

**HUBUNGAN KEBERADAAN GEN RESISTANSI ANTIMIKROBA
(*Antimicrobial Resistance Gene*) GOLONGAN TETRASIKLIN DAN
FENOTIPE RESISTANSINYA PADA *Vibrio parahaemolyticus***

(Skripsi)

Oleh:

Muhammad Gushafit

2117021073



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

**HUBUNGAN KEBERADAAN GEN RESISTANSI ANTIMIKROBA
(*Antimicrobial Resistance Gene*) GOLONGAN TETRASIKLIN DAN
FENOTIPE RESISTANSINYA PADA *Vibrio parahaemolyticus***

Oleh:

MUHAMMAD GUSHAFIT

Skripsi

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

Pada

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRAK

HUBUNGAN KEBERADAAN GEN RESISTANSI ANTIMIKROBA (*Antimicrobial Resistance Gene*) GOLONGAN TETRASIKLIN DAN FENOTIPE RESISTANSINYA PADA *Vibrio parahaemolyticus*

Oleh:

MUHAMMAD GUSHAFIT

Resistensi antibiotik dan penyebaran gen penyandi resistansi berpotensi menimbulkan bahaya terhadap kesehatan masyarakat dan keamanan pangan. Menurut *World Health Organization*, *Multiple Antibiotic Resistance* (MAR) pada bakteri menjadi perhatian utama dan resistansi dapat menjadi masalah serius yang mengancam sistem pengobatan modern. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan informasi terkait perkembangan resistansi antibiotik golongan tetrasiklin terhadap *Vibrio parahaemolyticus* di beberapa wilayah Indonesia. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan melakukan uji kerentanan antimikroba pada *Vibrio parahaemolyticus* terhadap antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin menggunakan metode uji cakram difusi dan uji konsentrasi hambat minimum. Uji cakram difusi dilakukan dengan meletakan *disk* antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin (30 µg) pada permukaan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) yang telah diinokulasi bakteri untuk melihat pembentukan zona hambat. Uji konsentrasi hambat minimum dilakukan pada konsentrasasi antibiotik 0,25-256 µg/mL menggunakan media *Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth* (CAMHB) untuk mengamati konsentrasi hambat minimum antibiotik terhadap bakteri. Interpretasi nilai zona hambat dan nilai *minimum inhibitory concentration* mengacu pada CLSI M45, 2015 dan deteksi gen penyandi resistansi *tetA* dan *tetB* menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil menunjukkan sebanyak 42 isolat *Vibrio parahaemolyticus* tergolong *susceptible* dengan hasil rata-rata zona hambat pada antibiotik tetrasiklin (24,9 mm) dan oksitetrasiklin (22,6 mm), nilai MIC₅₀ (0,5 µg/mL) dan MIC₉₀ (2 µg/mL) pada antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin serta tidak terdapat gen penyandi *tetA* dan *tetB*.

Kata Kunci: *Vibrio parahaemolyticus*, Antibiotik tetrasiklin, Antibiotik oksitetrasiklin, Resistansi Antibiotik dan Budidaya Perairan

ABSTRACT

ASSOCIATION BETWEEN TETRACYCLINE RESISTANCE GENES AND RESISTANCE PHENOTYPE IN *Vibrio parahaemolyticus*

By:
MUHAMMAD GUSHAFIT

Antibiotic resistance and the spread of resistance genes have the potential to pose a threat to public health and food safety. According to the World Health Organization, Multiple Antibiotic Resistance (MAR) in bacteria is a major concern and resistance can be a serious problem that threatens the modern medical system. This study aims to provide information related to the development of tetracycline antibiotic resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in several regions of Indonesia. This study is a descriptive study by conducting antimicrobial susceptibility tests on *Vibrio parahaemolyticus* to tetracycline and oxytetracycline antibiotics using the disk diffusion test method and the minimum inhibitory concentration test. The disk diffusion test was carried out by placing tetracycline and oxytetracycline antibiotic disks (30 µg) on the surface of Mueller-Hinton Agar (MHA) media that had been inoculated with bacteria to see the formation of inhibition zones. The minimum inhibitory concentration test was carried out at antibiotic concentrations of 0.25-256 µg/mL using Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth (CAMHB) media to observe the minimum inhibitory concentration of antibiotics against bacteria. Interpretation of inhibition zone values and minimum inhibitory concentration values refer to CLSI M45, 2015 and detection of *tetA* and *tetB* resistance coding genes using Polymerase Chain Reaction (PCR). The results showed that 42 *Vibrio parahaemolyticus* isolates were classified as susceptible with an average inhibition zone result for tetracycline antibiotics (24.9 mm) and oxytetracycline (22.6 mm), MIC₅₀ values (0.5 µg/mL) and MIC₉₀ (2 µg/mL) for tetracycline and oxytetracycline antibiotics and no *tetA* and *tetB* coding genes.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, tetracycline, oxytetracycline, antibiotic resistance, aquaculture

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Hubungan Keberadaan Gen Resistansi
Antimikroba (*Antimicrobial Resistance Gene*)
Golongan Tetrasiklin dan Fenotipe Resistansinya
pada *Vibrio parahaemolyticus*

Nama : Muhammad Gushafit

NPM : 2117021073

Jurusan/Program Studi : Biologi/S1 Biologi

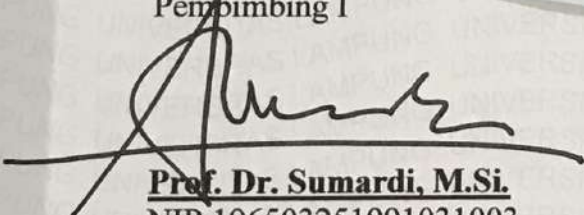
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

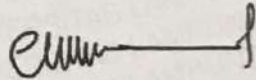
MENYETUJUI

I. Komisi Pembimbing

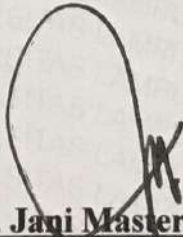
Pembimbing I

Pembimbing II


Prof. Dr. Sumardi, M.Si.
NIP 196503251991031003


Yan Evan, S.Pi., M.Si.
NIP 198705252010121002

II. Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung

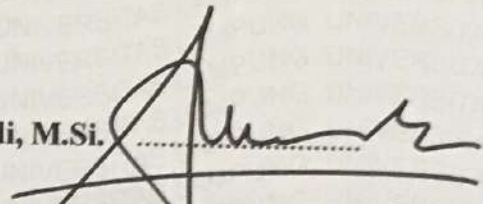

Dr. Jaji Master, S.Si., M.Si.
NIP 198301312008121001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

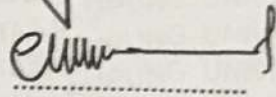
Ketua

: Prof. Dr. Sumardi, M.Si.



Sekretaris

: Yan Evan, S.Pi., M.Si.



Penguji

Bukan Pembimbing

: Dr. Eti Ernawati, M.P.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 1971100112005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 17 Juni 2025

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Muhammad Gushafit
NPM : 2117021073
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul:

**“HUBUNGAN KEBERADAAN GEN RESISTANSI ANTIMIKROBA
(*Antimicrobial Resistance Gene*) GOLONGAN TETRASIKLIN DAN
FENOTIPE RESISTANSINYA PADA *Vibrio parahaemolyticus*”**

Dengan ini menyatakan bahwa apa yang tertulis di dalam karya ilmiah ini adalah hasil karya saya sendiri berdasarkan pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Karya ilmiah ini tidak berisi material yang telah dipublikasikan sebelumnya atau dengan kata lain bukan hasil plagiat karya orang lain. Demikian pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila di kemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ilmiah saya, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 24 Juni 2025

Yang Menyatakan



Muhammad Gushafit
NPM 2117021073

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Natar pada tanggal 16 September 2003.

Penulis merupakan anak terakhir dari 3 bersaudara dari pasangan Bapak Alm. Walyono dan Ibu Saria. Penulis beralamat di Jl. Sidoharjo 1, Desa Negararatu, Kecamatan Natar, Kabupaten Lampung Selatan, Provinsi Lampung.

Penulis mengawali pendidikan pada Taman Kanak-kanak tutwuri handayani pada tahun 2008. Pada tahun 2009 penulis melanjutkan pendidikan di SDN 1 Negararatu, Natar. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan di SMP YBL Natar pada tahun 2015. Pada tahun 2018, penulis melanjutkan pendidikan di SMA Negeri 1 Natar.

Pada tahun 2021, penulis tercatat sebagai salah satu mahasiswa Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN. Selama menempuh pendidikan di Jurusan Biologi FMIPA Unila, penulis pernah menjadi asisten praktikum untuk mata kuliah, Praktik Keterampilan Dasar Laboratorium (PKDL), dan Biologi Sel. Penulis aktif dalam berbagai organisasi kemahasiswaan, di antaranya Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) FMIPA Unila, sebagai Anggota Biro Kesekretariatan dan Logistik (Kalog) pada tahun 2021–2022, serta menjabat sebagai kepala Biro Kalog pada tahun 2022–2023. Penulis juga terlibat dalam kepanitiaan berbagai acara yang diselenggarakan oleh HIMBIO, seperti Pekan Konservasi Sumber Daya Alam (PKSDA) ke-XXVI dan XXVII sebagai anggota Sub-Acara Pameran Konservasi dan Bazar .

Pada bulan Desember 2023 – Februari 2024, penulis telah melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL), Serang dengan Judul **“Nilai Hematologi Komparatif, Pengamatan Morfologi dan Morfometri Sel Darah Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dan Ikan Lele (*Clarias batrachus*) di Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL) Serang”**. Kemudian pada bulan Juni – Agustus 2024 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Ngesti Karya, Kecamatan Waway Karya, Kabupaten Lampung Timur, Lampung. Pada tahun 2024, penulis mengikuti Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) di Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL), Serang, Banten pada Laboratorium Patologi, Mikrobiologi dan Biomolekuler.

PERSEMBAHAN



Dengan mengucapkan rasa syukur kepada Allah SWT. yang telah memberikan rahmat, nikmat, hidayah, dan ridha-Nya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

Kedua orang tua saya tercinta, Bapak Alm.Walyono dan Ibu Saria, yang telah memfasilitasi, memberikan kasih sayang dan doa yang tidak pernah terputus.

Kedua kakak saya tersayang, Fitri Wulandari dan Lis Kurniawati, yang selalu memberikan semangat

Bapak dan Ibu dosen yang sedia membimbing dan mengarahkan saya

Seluruh pihak yang terlibat dalam proses perjalanan hidup saya

MOTTO

“Allah tidak pernah menaruh tanggung jawab dibahu yang salah, jika kamu terpilih, maka kamu mampu.”

(Q.S Al-Baqarah:286)

“Life is not about Expecting, Hoping and Wishing. It’s about Being, Doing and Becoming.”

(Mike Dooley)

“Work Hard in Silence, let Success be your Noise.”

(Frank Ocean)

“Every Moment, Every Place, Every Joy and Every Struggle has a Purpose.”

(Penulis)

“Banyak kegagalan dalam hidup ini, dikarenakan orang-orang tidak menyadari betapa dekatnya mereka dengan keberhasilan saat mereka menyerah.”

SANCWACANA

Alhamdulillahirobbilalamiin,

Puji syukur atas kehadiran Allah, Tuhan yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, yang telah memberikan segala nikmat dan karunia-Nya. Saya mengucapkan rasa syukur yang mendalam atas segala berkah dan bimbingan-Nya yang tak terhingga sehingga Skripsi dengan judul, **“HUBUNGAN KEBERADAAN GEN RESISTANSI ANTIMIKROBA (*Antimicrobial Resistance Gene*) GOLONGAN TETRASIKLIN DAN FENOTIPE RESISTANSINYA PADA *Vibrio parahaemolyticus*”** yang menjadi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Sains di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung ini dapat diselesaikan.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat banyak kekurangan dalam proses penulisan skripsi ini, namun penulis sangat bersyukur karena mendapatkan banyak dukungan, bimbingan, serta bantuan dari berbagai pihak sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua saya, Bapak Alm.Walyono dan Ibu Saria yang selalu memberikan doa dan kasih sayang yang tiada henti
2. Kedua kakak saya, Fitri Wulandari dan Lis Kurniawati yang selalu memberikan semangat dalam menyelesaikan studi ini

3. Ibu Prof. Dr. Lusmeilia Afriani, D.E.A, IPM., ASEAN Eng., selaku Rektor Universitas Lampung
4. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. Selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung
5. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si. Selaku Ketua Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung
6. Ibu Dr. Kusuma Handayani, M.Si. Selaku Ketua Program Studi S1 Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung
7. Bapak Prof. Dr. Sumardi, M.Si. Selaku pembimbing utama yang telah membimbing dan memberikan arahan selama penyusunan skripsi penulis
8. Bapak Yan Evan, S.Pi., M.Si. Selaku pembimbing kedua yang selalu memberikan motivasi dan masukan selama penyusunan skripsi
9. Ibu Dr. Eti Ernawati, M.P. selaku dosen pembahas yang sudah memberikan saran dan arahan agar penulisan skripsi penulis lebih baik
10. Ibu Dinarti, selaku pembimbing lapang yang sedia menemani, membimbing dan memfasilitasi dari persiapan hingga selesai
11. Ibu Gina Dania Pratami, S.Si., M.Si. Selaku pembimbing akademik penulis
12. Bapak dan Ibu Dosen Biologi yang telah memberikan ilmu selama perkuliahan
13. Bapak drh. Toha Tusihadi selaku Kepala Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL), Serang
14. Analis Laboratorium Mikrobiologi (Pak Suherman, Bu Inggar, Bu Riris) yang menemani dan membantu penulis selama riset
15. Teman-teman Mikrobiologi (Kak Mutaal, Mba Ica, Rafly, Cintya dan Alya) yang telah menemani dan menghibur penulis selama riset
16. Kepada sahabatku terhebat, Nurul Isnaini, Rara Nur Aini, dan Risa Dita Adifitri yang selalu memberikan motivasi, semangat dan bersedia menjadi rumah untuk berkeluh kesah penulis
17. Kepada seluruh pihak yang terlibat dalam perjalanan hidup saya

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih terdapat banyak kekurangan, baik

dalam pelaksanaan penelitian maupun dalam penyusunan skripsi. Akan tetapi, penulis berharap semoga skripsi ini dapat diterima dan bermanfaat bagi kita yang membutuhkan.

Bandar Lampung, 24 Juni 2025

Penulis

Muhammad Gushafi

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
MENGESAHKAN	vi
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	vii
RIWAYAT HIDUP	viii
PERSEMBAHAN.....	x
MOTTO	xi
SANCWACANA	xii
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Kerangka Pemikiran	5
1.5 Hipotesis Penelitian	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7
2.2 Antibiotik Tetrasiklin	8
2.3 Antibiotik Oksitetrasiklin	9
2.4 <i>Antimicrobial Resistance</i> (AMR)	10
2.5 <i>Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (AST)	12
2.5.1 <i>Disk Diffusion Susceptibility Testing</i>	12
2.5.2 <i>Broth Dilution Susceptibility Tests</i>	13
2.6 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	13

III. METODE PENELITIAN	15
3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian.....	15
3.2 Alat dan Bahan	15
3.3 Sampel Penelitian	16
3.4 Prosedur Penelitian.....	16
3.4.1 Subkultur dan Re-Identifikasi <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	16
3.4.2 Uji Cakram Difusi (<i>Disk Diffusion</i>).....	18
3.4.3 Uji Konsentrasi Hambat Minimum (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>).....	20
3.4.4 Deteksi Gen Penyandi Resistansi Antibiotik	24
3.5 Analisis Data	27
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1 Hasil Penelitian.....	28
4.1.1 Hasil Subkultur dan Reidentifikasi	28
4.1.2 Hasil Uji Cakram Difusi (<i>Disk Diffusion</i>)	31
4.1.3 Hasil Uji Konsentrasi Hambat Minimum (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>).....	34
4.1.4 Hasil Deteksi Gen Penyandi Resistansi	36
4.2 Pembahasan	39
V. SIMPULAN DAN SARAN	51
5.1 Simpulan.....	51
5.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN.....	61

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1 . Interpretasi zona hambat cakram difusi pada <i>Vibrio</i> sp.	20
2 . Interpretasi Nilai <i>Quality Control</i> (QC) ATCC <i>E.coli</i> 25922.....	20
3 . Interpretasi Nilai <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC) pada <i>Vibrio</i> sp...24	24
4 . Interpretasi Nilai <i>Quality Control</i> (QC) <i>E.coli</i> ATCC 25922.....	24
5 . Target gen dan primer untuk deteksi gen penyandi resistansi	25
6 . Komposisi <i>Mastermix</i>	25
7 . Pengamatan Isolat <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	29
8 . Hasil Pengujian Isolat <i>V.parahaemolyticus</i> metode PCR Konvensional.....	30
9 . Hasil uji cakram difusi <i>V.parahaemolyticus</i> terhadap antibiotik.....	32
10 . Nilai <i>minimum inhibitory concentration</i> (MIC) pada isolat <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	35
11 . Hasil deteksi gen penyandi resistansi metode PCR konvensional	37
12 . Primer untuk mendeteksi gen <i>tetA</i> dan <i>tetB</i>	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1 . Koloni <i>Vibrio parahaemolyticus</i> pada media <i>Hicrome</i>	8
2 . Pewarnaan Gram <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8
3 . Struktur Tetrasiklin	8
4 . Struktur Oksitetrasiklin	9
5 . Mekanisme transfer gen horizontal	11
6 . Tahapan PCR	14
7 . Mekanisme subkultur dan reidentifikasi	18
8 . Mekanisme uji cakram difusi	20
9 . Mapping <i>microplate</i>	23
10 . Mekanisme uji konsentrasi hambat minimum	24
11 . Mekanisme deteksi gen penyandi resistansi	27
12 . Isolat <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	28
13 . Deteksi <i>V.parahaemolyticus</i> metode PCR konvensional.....	29
14 . Hasil uji cakram difusi pada antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin.....	32
15 . Hasil uji konsentrasi hambat minimum (MIC)	34
16 . Hasil visualisasi deteksi gen <i>tetA</i>	36
17 . Hasil visualisasi deteksi gen <i>tetB</i>	37
18 . Grafik hasil interpretasi zona hambat pada isolat <i>V.parahaemolyticus</i>	42
19 . Grafik hasil interpretasi nilai MIC antibiotik tetrasiklin pada isolat <i>V.parahaemolyticus</i>	43
20 . Grafik hasil interpretasi nilai MIC antibiotik oksitetrasiklin pada isolat <i>V.parahaemolyticus</i>	43

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Komoditas ekspor dan impor kini sangat berkembang pesat di Indonesia, salah satu bagian komoditas ekspor yaitu komoditas budidaya perairan yang cukup tinggi perkembangannya yaitu budidaya udang. Budidaya udang menjadi bagian dari salah satu komoditas unggulan pada sektor perikanan. Menurut data statistik ekspor-impor Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) pada tahun 2023, Indonesia sendiri telah mengekspor 220 ribu ton udang ke berbagai negara, dengan nilai pendapatan 1,729 juta USD. Dengan berkembangnya komoditas ekspor ini dapat meningkatkan nilai perekonomian dalam sektor perikanan di Indonesia.

Berdasarkan data Kementerian Kelautan dan Perikanan, pada tahun 2019 Indonesia berada di posisi nomor 4 dalam ekspor udang beku terbanyak di dunia. Menurut Miar dkk., (2020), potensi tersebut menunjukkan adanya peningkatan nilai produk domestik bruto dari tahun 2015 sebanyak 5,3 juta ton meningkat menjadi 6,2 juta ton pada tahun 2018. Udang putih pasifik (*Litopenaeus vannamei*) menjadi salah satu komoditas budidaya udang yang paling sukses dibudidayakan dan menyumbang hingga 80% dari produksi jenis udang budidaya lainnya (Prathiviraj dkk., 2021). Menurut FAO (2020), produksi *L. vannamei* di seluruh dunia mencapai 5.812,18 ribu ton dan senilai lebih dari 33 juta USD pada tahun 2020. Namun, terdapat ancaman dalam hal kualitas produk sehingga menyebabkan penolakan pada ekspor produk perikanan di negara tujuan (Nurilmala dkk., 2020). Menurut Schmidt dkk., (2018), salah satu permasalahan tersebut disebabkan oleh adanya kontaminasi

bakteri patogen pada produk perikanan mulai dari proses budidaya sampai pengolahan produk. Produk makanan yang dibudidayakan dapat berpotensi terkontaminasi oleh mikroba kontaminan yang mampu menyebabkan resiko serius terhadap keamanan makanan dan kesehatan manusia (Stentiford dkk., 2022). Menurut Alfiansyah dkk., (2020), bakteri patogen dapat diperoleh udang melalui air pemeliharaan yang tercemar dan kontaminasi silang yang dapat berasal dari manusia dan hewan. Bakteri yang menyebabkan beberapa penyakit yang ditularkan melalui makanan termasuk infeksi yang disebabkan oleh *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio* spp., *Shigella* spp., dan penghasil racun seperti *Staphylococcus aureus* dan *Clostridium botulinum* (Kim dan Lee, 2017).

Salah satu bakteri yang umum menyerang udang pada proses budidaya udang adalah infeksi bakteri *Vibrio*. *Vibrio* spp. merupakan bakteri alami pada lingkungan perairan payau seperti pantai atau muara sungai dan umum terdapat selama kegiatan budidaya udang (Vandenberghe dkk., 2003). Menurut Ceccarelli dkk., (2013), salah satu spesies *Vibrio* spp. yang bersifat patogen terhadap komoditas udang maupun manusia yaitu *Vibrio parahaemolyticus*. Bakteri ini terdapat secara alami pada lingkungan perairan dan sering dijumpai di lingkungan budidaya udang (Newton dkk., 2012). Menurut Jiang dkk., (2017), *Vibrio parahaemolyticus* termasuk dalam bakteri gram negatif, berbentuk batang, bersifat halofilik, dan membutuhkan salinitas pada proses pertumbuhannya. Bakteri ini dapat mengkontaminasi makanan dan berhabitat dari perairan payau, muara dan laut (Chen dkk., 2018). *Vibrio parahaemolyticus* dapat menyebabkan penyakit Gastroenteritis pada manusia dengan gejala klinis yaitu kram perut, demam, mual, muntah, dan diare yang disertai darah (Chen dkk., 2018). Menurut Alam dkk., (2002), *Vibrio parahaemolyticus* menjadi salah satu penyebab utama dari 20-30% kasus Gastroenteritis pada manusia yang terjadi di negara-negara asia termasuk Jepang, Hong kong, Thailand, dan Indonesia. Bakteri ini dapat masuk ke sistem gastrointestinal manusia melalui konsumsi udang mentah atau kurang matang yang telah terkontaminasi *Vibrio parahaemolyticus* (Faruque, 2012).

Menurut Labbe dan Garcia (2013), bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yang telah menemukan kondisi optimal pada bagian gastrointestinal manusia akan melakukan kolonisasi organisme inang untuk mendapat nutrisi dengan tujuan mempertahankan pertumbuhannya.

Dalam upaya mengatasi kontaminasi *Vibrio parahaemolyticus* pada lingkungan perairan budidaya, biasanya para pembudidaya menggunakan Antibiotik sebagai alternatif dalam pengobatan. Menurut Rodrigues de Melo dkk., (2011), penggunaan senyawa antibiotik berkaitan untuk menekan keberadaan bakteri *Vibrio* spp. yang bersifat patogen di area tambak. Antibiotik dapat digunakan sebagai pencegahan, pengobatan penyakit dan peningkatan pertumbuhan udang. Dikutip dari *European Federation of Animal Health* (1998), sebanyak 50% dari seluruh produksi antibiotik digunakan dalam produksi hewan untuk pangan dan peternakan di Eropa dan Amerika Utara. Salah satu antibiotik yang umum digunakan oleh pembudidaya dalam mengatasi infeksi bakteri yaitu antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin. Antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin berperan dalam menghambat sintesis protein dan mengganggu ribosom unit pada bakteri sehingga bakteri tidak dapat bertahan dan mengalami kematian (Dev dkk., 2020). Namun, penggunaan antibiotik yang tidak tepat dan terus menerus pada budidaya udang dapat memicu terjadinya resistansi antibiotik pada bakteri. Resistansi juga dapat diperoleh melalui proses transduksi, transformasi, konjugasi atau mutasi pada DNA kromosomnya (Lerminiaux dan Cameron, 2019). Menurut Garima dkk., (2018), mekanisme resistansi antibiotik dapat dibagi menjadi empat kategori yaitu, pembatasan penyerapan obat, modifikasi target obat, inaktivasi obat dan efluks obat. Karena terdapat perbedaan struktural, bakteri Gram-negatif dapat menggunakan empat mekanisme ini dibandingkan bakteri Gram-positif. Zafran dkk., (1997) melaporkan bahwa terdapat beberapa jenis antibiotik yang secara rutin diterapkan oleh pembudidaya udang di Indonesia dan menyebabkan munculnya strain *Vibrio* spp. yang resistan terhadap antibiotik. Yano dkk.,

(2014) menemukan *Vibrio parahaemolyticus* di lingkungan tambak udang resistan terhadap ampisilin dan oksitetrasiklin sebesar 72% dan 3%.

Resistensi antibiotik dan penyebaran gen penyandi memiliki potensi bahaya yang tidak hanya berdampak pada keberlanjutan dan keamanan budidaya udang, namun juga berpotensi menimbulkan bahaya terhadap kesehatan masyarakat dan keamanan pangan (Wang dkk., 2019). *World Health Organization* (WHO, 2014) menyatakan, *Multiple Antibiotic Resistance* (MAR) pada bakteri menjadi perhatian utama dan resistansi dapat menjadi masalah serius yang mengancam sistem pengobatan modern. Hal tersebut disebabkan oleh mikroorganisme resistan dapat tumbuh pada konsentrasi antibiotik yang biasanya mampu untuk membunuh mikroorganisme tersebut (EFSA dan ECDC, 2009). Menurut laporan *World Health Organization* (WHO) tahun 2019, resistansi antibiotik bertanggung jawab atas 700.000 kasus kematian, sementara diperkirakan pada tahun 2050 angka tersebut akan meningkat menjadi 20 juta, dengan biaya lebih dari 2,9 triliun USD. Oleh karena itu, dilakukannya penelitian ini yang bertujuan untuk mengetahui dan memberikan informasi terkait perkembangan resistansi antibiotik golongan tetrasiklin terhadap *Vibrio parahaemolyticus* di beberapa wilayah yaitu Lampung, Banten dan Jawa Tengah.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini yaitu sebagai berikut.

1. Mendeteksi resistansi *Vibrio parahaemolyticus* terhadap antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin secara fenotipe
2. Mendeteksi keberadaan gen penyandi resistansi antibiotik golongan tetrasiklin terhadap *Vibrio parahaemolyticus* yang diisolasi dari udang dan air budidaya

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu dapat memberikan gambaran dan informasi terkait perkembangan resistansi antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus*.

1.4 Kerangka Pemikiran

Keberadaan bakteri patogen seperti *Vibrio parahaemolyticus* pada lingkungan budidaya akan memberikan dampak negatif terhadap kualitas produksi.

Kemampuan bakteri patogen dalam menginfeksi dapat terjadi secara cepat dan mudah menular. Hal tersebut akan mempengaruhi hasil panen dan menimbulkan kerugian. Solusi dalam permasalahan bakteri patogen yang mengancam usaha budidaya yaitu menggunakan antibiotik dalam pencegahan dan pengobatan. Salah satu antibiotik yang umum diterapkan dalam akuakultur yaitu antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin. Antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin memiliki mekanisme dengan menghambat sintesis protein dan mengganggu ribosom unit pada bakteri, sehingga bakteri tidak dapat bertahan. Namun, penggunaan antibiotik yang tidak tepat dan berlebihan akan memicu terjadinya resistansi. Permasalahan kembali muncul jika strain bakteri patogen mengalami resistansi terhadap antibiotik.

Resistansi antibiotik merupakan mekanisme pertahanan diri pada bakteri untuk menjadi kebal terhadap antibiotik. Mekanisme ini dapat diperoleh secara alami melalui evolusi, mutasi genetik atau transfer gen resistan dari bakteri lain di lingkungannya. Pengujian fenotipe kepekaan antimikroba dilakukan untuk mengamati dan mengetahui pola resistansi bakteri secara klinis. Pengujian genotipe melalui molekuler menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan untuk melihat keberadaan gen penyandi resistansi. Tujuan dilakukan pengujian kepekaan antimikroba secara fenotipe dan deteksi gen penyandi resistansi yaitu untuk melihat perkembangan resistansi antibiotik golongan tetrasiklin terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Hasil yang diperoleh akan memberikan gambaran terkait perkembangan resistansi antibiotik golongan tetrasiklin terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* serta dapat memberikan informasi terkait

kelayakan penggunaan antibiotik golongan tetrasiklin untuk pengobatan infeksi bakteri *Vibrio parahaemolyticus*.

1.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini yaitu sebagai berikut.

1. Terdapat bakteri *Vibrio parahaemolyticus* resistan terhadap antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin secara fenotipe
2. Terdapat gen penyandi resistansi antibiotik golongan tetrasiklin pada *Vibrio parahaemolyticus* yang diisolasi dari udang dan air budidaya

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Vibrio parahaemolyticus*

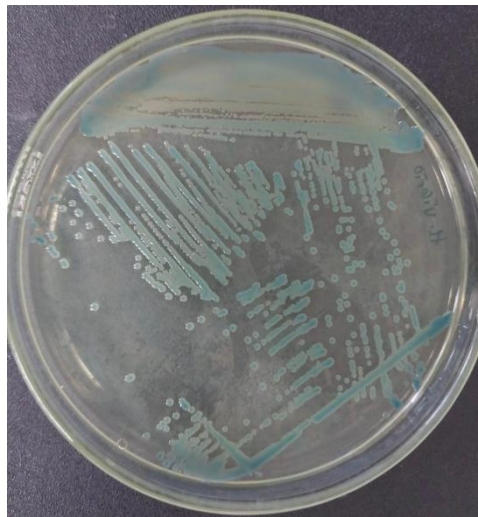
Vibrio parahaemolyticus merupakan bakteri motil, gram negatif dan bersifat halofilik yang secara alami terdapat di perairan payau dan laut (Ceccarelli dkk., 2013). Menurut Gode-Potratz dkk., 2011), *V. parahaemolyticus* biasanya ditemukan dalam keadaan berenang bebas dengan satu flagel menempel pada permukaan benda mati dan hidup seperti zooplankton, ikan, kerang atau bahan yang tersuspensi apapun dibawah air. Strain *V. parahaemolyticus* yang virulen ditularkan melalui konsumsi makanan laut mentah atau setengah matang yang dapat menyebabkan gastroenteritis akut (Newton dkk., 2012).

Klasifikasi *Vibrio parahaemolyticus* menurut Kanagawa (1985) dalam Marlina (2004) sebagai berikut.

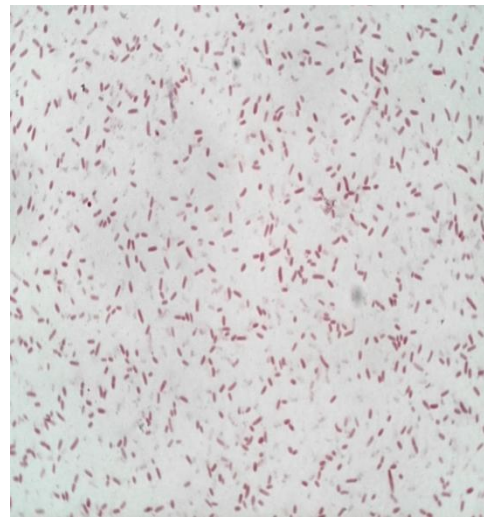
Kingdom	:	Bacteria
Filum	:	Protobacteria
Class	:	Gammaproteobacteria
Order	:	Vibrionales
Family	:	Vibrionaceae
Genus	:	<i>Vibrio</i>
Species	:	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

Strain *Vibrio parahaemolyticus* memiliki sejumlah faktor virulensi yang berbeda termasuk *adhesin*, *thermostable direct hemolysin (tdh)* dan *thermostable related hemolysin (trh)* serta dua *type 3 secretion system* (T3SS), yaitu T3SS1 dan T3SS2 (Makino dkk., 2003). Menurut Paranjpye .

dkk., (2012), strain *V.parahaemolyticus* dikodekan dengan T3SS1 untuk memastikan kelangsungan hidupnya di lingkungan. T3SS1 memiliki sejumlah faktor virulensi yang menyebabkan lisis sel inang yang terinfeksi dan memungkinkan pelepasan nutrisi penting (Burdette dkk., 2008). Selain itu, beberapa strain *V.parahaemolyticus* memperoleh T3SS2, gen *tdh* dan *trh* yang mengarah ke sejumlah strain dengan tingkat patogenitas yang berbeda. Selain gen T3SSs dan *tdh*, *V.parahaemolyticus* mempunyai dua jenis *flagella* yang berbeda yang berfungsi untuk berenang berkerumun dan kemampuan untuk menghasilkan kapsul. Kedua *flagella* ini memungkinkan membantu dalam kelangsungan hidup strain *V.parahaemolyticus* di lingkungan dan juga dalam kolonisasi pada inang manusia (Broberg dkk., 2011)

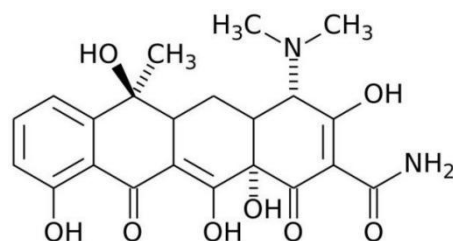


Gambar 1. Koloni *Vibrio parahaemolyticus* pada media Hicrome



Gambar 2. Pewarnaan Gram *Vibrio parahaemolyticus*

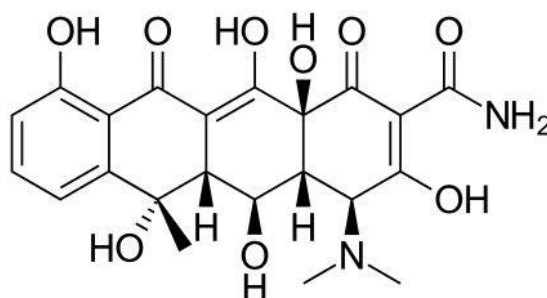
2.2 Antibiotik Tetrasiklin



Gambar 3. Struktur Tetrasiklin

Antibiotik tetrasiklin ditemukan pada tahun 1940-an yang merupakan antibiotik bakteriostatik yang menghambat sintesis protein dengan mencegah perlekatan aminoasil-tRNA ke situs akseptor ribosom (A). Tetrasiklin adalah agen berspektrum luas yang menunjukkan aktivitas terhadap berbagai jenis bakteri gram positif dan gram negatif, organisme seperti klamidia, mikoplasma, riketsia serta parasit protozoa. Sifat antimikroba yang menguntungkan dari antibiotik ini menyebabkan penggunaannya yang luas dalam pengobatan infeksi pada manusia dan hewan (Chopra dan Robert, 2001). Menurut Olson (2014), mekanisme kerja antibiotik tetrasiklin yaitu dengan menghambat ikatan antara tRNA dan asam amino. Tetrasiklin berikatan secara reversibel pada subunit 30S ribosom bakteri, mencegah ikatan aminoasil-tRNA pada lokasi reseptor di kompleks mRNA ribosom yang mencegah penambahan asam amino ke peptida yang sedang terbentuk.

2.3 Antibiotik Oksitetrasiklin



Gambar 4. Struktur Oksitetrasiklin

Oksitetrasiklin menjadi antibiotik dengan spektrum luas dari golongan tetrasiklin yang memiliki fungsi dengan menghambat sintesis protein pada bakteri (Dev dkk., 2020). menurut Dewi dkk., (2019), antibiotik oksitetrasiklin termasuk ke dalam jenis antibiotik yang hanya dapat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik). Mekanisme kerja antibiotik ini serupa dengan antibiotik tetrasiklin karena masih satu golongan yang sama. Menurut Pratiwi (2017), ketika antibiotik melewati membran sel, senyawa antibiotik tersebut dapat dihilangkan oleh bakteri menggunakan pompa pembuangan (*Efflux Pumps*) . Bakteri dapat mengembangkan pompa

pembuangan untuk menghilangkan antibodi dari sitoplasma lebih cepat daripada kemampuan senyawa antibiotik dalam berdifusi. Pompa tersebut juga dapat digunakan oleh bakteri untuk mengeluarkan senyawa antibiotik dari sel ke lingkungan.

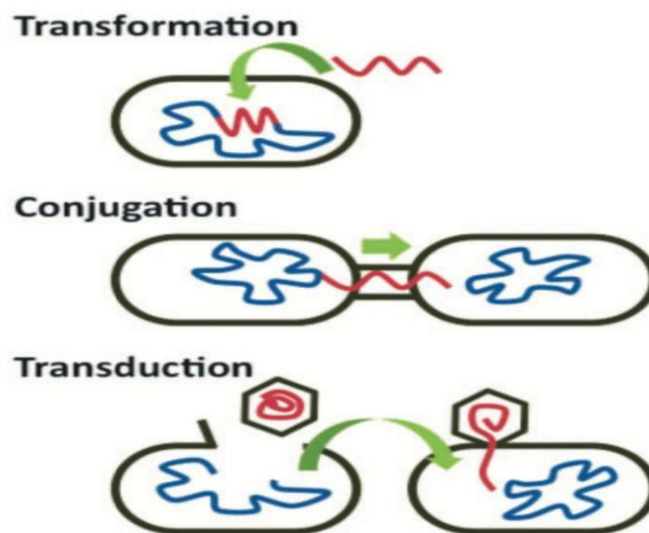
2.4 Antimicrobial Resistance (AMR)

Resistensi antimikroba (AMR) telah muncul sebagai salah satu masalah kesehatan masyarakat utama di abad ke-21 yang mengancam pencegahan dan pengobatan secara efektif terhadap berbagai macam infeksi yang disebabkan oleh bakteri, parasit, virus, dan jamur yang tidak lagi rentan terhadap obat-obatan umum yang digunakan untuk mengobatinya. Masalah resistansi antibiotik sangat mendesk terutama terkait dengan resistansi antibiotik pada bakteri. Resistansi antibiotik merupakan fenomena alami yang terjadi ketika mikroorganisme terpapar obat antibiotik. Di bawah tekanan selektif antibiotik, bakteri yang rentan dibunuh atau dihambat, sementara bakteri yang secara alami (intrinsik) resistan atau yang telah memperoleh resistansi antibiotik memiliki peluang yang lebih besar untuk bertahan dan berkembang biak. Bukan hanya penggunaan antibiotik yang berlebihan, namun penggunaan yang tidak tepat, pilihan yang tidak tepat dan dosis yang tidak tepat akan meningkatkan risiko resistansi antibiotik (Prestinaci dkk., 2015).

Resistensi diartikan sebagai tidak terhambatnya pertumbuhan bakteri dengan pemberian antibiotik secara sistemik dengan dosis normal yang seharusnya atau kadar hambat minimalnya. Resistansi terjadi ketika bakteri berubah dalam satu atau lain hal yang menyebabkan terjadinya penurunan atau hilangnya efektivitas obat, senyawa kimia atau bahan lain yang digunakan untuk mencegah dan mengobati infeksi. Bakteri yang mampu bertahan hidup dan berkembang biak, dapat menimbulkan lebih banyak bahaya (Kurniawati, 2015).

Penyebaran gen resistansi dapat terjadi secara horizontal melalui transfer gen. Transfer gen dapat terjadi melalui beberapa proses seperti transformasi yaitu

perolehan DNA dari lingkungan, lalu transduksi yaitu perolehan DNA dari bakteriofage (virus bakteri) yang memindahkan gen dari satu sel ke sel lainnya, dan melalui proses konjugasi yaitu perolehan gen secara langsung oleh bakteri (Burmeister, 2015). Plasmid merupakan elemen genetik ekstrakromosomal yang bereplikasi secara independen dari kromosom. Plasmid dapat menyebar melalui populasi bakteri terutama melalui proses konjugasi. Konjugasi memerlukan kontak fisik antara dua sel dalam lingkungan yang sama, diikuti dengan pembentukan jembatan yang memungkinkan transfer plasmid dari donor ke sel penerima (Blair dkk., 2015). Setelah plasmid masuk tiba di sel inang baru, plasmid ditransposabel dengan elemen-elemen tersebut selanjutnya dapat bereplikasi, hal tersebut mampu memobilisasi *Antimicrobial Resistance Gene* (ARG) ke plasmid lain atau ke kromosom (Ludden dkk., 2017). Dengan demikian, transposon dapat menciptakan dinamika transmisi dimana ARG dalam transposon dapat ditransfer ke plasmid lain dan dengan demikian meningkatkan potensi ARG untuk ditransmisikan ke bakteri lain melalui konjugasi (Conlan dkk., 2014).



Gambar 5. Mekanisme transfer gen horizontal

2.5 *Antimicrobial Susceptibility Testing (AST)*

Pengujian *Antimicrobial Susceptibility Testing (AST)* diindikasikan ketika terapi diperlukan untuk infeksi yang disebabkan oleh suatu organisme yang profil resistansinya tidak dapat diprediksi secara pasti. *Antimicrobial Susceptibility Testing (AST)* paling sering diindikasikan ketika organisme penyebab dianggap berasal dari spesies yang menunjukkan resistansi terhadap agen antimikroba yang umum digunakan. Kategori interpretatif berdasarkan respon *in vitro* suatu organisme terhadap agen antimikroba sebagai berikut: *Susceptible (S)*, yaitu kategori yang menyiratkan bahwa isolat dihambat oleh konsentrasi agen antimikroba yang biasanya dapat dicapai ketika dosis yang dianjurkan untuk mengobati infeksi. Selanjutnya *Intermediate (I)*, yaitu kategori yang mencakup isolat dengan konsentrasi penghambatan minimal (MIC) agen antimikroba yang biasanya dapat dicapai dan tingkat responnya lebih rendah dibandingkan isolat yang rentan. Kemudian *Resistant (R)*, yaitu kategori yang menyiratkan bahwa isolat tidak dihambat oleh konsentrasi yang biasanya dapat dicapai dengan dosis normal atau yang menunjukkan diameter zona yang berada dalam kisaran pada mekanisme resistansi mikroba tertentu (CLSI, 2015).

Terdapat dua pengujian untuk *Antimicrobial Susceptibility Testing (AST)* menurut CLSI (2015) yaitu:

2.5.1 *Disk Diffusion Susceptibility Testing*

Metode pengujian aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan menggunakan cara difusi dan dilusi. Metode *disk diffusion* atau yang disebut dengan tes *Kirby and Bauer*, *Distch Plate Technique*, atau *Cup Plate Technique* (Khasanah dan Nugraheni, 2021). Menurut Balaouri dkk., (2016), prinsip kerja dari metode *disk diffusion* yaitu terdifusinya senyawa antibakteri ke dalam media padat dimana mikroba uji telah diinokulasikan dalam media padat. Daerah bening yang terbentuk di sekitar cakram menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri.

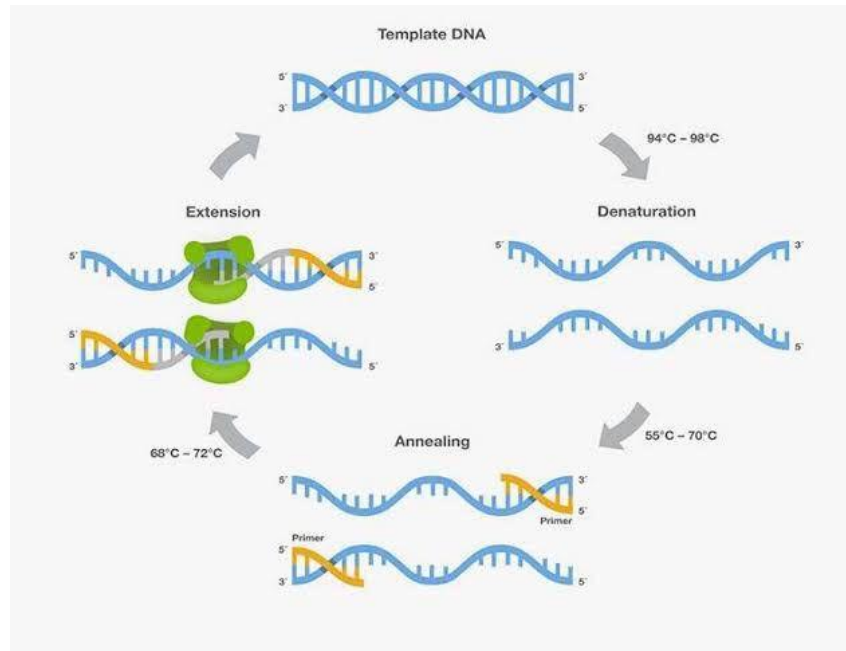
2.5.2 *Broth Dilution Susceptibility Tests*

Pengujian aktivitas antibakteri dikenal dengan konsentrasi hambat minimum (KHM) atau MIC. Konsentrasi hambat minimum adalah konsentrasi antibiotik terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan organisme tertentu. KHM dapat ditentukan dengan metode dilusi atau tabung enceran (Harmita dan Radji, 2008). Menurut CLSI (2015), *Broth Dilution Susceptibility Tests* dapat digunakan untuk mengukur secara kuantitatif pada aktivitas *in vitro* suatu zat antimikroba dalam kultur bakteri tertentu. Namun MIC yang diperoleh tidak mewakili nilai absolut. MIC sebenarnya berada diantara konsentrasi uji terendah yang menghambat pertumbuhan organisme dan konsentrasi uji terendah berikutnya.

2.6 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA (McPherson dan Moller, 2006). teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam (Setyawati dkk., 2021). PCR melibatkan tiga tahap siklus temperatur yang berurutan yaitu denaturasi *template* (94-95°C), *annealing* (penempelan) pasangan primer pada untai ganda DNA target (50-60°C) dan pemanjangan (72°C). Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan hasil PCR diantaranya yaitu, konsentrasi dan kualitas DNA, temperatur *annealing* dari kedua primer, konsentrasi MgCl₂, enzim polimerase, konsentrasi dan kualitas primer, jumlah siklus PCR, *deoksinukleotida triphosphate* (dNTP), dan faktor lain seperti *buffer* (Gelfand dan White, 1990). Menurut Fatimi (2010), hasil amplifikasi DNA dengan PCR konvensional, pengamatan keberadaan DNA dilakukan pada tahap akhir reaksi menggunakan *agarose* setelah dilakukan proses elektroforesis. Sedangkan analisis menggunakan *Real Time PCR* memungkinkan untuk dilakukan pengamatan pada saat reaksi berlangsung, keberadaan DNA hasil amplifikasi dapat diamati pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi dari *probe* (penanda). pada *Real Time PCR* pengamatan hasil tidak

lagi membutuhkan tahap elektroforesis, sehingga tidak lagi membutuhkan *agarose* dan penggunaan *Ethidium Bromide* (EtBr) yang merupakan senyawa karsinogenik.



Gambar 6. Tahapan PCR

III.METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2024 - Februari 2025 dan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomolekuler, Balai Pengujian Kesehatan Ikan dan Lingkungan (BPKIL), Serang, Banten.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu, ose, inkubator, *bacticenerator*, cawan petri steril, tabung reaksi steril, *refrigerator*, pinset steril, *vortex mixer*, mikropipet, multikanal mikropipet, labu takar, gelas piala, *sprayer bottle*, autoklaf, *Biosafety cabinet class IIA*, neraca analitik, batang pengaduk, densitometer, penangas air, *deep freezer*, *thermo block*, *multiscan spectrophotometer*, *PCR thermacycler*, mesin elektroforesis, dan *gel documentation system*.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu, isolat bakteri *Vibrio parahaemolyticus*, bakteri kontrol *E.coli* ATCC 25922, *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Cation Adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB), *Tryptic Soy Agar* (TSA), *Tryptic Soy Broth* (TSB), *Vibrio Chromoselect Agar* (VCA), *Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar* (TCBSA), larutan standar turbiditas 0,5 McFarland, larutan garam fisiologis, *sodium chloride* (NaCl), kit pewarnaan Gram, *microplate 96-well*, tabung mikro berbagai ukuran, mikrotip berbagai ukuran, *cotton swab* steril, kaca preparat, *agarose*, *Go-Taq Green PCR Mastermix*, set PCR Primer, akuades, *buffer* TAE, alkohol 70%, cakram standar antibiotik tetrasiklin dan larutan standar antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa sampel isolat arsip. Isolat yang akan dipergunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 42 isolat arsip bakteri *V. parahaemolyticus* koleksi BPKIL Serang. Isolat tersebut dikoleksi dari tambak udang pada beberapa provinsi di Indonesia yaitu Banten, Jawa Tengah dan Lampung. Isolat merupakan hasil isolasi bakteri dari organ hepatopankreas udang komoditas budidaya serta air tambak budidaya.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Subkultur dan Re-Identifikasi *Vibrio parahaemolyticus*

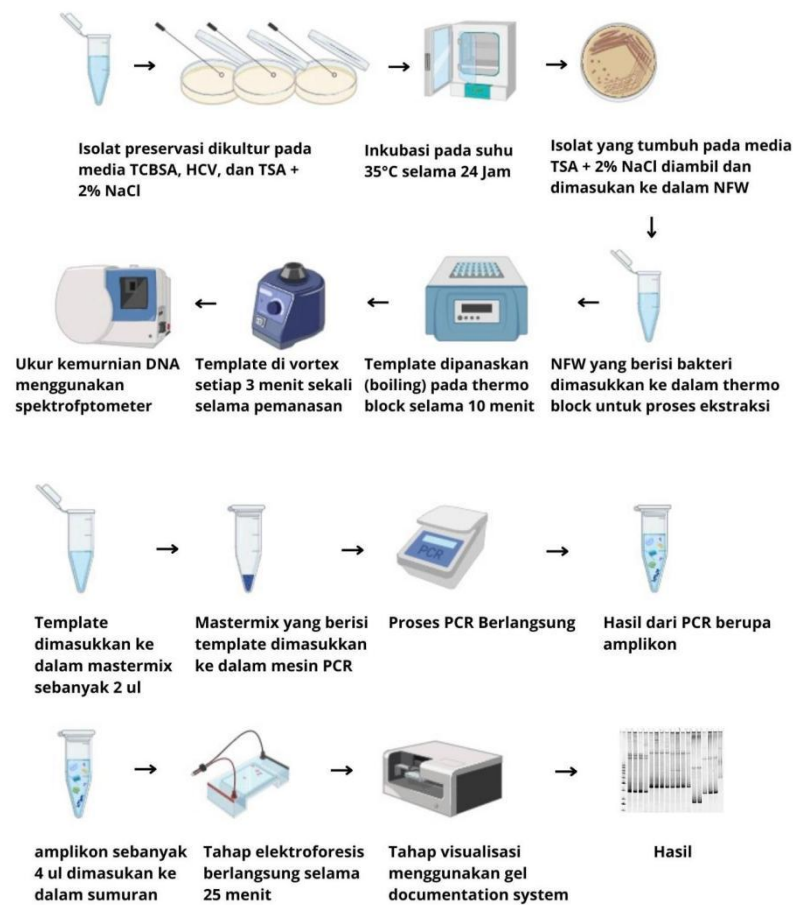
a) Subkultur *Vibrio parahaemolyticus*

Sebanyak 42 sampel isolat arsip *Vibrio parahaemolyticus* dikultur dari preservasi gliserol ke media *Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar* (TCBSA) dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35°C. Koloni yang tumbuh pada media TCBSA dan berwarna hijau berukuran 3-5 mm diambil dan dipindahkan ke media *Hicrome Vibrio Agar* (HVA) dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam. Koloni yang tumbuh pada media HVA yang berwarna hijau kebiruan ditumbuhkan pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) yang diperkaya 2% NaCl kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram untuk mengamati bentuk selnya secara mikroskopis. Tahapan pertama ambil 2-3 koloni *V.parahaemolyticus* kemudian diratakan diatas permukaan *object glass* yang telah diberi akuades, selanjutnya dibiarkan mengering diatas *hotplate*. Tahapan kedua yaitu pewarnaan dengan tahapan *crystal violet* 1 menit, *iodine* 1 menit, alkohol 30 detik dan safranin 45 detik, selanjutnya diamati dibawah mikroskop.

b) Re-Identifikasi *Vibrio parahaemolyticus*

Proses re-identifikasi isolat *Vibrio parahaemolyticus* menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Tahapan pertama yaitu ekstraksi DNA *Vibrio parahaemolyticus*. Isolat *V.parahaemolyticus* yang

telah ditumbuhkan pada media TSA di ambil dan dimasukkan ke dalam 30 μ l *Nuclease Free Water* (NFW) lalu dipanaskan (*Boiling*) ke dalam *thermo block* dengan suhu 100°C selama 10 menit, dan dihomogenkan menggunakan *mini mixer* setiap 3 menit sekali kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 2 menit. Setelah itu, suspensi bakteri disentrifugasi pada kecepatan 13.000 x g selama 5 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung baru, kemudian kemurnian DNA diukur menggunakan *microplate spectrophotometer* pada rasio absorbansi 260/280 nm. Rentang keberterimaan kemurnian DNA berkisar antara 1,8-2,0 (Dewanata dan Mushlih, 2021). Tahap kedua re-identifikasi bakteri adalah pembuatan *Mastermix* PCR. Pembuatan 1 kali reaksi *Mastermix* PCR dilakukan dengan mencampurkan *Go-Taq Green Master Mix* 12,5 μ l, *Primer forward* Vp FlaE-79F 1,25 μ l, *Primer reverse* Vp FlaE-934R 1,25 μ l, dan 8 μ l NFW, dan sebanyak 2 μ l *template* DNA. Isolat bakteri VP ATCC 17802 digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif berupa *non template control* (NTC). *Mastermix* PCR selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin *PCR thermacycler* untuk memulai proses amplifikasi. Proses amplifikasi dilakukan pada kondisi pradenaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, diikuti dengan proses *annealing* pada suhu 57°C selama 1 menit, kemudian proses ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit. Selanjutnya, tahap akhir amplifikasi yaitu proses ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Setelah proses amplifikasi selesai, ampikon divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarose 1,5-2% yang diwarnai menggunakan *floro safe DNA stain* selama 25 menit pada tegangan 100 volt. *Marker* 100 bp (Bio-Helix, Taiwan) digunakan sebagai penanda ukuran pita DNA. Pita DNA yang terbentuk diamati menggunakan UV transilluminator. panjang DNA target yaitu sebesar 897 bp (Beshiru dkk., 2020).



Gambar 7. Mekanisme subkultur dan reidentifikasi

3.4.2 Uji Cakram Difusi (*Disk Diffusion*)

Uji kepekaan antibiotik menggunakan metode cakram difusi sesuai dengan standar acuan dan kriteria interpretasi yang direkomendasikan dalam CLSI M45 (2015). Jenis antibiotik yang digunakan yaitu antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin dengan kadar (30 µg) pada setiap cakram.

a) Persiapan Media

Media yang digunakan yaitu media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) dengan komposisi 38 g/L (OXOID, UK) dilarutkan menggunakan akuades, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah media steril, dimasukkan ke dalam

waterbath hingga suhu 45°C. Berdasarkan acuan dari CLSI M45 (2015), media MHA yang digunakan untuk uji cakram difusi harus memiliki pH antara 7,2-7,4. Untuk memperoleh pH tersebut, sebelum media MHA dituang ke dalam cawan petri, pH media MHA diukur terlebih dahulu. Jika pH media MHA kurang dari 7,2 maka ditambahkan larutan NaOH 0,1M hingga pH yang dipersyaratkan. Jika media MHA lebih dari 7,4 maka ditambahkan larutan HCl 0,1M hingga pH yang dipersyaratkan. Media MHA dengan kondisi pH yang telah sesuai dapat dituang ke dalam cawan petri hingga mencapai ketebalan 4 mm. Media kemudian dimasukkan ke dalam oven suhu 35°C selama 24 jam untuk melihat ada atau tidaknya kontaminasi pada media sebelum digunakan.

b) Pengujian Cakram Difusi

Bakteri *V.parahaemolyticus* berumur 18–24 jam yang dibiakkan pada cawan media TSA yang diperkaya 2% NaCl lalu diambil sebanyak 3–5 koloni. Koloni disuspensikan dalam 3 mL larutan garam fisiologis dan diukur kekeruhannya menggunakan densitometer hingga mencapai 0,5 McFarland (setara dengan $1-2 \times 10^8$ CFU/mL). Suspensi digoreskan secara merata pada permukaan media MHA menggunakan *swab cotton stick* steril, cawan dibiarkan terbuka selama 3–5 menit setelah penggoresan. Cakram antibiotik diletakkan di atas permukaan media MHA yang telah terinokulasi bakteri menggunakan pinset steril sedemikian rupa untuk menghindari adanya *overlapping* zona hambat yang akan terbentuk. Setelah cakram antibiotik diletakkan pada media yang telah terinokulasi bakteri, ditunggu hingga 15 menit kemudian seluruh cawan yang telah berisi cakram antibiotik diinkubasi pada suhu 35 °C selama 16-18 jam dalam posisi terbalik. Pengujian dilakukan secara duplo untuk setiap isolat. Diameter zona hambat yang terbentuk kemudian diukur dan diinterpretasikan sesuai standar acuan CLSI M45 (2015) pada tabel 1. Pengujian terhadap *E.coli* ATCC 25922 dilakukan pada setiap tahap pengujian sampel

sebagai kontrol kualitas pengujian kepekaan antibiotik. Selanjutnya, isolat bakteri *E.coli* AT/748 hasil studi sebelumnya yang resistan terhadap antibiotik golongan tetrasiklin digunakan sebagai pembanding.



Gambar 8. Mekanisme uji cakram difusi

Tabel 1. Interpretasi zona hambat cakram difusi pada *Vibrio* sp.

<i>Antimicrobial Agent</i>	<i>Disk Content</i>	<i>Zone Diameter (mm)</i>		
		S	I	R
<i>Tetracycline</i>	30 µg	≥15	12-14	≤11
<i>Oxytetracycline</i>	30 µg	≥15	12-14	≤11

keterangan: S (susceptible), I (intermediate), R (resistant)

Tabel 2. Interpretasi Nilai *Quality Control* (QC) ATCC *E.coli* 25922

<i>Antimicrobial Agent</i>	<i>Disk Content</i>	<i>E.coli</i> ATCC 25922
<i>Tetracycline</i>	30 µg	18-22 mm
<i>Oxytetracycline</i>	30 µg	18-22 mm

3.4.3 Uji Konsentrasi Hambat Minimum (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Pengujian konsentrasi hambat minimum (KHM) menggunakan metode *Microdilution Broth*. Prosedur pengujian mengacu pada standar acuan

dan kriteria interpretasi yang direkomendasikan dalam CLSI M45 (2015). Konsentrasi antibiotik yang digunakan adalah 0,25–256 µg/mL untuk oksitetrasiklin dan tetrasiklin.

a) Persiapan Media

Media yang digunakan yaitu *Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth* (CAMHB) dengan komposisi 22 g/L (SIGMA-ALDRICH, India) dilarutkan menggunakan akuades kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 115°C selama 10 menit.

Berdasarkan acuan dari CLSI M45 (2015), media CAMHB yang digunakan untuk uji konsentrasi hambat minimum harus memiliki pH berkisar antara 7,2-7,4 suhu temperatur ruang 25°C. Untuk memperoleh pH tersebut, sebelum media CAMHB dituang ke dalam cawan petri, pH media CAMHB di ukur terlebih dahulu. Jika pH media CAMHB kurang dari 7,2 maka ditambahkan larutan NaOH 0,1M hingga pH yang dipersyaratkan. Jika media CAMHB lebih dari 7.4 maka ditambahkan larutan HCl 0,1M hingga pH yang dipersyaratkan.

b) Pembuatan Larutan Stok Antibiotik

Sebelum membuat pengenceran antibiotik, tahapan pertama yaitu membuat larutan stok antibiotik dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Pembuatan larutan stok menggunakan rumus sebagai berikut.

$$Weight (mg) = \frac{Volume (mL) \times Concentration (\mu g/mL)}{Assay Potency (\mu g/mL)}$$

$$Volume (mL) = \frac{Weight (mg) \times Assay Potency (\mu g/mL)}{Concentration (\mu g/mL)}$$

Untuk antibiotik tetrasiklin, serbuk antibiotik dilarutkan terlebih dahulu ke dalam jumlah kecil akuades hingga terlarut sempurna, setelah terlarut sempurna, tambahkan akuades hingga mencapai

volume yang diinginkan. Sedangkan untuk antibiotik oksitetrasiklin, serbuk antibiotik dilarutkan terlebih dahulu ke dalam jumlah kecil metanol 100% hingga terlarut sempurna, setelah terlarut sempurna, tambahkan akuades hingga mencapai volume akhir yang diinginkan. Pembuatan larutan antibiotik pada konsentrasi yang akan digunakan untuk pengujian dilakukan dengan melakukan pengenceran menggunakan rumus sebagai berikut.

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

Keterangan:

M_1 = Molaritas Awal

M_2 = Molaritas Akhir

V_1 = Volume Awal

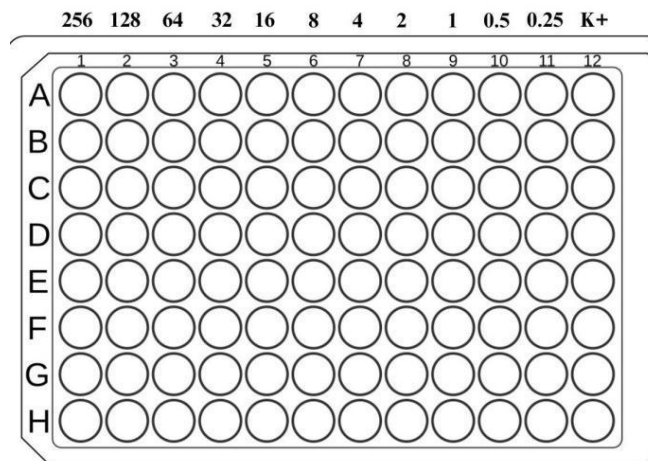
V_2 = Volume Akhir

c) **Pengujian Konsentrasi Hambat Minimum**

Bakteri *V.parahaemolyticus* disiapkan dengan mengambil sebanyak 3–5 koloni bakteri berumur 18-24 jam yang dibiakkan pada cawan media TSA yang ditambah 2% NaCl. Koloni selanjutnya disuspensikan dalam 5 mL larutan garam fisiologis dan diukur kekeruhannya menggunakan densitometer hingga mencapai 0,5 McFarland (setara dengan $1-2 \times 10^8$ CFU/mL). Setelah itu, dilakukan pengenceran sedemikian rupa terhadap suspensi tersebut hingga didapatkan kepadatan akhir bakteri untuk pengujian sebesar 5×10^5 CFU/mL (5×10^4 CFU/well).

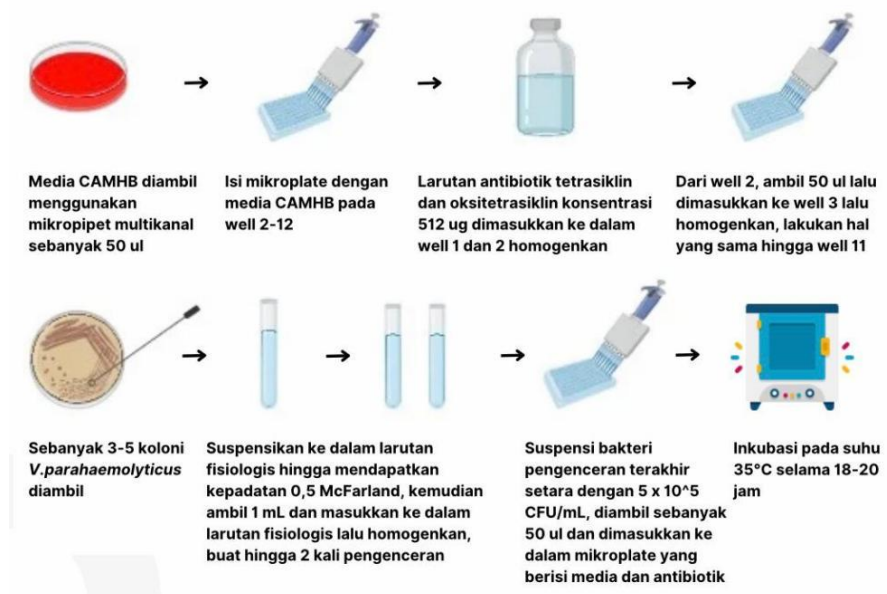
Pengujian menggunakan *microplate* dengan susunan: a) *well* 1 berisi bakteri dan antibiotik; b) *well* 2-11 berisi media, bakteri dan antibiotik; c) *well* 12 berisi media dan bakteri. Sebagai langkah awal, sebanyak 50 µl media CAMHB dimasukkan ke dalam *well* 2-12. Pada *well* 1 dan 2 ditambahkan larutan antibiotik dengan konsentrasi 512 µg/mL sebanyak 50 µl lalu dihomogenkan. Selanjutnya, pengenceran berseri dilakukan dengan mengambil

sebanyak 50 μL dari *well* 2, ditambahkan ke *well* 3, dan dihomogenkan. Cara yang sama diulangi hingga *well* 11. Pada *well* 11 setelah dihomogenkan, diambil 50 μL dan dibuang. Selanjutnya dimasukkan suspensi bakteri dengan kepadatan 5×10^5 CFU/mL sebanyak 50 μL pada semua *well*. Volume akhir pada setiap *well* adalah 100 μL dengan kepadatan bakteri akhir yaitu 5×10^4 CFU/*well*. Konsentrasi akhir antibiotik pada setiap *well* dari *well* 1 hingga 11 berturut-turut adalah 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya, *microplate* diinkubasi pada suhu 35°C selama 18-20 jam.



Gambar 9. Mapping microplate

Nilai konsentrasi hambat minimum didefinisikan sebagai konsentrasi terkecil dimana pertumbuhan bakteri terhambat dibandingkan dengan pertumbuhan pada *well* kontrol positif. Kriteria interpretatif nilai daya hambat minimum dapat dilihat pada tabel 3. Untuk antibiotik oksitetrasiklin kriterianya mengacu pada tetrasiklin. Pengujian terhadap *E.coli* ATCC 25922 dilakukan pada setiap tahap pengujian sampel sebagai kontrol kualitas pengujian konsentrasi hambat minimum.



Gambar 10. Mekanisme uji konsentrasi hambat minimum

Tabel 3. Interpretasi Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) pada *Vibrio* sp.

<i>Antimicrobial Agent</i>	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	S	I	R
<i>Tetracycline</i>	≤ 4	8	≥ 16
<i>Oxytetracycline</i>	≤ 4	8	≥ 16

keterangan: S (susceptible), I (intermediate), R (resistant)

Tabel 4. Interpretasi Nilai *Quality Control* (QC) *E.coli* ATCC 25922

<i>Antimicrobial Agent</i>	MIC QC Ranges ($\mu\text{g/mL}$) ATCC <i>E.coli</i> 25922
<i>Tetracycline</i>	0,5-2
<i>Oxytetracycline</i>	0,5-2

3.4.4 Deteksi Gen Penyandi Resistansi Antibiotik

Keberadaan gen-gen penyandi resistansi antibiotik untuk golongan tetrasiklin yaitu *tetA* dan *tetB*, dideteksi dengan metode PCR. Primer yang digunakan untuk mendeteksi gen-gen ini dipilih dari studi sebelumnya (Tabel 5).

Tabel 5. Target gen dan primer untuk deteksi gen penyandi resistansi

Gen	Sekuen Basa Primer	bp	Kondisi <i>annealing</i>	Referensi
<i>tetA</i>	(F)5'-GTA ATT CTG AGC ACT GTC GC-3' (R)5'-CTG CCT GGA CAA CAT TGC TT-3'	957	62°C 30 detik	Garcia-Aljaro (2014)
<i>tetB</i>	(F)5'CTC AGT ATT CCA AGC CTT TG-3' (R)5'CTA AGC ACT TGT CTC CTG TT-3'	436	59°C 30 detik	Akinbowale (2007)

a) Ekstraksi DNA *Vibrio parahaemolyticus*

Tahapan pertama yaitu isolat *Vibrio parahaemolyticus* yang telah ditanam pada media TSA diambil dan dimasukkan ke dalam 30 µl *Nuclease Free Water* (NFW), kemudian dipanaskan (*Boiling*) ke dalam *thermo block* pada suhu 100°C selama 10 menit, dihomogenkan menggunakan *mini mixer* setiap 3 menit kemudian diamkan pada suhu ruang selama 2 menit. Selanjutnya suspensi bakteri disentrifugasi pada kecepatan 13.000 x g selama 5 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung baru, kemudian kemurnian DNA diukur menggunakan *microplate spectrophotometer* pada rasio absorbansi 260/280 nm. Rentang keberterimaan kemurnian DNA berkisar antara 1,8-2,0 (Dewanata dan Mushlih, 2021).

b) Amplifikasi DNA *Vibrio parahaemolyticus*

Amplifikasi DNA *Vibrio parahaemolyticus* untuk mendeteksi gen penyandi resistansi menggunakan metode PCR melalui tahapan pertama dengan pembuatan mastermix dengan komposisi pada tabel 6.

Tabel 6. Komposisi *Mastermix*

Komposisi	1× Reaksi
Go Taq Green Master Mix	12, 5 µl
Primer Forward (F)	1,25 µl
Pimer Reverse (R)	1,25 µl
Template DNA	2 µl
Nuclease Free Water (NFW)	8 µl

Non template control (NTC) digunakan sebagai kontrol negatif dan isolat AT/748 bakteri *E.coli* resistan digunakan sebagai kontrol positif untuk gen *tetA*. Tahapan selanjutnya yaitu proses amplifikasi di dalam mesin PCR, untuk deteksi gen penyandi resistansi *tetA* tahap pertama yaitu proses pradenaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, selanjutnya 23 siklus dengan tahapan denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, diikuti proses *annealing* pada suhu 62°C selama 30 detik, dan proses ekstensi pada suhu 72°C selama 42 detik. Selanjutnya, tahap akhir amplifikasi yaitu proses ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Untuk tahapan deteksi gen penyandi resistansi *tetB* tahap pertama yaitu proses pradenaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, selanjutnya 25 siklus dengan tahapan denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, diikuti proses *annealing* pada suhu 59°C selama 30 detik, dan proses ekstensi pada suhu 72°C selama 20 detik. Selanjutnya, tahap akhir amplifikasi yaitu proses ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

c) Visualisasi Gen Penyandi Resistansi

Setelah proses amplifikasi selesai, amplikon divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarose 1,5-2%, yang diwarnai menggunakan *floro safe DNA stain* selama 25 menit pada tegangan 100 volt. *Marker 100 bp* (Bio-Helix, Taiwan) digunakan sebagai penanda ukuran pita DNA. Pita DNA yang terbentuk diamati menggunakan UV transilluminator.

EKSTRAKSI



AMPLIFIKASI DAN VISUALISASI



Gambar 11. Mekanisme deteksi gen penyandi resistansi

3.5 Analisis Data

Data dianalisis secara kualitatif deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel atau grafik menggunakan Microsoft Office untuk menggambarkan hasil pola resistansi dan gen penyandi resistansi antibiotik golongan tetrasiklin yang ditemukan pada isolat *Vibrio parahaemolyticus*.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Simpulan dari penelitian ini sebagai berikut.

1. Sebanyak 42 isolat *Vibrio parahaemolyticus* masih tergolong sensitif berdasarkan nilai rata-rata zona hambat yang terbentuk yaitu pada tetrasiklin sebesar 24,9 mm dan oksitetrasiklin sebesar 22,6 mm serta nilai MIC₅₀ sebesar 0,5 µg/mL dan nilai MIC₉₀ sebesar 2 µg/mL pada antibiotik tetrasiklin dan oksitetrasiklin
2. Sebanyak 42 isolat *Vibrio parahaemolyticus* tidak memiliki gen penyandi resistansi *tetA* dan *tetB*

5.2 Saran

Saran dari penelitian ini yaitu dilakukannya pengujian *Whole Genome Sequencing* untuk mengetahui seluruh gen yang terdapat pada isolat *Vibrio parahaemolyticus* yang digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed H. A, ElRB, Hussein M. A, Khedr, M, Abo E. R, dan Elashram A. 2018. Molecular characterization, antibiotic resistance pattern and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholerae* isolated from crustaceans and humans. *Int. J. Food Microbiol.* 274: 31- 37.
- Akinobowale, O.L., Peng, H. dan Barton M.D. 2007. Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Bacteria from Aquaculture sources in Australia. *J Appl Microbiol.* 103:2016-2025.
- Alam, M. J., Tomochika, K.-I., Miyoshi, S.-I., dan Shinoda, S. 2002. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto- Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiology Letters*, 208(1), 83–87.
- Alfiansah, Y.R., Peters, S., Harder, J., Hassenrück, C. dan Gärdes, A. 2020. Structure and co-occurrence patterns of bacterial communities associated with white faeces disease outbreaks in Pacific white-leg shrimp *Penaeus vannamei* aquaculture. *Sci. Rep.* 10, 11980.
- Ambat, K.N., Abida, I.W., dan Maherlina, R. 2022. Kelimpahan bakteri *Vibrio* sp. Pada sampel air tambak di UPT laboratorium kesehatan ikan dan lingkungan Pasuruan Jawa Timur. *Juvenil.* Vol 3(3).
- Aminov, R., Chee-Sanford, J. C., Garrigues, N., Mehboob, A., dan Mackie, R. I. 2004. Detection of tetracycline resistance genes by PCR methods. *Methods in Molecular Biology*, 268, 3-13.
- Balouiri, M., Sadiki, M. dan Ibsouda, S.K. 2016 .Methods for in vitro Evaluating Antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2): 71-79.
- Belaynehe K.M., Shin S.W. dan Yoo H.S. 2018. Interrelationship between tetracycline resistance determinants, phylogenetic group affiliation and carriage of class 1 integrons in commensal *Escherichia coli* isolates from cattle farms. *BM Veterinary Research.* 14.340.
- Beshiru, A. dan Igbinosa, E.O. 2023. Surveillance of *Vibrio parahaemolyticus* pathogens recovered from ready- to-eat foods. *Sci Rep.* 13, 4186.

- Beshiru, A., Okareh, O.T., Okoh A.I. dan Igbinsosa, I. 2020. Detection of antibiotik resistance and virulence genes of *Vibrio* strains isolated from ready-to-eat shrimps in Delta and Edo States, Nigeria. *J Appl Microbiol.* 129:17-36.
- Bin Zaman, S., Hussain, M.A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K.T. dan Hossain, N. 2017. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus.*
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O. dan Piddock, L.J.V. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13: 42–51.
- Bonnet, M., Lagier, J.C., Raoult, D. dan Khelaifia, S. 2019. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.* 34, 100622.
- Broberg, C. A., Calder, T. J., dan Orth, K. 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes Infect.* 13, 992–1001.
- Brooks, G.F., Carrol, K.C., Butel, J.S., Mprse, S.A. dan Mietzner, T.A. 2013. *Medical Microbiology, twenty-sixth ed.* McGraw-Hill Companies Inc, New York.
- Burdette, D. L., Yarbrough, M, L., Orvedahl, A., Gilpin, C, J., dan Orth, K. 2008. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 12497–12502.
- Burmeister, A. R. 2015. Horizontal Gene Transfer. *Evolution, Medicine, and Public Health.* 193-194.
- Ceccarelli, D., Hasan, N. A., Hug, A. dan Colwell, R. R. 2013. Distribution, and dynamics of epidemic, and pandemic *V. parahaemolyticus* virulence factors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3,97.
- Chen, X., Zhu, Q., Yu, F., Zhang, W., Wang, R., Ye, X., Jin, L., Liu, Y., Li, S. dan Id, Y. C. 2018. Serology , virulence and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood in Zhejiang province. *PLOS One*, 1–9.
- Chokshi, A., Sifri, Z., Cennimo, D. dan Horng, H. 2019. Global contributors to antibiotic resistance. *J Glob Infect Dis* ;11:36–42,
- Chopra, I dan Robert, M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Review.* Vol 65 (2). 232-260.

- Conlan, S., Thomas, P.J., Deming, C., Park, M., Lau, A.F. dan Dekker, J.P. 2014. Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae*. *Sci. Transl. Med.* 6: 254ra126.
- CLSI. 2015. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. 3rd ed. CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dev, R.K., Mishra, P., Chaudary, N.K. dan Bhattarai, A. 2020. Synthesis, characterization and antibacterial evolution of heteroleptic oxytetracycline-sali-cylaldehyde complexes. *Journal of Chemistry*. 1-10.
- Dewanata P.A., dan Mushlih, M. 2021. Differences in DNA Purity Test Using UV-VIS Spectrophotometer and Nanodrop Spectrophotometer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Indonesian Journal of Inovation Studies*. Vol 15.
- Dewi, M., Darmawi, Helmi, T.Z., Erina, Gani, B.A., Eliawardani., dan Azhar. 2019. Oxytetracycline activities to *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition of aceh cattle preputium isolate. *Jurnal Medika Veterinaria*. 13(1):125-131.
- European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). 2009. Joint Opinion on Antimicrobial Resistance focused on zoonotic infections. *EFSA Journal*, 7(11), 1372.
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- Faruque, S. M. 2012. *Foodborne and Waterborne Bacterial Pathogens: Epidemiology, Evolution and Molecular Biology*. Caister Academic Press.
- Ferretti, J.J., Stevens, D.L. dan Fischetti, V.A. 2016. *Vibrio pyogenes*; Basic Biology to Clinical Manifestations. Oklahoma City (US): University of Oklahoma Health Sciences Center. Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical and Microbiology Infection*. 22: 416–422.
- Fitri S.R.A. F. 2020. Uji Daya Hambat Antibakteri Salep Ekstrak Etanol Daun Pandan Hutan (*Freycinetia sessiliflora* Rizki.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 5(1), 1–9.
- Fatimi, H. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Palembang : Program Studi Ilmu Biomedik, Program Pasca Sarjana, Universitas Brawijaya.

- Garcia-Aljaro, C., Riera-Hereida, J. dan Blanch A.R. 2014. Antimicrobial resistance and presence of the SXT mobile element in *Vibrio* spp. Isolated from aquaculture facilities. *New Microbiol.* 37(3):339-346.
- Garima, K., Saurabh, S. dan Ashok, E. 2018. Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* ;34:46–50.
- Gode-Potratz, C. J., Kustusch, R. J., Breheny, P. J., Weiss, D. S., dan McCarter, L. L. 2011. Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence. *Mol. Microbiol.* 79, 240–263.
- Grossman, T.H. 2016. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* ;6, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>
- Hadi, M. P., Fadlillah, L. N., Widasmara, M. Y., Muziasari, W. I., dan Subaryono. 2018. Potensi sumber bakteri resisten antibiotik berdasarkan kondisi kualitas air dan penggunaan lahan di Sungai Code, Yogyakarta: suatu tinjauan metodologis. *Jurnal Pengelolaan Lingkungan Berkelanjutan.* Vol 2(1):88-100.
- Han F., Walker, R.D., Janes, M.E., Prinyawiwatkul, W., dan Ge, B. 2007. Antimicrobial Susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and Retail Raw Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 73 (21): 7096-7098.
- Harmita dan Radji, M. 2008. *Kepekaan Terhadap Antibiotik. Dalam: Buku Ajar Analisis Hayati, Ed 3.* RHC. Jakarta.
- Hedayantianfard, K., Akhlagh, M. dan Sharifiyazdi, H. 2014. Detection of tetracycline resistance genes in bacteria isolated from fish farms using polymerase chain reaction. *Veterinary Research Forum.* Vol 5(4):269-275.
- Hikmawati, F., A. Susilowati., dan Setyaningsih, R. 2019. Deteksi jumlah dan uji patogenitas *Vibrio* spp. pada kerang hijau (*Perna viridis*) di Kawasan Wisata Pantai Yogyakarta. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia.* 5(2). 334 - 339..
- Jiang, Y., He, L., Wu, P., Shi, X., Jiang, M., Li, Y., dan Lin, Y. 2017. Simultaneous Identification of Ten Bacterial Pathogens Using the Multiplex Ligation Reaction Based on the Probe Melting Curve Analysis. *Scientific Reports*, June, 1–9.
- Khasanah, H. R., dan Nugraheni, D. E. 2021. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Biji Kebiul (*Caesalpinia Bonduis* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Avicenna.* Vol 16 (1) : 8-15.

- Kim, J.Y. dan Lee, J.-L. 2017. Correlation of Total Bacterial and *Vibrio* spp. Populations between Fish and Water in the Aquaculture System. *Front. Mar. Sci.* 4.
- Kusmarwati, A., Yennie dan Y., Indriati, N. 2017. Resistansi antibiotik pada *Vibrio parahaemolyticus* dari udang vannamei asal pantai utara jawa untuk pasar ekspor. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Vol 12(2).
- Labbe, R. G., dan Garcia, S. 2013. *Guide to Foodborne Pathogens*. John Wiley & Sons. USA.
- Lerminiaux, N.A. dan Cameron, A.D.S. 2019. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol* ;65:34–44.
- Letchumanan, V., Yin, W.F., Lee, L.H. dan Chan, K.G. 2015. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia. *Frontiers in Microbiology*.6(33).
- Ludden, C., Reuter, S., Judge, K., Gouliouris, T., Blane, B. dan Coll, F. 2017. Sharing of carbapenemase-encoding plasmids between *Enterobacteriaceae* in UK sewage uncovered by Min- ION sequencing. *Microb. Genom.* 3(7): e000114.
- MacGowan. A. dan Macnaughton, E. 2017. Antibiotic resistance. *Med (United Kingdom)* ;45:622–8.
- Mailoa, M.C dan Setha, B. 2011. Karakteristik Patogenitas *Vibrio* sp. Diisolasi dari Lendir Sidat (*Anguilla* Sp.). *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*. Program Studi Pendidikan Dokter Universitas Pattimura.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T. dan Tagomori, K. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. *Lancet* 361, 743–749.
- Manjusha, S. dan Sarita, G. B. 2011. Plasmid associated antibiotic resistance in *Vibrio* isolated from coastal waters of Kerala. *Int. Food Res. J.* 18, 1171–1181.
- Marlina. 2004. Karakteristik Molekuler Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dari Sampel Air Laut dan Uji Resistensi Antibiotiknya. Fakultas MIPA. Universitas Andalas.
- McPherson, M. J dan Moller, S. G. 2006. *PCR. Second Edition*. Published by: Taylor and Francis Group. UK.
- Miar, Firmansyah, Oktavilia, S., Puspita, D. W., dan Prayogi, R. 2020. Fisheries industry strategy in Indonesia. *Earth and Environmental Science*, 1–7.

- Munita, J.M. dan Arias, C.A. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Virulence mechanisms of bacterial pathogens. *wiley*; . p. 481–511.
- Mulya, M.A., Pasaribu, F.H., Afif, U., dan Yuhana, M. 2022. Karakterisasi dan deteksi molekuler gen penyandi patogenitas, resistansi antibiotik pada *Vibrio parahaemolyticus* yang diisolasi dari udang vanamei. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. Vol 21(1):81-92.
- Newton, A., Kendall, M., Vugia, D. J., Henao, O. L., dan Mahon, B.E. 2012. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems. *Clin. Infect. Dis*, 54, S391– S395.
- Nguyen, F., Starosta, A.L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A. dan Wilson, D.N. 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol. Chem.*, 395, 559–575.
- Nurilmala, M., Saputri, N. N., Abdullah, A., Nurjanah, N., Yusfiandayani, R., dan Sondita, M. F. A. 2020. Detection of histamine-producing bacteria on tuna species using histidine decarboxylase (Hdc) and 16s rRNA. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 15(3), 131–139.
- Okamoto, A. S., Andreatti Filho, R. L., Rocha, T. S., Menconi, A., dan Marietto-Goncalves, G. A. 2009. Detection and transfer of antimicrobial resistance gene integron in *Salmonella Enteritidis* derived from avian material. *Rev. Brasil. Ciên. Avíc.* 11, 195–201.
- Olson, J.M.D. 2014. *Farmakologi*. EGC. Jakarta.
- Ong, H.M.G., Zhong, Y., Hu, C., Ong, K.H., Khor, W.C., Schlundt, J. dan Aung, K.T. 2023. Antimicrobial Resistance Risk Assessment of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Farmed Green Mussels in Singapore. *Microorganisms*. 11, 1498.
- Pal, C., Palme-Bengtsson, J., Kristiansson, E. dan Larsson, D.G.J. 2016. The structure and diversity of human animal and environmental resistomes. *Microbiome*. 4:54.
- Paranjpye, R., Hamel, O. S., Stojanovski, A., dan Liermann, M. 2012. Genetic diversity of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains from the Pacific Northwest. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8631–8638.
- Prathiviraj, R., Rajeev, R., Fernandes, H., Rathna, K., Lipton, A.N., Selvin, J. dan Kiran, G.S. 2021. A gelatinized lipopeptide diet effectively modulates immune response, disease resistance and gut microbiome in *Penaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 112, 92– 107.

- Pratiwi, R. H. 2017. Mekanisme pertahanan bakteri patogen terhadap antibiotik. *Jurnal Pro-Life*. 4(3):418-429.
- Prestinaci, F., Pezzoti, P., dan Pantosti, A. 2015. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109 (7).
- Ramadhaniah, V., Indrawati, A., dan Prasetyo, B.F. 2024. Uji resistansi antibiotik bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dari udang putih (*Litopenaeus vannamei*) serta identifikasi gen penyandi resisten ampisilin. *Acta Veterinaria Indonesiana*. Vol 12(2):97-105.
- Rocha R. S., Sousa O. V. dan Vieira, R. H. 2016. Multidrug-resistant *Vibrio* associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 105 (1), 337-340.
- Rodrigues de Melo, L. M., Almeida, D., Hofer, E., Falavina dos Reis, C. M., Theophilo, G. N. D., Santos, A. F. D. M. dan Vieira, R. H. S. D. F. 2011. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from pond-reared *Litopenaeus vannamei* marketed in Natal, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1463- 1469.
- Saputera, M.M.A. 2019. Konsentrasi hambat minimum (KHM) kadar ekstrak etanol Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk.) terhadap bakteri *Escherichia coli* melalui metode sumuran. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*; 5(2), 167-173.
- Sarida, M., dan Harpeni, E. 2010. Screening of potential probiotic *Vibrio* sp. against vibriosis in the *Litopenaeus vannamei*. *BIOSFERA: A Scientific Journal*, 27(2), 88-94.
- Sarosa, A. H., P. H. T., Santoso, B. I., Nurhadianty, V. dan Cahyani, C. 2018. Pengaruh Penambahan Minyak Nilam Sebagai Bahan Aditif Pada Sabun Cair Dalam Upaya Meningkatkan Daya Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus*. *Indonesian Journal Of Essential Oil*, 3(1), 1–8.
- Setyawati, R., dan Zubaidah, S. 2021. Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu Annealing dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*. Vol 4 (1) : 35-40.
- Schmidt, W., Evers-king, H. L., Campos, C. J. A., Jones, D. B., Miller, I., Davidson, K. dan Shutler, J. D. 2018. A generic approach for the development of short- term predictions of *Escherichia coli* and biotoxins in shellfish. *Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts*, 173–185.

- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., Duijkeren, E.V., Johnson, A.P., dan Gastra, W. 2010. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J.Antimicrob Chemother.* 65:601-604.
- Siegrist, J. 2025. Vibrio Detection. Diakses pada 27 Maret 2025 dari <https://www.sigmaaldrich.com/ID/en/technical-documents/technical-article/microbiological-testing/pathogen-and-spoilage-testing/vibrio-detection>
- Stentiford, G.D., Peeler, E.J., Tyler, C.R., Bickley, L.K., Holt, C.C., Bass, D., Turner, A.D., Baker-Austin, C. dan Ellis, T. 2022. A seafood risk tool for assessing and mitigating chemical and pathogen hazards in the aquaculture supply chain. *Nat. Food* 3, 169–178.
- Subramaniam, G. dan Girish, M. 2020. Antibiotic resistance a cause for reemergence of infections. *Indian J Pediatr*;87:937–44.
- Tarr, C. L., Patel, J. S., Puhr, N. D., Sowers, E. G., Bopp C. A. dan Strockbine, N. A. 2006. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *J Clin Microbiol.* 8 : 134 - 140.
- Tortora, G.J.F.B.R.dan C.C.L. 2010. *Microbiology an introduction 10th edition*, Pearson edition, Publishing as Pearson Benjamins Cummings, San Francisco, 1301 Sansome.
- Vandenberghe, J., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B. dan Swings, J. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture*, 219(1–4), 9–20.
- Wagley, S., Koofhethile, K., Wing, J.B. dan Rangdale, R. 2008. Comparison of *V. parahaemolyticus* isolated from seafoods and cases of gastrointestinal disease in the UK. *Int. J. Environ. Health Res.*, 18, 283–293.
- Wang, R., Zhong, Y., Gu, X., Yuan, J., Saeed, A.F., dan Wang, S. 2015. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front. Microbiol.* 6, 44.
- Wang, Z., Zuo, J., Gong, J., Hu, J., Jiang, W., Mi, R., Huang, Y., Chen, Z., Phouthapane, V., Qi, K., Wang, C. dan Han, X. 2019. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous and rapid detection of six pathogenic bacteria in poultry. *AMB Express*, 1–11.
- World Health Organization (WHO). 2014. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*.
- Yano Y., Hamano K., Satomi M., Tsutsui I., Ban M. dan Aue-Umneoy D. 2014. Prevalensi dan kerentanan antimikroba spesies *Vibrio* terkait dengan

keamanan pangan yang diisolasi dari udang yang dibudidayakan di tambak pedalaman di Thailand. *Food Control*. 38:30–36.

- Ye, L., Zheng, Z., Xu, Y., Yang, C., Heng, H., Li, F., Chan, E.W.C. dan Chen, S. 2023. Prevalence and genetic basic of tetracycline in *Vibrio parahaemolyticus* isolates recovered from food products in Shenzhen, China during 2013-2021. *Science of the Total Environment*. 902.
- Yuanqing Hu, Li, F., Zheng, Y., Jiao, X., dan Guo, L. 2020. Isolation, molecular characterization and antibiotic susceptibility pattern of *Vibrio parahaemolyticus* from aquatic products in the Souhtern Fujian Coast, China. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30(6):856-867.
- Zafran, D., Roza, dan Koesharyani. 1997. Resistensi Isolat dari Beberapa Panti Benih Udang Windu (*Peneaus monodon*) terhadap Antibiotik. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 3(1): 11-15.
- Zhang, F., Zhang, J., Lin, G., Chen, X., Huang, H., Xu, C. dan Chi, H. 2024. Antibiotic Resistance and Genetic Profiles of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Farmed Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Ningde Regions. *Microorganisms*, 12,152.