

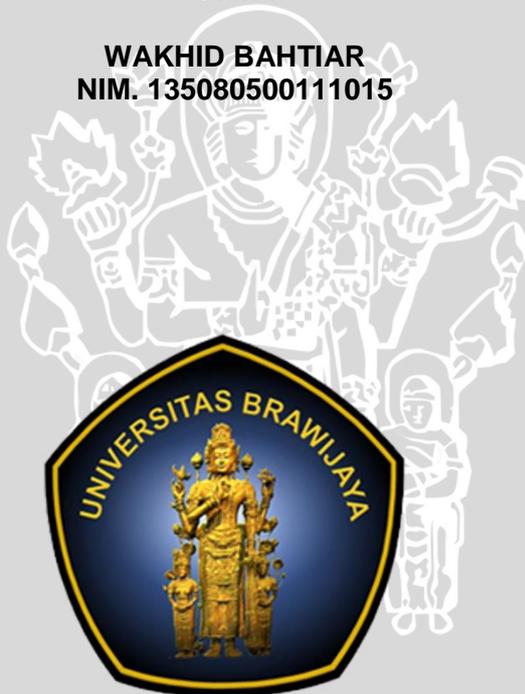
repository.ub.ac.id

PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus*
UNTUK DETEKSI PENYAKIT PADA UDANG VANNAME (*Litopenaeus*
vannam)

LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Oleh :

WAKHID BAHTIAR
NIM. 135080500111015



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

**PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus*
UNTUK DETEKSI PENYAKIT PADA UDANG VANNAME (*Litopenaeus
vannam*)**

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Oleh :

**WAKHID BAHTIAR
NIM. 135080500111015**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017**

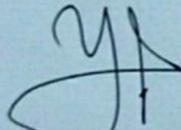
LAPORAN SKRIPSI

PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus*
UNTUK DETEKSI PENYAKIT PADA UDANG VANNAME (*Litopenaeus*
vannamei)

Oleh:
WAKHID BAHTIAR
NIM. 135080500111015

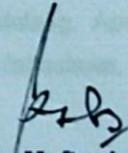
telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 18 April 2017
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji I



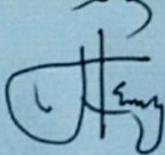
(Dr. Yunita Maimunah, S.Pi., M.Sc)
NIP. 19780625 200501 2 002
Tanggal: 21 APR 2017

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I



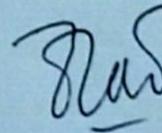
(Dr. Ir. Maftuch, M.Si)
NIP. 19660825 199203 1 001
Tanggal: 21 APR 2017

Dosen Penguji II



(Ir. Heny Suprastyani, MS)
NIP. 19620904 198701 2 001
Tanggal: 21 APR 2017

Dosen Pembimbing II



(Dr. Ir. M. Fadjjar, M.Sc)
NIP. 19621014 198701 1 001
Tanggal: 21 APR 2017



Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Arning Wrujeng Ekawati, MS)
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal: 21 APR 2017

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, April 2017

Mahasiswa,

Wakhid Bahtiar



UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini banyak yang memberikan dukungan serta motivasi. Penulis mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Maftuch selaku dosen pembimbing I dan bapak M. Fadjar selaku dosen pembimbing II yang telah membimbing, memberikan saran, arahan serta nasihat bagi penulis.
2. Ibu Yunita Maemunah selaku dosen penguji I dan Ibu Heny Suprastyani selaku dosen penguji II.
3. Bapak Yayan Sofyan selaku Kepala Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan yang telah mengizinkan saya melakukan penelitian di loka tersebut.
4. Bapak Yan Evan selaku pembimbing skripsi dan rekan-rekan pegawai (LP2IL) serang yang sudah membantu suksesnya penelitian ini.
5. Kedua orang tua saya yang selalu memberikan doa, dukungan serta motivasi kepada saya.
6. Teman-teman *AquaGT*'13 yang telah memberikan motivasi, semangat serta dukungan.
7. Teman-teman kontrakan (Gigih, Arif, Febri, Hernawan, Angga) yang telah memberikan semangat, kelucuan-kelucuan serta doa.

Malang, April 2017

Penulis

RINGKASAN

Wakhid Bahtiar. Pembuatan Antibodi Poliklonal Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* untuk Deteksi Penyakit pada Udang Vanname (*Litopenaeus vannamei*) (dibawah bimbingan **Dr. Ir. Maftuch, M.Si** dan **Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc**).

Udang merupakan komoditas terbesar di Indonesia terutama udang vanname (*L. vannamei*). Produksi udang tiap tahunnya mengalami peningkatan. Hal tersebut terbukti pada tahun 2014 tercatat produksi udang mencapai 623.000 ton. Seiring dengan peningkatan tersebut, maka penyakit pada udang juga mengalami peningkatan serta mengalami perubahan. Penyakit yang menyerang udang banyak diakibatkan oleh bakteri jenis *Vibrio*. Deteksi penyakit yang dilakukan saat ini masih menggunakan metode konvensional dimana membutuhkan waktu yang cukup lama. Dalam hal ini perlu dikembangkan metode yang dapat mempersingkat serta lebih efisien dalam hal deteksi penyakit udang yang diakibatkan oleh bakteri *Vibrio* salah satunya dengan metode serologi dengan memanfaatkan antibodi poliklonal. Antibodi tersebut didapatkan dari hasil imunisasi hewan uji.

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mendapatkan serum antibodi serta mengetahui kemampuan serum tersebut dalam mendeteksi penyakit pada udang vaname yang diakibatkan oleh bakteri *Vibrio*.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan (LP2IL) Serang, Banten pada bulan Maret - April 2017.

Metode yang digunakan pada penelitian ini yaitu menggunakan metode deskriptif dimana metode ini dilakukan dengan membandingkan literatur, mengamati keadaan yang ada serta dengan melihat fenomena atau gejala-gejala yang sudah ada sebelumnya. Selain itu metode ini juga tidak menggunakan perlakuan atau yang sering disebut metode non-eksperimental.

Hasil penelitian didapatkan hasil bakteri yang akan digunakan sebagai isolat terbukti bakteri *V. parahaemolyticus*. Hal tersebut sesuai dengan identifikasi yang dilakukan menggunakan alat *Automatic Identification System* (Vitek 2 Compact). Serum yang sudah didapatkan dilakukan uji titer antibodi dan didapatkan hasil sebesar 320 dimana hasil tersebut sudah memenuhi syarat uji. Hasil serum tersebut selanjutnya dilakukan tahap uji serologi dengan menggunakan metode dua metode yaitu metode *Agar Gel Precipitation Test* (AGPT) dan metode *Aglutination Slide*. Berdasarkan hasil kedua metode tersebut didapatkan hasil bahwa udang tersebut positif terserang bakteri *V. parahemolyticus* dengan ditunjukkan adanya garis presipitasi pada uji AGPT dan penggumpalan (*Aglutination*) pada uji *Aglutination Slide*.

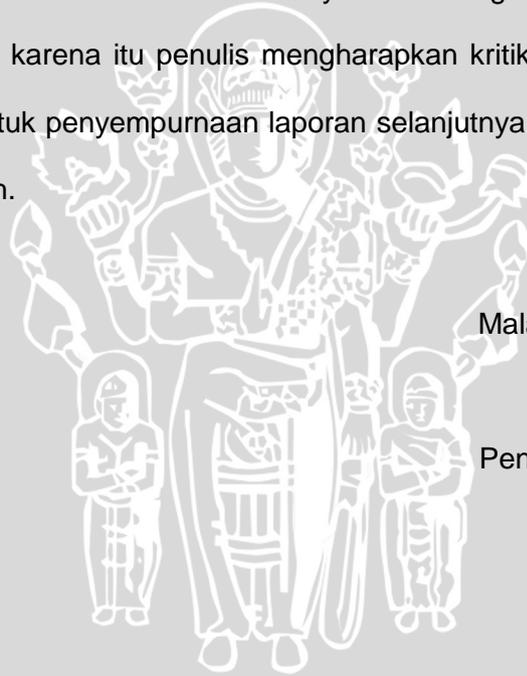
KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji dan syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul “Pembuatan Antibodi Poliklonal Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* untuk Deteksi Penyakit pada Udang Vanname (*Litopenaeus vannamei*)”. Laporan Skripsi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan yang mendasar pada laporan ini. oleh karena itu penulis mengharapkan kritik serta saran yang dapat membangun untuk penyempurnaan laporan selanjutnya. Demikian penulis sampaikan terimakasih.

Malang, April 2017

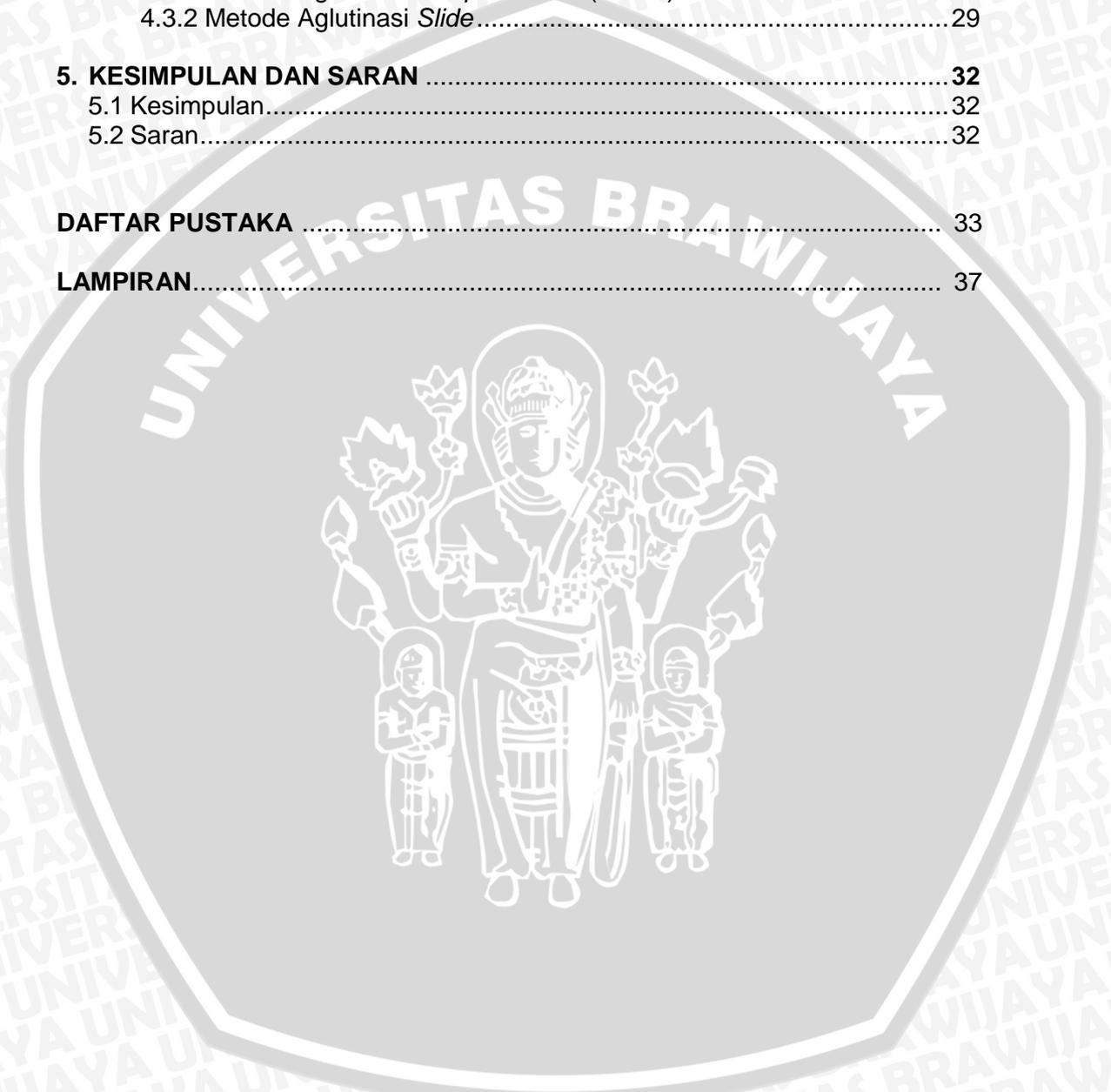
Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
UCAPAN TERIMAKASIH	v
RINGKASAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	4
1.4 Kegunaan	5
1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Biologi Udang Vanname (<i>L. vannamei</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Udang Vanname (<i>L. vannamei</i>)	6
2.1.2 Daur Hidup dan Perkembangbiakan	7
2.1.3 Habitat	8
2.3 Biologi Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	9
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi <i>V. parahaemolyticus</i>	9
2.3.2 Pertumbuhan Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	10
2.3.3 Patogenitas Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	10
2.3.4 Infeksi Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	11
2.4 Antibodi Poliklonal	12
2.5 Antigen	12
2.6 Teknik Serologi	13
3. METODE PENELITIAN	14
3.1 Materi Penelitian	14
3.1.1 Alat	14
3.1.2 Bahan	15
3.2 Media Penelitian	15
3.3 Metode Penelitian	15
3.4 Pengambilan Data	16
3.5 Prosedur Penelitian	16

3.5.1	Sterilisasi dan Persiapan Media	16
3.5.2	Persiapan Pengujian.....	18
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1	Karakteristik Bakteri <i>V. parahamolyticus</i>	23
4.2	Titer Antibodi.....	25
4.3	Uji Serologi.....	27
4.3.1	Metode <i>Agar Gel Presipitasi Test (AGPT)</i>	27
4.3.2	Metode <i>Aglutinasasi Slide</i>	29
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	32
5.1	Kesimpulan.....	32
5.2	Saran.....	32
	DAFTAR PUSTAKA	33
	LAMPIRAN.....	37



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Udang Vanname (<i>L. vannamei</i>)	7
2. Siklus Hidup Udang Panaeid.....	8
3. Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	9
4. Metode Uji Titer Antibodi.....	21
5. Hasil Uji Tes Aglutinasi <i>Slide</i>	22
6. Hasil Uji Titer Antibodi.....	26
7. Hasil Uji AGPT Pada <i>Slide</i>	28
8. Hasil Uji Aglutinasi <i>Slide</i>	30



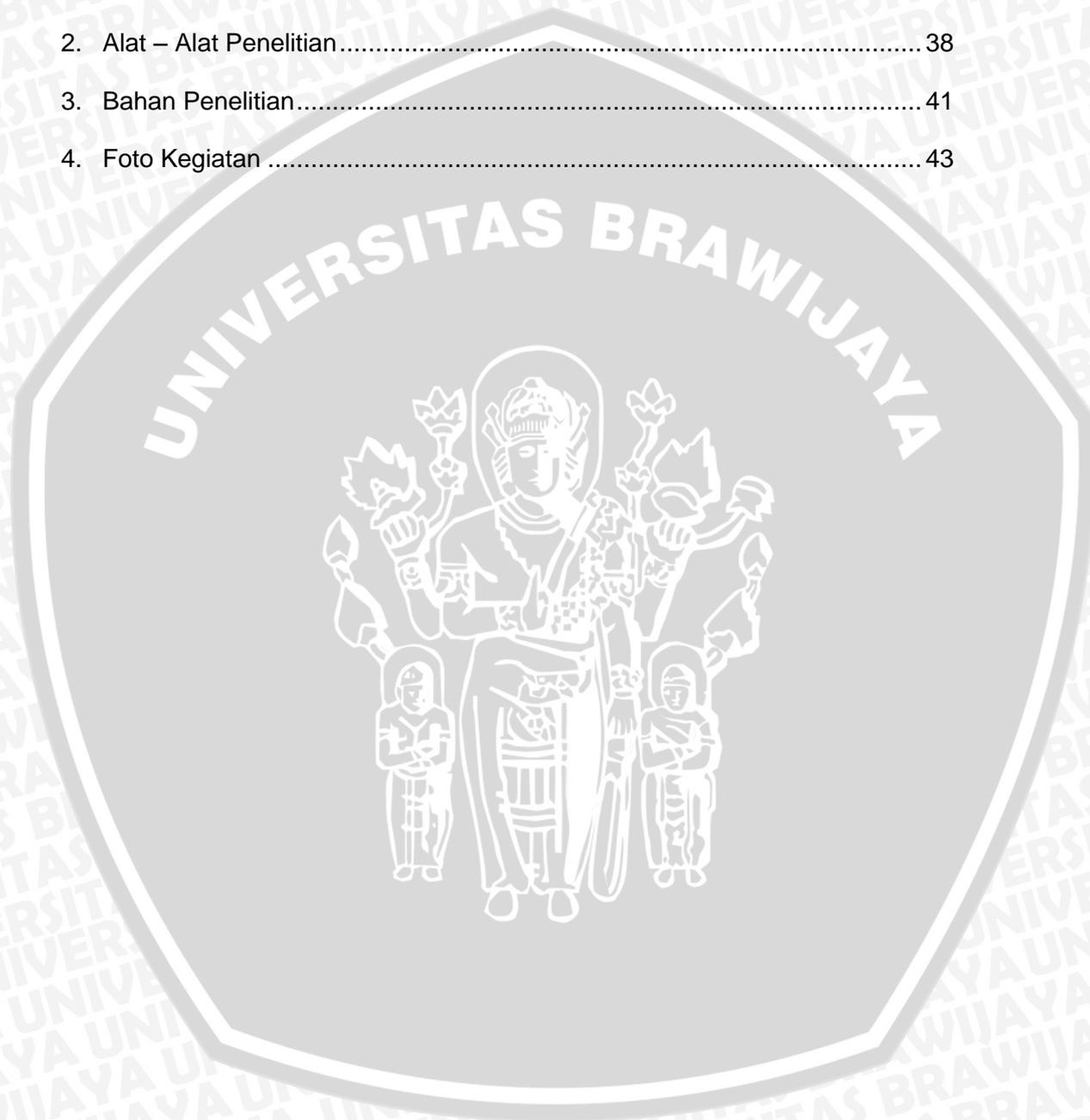
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	23
2. Hasil Uji Titer Antibodi.....	26



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Identifikasi Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	37
2. Alat – Alat Penelitian.....	38
3. Bahan Penelitian.....	41
4. Foto Kegiatan	43



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang vaname (*L. vannamei*) merupakan spesies introduksi yang saat ini telah banyak dibudidayakan di Indonesia. Udang putih yang dikenal masyarakat dengan nama vaname ini merupakan udang asli perairan Amerika Latin yang masuk ke dalam famili *Penaidae*. Udang ini dianggap mampu menggantikan udang windu yang mengalami penurunan produksi pada tahun 1992 karena adanya faktor alami berupa perubahan lingkungan. Penurunan produksi udang windu berbanding terbalik dengan tuntutan kebutuhan akan udang baik di pasar lokal maupun internasional sebagai bahan pangan yang terus meningkat. Untuk memenuhi permintaan tersebut maka pada tahun 2001 Indonesia sebagai salah satu Negara produsen udang mulai membudidayakan udang vaname. Produksi udang Indonesia pada tahun 2014 mencapai 623.000 ton dan kemungkinan bertambah menjadi 680 ribu ton untuk total produksi 2014 karena Indonesia menempati peringkat ke dua di pasar udang AS setelah India berdasarkan data yang dilansir *NOAA Fisheries* (Anam, Khumaidi dan Muqsith, 2016)

Produksi perikanan di tahun 2015 jika dibandingkan dengan produksi perikanan tahun 2014 terjadi kenaikan sebesar 13%, apabila dibandingkan dengan target produksi sampai akhir RPJMN tahun 2019 sebesar 39,97 juta ton, capaian saat ini sudah mencapai 60,02%. Produksi perikanan tahun 2015 sebesar 23,99 juta ton terdiri dari produksi perikanan budidaya sebesar 17,47 juta ton (72,82%) dan produksi perikanan tangkap sebesar 6,52 juta ton (27,18%). Selama kurun waktu 4 tahun yaitu pada tahun 2011-2015 produksi perikanan budidaya memperlihatkan tren yang positif dengan kenaikan rata-rata sebesar 22,17%. Sementara kenaikan produksi dari tahun 2014 ke tahun 2015 sebesar 21,64 % bila dibandingkan dengan produksi tahun 2015 maka baru

mencapai 55,77% dari target 2019. Produksi sementara perikanan budidaya tahun 2015 masih didominasi oleh rumput laut sebesar 11,68 juta ton atau mencapai 66,87% dari total produksi perikanan budidaya, sedangkan ikan mencapai 28,95% dan udang sebesar 4,18% dari total produksi (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2016).

Menurut Kharisma dan Manan (2012), permintaan udang vannamei sangat besar baik pasar lokal maupun internasional, karena memiliki keunggulan nilai gizi yang sangat tinggi serta memiliki nilai ekonomis yang cukup tinggi menyebabkan pesatnya budidaya udang vannamei. Hal tersebut menyebabkan kemungkinan serangan penyakit pada udang vannamei sangat besar. Penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri, virus, dan jamur dapat terjadi apabila terjadi ketidakseimbangan antara *Host*, *Pathogen Agent*, dan *Environment*.

Penyakit yang timbul pada usaha budidaya udang terjadi pada usaha-usaha pembenihan maupun pada tambak-tambak pembesaran. Serangan penyakit bakterial yang paling serius dan sering menyebabkan kematian massal pada larva udang adalah serangan bakteri *Vibrio*. Oleh karena itu kehadiran bakteri *Vibrio* merupakan kendala dalam penyediaan benih udang yang sehat dalam jumlah besar (Prajitno, 2007).

Vibrio merupakan bakteri akuatik yang dapat ditemukan di sungai, muara sungai, kolam, dan laut. Salah satu jenis bakteri dari marga *Vibrio* yang hidup di laut dan merupakan patogen yang berbahaya bagi kesehatan manusia adalah *V. parahaemolyticus*. Bakteri ini adalah jenis bakteri yang hidupnya di laut, memiliki daya tahan terhadap salinitas cukup tinggi. Oleh sebab itu bakteri patogen ini dapat mencemari pangan hasil laut (Widowati, 2008).

Bakteri *V. parahaemolyticus* merupakan bakteri laut asli yang dapat diisolasi dari biota laut, rumput laut, air laut dan air payau. *V. parahaemolyticus* adalah bakteri gram negatif yang dikenal sebagai penyakit yang sangat akut dan

gan (Firdaus, 2013). Mengingat pentingnya tingkat kesehatan udang dalam proses usaha budidaya, maka deteksi dini tentang kondisi kesehatan udang vannamei dan kondisi lingkungan perairan sangat diperlukan (Kharisma dan Manan 2012). Pengembangan metode deteksi cepat, tepat, akurat dan murah sangat bermanfaat karena dapat digunakan dalam upaya pencegahan penyakit vibriosis di lapangan baik di panti benih maupun pada pembesaran udang ditambak. Upaya ini harus dilakukan sebelum koloni bakteri mencapai *quorum*. *Quorum* ialah suatu keadaan dimana populasi bakteri mencapai titik optimum di alam (Kadriah, Susianingsih, Sukenda, Yuhana dan Harris, 2013). Beberapa spesies pathogen *Vibrio* seperti *V. harveyi* dan *V. parahemolyticus* merupakan bakteri yang menginfeksi udang dan pada umumnya dengan pathogen oportunistik yang dapat menyebabkan penyakit pada udang (Yennie, 2011).

Deteksi bakteri *Vibrio* dapat dilakukan dengan membuat antigen yang diisolasi dari bakteri yang menyerang udang tersebut. Evan *et al.* (2014), metode pemeriksaan penyakit ikan bacterial secara konvensional yang ada umumnya telah dilakukan memerlukan waktu yang lama yaitu sekitar 4-5 hari, sehingga perlu adanya inovasi teknik pemeriksaan yang relatif singkat untuk mendiagnosa penyakit ikan yang disebabkan oleh bakteri. Seiring dengan kemajuan teknologi maka salah satu alternatif diagnosis cepat penyakit ikan dapat dilakukan dengan metode serologi. Teknik pemeriksaan dengan metode serologi pada prinsipnya hanya mereaksikan antibodi dengan antigen bakteri yang sesuai sehingga mendapatkan hasil yang akurat.

Pemanfaatan dari metode serologi tersebut akan menghasilkan antibodi poliklonal yang akan disuntikkan ke hewan uji sebagai penghasil serum. Widyasmoro (2007), antibodi poliklonal adalah antibodi yang secara khas dihasilkan dari imunisasi hewan yang sesuai. Antibodi poliklonal dihasilkan dengan cara menyuntikkan antigen ke dalam tubuh hewan lalu memurnikan

antibodi dari serum darah. Teknik serologi ini dapat membantu dalam hal deteksi dini penyakit secara cepat dan akurat sebagai salah satu alternatif yang dapat digunakan oleh pembudidaya.

1.2 Rumusan Masalah

Penyakit pada udang yang disebabkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus* masih menjadi ancaman yang sangat serius bagi para petani udang vanname (*L. vannamei*). Bakteri ini sangat berbahaya karena dapat menyebabkan kematian massal bagi udang serta keracunan bagi manusia. Deteksi penyakit pada udang masih memerlukan waktu yang lama. Oleh karena itu, diperlukan suatu metode baru yang dapat mempercepat pendeteksian agar dapat segera ditangani secara tepat, cepat dan akurat agar tidak menyebar luas. Salah satu metode yang dapat digunakan yaitu dengan memanfaatkan serum antibodi poliklonal dari bakteri *V. parahemolyticus*. Namun dalam proses ini beberapa masih belum mengerti dan paham akan manfaat serum antibodi poliklonal ini sehingga timbul masalah yang mana dirumuskan sebagai berikut:

1. Bagaimana cara mendapatkan serum antibodi poliklonal dari bakteri *V. parahaemolyticus*.
2. Bagaimana kemampuan serum antibodi dalam mendeteksi penyakit akibat bakteri *V. parahaemolyticus*.

1.3 Tujuan

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui cara mendapatkan serum antibodi poliklonal dari bakteri *V. parahaemolyticus*.
2. Untuk mengetahui kemampuan serum antibodi tersebut dalam mendeteksi penyakit yang diakibatkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus*.

1.4 Kegunaan

Dapat membantu para pelaku budidaya udang dalam hal mengatasi permasalahan mendiagnosa penyakit *V. parahaemolyticus* secara cepat dan akurat serta dapat meminimalkan waktu dalam hal mendeteksi penyakit yang diakibatkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus*.

1.5 Tempat, Waktu/ Jadwal Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan (LP2IL), Serang, Provinsi Banten yang dilaksanakan pada tanggal Maret 2017 – April 2017.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Udang Vaname (*L. vannamei*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Udang Vaname (*L. vannamei*)

Menurut Amri dan Kanna (2008), penggolongan udang vaname secara lengkap berdasarkan ilmu taksonomi hewan (sistem pengelompokan hewan berdasarkan bentuk tubuh dan sifat-sifatnya) dipaparkan sebagai berikut :

Filum : Arthropoda

Kelas : Crustacea

Ordo : Decapoda

Famili : Penaidae

Genus : *Litopenaeus*

Spesies : *L. vannamei*



Gambar 1. Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) (Amri dan Kanna, 2008)

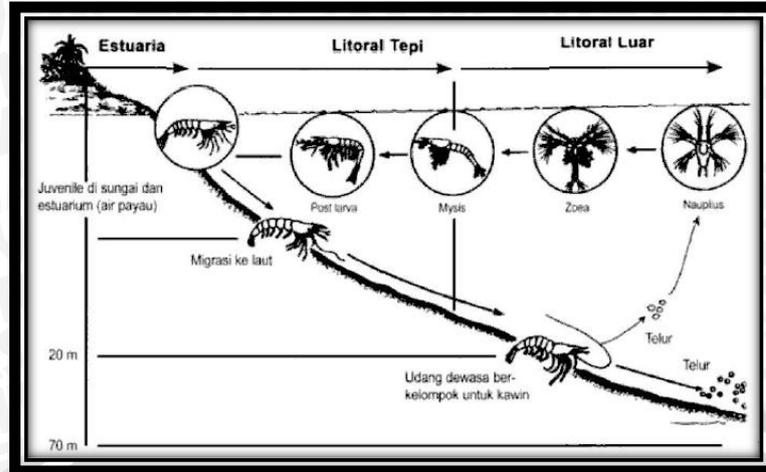
Menurut Suyanto dan Takarina (2009), secara nyata, tubuh udang dapat dibedakan menjadi tiga bagian, yaitu kepala-dada (*cephalothorax*) yang tertutup oleh satu kelopak yang disebut karapas. Karapas mempunyai tonjolan yang meruncing kearah depan yaitu *rostrum* (cucuk). *Rostrum* tampak bergerigi pada tepi-tepinya. Bagian belakang *cephalothorax* terdapat badan (*abdomen*) dan

ekor. Kepala udang vanname terdiri dari lima ruas dan delapan ruas di bagian dada. Masing-masing ruas mempunyai sepasang anggota badan yang memiliki fungsi tersendiri. Seluruh ruas-ruas tersebut tertutup oleh kulit keras tetapi tipis pada setiap sambungannya sehingga memungkinkan udang bergerak lebih sensitif, hal tersebut disajikan pada gambar 1.

Menurut Suyanto dan Mujiman (2003), warna badan putih sampai kuning, terdapat bintik-bintik coklat dan hijau pada ujung ekor. Udang memiliki sungut yang pendek (*antennula*), dimana pada bagian tersebut terdapat belang-belang merah sawo. Kaki jalan dan kaki renang berwarna kekuningan atau kadang-kadang kemerahan. Sungut yang panjang (*antenna*) berwarna kemerahan. Sirip ekor atau kipas (*uropoda*) berwarna merah sawo matang dengan ujungnya kuning kemerah-merahan atau kadang-kadang sedikit kebiru-biruan, kulit tipis dan tembus cahaya.

2.1.2 Daur Hidup

Menurut Suyanto dan Mujiman (2003), udang-udang penaid menjadi dewasa dan bertelur di laut. Setelah telur menetas, keluarlah burayak (larva) tingkat pertama, yang di namakan *nauplius*. Dalam waktu 46-50 jam, *nauplius* berubah menjadi burayak tingkat kedua yang kita namakan *zoea*. Setelah lima hari *zoea* berubah lagi menjadi burayak tingkat ketiga yang di namakan *mysis*. Dalam waktu 4-5 hari *mysis* berubah menjadi burayak tingkat akhir atau *post larva*. Selama hidupnya dari *nauplius* sampai *post larva*, mereka hidup planktonik dalam air mengikuti ombak dan arus. Secara alamiah gerakan-gerakan itu makin lama makin mendekati pantai. Biasanya udang mulai mendarat di pantai setelah menjadi *post larva*. Kehidupan larva udang yang berada di pantai sangatlah rawan dan kritis dikarenakan pada saat larva udang menjadi makanan hewan lain. Daur hidup udang vanname disajikan pada gambar 2.



Gambar 2. Siklus hidup udang Penaeid (Suyanto dan Takarina, 2009)

2.1.3 Habitat

Menurut Rachmansyah, Suwoyo, Undu dan Makmur (2006), diantara berbagai sifat dan tingkah laku udang sangat penting untuk di ketahui yaitu sifat nokturnal, sifat suka memangsa sesama jenis (kanibalisme) dan proses ganti kulit (*moulting*). Sifat nokturnal adalah sifat binatang yang aktif mencari makan pada waktu malam. Udang vanname pada waktu siang lebih suka beristirahat dengan cara membenamkan diri di dalam lumpur maupun menempel pada suatu benda yang terbenam dalam air.

Udang dapat hidup dalam kisaran kadar garam 3% - 45% (pertumbuhan optimal pada salinitas 15% - 30%). Udang aktif pada malam hari, sementara pada siang hari lebih suka membenamkan diri di tempat teduh atau lumpur. Dalam habitatnya, makanan udang bermacam-macam (*omnivorus*), seperti jenis *crustacea* rendah, siput kecil, cacing, larva serangga, maupun sisa-sisa bahan organik, baik tumbuhan maupun hewan. Udang juga bersifat kanibal, yang menjadi sasaran terutama udang yang sedang berganti kulit. Kulit udang tidak elastis dan selalu berganti kulit selama pertumbuhan. Udang yang berganti kulit biasanya berpuasa, tidak banyak bergerak, dan matanya suram karena hormon

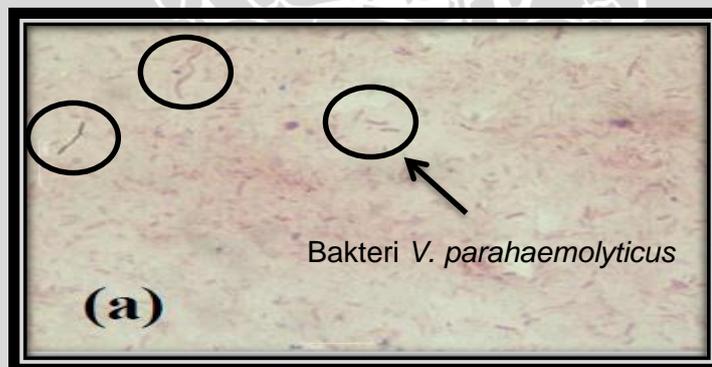
pengatur pergantian kulit yang terdapat pada mata sedang aktif. Frekuensi pergantian kulit tergantung pada jumlah dan kualitas makanan, usia dan kondisi lingkungan (Murtidjo, 2003).

2.2 Biologi Bakteri *V. parahaemolyticus*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi *V. parahaemolyticus*

Menurut Marlina (2004), klasifikasi bakteri *V. parahaemolyticus* sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Vibrionales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Species	: <i>V. parahaemolyticus</i>



Gambar 3. Bakteri *V. parahaemolyticus* (Ajitama, Suryanto dan Djayus, 2014).

Bakteri *V. parahaemolyticus* memiliki diameter 3-5 mm, warna koloni biru kehijauan, pusat koloni berwarna hijau tua, memiliki banyak flagela (Richie, 2005). Bakteri *V. parahaemolyticus* adalah bakteri halofilik, bersifat gram negatif yang terdistribusi di perairan pantai tropis di seluruh dunia dan menyebabkan penyakit *gastroenteritis* pada manusia bila dikonsumsi dalam keadaan mentah

atau kurang matang. Selain itu, bakteri ini juga memiliki panjang basa 1015 pb (Felix, Nugroho, Silalahi dan Octavia, 2011). Hal tersebut disajikan pada Gambar 3.

2.2.2 Pertumbuhan

Menurut Mewengkang (2010), bahwa suhu pertumbuhan *Vibrio* sp. Berkisar antara 5^o-44^oC. Dalam suhu 50^oC bakteri ini tidak dapat tumbuh, berarti *Vibrio* merupakan bakteri yang tidak tahan pada suhu panas. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu 30^oC, salinitas antara 20-30 ppt dengan pH 7,0 dan bersifat anaerobic fakultatif, yaitu dapat hidup dengan oksigen ataupun tanpa adanya oksigen.

Menurut Azyenela dan Marlina (2015), bahwa *V. parahaemolyticus* tumbuh optimum pada kadar NaCl 3%, suhu 35-43 °C, pH 4,8-11, bakteri anaerob fakultatif dan bersifat halofilik. Mudoh, Parveen, Schwarz, Rippen dan Chaudhuri (2014), menyatakan bahwa pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* dipengaruhi oleh suhu dan salinitas. Suhu optimum pertumbuhan bakteri patogen ini terjadi antara 30-35 °C dengan batas atas 45,3 °C. Kadar NaCl berada pada kisaran 2-4%. Bakteri ini juga dapat tumbuh pada rentang pH yang luas (4,8 - 11,0), kisaran optimal adalah pH 7,6 – 8,6. Kisaran Aw (*humidity*) pertumbuhan bakteri ini berturut-turut adalah 0,94-0,99 (optimum 0,981).

2.2.3 Patogenitas Bakteri *V. parahaemolyticus*

Uji patogenitas bakteri *Vibrio* pada benih udang mengakibatkan kematian sebesar 75%, 35% dan 25% pada perendaman 96 jam dengan konsentrasi bakteri masing-masing 10⁶, 10⁴, 10². Hal tersebut berarti bahwa semakin tinggi konsentrasi bakteri yang disuspensikan ke dalam media percobaan maka tingkat mortalitas hewan uji semakin tinggi (Feliatra, Zainuri dan Yoswaty, 2014).

Patogenisitas bakteri terhadap inang berbeda-beda, dipengaruhi oleh faktor pertahanan inang dalam melawan pathogen, maupun faktor patogenitas yang ada pada pathogen, diantaranya kemampuan memproduksi toksin, enzim, mengatasi ketahanan inang, serta kecepatan berkembang biak. Aktivitas haemolysin maupun leukosidin yang dihasilkan oleh *Extracellular Products* (ECPs) bakteri menjadi faktor pertahanan bakteri untuk melawan pertahanan darah inang karena mampu melisis sel darah. Bakteri akan mengikuti aliran darah, menyebar ke seluruh sel tubuh inang maupun menuju organ target (Istiqomah, Isnansetyo, Triyanto, Nitimulyo dan Murdjani, 2006).

2.2.4 Infeksi Bakteri *V. parahaemolyticus*

Udang yang terinfeksi oleh bakteri *V. parahaemolyticus* ditunjukkan dengan tanda-tanda khas *Vibriosis* (kerusakan insang, lesu dan hilangnya nafsu makan), ditambah dengan kematian yang signifikan. Dalam penelitian lain udang vanname (*L. vannamei*) yang telah terinfeksi dengan strain bakteri yang sama dari *V. parahaemolyticus* mengalami tingkat kematian 6%. Dalam hal ini menggunakan dosis infeksi 10^6 CFU/ml. Hal lain juga dilaporkan bahwa infeksi pada larva udang vanname (*L. vannamei*) dengan tingkat dosis *V. parahaemolyticus* (10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/ml) mengakibatkan kematian yang lebih tinggi (Guzman, Martinez, Castaneda, Monzon, Rodriguez, Hernandez, 2010). Yennie (2011), juga mengungkapkan bahwa infeksi *V. parahemolyticus* pada udang terjadi pada fase juvenile sampai dewasa. Penyakit pada udang ini disebut dengan *red disease syndrome* yaitu berubahnya warna tubuh udang menjadi merah dan mengakibatkan kematian. Kematian udang karena penyakit ini berkisar 1-20%.

Udang yang terinfeksi bakteri vibrio biasanya digambarkan sebagai penyakit vibriosis, penyakit bakterial, bakteri *Septicemia* pada udang, vibriosis

luminescent pada udang, penyakit *red leg syndrome*, penyakit kerusakan hepatopankreas akut (AHPND). Penyakit AHPND disebabkan oleh strain bakteri *V. parahaemolyticus* dimana bakteri ini telah mempengaruhi 2 (dua) spesies udang yang dibesarkan di dunia yaitu udang windu (*P. monodon*) dan udang putih (*L. vannamei*). Penyakit ini sering terjadi dalam 30 hari pertama setelah tebar dan dapat menyebabkan kematian massal melebihi 70%. Di Meksiko, AHPND telah mempengaruhi produksi udang putih di Negara Barat Laut. Tanda-tanda klinis dari penyakit AHPND ini termasuk pergerakan lemah, pertumbuhan lambat, pengosongan lambung dan usus, hepatopankreas berhenti berkembang serta berwarna putih pucat (Leon, Gonzalez, Montes, Miranda, Coronado, Ruiz dan Plata, 2016).

2.3 Antibodi Poliklonal

Antibodi adalah molekul protein yang dihasilkan oleh sel plasma sebagai akibat interaksi antara limfosit B peka antigen dan antigen khusus. Tiga macam limfosit yang diketahui secara bersama-sama bertanggung jawab terhadap timbulnya respon imun yaitu sel T *sitotostik*, sel T *helper* dan sel B (Evan *et al.*, 2014).

Antibodi serum adalah antibodi poliklonal, karena antibodi ini dihasilkan oleh turunan dari beberapa sel B yang mengenali epitop berbeda pada antigen yang sama. Antibodi poliklonal dihasilkan dengan cara menyuntikkan antigen ke dalam tubuh hewan lalu memurnikan antibodi dari serum darah. Antibodi ini umumnya bereaksi dengan banyak epitop sehingga kurang spesifik dibandingkan dengan antibodi monoklonal (Widyasmoro, 2007).

2.4 Antigen

Antigen adalah setiap senyawa yang mampu mengimbas tanggap imun bila diinjeksikan dalam hewan berdarah panas. Senyawa yang dapat

merangsang terbentuknya antibodi biasanya merupakan benda asing yang secara genetika tidak dapat disandikan oleh hewan percobaan. Antigen merupakan makromolekul atau partikel yang terdiri atas protein atau polisakarida. Secara umum, bobot molekul (BM) senyawa yang dapat mengimbas reaksi antibodi adalah ≥ 5000 , walaupun ada beberapa molekul yang lebih kecil yang dapat mengimbas terbentuknya antibodi. Keimunogenan antigen tergantung pada sifat fisikokimiawi suatu senyawa, hewan percobaan, dan metode imunisasi yang digunakan (Akin, 2006).

Menurut Hartati (2013) antigen dan antibodi merupakan substansi yang berhubungan, dimana dengan adanya antigen menyebabkan produksi antibodi sehingga dapat menghambat kinerja antigen (benda asing) yang menjadi penyebab suatu penyakit. Antigen akan memacu terjadinya respon imun yang akhirnya dapat meningkatkan produksi antibodi.

2.5 Teknik Serologi

Teknik serologi merupakan salah satu cara deteksi dan identifikasi suatu patogen dalam suatu inang, yang memanfaatkan reaksi spesifik antara antigen dan antiserum (Crowther, 1995). Keberhasilan dan ketelitian teknik serologi untuk mendeteksi dan mengidentifikasi virus sangat tergantung pada ketersediaan pereaksi diagnostik seperti antiserum dengan kualitas yang baik (Temaja, Suastika, Hidayat dan Kartosuwondo, 2010).

Menurut Evan *et al.* (2014), bahwa metode serologi digunakan untuk mendeteksi adanya penyakit melalui tes aglutinasi yaitu reaksi dengan antibodi atau mendeteksi titer antibodi organisme yang terinfeksi penyakit. Tes aglutinasi dapat dilakukan dua cara yakni tes aglutinasi pada gelas objek dan tes aglutinasi dilusi tabung yang biasanya disebut dengan tes widal.

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian tentang pembuatan antibody poliklonal bakteri *V. parahaemolyticus* untuk deteksi penyakit pada udang vaname (*L. vannamei*) antara lain:

- *Horizontal Laminari Air Flow* • *Bluetip*
(HLAF)
- Botol Schot
- *Standar McFarlan*
- *Biosafety Cabinet (BSC)*
- *Sterofoam*
- *Petridish*
- Kandang ukuran 30x30x50
cm
- Jarum Ose
- Karung pakan
- Tabung Reaksi
- Sabit
- Rak Tabung Reaksi
- Kain/lap
- *Refrigerator*
- *Mikrotube*
- *Waterbath*
- *Appendorf*
- Autoklaf
- Bunsen
- Tabung Sentrifuge
- Sprayer
- *Automatic Identification System*
(VITEX 2 Compact)
- *Incubator 30⁰ dan 37⁰ C*
- *Objek Glass*
- Mikropipet

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut:

- Bakteri *V. parahaemolyticus*
- Jarum Suntik
- Kelinci
- Parafilm
- NaCl 0,85%
- Formalin
- Aquades
- Iodine
- Kapas
- Es
- *Trypton Soya Agar* (TSA Laut)
- Tisu
- TCBS Agar
- Agarose
- Plastik
- Na Acid
- Pelet Kelinci
- Alumunium Foil

3.2 Media Penelitian

Media yang digunakan dalam penelitian ini yaitu hewan kelinci yang di suntikkan antigen bakteri *V. parahaemolyticus*. Kelinci tersebut didapatkan dari peternakan kelinci yang kemudian diadaptasikan dalam kandang berukuran 30x30x50 cm sebanyak 5 ekor dengan berat 2,5 kg.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan metode deskriptif. Sangadji dan Sopiah (2010), penelitian ini merupakan metode penelitian yang menjelaskan dan menginterpretasikan obyek penelitian apa adanya, tanpa memberikan perlakuan atau *treatment* dan tanpa memanipulasi variabel penelitian sehingga sering disebut juga penelitian non- eksperimental.

Suryana (2010) juga menambahkan bahwa metode deskriptif (*mendeskripsikan*), yaitu metode yang digunakan untuk mencari unsur-unsur,

ciri-ciri, sifat-sifat suatu fenomena. Metode ini dimulai dengan mengumpulkan data, menganalisis data dan menginterpretasikannya. Metode deskriptif dalam pelaksanaannya dilakukan melalui: teknik survey, studi kasus (bedakan dengan suatu kasus), studi komparatif, studi tentang waktu dan gerak, analisis tingkah laku, dan analisis dokumenter.

3.4 Pengambilan Data

Menurut Sugiyono (2014), terdapat dua hal utama yang mempengaruhi kualitas data hasil penelitian salah satunya adalah kualitas pengambilan data. Kualitas pengambilan data berkenaan dengan ketepatan cara-cara yang digunakan untuk mengumpulkan data. Pengumpulan data dapat dilakukan dalam berbagai sumber yaitu dapat menggunakan sumber primer dan sumber sekunder.

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu penyelidik mengadakan pengamatan terhadap gejala-gejala subjek yang diselidiki baik secara langsung dalam situasi yang sebenarnya maupun dalam situasi buatan atau alat yang sudah ada maupun yang dibuat untuk keperluan khusus (Surachmad, 1998).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi dan Persiapan Media

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan pada penelitian ini harus dalam keadaan steril dari berbagai jenis mikroorganisme baik jamur maupun bakteri. Proses menghilangkan atau memusnahkan mikroorganisme pada alat dan bahan dilakukan dengan cara sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit dengan metode sterilisasi basah. Adapun alat yang dilakukan sterilisasi diantaranya *petridish*, tabung *centrifuge*, tabung reaksi, tabung *shot*

dan *bluetip*, sedangkan bahan yang disterilisasi diantaranya media agar TSA, TCBS dan larutan fisiologis (Na-Fis)/Aquadex. Ahmad, Arlianti dan Azmi (2011), bahwa sterilisasi adalah suatu cara untuk membebaskan suatu benda dari jasad hidup, baik terkait dengan wadah atau alat yang digunakan, media bagi jasad mikro, specimen (benda yang menjadi sumber diperolehnya jasad mikro yang dikehendaki), maupun lingkungan/ruang kerja.

b. Persiapan Media

Persiapan media menjadi faktor utama dalam proses penelitian yang berhubungan dengan bakteri terutama media agar. Hal tersebut karena media agar merupakan tempat untuk menumbuhkan bakteri yang akan digunakan untuk penelitian. Adapun media agar yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- Media TSA Laut(*Trypton Soya Agar*)

Media TSA merupakan media umum yang dapat digunakan dalam menumbuhkan bakteri yang akan dilakukan identifikasi maupun media untuk perbanyakan bakteri. Dalam pembuatan media hal yang harus diperhatikan yaitu komposisi dan aturan dalam penimbangan agar tidak terjadi kesalahan dalam pembuatan. Media yang dibuat dalam penelitian ini TSA Laut sebanyak 10 gram dimana media tersebut dicampur dengan NaCl sebanyak 5 gram dan dimasukkan kedalam botol *Schott* yang berisi Aquades 250 ml. Pemberian NaCl pada media tersebut menyesuaikan dengan jenis bakteri yang akan ditumbuhkan, dalam penelitian ini yaitu bakteri *Vibrio*.

- Media TCBS Agar

Media TCBS merupakan media spesifik untuk bakteri jenis *Vibrio*. Dalam hal ini media TCBS tidak dilakukan sterilisasi secara langsung hanya aquades saja yang disterilisasi. Memasukkan media TCBS harus dalam keadaan steril meskipun jarang terjadi kontaminasi pada media tersebut. Media TCBS yang

dibuat dalam penelitian ini sebanyak 100 ml dimana bahan yang dibutuhkan yaitu media agar TCBS sebanyak 8.8 gram. Media tersebut dimasukkan dalam botol *Schott* yang sudah berisi aquades steril dan kemudian dipanaskan sambil diaduk menggunakan *stirrer*.

3.5.2 Persiapan Pengujian

a. Pembuatan Isolat Bakteri *V. parahaemolyticus*

Isolat bakteri *V. parahaemolyticus* berasal dari Lampung. Sebelum digunakan isolat bakteri tersebut dilakukan pengujian dan identifikasi dengan metode konvensional dan metode *Automatic Identification System* (Vitek 2 Compact), hal ini dilakukan untuk mengkonfirmasi kembali bakteri yang berasal dari Lampung tersebut adalah bakteri *V. parahaemolyticus*.

b. Persyaratan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah kelinci lokal dengan bobot minimal 2,5 kg dan dalam kondisi sehat. Sebelum dilakukan pengujian kelinci diadaptasikan selama 1 minggu, hal ini dilakukan untuk mencegah kelinci menjadi stress ketika dilakukan penyuntikan. Selama pemeliharaan, kelinci diberi makan wortel, kangkung dan pakan konsentrat, diharapkan dengan pemberian pakan ini kelinci sehat dan pembentukan antibodi lebih baik. Kelinci diberi pakan 3 kali sehari pada jam 08.00, 12.00 dan 16.00 WIB.

c. Pembuatan Antigen O (AgO)

Bakteri *V. parahaemolyticus* yang sudah dimurnikan dikultur pada media TSA Laut lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 25 °C – 30 °C. Setelah bakteri tumbuh dilakukan pemanenan biomassa bakteri dengan cara genangi cawan TSA Laut yang berisi koloni bakteri dengan larutan fisiologis (0,85% NaCl) lalu dikumpulkan biomassa bakteri menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam tabung *centrifuge*, selanjutnya *centrifuge* dengan kecepatan 3000 RPM

selama 10-15 menit. Buang supernatan yang ada dalam tabung, biomassa/pellet bakteri dicuci dengan larutan fisiologis (0,85% NaCl), aduk perlahan menggunakan kedua tangan hingga homogen, lalu di *centrifuge* lagi selama 15 menit.

Pencucian biomassa bakteri tersebut dilakukan sebanyak 3 kali. Pellet dilarutkan lagi dengan larutan NaCl 0,85% steril secara perlahan-lahan sampai homogen dan jangan ada buih. Suspensi bakteri dimasukkan ke dalam *waterbath* pada suhu 95 °C. Setelah mendidih biarkan selama 2,5 jam. Kemudian didinginkan dalam suhu ruangan. Selanjutnya suspensi bakteri tersebut dilakukan pengujian viabilitas bakteri pada media TSA Laut diinkubasi selama 24 jam, hal ini dilakukan untuk mengetahui bakteri tersebut masih tumbuh atau tidak serta ada tidaknya kontaminasi. Apabila tidak terjadi pertumbuhan bakteri, maka sisa suspensi bakteri yang di dalam tabung tersebut di *centrifuge* kembali 3000 RPM selama 10-15 menit. Buang supernatan lalu pellet bakteri dibuat suspense lagi dengan menggunakan larutan formalin fisiologis 0,3 % dan antigen O (*AgO*) siap digunakan untuk penyuntikan atau dapat disimpan di dalam *refrigerator* sebagai stock.

d. Penyuntikan Hewan Uji dan Pemanenan Serum

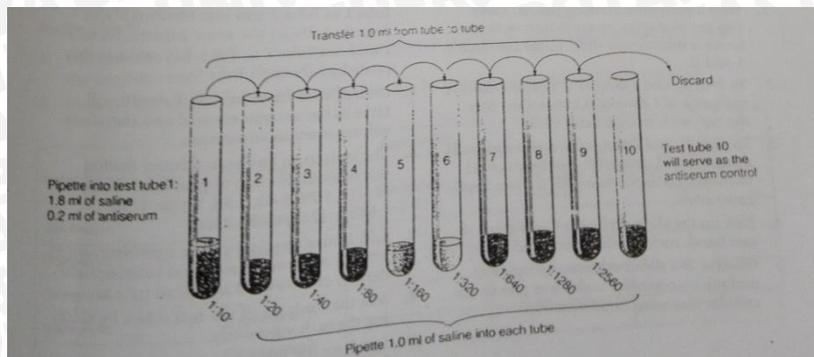
Penyuntikan antigen O (*AgO*) pada kelinci percobaan dilakukan dengan cara membuat konsentrasi sesuai standar *MacFarlan* 6×10^8 /ml antigen O dengan mencampurkan sedikit antigen tersebut kedalam larutan fisiologis sebanyak 10 ml lalu dibandingkan dengan konsentrasi antigen yang telah dibuat dengan standar *MacFarlan* 6×10^8 CFU/ml sehingga konsentrasi antigen yang disuntikkan tepat. Penyuntikan antigen O dilakukan sebanyak 4 kali melalui pembuluh darah vena yang terletak pada telinga kelinci yaitu minggu pertama antigen di suntikkan sebanyak 1 ml, minggu ke dua sebanyak 1 ml, minggu ke ketiga sebanyak 1 ml dan minggu ke empat sebanyak 1 ml. Sehari sebelum minggu kelima, darah

kelinci dipanen menggunakan *sputit* kemudian dibiarkan sampai serum terpisah dari sel darah merahnya, kemudian serum diambil dan dimasukkan ke dalam mikrotube. Serum yang telah dipanen diinaktivasi pada *waterbath* dengan suhu 56 °C selama 30 menit, inaktivasi serum dilakukan agar komplemen dalam serum rusak sehingga tidak akan mengganggu reaksi pada saat digunakan. Tahap terakhir tambahkan pengawet *Sodium Acide* 0,1 % pada serum yang telah diinaktivasi agar serum tersebut awet dan tidak mudah busuk/rusak, kemudian simpan pada suhu 5 °C.

e. Pengujian Titer Antibodi

Pengujian titer antibodi dilakukan dengan cara menyiapkan tabung ukuran 10 cm sebanyak 10 tabung dan disusun pada rak tabung reaksi, kemudian mengisi larutan fisiologis (0,85% NaCl) ke dalam tabung 1 sebanyak 1,8 ml, dan tabung 2-10 diisi larutan fisiologis sebanyak 1 ml. Setelah itu, ditambahkan serum sebanyak 0,2 ml dan dimasukkan secara perlahan-lahan ke dalam tabung 1 yang berisi larutan fisiologis 1,8 ml lalu dihomogenkan dengan menggunakan mikropipet. Kemudian pada tabung pertama diambil larutan sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan pada tabung ke-2 dan dihomogenkan, lalu dilanjutkan dengan cara yang sama sampai pada tabung ke-9. Cairan pada tabung ke 9 yang sudah homogen dikeluarkan sebanyak 1 ml dan dibuang sehingga sampai tabung ke-9 saja yang hanya berisi larutan sebanyak 1 ml. Kemudian tabung ke-10 sebagai kontrol. Setelah itu, ditambahkan antigen dengan konsentrasi 6×10^8 CFU/ml sesuai standard *MacFarlan* sebanyak 1 ml ke semua tabung 1 sampai 10. Goyang atau aduk pelan-pelan sehingga suspensi di dalam tabung reaksi homogen. Selanjutnya, tabung reaksi yang sudah homogen diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah 24 jam, dilakukan pengamatan pada setiap tabung dengan melihat bagian bawah tabung

reaksi. Hasil nilai titer antibodi yang positif ditandai dengan adanya aglutinasi pada dasar tabung. Metode uji titer disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Metode Uji Titer Antibodi (Cappucino, 2005)

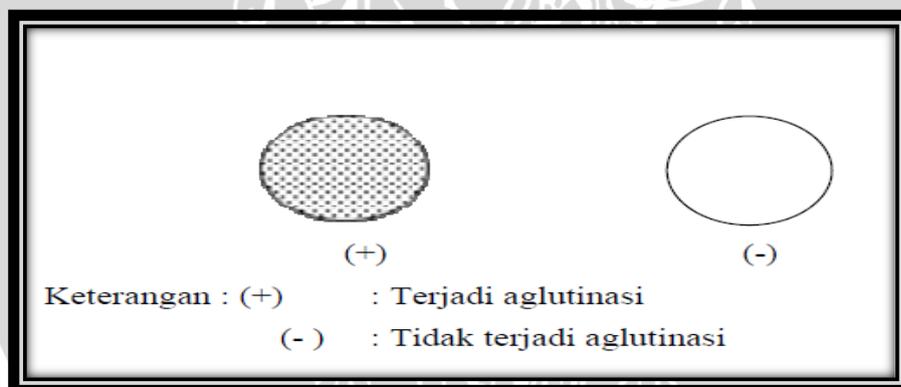
f. **Pemeriksaan Bakteri *V. parahaemolyticus***

- **Metode Agar Gel Presipitation Test (AGPT)**

Pemeriksaan Bakteri *Vibrio* dilakukan dengan cara menyiapkan bahan-bahan seperti 99 ml aquades steril, *Agarose* 1 gram, *Na-Acid* 0.1 gram dan bakteri *V. parahemolyticus*. Wibawan, Darmono dan Suartha (2010), menyatakan bahwa campuran tersebut dimasukkan ke dalam botol *shot* yang tahan panas lalu dipanaskan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit atau penangas air sampai terbentuk larutan jernih. Setelah itu campuran dituangkan ke dalam gelas objek sebanyak 5 ml dengan ketebalan 0,5-1 cm dan ditunggu sampai beku menjadi agar. Setelah menjadi agar dibuat lubang dengan alat *gel puncher*. Lalu dimasukkan 25 µl antigen *V. parahaemolyticus* ke dalam lubang tengah dan serum antibodi bakteri *V. parahaemolyticus* yang diuji ke dalam lubang sisi dengan mikropipet. Kemudian diinkubasi selama 24-48 jam dengan suhu 25-30 °C. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya garis presipitasi diantara sumur antigen dan bakteri *V. parahaemolyticus*.

- **Metode Aglutinasi slide**

Pemeriksaan Bakteri *Vibrio* menggunakan aglutinasi slide, hal yang harus dilakukan yang pertama yaitu menyiapkan alat dan bahan berupa objek glass, pipet tetes, jarum ose, bakteri *V. parahaemolyticus*, aquades dan antigen. Selanjutnya tetesi objek glass dengan aquades sebanyak 1 tetes. Kemudian ambil isolat bakteri pada media petridish menggunakan jarum ose. Larutkan bakteri dan aquades sampai tidak terbentuk gumpalan atau sampai keruh. Setelah tercampur ambil antigen sebanyak 25 μ l, lalu teteskan pada media yang sudah tercampur dengan bakteri. Selanjutnya homogenkan dengan cara di goyang-goyangkan sampai terbentuk butiran-butiran/gumpalan-gumpalan halus pada objek glass tersebut. Apabila terjadi gumpalan maka positif mengandung antibody bakteri *V. parahaemolyticus* (Harti dan Saptorini, 2012). Hasil dianggap positif apabila sesuai dengan hasil yang disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil Uji Tes Aglutinasi *Slide*
(Harti dan Saptorini, 2012).

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakterisasi Bakteri *V. parahaemolyticus*

Udang yang didiagnosa terserang penyakit *V. parahaemolyticus* dilakukan identifikasi. Dalam hal melakukan identifikasi perlu adanya melihat gejala klinis yang ditimbulkan dari udang yang terinfeksi bakteri tersebut. Karakteristik bakteri *V. parahaemolyticus* setelah dilakukan identifikasi disajikan pada Tabel 1. Dimana hasil identifikasi menunjukkan bahwa karakteristik bakteri *V. parahaemolyticus* memiliki warna Gram negatif dengan bentuk batang, motilitas positif, fermentatif, oksidase positif, katalase positif, tumbuh pada media agar NaCl 6% dan memiliki pertumbuhan pada suhu 37°C serta negatif sukrosa dan laktosa. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Alcaide, Amaro, Todoli dan Oltra (1999), bahwa *V. parahaemolyticus* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang, oksidase positif, tumbuh pada media NaCl 3-10%. Bakteri ini juga tidak memfermentasi sukrosa dan laktosa, dapat tumbuh pada suhu 25-40 °C (optimum 37°C). Hal tersebut dikarenakan bakteri ini memiliki sifat halofilik.

Tabel 1. Karakteristik bakteri *V. parahaemolyticus*

Pengujian	Hasil uji
Pewarnaan Gram	Gram Negatif
Bentuk	Batang
Motilitas	Positif
Katalase	Positif
Oksidase	Positif
Glukosa	Positif
Oksidatif/Fermentatif (OF)	Fermentatif
Pertumbuhan suhu	37 °C
Pertumbuhan media agar NaCl 0%	Negatif
Pertumbuhan media agar NaCl 6%	Positif

Identifikasi bakteri *V. parahaemolyticus* ini dilakukan dengan dua metode untuk membandingkan data serta untuk memperoleh data yang valid sehingga didapatkan hasil yang sesuai dengan bakteri yang dimaksud. Teknik identifikasi

tersebut berupa identifikasi secara konvensional dan juga secara modern dengan menggunakan alat *Automatic Identification System (VITEK 2 Compact)*. Berdasarkan kedua teknik tersebut baik konvensional maupun modern didapatkan hasil yang sama yaitu bakteri *V. parahaemolyticus* dengan ditunjukkan hasil yang disajikan pada Lampiran 1.

Perbedaan kedua teknik tersebut terletak pada waktu yang diperlukan untuk penentuan hasil dari bakteri tersebut. Teknik identifikasi menggunakan alat yang modern (*VITEK 2 Compact*) lebih cepat hanya butuh 2-4 jam tergantung jumlah sampel yang dimasukkan kedalam alat tersebut dibandingkan dengan teknik yang konvensional yang memerlukan waktu 1-2 minggu.

Seiring dengan hal tersebut dan perkembangan teknologi, maka banyak balai maupun instalasi penyakit ikan yang menggunakan alat tersebut. Meskipun alat ini canggih hanya beberapa saja yang dipasarkan. Hal tersebut karena selain harganya mahal juga perawatan alat tersebut yang cukup rumit. Alat ini dapat digunakan dalam mengidentifikasi bakteri dan uji kerentanan dari sifat bakteri tersebut. Hal tersebut juga disampaikan oleh Thomas, Tam, Liu dan Cheng (2001), bahwa identifikasi bakteri secara otomatis dan uji kerentanan telah dikembangkan dan dikomersialkan dalam dua dekade. Salah satunya identifikasi secara otomatis ini dapat menggunakan *Vitek 2 (bioMe'rieux)*. Tetapi hanya beberapa yang tersedia dipasar. *Vitek 2 (bioMe'rieux)* merupakan teknologi berbasis *fluoresensi*, dimana dapat digunakan untuk identifikasi dan uji kerentanan pada isolat gram negatif.

Selain itu, dalam menggunakan alat ini terdapat beberapa prosedur yang digunakan untuk mendapatkan hasil yang valid. Alat ini dilengkapi dengan *database* jenis bakteri serta kandungan biokimia yang ada dalam bakteri yang akan diidentifikasi. *Database* tersebut yang akan membantu menganalisa bakteri yang akan diidentifikasi. Hasil yang ditampilkan dalam alat ini cukup lengkap

dengan disertai prosentase hasil bakteri yang teridentifikasi. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Wallet, Louiz, Renaux, Lemaitre dan Courcol (2005), yang menyampaikan bahwa *Vitek 2 system* merupakan alat identifikasi yang menggunakan *card identification*. Misalnya GP (*Gram Positive*) card dan GN (*Gram Negative*) card. Alat ini dilengkapi dengan *database* yang dipergunakan untuk analisis dalam identifikasi bakteri secara otomatis. Hasil dari identifikasi menggunakan vitek ini berupa prosentase kebenaran dari pengujian yang telah dicocokkan pada *database*. Prosedur identifikasi bakteri dengan vitek ini yaitu dengan membuat suspensi menggunakan 0.45% *Sodium Chloride* dan menyesuaikan kekeruhan (*density*) dengan *Mc Farland* yang diukur dengan *densycheck system (bioMerieux)*. Kemudian dipergunakan *card identification* untuk identifikasi bakteri secara otomatis.

4.2 Titer Antibodi

Pengukuran titer antibodi dilakukan untuk mengetahui jumlah antibodi yang terbentuk pada darah kelinci yang telah diinfeksi bakteri in-aktif *V. parahaemolyticus*. Baratawidjaja dan Rengganis (2014) dalam bukunya menyebutkan bahwa titer antibodi adalah pengenceran tertinggi yang menunjukkan aglutinasi atau presipitasi. Penentuan titer antibodi dengan membuat pengenceran serial serum dan selanjutnya ditambahkan sejumlah antigen yang konstan dan campuran larutan tersebut diinkubasikan dan diperiksa untuk aglutinasi/ presipitasinya. Serum dengan kekuatan tertinggi atau tidak diencerkan hanya sedikit atau tidak menunjukkan aglutinasi/ presipitasi. Hal itu disebut fenomena prozon disebabkan oleh antibodi berlebihan.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan 2 kali pengukuran titer antibodi yaitu 2 minggu setelah penyuntikan dan minggu ke empat atau minggu terakhir pasca penyuntikan didapatkan hasil titer antibodi kelinci sebesar 40 pada minggu

ke-2, sedangkan pada minggu ke-4 didapatkan hasil titer antibodi sebesar 320 seperti yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Titer Antibodi

Minggu ke-	Pengenceran ke-									
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	

Data tabel diatas menunjukkan bahwa kelinci yang diinfeksi bakteri *V. parahaemolyticus* in-aktif terjadi respon pembentukan antibodi. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya peningkatan jumlah titer yang terdapat pada antibodi kelinci tersebut seiring dengan bertambahnya bakteri yang disuntikkan. Menurut Coleman (1996), antibodi akan terbentuk lebih banyak apabila ada paparan ulangan. Pembentukan antibodi dipengaruhi beberapa faktor, yaitu: imunogenesitas, kualitas, bentuk kelarutan stimulan, spesies hewan, rute imunisasi, dan sensitivitas assay (Belanti, 1993 dalam Daniarti *et al.*, 2016). Hasil titer antibodi di sajikan pada Gambar 6.



Nilai titer

Gambar 6. Hasil uji titer antibodi

Berdasarkan gambar diatas dapat dianalisa bahwa titer antibodi berhenti pada tabung ke enam dengan ditunjukkan pada tabung tujuh sudah terbentuk

tanda titik (tidak terdapat persebaran). Hal tersebut menunjukkan bahwa jumlah titer antibodi sebesar 320, karena berhenti pada tabung ke enam.

Variasi respon pembentukan antibodi dalam individu dapat disebabkan oleh kesehatan hewan uji serta faktor pakan yang diberikan. Selain itu juga dikarenakan perubahan hormon pada hewan uji yang disebabkan adanya perkawinan dari hewan uji sebelum dilakukan penelitian. Hal tersebut yang dapat menyebabkan adanya perbedaan kinerja makrofag dalam pembentukan antigen. Hal ini membuktikan bahwa makrofag sangat penting, sebab makrofaglah yang menyajikan antigen (*antigen presenting cells*), mengoptimalkan kerja sel limfosit Th dalam menghasilkan sitokin dan kemudian menginduksi sel B menjadi sel plasma yang secara spesifik menghasilkan IgY (Wibawan, Darmono dan Suartha, 2010).

Wibawan dan Soejoedono (2013), menyebutkan dalam penelitiannya bahwa makrofag yang telah memfragmentasi antigen akan mempresentasikan fragmen antigen tersebut kepada sel limfosit T helper (sel Th) melalui molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II yang terletak di permukaan makrofag. Sel Th berinteraksi dengan APC melalui CD4 (*Cluster of Differentiation 4*) dan TCR (*T-cell Receptor*) yang dimiliki oleh sel Th. Setelah itu, akan terjadi aktivasi sel Th, sel Th berproliferasi dan mengeluarkan sitokin (interleukin-1/IL-1) yang akan mengaktifasi sel B yang menjadi sel plasma yang siap memproduksi antibodi spesifik terhadap antigen tersebut.

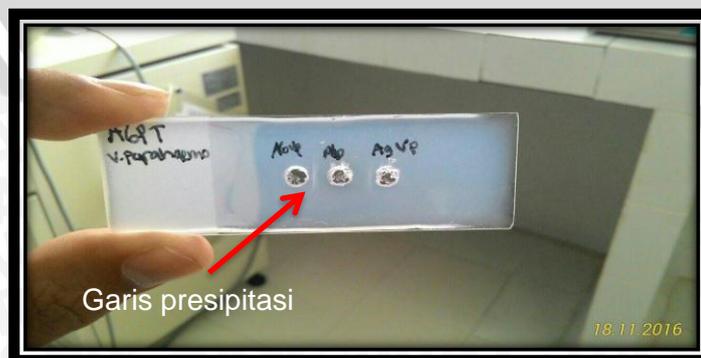
Lama penyimpanan serum juga akan mempengaruhi kualitas dari serum tersebut. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kualitas serum diantaranya yaitu suhu, sel hidup dalam serum tersebut serta lamanya waktu penyimpanan. Menurut Hartini dan Suryani (2016), menyatakan bahwa ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi stabilitas spesimen seperti kontaminan oleh kuman dan bahan kimia, terkena paparan sinar matahari,

pengaruh suhu dan metabolisme dari sel-sel hidup. Terdapat beberapa cara penyimpanan dalam bentuk serum pada suhu 2 - 8 °C stabilitas serum akan bertahan selama 5-7 hari. Penyimpanan serum dengan sel darah dapat mempengaruhi hasil karena dengan adanya sel darah yang mengalami hemolysis selama penyimpanan yang terlalu lama akan mengakibatkan kontaminasi pada serum sehingga mempengaruhi dalam pembacaan hasil.

4.3 Uji Tes Serologi

4.3.1 Metode *Agar Gel Presipitasi Test (AGPT)*

Hasil pengamatan pada minggu ke 4, dimana setelah dilakukan pengujian titer antibodi dilakukan pengujian lanjutan melalui tes serologi AGPT (*Agar Gel Presipitation Test*) untuk mengetahui serum antibodi yang dihasilkan dapat mendeteksi penyakit pada udang vanname (*L. vannamei*) yang diakibatkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus*. Pengamatan hasil uji AGPT dapat diperoleh setelah 24 jam masa inkubasi. Hasil tersebut dapat ditunjukkan dengan adanya garis presipitasi yang muncul pada slide gel. Tahap metode AGPT ini dilakukan uji *gel presipitasi* dengan melakukan perbedaan antar lubang. Lubang pertama tidak diberi antigen dari bakteri *V. parahemolyticus* (kontrol) dan pada lubang yang ke dua diberi antigen bakteri uji yang sama dengan bakteri yang disuntikkan ke hewan uji. Lubang yang berada ditengah di tetesi antibodi yang sudah dibuat sebelumnya. Hasil tersebut disajikan pada Gambar 7.



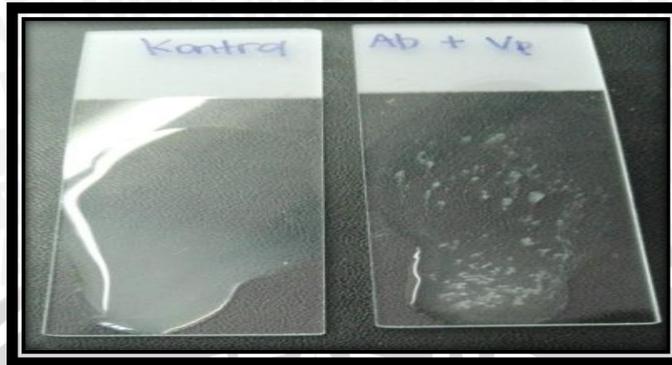
Gambar 7. Hasil uji AGPT pada slide.

Berdasarkan gambar diatas menunjukkan bahwa hasil uji agar presipitasi didapatkan hasil dengan adanya garis presipitasi pada lubang yang diberi antigen bakteri dengan antibodi. Hasil pada lubang kontrol tidak muncul garis presipitasi. Garis presipitat yang terbentuk pada slide tersebut adalah bentuk dari netralisasi antigen dengan antibodi. Hal tersebut dapat disimpulkan bahwa hasil dari antibodi yang terbentuk dapat bereaksi dengan antigen yang sama atau satu epitope. Hal tersebut juga disampaikan oleh Wibawan dan Soejoedono (2013), bahwa netralisasi antigen oleh antibodi akan terjadi jika antigen bisa dikenal oleh antibodi. Bagian antigen yang dikenal atau yang bereaksi dengan antibodi disebut *epitope* (epitop) atau *antigenic determinant*, sedangkan bagian bagian antibodi yang dapat mengenal antigen disebut *paratope* (paratop) atau antigen *binding site*.

4.3.2 Metode Aglutinasi Slide

Penelitian ini, juga dilakukan uji serologi lain yaitu aglutinasi *slide* untuk membandingkan hasil yang sudah didapat pada uji sebelumnya. Metode Aglutinasi *slide* ini dilakukan dengan mencampurkan bakteri *V. parahaemolyticus* hidup yang dilarutkan pada larutan Na-Fis kemudian di tetesi serum yang sudah dibuat. Pembuktian tersebut dilakukan untuk memperjelas dan memperkuat akan hasil serum bakteri yang didapatkan dari hasil penyuntikan. Capuccino (2005), menyatakan dalam penelitiaannya bahwa dalam prosedur aglutinasi slide antigen dicampur slide dengan serum antibodi. Penggumpalan sel merupakan indikasi adanya antibodi homolog dalam serum, tidak adanya antibodi homolog diindikasikan ketika tidak ada penggumpalan terlihat. Selain itu, prosedur ini juga dirancang untuk menggambarkan reaksi aglutinasi seperti tes antibodi demam untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang tidak diketahui melalui serotip. Metode ini digunakan karena waktu yang dibutuhkan hanya beberapa menit saja,

sehingga metode ini sangat efektif dibandingkan dengan metode sebelumnya yang membutuhkan waktu cukup lama. Hasil tersebut disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Hasil Reaksi Aglutinasi dengan Bakteri *V. parahaemolyticus* dan Kontrol.

Berdasarkan hasil pada gambar 8. dapat dianalisa bahwa terjadi aglutinasi (penggumpalan) yang ditunjukkan dengan adanya butiran-butiran pada slide yang ditetesi antibodi dan bakteri *V. parahaemolyticus* (Vp) sel utuh (*Whole cells*). Hal tersebut menunjukkan bahwa epitope pada bakteri tersebut sama antara antibodi yang terbentuk dengan antigen dari bakteri yang diuji. Selain itu, pengujian antibodi tersebut juga dilakukan dengan *Genus* bakteri yang sama dan tidak terjadi aglutinasi (penggumpalan) meskipun menggunakan bakteri yang sama *Genus*. Pengujian yang lain juga dilakukan terhadap bakteri yang berbeda dan hasilnya tidak terjadi aglutinasi pula. Hal tersebut dikarenakan, tidak adanya epitope yang sama antara antigen yang dibuat dengan bakteri yang direaksikan meskipun sama *Genus* yaitu *Vibrio*. Hal tersebut juga disampaikan oleh Baratawidjaja dan Rengganis (2014), bahwa antigen adalah bahan yang dapat diikat secara spesifik oleh molekul antibodi atau molekul reseptor pada sel T. Antibodi dapat mengenal hampir setiap molekul biologi sebagai antigen. Pengenalan antigen oleh antibodi melibatkan ikatan nonkovalen dan *reversible*. Berbagai jenis interaksi nonkovalen dapat berperan pada ikatan antigen seperti faktor elektrostatis, ikatan hydrogen, interaksi hidrofobik dan lainnya. Kekuatan

ikatan antara satu antibodi dan epitope disebut afinitas antibodi. Kekuatan ikatan antibodi dengan epitope antigen keseluruhan disebut afiditas.

Tes uji aglutinasi dapat terjadi kesalahan sehingga tidak muncul aglutinasi (penggumpalan) pada uji serologi. Hal tersebut dapat terjadi akibat berbagai faktor salah satunya kadar antibodi atau antigen yang sangat tinggi. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Baratawidjaja (2002), bahwa pada umumnya aglutinasi tidak terjadi bila kadar antibodi atau antigen sangat tinggi. Tabung reaksi dengan kadar antibodi atau antigen tinggi yang tidak menunjukkan aglutinasi merupakan suatu efek prozon. Disini kadar antibodi atau antigen berlebihan sehingga perbandingan antigen-antibodi tidak seimbang.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan dapat di simpulkan diantaranya:

- Serum bakteri *V. parahaemolyticus* didapatkan dari inokulasi bakteri yang menyerang udang vanname (*L. vannamei*), lalu dijadikan vaksin in-aktif dengan cara pemanasan untuk mendapatkan antigen O (AgO). Darah kelinci yang sudah tercampur vaksin di sentrifuge untuk diambil serum antigennya. Hasil titer antibodi sebesar 320.
- Serum bakteri *V. parahaemolyticus* yang dibuat mampu mendeteksi penyakit yang menyerang udang vanname (*L. vannamei*) yang diakibatkan bakteri *V. parahemolyticus*. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya garis presipitasi pada uji AGPT dan adanya aglutinasi (penggumpalan) pada uji Aglutinasi slide yang telah dilakukan.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dalam penelitian ini antara lain:

- Perlu dilakukan uji residu pada hewan uji yang disuntik vaksin inaktif bakteri *V. parahaemolyticus* yang mengandung formalin untuk penyimpanannya.
- Perlu dilakukan penelitian lanjutan terutama uji serologi pada bakteri yang sama dengan perbedaan tempat pemeliharaan udang disetiap tambak di berbagai daerah.
- Perlu dilakukan uji sensitivitas terhadap antibodi yang sudah dibuat.
- Perlu dilakukan uji kualitas serum terkait pengaruh lama penyimpanan pada suhu rendah

DAFTAR PUSTAKA

- Ajitama, P., D. Suryanto dan Y. Djayus. 2014. Jenis-jenis bakteri gram negatif potensial pathogen pada ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus tauvina*) di Keramba Jaring Apung perairan Belawan. *Aquacoastmarine*. **5** (4): 132-146.
- Akin, H. M. 2006. Virologi Tumbuhan. Kanisius. Yogyakarta. 118 hlm.
- Alcaide, E., C. Amaro, R. Todoli dan R. Oltra. 1999. Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing infection in Iberian toothcrap *Aphanius iberus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. **35** : 77-80.
- Amri, K dan Kanna, I. 2008. Budidaya Udang Vanname Secara Intensif, Semi Intensif, dan Tradisional. PT Gramedia Pustaka Utama . Jakarta. 161 hlm.
- Anam, C., A. Khumaidi dan A. Muqaith. 2016. Manajemen produksi Naupli Udang Vaname (*Liptopanaeus vannamei*) di Instalasi Pembenihan Udang (IPU) Gelung Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo Jawa Timur. *Ilmu Perikanan*. **7** (2): 57-65.
- Azyenela, L dan Marlina. 2015. Deteksi gen virulen bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dari sampel Pensi (*Corbicula moltkiana*. Prime) dengan metoda *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Scientia*. **5** (1): 42-46.
- Ahmad, Mugiono, T. Arlianti dan C.Azmi. 2011. Panduan Lengkap Jamur. Penebar Swadaya. Jakarta. 252 hlm.
- Baratawidjaja, K. G. 2002. Imunologi Dasar Edisi kelima. FKUI. Jakarta. 450 hlm.
- Baratawidjaja, K. G dan Rengganis, I. 2014. Imunologi Dasar Edisi ke Sebelas. FKUI. Jakarta. 859 hlm.
- Cappuccino, JG dan Sherman, N. 2005. Microbiology A Laboratory Manual 7th Edition. Benjamin Cummings Publishing. San Fransisco (USA). hlm 74.
- Coleman, P. G dan C. Dye. 1996. Immunization coverage required to prevent outbreaks of dog rabies. *Vaccine*. **14**: 185-186.
- Crowter J. R. 1995. *ELISA: Theory and Practice*. Humana Press Inc. New Jersey . 220 hlm.
- Daniarti., Darmawi., Erina., M. Dewi, Fakhurrrazi., M. Abrar., Safika dan M. Daud. 2016. Produksi antibodi terhadap *Salmonella* sp. isolat lokal asal Ayam Kampung pada Kelinci. *Ilmiah Peternakan*. **4** (1): 25-28.
- Evan, Y., Suherman., S. Amanu., S. D. Soraya., Dinarti dan M. A. Hakim. 2014. Pembuatan antibodi poliklonal untuk pemeriksaan bakteri *Aeromonas hydrophilla* pada ikan dengan metode serologi. *Prosiding Penemuan Ahli Kesehatan Ikan*. 121-129 hlm.

- Feliatra, Zainuri dan Yoswaty, D. 2014. Pathogenitas Bakteri *Vibrio* sp. terhadap Udang Windu (*Panaeus monodon*). *Sungkai*. **2** (1): 23-36.
- Felix, F., T. T. Nugroho., S. Silalahi dan Y. Octavia. 2011. Skrining bakteri *Vibrio* sp. asli Indonesia sebagai penyebab penyakit udang berbasis teknik 16S Ribosomal DNA. *Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. **3** (2): 85-99.
- Firdaus, R. 2013. Antagonisme Bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. terhadap Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pathogen pada Udang Windu (*Panaeus monodon* FAB). *Dimensi*. **2** (2): 1-14.
- Guzman, G. A., J. G. S. Martinez, R. P. Castaneda, A. P. Monzon, T. T. Rodriguez and N. I. D. L. C. Hernandez. 2010. Pathogenity and infection route of *V. parahaemolyticus* in American White Shrimp, *L. vannamei*. *World Aquaculture Society*. **41** (3): 464-470.
- Hartati, A. S. 2013. *Imunologi Dasar dan Imunologi Klinis*. Graha Ilmu. Yogyakarta. 98 hlm.
- Harti, A. S dan Saptorini. 2012. Pemeriksaan widal slide untuk diagnosa demam Tifoid. *KESMADASKA*. **3** (2): 1-7.
- Hartini, S dan Suryani, M. E. 2016. Uji kualitas serum simpanan terhadap kadar Kolesterol dalam darah di poltekkes kemenkes Kaltim. *Ilmiah Manuntung*. **2** (1): 65-69.
- Istiqomah, I., A. Isnansetyo., Triyanto., K. H. Nitimulyo dan M. Murdjani. 2006. Patogenitas *Vibrio fluvialis* 248 K terhadap Kerapu Tikus (*Cromileptes altivalis*). *Perikanan*. **VIII** (1):17-24.
- Kadriah, I. A. K., E. Susianingsih, Sukenda, M. Yuhana dan E. Harris. 2013. Desain primer spesifik untuk deteksi dini penyakit *Vibriosis* pada Udang *Penaeid*. *Riset Akuakultur*. **8** (1): 131-143.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2016. Laporan kinerja direktorat jenderal perikanan budidaya tahun 2015. Jakarta. 69 hlm.
- Kharisma, A dan Manan, A. 2012. Kelimpahan bakteri *Vibrio* sp. pada air pembesaran Udang Vanname (*Litopenaeus vannamei*) sebagai deteksi dini serangan penyakit *Vibriosis*. *Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **4** (2):129-134.
- Leon, P. L., A. L. Gonzalez, R. E. Montes, M. D. C. F. Miranda, J. A. F. Coronado, P. A. Ruiz dan G. D. Plata. 2016. Isolation and characterization of infectious *V. parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aqua Res*. **44** (3): 470-479.
- Marlina. 2004. Karakteristik molekuler bakteri *V. parahaemolyticus* dari sampel air laut dan uji resistensi antibiotiknya. *Skripsi*. Fakultas MIPA Universitas Andalas. 78 hlm.

- Mewengkang, H. W. 2010. Identifikasi *Vibrio sp.* pada gonad ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis* L). *Perikanan dan Kelautan*. **VI** (1): 18-21.
- Mudoh, M. F., S. Parveen, J. Schwarz, T. Rippen dan A. Chaudhuri. 2014. The effect of storage temperature on the growth of *Vibrio parahaemolyticus* and organoleptic properties in *Oysters*. *Original Research Article*. **2** (45): 1-7.
- Murtidjo, B. A. 2003. Benih Udang Windu Skala Kecil. Kanisius. Yogyakarta. 78 hlm.
- Prajitno, A. 2007. Uji sensitivitas Flavonoid Rumput Laut *Eucheuma cottonii* sebagai bioaktif alami terhadap Bakteri *Vibrio harveyi*. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. *Jurnal Protein*. III.
- Rachmansyah., Suwoyo HS, Undu MC, Makmur. 2006. Pendugaan nutrient Budget tambak intensif udang *Litopenaeus vannamei*. *Riset Akuakultur*. **1** (2): 181 -202.
- Richie, J. P. 2005. Analisis bakteri *Vibrio* pada Udang Windu (*Penaeus monodon*) tambak di Bengkalis Propinsi Riau. *Skripsi*. Faperikan UNRI. Pekanbaru.
- Sangadji, E. M dan Sopiah. 2010. Metode Penelitian: Pendekatan Praktis Dalam Penelitian. Andi. Yogyakarta. 306 hlm.
- Sugiyono. 2014. Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R & D. Alfabet. Bandung. 334 hlm.
- Surachmad, W. 1998. Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar. Tarsito. Bandung. 118 hlm.
- Suryana. 2010. Metode Penelitian Model Praktis Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif. Buku Ajar Perkuliahan. Universitas Pendidikan Indonesia: Bandung. 245 hlm.
- Suyanto dan Mujiman. 2003. Budidaya Udang Windu. Penebar Swadaya. Jakarta. 198 hlm.
- Suyanto, S. R dan E. P. Takarina. 2009. Panduan Budidaya Udang Windu. Penebar Swadaya. Jakarta. 185 hlm.
- Temaja, I. G. R. M., G. Suastika., S. H. Hidayat dan U. Kartosuwondo. 2010. Produksi antiserum dan kajian serologi *Crhysanthemum B Carlavirus* (CVB). *HPT Tropika*. **10** (1): 80-88.
- Thomas, K. W. L., P.C.Tam, Z. K. Liu and A.F.B.Cheng. 2001. Evaluation of VITEK 2 Rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*. **39** (8) : 2964-2966.
- Wallet, F., C. Louiz, E. Renaux, N. Lemaitre and R.J. Courcol. 2005. Performances of VITEK 2 colorimetric cards for Identification of gram-

positive and gram-negative bacteria. *Journal of clinical microbiology*. **43** (9) : 4402-4406.

Wibawan, I. W. T., I. B. P. Darmono dan I. N. Suartha. 2010. Variasi respon pembentukan IgY terhadap Toxoid Tetanus dalam serum dan kuning telur pada individu Ayam petelur. *Veteriner*. **11** (3): 152-157.

Wibawan, I. W. T dan Soejoedono, R. D. 2013. Intisari Imunologi Medis. FKH IPB. Bandung. 155 hlm.

Widowati, R. 2008. Keberadaan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pada udang yang dijual di rumah makan kawasan Pantai Pangandaran. *VIS VITALIS*. **01** (1):9-14.

Widyasmoro, K. 2007. Produksi antibodi poliklonal anti H5N1 pada Marmot (*Cavia porcellus*) yang divaksinasi dengan vaksin Avian Influenza H5N1 dan H5N2. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan IPB. 1-48.

Yennie, Y. 2011. Isolasi dan identifikasi *Vibrio parahaemolyticus* patogenik pada Udang tambak. *Tesis*. Sekolah PascaSarjana IPB. 1-103 hlm.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Identifikasi Bakteri *V. parahaemolyticus*

LABORATORIUM MIKROBIOLOGI LP2IL SERANG

bioMerieux Customer:
System #: 7875

Laboratory Report

Printed Jul 22, 2016 17:35 ICT
Autoprint

Isolate Group: Vp_lampung-1

Card Type: GN Testing Instrument: 0000144FE24A (7875)

Bionumber: 5425611140501262
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 241351810	Expires: Aug 1, 2016 12:00 ICT
	Completed: Jul 22, 2016 17:56 ICT	Status: Final	Analysis Time: 7.00 hours
Selected Organism	97% Probability <i>Vibrio parahaemolyticus</i>		Bionumber: 5425611140501262
SRF Organism			Confidence: Excellent identification
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> dCEL(78),			

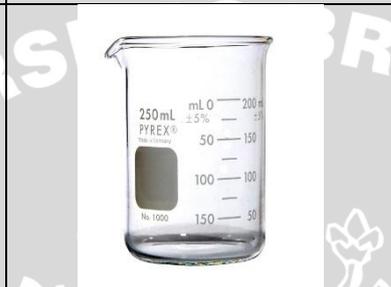
Biochemical Details																	
2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	+	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	(-)
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHI Sa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	+	61	IMLTa	+	62	ELLM	-	64	ILATa	+			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

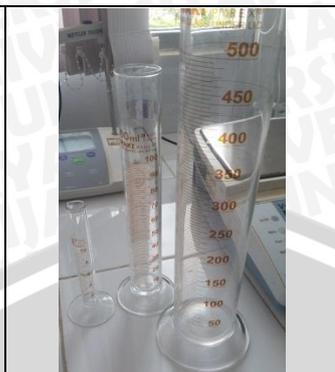
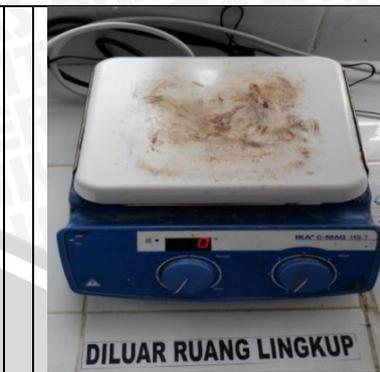
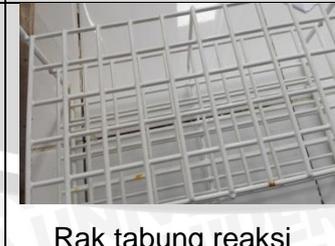
Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:



Lampiran 2. Alat - Alat Penelitian

		
<p>Bunsen</p>	<p>Nampan</p>	<p>BSC</p>
		
<p>Obyek glass</p>	<p>Beaker glass</p>	<p>Kulkas</p>
		
<p>Sprayer</p>	<p>Cawan Petri</p>	<p>Mikropipet</p>
		
<p>Timbangan digital</p>	<p>Autoklaf</p>	<p>Waterbath</p>

Lampiran 2. (Lanjutan)

		
<p>Horizontal Laminary Air Flow</p>	<p>Gelas Ukur</p>	<p>Hot Plate</p>
		
<p>Show case</p>	<p>Tabung reaksi</p>	<p>Jarum Ose</p>
		
<p>Incubator</p>	<p>Mikroskop</p>	<p>Desikator</p>
		
<p>Refrigerator</p>	<p>Rak tabung reaksi</p>	<p>Tabung sentrifuge</p>

Lampiran 2. (Lanjutan)



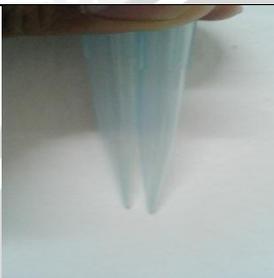
Mikropipet besar



Oven



Botol scoot



Bluetip



White tip



Centrifuge



Kandang

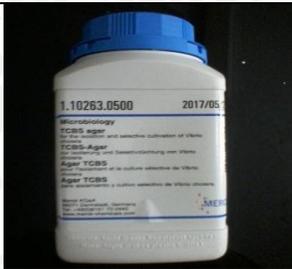


Larutan standar
McFarland

Lampiran 3. Bahan Penelitian

 <p>Iodine</p>	 <p>Aquades</p>	 <p>Blood Agar</p>
 <p>kelinci</p>	 <p>Tisu</p>	 <p>KOH 3%</p>
 <p>Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i></p>	 <p>Minyak emersi</p>	 <p>Tisu lensa</p>
 <p>Glove</p>	 <p>Masker</p>	 <p>Kapas</p>

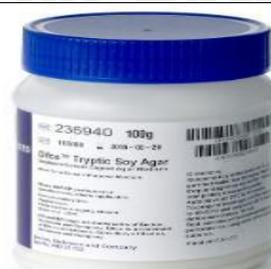
Lampiran 3. (Lanjutan)



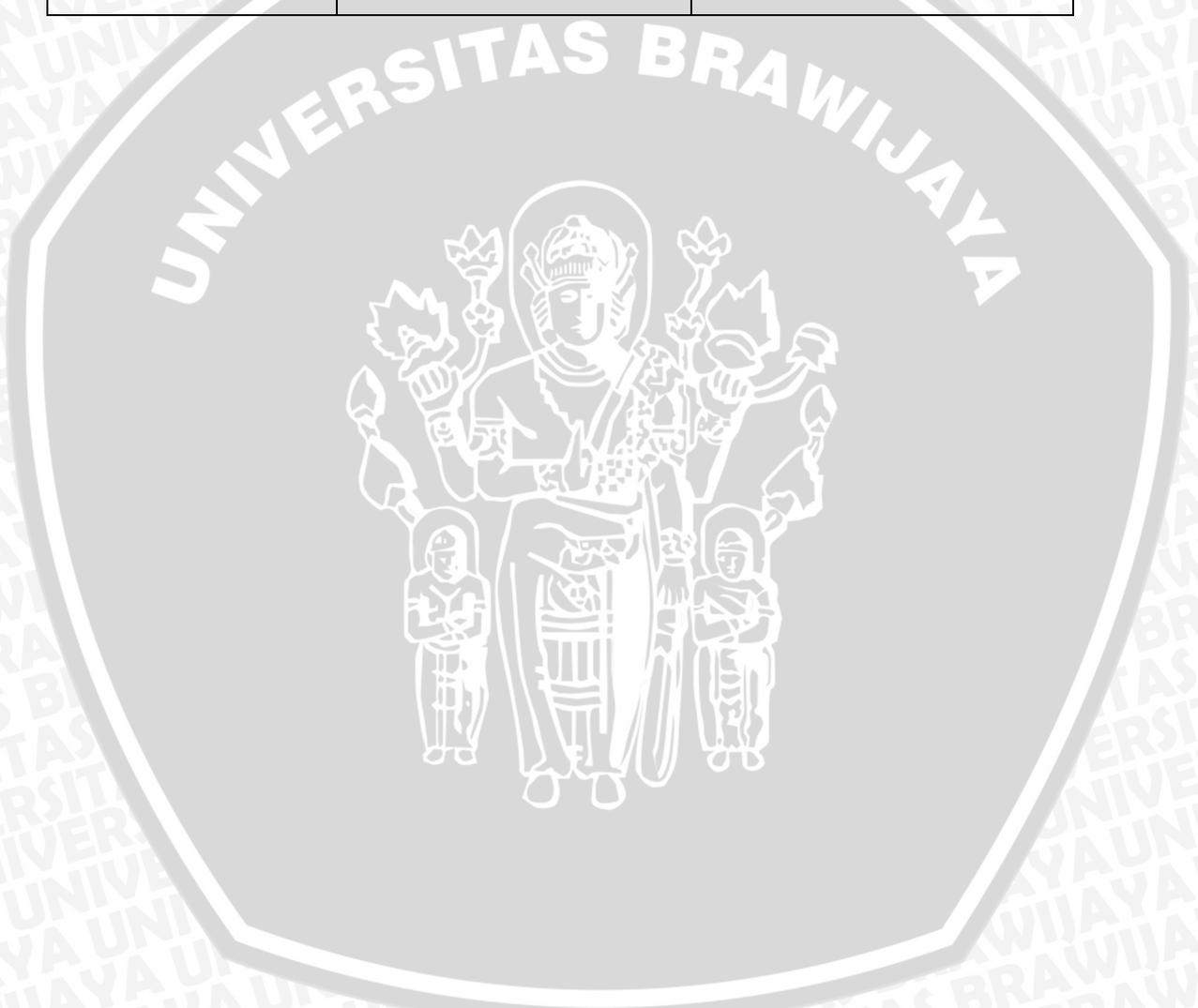
TCBS Agar



Pelet kelinci



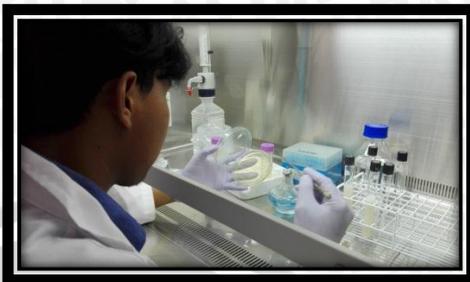
Media TSA



Lampiran 4. Foto Kegiatan



Pemanenan bakteri



Uji viabilitas



Penyuntikan



Pengambilan darah



Pemanenan serum



Pemberian pakan kelinci