

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Udang merupakan salah satu komoditas ekspor perikanan yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Menurut KKP (2023) ekspor udang di Indonesia mengalami pertumbuhan rata-rata sebesar 4,61% pertahunnya. Salah satu jenis udang yang permintaannya cukup tinggi yaitu udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) (Nurhasanah *et al.*, 2021). Akibat dari agroindustri udang windu di Indonesia yang mengalami penurunan, sehingga pengembangan udang vaname merupakan alternatif budidaya yang cocok di lakukan untuk memenuhi kebutuhan ekspor serta menumbuhkan perekonomian nasional. Udang vaname tergolong mudah untuk dibudidayakan, karena udang ini dapat dipelihara dengan padat tebar tinggi serta mampu memanfaatkan pakan dan ruang secara lebih efisien, sehingga petambak udang di tanah air banyak yang mengusahakannya (Se *et al.* 2023).

Meskipun memiliki banyak kelebihan, budidaya udang vaname seringkali dihadapkan pada masalah penyakit, salah satunya disebabkan oleh bakteri *Vibrio harveyi* sebagai penyebab penyakit vibriosis yang tercatat mengakibatkan mortalitas udang hingga 80% (Rusadi *et al.*, 2019). Infeksi *V. harveyi* akan berdampak pada kerusakan organ hepatopankreas yang merupakan organ vital dan berperan dalam pencernaan, metabolisme, dan sistem imun udang. Menurut Izza (2011). Infeksi *V. harveyi* pada hepatopankreas dapat menyebabkan gangguan pada metabolisme yang menyebabkan pembusukan sel dan lisis sel, pergerakan udang melambat, dan pertumbuhan lambat hingga menyebabkan kematian. Kerusakan hepatopankreas pada udang dapat diketahui dengan pengamatan histologi untuk melihat perubahan metabolisme melalui perubahan jaringan yang terjadi. Pemeriksaan tersebut dapat dilakukan pada udang yang sakit, diduga sakit, dan yang sudah mati (Izzah, 2011).

Solusi yang sedang dikembangkan adalah penggunaan bahan alami sebagai imunostimulan, salah satunya adalah nanokitosan. Nanokitosan merupakan hasil modifikasi kitosan dengan merubah ukuran partikelnya menjadi partikel yang lebih kecil membentuk nanopartikel (Suwarda dan Maarif, 2013). Nanopartikel memiliki beberapa keunggulan seperti ukurannya yang lebih kecil yang memungkinkan penyerapannya lebih cepat, serta memiliki efektivitas sebagai agen antibakteri dan immunomodulator (El Knidri *et al.*, 2018). Kitosan sendiri merupakan biopolymer alami yang disintesis dari krustasea yang mengandung kitin termasuk cangkang tiram. Pemanfaatan cangkang tiram sebagai sumber kitosan dapat menjadi solusi pemanfaatan limbah perikanan yang ramah lingkungan (Younes dan Rinaudo, 2015).

Penggunaan nanokitosan cangkang tiram yang ditambahkan kedalam pakan diduga dapat meningkatkan respon imun dan menghambat aktivitas anti bakteri. Menurut (Rismania *et al.*, 2014) pemberian nanokitosan dapat meningkatkan kelangsungan hidup udang terhadap patogen. Serta menurut Risma *et al.* (2014) bahwa campuran ekstrak kulit buah manggis dapat menghambat bakteri *V. harveyi*. Namun, penelitian mengenai efek nanokitosan cangkang tiram pada hepatopankreas udang vaname yang terinfeksi *V. harveyi* masih



Berdasarkan latar belakang, belum ada penelitian yang membandingkan efektivitas pakan yang dicampurkan dengan nanokitosan cangkang tiram pada dosis tertentu untuk melihat kondisi hepatopankreas udang vaname. Sehingga perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pakan nanokitosan cangkang tiram terhadap kondisi hepatopankreas udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang terinfeksi *Vibrio harveyi* untuk membandingkan hepatopankreas udang vaname sebelum dan setelah terinfeksi *Vibrio harveyi*.

1.2. Teori

1.2.1 Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

1.2.1.1 Ciri morfologi

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) memiliki bagian tubuh yang terdiri dari kepala (*cephalothorax*) dan perut (*abdomen*). Kepala dilengkapi dengan antenula, antenna, mandibula dan sepasang maxilia. Pada bagian kepala terdapat lima pasang periopoda atau kaki jalan, yang juga memiliki dua pasang maxillae dan tiga pasang. Sementara itu, udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) (**Gambar 1**) memiliki abdomen yang terdiri dari enam ruas dan memiliki lima pasang pleopod atau kaki renang, sepasang uropod yang berbentuk seperti kipas, dan tepat diatas uropod terdapat telson yang berfungsi untuk menjaga keseimbangan saat udang berenang (Ramadani, 2023).

Bagian tubuh udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dibentuk oleh dua cabang yaitu exopodite dan endopodite. Udang vaname memiliki aktivitas berganti kulit (*moulting*) yang dilakukan dalam periode waktu tertentu. Tubuh udang vaname mengalami modifikasi sehingga dapat digunakan untuk keperluan makan, bergerak, dan membenamkan diri kedalam lumpur, serta menopang insang. Antenna dan antenula merupakan organ sensor pada udang vaname. Maxilliped pada bagian kepala telah mengalami modifikasi dan berfungsi sebagai organ untuk makan (Muzahar, 2020).



Gambar 1. Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*)

1.2.1.2 Pakan dan kebiasaan makan



akan faktor yang penting dalam kegiatan budidaya baik secara nsif. Udang vaname bersifat omnivore, dapat memakan plankton, film dan pakan buatan. Pakan buatan merupakan salah satu yang rubahan terbesar pada udang, karena kandungan nutrisi yang 1 buatan sangat dibutuhkan udang untuk tumbuh dengan baik

Udang vaname aktif mencari makan pada malam hari, tetapi dalam budidaya dapat beradaptasi dengan pemberian pakan pada siang hari karena udang ini juga bersifat continue feeder atau pemakan lambat namun secara terus menerus (Gompi *et al.*, 2023). Menurut Emmi (2021) aktivitas makan udang *panaadae* dipengaruhi oleh intensitas cahaya. Semakin rendah intensitas cahaya, maka semakin tinggi aktivitas makan udang tersebut. Frekuensi pemberian pakan udang vaname harus disusun sesuai dengan tingkat kebutuhan udang vaname yang berubah-ubah, nafsu makan udang yang berbeda-beda pada pagi, siang, sore dan malam, serta untuk menghindari terjadinya over feeding (Gompi *et al.*, 2023).

1.2.1.3 Sistem pencernaan

Sistem pencernaan udang vaname sangat sederhana, pencernaan udang hanya terdiri dari hepatopankreas. Proses pencernaan udang hanya memerlukan waktu yang singkat yaitu 2 jam 30 menit. Hal inilah yang menyebabkan udang dapat makan secara terus menerus. Saluran pencernaan udang terbagi menjadi 3 bagian, yaitu bagian depan yang terdiri dari esophagus, perut kardiak dan perut pylorik. Bagian tengah yang terdiri dari hepatopankreas dan sebagian dari usus. Dan bagian terakhir yaitu bagian belakang terdiri dari sisa usus dan rektum (Junaidi, 2022).

Penyerapan makanan yang terjadi dalam tubuh udang vaname berawal dari mulut, masuk ke esofagus, lambung kardiak yang besar untuk menggiling pakan, kemudian lambung pilorik untuk menyaring partikel halus ke hepatopankreas, hepatopankreas akan memproduksi enzim pencernaan dan absorpsi nutrisi, kemudian masuk ke usus sebagai pencernaan akhir dan penyerapan nutrisi selanjutnya ke anus untuk membuang sisa-sisa pencernaan (Pusporini, 2018). Beberapa enzim yang bekerja dalam sistem pencernaan udang vaname yaitu Protease yang berperan menghidrolisis protein menjadi peptida yang selanjutnya menjadi asam amino, dan Amilase yang berperan dalam mencerna karbohidrat menjadi glukosa (Lestari, 2018). Selain itu, terdapat enzim khusus yang berperan dalam proses molting dan pertahanan imun yaitu kitinase. Menurut Nafiah *et al.*, (2017) Kitinase merupakan enzim yang memecah kitin menjadi N-asetil glukosamin, kitosan merupakan turunan dari kitin sehingga enzim kitinase juga dapat merombak kitosan.

1.2.1.4 Hepatopankreas

Hepatopankreas merupakan gabungan dari hepar atau hati dan pancreas, berfungsi sebagai kelenjar pencernaan dan memiliki peran penting dalam proses pencernaan udang (Ihsan *et al.*, 2017). Fungsi hepatopankreas sebagai kelenjar pencernaan diantaranya yaitu memproduksi enzim-enzim pencernaan, sebagai detoksifikasi, menyimpan hasil-hasil pencernaan termasuk mineral dan bahan organik, membuang produk sisa metabolisme lemak dan karbohidrat untuk penyediaan energi bagi udang, dan regenerasi berbagai bagian tubuh udang untuk berbagai fungsi fisiologis. Selain itu, hepatopankreas juga berperan dalam regenerasi kembali kulit udang pada saat periode moulting (Sukarno, 2018). Hepatopankreas juga memiliki berbagai enzim yang memiliki peranan yang berbeda-beda, membantu udang bertahan hidup, tumbuh dan beradaptasi dengan lingkungan (Sukarno, 2018). Sebagian enzim dihasilkan dari hepatopankreas seperti amilase, protease, lipase, dan kitinase (Lestari, 2018), selain itu



hepatopankreas juga berkontribusi pada kesehatan udang, gangguan pada hepatopankreas dapat disebabkan oleh bakteri *Vibrio harveyi*. Infeksi *V. harveyi* pada hepatopankreas dapat menyebabkan gangguan pada metabolisme yang menyebabkan pembusukan sel dan lisis sel, pergerakan udang melambat, pertumbuhan lambat serta dapat menyebabkan kematian (Izza, 2011).

1.2.2 *Vibrio harveyi*

Vibrio harveyi merupakan bakteri laut gram negatif dari genus *Vibrio*, bakteri ini berbentuk batang, motil dengan flagella polar, memiliki sifat fakultatif anaerob, halofilik dan memiliki metabolisme fermentative dan respiratori (Kusumaningrum *et al.*, 2017). Bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang mengandung peptidoglikan dan lipopolisakarida yang berfungsi melindungi selnya. Bakteri ini sulit di musnahkan dengan antibiotik, karena bakteri ini dapat bersifat resisten terhadap antibiotik sehingga udang yang terserang umumnya tidak dapat disembuhkan. Bakteri gram negatif umumnya berwarna merah dan memiliki struktur dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi (Nurhidayati *et al.*, 2015).

Bakteri *V. harveyi* menyebabkan penyakit vibriosis yang tercatat menyebabkan kematian 80-100% dalam budidaya udang vaname, penyakit yang diakibatkann oleh bakteri ini bersifat sangat ganas karena dapat mematikan populasi larva udang dalam waktu 1 sampai 3 hari sejak terdampak (Kusumaningrum *et al.*, 2017). Bakteri ini dapat tumbuh secara optimal pada suhu 30°C, salinitas antara 20-30 ppt dengan pH 7,0 dan bersifat anaerob fakultatif artinya dapat hidup baik dengan atau tanpa adanya oksigen (Lestari *et al.*, 2018). Menurut Kusumaningrum *et al.*, (2017) infeksi *V. harveyi* dapat terjadi pada semua fase, mulai dari telur hingga indukan dan telah banyak menyebabkan kasus kematian budidaya hingga 100%. *V. harveyi* menginfeksi udang dengan cara masuk melalui mulut, membentuk plak, menyebar ke alat gerak dan menyebabkan kehilangan fungsi dan degradasi alat gerak. Selain itu infeksi *V. harveyi* juga dapat dilakukan dengan cara intramuskular yaitu dengan menyuntikkan bakteri pada bagian punggung udang diantara segmen kedua dan ketiga (Kurniawan *et al.*, 2023). Menurut Widanarni *et al.*, (2014) penyuntikan yang dilakukan pada bagian punggung udang antara segmen kedua dan ketiga merupakan area yang cukup tebal untuk menahan infeksi tanpa merusak organ vital atau cedera pada udang, mudah dijangkau, memungkinkan bakteri vibrio menyebar lebih cepat pada organ-organ tubuh udang, dan mudah dalam mengidentifikasi gejala klinis yang muncul akibat infeksi bakteri.

1.2.3 Nanokitosan Cangkang Tiram

Cangkang tiram (*Saccostrea cucullate*) merupakan salah satu limbah perikanan yang pemanfaatannya masih belum pada kategori optimal, sehingga akumulasi cangkang akan pencemaran lingkungan yang berdampak pada kualitas etika lingkungan. Cangkang tiram sebagai Bivalvia banyak mengandung protein yang merupakan salah satu senyawa organik utama dalam tubuhnya. Protein ini dapat diubah menjadi kitosan melalui proses diasilasi (Handayani *et*



Salah satu turunan dari kitin yang banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri adalah kitosan. Cangkang tiram memiliki rendemen kitosan sebesar 3,75% dan derajat deasetilasi (DD) mencapai 80,6% (Handayani *et al.*, 2018). Kitosan merupakan polisakarida yang terdiri dari glukosamin dan N-asetilglukosamin yang berfungsi untuk menginduksi respons resistensi terhadap infeksi patogen. Kelebihan kitosan adalah bersifat anti mikroba, penyembuh luka, tidak beracun, murah, biokompatibel, mudah terurai secara biologis, dan larut dalam air (Suryadi *et al.*, 2020).

Sifat antimikroba kitosan dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme, seperti bakteri patogen, jamur maupun bakteri gram positif dan negatif (Kanani *et al.*, 2023). Selain itu kitosan merupakan satu-satunya selulosa yang dapat dimakan, tidak beracun, dapat menginduksi enzim kitinase yang dapat mendegradasi kitin, sehingga dapat digunakan sebagai biofungisida (Mulyaningtyas *et al.*, 2016). Mekanisme antibakteri kitosan dapat terjadi pada level ekstraseluler maupun intraseluler. Pada mekanisme ini, kitosan harus mempunyai berat molekul kecil agar dapat masuk dalam sel mikroorganisme. (Mulyaningtyas *et al.*, 2016). Kitosan memiliki peran dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme dan bersifat antibakteri, tetapi kitosan ini perlu didegradasi menjadi nano partikel untuk meningkatkan efektivitas sebagai antibakteri (Suryadi *et al.*, 2020). Kombinasi nanopartikel perak dengan kitosan dari limbah cangkang tiram berpotensi menghasilkan agen antimikroba yang efektif melawan bakteri *Vibrio* yang resisten terhadap antibiotik (Iskandar, 2024).

Nanopartikel perak kitosan merupakan hasil modifikasi kitosan melalui teknologi nano. Menurut Rohaeti (2019) Nanopartikel memiliki ukuran berkisar 1 hingga 100 nm dapat memberi fungsi khusus dengan sifat antibakteri yang dikembangkan dengan menggunakan senyawa organik maupun anorganik. Nanokitosan memiliki efektivitas antibakteri yang lebih tinggi dari pada kitosan karena nanokitosan memiliki luas permukaan yang lebih besar, sehingga interaksi antara gugus amina ($-NH_2$) dengan membran sel bakteri lebih besar (Hardiningtyas *et al.*, 2022). Kelebihan dari nanokitosan yaitu bersifat tidak toksik, meningkatkan daya adsorpsi kitosan, meningkatkan kemampuan penghantaran, dan memiliki stabilitas yang konstan. (Mulyaningtyas *et al.*, 2016). Menurut Chandrasekaran *et al.*, (2020) mekanisme kitosan sebagai antibakteri yaitu mengganggu dinding sel dan membran sel bakteri, sehingga menyebabkan molekul intraseluler keluar dan kematian sel pada bakteri.

Nanokitosan dapat dicampurkan dengan pakan sebagai bahan pelengkap. Pakan dengan penambahan kitosan dapat menstimulasi fungsi imun, meningkatkan pencernaan dan penyerapan nutrisi, serta kandungan protein, sehingga dapat meningkatkan kinerja pertumbuhan (Aathi *et al.*, 2013). Berdasarkan teori diatas pakan yang telah ditambahkan nanokitosan akan dimakan oleh udang vaname, kandungan kitosan yang terdapat pada pakan akan dihidrolisis oleh enzim kitinase untuk

nun dan melawan infeksi bakteri pada hepatopankreas.



ilmu pengetahuan yang mempelajari tentang jaringan tubuh yang u organ, seperti jaringan epitel, jaringan otot, maupun jaringan saraf anan penting dalam jaringan fundaeltal tubuh (Soesilawati, 2019). atu cara yang dilakukan untuk melihat perubahan metabolisme dari

perubahan jaringan yang terjadi, mendiagnosis penyakit dengan pengidentifikasi perubahan struktur jaringan, dan memberikan gambaran tingkat keparahan suatu penyakit. Pemeriksaan tersebut dapat dilakukan pada udang yang sakit, diduga sakit, dan yang sudah mati (Izzah, 2011). Sukarno (2016) telah melakukan penelitian tentang histologi udang vaname yang terinfeksi penyakit WFS (White Feses Syndrome), yang mengatakan bahwa berdasarkan hasil pengamatan histopatologi, hepatopankreas udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi WFS (*White Feses Syndrome*) memperlihatkan beberapa kerusakan seperti Atropi, Koloni Bakteri, dan terlihat adanya ATM (*Aggregation, Transformation, Mikrovil*). Kerusakan tersebut dapat menyebabkan kematian pada udang vaname.

1.3 Tujuan dan Kegunaan

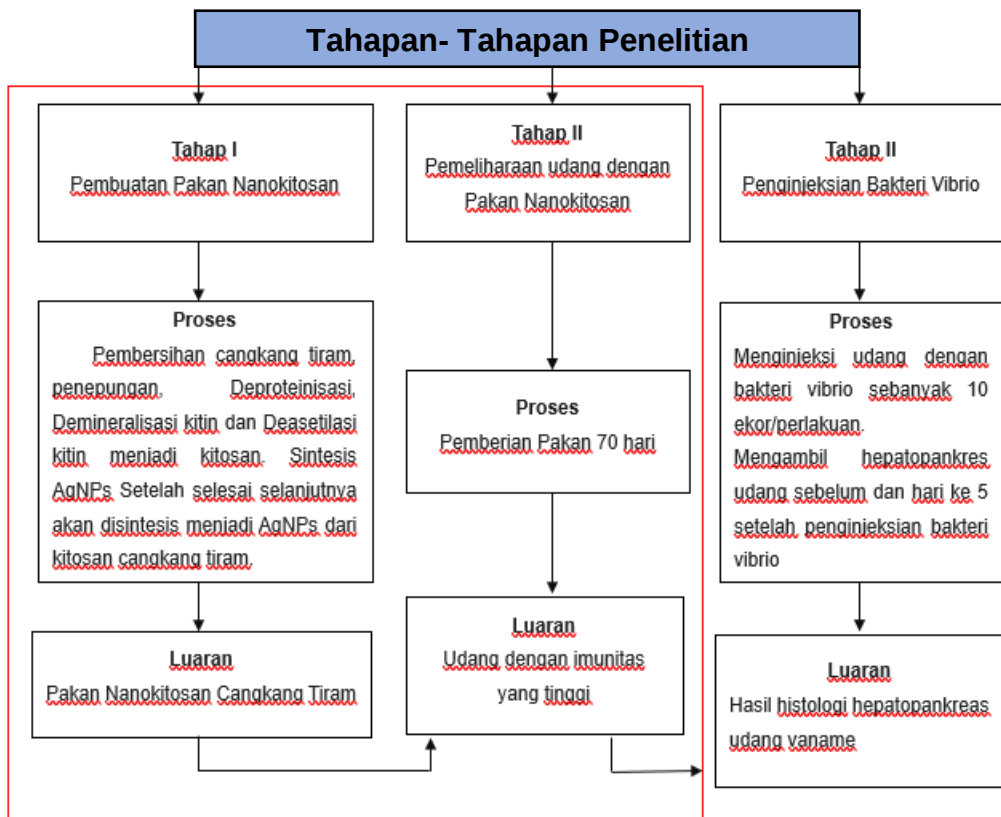
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan kondisi hepatopankreas udang vaname yang diberi pakan nanokitosan cangkang tiram setelah terinfeksi *Vibrio harveyi*.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan solusi alternatif yang efektif dan ramah lingkungan untuk pengendalian penyakit bakterial dalam budidaya udang vaname, serta memanfaatkan limbah cangkang tiram secara optimal dan juga diharapkan dapat menjadi acuan dalam penelitian selanjutnya.



BAB II. METODE PENELITIAN

Adapun metode penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Tahapan-tahapan penelitian

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini bertempat di Hatchery mini, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin. Analisis histologi dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin, Makassar. Di laksanakan pada bulan Oktober – Desember 2024

2.2 Pembuatan Pakan Nanokitosan

Nanokitosan cangkang tiram menggunakan limbah cangkang tiram *Saccostrea cucullata* yang dicuci dengan air mengalir hingga bersih kemudian dikeringkan dibawah **bar 3**). Selanjutnya dilakukan proses penepungan hingga halus. untuk memperoleh kitosannya.





Gambar 3. Cangkang tiram setelah dibersihkan

Ekstraksi cangkang tiram untuk menghasilkan kitosan melalui 3 proses kemudian disintesis dengan AgNPs untuk membentuk ukuran nano yaitu Nanopartikel perak kitosan. Adapun proses pembuatan kitosan yaitu sebagai berikut (Mukhlisa, 2024).

1. Deproteinasi

Tepung cangkang tiram yang diambil sebanyak 50 g dan dicampurkan dengan larutan NaOH 3,5% dengan perbandingan pelarut dan sampel yaitu 6:1. Selanjutnya dipanaskan dan homogenkan menggunakan magnetic stirrer selama 1 jam pada suhu 85°C. Selanjutnya didiamkan hingga dingin dan disaring untuk memperoleh residu dan filtratnya, kemudian residu tersebut dicuci menggunakan aquades sampai pH netral, selanjutnya dikeringkan selama 24 jam didalam oven dengan suhu 85°C.

2. Demineralisasi

Hasil dari deproteinasasi kemudian ditimbang dan campurkan dengan HCl 1,5 N dengan perbandingan sampel dan pelarut yaitu 10:1. Selanjutnya dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer selama 2 jam pada suhu 60°C. Setelah selesai kemudian dicuci menggunakan aquades untuk menetralkan pH dan dikeringkan selama 24 jam didalam oven pada suhu 85°C. Hasil dari demineralisasi ini akan menghasilkan kitin.

3. Deasetilasi kitin menjadi kitosan

Kitin yang dihasilkan kemudian ditimbang dan ditambahkan dengan NaOH 50% dengan perbandingan 10:1 (NaOH:Kitin) selanjutnya dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer selama 2 jam pada suhu 90°C. kemudian didinginkan dan disaring, residu yang dapatkan dicuci dengan aquades dan ditambahkan larutan HCl encer untuk menetralkan pH, selanjutnya dikeringkan pada oven dengan suhu 85°C



ah selesai kemudian akan menghasilkan kitosan, yang selanjutnya NPs untuk memperoleh ukuran nano.

NPs dari kitosan cangkang tiram

hasilkan kemudian ditimbang 0,2 g dan dicampurkan dengan asam uk selama 30 menit. Selanjutnya disaring dan hasil saringan ini kemudian ditambahkan dengan 3 ml AgNO₃ 0,1 M dan 100 ml NaOH

1 M, kemudian ditambahkan lagi dengan asam asetat yang mengandung kitosan. Semua larutan dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer selama 10 jam pada suhu 90°C. setelah selesai warna akan berubah dari tidak berwarna menjadi kuning muda dan akhirnya sampai coklat kekuningan yang menunjukkan pembentukan AgNPs (Mukhlisa, 2024).

AgNPs kitosan limbah cangkang tiram yang digunakan di sesuaikan dengan dosis perlakuan, yaitu 0 ml, 75 ml, 150 ml dan 225 ml dicampurkan ke dalam 2 kg pakan formulasi (Quinonez *et al.*, 2022). Sebelum diberikan ke udang vaname, pakan dihaluskan terlebih dahulu untuk menyesuaikan ukuran bukaan mulut udang vaname.

Adapun formulasi pakan yang dibuat berdasarkan Mukhlisa (2024) dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Formulasi pakan uji

Bahan Baku Pakan (BBP)	Perlakuan Nanopartikel Perak Kitosan (ml)			
	0	75	150	225
Tepung Ikan	39	39	39	39
Tepung Kepala Udang	10	10	10	10
Tepung Kedelai	27	27	27	27
Tepung Jagung	6	6	6	6
Tepung Terigu	5	5	5	5
CMC	2	2	2	2
Minyak Ikan	8	8	8	8
Vitamin Mix	2	2	2	2
Mineral	1	1	1	1
Total	100	100	100	100

Pakan yang telah ditambahkan dengan AgNPs kitosan cangkang tiram kemudian diberikan pada udang vaname sebanyak 4 kali sehari dengan dosis 5% dari biomassa udang vaname (Akram, 2024). Udang tersebut dipelihara selama 70 hari di akuarium.

2.3. Persiapan Wadah

Akuarium yang digunakan sebanyak 4 buah. Akuarium dicuci bersih kemudian dibilas hingga bersih dan dikeringkan. Selanjutnya, akuarium diisi air dengan ketinggian 15 cm, pada bagian atas akuarium ditutup dengan waring hitam dan disetiap akuarium diberi masing-masing aerasi.

2.4 Persiapan Udang

Udang dipelihara selama 70 hari dengan pemberian pakan yang telah ditambahkan nanokitosan cangkang tiram. Kemudian diambil secara acak sebanyak 10 ekor mewakili setiap perlakuan A (0 ml), B (75 ml), C (150 ml), dan D (225 ml).



ri

harveyi yang digunakan berasal dari Balai Perikanan Budidaya Air Tawar, Sulawesi Selatan. Selanjutnya bakteri diremajakan pada media agar (TSA). Inokulasi bakteri dilakukan menggunakan jarum ose, dan inkubasi dilakukan dengan metode gores lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu

penanaman bakteri dikultur pada media cair *Trypticase Soy Broth* (TSB) dengan cara mengambil isolat bakteri dengan jarum ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi TSB. Kemudian diinkubasi pada *waterbath shaker* selama 24 jam.

Selanjutnya dilakukan isolasi bakteri udang vaname dalam media TSA dengan menambahkan media TSA cair sebanyak 20 ml kedalam cawan petri hingga memadat. kemudian menambahkan 200 μ l suspensi bakteri uji dengan kepadatan 10^7 CFU/ml secara aseptis ke permukaan media yang telah memadat dalam cawan petri menggunakan pipet. Lalu suspensi bakteri disebarakan menggunakan spreader secara merata hingga permukaan agar mengering. Selanjutnya, diinkubasi secara terbalik selama 24 jam pada suhu 37°C .

Pembuatan TSA miring dimulai dengan menimbang media padat TSA sebanyak 1,28 g ditambahkan aquadest sebanyak 32 mL lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dipanaskan diatas hot plate. Setelah mendidih dan tercampur rata kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfer selama 20 menit. Setelah disterilkan media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dimiringkan sampe media membeku.

Selanjutnya dilakukan pengenceran bakteri yang diawali dengan mengisi 2 buah tabung reaksi dengan larutan fisiologis sebanyak 10 ml dan 9 ml, kemudian bakteri dari agar mirip di ulas dan campurkan ke tabung reaksi berisi larutan fisiologis 10 ml kemudian di vortex hingga tercampur merata, selanjutnya di encerkan dengan cara mengambil 1 ml dari tabung reaksi 10 ml menggunakan mikropipet dan di masukkan pada tabung reaksi 9 ml kemudian di vortex hingga tercampur merata. Selanjutnya dituankan pada wadah dan bakteri siap untuk digunakan atau di injeksikan pada udang.

2.6 Penginjeksian Bakteri

Bakteri yang telah dibuat dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml, selanjutnya masukkan kedalam spoit sebanyak 0,05 ml. Kemudian, diinjeksikan ke udang pada bagian punggung udang antara segmen kedua dan ketiga. Selanjutnya udang ditempatkan pada wadah yang terpisah untuk setiap perlakuan dan diberi aerasi. Kemudian udang yang telah diinjeksi bakteri *V. harveyi* akan dipelihara selama 5 hari dalam wadah tersebut serta dilakukan pengamatan terkait gejala yang ditimbulkan.

2.7 Histologi

Hepatopankreas udang vaname di ambil terlebih dahulu kemudian di lakukan fiksasi dengan cara memasukkan hepatopankreas udang kedalam larutan formalin 10%. Selanjutnya dilakukan pemotongan jaringan dengan ketebalan 5 mm dan di beri label untuk menandai sampel, kemudian dilakukan dekalsifikasi atau penguraian kalsium agar tidak menyulitkan dalam pembuatan preparat.



istologi terdiri dari beberapa tahapan sebagai berikut:

untuk mengurangi kadar air dalam jaringan menggunakan alkohol li rendam dalam alkohol 70% selama 6 jam, alkohol 80% selama 4 lama 3 jam, alkohol 95% selama 2 jam, dan dilanjutkan dengan ua tahap alkohol 100% masing-masing 1 jam.

2. Penjernihan

Penjernihan dilakukan dengan cara mencelupkan sampel kedalam larutan Xylene I selama 15 menit, Xylene II selama 30 menit, dan Xylene III selama 45 menit.

3. Parafinasi

Pelelehan paraffin dilakukan dalam oven dengan suhu 56-62°C. Paraffin yang digunakan harus bersih dan tidak terkontaminasi dengan benda atau media asing. Setelah paraffin meleleh selanjutnya dilakukan perendaman jaringan pada paraffin I, dan paraffin II masing-masing selama 1 jam.

4. Pembuatan Blok

Pembuatan blok dilakukan dengan tujuan untuk menjaga masing-masing bagian dari jaringan tidak berubah dan tetap pada kondisi tahap awal pemotongan. Jaringan yang berasal dari perendaman paraffin II dipindahkan dalam cetakan yang telah berisi paraffin cair. Paraffin cair dapat dibekukan kembali apabila jaringan telah diatur penempatannya. Pada saat yang bersamaan jaringan ditahan secara perlahan dengan forsep agar permukaan jaringan sejajar dengan dasar cetakan serta tidak terdapat gelembung udara. Selanjutnya cetakan paraffin di pindahkan kedalam lemari pendingin agar membeku hingga permukaan.

5. Pengirisan Jaringan

Pengirisan jaringan dilakukan dengan cara mengiris bagian-bagian blok paraffin dari jaringan dengan menggunakan mikrotom. Selanjutnya mengiris jaringan dengan baik kemudian di masukkan kedalam waterbath bersuhu 40°C. kemudian memilih sayatan yang terbaik dan di letakkan pada slide glass kemudian direkatkan menggunakan polysin. Selanjutnya sampel di keringkan dalam oven pada suhu 50-60°C selama 30 menit.

6. Pewarnaan dengan Menggunakan Hematoxylin & Eosin (H&E)

Pewarnaan H&E dilakukan dengan menggunakan 2 jenis pereaksi untuk memudahkan dalam memahami perubahan patologik dengan mewarnai organella sel dan organisme secara terpisah. Pada pewarnaan H&E, struktur selular dan perubahan patologik dapat dengan mudah diamati yaitu sitoplasma (organella) diwarnai oleh eosin menjadi merah muda dan nukleus di warnai oleh hematoxylin menjadi ungu (Sukarno, 2016).

Adapun prosedur pewarnaan Hematoxylin & Eosin yaitu sebagai berikut

a. Deparaffinisasi dan Hidrasi

Deparaffinisasi dan hidrasi yaitu tahap menghilangkan paraffin dengan perendaman xylol jaringan di rendam pada Xylol I dan II selama masing-masing 5 menit kemudian direndam kembali dalam seri alkohol menurun mulai dari alkohol 100% masing-masing 5 menit, alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% selama 5 menit. Kemudian direndam kembali di air mengalir selama 10 menit dan



b. Pewarnaan Hematoxylin & Eosin (H&E)

Pewarnaan hematoxylin & Eosin dilakukan dengan menambahkan pewarna Hematoxylin selama 10 menit dan Eosin selama 5 menit.

c. Dehidrasi dan Penjernihan

Dehidrasi dan penjernihan dilakukan dengan tujuan untuk mengurangi kadar air agar pemberian warna dapat melekat dengan baik serta dapat terlihat jelas ketika diamati. Dehidrasi dilakukan dengan membilas slide glass menggunakan alkohol bertingkat di mulai dari alkohol 70%, 80%, 90%, 95%. Kemudian di masukkan kedalam alkohol 100% I selama 5 menit dan alkohol 100% II selama 10 menit. Penjernihan dilakukan dengan merendam slide atau sayatan tersebut menggunakan Xylol I dan II selama masing-masing 5 menit.

d. Penutupan

Penutupan dilakukan dengan meneteskan DPX mounting pada slide glass kemudian ditutup dengan cover glass kemudian direkatkan agar tidak terdapat gelembung udara. Selanjutnya di biarkan hingga kering di suhu ruang sebelum di amati di bawah mikroskop. Selanjutnya melakukan pengamatan mikroskopik pada berbagai pembesaran untuk menilai perubahan patologi yang terjadi pada jaringan hepatopankreas udang.

2.8 Parameter Uji

Parameter uji yang dilakukan pada penelitian ini yaitu kondisi hepatopankreas pada udang vaname, berupa kerusakan jaringan hepatopankreas udang perlakuan sebelum injeksi dan udang perlakuan yang telah diinjeksi. Pengamatan dilakukan pada hari ke- 5 setelah injeksi dengan menggunakan metode Pewarnaan Hematoxylin dan Eosin (H&E) dengan pengamatan mikroskop.

2.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan yaitu analisis deskriptif, dimana hasil histologi hepatopankreas dianalisis secara deskriptif menggunakan gambar serta presentase kerusakan jaringan dianalisis menggunakan metode scoring presentase kerusakan jaringan yang merujuk pada Quinonez *et al.*, 2022, dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2. Pemberian skor berdasarkan persentase kerusakan

Tingkat kerusakan	Presentase kerusakan	Skor
Normal (-)	0%	0
Ringan (+)	<25%	1
Sedang (++)	25-50%	2
	50-75%	3
	>75%	4

