



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM

SERTIFIKAT PATEN SEDERHANA

Menteri Hukum atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten Sederhana kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten : UNIVERSITAS SURABAYA
JALAN NGAGEL JAYA SELATAN NO. 169
SURABAYA

Untuk Invensi dengan Judul : KIT UNTUK DETEKSI CEPAT ACUTE HEPATOPANCREATIC
NECROSIS DISEASE (AHPND) PADA UDANG SECARA
ISOTHERMAL DENGAN GEN TARGET PirA DAN PirB

Inventor : Dr.rer.nat Sulistyono Emantoko Dwi Putra
Ernest Suryadjaja Jahja, S.Si., M. App. Sc

Tanggal Penerimaan : 02 November 2022

Nomor Paten : IDS000011103

Tanggal Pemberian : 26 Agustus 2025

Pelindungan Paten Sederhana untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 10 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 23 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten Sederhana ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari invensi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



a.n MENTERI HUKUM
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL
u.b.
Direktur Paten, Desain Tata Letak Sirkuit Terpadu dan
Rahasia Dagang



Sri Lastami

Dra. Sri Lastami, S.T., M.IPL.
NIP. 196512311991032002

**KEMENTERIAN HUKUM
REPUBLIK INDONESIA
DIREKTORAT JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL
DIREKTORAT PATEN, DESAIN TATA LETAK SIRKUIT TERPADU DAN RAHASIA DAGANG**
Jln. H.R. Rasuna Said, Kav. 8-9 Kuningan Jakarta Selatan 12940
Phone/Facs. (6221) 57905611; Website: www.dgip.go.id

INFORMASI BIAYA TAHUNAN

Nomor Paten : IDS000011103 Tanggal diberi : 26 Agustus 2025 Jumlah Klaim : 1
 Nomor Permohonan : S00202212327 Tanggal Penerimaan : 02 November 2022

Berdasarkan Peraturan Pemerintah Nomor 28 tahun 2019 tentang Jenis dan Tarif Atas Jenis Penerimaan negara Bukan Pajak Yang Berlaku Pada Kementerian Hukum, biaya tahunan yang harus dibayarkan adalah sebagaimana dalam tabel di bawah.

Perhitungan biaya tahunan yang sudah dibayarkan adalah :

Biaya Tahunan Ke-	Periode Perlindungan	Batas Akhir Pembayaran	Tgl Pembayaran	Jumlah Pembayaran	Keterangan
1	02/11/2022-01/11/2023	25/02/2026	undefined	0	Klaim 1; Total Klaim: 0; Denda: 0
2	02/11/2023-01/11/2024	25/02/2026	undefined	0	Klaim 1; Total Klaim: 0; Denda: 0
3	02/11/2024-01/11/2025	25/02/2026	undefined	0	Klaim 1; Total Klaim: 0; Denda: 0
4	02/11/2025-01/11/2026	25/02/2026	undefined	0	Klaim 1; Total Klaim: 0; Denda: 0
5	02/11/2026-01/11/2027	03/10/2026	undefined	0	Klaim 1; Total Klaim: 0; Denda: 0

Perhitungan biaya tahunan yang belum dibayarkan adalah :

Biaya Tahunan Ke-	Periode Perlindungan	Batas Akhir Pembayaran	Biaya Dasar	Jml Klaim	Biaya Klaim	Total	Terlambat (Bulan)	Total Denda	Jumlah Pembayaran
6	02/11/2027-01/11/2028	03/10/2027	1.650.000	1	50.000	1.700.000	0	0	1.700.000
7	02/11/2028-01/11/2029	03/10/2028	2.200.000	1	50.000	2.250.000	0	0	2.250.000
8	02/11/2029-01/11/2030	03/10/2029	2.750.000	1	50.000	2.800.000	0	0	2.800.000
9	02/11/2030-01/11/2031	03/10/2030	3.300.000	1	50.000	3.350.000	0	0	3.350.000
10	02/11/2031-01/11/2032	03/10/2031	3.850.000	1	50.000	3.900.000	0	0	3.900.000

Biaya yang harus dibayarkan hingga tanggal 03-10-2027 (tahun ke-6) adalah sebesar Rp.1.700.000 ⁷

- Pembayaran biaya tahunan untuk pertama kali wajib dilakukan paling lambat 6 (enam) bulan terhitung sejak tanggal diberi paten
- Pembayaran biaya tahunan untuk pertama kali meliputi biaya tahunan untuk tahun pertama sejak tanggal penerimaan sampai dengan tahun diberi Paten ditambah biaya tahunan satu tahun berikutnya.
- Pembayaran biaya tahunan selanjutnya dilakukan paling lambat 1 (satu) bulan sebelum tanggal yang sama dengan Tanggal Penerimaan pada periode perlindungan tahun berikutnya.
- Permohonan penundaan pembayaran biaya tahunan akan diterima apabila diajukan paling lama 7 hari kerja sebelum tanggal jatuh tempo pembayaran biaya tahunan berikutnya, dan bukan merupakan pembayaran biaya tahunan pertama kali.
- Dalam hal biaya tahunan belum dibayarkan sampai dengan jangka waktu yang ditentukan, Paten dinyatakan dihapus



(12) PATEN INDONESIA

(11) IDS000011103 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 26 Agustus 2025

(51) Klasifikasi IPC⁸ : A 01K 61/59(2006.01), G 01N 33/569(2006.01)

(21) No. Permohonan Paten : S00202212327

(22) Tanggal Penerimaan: 02 November 2022

(30) Data Prioritas :

(31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara

(43) Tanggal Pengumuman: 10 November 2022

(56) Dokumen Pemandang:

CN107723372 A (INST OCEANOLOGY & MARINE FISHERIES
JIANGSU) 23 Februari 2018

KR101981401 B1 (SOLFORTO CO LTD) 24 Mei 2019

Tuklasinnatin, White spot syndrome—cause of shrimp industry
degeneration, finally cured, Agriculture, Science & Technology, 3
April 2018, diakses dari

<https://tuklasinnatin.wordpress.com/tag/jamp-detection-kit/> pada 8
April 2025

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :
UNIVERSITAS SURABAYA
JALAN NGAGEL JAYA SELATAN NO. 169
SURABAYA

(72) Nama Inventor :

Dr.rer.nat Sulistyono Emantoko Dwi Putra, ID
Ernest Suryadjaja Jahja, S.Si., M. App. Sc, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Nani Nur'aeny, S.Si.

Jumlah Klaim : 1

(54) Judul Invensi : KIT UNTUK DETEKSI CEPAT ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE (AHPND) PADA UDANG SECARA
ISOTHERMAL DENGAN GEN TARGET PirA DAN PirB

(57) Abstrak :

Invensi ini berhubungan dengan suatu kit untuk mendeteksi *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) secara cepat pada udang dengan metode *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). Kit ini terdiri dari campuran primer yang didesain khusus untuk mendeteksi AHPND, campuran reaksi LAMP yang mengandung Bst DNA polimerase, *Deoxynucleotide Triphosphate*, dan larutan penyangga; air bebas nuklease; kontrol positif adalah plasmid rekombinan *pirA* dan *pirB*. Deteksi AHPND menggunakan kit ini mempunyai keunggulan pengerjaan lebih singkat dan sederhana dibandingkan metode diagnostik lainnya.



Deskripsi

KIT UNTUK DETEKSI CEPAT ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE (AHPND) PADA UDANG SECARA ISOTERMAL DENGAN GEN TARGET PirA dan PirB

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan suatu kit untuk mendeteksi Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) secara cepat pada udang dengan metode *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP).

Latar Belakang Invensi

Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)/Early Mortality Syndrome (EMS) adalah penyakit yang disebabkan oleh serangan bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Awalnya penyakit ini disebut sindrom kematian dini, tetapi setelah ditemukan oleh Tran et al. (2015) bahwa penyebabnya adalah strain *Vibrio parahaemolyticus*, nama penyakit ini diubah menjadi AHPND. Penyakit ini diawali oleh negara Cina pada tahun 2009. Budidaya udang vanamei menghadapi kendala dengan munculnya kasus kematian dini yang ditandai dengan kerusakan pada hepatopankreas (nekrosis hepatopankreatik akut). Kematian udang terjadi secara cepat karena bakteri *V. parahaemolyticus* akan berkolonisasi di perut udang dan mensekresikan toksin PirAB^{VP} yang bersifat fatal. Penyakit ini disebut akut karena menyebabkan mortalitas yang tinggi, yaitu 100% (Schryver et al., 2014).

Gejala klinis AHPND adalah hepatopankreas berwarna pucat dan menyusut (perkembangannya terhenti). Berdasarkan analisis histologis, pada stadium awal AHPND, akan terjadi pengelupasan sel epitel tubulus hepatopankreas, sedangkan nekrosis pada sel epitel tubulus hepatopankreas dan infiltrasi hemositik terjadi



pada tahap infeksi selanjutnya (Lai et al., 2015). Beberapa perubahan perilaku, diantaranya udang cenderung berdiam (*sluggish*), berenang secara spiral, dan tidak nafsu makan (Zorriehzahra dan Banaederakhshan, 2015). Meskipun begitu, perubahan perilaku hanyalah presumtif yang perlu dikonfirmasi kebenarannya melalui pengujian histologis. Selain itu, gejala ini baru nampak paling cepat 10 hari setelah *stocking* udang pada kolam yang baru. Dalam 10 hari tersebut, dapat dipastikan sudah banyak udang yang terinfeksi AHPND. Oleh karena itu, diperlukan metode deteksi dini, sederhana, sensitif, dan akurat untuk meminimalisir penyebaran bakteri.

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan metode diagnostik yang dapat digunakan untuk memeriksa sampel yang diduga terinfeksi AHPND. Primer pada PCR akan secara spesifik menarget sekuens DNA yang ada pada sampel sehingga diagnosis penyakit menjadi lebih akurat dibandingkan pengamatan gejala klinis. *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP) merupakan PCR yang lebih sederhana dibanding PCR konvensional, namun memiliki sensitivitas yang setara. Jika dibandingkan, PCR konvensional memiliki beberapa kelemahan, yaitu diperlukannya mesin berteknologi tinggi seperti *thermal cycler machine* serta tenaga profesional dan hasilnya baru dapat diamati setelah tiga jam. Berbeda dengan PCR konvensional, PCR isothermal hanya memerlukan *waterbath* dan dapat dijalankan oleh tenaga tanpa keterampilan khusus (Iwamoto et al., 2003), hasil PCR isothermal sudah dapat diamati setelah 30 menit.

Beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan deteksi AHPND berbasis LAMP. Yamazaky et al. (2008) melaporkan penggunaan LAMP untuk deteksi AHPND dengan primer yang dirancang berdasarkan urutan gen *thermolabile hemolysin* (gen *tlh*). Metode LAMP ini dirancang dapat memberikan hasil dalam waktu 40 menit. Namun demikian gen *thermolabile hemolysin* merupakan *housekeeping gene* dan tidak terlibat langsung dalam



sifat patogen *V. parahaemolyticus*. Hal ini menyebabkan metode yang dikembangkan tidak cukup membedakan *V. parahaemolyticus* patogen dan non patogen. Penelitian lain oleh Arunrut et al. (2016) merancang metode LAMP yang ditambah probe nanopartikel emas (AuNP) untuk deteksi penyebab AHPND. Metode dikembangkan dengan deteksi gen *pirA* dan *pirB* secara terpisah Hal ini memungkinkan deteksi strain *V. parahaemolyticus* yang memiliki gen *pirA* dan *pirB* yang terekspresi dalam waktu berbeda, juga memberikan hasil positif, meskipun tidak bersifat virulen.

10 Penelusuran terhadap paten nomor CN107723372A, menunjukkan primer yang dirancang berdasarkan gen *pirB* untuk deteksi penyebab AHPND menggunakan LAMP. Deteksi AHPND dengan primer yang hanya berdasarkan gen *pirB* berpotensi menimbulkan positif palsu hasil deteksi karena gen *pirB* dapat ditemukan
15 pada bakteri vibrio lain yang bukan merupakan penyebab AHPND. Lebih jauh, penelusuran terhadap paten KR101981401B1 menunjukkan deteksi AHPND yang dilakukan menggunakan dua set primer yang masing-masing mengamplifikasi gen *pirA* dan gen *pirB*. Deteksi AHPND dengan amplifikasi gen *pirA* dan *pirB*
20 secara terpisah memiliki potensi bahwa salah satu gen tidak terdeteksi dan gen yang lain terdeteksi ada. Hal ini dapat terjadi karena efisiensi primer saat pelaksanaan PCR berbeda. Lebih jauh, set primer yang berbeda juga tidak bisa memastikan bahwa gen *pirA* dan *pirB* diamplifikasi dari plasmid yang sama
25 atau berbeda. Mengingat Vibrio baru menyebabkan AHPND ketika gen *pirA* dan *pirB* berada dalam satu plasmid, maka deteksi dengan dua set primer ini tidak dapat memastikan bahwa hasil deteksi berasal dari vibrio penyebab AHPND atau tidak.

Invensi ini merupakan suatu kit yang dapat mendeteksi
30 udang yang terinfeksi AHPND secara spesifik karena menarget gen *PirA* dan *PirB* sekaligus. Deteksi gen *pirA* dan *pirB* sekaligus dengan set primer yang sama, memastikan bahwa hasil



positif akan didapatkan ketika gen *pirA* dan *pirB* berasal dari satu plasmid yang dimiliki oleh *Vibrio* penyebab AHPND.

Uraian Singkat Invensi

- 5 Tujuan utama invensi ini adalah menyediakan kit untuk mendeteksi adanya *V. parahaemolyticus* patogen penyebab AHPND. Lebih khusus invensi ini berupa kit untuk deteksi cepat AHPND pada udang secara isothermal dengan gen *pirA* dan *pirB* *V. parahaemolyticus* sebagai target dengan satu set primer.
- 10 Terdapat empat primer yang dipergunakan dalam invensi ini yang diberi nama F3_2, B3_2, FIP dan BIP. Primer F3_2 dirancang berdasarkan urutan gen *pirB*. Lebih jauh, primer B3_2, FIP dan BIP dirancang berdasarkan urutan gen *pirA*.

- Kit ini mencakup campuran primer yang didesain khusus;
- 15 campuran reaksi LAMP yang mengandung *Bst* DNA polimerase, *Deoxynucleotide Triphosphate*, dan larutan penyangga; air bebas nuklease; dan kontrol positif adalah plasmid rekombinan gen *pirA* dan *pirB* *V. parahaemolyticus*. Masing-masing bahan dikemas dalam tabung polipropilen berukuran 1,5 ml yang dapat
- 20 dipergunakan hingga 200 kali reaksi pengujian. Dengan proses perwujudan invensi ini, deteksi AHPND dapat dilakukan hanya dengan mencampurkan bahan-bahan tersebut dengan sampel DNA dari *V. parahamolyticus* yang terdapat di udang, diinkubasi di *waterbath* selama 30 menit pada suhu 65°C, lalu hasilnya
- 25 dielektroforesis.

Uraian Singkat Gambar

- Gambar 1, adalah hasil elektroforesis yang menunjukkan kit LAMP untuk mendeteksi gen *pirA* dan *pirB* dari *V.*
- 30 *parahaemolyticus*. Adapun keterangan dari singkatan pada gambar, yaitu:

- 1 = 100 bp DNA ladder (Promega)
- 2 = Udang terserang AHPND



3 = Kontrol positif

4 = Kontrol negatif

Uraian Lengkap Invensi

5 Invensi ini adalah kit yang lebih mudah, murah, dan cepat dalam mendeteksi AHPND tanpa mengurangi sensitivitas dan spesifisitasnya. Tujuan tersebut dapat dicapai berkat metode LAMP yang menggunakan primer spesifik yang hanya mentargetkan gen PirA (GenBank #: KU145400.1) dan PirB (GenBank #: 10 KU145400.1) yang berasal dari AHPND. Terdapat empat primer yang dipergunakan dalam invensi ini yang diberi nama F3_2, B3_2, FIP dan BIP. Primer F3_2 dirancang berdasarkan urutan gen pirB. Lebih jauh, primer B3_2, FIP dan BIP dirancang berdasarkan urutan gen pirA. Secara lengkap primer-primer yang 15 dipergunakan adalah sebagai berikut:

- a. F3_2: GTTAAATTCCGTCAAAGATGAC, yang merupakan urutan yang berasal dari gen pirB.
- b. B3_2: CAATACCAATGGGGTGCG, yang merupakan urutan yang berasal dari gen pirA.
- 20 c. FIP_2: GCTAGTCGTGGTTTCTGTACAATCTTACAACGTATTCGTTAGTCAT, yang merupakan urutan yang berasal dari gen pirA.
- d. BIP_2: ACGCTGATGATAGAATGCATTATCATGGAAAGTGGCTAAATCACA yang merupakan urutan yang berasal dari gen pirA.;

25 Waktu inkubasi selama 30 menit di *waterbath* yang diperlukan dalam mendapatkan hasil oleh kit, jauh lebih singkat daripada metode-metode deteksi lainnya yang juga memerlukan peralatan rumit serta ketrampilan khusus. Kit deteksi cepat ini berisi bahan-bahan sebagai berikut:

- 30 1. Campuran primer yang didesain secara khusus menggunakan software Primerexplorer V5 (Primerexplorer.jp, Japan). Primer dirancang untuk sekaligus mengamplifikasi gen pirA dan pirB. Primer dirancang terletak pada bagian akhir gen



pirA dan bagian awal gen pirB, melewati daerah antar gen pirA dan pirB.

2. Campuran reaksi LAMP yang terdiri dari enzim Bst DNA polimerase dan *master mix*.
- 5 3. Air bebas nuklease
4. Kontrol positif berupa Fragmen gen pirA dan pirB.

Salah satu contoh campuran reaksi dapat dilihat pada tabel 1. Tabel ini memperlihatkan total campuran reaksi sebanyak 10 μ l. Setelah semua campuran di atas dimasukkan dalam tabung mini, dilakukan inkubasi selama selama 30 menit pada suhu 65°C. Hasil pelaksanaan LAMP selanjutnya di elektroforesis menggunakan agarosa 1,5% untuk memberikan hasil seperti pada Gambar 1.

15

Tabel 1. Contoh reaksi dalam identifikasi LAMP

No	Komponen	Volume (μ l)
1	Primer F3_2	0,2
2	Primer B3_2	0,2
3	Primer FIP_2	1,6
4	Primer BIP_2	1,6
5	Campuran reaksi LAMP	5
6	Template larutan DNA/Kontrol positif	1
7	Air bebas nuklease	0,4
	Total	10

Dalam mekanisme patogenesis AHPND, gen pirA dan pirB bekerja secara sinergis untuk menghasilkan toksin dua-komponen (binary toxin) yang menyerang jaringan hepatopankreas udang. Gen pirA berperan sebagai bagian yang membantu toksin menempel dan menembus membran sel target, memungkinkan toksin masuk ke dalam sel. Gen pirB merupakan bagian toksin yang bersifat

20



aktif dan bertanggung jawab atas kerusakan sel secara langsung.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada kemungkinan bahwa LAMP PCR dapat mendeteksi keberadaan AHPND. Gambar 1 menunjukkan bahwa sampel udang yang terjangkit AHPND (ditunjukkan oleh pita 2), memberikan pita spesifik hasil LAMP yang sesuai dengan kontrol positif (ditunjukkan oleh pita 4).

10

15

20

25

30

**Klaim**

1. Suatu kit pendeteksi AHPND secara cepat pada udang berbasis isothermal dengan target gen *pirA* dan *pirB* yang berisi:

a. campuran primer dengan urutan:

F3_2: GTTAAATTCCGTCAAAGATGAC, yang merupakan urutan yang berasal dari gen *pirB*;

B3_2: CAATACCAATGGGGTGCG, yang merupakan urutan yang berasal dari gen *pirA*;

FIP_2: GCTAGTCGTGGTTTCTGTACAATCTTACAACGTATTCGTTAGTCAT, yang merupakan urutan yang berasal dari gen *pirA*;

BIP_2: ACGCTGATGATAGAATGCATTATCATGGAAAGTGGCTAAATCACA yang merupakan urutan yang berasal dari gen *pirA*;

b. campuran reaksi LAMP yang mengandung Bst DNA polimerase, *Deoxynucleotide Triphosphate*, larutan penyangga;

c. air bebas nuklease;

d. kontrol positif adalah plasmid rekombinan gen *pirA* dan *pirB*.



Abstrak

**KIT UNTUK DETEKSI CEPAT ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS
DISEASE (AHPND) PADA UDANG SECARA ISOTERMAL DENGAN GEN TARGET**

PirA DAN PirB

5

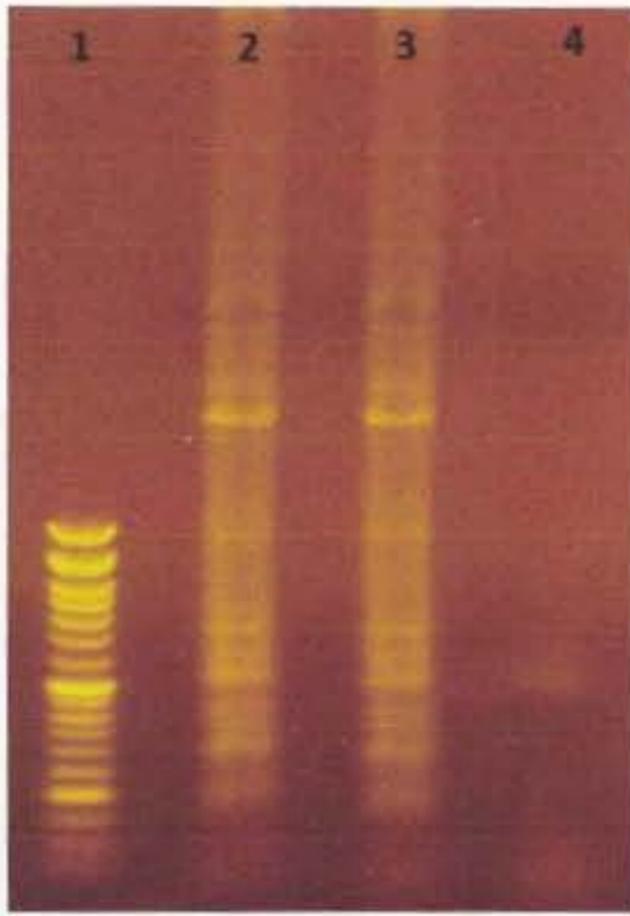
Invensi ini berhubungan dengan suatu kit untuk mendeteksi
Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) secara cepat
pada udang dengan metode *loop-mediated isothermal amplification*
10 (LAMP). Kit ini terdiri dari campuran primer yang didesain
khusus untuk mendeteksi AHPND, campuran reaksi LAMP yang
mengandung *Bst* DNA polimerase, *Deoxynucleotide Triphosphate*,
dan larutan penyangga; air bebas nuklease; kontrol positif
adalah plasmid rekombinan *pirA* dan *pirB*. Deteksi AHPND
15 menggunakan kit ini mempunyai keunggulan pengerjaan lebih
singkat dan sederhana dibandingkan metode diagnostik lainnya.

20

25

30

Mr



Gambar 1.

Ar