

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang vaname (*Penaeus vannamei*) merupakan salah satu komoditas perikanan laut yang memiliki nilai ekonomis tinggi baik di pasar domestik maupun global, dimana 77% di antaranya diproduksi oleh negara-negara Asia termasuk Indonesia. Salah satu keunggulan dari udang vaname adalah harga jual tinggi, dan mudah dibudidayakan (Jose, 2023). Data ini membuktikan bahwa udang vaname memiliki potensi besar untuk terus dikembangkan dalam industri akuakultur, baik untuk memenuhi permintaan pasar lokal maupun internasional. Namun, intensifikasi budidaya ini rentan terhadap serangan penyakit, khususnya yang disebabkan oleh bakteri patogen seperti *Vibrio harveyi*. Infeksi *V. harveyi* dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang signifikan melalui peningkatan mortalitas udang dan penurunan produktivitas tambak. Dalam upaya mengendalikan penyakit bakteri, penggunaan antibiotik telah menjadi metode umum. Namun, pemakaian antibiotik yang berlebihan berpotensi menimbulkan resistensi bakteri serta pencemaran lingkungan (Defoirdt *et al.*, 2011). Oleh karena itu, diperlukan alternatif yang ramah lingkungan dan berkelanjutan, salah satunya dengan memanfaatkan bahan alami berbasis teknologi nano.

Nanopartikel merupakan salah satu contoh teknologi nano yang memiliki partikel dengan ukuran nanometer 1–100 yang terdiri dari bahan makromolekul dan dapat digunakan untuk terapi sebagai pembantu (*adjuvant*) vaksin atau pembawa obat, yaitu dengan melarutkan, memerangkap, mengenkapsulasi, menyerap atau menempelkan bahan aktif secara kimia. Nanopartikel yang efektif terhadap beberapa bakteri pembentuk biofilm yang menunjukkan potensi mereka sebagai agen biofilmisidal (penghancur biofilm) yang efektif yaitu nanopartikel perak (Irianto and Ijah, 2011).

Nanopartikel perak (AgNPs) adalah agen antimikroba baru dan banyak digunakan di bidang kesehatan dan obat-obatan seperti pelapis antimikroba, perangkat biomedis, dan pembalut luka karena sifatnya yang menolak bakteri. Sudah diketahui bahwa sifat mereka sangat bergantung pada ukuran, spesies, bentuk, dan metode sintesisnya (Syafiuddin, 2019). Ukuran Nanopartikel perak pada umumnya 1-100 nm yang bersifat non toksik dan sangat efektif melawan bakteri, virus dan mikroorganisme eukariotik sehingga dapat difungsikan sebagai antibakteri dengan



na organik maupun anorganik (Abdassah, 2017). Polimer yang nentuk nanopartikel dapat berupa polimer sintetik dan alami. dahkan dalam penyiapan nanopartikel dapat dipilih berupa ir. Salah satu polimer larut air yang dapat digunakan pada kel untuk tujuan pengobatan adalah kitosan (Irianto and Ijah,

Kitosan diproduksi melalui proses deasetilasi (proses penghilangan gugus asetil) senyawa kitin yang tersusun dari kopolimer dari glukosamin dan Nasetilglukosamin. Kitosan dapat berfungsi sebagai immunostimulan terhadap perubahan kualitas air, penyakit, bakteri dan lain-lain (Hafiluddin dan Triajie, 2011). Kitosan memiliki sifat yang ideal, yaitu biocompatible, biodegradable, tidak beracun, dan tidak mahal. Penambahan kitosan pada pakan komersil dapat meningkatkan pertumbuhan karena kitosan mampu menstimulan fungsi imun pada udang vaname (Ekaputri *et al.*, 2018). Kitosan merupakan biopolimer alami yang menarik disebabkan adanya gugus amino reaktif dan grup fungsional hidroksil. Kitosan memiliki karakteristik biokompatibilitas yang diinginkan serta kemampuan untuk meningkatkan permeabilitas membran. Oleh karenanya kitosan merupakan salah satu matriks imobilisasi yang paling menjanjikan karena memiliki kemampuan membentuk membran, sifat adhesi yang baik, harga murah, tidak beracun, kekuatan mekanis dan hidrofilitas yang tinggi serta perbaikan stabilitas (Irianto and Ijah, 2011).

Sumber utama untuk produksi kitosan adalah kitin dan bahan baku yang digunakan untuk mengolahnya tersedia dalam jumlah yang cukup melimpah di Indonesia, salah satunya cangkang tiram yang terdapat di saluran air yang dapat mencemari lingkungan sehingga digunakan untuk memanfaatkan limbah cangkang tiram menjadi nanopartikel perak sebagai antimikroba pada udang vaname (Amin *et al.*, 2019). Ada beberapa dosis yang digunakan untuk pencampuran NPKCT ke dalam 2 kg pakan udang vaname yaitu 75 ml, 150 ml, dan 225ml (Quinonez *et al.*, 2022). Salah satu parameter penting dalam menilai respons imun udang terhadap infeksi bakteri adalah ekspresi gen *penaeidin*. *Penaeidin* adalah kelompok peptida antimikroba (AMP) yang berperan sebagai lini pertama pertahanan tubuh udang melawan patogen (Yang *et al.*, 2015). Peningkatan ekspresi gen *penaeidin* menunjukkan aktivasi sistem imun yang efektif dalam melawan infeksi.

Ekspresi gen adalah serangkaian proses di mana informasi yang terkandung dalam gen (DNA) digunakan untuk menghasilkan produk fungsional, seperti protein (Pandiangan *et al.*, 2016). Proses ekspresi gen ini dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu Isolasi RNA, sintesis cDNA, dan menganalisis ekspresi gen imun menggunakan PCR.

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dilakukan penelitian untuk mengevaluasi pengaruh berbagai dosis nanopartikel perak kitosan dari cangkang tiram yang diberikan melalui pakan terhadap ekspresi gen *penaeidin* pada udang vaname setelah terinfeksi *V. harveyi*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat

f strategi pengendalian penyakit berbasis bioteknologi nano an dalam budidaya udang vaname.



1.2 Teori

1.2.1 Klasifikasi Udang Vaname (*Penaeus vannamei*)

Udang vaname adalah jenis udang yang secara ilmiah dikenal dengan nama *Penaeus vannamei* dan sering disebut juga sebagai udang kaki putih atau white leg shrimp. Udang ini berasal dari perairan subtropis di pantai barat Amerika, mulai dari Teluk California di Meksiko hingga ke pantai barat Amerika Tengah seperti Guatemala, El Salvador, dan Kosta Rika. Udang vaname dijadikan pengganti dari udang windu, yang produksinya menurun akibat faktor alami berupa perubahan lingkungan pada tahun 1996. Vaname memiliki keunggulan spesifik seperti adaptasi tinggi terhadap suhu rendah, perubahan salinitas, serta laju pertumbuhan yang relatif cepat (Aini, 2021). Berikut udang vaname yang dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Udang vaname (*P. Vannamei*) (Koleksi pribadi, 2024)

Adapun klasifikasi udang vaname adalah sebagai berikut (Firmansyah, 2024) :

Filum	: Arthropoda
Kelas	: Crustacea
Ordo	: Decapoda
Famili	: Penaeidae
Genus	: <i>Penaeus</i>
Spesies	: <i>Penaeus vannamei</i>

1.2.1.1 Morfologi

Hewan perairan yang memiliki badan tersegmentasi, serta pada segmennya dilengkapi sepasang anggota tubuh ialah udang vannamei. Udang vannamei memiliki sepuluh kaki, yang terdiri dari lima kaki jalan dan lima kaki renang, dan termasuk dalam Ordo Decapoda berdasarkan ciri tubuhnya. Pada bagian kepala serta bagian tubuh udang vannamei terbagi yang artinya tubuh udang terbagi



Terdapat 13 ruas pada bagian kepala udang vannamei, yaitu 5 ruas di bagian kepala dan 8 ruas di bagian dada, yang disebut Cephalothorax, yang menyatu dengan dada. Sementara itu, bagian tubuh dan 6 ruas, di mana setiap ruas (segmen) memiliki sepasang anggota (kaki renang) yang juga tersegmentasi. Kemudian ada empat lembar telson yang berbentuk runcing pada ujung ruas keenam dan ruas pertama terdapat alat kelamin udang jantan yang disebut

petasma. Sedangkan pada pangkal kaki jalan keempat dan kelima terdapat thelicum (alat kelamin betina) (Firmansyah, 2024).

1.2.1.2 Habitat dan kebiasaan makan

Udang vaname adalah binatang catodroma, artinya pada saat bertelur akan mencari salinitas tinggi dan pada saat larva akan bermigrasi ke daerah estuaria atau daerah yang memiliki salinitas rendah. Telur udang vaname bersifat menyebar dalam air dan menetas menjadi nauplius diperairan laut lepa bersifat zooplankton. Selanjutnya dalam perjalanan migrasi ke arah estuaria, larva udang vaname mengalami beberapa kali metamorfosa. Siklus hidup udang vaname yaitu naupli, zoea, mysis, post larva, juvenile hingga dewasa (Safira, 2023).

Udang termasuk golongan pemakan segala atau omnivora. Ada beberapa sumber pakan larva udang di antaranya adalah udang kecil (rebon), fitoplankton, zooplankton, cacing laut, larva kerang dan lumut. Udang vaname mencari dan mengidentifikasi pakan menggunakan sinyal kimiawi berupa getaran dengan bantuan organ sensor yang terdiri dari bulu-bulu halus (setae). Organ sensor ini terpusat pada ujung anterior antena, bagian mulut, capit, antena, dan maxilliped. Dengan bantuan sinyal kimiawi yang ditangkap, udang akan merespon untuk mendekati atau menjauhi sumber pakan. Bila pakan mengandung senyawa organik, seperti protein, asam amino, dan asam lemak maka udang akan merespon dengan cara mendekati sumber pakan tersebut. Untuk mendekati sumber pakan, udang akan berenang menggunakan kaki jalan yang memiliki capit. Pakan langsung dicapit menggunakan kaki jalan, kemudian dimasukkan ke dalam mulut. Selanjutnya, pakan yang berukuran kecil masuk ke dalam kerongkongan dan oesopagus. Bila pakan yang dikonsumsi berukuran lebih besar, akan dicerna secara kimiawi terlebih dahulu oleh maxilliped di dalam mulut (Ardiansyah, 2019).

1.2.1.3 *Vibrio harveyi*

Bakteri *V. harveyi* adalah bakteri gram negatif berbentuk batang dengan ukuran (1,0-1,6 x 0,5-0,7 µm), fermentatif dan memiliki flagel lateral pada salah satu ujung polarnya (Ramesh et al., 2014). Bakteri ini mempunyai ciri-ciri koloni berwarna putih sampai hijau pada media Thiosulphate Citrate Bile Salt (TCBS), dengan diameter 15-17 mm dan pada pusat koloni berwarna hijau tua. Karakteristik lain bakteri *V. harveyi* adalah bersifat patogen oportunistik, yaitu organisme yang dalam keadaan normal ada di lingkungan pemeliharaan yang berkembang menjadi patogen apabila kondisi lingkungan dan inangnya memburuk (Utami, 2016)



pakan bakteri penyebab penyakit vibriosis yang meresahkan sebab dapat menyebabkan kematian udang hingga 80% dalam akit ini juga dapat menyebabkan kematian massal baik pada pembesaran udang vaname di dunia karena sifatnya yang udang yang terinfeksi penyakit vibriosis menunjukkan berwarna in beberapa organ luar tampak merah, terutama pada insang *V. harveyi* menginfeksi udang dengan cara masuk melalui mulut,

membentuk plak, menyebar ke alat gerak dan menyebabkan kehilangan fungsi dan degradasi alat gerak. Selain itu infeksi *V. harveyi* juga dapat dilakukan dengan cara intramuskular yaitu dengan menyuntikkan bakteri pada bagian punggung udang diantara segmen kedua dan ketiga (Rusadi *et al.*, 2019).

1.2.1.4 Gen *penaeidin*

Gen *penaeidin* adalah gen yang mengkode peptida antimikroba (AMPs) pada udang, khususnya famili Penaeidae salah satunya yaitu *P. vannamei*. Peptida ini berperan vital dalam sistem imun bawaan udang untuk melawan infeksi patogen seperti bakteri (*V. harveyi*) dan virus. Gen *penaeidin* berfungsi sebagai instruksi genetik untuk memproduksi peptida antimikroba yang disebut *penaeidin* pada udang. Peptida antimikroba ini berperan penting dalam sistem imun udang karena mampu melawan dan membunuh patogen seperti bakteri dan virus yang menginfeksi udang

Secara sederhana, gen *penaeidin* adalah bagian dari materi genetik udang yang bertanggung jawab untuk membuat molekul protein (peptida) yang memiliki kemampuan membunuh mikroorganisme penyebab penyakit. Dengan demikian, semakin aktif gen *penaeidin*, semakin banyak peptida antimikroba yang dihasilkan, sehingga daya tahan udang terhadap infeksi patogen juga meningkat (Parenrengi, 2010).

1.2.1.5 Nanokitosan Cangkang Tiram

Kitosan adalah padatan amorf berwarna kitin murni, memiliki sifat biologi dan mekanik yang tinggi. Kitosan juga mempunyai sifat polielektrolit. Pada umumnya kitosan larut dalam pelarut asam organik pada kisaran pH 4 – 6,5 dan kitosan mengandung polikation yang mampu menekan pertumbuhan bakteri (Amanda, 2022). Kitosan juga merupakan biopolimer alami dengan kelimpahan terbesar kedua setelah selulosa, yang merupakan produk deasetilasi kitin, baik melalui proses reaksi kimia maupun reaksi enzimatik. senyawa ini dapat ditemukan pada cangkang tiram. Cangkang tiram (kelompok moluska) merupakan limbah perikanan yang melimpah dan kaya akan kitin, sehingga berpotensi besar untuk diolah menjadi kitosan. Lebih lanjut, pengolahan kitosan dalam bentuk nanopartikel atau *nanokitosan* dapat meningkatkan efektivitasnya sebagai antibakteri, karena luas permukaan partikel yang lebih besar dan kemampuan penetrasi yang lebih baik ke dalam dinding sel bakteri (Kaimudin dan Leounupun, 2016).

Nanokitosan adalah bentuk nano dari kitosan, yaitu polisakarida alami hasil deasetilasi dari kitin, dengan ukuran partikel berkisar 1–100 nanometer. Sumber



Kitosan adalah kitin dan bahan baku yang digunakan untuk a dalam jumlah yang cukup melimpah di Indonesia, terutama cangkang tiram yang umumnya merupakan limbah, mengandung straksi dan dimanfaatkan secara ekonomis.

Cangkang tiram memiliki sifat biokompatibel, biodegradabel, oba. Beberapa studi menunjukkan bahwa nanokitosan dapat dinding sel bakteri, meningkatkan permeabilitas membran, serta

menghambat sintesis protein bakteri. Oleh karena itu, penggunaannya sebagai agen antibakteri alami dalam budidaya udang menjadi solusi potensial untuk mengurangi ketergantungan terhadap antibiotik sintetis dan meningkatkan kesehatan udang vaname secara berkelanjutan. Selain itu, nanokitosan juga dapat meningkatkan ekspresi gen *penaeidin* (Irianto dan Muljanah, 2011).

1.2.1.6 Ekspresi gen

Tidak seperti vertebrata, udang tidak memiliki sistem imun adaptif, sehingga sistem imun bawaan (innate immune system) menjadi lini pertahanan utama terhadap infeksi. Salah satu aspek penting dari sistem imun bawaan ini adalah ekspresi gen-gen imun, yang mengkode protein-protein antimikroba dan molekul pertahanan lainnya (Sinaga, 2010).

Ekspresi gen adalah proses di mana informasi genetik dalam DNA digunakan untuk menghasilkan produk fungsional seperti protein atau peptida. Ekspresi gen terdiri dari dua tahap utama, yaitu transkripsi (Informasi dalam DNA ditranskripsi menjadi mRNA (messenger RNA)) dan translasi (mRNA diterjemahkan menjadi protein (misalnya *penaeidin*, *crustin*, *lysozyme*)) (Pandiangan, 2016).

1.3 Tujuan dan Kegunaan

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh dosis nanopartikel perak kitosan cangkang tiram yang ditambahkan pada pakan sehingga mampu mengetahui ekspresi gen *penaeidin* pada udang vaname (*Penaeus vannamei*) yang terinfeksi bakteri *V.harveyi*.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu bahan informasi tentang pengaruh nanopartikel perak kitosan cangkang tiram terhadap ekspresi gen *penaeidin* udang vaname yang terinfeksi bakteri *V. harveyi*. Selain itu, sebagai bahan acuan untuk penelitian-penelitian selanjutnya.



BAB II. METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Hatchery Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Kecamatan Tamalanrea, Kelurahan Tamalanrea Indah, Kota Makassar, Sulawesi Selatan pada bulan September sampai Oktober 2024. Untuk kegiatan ekspresi gen dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan (BRPBAPPP), Maros

2.2 Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang digunakan pada saat penelitian dapat dilihat pada tabel 1 dan tabel 2, sebagai berikut :

Table 1. Bahan yang digunakan selama penelitian

Nama Bahan	Fungsi
Udang vaname	Hewan uji penelitian
Air laut	Media pemeliharaan
Pakan formulasi	Pakan hewan uji
Kitosan cangkang tiram	Bahan campur pakan
NaOH	Bahan untuk mensintesis nanopartikel
HCl	Bahan untuk mensintesis nanopartikel
Asam Asetat	Bahan untuk mensintesis nanopartikel
Aquades	Bahan untuk mensintesis nanopartikel
AgNO ₃	Bahan untuk mensintesis nanopartikel
Nanopartikel Perak	Bahan utama
Kertas pH	Mengidentifikasi keasaman dan kebasaan larutan
Aluminium foil	Menutup wadah larutan
Cling	Merekatkan penutup larutan
Plastik klip	Menaruh pakan
Tepung ikan	Bahan pakan
Tepung kepala udang	Bahan pakan
Tepung kedelai	Bahan pakan
Tepung jagung	Bahan pakan
Tepung terigu	Bahan pakan
CMC (<i>Carboxymethyl cellulose</i>)	Bahan pakan
	Bahan pakan
	Bahan pakan
	Bahan pakan
	Bahan pakan
	Mereduksi zat organik
	Menghilangkan kaporit
	Melindungi sistem pernapasan
	Untuk ekspresi gen



Tissue	Menunjang kebersihan
Sabun	Untuk mencuci alat
Label	Penandah wadah

Table 2. Alat yang digunakan selama penelitian

Nama Alat	Fungsi
Belender	Menghaluskan bahan
Timbangan analitik	Menimbang zat dengan kapasitas kecil
Beaker glass	Mengambil cairan dalam jumlah yang banyak agar terukur
Gelas ukur	Menakar cairan
Labu ukur	Mengencerkan larutan
Pipet tetes	Mengambil cairan
Lemari asam	Menyimpan bahan kimia yang bersifat asam
Penghisap (filter)	Menghisap dan melepaskan cairan
Sendok	Mengaduk larutan
Botol semprot	Menyimpan aquades
Cawan petri	Menyimpan bahan
Oven	Mengeringkan bahan
Thermometer	Mengukur suhu
Magnetic stirrer	Mengaduk larutan dengan pemanasan tertentu
Mesin pencetak pakan	Mencetak pakan pellet
Ayakan	Mengayak tepung pakan
Baskom	Wadah pencampuran pakan
Kontainer	Wadah pemeliharaan
Bak penampungan air laut	Menampung air laut
Pompa celup	Memindahkan air laut
Blower	Menyuplai oksigen
Kerang aerasi	Mengatur jumlah oksigen
Selang aerasi	Menghubungkan blower dengan batu aerasi
Timbangan elektrik	Menimbang pakan dan bobot sampel
Selang spon	Membersihkan wadah penelitian dan mengambil sisa pakan
	Wadah udang saat ekspresi gen
	Untuk membedah udang
	Untuk membedah udang
	Untuk mengambil organ udang
	Untuk menggandakan untai DNA



Elektroforesis

Untuk memisahkan komponen DNA berdasarkan muatan

UV Transilluminator

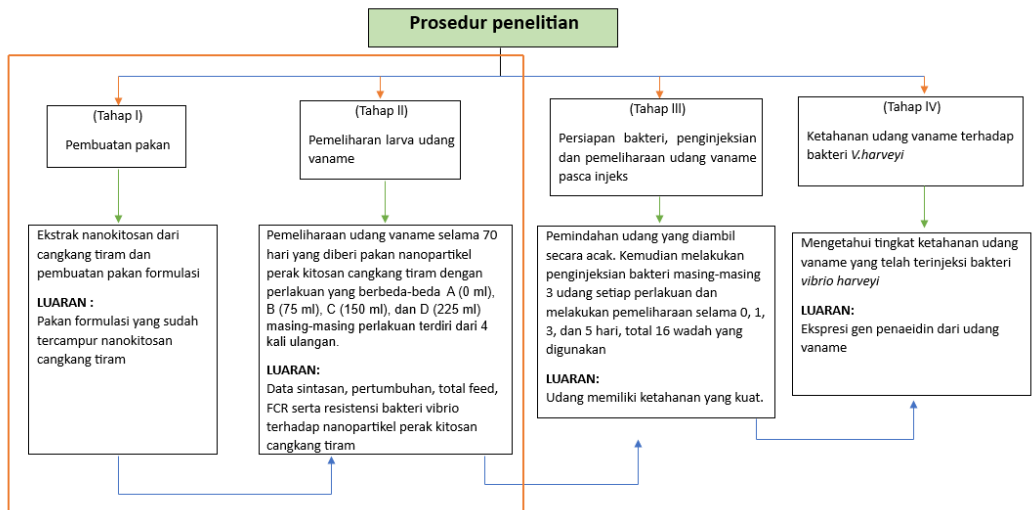
Untuk mengamati hasil ekspresi gen

Neraca analitik

Untuk mengukur bobot organ sampel

2.3 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari atas beberapa tahapan prosedur penelitian, yaitu pada gambar 2.



Gambar 2. Prosedur penelitian

Prosedur penelitian di atas terdiri dari 4 tahapan yang ditujukan pada lampiran 3, dimana tahapan I dan II merupakan prosedur yang dilakukan dengan menghasilkan data sintasan, pertumbuhan serta resistensi bakteri vibrio terhadap nanopartikel perak kitosan cangkang tiram. Sedangkan pada tahap III dan IV merupakan tahapan yang mendapatkan hasil data ekspresi gen *penaeidin* terhadap bakteri *V. harveyi* yang menginfeksi udang vaname. Dari pernyataan tersebut, pada penelitian ini berada pada tahapan III dan IV yang kemudian dijelaskan sebagai berikut.

2.3.1. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian adalah udang vaname (*P. vannamei*) pada stadia PL 12. Larva udang ditebar dengan kepadatan 80 ekor/wadah. Larva udang diperoleh dari hasil pemijahan induk dan penetasan telur udang vaname di a Utama, Kabupaten Barru. Kemudian dilakukan pemeliharaan ri dengan pemberian pakan yang telah dicampur nanokitosan



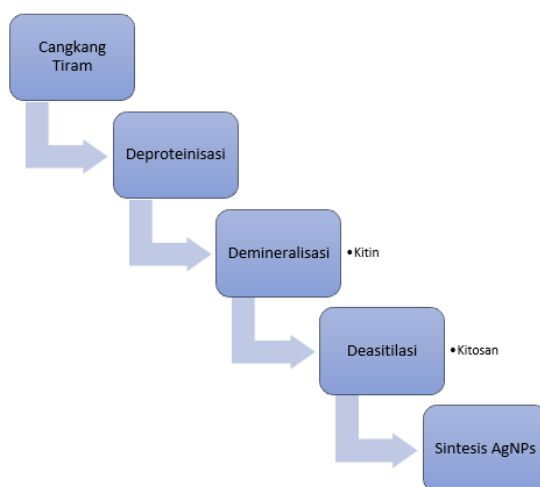
/adah

ai pemeliharaan, langkah awal yang perlu dilakukan adalah ang berupa box kontainer plastik berukuran 56 cm x 35,5 cm x

28 cm. Wadah ini berkapasitas 55,6 Liter yang diisi air sebanyak 20 Liter sebanyak 16 wadah untuk perlakuan A (0 ml), B (75 ml), C (150 ml), dan D (225 ml) yang masing-masing dilengkapi dengan 1 aerasi. Sebelum digunakan, wadah terlebih dahulu di cuci hingga bersih menggunakan air mengalir, selanjutnya dilakukan pengeringan dan membungkusnya dengan plastik hitam pada bagian luar wadah agar sesuai dengan kondisi lingkungannya. Pada bagian atas wadah diberi waring untuk mencegah organisme lain masuk kedalam wadah penelitian. Media air yang digunakan terlebih dahulu ditreatmen dan diencerkan dengan air tawar hingga pada salinitas 25 ppt atau sesuai dengan salinitas yang optimal untuk pertumbuhan kultivan yang digunakan.

2.3.3. Pembuatan Pakan

Pakan yang diberikan merupakan pakan buatan yang telah dicampurkan dengan nanokitosan cangkang tiram. Limbah cangkang tiram didapatkan dari Rumah Makan Celebes, Kabupaten Takalar, Sulawesi selatan. Setelah itu, cangkang tiram dicuci menggunakan air tawar dengan cara digosok sampai bersih kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari hingga kering. Kemudian cangkang tiram ditumbuk menggunakan penumbuk. Lalu, dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi tepung cangkang tiram. Adapun proses ekstraknya ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Prosedur ekstrak cangkang tiram (Mukhlisa, 2024 ; Kalaivani *et al.*, 2018).



proteinase dilakukan penambahan larutan NaOH 3,5% dengan arut dengan sampel kemudian dipanaskan kemudian dilakukan oven. Proses deproteinasi bertujuan untuk mengurangi kadar larutan alkali encer dan pemanasan yang cukup. Protein harus mengganggu proses kimia berikutnya dan meningkatkan kemurnian kitosan (Luthfiyana *et al.*, 2022)

Selanjutnya Demineralisasi dengan penambahan HCl 1,5 N dengan perbandingan 10:1 sampel dan pelarut di campurkan. Proses demineralisasi juga harus dilakukan untuk menghilangkan kandungan mineral anorganik (CaCO_3) kalsium karbonat dari struktur keras cangkang tiram. Hal ini dilakukan agar kitosan tidak kasar, reaktif dan larut (Jayanudin *et al.*, 2013)

Setelah itu, Deasetilasi kitin menjadi kitosan menggunakan larutan NaOH 50% dengan perbandingan 10:1 (NaOH:Kitin) kemudian dilakukan pengadukan dan pemanasan dengan suhu 90°C selama 2 jam. Proses deasetilasi kitin ini bertujuan untuk menghilangkan gugus asetil yang akan menyebabkan kitin tidak larut dalam air dan kurang reaktif secara biologis (Aldila *et al.*, 2021)

Selanjutnya dilakukan Sintesis AgNPs dari kitosan cangkang tiram dengan menggunakan asetat 1% kemudian di saring dan hasil saringan yang didapatkan selanjutnya akan ditambahkan dengan 3 ml AgNO_3 , 0,1 M dan 100 ml NaOH 1 M. setelah selesai akan menjadi warna coklat kekuningan yang menunjukkan pembentukan AgNPs. Setelah selesai selanjutnya akan dicampurkan dengan formulasi pakan yang telah dibuat (Mukhlysa, 2024).

Pakan dibuat dengan formulasi yang sesuai kebutuhan nutrisi udang vaname. AgNPs kitosan limbah cangkang tiram sebagai perlakuan diberikan pada udang vaname setelah dicampurkan terlebih dahulu kedalam pakan formulasi. AgNPs kitosan limbah cangkang tiram yang digunakan di sesuaikan dengan dosis perlakuan, yaitu 0 ml, 75 ml, 150 ml dan 225 ml dicampurkan ke dalam 2 kg pakan formulasi. Kemudian setelah tercampur adonan siap dimasukkan ke dalam penggiling manual cetakan pellet. Pakan yang sudah ditambahkan AgNPs kitosan limbah cangkang tiram selanjutnya dikering anginkan di bawah sinar matahari dan setelah kering dimasukkan ke dalam wadah. Sebelum diberikan ke udang vaname, pakan dihaluskan terlebih dahulu untuk menyesuaikan ukuran dan umur udang vaname.

Adapun formulasi pakan yang dibuat berdasarkan Mukhlysa (2024) dapat dilihat pada Tabel 3.

Table 3. Formulasi pakan

Bahan Baku Pakan (BBP)	Perlakuan Nanopartikel Perak Kitosan (ml)			
	0	75	150	225
Tepung Ikan	39	39	39	39
Tepung Kepala Udang	10	10	10	10
Tepung Kedelai	27	27	27	27
Tepung Jagung	6	6	6	6
irigu	5	5	5	5
yl cellulose)	2	2	2	2
an	8	8	8	8
lix	2	2	2	2
	1	1	1	1
	100	100	100	100



2.3.4. Persiapan Wadah Untuk Injeksi

Akuarium yang digunakan sebanyak 16 buah. Akuarium dicuci bersih kemudian dibilas hingga bersih dan dikeringkan. Selanjutnya, akuarium diisi air dengan ketinggian 15 cm, dan diberi penutup plastik hitam dibagian luar akuarium agar tidak stress, pada bagian atas akuarium ditutup dengan waring hitam dan disetiap akuarium diberi diberi masing-masing aerasi.

2.3.5. Persiapan Bakteri

Isolat bakteri *Vibrio harveyi* yang digunakan berasal dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Takalar, Sulawesi Selatan. Selanjutnya bakteri diremajakan pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA). Inokulasi bakteri dilakukan menggunakan jarum ose, kemudian diperbanyak dengan metode gores lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu penanaman bakteri dikultur pada media cair *Trypticase Soy Broth* (TSB) dengan cara mengambil isolat bakteri dengan jarum ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi TSB. Kemudian diinkubasi pada waterbath shaker selama 24 jam.

Selanjutnya dilakukan isolasi bakteri udang vaname dalam media TSA dengan menambahkan media TSA cair sebanyak 20 ml kedalam cawan petri hingga memadat. kemudian menambahkan 200 µl suspensi bakteri uji dengan kepadatan 10^7 CFU/ml secara aseptis ke permukaan media yang telah memadat dalam cawan petri menggunakan pipet. Lalu suspensi bakteri disebarkan menggunakan spreader secara merata hingga permukaan agar mengering. Selanjutnya, diinkubasi secara terbalik selama 24 jam pada suhu 37°C.

Pembuatan TSA miring dimulai dengan menimbang media padat TSA sebanyak 1,28 g ditambahkan aquadest sebanyak 32 ml lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dipanaskan diatas hot plate. Setelah mendidih dan tercampur rata kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfer selama 20 menit. Setelah disterilkan media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dimiringkan sampe media membeku.

Selanjutnya dilakukan pengenceran bakteri yang diawali dengan mengisi 2 buah tabung reaksi dengan larutan fisiologis sebanyak 10 ml dan 9 ml, kemudian bakteri dari agar mirip di ulas dan campurkan ke tabung reaksi berisi larutan fisiologis 10 ml kemudian di vortex hingga tercampur merata, selanjutnya di encerkan dengan cara mengambil 1 ml dari tabung reaksi 10 ml menggunakan mikropipet dan di masukkan pada tabung reaksi 9 ml kemudian di vortex hingga tercampur merata. Selanjutnya dituangkan pada wadah dan bakteri siap untuk digunakan atau di injeksikan pada



an Bakteri

n penginfeksi bakteri, terlebih dahulu menyiapkan 4 wadah ngambil dan memindahkan udang yang sudah dilakukan 70 hari sebanyak 48 ekor pada setiap perlakuan secara acak.

Bakteri yang telah dibuat dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml, selanjutnya disuntikkan ke punggung udang masing-masing perlakuan 3 ekor sebanyak 0,05 ml. Volume injeksi optimal harus disesuaikan dengan ukuran fisik udang untuk menghindari trauma fisik dan memastikan distribusi bakteri yang efektif. Hal ini sejalan dengan penelitian Azizatunnisa (2008) bahwa dosis rendah (0,02 ml) menyebabkan perubahan perilaku imun kurang signifikan, dosis tinggi (0,1 ml) mengakibatkan kematian pada udang dalam waktu singkat sehingga tidak memungkinkan pengamatan ekspresi gen secara memadai dan pada dosis 0,05 ml udang dapat bertahan cukup lama dan bisa digunakan untuk melakukan analisis ekspresi gen.

Setelah penginjeksian, udang ditempatkan pada wadah yang terpisah untuk setiap perlakuan dan diberi aerasi. Kemudian udang yang telah diinjeksi bakteri *V. harveyi* akan dipelihara selama 5 hari dalam wadah tersebut serta dilakukan pengamatan terkait gejala yang ditimbulkan. Setelah pemeliharaan, udang kemudian dimasukkan ke dalam plastik packing masing-masing 3 pada setiap waktu pemeliharaan yaitu 0, 1, 3, dan 5 hari pasca infeksi dan diisi aerasi, kemudian dibawa ke Laboratorium Bioteknologi (BRPBAPPP) Maros untuk melakukan analisis ekspresi gen.

2.4. Ekspresi gen

Untuk mengamati ekspresi gen dimulai dengan mengambil masing-masing 1 ekor sampel udang pada setiap waktu 0, 1, 3, dan 5 hari pasca infeksi *post day infection (PDI)*. Bobot sampel minimal 0,03 g dengan organ yang digunakan adalah hepatopankreas kemudian sampel dianalisis. Gen yang digunakan untuk mendeteksi hasil ekspresi gen yaitu gen penaeidin yang dianalisis menggunakan metode *Reverse Transcriptase (RT)- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*. Sampel jaringan diambil setelah udang berumur 1 bulan. Pada umur ini, *ribonukleat acid (RNA)* total diekstraksi dari hepatopankreas. Hepatopankreas diambil dari bagian tubuh punggung udang RNA total diekstraksi menggunakan Isogen (Nippon Gen, Japan) sesuai dengan prosedur dalam manual.

Sintesis cDNA dari RNA total dilakukan menggunakan kit *ReverTra Ace qPCR RT (Toyobo, Jepang)* dengan prosedur sesuai dengan manual. Jumlah RNA (1 mikrogram) diinkubasi pada suhu 65°C selama 5 menit dan didinginkan dalam es selama 15 menit. Campurannya terdiri dari 2 μl buffer reaksi, 0,5 μl reverse transkriptase, dan 0,5 μl campuran primer, dan total volumenya dibawa ke 10 μl dengan menambahkan air bebas nuklease yang disertakan dalam kit. Larutan dihomogenkan dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, cDNA



serkan sepuluh kali lipat menggunakan air bebas nuklease dan -20°C .

anakan dapat dilihat pada Tabel 3., PCR dikondisikan sbb: pre menit), denaturasi (95°C , 15 detik, 35 siklus), annealing (56°C , 72°C , 10 detik) dan extension akhir pada 72°C setelah 5 menit.

Hasil PCR diseparasi menggunakan elektroforesis dengan gel agarosa 1% dan ditunjukkan pada Lampiran 1 dan 2. DNA divisualisasi dengan pewarna etidium bromida menggunakan cahaya ultraviolet kemudian melakukan pengamatan terhadap muncul atau tidaknya pita pada ukuran standar yang digunakan 50 bp.

Table 4. Primer yang digunakan dalam pengujian tingkat ekspresi gen

Gen	Primer 5'-3'	Reference
<i>Penaedin</i>	F' CACCCTTCGTGAGACCTTTG R' AATATCCCTTTCCCACGTCAG	Wang <i>et al.</i> (2010)
<i>β-actin</i>	F' CCACGAGACCACCTACAAC R' AGCGAGGGCAGTGATTTC	Wang <i>et al.</i> (2010)

2.5. Analisis Data

Data ekspresi gen yang diperoleh dianalisis secara deskriptif berdasarkan kemunculan pita hasil analisis PCR.

