

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

ARTIKEL SKRIPSI
BUDIDAYA PERAIRAN

Oleh:
WAKHID BAHTIAR
NIM. 135080500111015



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017

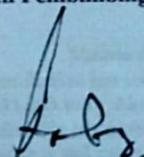
PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus* UNTUK
DETEKSI PENYAKIT PADA UDANG VANNAME (*Litopenaeus vannamei*)

Artikel Skripsi sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Perikanan pada
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya

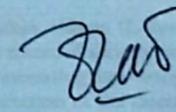
Oleh:

WAKHID BAHTIAR
NIM. 135080500111015

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I


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

Dosen Pembimbing II


Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc
NIP: 19611106 198602 2 001
Tanggal : 21 APR 2017

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP



Dr. Ir. Anung Wilujeng Ekawati, MS
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal : 21 APR 2017

PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL BAKTERI *V. parahaemolyticus* UNTUK DETEKSI PENYAKIT PADA UDANG VANNAME (*L. vannamei*)

Wakhid Bahtiar¹⁾, Maftuch²⁾, M. Fadjar³⁾,

Abstrak

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. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui cara mendapatkan serum antibodi dan kemampuan serum antibodi dalam mendeteksi penyakit akibat *V. parahaemolyticus*. Metode yang digunakan adalah metode deskriptif tanpa ada perlakuan. Hasil penelitian didapatkan bahwa hasil bakteri yang akan digunakan sebagai isolat terbukti bakteri *V. parahaemolyticus*. Hal tersebut sesuai dengan identifikasi yang dilakukan menggunakan *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 Aglutinasi *Slide*. Berdasarkan hasil kedua metode tersebut didapatkan hasil bahwa udang tersebut positif terserang bakteri *V. parahaemolyticus* dengan ditunjukkan adanya garis presipitasi pada uji AGPT dan penggumpalan (Aglutinasi) pada uji Aglutinasi *Slide*.

Kata kunci: *L. vannamei*, *V. parahaemolyticus*, antibody poliklonal, uji serologi

PRODUCTION OF POLICLONAL ANTIBODIES FOR THE DETECTION OF BACTERIA *V. parahaemolyticus* WHITE SHRIMP DISEASE (*L. vannamei*)

Wakhid Bahtiar ¹⁾, Maftuch ²⁾, M.Fadjar ³⁾

Abstract

Shrimp is the largest commodity in Indonesia especially white shrimp (*L. vannamei*). Shrimp production has increased each year. This is evident in the year 2014 recorded shrimp production reach 623,000 tons. Along with this increase, the shrimp disease is also increasing and changing. A disease affecting many shrimp caused by the bacterium *Vibrio* species. Detection of the disease that is done today is still using the conventional method which requires quite a long time. In this case the need to develop a method that can shorten and more efficient in terms of detection of shrimp disease caused by the bacteria *Vibrio* one with serological methods by utilizing polyclonal antibodies. The antibodies obtained from the immunization of test animals. This research aims to find out how to get the serum antibody and the ability of serum antibodies in detecting disease caused by *V. parahaemolyticus*. The method used is descriptive method without any treatment. The results showed that the results of the bacteria to be used as evident bacterial isolates *V. parahaemolyticus*. This is in accordance with the identification by using *Automatic Identification System* (Vitek 2 Compact). Serum which have been obtained to test the antibody titers and the results obtained at 320 where the results are to qualify to test. The results of the serum is then performed serologic testing phase by using two methods of the method *Precipitation Gel Test Agar* (AGPT) and slide agglutination method. Based on those the results of both methods showed that the shrimp positive for the bacteria *V. parahaemolyticus* indicated their precipitation on the test line AGPT and clumping (agglutination) in the slide agglutination test.

Key word: *L. vannamei*, *V. parahaemolyticus*, polyclonal antibodies, serologi test

¹⁾ Student of Fisheries and Marine Science Faculty, University of Brawijaya

^{2,3)} Lecture of Fisheries and Marine Science Faculty, University of Brawijaya

1 Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Udang vaname (*L. vannamei*) merupakan spesies introduksi yang saat ini telah banyak dibudidayakan di Indonesia. Udang ini dianggap mampu menggantikan udang windu yang mengalami penurunan produksi pada tahun 1992 karena adanya faktor alami berupa perubahan lingkungan. Produksi udang Indonesia pada tahun 2014 mencapai 623.000 ton dan kemungkinan bertambah menjadi 680 ribu ton. (Anam *et al.*, 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%. Selama kurun waktu 4 tahun yaitu pada tahun 2011-2015 produksi perikanan budidaya memperlihatkan tren yang positif dengan kenaikan rata-rata sebesar 22,17%. (KKP, 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 vanname.

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* (Prajitno, 2007). Salah satu jenis bakteri dari marga *Vibrio* yang hidup di laut dan merupakan patogen yang berbahaya

bagi kesehatan manusia adalah *V. parahaemolyticus*. *V. parahaemolyticus* adalah bakteri gram negatif yang dikenal sebagai penyakit yang sangat akut dan ganas (Firdaus, 2013).

Oleh karena itu, pengembangan metode deteksi cepat, tepat, akurat dan murah sangat bermanfaat karena dapat digunakan dalam upaya pencegahan penyakit (Kadriah *et al.*, 2013). Seiring dengan kemajuan teknologi maka salah satu alternatif diagnosis cepat penyakit udang dapat dilakukan dengan metode serologi dengan memanfaatkan antibody hewan uji atau yang disebut antibody poliklonal (Evan *et al.*, 2014). 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 (Widyasmoro, 2007).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui cara mendapatkan serum antibodi dan kemampuan serum antibodi tersebut dalam mendeteksi penyakit yang diakibatkan bakteri *V. parahaemolyticus*.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan Serang, Banten pada bulan Maret – April 2017.

2 Metode Penelitian

2.1 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah autoklaf, botol *Schot*, *Biosafety Cabinet* (BSC), bunsen, cawan petri, tabung reaksi, *waterbath*, tabung *Centrifuge*, *Automatic Identification System (VITEK 2 Compact)*, gunting, hotplate, incubator, objek *Glass*, jarum ose, *Horizontal Laminar Air Flow (HLAF)*, *Appendorf*,

mikropipet 100-1000 μ , mikropipet 10-100 μ , nampan, *Bluetip*, rak tabung reaksi, *Rotary Vacuum Evaporator*, *Refrigerator*, *Standard McFarland*, sprayer, kandang kelinci, timbangan analitik, sabit, kain/lap, spatula dan oven.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Bakteri *V. parahaemolyticus*, Aquades, NaCl 0,85%, tisu, Aluminium Foil, Alkohol 70%, Kapas, kertas label, Kelinci, jarum suntik, parafilm, formalin, *Iodine*, es, plastik, pelet kelinci, *agarose*, *Na Acid*, *TSA (Tryptone Soy Agar)*, *TCBSA (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar)*, Kertas Koran, Tali Kasur, Spirtus.

2.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah 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.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Persiapan Penelitian

A. Sterilisasi dan Persiapan Media

Tahap pertama yang harus dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan sterilisasi yaitu memusnahkan atau menghilangkan mikroorganisme pada alat maupun bahan yang akan digunakan. Tahap selanjutnya mempersiapkan media tumbuh bagi bakteri yang akan digunakan sebagai bahan uji yaitu *TSA (Tryptone Soy Agar)* Laut sebanyak 10 gram yang dicampur dengan NaCl sebanyak 5 gram dan dilarutkan pada aquades 250 ml, sedangkan *TCBSA (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar)* sebanyak 8,8 gram dilarutkan pada aquades steril sebanyak 100 ml.

B. 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 (Vitex 2 Compact)*, hal ini dilakukan untuk mengkonfirmasi kembali bakteri yang berasal dari Lampung tersebut adalah bakteri *V. parahaemolyticus*.

C. 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.

D. 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 dinginkan dalam suhu ruangan. Selanjutnya suspensi bakteri tersebut dilakukan pengujian viabilitas bakteri pada media TSA Laut inkubasi selama 24 jam, hal ini dilakukan untuk mengetahui bakteri tersebut 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 suspensi lagi dengan menggunakan larutan formalin fisiologis 0,3 % dan antigen O (*AgO*) siap digunakan untuk penyuntikan atau dapat disimpan di dalam *refrigerator* sebagai stock.

E. 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 *sprit* 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 *Natrium Acide* 0,1 % pada serum yang telah diinaktivasi agar serum tersebut awet dan tidak mudah busuk/rusak, kemudian simpan pada suhu 5 °C.

F. 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.

G. 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, *larutan Phenol* 0.1 gram dan bakteri *V. parahaemolyticus*. Wibawan, Darmono dan Suartha (2010), 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 µl, 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 antibodi bakteri *V. parahaemolyticus* (Harti dan Saptorini, 2012).

3 Hasil dan Pembahasan

3.1 Identifikasi 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.

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

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 pada 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.

3.2 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. Hasil tersebut disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Uji Titer Antibodi

Berdasarkan Gambar 1, mengenai hasil titer didapatkan hasil yaitu aglutinasi berhenti pada tabung 6 yang mana ditunjukkan pada tabung 7 tidak terjadi aglutinasi melainkan sudah bentuk titik. Menurut Wibawan *et al.* (2010), bahwa 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.

Pengujian titer antibodi dilakukan sebanyak 2 kali untuk mengetahui jumlah antibodi yang terbentuk setelah dilakukan imunisasi. Penyuntikan antigen tersebut dilakukan pada pembuluh darah vena yang terletak pada telinga hewan uji. Pengambilan darah pertama dilakukan pada minggu ke 2 pasca penyuntikan dan didapatkan hasil titer antibodi sebesar 40. Pengambilan darah kedua dilakukan pada minggu ke 4 dimana pada tiap minggunya dilakukan penyuntikan ulang sebagai *booster* dan didapatkan hasil titer sebesar 320. Hal tersebut membuktikan bahwa dilakukannya penyuntikan ulang tersebut dapat meningkatkan jumlah antibodi pada hewan uji. 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 tersebut disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Titer Antibodi Selama 2 Kali Pengujian.

Minggu ke-	Pengenceran ke- (1:)					
	10	20	40	80	160	320
2	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+

3.3 Uji Tes Serologi

3.3.1 Metode *Agar Gel Presipitation 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 24-48 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. parahaemolyticus* (kontrol) dan pada lubang yang ke dua diberi antigen bakteri uji yang sama dengan bakteri yang disuntikkan terhadap hewan uji. Lubang yang berada ditengah di tetesi antibodi yang sudah dibuat pada tahap sebelumnya. Hasil uji tersebut disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil uji AGPT

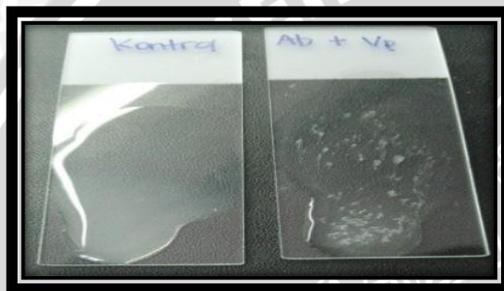
Berdasarkan hasil uji AGPT didapatkan hasil bahwa antara antigen dan antibodi saling bereaksi dengan ditunjukkan adanya garis presipitat pada slide tersebut. Garis presipitasi tersebut adalah suatu bentuk dari netralisasi antara antigen dan antibodi yang satu epitope (sama). Menurut Wibawan dan Soejoedono (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*.

3.3.2 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 penelitiannya 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 uji aglutinasi disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Uji Aglutinasi *Slide*

Berdasarkan hasil uji aglutinasi didapatkan hasil bahwa serum tersebut mampu bereaksi dengan bakteri *V. parahaemolyticus* yang sudah diencerkan dengan larutan fisiologis dengan ditunjukkan adanya butiran-butiran halus seperti pasir. Baratawidjaja dan Renggani (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 elektrostatik, 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.

Aglutinasi pada slide ataupun tabung dapat juga mengalami kegagalan akibat beberapa faktor. Faktor tersebut dapat dipengaruhi oleh jumlah antibodi-antigen tidak sama atau berlebih. Menurut 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. Oleh karenanya, pemberian antigen dan antibodi harus disesuaikan dengan tujuan meminimalisir kegagalan sehingga serum yang terbentuk dapat mendeteksi suatu penyakit yang diakibatkan oleh mikroorganisme yang bersifat pathogen.

4 Kesimpulan dan Saran

4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

- 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 antibody sebesar 320.
- Serum bakteri *V. parahaemolyticus* yang dibuat mampu mendeteksi penyakit yang menyerang udang vanname (*L. vannamei*) yang diakibatkan bakteri *V. parahaemolyticus*. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya garis presipitasi pada uji AGPT dan adanya aglutinasi (penggumpalan) pada uji Aglutinasi slide yang telah dilakukan.

4.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan terutama uji serologi pada bakteri yang sama

dengan perbedaan tempat pemeliharaan udang disetiap tambak di berbagai daerah, perlu dilakukan uji residu terhadap hewan uji serta dilakukan uji sensitivitas dan pengujian pengaruh kualitas serum terhadap lamanya proses penyimpanan.

Daftar Pustaka

- Alcaide, E., C. Amaro, R. Todoli dan R. Oltra. 1999. Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing infection in Iberian toothcrab *Aphanius iberus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. **35** : 77-80.
- Anam, C., A. Khumaidi dan A. Muqaiith. 2016. Manajemen produksi Naupli Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) di Instalasi Pembenuhan Udang (IPU) Gelung Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo Jawa Timur. *Ilmu Perikanan*. **7** (2): 57-65.
- Baratawidjaja, K. G dan Rengganis, I. 2014. Imunologi Dasar Edisi ke Sebelas. FKUI. Jakarta. 859 hlm.
- Baratawidjaja, K. G. 2002. Imunologi Dasar Edisi kelima. FKUI. Jakarta. 450 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.
- 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 Abli Kesehatan Ikan*. 121-129 hlm.
- Firdaus, R. 2013. Antagonisme Bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. terhadap Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pathogen pada Udang Windu (*Penaeus monodon* FAB). *Dimensi*. **2** (2): 1-14.
- Harti, A. S dan Saptorini. 2012. Pemeriksaan widal slide untuk diagnosa demam Tifoid. *KESMADASKA*. **3** (2): 1-7.
- 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.
- Prajitno, A. 2007. Uji sensitifitas flavonoid rumput laut (*Euchemna cottoni*) sebagai bioaktif alami terhadap bakteri *Vibrio harveyi*. *Jurnal Protein*. **15**(2): 66-71.
- Sangadji, E. M dan Sopiiah. 2010. Metode Penelitian: Pendekatan Praktis Dalam Penelitian. Andi. Yogyakarta. 306 hlm.

Wibawan, I. W. T dan Soejoedono, R. D. 2013.

Intisari Imunologi Medis. FKH IPB.
Bandung. 155 hlm.

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.

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.

