

**UJI KINERJA ANTIBODI POLIKLONAL DENGAN
VARIASI ANTIGEN *Aeromonas hydrophila***

Skripsi

Oleh

**Zakia Ayu Lutfiyah Seniman
2014111028**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

UJI KINERJA ANTIBODI POLIKLONAL DENGAN VARIASI ANTIGEN *Aeromonas hydrophila*

Oleh

Zakia Ayu Lutfiyah Seniman

Aeromonas hydrophila merupakan salah satu bakteri yang menginfeksi ikan air tawar dengan penyebaran yang cepat pada padat tebar yang tinggi. Deteksi cepat seperti metode serologi tes menggunakan antibodi poliklonal dibutuhkan untuk mencegah terjadinya penyebaran penyakit. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kemampuan antibodi poliklonal dalam mendeteksi beberapa antigen *Aeromonas hydrophila*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL) Serang pada November 2023 sampai dengan Mei 2024. Metode penelitian dilakukan dengan mengidentifikasi sampel ATCC 7966, I/454, I/685 dan I/560 secara biokimia dan *polymerase chain reaction* (PCR), dilanjutkan dengan membuat antigen, penyuntikan dan pemanenan serum hewan uji, pengujian titer antibodi dan uji kinerja antibodi poliklonal. Hasil penelitian ini menyatakan setiap antibodi poliklonal yang digunakan memiliki performa baik dalam mendeteksi antigen target dengan nilai sensitivitas, spesifisitas serta akurasi mencapai 100% dan nilai *false positive rate* (FPR) dan *false negative rate* (FNR) sebesar 0%. Nilai batas deteksi pada sampel dengan kode I/685 masih terdeteksi hingga pengenceran 10^5 sel/mL dan menunjukkan nilai positif pada semua antigen dalam uji reaksi silang. Karena hasil penelitian dapat dijadikan dasar yang kuat, maka disarankan untuk diaplikasikan menjadi bahan yang efektif dalam kegiatan diagnostik *Aeromonas hydrophila*.

Kata kunci: *Aeromonas hydrophila*, antibodi poliklonal, antigen, uji kinerja, uji reaksi silang

ABSTRACT

POLYCLONAL ANTIBODY DETECTION PERFORMANCE WITH VARIATIONS OF *Aeromonas hydrophila* ANTIGEN

by

Zakia Ayu Lutfiyah Seniman

Aeromonas hydrophila is one of the bacteria that infect freshwater fish with rapid spread at high stocking densities. Rapid detection such as serological tests using polyclonal antibodies is needed to prevent the spread of disease. This research aimed to evaluate the ability of polyclonal antibodies in detecting several *Aeromonas hydrophila* antigens. The research was conducted at the Microbiology Laboratory, Fish and Environmental Health Testing Center (BPKIL) Serang from November 2023 to May 2024. The research method was carried out by identifying ATCC 7966, I/454, I/685 and I/560 samples biochemically and *polymerase chain reaction* (PCR), followed by making antigens, injecting and harvesting test animal serum, testing antibody titers and testing the performance of polyclonal antibodies. The results of this study state that each polyclonal antibody used has good performance in detecting target antigens with sensitivity, specificity and accuracy values reaching 100% and *false positive rate* (FPR) and *false negative rate* (FNR) values of 0%. The detection limit value in the sample with code I/685 was still detected up to a dilution of 10^5 cells/mL and showed positive values on all antigens in the cross-reaction test. Because the results of the study can be used as a strong basis, it is recommended to be applied to be an effective material in *Aeromonas hydrophila* diagnostic activities.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, polyclonal antibody, antigen, performance test, cross-reaction test

**UJI KINERJA ANTIBODI POLIKLONAL DENGAN
VARIASI ANTIGEN *Aeromonas hydrophila***

Oleh

Zakia Ayu Lutfiyah Seniman

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA PERIKANAN**

Pada

**Jurusan Perikanan dan Kelautan
Fakultas Pertanian**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

Judul Skripsi

: **UJI KINERJA ANTIBODI POLIKLONAL
DENGAN VARIASI ANTIGEN *Aeromonas
hydrophila***

Nama Mahasiswa

: **Zakia Ayu Tufiyah Seniman**

Nomor Pokok Mahasiswa : 2014111028

Program Studi

: **Budidaya Perairan**

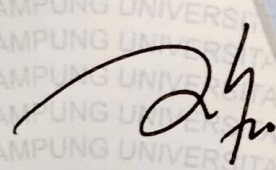
Jurusan

: **Perikanan dan Kelautan**

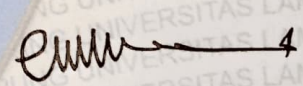
Fakultas

: **Pertanian**



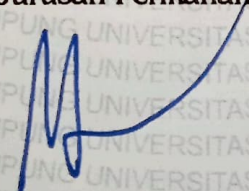

Ir. Siti Hudaidah, M.Sc.

NIP 19640215 199603 2 001


Yan Evan, S.Pl., M.Si.

NIP 19870525 201012 1 002

2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan


Munti Sarida, S.Pl., M.Sc., Ph.D.

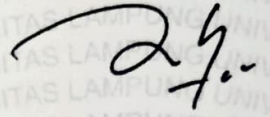
NIP 19830923 200604 2 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

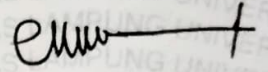
Ketua

: **Ir. Siti Hudaidah, M.Sc.**



Sekretaris

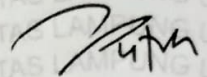
: **Yan Evan, S.Pl., M.Si.**



Penguji

Bukan Pembimbing

: **Dr. Yudha Trinoeagraha A., S.Pl., M.Si.**



2. Dekan Fakultas Pertanian



Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P.

NIP. 19641118 198902 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **11 Desember 2024**

PERNYATAAN

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (sarjana) di Universitas Lampung.
2. Karya tulis ini murni gagasan, rumusan dan penelitian saya sendiri, tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan dari tim pembimbing.
3. Dalam skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai referensi dengan disebutkan nama penulis naskah kemudian dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran atas karya tulis ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh atau sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi ini.

Bandar Lampung, 07 Maret 2025
Yang membuat pernyataan



Zakia Ayu Lutfiyah Seniman
NPM. 2014111028

RIWAYAT HIDUP



Penulis dengan nama lengkap Zakia Ayu Lutfiyah Seniman lahir pada 19 November 2001 di Kecamatan Pringsewu, Kabupaten Pringsewu, Lampung. Merupakan anak pertama dari dua bersaudara pasangan Bapak Indjar dan Ibu Paisah. Mulai menempuh pendidikan formal di TK Xaverius (2006-2008), SD Negeri 1 Bumi Dipasena

Agung kemudian pindah ke SD Negeri 1 Bumiayu (2008-2014), SMP Negeri 1 Pringsewu (2014-2017), dan SMA Negeri 1 Pringsewu (2017-2020). Kemudian pada tahun 2020 penulis melanjutkan ke pendidikan tinggi (S-1) di Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

Penulis pernah melaksanakan magang mandiri di Balai Benih Ikan Natar, Lampung Selatan di 2022. Pada 2023 penulis ikut dalam program Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Air Ringkih, Kecamatan Rebang Tangkas, Kabupaten Way Kanan. Program Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) Riset penulis ikuti pada Juli 2023-Mei 2024 di Laboratorium Mikrobiologi, Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL) Serang. Penulis juga pernah aktif dalam organisasi kemahasiswaan Himpunan Mahasiswa Perikanan dan Kelautan (Himapik) Fakultas Pertanian, Universitas Lampung tahun 2022/2023.

PERSEMBAHAN

Puji dan Syukur atas segala nikmat serta rahmat yang diberikan oleh Allah swt sehingga saya dapat menuntut ilmu dan mengerjakan skripsi ini dengan lancar. Tak lupa shalawat serta salam selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad saw. Saya persembahkan skripsi ini kepada kedua orang tua tercinta Bapak Indjar dan Ibu Paisah serta Adik saya Dimas Faiz Lintang Kusuma yang selalu memberikan doa, nasehat dan dukungan yang tak terhingga.

Saya persembahkan pula karya ini kepada Dosen Pembimbing yang telah memberikan saran, masukan dan kritik yang memotivasi dalam penyusunan karya ini. Juga saya persembahkan karya ini kepada para analis di Laboratorium Mikrobiologi BPKIL Serang yang selalu memberikan pengalaman serta ilmu yang bermanfaat.

Saya persembahkan juga kepada teman-teman serta sahabat-sahabat terbaik yang selalu memberikan dukungan, motivasi dan doa.

Serta almamater tercinta, Universitas Lampung

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL) Serang yang telah memfasilitasi secara penuh kegiatan penelitian ini.

MOTO

Jangan Putus Asa dan Bersedih.

(QS. Al-Imran: 139)

Sesungguhnya hanya orang-orang yang bersabarlah yang disempurnakan pahalanya tanpa perhitungan.

(QS. Az-Zumar: 10)

Jangan putus asa jika langkah-langkahmu harus mundur ke belakang. Karena anak panah itu ditarik kebelakang, agar mampu bergerak dengan kuat ke depan.

(Habib Ali bin Abu Bakar)

Semua orang punya kecepatannya masing-masing, kecepatanmu juga spesial. Jadi jangan terlalu peduli dengan orang lain, jalani saja jalan yang kamu tuju, karena itu akan membawamu ke tempat yang sangat spesial.

(Bang Chan)

SANWACANA

Puji dan syukur kehadiran Allah Swt atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul “Uji Kinerja Deteksi Antibodi Poliklonal dengan Variasi Antigen *Aeromonas hydrophila*” ini sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Perikanan di Universitas Lampung.

Penulis dapat menyelesaikan skripsi ini berkat bantuan serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat., M.P., selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.
2. drh. Toha Tusihadi, selaku Kepala Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL) Serang yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melakukan penelitian di BPKIL Serang.
3. Munti Sarida, S.Pi., M.Sc., Ph.D., selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan serta Ketua Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.
4. Dr. Supono S.Pi., M.Si., (alm). selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama di perkuliahan.
5. Ir. Siti Hudaidah, M.Sc., selaku Pembimbing Akademik sekaligus Pembimbing Utama yang telah memberikan motivasi, bimbingan, saran dan juga kritik bermanfaat dalam penyelesaian skripsi ini.

6. Yan Evan, S.Pi., M.Si., selaku Pembimbing Kedua yang telah memberikan ilmu, motivasi, saran dan juga kritik bermanfaat dalam penyelesaian skripsi ini.
7. Dr. Yudha Trinoegraha Adiputra, S.Pi., M.Si. selaku dosen penguji atas saran dan juga kritik bermanfaat dalam penyelesaian skripsi ini.
8. Dosen-dosen Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat serta pengalaman yang tak terhingga selama di perkuliahan.
9. Suherman, S.Si., M.Si., Yashintya Inggariyanti, A.Md., drh. Rimesly, Dinarti, S.Si., Tatang Sudiman, Mentari Yuliana Jaya, Muta'al dan seluruh karyawan Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL) Serang atas bantuan yang diberikan kepada penulis selama melaksanakan penelitian.
10. Kedua orang tua, adik dan keluarga besar yang telah memberi bantuan dan dukungan baik secara finansial dan moral.
11. Nadine Daniella Wibowo yang selalu membersamai penulis.
12. Adelia Wihardini, Dea Ayu Palupi, Indah Puspita, Haniatun Aminah, Siti Mutomimah Aini, Meileni Anggraini, Khoirun Nisa, Syasqia Mita, Dinda Permata Sari, Cipto Hadi Saputro, Frido Yoga, Sefrian Meifaril yang selalu memberikan semangat serta masukan sehingga penulis selalu optimis.
13. Rekan-rekan MBKM di BPKIL Serang serta rekan-rekan Program Studi Budidaya Perairan atas dukungan yang diberikan.

Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan masyarakat umumnya.

Bandar Lampung, 07 Maret 2025
Penulis

Zakia Ayu Lutfiyah Seniman

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan	2
1.3 Manfaat Penelitian	3
1.4 Kerangka Pikir	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Biologi <i>Aeromonas hydrophila</i>	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Morfologi	5
2.1.3 Habitat dan Penyebaran	6
2.2 Antibodi Poliklonal	6
2.3 Teknik Serologi	7
2.4 Uji Kinerja Antibodi Poliklonal	7
III. METODE PENELITIAN	9
3.1 Waktu dan Tempat	9
3.2 Alat dan Bahan	9
3.3 Prosedur Penelitian	12

3.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan	12
3.3.2 Identifikasi Isolat Bakteri	13
3.3.3 Persyaratan Hewan Uji	16
3.3.4 Pembuatan Antigen O (AgO)	16
3.3.5 Penyuntikan Hewan Uji dan Pemanenan Serum	17
3.3.6 Pengujian Titer Antibodi	18
3.3.7 Uji Kinerja Antibodi Poliklonal	18
3.4 Analisis Data	21
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Hasil	22
4.1.1 Identifikasi <i>Aeromonas hydrophila</i>	22
4.1.2 Pengujian Titer Antibodi.....	24
4.1.3 Penentuan Batas Deteksi	27
4.1.4 Penentuan Sensitivitas, Spesifisitas, <i>False Positive Rate</i> (FPR), <i>False Negative Rate</i> (FNR), dan Akurasi	27
4.1.5 Uji Reaksi Silang Lokasi	28
4.2 Pembahasan.....	29
V. SIMPULAN DAN SARAN	32
5.1 Simpulan	32
5.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN.....	37

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat yang digunakan pada penelitian	9
2. Bahan yang digunakan pada penelitian	11
3. Kriteria <i>Aeromonas hydrophila</i> dengan identifikasi biokimia	15
4. Perhitungan kualitatif sensitivitas, spesifisitas, <i>false positive rate</i> , <i>false negative rate</i> , dan akurasi.....	19
5. Hasil pengamatan uji biokimia	22
6. Hasil konfirmasi uji PCR (<i>polymerase chain reaction</i>).....	23
7. Hasil pengujian titer antibodi pada kode sampel ATCC AH 7966.....	24
8. Hasil pengujian titer antibodi pada kode sampel I/454.....	25
9. Hasil pengujian titer antibodi pada kode sampel I/685.....	25
10. Hasil pengujian titer antibodi pada kode sampel I/560.....	26
11. Hasil penentuan batas deteksi masing-masing sampel	27
12. Hasil uji parameter setiap antibodi poliklonal	28
13. Hasil perhitungan parameter uji kinerja antibodi poliklonal	28
14. Hasil uji reaksi silang pada setiap antibodi poliklonal.....	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bagan kerangka pikir penelitian.....	4
2. Hasil reaksi aglutinasi	7
3. Pembuluh darah vena pada telinga kelinci (<i>Oryctulagus cuniculus</i>)	18
4. Hasil identifikasi dan deteksi bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	24
5. Hasil titer antibodi	26

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil pengujian limit deteksi.....	38
2. Hasil uji kinerja.....	41
3. Hasil silang lokasi	43
4. Perhitungan sensitivitas, spesifisitas, <i>false positive rate</i> , <i>false negative rate</i> , dan akurasi.....	45

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ancaman penyakit yang disebabkan oleh bakteri masih menjadi kendala pada budi daya ikan, karena dapat menimbulkan kematian yang tinggi (Hardi, 2018). *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri patogen yang dapat menimbulkan kerugian pada budi daya perikanan tawar. Bakteri ini bersifat patogen, baik pada manusia atau hewan khususnya ikan (Manik *et al.*, 2014). *Aeromonas hydrophila* adalah bakteri Gram negatif bersifat oportunistik penyebab kematian ikan hingga 80 – 100% (Lukistyowati & Kurniasih, 2012).

Aeromonas hydrophila umum menyerang ikan air tawar dan dapat menyebabkan penyakit *Motile Aeromonas Septicaemia* (MAS) (Roberts, 2000). Pada tahun 2005, sebanyak 47 ton gurami (*Osphronemus gourami*) ukuran konsumsi dan 2,1 juta ekor benih gurami mati karena penyakit yang disebabkan bakteri *Aeromonas hydrophila* di Lubuk Pandan, Sumatera Barat (Zainal, 2009). Menurut KKP (2021), ditemukan kasus MAS pada 18 provinsi di Indonesia mulai dari kasus ringan hingga berat, dibandingkan dengan 13 penyakit ikan lainnya jumlah ini termasuk yang paling banyak.

Penyebaran *Aeromonas hydrophila* sangat cepat pada padat tebar yang tinggi (Kabata, 1985). Austin & Austin (1996) menyatakan penyakit oleh *Aeromonas hydrophila* adalah busuknya sirip dan ekor, *haemorrhagic septicaemia*, pengelupasan sisik dan pendarahan pada bagian insang serta anus, mata menonjol, dan pembengkakan pada abdomen. Deteksi dini dengan metode yang tepat, akurat, cepat dan mudah dapat dilakukan guna penanggulangan atau pencegahan penyebaran penyakit.

Seiring perkembangan teknologi diperlukan inovasi teknik pemeriksaan penyakit pada ikan dengan waktu singkat untuk mendiagnosis penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Metode deteksi konvensional umumnya memerlukan waktu yang lama, membutuhkan alat dan bahan tertentu serta kompetensi analis. Sedangkan metode modern seperti PCR (*polymerase chain reaction*), ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) dan FIA (*flow immunogold assay*) membutuhkan bahan dan alat yang mahal. Memanfaatkan antibodi poliklonal metode serologi tes aglutinasi menjadi salah satu alternatif diagnosis cepat dan juga murah. Metode serologi tes aglutinasi ini memiliki prinsip yang lebih efektif dan cepat dibandingkan dengan metode konvensional karena hanya mereaksikan antara antibodi dan juga antigen (Fitria *et al.*, 2021).

Antibodi poliklonal dihasilkan dari proses penyuntikan antigen pada hewan uji yang nantinya akan menghasilkan serum. Antibodi sendiri merupakan bagian dari sistem pertahanan tubuh yang digunakan untuk menghilangkan atau mengurangi zat asing yang masuk ke dalam tubuh. Antibodi atau *immunoglobulin* adalah protein terlarut yang diproduksi oleh sel B sebagai respon terhadap antigen, dimana setiap antibodi terikat secara spesifik pada antigen tunggal (Madigan *et al.*, 2009). Menggunkan prinsip reaksi antara antibodi dan antigen kemudahan diagnosa akan tercapai dan memiliki potensi digunakan di lapangan oleh para pembudidaya. Namun diperlukannya kegiatan pemeriksaan kinerja untuk memastikan bahwa metode tersebut dapat memberikan hasil yang akurat dan dapat diandalkan.

1.2 Tujuan Penelitian

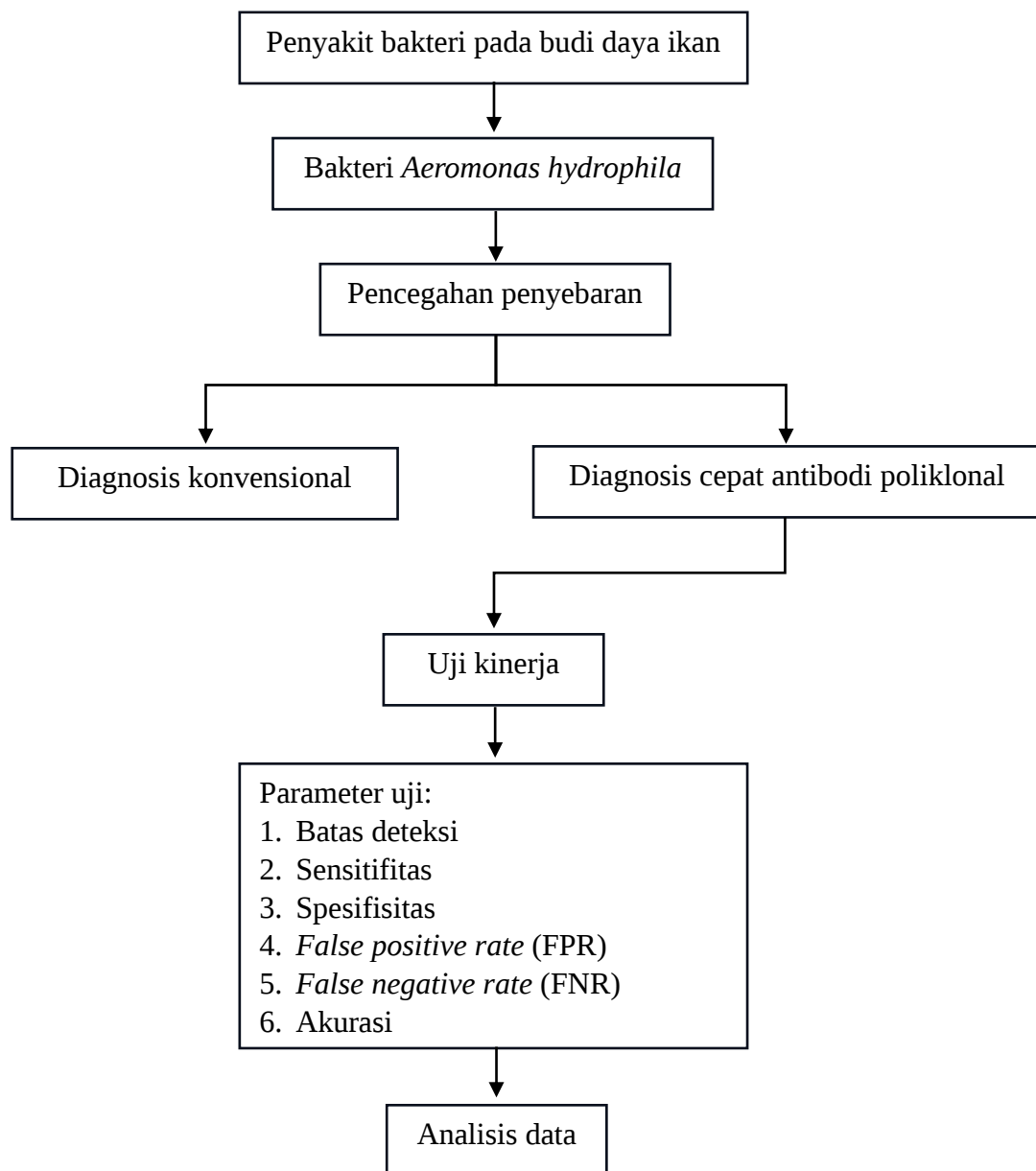
Tujuan penelitian yaitu untuk mengevaluasi kemampuan antibodi poliklonal dalam mendeteksi variasi antigen *Aeromonas hydrophila* melalui parameter uji antara lain: batas deteksi, sensitifitas, spesifisitas, *false positive rate* (FPR), *false negative rate* (FNR), dan akurasi.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah untuk memberikan informasi kepada masyarakat tentang kemampuan antibodi poliklonal dalam mendeteksi variasi antigen *Aeromonas hydrophila* melalui parameter uji antara lain: batas deteksi, sensitifitas, spesifisitas, *false positive rate* (FPR), *false negative rate* (FNR), dan akurasi.

1.4 Kerangka Pikir Penelitian

Penelitian pada ikan yang disebabkan oleh bakteri masih menjadi ancaman serius perikanan budi daya. *Aeromonas hydrophila* salah satu bakteri penyebab penyakit MAS (*motile aeromonas septicaemia*). Penyakit ini menyebabkan kematian 80 – 100% dalam jangka waktu 1 – 2 minggu (Aisiah *et al.*, 2020). Diperlukan diagnosa secara cepat dan tepat guna mencegah penyebaran *Aeromonas hydrophila*, karena diagnosa bakteri secara konvensional umumnya membutuhkan waktu yang cukup lama. Kerugian sering terjadi akibat kurang tanggapnya penanganan penyebaran *Aeromonas hydrophila* yang sulit dilakukan, hal ini dikarenakan belum adanya metode diagnosa penyakit yang cepat, tepat, akurat dan mudah. Seiring berkembangnya teknologi muncul alternatif pencegahan dini seperti diagnosa penyakit yang relative singkat, akurat dan mudah penerapannya. Antibodi poliklonal bisa menjadi alternatif diagnosa bakteri, dimana digunakan pada metode serologi tes aglutinasi. Antibodi ini didapatkan dari imunisasi hewan uji yang biasanya dilakukan pada hewan mamalia. Hewan yang sering digunakan untuk produksi antibodi poliklonal antara lain kambing (*Capra aegagrus*), kuda (*Equus caballus*), kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), marmot (*Marmota*), hamster (*Cricetinae*), tikus (*Muridae*), domba (*Ovis aries*) dan ayam (*Gallus gallus domesticus*). Untuk hewan laboratorium yang sering digunakan dalam menghasilkan antibodi poliklonal sendiri adalah kelinci dan mencit (*Mus musculus*).



Gambar 1. Bagan kerangka pikir penelitian

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi *Aeromonas hydrophila*

2.1.1 Klasifikasi

Aeromonas hydrophila diklasifikasikan sebagai patogen primer atau sekunder (Shome & Shome, 1999). Patogen yang menyebabkan penyakit pada ikan yang mengalami stres merupakan patogen primer. *Aeromonas hydrophila* umumnya ditemukan sebagai patogen sekunder yang menginfeksi bergantung pada keberadaan infeksi primer (ikan telah terinfeksi infeksi lain) (Harikrishnan & Balasundaran, 2005). Bakteri ini mampu menyebar dengan sangat cepat terlebih pada budi daya dengan padat tebar yang tinggi.

Menurut Holt *et al.* (1994), klasifikasi *Aeromonas hydrophila* adalah sebagai:

Filum : Protophyta

Kelas : Schizomycetes

Ordo : Pseudomonadales

Famili : Vibrionaceae

Genus : *Aeromonas*

Spesies : *Aeromonas hydrophila*

2.1.2 Morfologi

Aeromonas hydrophila merupakan bakteri Gram negatif dengan ciri utama berukuran $0,8 - 1 \times 1 - 3,5 \mu\text{m}$, hidup pada suhu $15 - 30^\circ\text{C}$, bersifat fakultatif aerobik (dapat hidup dengan atau tanpa oksigen) karena memiliki satu flagel yang keluar dari salah satu kutubnya. Sebagian besar *Aeromonas hydrophila* mampu tumbuh dan berkembang biak serta tetap motil pada suhu 37°C . Resisten terhadap suhu dingin dan klorin setidaknya hanya dalam kurun waktu satu bulan (faktanya

Aeromonas hydrophila dapat bertahan hidup dalam temperatur suhu rendah ± 4 °C). Berkembang biak secara aseksual, yang berarti bakteri ini memanjangkan sel diikuti dengan pembelahan biner atau inti. Memerlukan waktu ± 10 menit untuk membelah dari satu sel menjadi dua sel bakteri (Laili, 2007).

2.1.3 Habitat dan Penyebaran

Aeromonas hydrophila memiliki habitat alami diperairan, namun tidak dapat tumbuh pada perairan dengan kadar garam tinggi. Tumbuh subur pada kisaran suhu 0 – 45 °C dengan suhu optimum 22 – 32 °C (Farmer *et al.*, 2000). Bakteri ini biasanya hidup pada air tawar yang mengandung bahan organik yang tinggi. Bakteri ini dapat hidup pada saluran pencernaan (Irianto, 2005). Disebutkan *Aeromonas hydrophila* bersifat oportunistik, yang artinya dapat menimbulkan penyakit apabila lingkungannya mendukung. Adapun faktor pendukungnya antara lain ikan dalam keadaan stres, kepadatan terlalu tinggi, akibat transportasi, rendahnya nutrisi serta rendahnya kualitas air (Daskalov, 2006).

2.2 Antibodi Poliklonal

Antibodi poliklonal dihasilkan oleh limfosit B yang berasal dari berbagai jenis klon karena tanggapan dari ikatan antigen dengan epitop limfosit B yang berbeda-beda, antibodi ini diperoleh dari hasil imunisasi hewan uji (Burgess, 1995).

Hewan mamalia biasanya diimunisasi untuk memproduksi antibodi. Hewan yang sering digunakan sebagai produksi antibodi poliklonal antara lain kambing, kuda, marmut, kelinci, hamster, tikus, domba dan ayam. Sedangkan hewan laboratorium yang paling umum digunakan sebagai produksi antibodi yaitu kelinci dan mencit (Koivunen & Krogsrud, 2006).

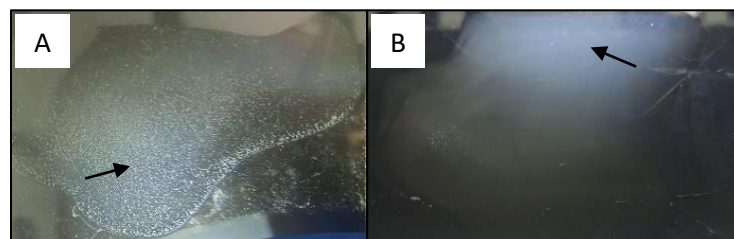
Dalam dunia pengujian immunosensor untuk mendeteksi patogen antibodi poliklonal sudah banyak digunakan. Dimana antibodi bermanfaat sebagai reagen diagnostik untuk melacak dan mengukur bahan biologi (Burgess, 1995). Adapun keunggulan dari antibodi poliklonal, yaitu dapat diproduksi dalam jumlah yang besar namun dalam waktu yang singkat juga tidak memerlukan teknologi yang

rumit dan biaya yang mahal, sehingga cocok untuk sebagian besar tujuan penelitian dasar.

2.3 Teknik Serologi

Serologi merupakan salah satu cara identifikasi atau deteksi suatu patogen pada inang, yang memanfaatkan reaksi spesifik antara antigen dan antiserum. Tes aglutinasi merupakan salah satu dari bermacam-macam tes pada metode serologi. Keberhasilan dan ketelitian metode serologi untuk identifikasi dan deteksi sangat bergantung pada ketersediaan pereaksi diagnostik (antiserum) dengan kualitas baik (Temaja *et al.*, 2010).

Metode serologi deteksi penyakit menggunakan tes aglutinasi memanfaatkan reaksi antigen dengan antibodi atau mendeteksi titer antibodi organisme yang terinfeksi penyakit (Dzen *et al.*, 2003). Pada tes aglutinasi hasil positif ditunjukkan oleh reaksi aglutinasi atau penggumpalan yang terlihat sebagai butiran-butiran pasir, sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan tidak terjadinya reaksi aglutinasi atau penggumpalan (Amanu & Kurniasih, 2017).



Keterangan: (A) hasil positif; (B) hasil negatif

Sumber: dokumentasi pribadi

Gambar 2. Hasil reaksi aglutinasi

2.4 Uji Kinerja Antibodi Poliklonal

2.4.1 Batas Deteksi

Batas deteksi merupakan jumlah terendah mikroorganisme dalam suatu sampel yang dapat dideteksi dan dihitung pada kondisi percobaan yang ditentukan. Dalam mikrobiologi kualitatif, batas deteksi adalah jumlah mikroorganisme terendah dalam volume sampel tertentu yang dapat dideteksi di bawah kondisi eksperimen

tertentu (The United States Pharmacopoeia, 2020). Oleh sebab itu, dapat disimpulkan batas deteksi didefinisikan sebagai representasi konsentrasi terkecil suatu sampel yang dapat diukur dan menunjukkan respon yang signifikan terhadap blanko.

2.4.2 Sensitivitas

Nilai sensitivitas merupakan parameter yang menunjukkan kemampuan suatu pemeriksaan untuk menyatakan hasil positif pada subjek terduga. Apabila didapatkan nilai sensitivitas yang semakin tinggi pada suatu pemeriksaan maka didapatkan semakin banyak hasil pemeriksaan yang positif pada subjek terduga atau semakin sedikit jumlah negatif palsu (Supriyanta & Setiawan, 2021).

2.4.3 Spesifisitas

Nilai Spesifisitas merupakan parameter yang menunjukkan kemampuan suatu pemeriksaan untuk menyatakan hasil negatif pada subjek terduga. Apabila didapatkan nilai spesifisitas yang semakin tinggi pada suatu pemeriksaan maka didapatkan semakin banyak hasil pemeriksaan yang negatif pada subjek terduga atau semakin sedikit jumlah positif palsu (Supriyanta & Setiawan, 2021).

2.4.4 False Positive Rate (FPR) dan False Negative Rate (FNR)

False positive rate (FPR) adalah sampel yang hasil pemeriksaannya positif dan benar-benar terduga positif. Sedangkan *false negative rate* (FNR) adalah sampel yang hasil pemeriksaannya negatif dan benar-benar terduga negatif (Supriyanta & Setiawan, 2021).

2.4.5 Akurasi

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan kedekatan hasil percobaan dengan kadar analit yang sebenarnya. Dalam bidang deteksi, akurasi ini digunakan untuk mengukur kemampuan dari bahan uji dalam mendeteksi kondisi uji dengan benar atau bisa dikatakan sebagai metode pemeriksaan untuk mendeteksi dari seluruh sampel yang diperiksa secara tepat (Supriyanta & Setiawan, 2021).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi pada Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL) Serang pada November 2023 sampai dengan Mei 2024.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Alat yang digunakan pada penelitian

No.	Nama Alat	Dimensifikasi	Fungsi
1.	<i>Biological safety cabinet</i> (BSC)	BIOBASE, 1 unit	Tempat melakukan kegiatan penelitian secara aseptis.
2.	Botol schott	DURAN, 500 mL	Wadah larutan fisiologis.
3.	<i>Petridish</i>	IWAKI, 100 mm	Wadah media kultur.
4.	Tabung reaksi	IWAKI, 16 mm x 100 mm	Tempat menampung larutan uji.
5.	Rak tabung reaksi	Kayu, 1 unit	Tempat meletakkan tabung reaksi.
6.	Tabung <i>sentrifuge</i>	IWAKI, 10 mL	Tempat menampung larutan uji.
7.	Waterbath	JISICO, 1 unit	Menginaktifasi bakteri.
8.	Autoklaf	TOMY, 1 unit	Sterilisasi alat dan bahan.
9.	Inkubator	LABTECH, 2 unit	Inkubasi bakteri.
10.	<i>Refrigerator</i>	1 unit	Menyimpan sampel.
11.	Standar McFarland	HIMEDIA, 1 unit	Mengetahui konsentrasi bakteri.

Tabel 1. Alat yang digunakan pada penelitian (lanjutan)

No.	Nama Alat	Dimensifikasi	Fungsi
12.	Kaca objek	ONELAB, 2 box	Pengamatan identifikasi bakteri.
13.	<i>Syringe</i>	ONEMED 1 mL dan 5 mL, 3 box	Menyuntikkan antigen dan mengambil darah hewan uji.
14.	Vorteks	Thermo Scientific, 1 unit	Menghomogenkan sampel.
15.	Jarum ose	2 unit	Menggores bakteri kemedi isolasi.
16.	<i>Bacti cinerator</i>	1 unit	Mensterilkan jarum ose.
17.	<i>Sentrifuge</i>	TOMY, 1 unit	Memisahkan natan dan supernatan.
18.	Mikropipet	2 unit	Mengambil cairan dalam jumlah yang kecil.
19.	Mikrotip	200 dan 1000 μ L	Menampung cairan.
20.	<i>Densichcek</i>	BIOMERIUX, 1 unit	Mengecek nilai kekeruhan suspensi bakteri.
21.	<i>Heat Block</i>	VWR, 1 unit	Memanaskan isolat bakteri.
22.	<i>Thermal cycler</i>	SENSOQUEST, 1 unit	Melakukan tahap amplifikasi PCR.
23.	Elektroforesis gel	Advance, 1 unit	Memisahkan fragmen DNA.
24.	<i>UV transiluminator</i>	1 unit	Membaca hasil elektroforesis.
25.	Mikroskop	1 unit	Mengamati sampel dengan ukuran makroskopis.
26.	Kandang hewan uji	30 x 30 x 50 cm, 4 unit	Tempat memelihara hewan uji.
27.	Kamera digital	1 unit	Mendokumentasikan kegiatan penelitian.
28.	Alat tulis	2 unit	Mencatat hasil saat penelitian.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 2. Bahan yang digunakan pada penelitian

No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Fungsi
1.	Isolat <i>American type culture collection</i> (ATCC) <i>Aeromonas hydrophila</i> 7966	Isolat stok laboratorium	Sebagai parameter uji.
2.	Isolat <i>Aeromonas hydrophila</i> lokal dari Kota Depok	Isolat stok laboratorium	Sebagai parameter uji.
3.	Isolat <i>Aeromonas hydrophila</i> lokal dari Kab. Lebak	Isolat stok laboratorium	Sebagai parameter uji.
4.	Isolat <i>Aeromonas hydrophila</i> lokal dari Kab. Sleman	Isolat stok laboratorium	Sebagai parameter uji.
5.	<i>tryptic soy agar</i> (TSA)	MERCK	Media umum isolasi bakteri
6.	Media <i>sulfide indole motility</i> (SIM)	HIMEDIA	Media uji motilitas bakteri.
7.	KOH 3%	MERCK	Uji gram bakteri.
8.	<i>Oxidase detection test</i>	MERCK	Uji oksidase bakteri.
9.	Media oksidatif/fermentatif	HIMEDIA	Media uji oksidatif-fermentatif bakteri.
10.	Media <i>rimmer-shotts</i> (RS)	HIMEDIA	Media selektif bakteri <i>Aeromonas</i> .
11.	Larutan fisiologis (NaCl)	Akuades dan NaCl	Sebagai bahan pelarut.
12.	<i>Aquades</i>	20 L	Membilas, mencampur, dan melarutkan bahan.

Tabel 2. Bahan yang digunakan pada penelitian (lanjutan)

No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Fungsi
13.	Kelinci	2,5 kg 4 ekor	Sebagai hewan uji.
14.	Pakan kelinci	CitraFeed 25 kg	Sebagai pakan hewan uji.
15.	Plastik	15 x 30 cm 2 pack	Untuk menyimpan bahan.
16.	<i>Agarose</i>	HIMEDIA	Bahan elektroforesis.
17.	<i>Iodine</i>	MERCK	Bahan pewarnaan bakteri.
18.	<i>Crystal violet</i>	MERCK	Bahan pewarnaan gram.
19.	Aseton	MERCK	Bahan pewarnaan gram.
20.	Safranin	MERCK	Bahan pewarnaan gram.
21.	Tisu	2 pack	Untuk mengeringkan permukaan.
22.	<i>Fast lisis buffer</i>	Sigma Aldrich	Sebagai bahan ekstraksi DNA.
23.	<i>Nucleous free water</i>	Sigma Aldrich	Reagen mastermix PCR.
24.	<i>Taq DNA polymerase</i>	Thermo Scientific	Reagen mastermix PCR.
25.	Primer <i>A.hydrophila</i>	Thermo Scientific	Reagen mastermix PCR.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Distrerilisasi alat dan juga bahan yang akan digunakan dalam kegiatan penelitian dari berbagai macam mikroorganisme baik jamur ataupun bakteri. Diawali dengan didestruksinya alat dan bahan pasca pengujian, kemudian dicuci menggunakan sabun dan dibilas dengan air mengalir, lalu dikeringkan hingga kering pada alat pengering. Diautoklaf alat dan bahan selama 15 menit pada suhu 121°C dengan metode sterilisasi basah. Metode sterilisasi basah dilakukan pada autoklaf yang dioperasikan dengan uap air dibawah tekanan. Sterilisasi berguna uantuk membunuh dan membersihkan semua bentuk mikroba hidup di peralatan dan bahan tanam yang digunakan (Misra & Misra, 2012).

3.3.2 Identifikasi Isolat Bakteri

a. Identifikasi Biokimia

Identifikasi *Aeromonas hydrophila* secara biokimia sesuai SNI 7303.1:2015, sebagai berikut:

- a) Diambil koloni terpisah yang bersifat β -hemolitik lalu diisolasikan pada media *Tryptic soy agar* (TSA) untuk tahap pemurnian bakteri. Kemudian diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24 jam. Jika hasil pemurnian diperoleh koloni yang seragam maka tahap identifikasi diteruskan.
- b) Disiapkan isolat yang telah berumur 12 – 24 jam untuk pengujian toleransi bakteri terhadap suhu. Diinokulasikan isolat dengan jarum ose steril pada 2 media TSA, diinkubasi masing-masing pada suhu 37°C dan 50°C selama 24 jam. Diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri pada media tanam.
- c) Disiapkan isolat yang telah berumur 12 – 24 jam untuk pengujian toleransi bakteri terhadap konsentrasi NaCl. Diinokulasikan isolat dengan jarum ose steril pada 4 media TSA miring masing-masing dengan kandungan NaCl sebanyak 0,5%, 3%, 5% dan tanpa kandungan NaCl. Diinkubasi masing-masing pada suhu 28°C selama 24 jam. Diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri pada media agar.
- d) Disiapkan kaca objek untuk pewarnaan Gram, ditetesi akuades sebanyak satu tetes, diambil isolat bakteri untuk dihomogenkan dengan akuades dan diulas merata pada permukaan kaca objek. Dilanjutkan dengan memfiksasi preparat dengan melewati preparat di atas api (jarak 15 cm) beberapa kali sampai terlihat kering. Kemudian ditetaskan larutan *crystal violet* secara merata pada preparat dan diamkan selama 1 menit, dibilas dengan air mengalir dan dikering anginkan. Selanjutnya, ditetaskan larutan *iodine lugol* secara merata pada preparat dan diamkan selama 1 menit. Dibilas kembali dengan air mengalir dan dikering anginkan. Ditetaskan larutan aseton merata pada preparat dan diamkan maksimal 30 detik, dibilas dengan air mengalir dan dikering anginkan. Terakhir, ditetaskan larutan Safranin merata pada preparat dan didiamkan selama 1 menit, dibilas dan dikering anginkan. Diamati preparat menggunakan mikroskop dan dicatat

warna serta bentuk sel bakterinya. Sel bakteri Gram negatif ditandai dengan warna merah atau pink, sedangkan Gram positif berwarna ungu. *Aeromonas hydrophila* sendiri merupakan bakteri Gram Negatif dengan bentuk batang pendek.

- e) Diambil isolat bakteri dan diletakkan pada permukaan kaca objek dengan jarum ose untuk dilakukannya uji Gram dengan KOH. Ditetesi KOH 3% pada preparat isolat dan homogenkan. Gram negatif ditunjukkan oleh terbentuknya lendir pada campuran saat ditarik dengan ose steril, sedangkan Gram positif tidak terbentuk lendir atau homogen.
- f) Disiapkan media *sulfide indole motility* (SIM) untuk uji motilitas bakteri, diambil isolat bakteri dengan jarum ose lurus kemudian diinokulasikan pada media semi solid SIM agar dengan cara ditusukkan ke dalam media. Diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Reaksi positif ditandai oleh adanya pertumbuhan bakteri yang menyebar dan tidak terlihat bekas tusukan.
- g) Disiapkan *oksidase detection test* lalu digoreskan isolat bakteri menggunakan bahan non logam steril. Reaksi oksidase positif ditandai munculnya warna biru keunguan pada goresan.
- h) Diinokulasikan isolat bakteri ke dalam 2 tabung berisi media O/F dengan cara ditusukkan, kemudian dimasukkan parafin cair steril setinggi 1 cm ke dalam salah satu tabung. Diinkubasi pada suhu 28 °C selama 24 jam.
- i) Diambil isolat bakteri tunggal dengan jarum ose steril, lalu digoreskan pada media *rimmler-shotts* (RS). Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati koloni yang tumbuh, apabila berwarna kuning tanpa warna hitam di tengah koloni berarti positif *Aeromonas hydrophila*.

Bakteri dinyatakan sebagai *Aeromonas hydrophila* apabila memenuhi kriteria seperti pada tabel berikut:

Tabel 3. Kriteria *Aeromonas hydrophila* dengan identifikasi biokimia

No	Parameter Uji	Hasil Reaksi
1	Toleransi terhadap suhu inkubasi:	
	a. suhu 37°C	+
	b. suhu 50°C	-
2	Toleransi terhadap konsentrasi NaCl dalam media:	
	a. NaCl 0,5%	+
	b. NaCl 3%	+
	c. NaCl 5%	-
3	Uji pewarnaan Gram	Gram negatif, bentuk batang pendek
4	Uji Gram (KOH 3%)	-
5	Uji Motilitas	+
6	Uji Oksidase	+
7	Uji Oksidatif-Fermentatif	+
8	Uji RS	Berwarna kuning

b. Deteksi *Aeromonas hydrophila* dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Dilakukan ekstraksi pada isolat bakteri dengan disiapkan *microtube* yang telah diisi dengan 200 µL *fast lysis buffer*, kemudian dipindahkan isolat *Aeromonas hydrophila* dari media TSA ke dalam *microtube*. Divorteks hingga homogen dan diinkunasi pada digital *heatblock* pada suhu 100°C kecepatan 800 rpm selama 10 menit. Selanjutnya, diamkan pada suhu ruang 15 – 25°C selama 2 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rcf. Dipindahkan supernatan sebanyak 100 µL ke *microtube* baru. Dilanjutkan tahap amplifikasi dimulai dengan pembuatan *mastermix* beberapa bahan, yaitu NFW (*nucleus free water*) per satu reaksi 8,5 µL, 2x *mastermix* (*gotag green*) per satu reaksi 12,5 µL, primer A.H (per satu reaksi *forward* 1 µL & *referse* 1 µL). Dikompositkan ketiga bahan tersebut pada tahap *mastermix* pertama, kemudian dilakukan penambahan genom hasil ekstraksi

(kecuali kontrol negatif) masing-masing sebanyak 2 μ L pada tahap *mastermix* kedua.

Dimulai amplifikasi yang diawali oleh tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, *annealing* primer selama 2 menit di suhu 55°C, dan primer *extension* selama 1 menit pada suhu 72°C dengan *autoextension* (Pollard *et al.*, 1990). Setelah tahap amplifikasi selesai dilanjutkan dengan tahap elektroforesis. Diletakkan gel agarose pada mesin elektroforesis, kemudian mulai dari kontrol negatif dimasukkan pada setiap sumuran secara berurutan. Mesin kemudian ditutup dan diatur pada kekuatan Listrik 100 V selama 15 menit. Setelah proses elektroforesis selesai dilakukan pembacaan hasil pada UV transilluminator yang telah terhubung dengan perangkat komputer. Hasil positif ditandai dengan *barcoding* dari sampel sejajar dengan kontrol positif.

3.3.3 Persyaratan Hewan Uji

Digunakan kelinci lokal dalam keadaan sehat sebagai hewan uji dengan bobot minimal 2,5 kg. Diadaptasikan selama satu minggu untuk mencegah stres pada hewan uji. Diberikan pakan selama pemeliharaan berupa wortel, kangkung dan pakan konsentrat. Intensitas waktu pemberian pakan dua kali sehari pada pagi dan sore hari. Diharapkan pemberian pakan tersebut kelinci sehat dan pembentukan antibodi lebih baik.

3.3.4 Pembuatan Antigen O (AgO)

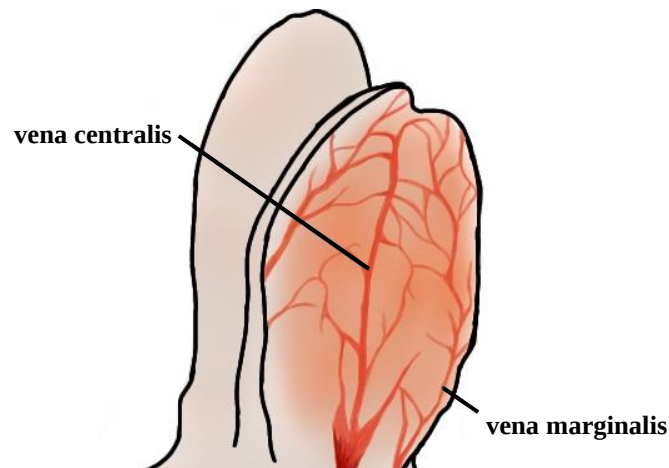
Diinokulasikan bakteri *Aeromonas hydrophila* ke media TSA yang telah dimurnikan dari isolat ATCC 7966 dan isolat lokal dengan kode I/454 dari Kota Depok, kode I/685 dari Kabupaten Lebak serta kode I/560 dari Kabupaten Sleman, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C. Selanjutnya, dipanen bakteri yang tumbuh dengan menggenangi cawan yang terdapat bakteri dengan larutan fisiologis (0,85% NaCl), dikumpulkan bakteri untuk dimasukkan ke dalam tabung *centrifuge*. Disentrifugasi bakteri dalam tabung dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 – 15 menit, dibuang supernatan yang telah terpisah dengan pellet,

tahapan ini merupakan tahap pencucian bakteri yang dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

Dilarutkan kembali dengan menambahkan larutan fisiologis (0,85% NaCl) secara perlahan hingga homogen dan tidak berbuih setelah tahap pencucian terakhir. Dimasukkan suspensi bakteri ke *waterbath* dengan suhu 80°C selama 2,5 jam. Lalu dinginkan di suhu ruang, untuk selanjutnya dilakukan uji viabilitas. Suspensi bakteri yang telah dingin dikultur pada media TSA dan diinkubasi selama 24 jam. Uji viabilitas dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut masih dapat tumbuh atau tidak serta melihat ada tidaknya kontaminasi. Apabila ditunjukkan hasil negatif pada uji viabilitas (tidak terjadi pertumbuhan bakteri), maka sisa Antigen O (AgO) siap digunakan untuk penyuntikan atau bisa disimpan sebagai stok dalam refrigerator 5°C.

3.3.5 Penyuntikan Antigen dan Pemanenan Serum Hewan Uji

Dibuat konsentrasi Antigen O (AgO) untuk penyuntikan sebesar 10^9 sel/mL (4 McFarland), dengan mencampurkan antigen kedalam larutan fisiologis 10 mL dan dibandingkan dengan standar McFarland 10^9 sel/mL (4 McFarland) hingga kekeruhannya sama. Dilakukan penyuntikan 1 mL Antigen O (AgO) *intra vena marginalis* yang terletak pada telinga kelinci, diberikan selang waktu seminggu ke penyuntikan berikutnya hingga 4 kali penyuntikan. Darah dipanen dengan spuit *intra vena centralis* setiap sebelum penyuntikan antigen, setelah itu darah pada spuit dibiarkan sampai terpisah dari sel darah merahnya. Diambil serum pada spuit kemudian dipindahkan ke dalam *microtube*, disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 15000 rcf. Serum yang benar-benar terpisah dari plasma darah dimasukkan ke *microtube* yang baru. Serum lalu diinaktivasi dengan direndam pada *waterbath* suhu 56°C selama 30 menit. Inaktivasi serum bertujuan menghilangkan komplemen merugikan dalam serum sehingga tidak akan mengganggu reaksi pada saat digunakan. Agar serum tersebut awet dan tidak mudah rusak disimpan pada suhu 5°C.



Gambar 3. Pembuluh darah vena pada telinga kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)

3.3.6 Pengujian Titer Antibodi

Titer antibodi diuji pada *microplate* dengan memasukkan larutan PBS sebanyak 25 μ L ke sumuran 1 sampai 12. Lalu dimasukkan serum darah sebanyak 25 μ L ke sumuran 1, lalu dilakukan pengenceran bertingkat sampai lubang ke 11. Selanjutnya, dimasukkan suspensi bakteri *Aeromonas hydrophila* konsentrasi 10^9 sel/mL (4 McFarland) sebanyak 25 μ L ke sumuran 1 sampai 12, campuran dihomogenkan dengan cara menggoyangkan *microplate* secara perlahan. *Microplate* kemudian disimpan selama 2 jam pada incubator suhu 37°C , dilanjutkan penyimpanan selama semalaman ke dalam refrigerator suhu 4°C . Titer antibodi ditandai dengan lubang terakhir yang masih ditemukan reaksi aglutinasi pada dasar lubang.

3.3.7 Uji Kinerja Antibodi Poliklonal

a. Penentuan Batas Deteksi

Diinokulasikan bakteri standar (acuan) pada media TSA, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi bakteri dipanen untuk dibuat menjadi suspensi dengan kepadatan tertinggi yaitu $1,2 \times 10^9$ sel/mL (4 McFarland). Dilakukan pengenceran bertingkat hingga didapat kepadatan 10^8 sel/mL, 10^7 sel/mL, 10^6 sel/mL dan 10^5 sel/mL. Selanjutnya dilakukan penentuan batas deteksi menggunakan metode aglutinasi slide sebanyak 3 kali ulangan pada

setiap pengenceran. Dilakukan dengan cara meneteskan 1:1 suspensi bakteri dan antibodi bakteri, dimana suspensi bakteri terlebih dahulu pada kaca objek. Dicampurkan hingga homogen dengan cara digoyang-goyangkan secara perlahan hingga terlihat hasil. Batas deteksi dinyatakan sebagai konsentrasi atau jumlah bakteri terendah yang masih menunjukkan hasil positif (dapat dideteksi).

b. Penentuan Sensitivitas, Spesifisitas, *False Positive Rate* (FPR), *False Negative Rate* (FNR) dan Akurasi

Diinokulasikan bakteri ATCC 7966 *A.hydrophila* dan isolat lokal *A.hydrophila* sebagai sampel positif serta ATCC *E.coli* sebagai sampel negatif masing-masing ke media TSA, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C. Setelah masa inkubasi, masing-masing bakteri dibuat menjadi suspensi dengan kepadatan diukur hingga mendapatkan konsentrasi bakteri yang memberikan hasil uji positif pada pengujian batas deteksi. Diuji masing-masing bakteri menggunakan metode aglutinasi slide sebanyak 3 kali ulangan pada setiap pengujian. Dilakukan dengan cara meneteskan 1:1 suspensi bakteri dan antibodi bakteri, dimana suspensi bakteri terlebih dahulu pada kaca objek. Dicampurkan hingga homogen dengan cara digoyang-goyangkan secara perlahan hingga terlihat hasil. Hasil positif ditandai oleh terbentuknya butiran-butiran (gumpalan-gumpalan) halus pada kaca objek.

Dilakukan perhitungan sensitivitas, spesifisitas, *false positive rate*, dan *false negative rate* seperti rumus pada tabel berikut:

Tabel 4. Perhitungan kualitatif sensitivitas, spesifisitas, *FPR*, *FNR*, dan akurasi.

Nilai Benar	Hasil Pengujian		Total
	Positif	Negatif	
Positif	a	b	a+b
Negatif	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N

Keterangan:

- a (benar): jumlah positif benar (pengujian memberikan hasil positif terhadap sampel positif)
- b (*false negative*): jumlah negatif salah (pengujian memberikan hasil negatif terhadap sampel positif)
- c (*false positive*): jumlah positif salah (memberikan hasil positif terhadap sampel negatif)
- d: jumlah negatif benar (memberikan hasil negatif terhadap sampel negatif)
- N: jumlah total sampel uji

Perhitungan:

- Sensitivitas adalah parameter yang menyatakan hasil positif (Supriyanta & Setiawan, 2021), dinyatakan dalam % dan dihitung dengan membagi nilai (a) dengan nilai (a+b). $(\%) = a/(a+b) \times 100\%$
- Spesifisitas adalah parameter yang menyatakan hasil negatif (Supriyanta & Setiawan, 2021), dinyatakan dalam % dan dihitung dengan membagi nilai (d) dengan nilai (c+d). $(\%) = d/(c+d) \times 100\%$
- False positive rate* (FPR) adalah sampel yang benar-benar terduga positif (Supriyanta & Setiawan, 2021), dinyatakan dalam % dan dihitung dengan membagi nilai (b) dengan nilai (b+d). $(\%) = b/(b+d) \times 100\%$
- False negative rate* (FNR) adalah sampel yang benar-benar terduga negatif (Supriyanta & Setiawan, 2021), dinyatakan dalam % dan dihitung dengan membagi nilai (c) dengan nilai (a+c). $(\%) = c/(a+c) \times 100\%$.
- Akurasi adalah parameter metode pemeriksaan yang digunakan untuk mendeteksi dari seluruh sampel yang diperiksa secara tepat (Supriyanta & Setiawan, 2021), dinyatakan dalam % yang dihitung dengan membagi nilai (a+d) dengan nilai (N). $(\%) = a+d/N \times 100\%$.

Syarat keberterimaan:

Sensitivitas > 70%

Spesifisitas > 70%

False positive rate (FPR) < 30%

False negative rate (FNR) < 30%

Akurasi > 70%

c. Uji Reaksi Silang Lokasi

Diinokulasikan bakteri *Aeromonas hydrophila* ke media TSA yang telah dimurnikan dari isolat ATCC AH 7966 dan isolat lokal dengan kode I/454 dari Kota Depok, kode I/685 dari Kabupaten Lebak serta kode I/560 dari Kabupaten Sleman, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C. Setelah masa inkubasi, masing-masing bakteri dibuat menjadi suspensi dengan kepadatan diukur hingga mendapatkan konsentrasi bakteri yang memberikan hasil uji positif pada pengujian batas deteksi. Diuji masing-masing bakteri dengan menyilangkan antibodi target pada isolat dari tiap daerah menggunakan metode aglutinasi slide sebanyak 3 kali ulangan pada setiap pengujian. Dilakukan dengan cara meneteskan 1:1 suspensi bakteri dan antibodi bakteri, dimana suspensi bakteri terlebih dahulu pada kaca objek. Dicampurkan hingga homogen secara perlahan hingga terlihat hasil. Hasil positif ditandai terbentuknya butiran-butiran halus pada kaca objek.

3.4 Analisis Data

Dikelola data yang diperoleh pada penelitian seperti hasil uji batas deteksi, sensitivitas, spesifisitas, *false positive rate*, *false negative rate*, dan akurasi secara deskriptif dimana menjelaskan objek penelitian apa adanya dan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Masing-masing antibodi poliklonal memiliki performa yang baik dalam mendeteksi antigen target dengan nilai sensitivitas dan spesifisitas mencapai 100% dengan nilai *false positive rate* (FPR) dan *false negative rate* (FNR) sebesar 0% serta nilai akurasi hingga 100%.

5.2 Saran

Hasil penelitian ini memberikan dasar yang kuat pada pengembangan bidang imunodiagnostik, disarankan untuk diaplikasikan menjadi bahan yang efektif dalam kegiatan diagnostik *Aeromonas hydrophila*.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Aisiah, S., Prajitno, A., Maftuch, M., & Yuniarti A. 2020. Effect of *nauclea subdita* (Korth.) Steud. leaf extract on hematological and histopathological changes in liver and kidney of striped catfish infected by *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary World*, 13(1): 47-53.
- Amanu, S. & Kurniasih. 2017. *Prinsip Antigen, Imunogen, dan Reaksi Imunologik dengan Rapid Test Kit pada Ikan*. Cetakan Pertama. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 57 halaman.
- Austin, B. & Austin, D.A. 1996. *Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish*. Edisi Kelima. Springer. London. 552 halaman.
- Burgess, G.W. 1995. *Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian*. Edisi Indonesia. Artama WT (penerjemah). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 607 halaman.
- Daskalov, H. 2006. *The importance of Aeromonas hydrophila in food safety*. In: Food Control, Elsevier. Frisco. 496 halaman.
- Dzen, Sjoekoer M., Roekistiningsi, Santoso S., & Sri W. 2003. *Bakteriologi Medik*. Bayumedia. Malang. 373 halaman.
- Farmer, J. J., Arduino, M. J., & Brenner-Hickman, F. W. 2000. *The Genera Aeromonas and Plesiomonas*. In: The Prokaryotes third edition. Springer. New York. 1194 halaman.
- Fitria, D. M., Sukenda, S., & Yuhana M. 2021. Development of a co-agglutination method for detection of *Aeromonas hydrophila* as causative agent of *motile aeromonas septicemia* (MAS) disease in gourami (*Osphronemus goramy*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 20(1): 141-156.

- Hardi, E. H. 2018. *Bakteri Patogen pada Ikan Air Tawar Aeromonas hydrophila dan Pseudomonas fluorescens*. Mulawarman University Press. Samarinda. 97 halaman.
- Harikrishnan R. & Balasundaram C. 2005. Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with fish. *Review in Fisheries Science*, 13(4): 281-320.
- Holt, J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., & Staley J. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins Company. United States of America Baltimore. 787 halaman.
- Irianto, A. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 256 halaman,
- Kabata, Z. 1985. *Parasites and Diseases of Fish Culture in the Tropics*. Pasific Biological. Taylor & Francis. London. 318 halaman.
- Koivunen, M. E. & Krogsrud, R. L. 2006. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Laboratory Medicine*, 37(8): 490-497.
- Kementrian Kelautan dan Perikanan. 2021. Kasus *Motile Aeromonas Septicaemia* pada 18 provinsi di Indonesia. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Laili, U. 2007. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Temulawak (Curcuma xanthorrhiza Roxb) Terhadap Prevalensi dan Kelulushidupan Ikan Mas (Cyprinus carpio) yang Diinfeksi Bakteri Aeromonas hydrophila*. (Skripsi). Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang. 46 halaman.
- Lukistyowati, I. & Kurniasih. 2012. Pelacakan gen aerolysin dari *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas yang diberi pakan ekstrak bawang putih. *Jurnal Veteriner*, 13(1): 43-50.
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., & Clark, D. 2010. *Biology of Microorganisms, 13th ed*. Pearson. London. 1152 halaman.
- Manik, V. T., Hidayat, T., & Kusumawaty, D. 2014. *Identifikasi dan Filogenetika Bakteri Aeromonas spp. Isolat Air Kolam Beberapa Kota Berdasarkan pada Sikuen Gen 16S rRNA*. (Skripsi). Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung. 71 halaman.
- Misra, A. N. & Misra, M. 2012. *Sterilization Techniques in Plant Tissue Culture*. Fakir Mohan University. India. 602 halaman.

- Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tylor, S. D., & Rozee, K. R. 1990. Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(11): 2477-2481.
- Roberts, R. J. 2000. *Fish Pathology, Fourth Edition*. Wiley-Blackwell. Iowa. 592 Halaman.
- Shome R. & Shome B. R. 1999. A typical chronic form of *Aeromonas hydrophila* infection in Indian major carp, *Catla catla*, from Andaman. *Current Science*, 76(9): 1188-1190.
- Standar Nasional Indonesia. 2015. SNI 7303.1:2015. Identifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan – Bagian 1: Metode Konvensional. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- Supriyanta, B. & Setiawan, B. 2021. Sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif, nilai prediksi negatif dan akurasi metode lateral immuno assay (LFIA) dengan mikroskopis pada diagnosis gonore. *Puinovakesmas*, 2(2): 40-44.
- Temaja, I. G. R. M., Suastika, G., H. Hidayat, S., & Kartosuwondo, U. 2010. Produksi antiserum dan kajian serologi Chrysanthemum B Caerlavirus (CVB). *Jurnal HPT Tropika*, 10(1): 80-88.
- Tizard, I. R. 2004. *Veterinary Immunology: An Introduction. Seventh Edition*. Saunders. Michigan. 494 halaman.
- The United States Pharmacopeial. 2020. *Standar Farmasi USP 43-NF 38. United State Pharmacopeia (ed.)*. US Pharmacopeia. Rockville. 2592 halaman.
- Xiong, Y., Leng, Y., Li, X., Huang, X., & Xiong, Y. 2020. Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 126: 115861.
- Zainal. 2009. Atasi Bakteri Ikan dengan Tanaman Obat. *Biofarmasi*, 14(1): 19-24.
- Zhang, S., Garcia-D'Angeli, A., Brennan, J. P., & Huo, Q. 2014. Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general. *Analyst Journal*, 139(2): 439-445.