, Ayam Kampung dan Ayam Ras Petelur Menggunakan PCR-RFLP. *Jurnal Peternakan UIN Sultan Syarif Kasim*; 13(1):1-12.
- Hikmatyar MF, dan Royani JI, 2015. Isolasi dan Amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium flagelliform*) untuk Identifikasi Keragaman Genetik. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*; 2(2): 42-48. doi: [10.29122/jbbi.v2i2.507](https://doi.org/10.29122/jbbi.v2i2.507)
- KKP (Kementerian Kelautan dan Perikanan), 2019. *Peraturan Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya No. 165 Tahun 2019 tentang Petunjuk Teknis Pencegahan AHPND*. Jakarta.
- KKP (Kementerian Kelautan dan Perikanan), 2020. *Keputusan Dirjen Perikanan Budidaya Nomor 184/KEP-DJPB/2020 tentang Pembentukan Gugus Tugas Pengendalian Penyakit Ikan Nasional*. Jakarta.
- Kumar V, Nguyen DV, Baruah K, dan Bossier P, 2019. Probing the Mechanism of VPAHPND Extracellular Proteins Toxicity Purified from *Vibrio parahaemolyticus* AHPND Strain in Germ-Free Artemia Test System. *Aquaculture*; 504(1): 414-419. doi [10.1016/j.aquaculture.2019.02.029](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.029)
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, dan Kim YH, 2012. Agarose Gel Electrophoresis for The Separation of DNA Fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*; 62(1): 3923.
- Lightner DV, Redman CR, Pantoja BL, Noble LM, Nunan, dan Tran L, 2013. Documentation of An Emerging Disease (Early Mortality Syndrome) In SE Asia & Mexico. *OIE Reference Laboratory For Shrimp Disease, The University of Arizona*.
- Lin SJ, Hsu KC, dan Wang HC, 2017. Structural Insights into The Cytotoxic Mechanism of *V. parahaemolyticus* Pir-A and Pir-B toxin. *Marine Drugs*; 373(15): 373. doi: [10.3390/md15120373](https://doi.org/10.3390/md15120373)
- Litbang Kemkes, 2021. Metode Deteksi Nested PCR. Diakses pada 20 Juni 2022, dari <https://www.balaibaturaja.litbang.kemkes.go.id/read-metode-deteksi-nested-pcr>
- Miandare HK, Mirghaed AT, Hosseini M, Mazloumi N, Zargar A, dan Nazari S, 2017. Dietary Immunogen® Modulated Digestive Enzyme Activity and Immune Gene Expression in *L. vannamei* Post Larvae. *Fish & Shellfish Immunology*; 70(1): 621-627. doi: [10.1016/j.fsi.2017.09.048](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.048)
- Nainggolan RKS, Yuhana M, Sukenda S, dan Sariati WNE, 2020. Deteksi *Vibrio parahaemolyticus* Menggunakan Marka Gen PirA pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan Real Time PCR. *Jurnal riset akuakultur*; 15(2): 111-119. doi: [10.15578/jra.15.2.2020.111-119](https://doi.org/10.15578/jra.15.2.2020.111-119)
- Nolan T, 2014. *A Technical Guide PCR Technologies*. St. Louis: Sigma Aldrich.
- Obradovic J, Jurisic V, Tosic N, Mrdjanovic J, Perin B, Pavlovic S, dan Djordjevic N, (2013). Optimization of PCR Conditions for Amplification of GC-Rich EGFR Promoter Sequence. *Journal of clinical laboratory analysis*; 27(6): 487-493. doi: [10.1002/jcla.21632](https://doi.org/10.1002/jcla.21632)
- OIE, 2019. Chapter 2.2.1. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Office International des Epizooties, The World Organisation for Animal Health*.
- Pertiwi NPN, Mahardika IGNK dan Watininiasih NL, 2015. Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction) Pada Ikan Karang Anggota Famili *Pseudochromidae* (DOTTYBACK) untuk Identifikasi Spesies Secara Molekular. *Jurnal Biologi Udayana*; 19(2): 1-5.
- Pooja S, Sudesh D, Poonam K, Joginder SD, dan Suresh KG, 2014. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: A Review. *African J Biotechnol [Internet]*; 13(19): 1920-1928.
- Prithvisagar KS, Krishna KB, Kodama T, Rai P, Iida T, Karunasagar I, dan Karunasagar I, 2021. Whole Genome Analysis Unveils Genetic Diversity and Potential Virulence Determinants in *Vibrio parahaemolyticus* Associated with Disease Outbreak Among Cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific White Shrimp) in India. *Virulence*; 12(1): 1936-1949. doi: [10.1080/21505594.2021.1947448](https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1947448)
- Raja RA, Sridhar R, Balachandran C, Palanisammi A, Ramesh S, dan Nagarajan K, 2017. Pathogenicity Profile of *V. parahaemolyticus* in Farmed Pacific White Shrimp, *Penaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*; 67: 368- 381. doi: [10.1016/j.fsi.2017.06.020](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.020)

- Saeed KBA, dan Ahmad NS, 2013. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Applications In Diagnostic Microbiology. *International Journal of Medical Students*; 1(1): 23-86. doi: [10.5195/ijms.2013.22](https://doi.org/10.5195/ijms.2013.22)
- Santos HM, Tsai CY, Maquiling KRA, Tayo LL, Mariatulqabiah AR, Lee CW, dan Chuang KP, 2020. Diagnosis and Potential Treatments For Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): a Review. *Aquac International*; 28(1): 169-185. doi: [10.1007/s10499-019-00451-w](https://doi.org/10.1007/s10499-019-00451-w)
- Sasmito DEK, Kurniawan R, dan Muhimmah I, 2014. Karakteristik Primer pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. Submitted at the *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)*: 93-102.
- Sauer PM, Muller dan Kang J, 1998. Quantitation DNA. *Qiagen News*; 2(1): 23- 26.
- Siswanto YP, Merdekawati F, Ernawati E, Hardiana AT, dan Kurniawan E, 2019. Optimasi Suhu *Annealing* dan Konsentrasi Primer Untuk Deteksi *Brugia Malayi* Menggunakan Real-Time PCR. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*; 11(1): 314-321. doi: [10.34011/juriskesbdg.v11i1.791](https://doi.org/10.34011/juriskesbdg.v11i1.791)
- Songsangjinda P dan Polchana J, 2016. Current Status and Impact of Early Mortality Syndrome (EMS)/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and Hepatopancreatic Microsporidiosis (HPM) Outbreaks on Thailand's Shrimp Farming. Submitted at the *Addressing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia: Proceedings of the ASEAN Regional Technical Consultation on EMS/AHPND and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia, Makati City, Philippines, 22-24 February 2016*. (pp. 79-87). Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Taukhid MHB, Utari S, Naim MS, Hastuti D, Nugraha, dan Widowati Z, 2019. *Standar Operasional Prosedur Pengendalian AHPND (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease)*. Jakarta, Direktorat Kawasan dan Kesehatan: KKP.
- Tran L, Nunan L, Redman RM, Mohney LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K, dan Lightner DV, 2013. Determination of The Infectious Nature of The Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome Affecting *Penaeid* Shrimp. *Disease of Aquatic Organisms*; 105(1): 45-55. doi: [10.3354/dao02621](https://doi.org/10.3354/dao02621)
- Yuanleni, Y, 2019. Langkah-Langkah Optimasi PCR. *Indonesian Journal of Laboratory*; 1(3): 51-56. doi: [10.22146/ijl.v1i3.48723](https://doi.org/10.22146/ijl.v1i3.48723)
- Yusuf ZK, 2010. *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Saintek*; 5(6): 1-6.

**Article History:**

Received: 24 Mei 2023

Revised: 1 Juli 2023

Available online: 18 Oktober 2023

Published: 31 Januari 2024

**Authors:**

Ratih Khairul Anissa, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang Gedung C3 Lt.2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: [khairulratih@gmail.com](mailto:khairulratih@gmail.com)

Lisa Lisdiana, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang Gedung C3 Lt.2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: [lisalisdiana@unesa.ac.id](mailto:lisalisdiana@unesa.ac.id)

Anita Tri Widyayanti, Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Surabaya II, Jl. Kalimas Baru No. 86, Perak Utara, Surabaya 60165, Indonesia, e-mail: [karantinaikan\\_anita@yahoo.co.id](mailto:karantinaikan_anita@yahoo.co.id)

**How to cite this article:**

Anissa RK, Lisdiana L, dan Widyayanti AT, 2024. Optimasi Metode *Nested* PCR untuk Deteksi *Vibrio parahaemolyticus* AHPND pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *LenteraBio*; 13(1): 1-13.