



Pemeriksaan EHP dan AHPND pada *Litopenaeus vannamei* dengan Metode PCR di BKHIT Jawa Timur

Silvani Tri Julianti¹, Putri Puspita Sari¹, Hesti Listiyani¹, Dewi Kartika¹, Siti Mufidah¹, Muhammad Adrian Fauzi¹, Maria Agustina Pardede^{1*}, Mohamad Fathoni²

¹ Universitas Airlangga, Indonesia

² Balai Karantina Hewan, Ikan, dan Tumbuhan (BKHIT) Jawa Timur, Indonesia

Email : mariapardede@sikia.unair.ac.id ^{1*}

Alamat: Jl. Wijaya Kusuma No.113, Mojopanggung, Kec. Giri, Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur 68425

Korespondensi penulis: silvani.tri.julianti-2021@fpk.unair.ac.id ¹

Abstract. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is an introduced species cultivated in Indonesia and plays an important role in increasing national shrimp production and exports. However, infectious diseases such as *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) pose a serious threat to the shrimp farming industry. These two diseases cause a decrease in shrimp growth and production performance. The Polymerase Chain Reaction (PCR) diagnostic technique is an effective method for detecting EHP and AHPND infections, because the results are fast and accurate. This research was carried out at the Juanda Fish Quarantine Laboratory, Animal, Fish and Plant Quarantine Center (BKHIT) East Java from July 1 to August 29 2024. This research aims to find out examination techniques and examination results for *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) during the examination process at BKHIT East Java. The test method used is a descriptive method by collecting primary and secondary data. The EHP examination at BKHIT East Java uses the single step PCR method, while the AHPND examination uses the Nested PCR method which consists of extraction, amplification, electrophoresis and visualization of the results. Based on the results of examinations during the activity, 4 samples were declared positive for EHP and no samples were declared positive for AHPND out of 51 samples of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

Keywords: Vaname shrimp, *Enterocytozoon hepatopenaei*, PCR, Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease

Abstrak. Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan spesies introduksi yang dibudidayakan di Indonesia dan berperan penting dalam peningkatan produksi serta ekspor udang nasional. Namun, penyakit infeksius seperti *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) dan Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) menjadi ancaman serius bagi industri budidaya udang. Kedua penyakit ini menyebabkan penurunan pertumbuhan dan performa produksi udang. Teknik diagnostik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menjadi metode yang efektif untuk mendeteksi infeksi EHP dan AHPND, karena hasilnya cepat dan akurat. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Karantina Ikan Juanda, Balai Karantina Hewan, Ikan, dan Tumbuhan (BKHIT) Jawa Timur tanggal 1 Juli sampai dengan 29 Agustus 2024. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui teknik pemeriksaan serta hasil pemeriksaan *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) dan Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) selama proses pemeriksaan di BKHIT Jawa Timur. Metode uji yang digunakan yaitu metode deskriptif dengan pengambilan data primer dan sekunder. Pemeriksaan EHP di BKHIT Jawa Timur menggunakan metode *single step* PCR, sedangkan pemeriksaan AHPND menggunakan metode *Nested* PCR yang terdiri dari tahap ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis dan visualisasi hasil. Berdasarkan hasil pemeriksaan selama kegiatan terdapat 4 sampel yang dinyatakan positif EHP dan tidak ada sampel yang dinyatakan positif AHPND dari 51 sampel udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

Kata kunci: Udang vaname, *Enterocytozoon hepatopenaei*, PCR, Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease

1. LATAR BELAKANG

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) berasal dari Pantai Pasifik Barat, Amerika Latin. Tahun 1970 udang vaname pertama kalinya diperkenalkan di Tahiti, kemudian tahun 1978-1979 udang vaname mulai dimasukkan ke Benua Asia (Anwar dan Abdurrohman, 2020). Masuknya udang vaname berperan dalam peningkatan produksi udang di Indonesia menggantikan agroindustri udang windu (*Penaeus monodon*) sebagai udang asli Indonesia yang mengalami penurunan kualitas karena proses produksi (Huda dan Wijoyo, 2023). Berdasarkan Data Kelautan dan Perikanan Triwulan I Tahun 2024 menunjukkan bahwa komoditas utama perikanan dengan kontribusi nilai ekspor tertinggi adalah udang sebesar USD 386,18 juta yang menyumbang 26,58% terhadap nilai ekspor total (KKP, 2024).

Kegiatan perdagangan komoditas perikanan terutama udang mengalami kontinuitas sebanding dengan besarnya potensi sumber daya, maka lalu lintas perdagangan juga akan sering berjalan. Hal ini berpeluang besar terhadap risiko masuk dan tersebarnya hama dan penyakit udang baik dari luar negeri maupun antar daerah di wilayah Indonesia. Penyakit berpotensi menghambat pertumbuhan bahkan menyebabkan kematian udang yang mengakibatkan kerugian finansial bagi pembudidaya. Penyakit infeksius yang dapat menyerang udang vaname yaitu *Enterocytozoon Hepatopenaei* (EHP) dan *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND). Berdasarkan Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No.17/KEPMEN-KP/2021 *Enterocytozoon Hepatopenaei* (EHP) dan *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) termasuk Hama dan Penyakit Ikan (HPIK) Golongan I. Menurut Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor PER.13/MEN/2007 HPIK Golongan I tidak dapat disucihamakan atau disembuhkan dari media pembawanya karena teknologi perlakuannya belum dikuasai sehingga teknik pemeriksaan EHP dan AHPND penting dipelajari untuk mencegah penyebaran penyakit.

Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) merupakan parasit mikrosporidia penyebab penyakit *Hepatopancreatic Microsporidiosis* (HPM) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) (Kim *et al.*, 2021). Ramadhan *et al.*, (2024) melaporkan bahwa pada tahun 2023, infeksi EHP ditemukan menginfeksi tambak udang di daerah Blimbingsari, Banyuwangi. Menurut Achmad dkk. (2020) *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) merupakan penyakit udang yang disebabkan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* penghasil toksin Pir A dan Pir B dengan tingkat kematian 100%. Toksin membentuk kompleks sheterodimerik yang akan berikatan dengan reseptor pada hepatopankreas udang dan menyebabkan nekrosis akut (Hong *et al.*, 2016). Data hasil penelitian Asmarany *et al.* (2022) menunjukkan bahwa AHPND pernah menginfeksi udang vaname di Banyuwangi, Jawa Timur. Penyakit EHP dan AHPND pada udang menyerang organ hepatopankreas. Menurut Aras dan Faruq (2024) gejala

yang timbul akibat EHP yaitu hepatopankreas pucat dan usus kosong. Gejala infeksi EHP seringkali ditunjukkan berhubungan dengan koinfeksi *Vibrio parahaemolyticus* yang menyebabkan penyakit berak putih (*White Feces Syndrome*) (Caro *et al.*, 2021). Gejala klinis udang yang terinfeksi AHPND yaitu pola renang spiral, usus kosong, hepatopankreas pucat, serta cangkang menjadi lunak (Hong *et al.*, 2015).

Deteksi EHP dan AHPND menggunakan metode PCR. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode enzimatik penggandaan DNA secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu tanpa menggunakan organisme (Kurniawati dkk., 2019). Metode pemeriksaan ini dapat dilakukan di Laboratorium Karantina Ikan Juanda, Balai Karantina Hewan, Ikan, dan Tumbuhan (BK HIT) Jawa Timur. Berdasarkan uraian diatas diperlukan adanya pemeriksaan EHP dan AHPND dengan metode PCR pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang bertujuan sebagai upaya deteksi keberadaan infeksi EHP dan AHPND udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) secara dini.

2. KAJIAN TEORITIS

Menurut Raju *et al.*, (2021) bahwa, tubuh udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) terbagi menjadi dua bagian, yaitu bagian kepala yang menyatu dengan bagian dada (*chephalothorax*) yang dilindungi oleh kitin (karapaks) dan bagian tubuh sampai ekor. Ujung *chephalothorax* meruncing dan bergerigi yang disebut rostrum. Spesies ini memiliki 2 gerigi di bagian ventral rostrum dan bagian dorsalnya terdapat 8 sampai 9 gerigi. Tubuhnya beruas-ruas dan setiap ruas terdapat sepasang anggota badan yang umumnya bercabang dua. Jumlah keseluruhan ruas badannya adalah 20 buah. *Chephalothorax* terdiri dari 13 ruas, yaitu 5 ruas di bagian kepala dan 8 ruas di bagian dada. Ruas I terdapat mata bertangkai, sedangkan ruas II dan III terdapat antena dan antenula sebagai alat peraba dan pencium. Ruas III terdapat rahang (mandibula) sebagai alat untuk menghancurkan makanan sehingga masuk ke dalam mulut (Boyd and Jescovitch, 2020).

Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) memiliki morfologi berbentuk oval dengan spora berukuran 0,7 hingga 1,1 μm . Spora EHP dewasa terdiri dari dinding padat elektron yang mengandung inti tunggal, terdapat vakuola di bagian posterior, dan memiliki anchoring disk yang terhubung ke filamen polar spiral yang berjumlah 5-6 (Aras dkk., 2023). Spora EHP terdiri atas tiga lapisan tebal yaitu eksospora, endospora, dan plasma-lemma (Gamez *et al.*, 2023). EHP merupakan mikrosporidia penyebab penyakit *Hepatopancreatic Microsporidiosis* (HPM) pada udang budidaya seperti *P. monodon*, *P. vannamei*, dan *P. stylirostris* (Chaijarasphong *et al.*, 2021). Organ target utama pada infeksi EHP yaitu sitoplasma dari sel tubulus epitelial hepatopankreas udang (Tourtip, 2009). Menurut Rajendran *et al.*, (2016)

infeksi EHP tidak menunjukkan gejala klinis tertentu. Namun Aras dkk., (2023) menyebutkan bahwa gejala klinis udang terinfeksi EHP yaitu organ hepatopankreas berwarna pucat dan lunak serta saluran pencernaan berwarna putih atau kosong. Infeksi hepatopankreas oleh EHP akan merusak kemampuan organ untuk mencerna dan mendapatkan nutrisi dari pakan. Hal ini berdampak pada penurunan nafsu makan, peningkatan rasio konversi pakan, keterlambatan atau retardasi pertumbuhan, peningkatan variabilitas ukuran, hingga kematian udang mencapai 10-20% (Hamzah dkk., 2021). Gejala infeksi EHP seringkali dibuktikan memiliki korelasi dengan koinfeksi *Vibrio parahaemolyticus* yang mengakibatkan penyakit berak putih (*White Feces Syndrome*) (Caro *et al.*, 2021).

Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) merupakan salah satu penyakit yang menyerang udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Penyakit ini juga disebut *White Feces Disease*. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yang memiliki toksin Pir A dan Pir B (Caro *et al.*, 2020). Gejala klinis pada udang yang terinfeksi penyakit AHPND antara lain udang terlihat mengalami kelesuan, pertumbuhan lambat, berenang dalam pola spiral, usus dan hepatopankreas terlihat kosong, perkembangan hepatopankreas menurun dan berwarna pucat atau putih, cangkang menjadi lunak, feses berwarna putih, dan pada infeksi tahap akhir udang akan tenggelam sehingga menyebabkan kematian (Hong *et al.*, 2015). Penyakit AHPND yang menyerang pada udang, dapat menyebabkan mortalitas hingga 100% ketika udang berusia 30-45 hari setelah pelepasan postlarva. Faktor pemicu munculnya penyakit AHPND salah satunya yaitu kualitas air yang buruk seperti suhu, pH, dan salinitas yang tidak sesuai (Soto-Rodriguez *et al.*, 2019).

Polymerase Chain Reaction merupakan mekanisme enzimatik yang dapat melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro* (Kurniawati dkk., 2019). Teknik PCR memungkinkan proses analisis suatu penyakit dilakukan dengan mudah melalui sejumlah kecil molekul DNA yang diperbanyak jumlahnya. PCR digunakan untuk memperbesar bagian (fragmen) tertentu dari rantai DNA dengan panjang rantai yang sangat pendek. PCR menjadi *gold standard* yang direkomendasikan untuk diagnosis berbagai penyakit udang berdasarkan protokol WHO (Chaijarashong *et al.*, 2021). Deteksi EHP menggunakan metode berbasis PCR dapat dilakukan secara *one-step* PCR (Tang *et al.*, 2015), *nested* PCR (Jaroenlak *et al.*, 2016), dan *multiplex* PCR (Koiwai *et al.*, 2018). Uji PCR juga telah menjadi teknik molekuler yang populer untuk identifikasi dan deteksi *Vibrio parahaemolyticus* penyebab *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) (Drake *et al.*, 2007). Teknik pemeriksaan suatu penyakit menggunakan PCR terdiri dari tahapan ekstraksi, amplifikasi, dan elektroforesis dan pembacaan hasil (Hanggono dan Junaidi, 2015).

3. METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada tanggal 1 Juli hingga 29 Agustus 2024 di Laboratorium Karantina Ikan Juanda, Balai Karantina Hewan, Ikan, dan Tumbuhan (BKHIT) Jawa Timur.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu mikropipet (0,5 – 10 µl, 10 - 200 µl, 200 – 1000 µl), mikrotip (10 µl, 200 µl, 1000 µl), mikrotube (1,5 ml, 0,2 ml), *disetting set*, *pastle* penggerus, *heating block*, *vortex*, *microsentrifuge*, *mini spin down*, *Laminar Air Flow*, *thermal cycler*, *microwave*, *gel combs*, *gel holder*, *elektroforesis set*, *UV trans-illuminator*, *software* UVP VisionWorks LS dan PC visualisasi. Bahan yang digunakan yaitu *Tryptic Soy Broth* (TSB), NaCl 3%, *Silica Extraction Kit* yang terdiri dari *GT Buffer* (*Guanidine Thiocyanate Buffer*), *silica*, dan DEPC ddH₂O (*Diethylpyrocarbonate Double-distilled water*), *TAE Buffer* (*Tris Acetic EDTA Buffer*), *template DNA*, kontrol positif EHP dan AHPND, kontrol negatif, primer *forward* dan *reverse*, *Nuclease Free Water* (NFW), *agarose*, *DNA staining*, *DNA marker* (*Molecular Weight Ladder*), alkohol 70%, *ethanol* 70%, dan aquades.

Prosedur Kerja

Teknik pemeriksaan yang dilakukan berdasarkan pada Instruksi Kerja Metode dengan nomor IK/KI/LP/6/M.023 untuk deteksi EHP dan nomor IK/KI/LP/6/M.019 untuk deteksi AHPND pada udang vaname.

Preparasi sampel

Jumlah sampel sebanyak 51 udang vaname dari stadia naupli, benur, dan induk yang diperoleh dari sampel masuk di BKHIT Jawa Timur. Sampel udang vaname sebelum dinekropsi dilakukan pengamatan gejala klinis. Nekropsi sampel induk diambil dari organ target hepatopankreas sedangkan sampel stadia naupli dan benur dilakukan pengambilan seluruh tubuh. Pada pemeriksaan AHPND, sebelum tahap ekstraksi dilakukan pengkayaan *Vibrio parahaemolyticus* yang ditumbuhkan dari organ target untuk mendapatkan bakteri yang cukup dalam tahap ekstraksi (Anissa dkk., 2024). Proses pengkayaan kultur bakteri menggunakan media *Tryptic Soy Broth* (TSB) dengan penambahan 3% NaCl selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil pengkayaan bakteri dipindahkan ke dalam mikrotube sebanyak 1000 µl kemudian dilakukan sentrifugasi kecepatan 12000 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang dengan natan yang dihasilkan dilanjutkan untuk proses ekstraksi.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi merupakan proses untuk mendapatkan materi genetik berupa DNA dari sampel (Anissa dkk., 2024). Ekstraksi sampel DNA dilakukan dengan *Silica Extraction Kit*. Sampel dihancurkan lalu ditambahkan 900 µl GT (*Guanidine Thiocyanate*) *Buffer* kemudian dihomogenkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Supernatan sebanyak 600 µl dipindahkan ke tube yang telah berisi 40 µl silica kemudian dilakukan homogenisasi dan sentrifugasi 12.000 rpm selama 15 detik, lalu buang supernatan. Tahap selanjutnya pencucian pellet silica dilakukan dengan penambahan 500 µl GT *Buffer* lalu homogenisasi dan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik, setelah itu supernatan dibuang. Langkah berikutnya pencucian pellet silica menggunakan 1000 µl *ethanol* 70%, homogenkan lalu *sentrifuge* dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik, setelah selesai supernatan dibuang dan pastikan *ethanol* terbuang sempurna. Langkah selanjutnya penambahan 400 µl DEPC ddH₂O (*Diethylpyrocarbonate Double-distilled water*) kedalam pellet silica lalu dihomogenisasi dan inkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Apabila inkubasi telah selesai sampel dihomogenisasi lalu disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Supernatan sebanyak 200 µl dipindahkan ke dalam mikrotube baru untuk dilakukan tahap amplifikasi.

Amplifikasi

Tahap amplifikasi pada pemeriksaan EHP menggunakan *single step* PCR sedangkan pada pemeriksaan AHPND dengan metode *nested* PCR. Metode *single step* PCR pada EHP mentargetkan gen yang mengkode *Small Sub Unit Ribosomal RNA* (SSU rRNA) sedangkan *nested* PCR menggunakan gen target spesifik Pir-A dan Pir-B. Berikut komposisi reagen amplifikasi, susunan basa nitrogen, dan profil amplifikasi untuk pemeriksaan EHP dan AHPND.

Tabel 1. Komposisi Reagen Amplifikasi *Single Step* PCR EHP

No.	Pereaksi	Volume Pereaksi (ul)
1.	2X PCR Master Mix	12,5
2.	Primer EHP – F (20 pMol)	0,5
3.	Primer EHP – R (20 pMol)	0,5
4.	<i>Nuclease Free Water</i>	9,5
5.	DNA Template	2
	Total Volume	25

Tabel 2. Komposisi Reagen Amplifikasi *First Step* PCR AHPND

No.	Pereaksi	Volume Pereaksi (ul)
1.	2X PCR Master Mix	12,5
2.	Primer AP4-F1 (10 pMol)	1
3.	Primer AP4-R1 (10 pMol)	1
4.	<i>Nuclease Free Water</i>	8,5
5.	DNA Template	2
	Total Volume	25

Tabel 3. Komposisi Reagen Amplifikasi *Nested Step* PCR AHPND

No.	Pereaksi	Volume Pereaksi (ul)
1.	2X PCR Master Mix	12,5
2.	Primer AP4-F2 (10 pMol)	1
3.	Primer AP4-R2 (10 pMol)	1
4.	<i>Nuclease Free Water</i>	8,5
5.	DNA Template	2
	Total Volume	25

Tabel 4. Susunan Basa Nitrogen dalam Primer EHP dan AHPND

Pemeriksaan	Primer	Susunan Basa Nitrogen	base pair
EHP <i>single step</i>	EHP-510F	5'-GCC-TGA-GAG-ATG-GCT-CCC-ACG-T-3'	510 bp
	EHP-510R	5'-GCG-TAC-TAT-CCC-CAG-AGC-CCG-A-3'	
AHPND <i>first step</i>	AP4-F1	5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3'	1269 bp
	AP4-R1	5'-ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA-3'	
AHPND <i>nested</i>	AP4-F2	5'-TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG-3'	230 bp
	AP4-R2	5'-GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC-3'	

Tabel 5. Profil Amplifikasi EHP *Single Step* (Sumber: IKM)

Pereaksi	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
Pre Heat	94	3 menit	1
Denaturation	94	30 detik	35
Annealing	60	30 detik	35
Extention	72	30 detik	35
Final Extention	72	5 menit	1

Tabel 6. Profil Amplifikasi AHPND *First Step* (Sumber: IKM)

Pereaksi	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
Pre Heat	94	30 detik	1
Denaturation	94	30 detik	30
Annealing	55	30 detik	30
Extention	72	90 detik	30
Final Extention	72	2 menit	1

Tabel 7. Profil Amplifikasi AHPND *Nested* (Sumber: IKM)

Pereaksi	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
Pre Heat	94	30 detik	1
Denaturation	94	20 detik	30
Annealing	55	20 detik	30
Extention	72	20 detik	30
Final Extention	72	2 menit	1

d. Elektroforesis

Tahap elektroforesis menggunakan gel *agarose* 1,5% dengan melarutkan 1,8 gram bubuk *agarose* dalam 120 ml TAE *Buffer* 1x kemudian dipanaskan dalam *microwave* hingga mendidih lalu ditambahkan 4 µl DNA *Staining*. Gel *agarose* yang telah padat dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis kemudian dituangkan TAE *Buffer* 1x ke dalamnya hingga terendam sempurna. Langkah berikutnya penambahan sampel, kontrol negatif, dan kontrol positif pada sumuran *agarose* masing-masing sebanyak 8 µl dilanjutkan dengan penambahan DNA *Marker* 100 bp sebanyak 4 µl ke sumuran *agarose*. Elektroforesis dilakukan dengan mengatur tegangan 120 volt selama 40 menit.

e. Visualisasi Hasil

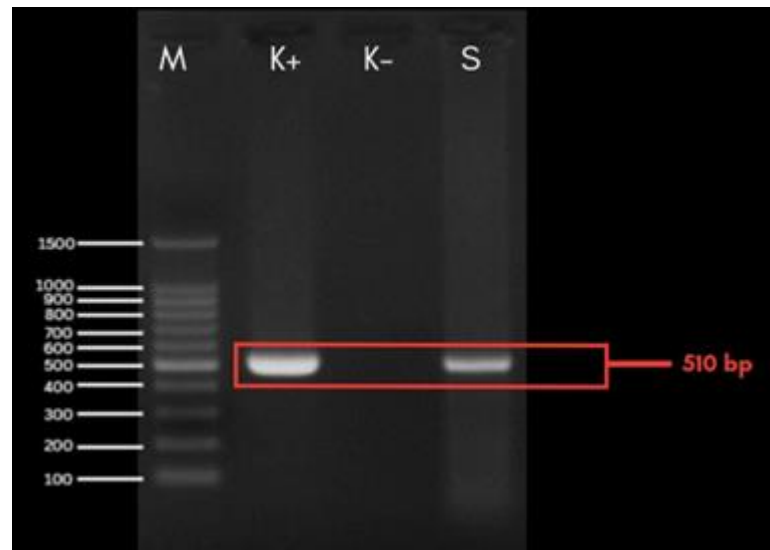
Hasil elektroforesis divisualisasikan melalui PC yang telah ter-*install software* UVP VisionWorks LS. Visualisasi hasil dilakukan secara visual dengan membandingkan *base pair* yang dihasilkan oleh sampel dengan *base pair* kontrol positif.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 8. Gejala Klinis pada Sampel Positif EHP

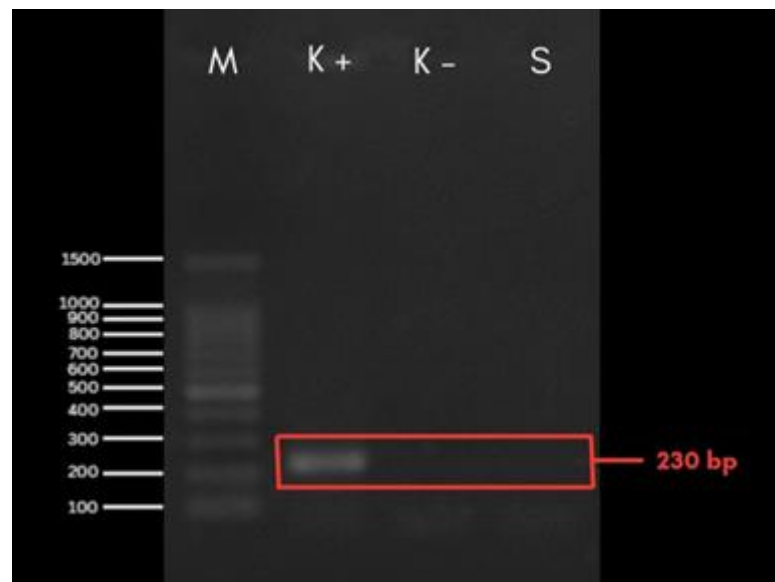
Pemeriksaan	Stadia	Gejala Klinis
<i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> (EHP)	Benur	Tidak menunjukkan gejala klinis

Berdasarkan gejala klinis yang diamati dengan hasil sesuai Tabel 8 dapat diketahui bahwa sampel udang vaname yang positif terinfeksi EHP tidak menunjukkan gejala klinis yang spesifik (normal).



Gambar 1. Visualisasi Hasil Elektroforesis EHP. Keterangan: M=marker; K+=kontrol positif; K-=kontrol negatif; S= positif EHP

Hasil visualisasi PCR dapat dilihat bahwa ukuran pita DNA pada kontrol positif EHP memiliki panjang *band* yaitu 510 bp. S (sampel) dinyatakan positif EHP karena terletak sejajar dengan kontrol positif dengan panjang *band* 510 bp. Sampel yang dinyatakan negatif jika *band* DNA tidak sejajar dengan band kontrol positif (tidak tervisualisasi di 510 bp).

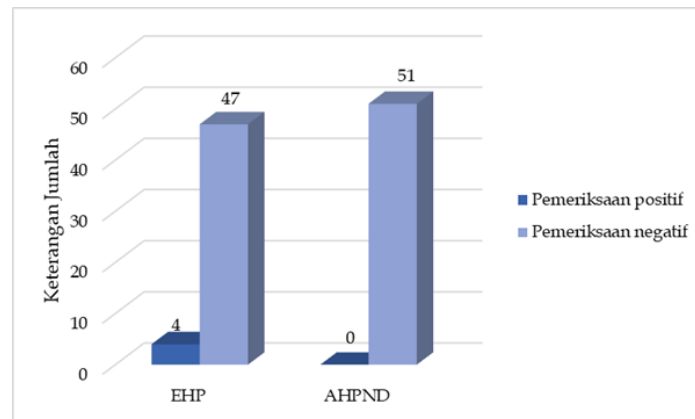


Gambar 2. Visualisasi Hasil Elektroforesis AHPND. Keterangan: M=marker; K+=kontrol positif; K-=kontrol negatif; S = negatif AHPND

Berdasarkan visualisasi kontrol positif AHPND memiliki panjang *band* DNA sebesar 230 bp. Untuk S sebagai sampel dinyatakan negatif karena *band* DNA tidak sejajar dengan *band* kontrol positif (tidak tervisualisasi di 230 bp).

Tabel 9. Hasil Pemeriksaan EHP dan AHPND pada Udang Vaname

Pemeriksaan	Jumlah Sampel	Jumlah Positif	Jumlah Negatif
<i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> (EHP)	51	4	47
<i>Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease</i> (AHPND)	51	0	51

**Gambar 3.** Grafik Sampel Positif dan Negatif EHP dan AHPND

Berdasarkan grafik pada Gambar 3 didapatkan bahwa dari 51 sampel udang vaname yang dilakukan pemeriksaan, sampel yang positif EHP sebanyak 4 sampel sehingga 47 sampel dinyatakan negatif EHP. Hasil pemeriksaan AHPND pada udang vaname tidak diperoleh sampel yang dinyatakan positif AHPND dan 51 sampel yang dinyatakan negatif. Sampel udang vaname yang terinfeksi EHP tidak terinfeksi AHPND.

5. PEMBAHASAN

Penyakit *Enterocytozoon hepatopenaei* atau yang dikenal dengan EHP merupakan parasit microsporidia yang bisa menyebabkan *hepatopancreatic microsporidiosis*. Wabah EHP telah banyak dilaporkan terjadi pada populasi udang di beberapa wilayah Indonesia seperti Jawa Timur, Jawa Barat, Sumatera Utara, Lampung, Lombok, Sulawesi dan Bali (Tang *et al.*, 2016). Salah satu contoh studi kasus infeksi EHP ditemukan di tiga kabupaten provinsi Bali, yaitu Kabupaten Karangasem dengan prevalensi infeksi EHP tertinggi sebesar 86,67%, Kabupaten Jembrana sebesar 70,00% dan Kabupaten Buleleng dengan prevalensi 66,67% (Aras dkk., 2022). Selain itu, penyakit infeksius yang sering menyerang udang vaname adalah AHPND (*Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*). Menurut Caro *et al.* (2020) AHPND disebabkan oleh bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yang memiliki plasmid pVA1 (609-70 kbp). Ramadhan *et al.* (2024) melaporkan bahwa AHPND ditemukan di salah satu tambak udang vaname di Desa Blimbingsari Kabupaten Banyuwangi, yang disebabkan oleh fluktuasi kualitas air, seperti suhu, salinitas, dan pH, serta ketidakpatuhan terhadap standar kualitas air.

Pemeriksaan EHP dan AHPND pada udang vaname menggunakan metode biologi molekuler yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Proses pemeriksaan PCR meliputi 3 tahapan, yaitu ekstraksi, amplifikasi dan elektroforesis disertai dengan visualisasi hasil. Keberadaan penyakit EHP dapat dideteksi dengan *single step* PCR dan penyakit AHPND menggunakan *nested* PCR. Sebelum dilakukan pemeriksaan, sampel terlebih dahulu diamati secara visualisasi dengan melihat gejala klinis. Berdasarkan hasil penelitian, pengamatan gejala klinis pada sampel udang vaname yang diperiksa di Laboratorium Karantina Ikan Juanda BKHIT Jawa Timur, yaitu tidak menunjukkan gejala klinis seperti tidak adanya perubahan warna pada hepatopankreas dan usus terisi penuh. Hal ini didukung oleh pernyataan Rajendran *et al.* (2016) bahwa infeksi EHP tidak menimbulkan gejala klinis tertentu. Akan tetapi, menurut Aras dan Faruq (2024) gejala yang timbul akibat EHP yaitu hepatopankreas pucat dan saluran usus kosong. Aras dkk. (2023) juga menambahkan bahwa infeksi EHP pada udang vaname menyebabkan penurunan nafsu makan, keterlambatan pertumbuhan, dan penurunan performa produksi udang. Gejala infeksi EHP seringkali ditunjukkan berhubungan dengan koinfeksi *Vibrio parahaemolyticus* yang menyebabkan penyakit berak putih (*White Feces Syndrome*) (Caro *et al.*, 2021). Pada pemeriksaan AHPND pada udang vaname tidak menunjukkan gejala yang spesifik atau udang terlihat normal. Menurut Saraswati *et al.* (2023) secara umum gejala klinis yang muncul akibat infeksi AHPND pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yaitu udang tidak aktif, usus dan hepatopankreas udang terlihat kosong, pertumbuhan terhambat, cangkang melunak, serta tanda morfologis lain seperti adanya kotoran berwarna putih, yang dikenal sebagai *White Feces Disease* (WFD).

Proses visualisasi hasil PCR dilakukan dengan membandingkan pita DNA pada sampel, DNA marker, dan pita DNA kontrol positif. Berdasarkan visualisasi melalui UV *Gel Documentation* kontrol positif EHP dengan jenis primer yang digunakan memiliki panjang band DNA sebesar 510 bp (*base pairs*). Hasil visualisasi PCR dapat dilihat pada gambar 1. Ukuran pita DNA yang digunakan pada sampel positif EHP yaitu 510 bp. S (sampel) dinyatakan positif EHP karena terletak sejajar dengan kontrol positif dan sampel akan dinyatakan negatif jika band DNA tidak sejajar dengan band kontrol positif (tidak tervisualisasi di 510 bp). Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa terdapat sampel positif terinfeksi EHP sebanyak 4 dari total 51 sampel. Data jumlah sampel udang vaname yang positif terinfeksi penyakit EHP dapat dilihat pada tabel 9. Data tersebut menunjukkan bahwa infeksi EHP pada daerah Jawa Timur rendah. Hal ini terjadi karena tambak yang ada di Jawa Timur sudah menerapkan Cara Karantina Ikan yang Baik (CKIB). Penerapan CKIB dapat mengendalikan status kesehatan ikan secara berkelanjutan dan meminimalisir berpindahnya HPIK dari wilayah satu ke wilayah lainnya di Indonesia (Achmad dkk., 2020). Selain itu, menurut Hamzah dkk.

(2021) kejadian EHP dikatakan sangat rendah karena tambak menerapkan pola ganti air yang cukup banyak dan melakukan pengurangan limbah dasar.

Berdasarkan hasil uji PCR yang dilakukan untuk mendeteksi adanya *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) menunjukkan bahwa dari 51 sampel yang diuji, tidak ditemukan sampel yang terindikasi positif AHPND. Hal ini ditunjukkan oleh hasil sampel S (sampel) yang tertera pada Tabel 9, di mana semua sampel dinyatakan negatif terhadap AHPND karena band DNA yang dihasilkan dari kelima sampel tersebut tidak sejajar dengan band kontrol positif pada 230 bp. Tidak adanya pita DNA ini mengindikasikan bahwa sampel tersebut tidak terinfeksi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yang mengandung plasmid penyebab AHPND. Menurut Anissa dkk. (2024) hasil negatif ditandai dengan tidak adanya pita DNA dengan ukuran *band* 230 bp, yang merupakan panjang target amplicon yang sesuai dengan kontrol positif. Hasil visualisasi PCR dapat dilihat pada gambar 2. Data tersebut menunjukkan bahwa infeksi penyakit AHPND pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) di daerah Jawa Timur masih tergolong rendah, sehingga dapat diartikan bahwa lingkungan budidaya udang vaname di Banyuwangi masih dalam kondisi baik. Menurut Soto-Rodriguez *et al.* (2019) bahwa *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) dapat diakibatkan karena lingkungan budidaya yang buruk seperti *biosecurity* yang kurang ketat serta penggunaan pakan yang berlebih.

Udang vaname yang terinfeksi EHP bisa disebabkan oleh faktor penyebaran secara vertikal dan horizontal. Penyebaran EHP secara vertikal dapat terjadi karena adanya inang pembawa (*vektor transmisi*) yang membawa spora dari luar, sedangkan faktor horizontal terjadi melalui feses yang terkontaminasi spora atau akibat kanibalisme udang pada saat waktu pemeliharaan (Desrina *et al.*, 2020). Upaya dalam pencegahan infeksi EHP adalah dengan menerapkan biosekuriti yang baik secara horizontal. Penerapan biosekuriti dilaksanakan pada kegiatan budidaya, meliputi pengolahan kualitas air, pemagaran di sekeliling lokasi budidaya, penyediaan tempat cuci tangan, cuci kaki dan cuci kendaraan serta penggunaan benih bersertifikat (Aras dkk., 2023). Penyakit infeksius seperti AHPND juga sering ditemukan menyerang udang vaname. Penyakit AHPND dapat menyebabkan mortalitas hingga 100% ketika udang berusia 30-45 hari setelah pelepasan *postlarva*. Faktor pemicu munculnya penyakit AHPND salah satunya yaitu kualitas air yang buruk seperti suhu, pH, dan salinitas yang tidak sesuai (Soto-Rodriguez *et al.*, 2019). Langkah-langkah untuk mengantisipasi penyebaran penyakit AHPND dan mengurangi risiko kegagalan produksi memerlukan pencegahan melalui deteksi dini dan pengendalian patogen, dengan melakukan pemeriksaan rutin di area tambak selama periode pemeliharaan (Anissa dkk., 2024).

6. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemeriksaan *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) didapatkan hasil visualisasi dengan panjang *band* 510 bp dan dari 51 sampel yang dilakukan pemeriksaan, 4 sampel dinyatakan positif EHP. Sedangkan pada pemeriksaan *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) diperoleh hasil visualisasi dengan panjang *band* 230 bp dan dari keseluruhan sampel tidak ada yang dinyatakan positif. Hasil pemeriksaan didapatkan bahwa udang vaname yang terinfeksi EHP tidak teridentifikasi adanya infeksi AHPND.

DAFTAR REFERENSI

- Achmad, H., Susanti, D., Lantiany, D., Supriyanto, D. I., Novianto, H., & Rahman, H. (2020). Penilaian resiko hama dan penyakit ikan karantina sebagai upaya pencegahan penyebarannya melalui lalu lintas komoditas perikanan dari Yogyakarta. *Journal of Fisheries and Marine Science*, 2(1), 87–91.
- Akmal, Y., Humairani, R., Muliari, M., Zulfahmi, I., & Rauf, A. (2021). Peningkatan nilai ekonomi pada kelompok pembudidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) Laut Mina Budidaya Kabupaten Bireuen, Aceh. *Jurnal Solma*, 10(2), 275–286.
- 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.
- Amelia, F., Halalludin, B., Naim, S., & Permana, R. (2020). Analisis keanekaragaman genus *Vibrio* pada udang terinfeksi *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) dengan metode ERIC-PCR. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 9(3), 238–251.
- Anissa, R. K., Lisdiana, L., & Widyayanti, A. T. (2024). Optimasi metode nested PCR untuk deteksi *Vibrio parahaemolyticus* AHPND pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 13(1), 1–13.
- Anwar, S., & Abdurrohman, A. (2020). Pemanfaatan teknologi Internet of Things untuk monitoring tambak udang vaname berbasis smartphone Android menggunakan Nodemcu Wemos D1 Mini. *Infotronik: Jurnal Teknologi Informasi dan Elektronika*, 5(2), 77–83.
- Aras, A. K., & Faruq, W. E. M. (2024). Penerapan budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dengan sistem super intensif (Studi kasus: PT XYZ, Karangasem, Bali). *Jurnal Lemuru*, 6(1), 60–75.
- Aras, A. K., Fikriyah, A., Pratiwi, G. A. I., & Nurlita, W. (2023). Prevalensi infeksi EHP (*Enterocytozoon hepatopenaei*) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) berdasarkan data surveilans di Bali, Indonesia. *Media Akuakultur*, 17(2), 59–65.
- Asmarany, A., Jayanti, S., & Mahbubah, N. U. (2022). The abundance of *Vibrio* sp. bacteria on *Litopenaeus vannamei* grow out-pond in CV. Lautan Sumber Rejeki Banyuwangi. *Earth and Environmental Science*, 1036(1), 12096.

- Ayunda, F. P., Feliatra, F., Thamrin, T., & Muhson, N. (2023). Prevalence analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by PCR method in Bengkalis District. *Journal of Coastal and Ocean Sciences*, 4(3), 113–121.
- Badan Karantina Ikan. (2017). *Keputusan Kepala Badan Karantina Ikan Nomor 99/Kep-BKIPM/2017 tentang Kategorisasi Tingkat Risiko Media Pembawa Hama dan Penyakit Ikan Karantina*. Jakarta: KKP.
- Boyd, C. E., & Jescovitch, L. N. (2020). Penaeid shrimp aquaculture. *Fisheries and Aquaculture*, 9(1), 233.
- Caro, A. L. F., Mai, H. N., Florez, R. C., Marcos, F. L. A., Alenton, R. R. R., & Dhar, A. K. (2021). Experimental reproduction of white feces syndrome in whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*. *PLOS ONE*, 16(12), e0261289.
- Caro, L. F. A., Mai, H. N., Kanrar, S., Cruz, F. R., & Dhar, A. K. (2020). A mutant of *Vibrio parahaemolyticus* PirABvp(+) that carries binary toxin genes but does not cause AHPND. *Microorganisms*, 8(10), 1549.
- Chaijarasphong, T., Munkongwongsiri, N., Stentiford, G. D., Cano, D. J. A., Thansa, K., Flegel, T. W., & Itsathitphaisarn, O. (2021). The shrimp microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP): Biology, pathology, diagnostics and control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186, 107458.
- Desrina, D., Prayitno, S. B., Haditomo, A. H. C., Latritiani, R., & Sarjito, S. (2020). Detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) DNA in polychaetes from shrimp ponds suffering WFS outbreaks. *Biodiversitas*, 21(1), 369–374.
- Drake, S. L., De Paola, A., & Jaykus, L. A. (2007). An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(4), 120–144.
- Faisal, A. F., & Pancoro, A. (2018). Deteksi dini *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) menggunakan metode PCR. *Jurnal Riset Akuakultur*, 13(3), 267–275.
- Gámez, I. J. C., García, M. F. R., Díaz, S. R., Hernández, C. R., & Ibarra, D. M. M. (2023). Identification techniques to prevent the current emerging disease hepatopancreatic microsporidiosis in white shrimp. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 51(1), 1–11.
- Hamzah, H., Aswar, A., & Supito, S. (2021). Kondisi udang dan air pemeliharaan sebelum muncul penyakit EHP di tambak tradisional. *Journal of Indonesian Tropical Fisheries (Joint-Fish)*, 4(2), 198–210.
- Hanggono, B., & Junaidi, M. (2015). Viral disease detection in vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by PCR. *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan*, 6(1), 4–5.
- Hong, X., Lu, L., & Xu, D. (2015). Program in research on AHPND. *Aquaculture International*, 24(2), 577–593.

- Huda, M. N., & Wijoyo, A. (2023). Sistem monitoring tambak pada budidaya udang menggunakan WSN dan IoT. *Oktal: Jurnal Ilmu Komputer dan Sains*, 2(11), 3012–3021.
- Instruktur Kerja Metode. (2024). *Deteksi Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) dengan teknik PCR*. IK/KI/6/M.023 (IK/SBY I/LP/8/M.56).
- Jaroenlak, P., Sanguanrut, P., Williams, B. A., Stentiford, G. D., Flegel, T. W., Sritunyalucksana, K., & Itsathitphaisarn, O. (2016). A nested PCR assay for EHP in shrimp farms. *PLOS ONE*, 11(11), e0166320.
- Joko, T., Kusumandari, N., & Hartono, S. (2011). Optimasi metode PCR untuk deteksi *Pectobacterium carotovorum*. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 17(2), 54.
- Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. (2007). *Peraturan Menteri No. Per.13/Men/2007 tentang Sistem Pemantauan Hama dan Penyakit Ikan Karantina*. Jakarta: KKP.
- Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. (2021). *Keputusan Nomor 17/Kepmen-KP/2021 tentang Penetapan Jenis Penyakit Ikan Karantina*. Jakarta: KKP.
- Kim, B. S., Jang, G. I., Kim, S. M., Kim, Y. S., Jeon, Y. G., Oh, Y. K., ... & Kwon, M. G. (2021). First report of EHP infection in *Litopenaeus vannamei* cultured in Korea. *Animals*, 11(11), 3150.
- KKP. (2024). *Rilis Data Kelautan dan Perikanan Triwulan I Tahun 2024*. <https://kkp.go.id/unit-kerja/sj/publikasi/materi/penyampaian-rilis-data-kelautan-dan-perikanan-triwulan-i-2024664d9c9c0520e.html>
- Koiwai, K., Koderu, T., Thawonsuwan, J., Kawase, M., Kondo, H., & Hirono, I. (2018). Rapid method for diagnosing four shrimp diseases using PCR-DNA chromatography. *J Fish Dis*, 41(2), 395–399.
- Kurniawati, M. D. S., Sumaryam., & Hayati, I. N. (2019). Aplikasi PCR konvensional dan Real-Time PCR untuk deteksi VNN pada ikan kerapu. *Techno-Fish*, 3(1), 19–30.
- Rajendran, K. V. S., Shivam., Praveena, P. E., Rajan, J. J. S., Kumar, T. S., Avunje, S., & Vijayan, K. K. (2016). Emergence of EHP in farmed *Litopenaeus vannamei* in India. *Aquaculture*, 454, 272–280.
- Raju, N., Gulzar, S., Buamard, N., Ma, L., Ying, X., Zhang, B., & Benjakul, S. (2021). Comparative study of shrimp oil extracted from hepatopancreas and cephalothorax. *Frontiers in Nutrition*, 8(1), 803664.
- Ramadhan, A. P., Setyaningrum, E. W., & Yuniartik, M. (2024). Monitoring diseases in water of vannamei shrimp in Banyuwangi. *Journal of Aquaculture Science*, 9(1), 39–47.
- Saraswati, E., Putri, C. B., & Sari, S. N. (2023). Analisis kelimpahan bakteri *Vibrio* sp. pada media dan hepatopankreas udang vaname. *Jurnal Lemuru*, 5(2), 252–264.
- Soto-Rodriguez, S., Lozano-Olvera, R., Palacios-Gonzales, D. A., Bolan-Mejia, C., & Rendon-Anguilar, K. G. (2019). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains that cause AHPND. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(5), 1002–1015.

- Tang, K. F., Han, J. E., Aranguren, L. F., White-Noble, B., Schmidt, M. M., Piamsomboon, P., & Hanggono, B. (2016). *EHP* in feces and its transmission in *Penaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 140, 1–7.
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P. V., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W., & Itsathitphaisarn, O. (2016). Review of disease threats for penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 452, 69–87.
- Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G. D., Stentiford, K. S., Bateman, Sriurairatana, S., Chavadej, J., & Withyachumnarnkul, B. (2009). *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. in black tiger shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(1), 21–29.