

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Akuakultur saat ini menjadi salah satu sektor kunci dalam penyediaan pangan global. Berdasarkan laporan FAO (2024), produksi akuakultur dunia pada tahun 2022 mencapai 130,9 juta ton, untuk pertama kalinya melampaui hasil tangkapan laut. Kawasan Asia menyumbang sekitar 91,4% dari total produksi tersebut, dengan Tiongkok, India, dan Indonesia sebagai kontributor utama (FAO, 2025). Data pembaruan *FishStat* menegaskan bahwa Indonesia merupakan salah satu produsen akuakultur terbesar di dunia, dengan kontribusi sekitar 7% terhadap produksi global (FAO, 2025).

Ikan bandeng (*Chanos chanos* (Forsskål, 1775)) termasuk dalam kelompok spesies utama yang dibudidayakan di kawasan Asia Tenggara. Produksi global bandeng pada tahun 2022 tercatat sekitar 1,2–1,3 juta ton, di mana lebih dari 70% berasal dari Indonesia dan Filipina (FAO, 2025). Di Indonesia, praktik budidaya bandeng telah berlangsung selama berabad-abad dan berkembang melalui berbagai sistem mulai dari tradisional hingga intensif (Riany et al., 2023). Hingga tahun 2022, produksi bandeng nasional telah melampaui 600 ribu ton, menjadikannya salah satu komoditas strategis nasional yang bernilai ekonomi tinggi serta berperan penting sebagai sumber protein terjangkau dan penopang mata pencaharian masyarakat pesisir (Jose & Divya, 2022).

Namun, seiring dengan meningkatnya intensifikasi kegiatan budidaya, ikan bandeng menjadi semakin rentan terhadap berbagai jenis patogen. Faktor-faktor ekologis yang berbeda pada berbagai sistem dan lingkungan budidaya dapat memengaruhi frekuensi, distribusi, dan intensitas infestasi parasit (Zamri et al., 2025). Akuakultur bandeng menghadapi berbagai tantangan, dengan faktor pembatas utama berupa kerugian akibat penyakit infeksius yang disebabkan oleh parasit, bakteri, jamur, dan virus (Assefa & Abunna, 2018). Infeksi bakteri, khususnya yang disebabkan oleh *Vibrio* spp., telah dilaporkan sebagai penyakit dominan dalam sistem akuakultur dan sering kali menimbulkan kerugian ekonomi yang signifikan (Mohamad et al., 2019b; Deng et al., 2020).

Laporan terkini menunjukkan kejadian *fin rot* pada benih bandeng yang dikaitkan dengan *Vibrio harveyi* dan terbukti patogenik melalui ujiantang, memperkuat status *V. harveyi* sebagai patogen penting dalam perikanan budidaya tropis (Superio et al., 2021). Selain itu, infestasi parasit juga menjadi kendala serius. Penelitian di Jawa Timur menemukan parasit insang *Dactylogyrus* dan *Capillaria* dengan prevalensi 2,5–5% dan intensitas 1–2 parasit per ekor ikan (Atsnani & Farikhah, 2023). Penelitian lain melaporkan infestasi *Dactylogyrus vastator* pada kolam pendederan dan pembesaran dengan prevalensi masing-masing 5,33% dan 2,0% (Hidayatullah et al., 2020). Walaupun prevalensinya relatif rendah, keberadaan parasit dapat menurunkan performa pertumbuhan, melemahkan sistem imun, dan meningkatkan risiko infeksi sekunder (Buchmann & Lindenstrøm, 2002).

Dalam konteks penelitian ini, terdapat laporan kematian ikan bandeng dari masyarakat petambak di wilayah Sulawesi-Selatan yang menunjukkan adanya masalah kesehatan ikan di tingkat lapangan. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk memperoleh gambaran menyeluruh mengenai kondisi kesehatan ikan

bandeng sejak stadia awal hingga pembesaran. Pemeriksaan histopatologi insang dilakukan untuk mendeteksi perubahan jaringan. Insang merupakan organ vital dalam respirasi, osmoregulasi, dan menjadi barier imun terhadap patogen akuatik, sehingga sangat sensitif terhadap gangguan lingkungan dan infeksi (Poleksić & Mitrović-Tutundžić, 1994; Roberts, 2012). Penggunaan pendekatan histopatologi pada tahap awal memungkinkan deteksi dini dampak infeksi atau stres lingkungan bahkan sebelum muncul gejala klinis (Mallatt, 1985; Bernet et al., 1999). Selanjutnya, identifikasi parasit dan bakteri dilakukan untuk mengetahui jenis patogen yang berperan dalam kasus tersebut.

Perkembangan teknologi diagnostik juga telah meningkatkan ketepatan identifikasi patogen. Untuk bakteri, metode Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) kini mulai digunakan di laboratorium mikrobiologi akuakultur karena mampu memberikan hasil identifikasi cepat, akurat, dan berbiaya relatif rendah dibandingkan metode konvensional (Piamsomboon et al., 2020). Metode ini mendeteksi profil massa protein/peptida bakteri dan membandingkannya dengan pustaka referensi dengan akurasi hingga 99,9% pada tingkat spesies (Catagay, 2024). Sementara itu, identifikasi parasit ikan masih banyak bergantung pada pemeriksaan morfologi menggunakan mikroskop stereo maupun binokuler, yang memungkinkan deteksi cepat karakter khas seperti dentikel pada *Trichodina* spp. Identifikasi patogen yang tepat sangat penting untuk pencegahan penularan dan penentuan terapi penyakit yang akurat (Sufardin et al., 2021).

Meskipun demikian, studi tentang profil multipatogen pada bandeng di Indonesia masih terbatas. Sebagian besar penelitian sebelumnya hanya berfokus pada prevalensi satu jenis patogen (Cruz-Lacierda et al., 2011). Hingga saat ini, belum tersedia data dasar (*baseline data*) yang menggambarkan keragaman patogen bakteri dan parasit secara simultan pada ikan bandeng di Sulawesi Selatan. Kekosongan data ini menjadi *knowledge gap* penting yang berpotensi menghambat perumusan strategi biosekuriti dan pengendalian penyakit berbasis bukti epidemiologis lokal.

Pemilihan dua lokasi penelitian, yaitu Instalasi Tambak Percobaan (ITP) Marana, Maros dan tambak masyarakat di Labakkang, Pangkep, dilakukan dengan pertimbangan representativitas sistem budidaya utama di Sulawesi Selatan. ITP Marana mewakili sistem budidaya semi-intensif dengan manajemen kualitas air yang relatif terkontrol serta sumber larva dari hatchery Barru, sedangkan tambak masyarakat Labakkang mencerminkan sistem tradisional-ekstensif dengan sumber benih dari Bali dan pengelolaan yang lebih sederhana dimana menggunakan tambak tradisional, jarang dilakukan pengurasan air, dan pemberian kapur pada tambak. Perbedaan ini penting untuk menggambarkan variasi tekanan patogen dan praktik biosekuriti antar sistem. Kedua wilayah juga merupakan sentra produksi bandeng utama di Provinsi Sulawesi Selatan (DKP Sulsel, 2023; BPS, 2023), sehingga hasil penelitian diharapkan dapat merepresentasikan kondisi lapang aktual di tingkat produksi daerah.

Selain itu, pemilihan stadia ikan uji yang meliputi larva, nener, penggelondongan dan pembesaran awal bertujuan untuk menggambarkan dinamika infeksi multipatogen pada fase siklus produksi. Stadia ini merupakan tahapan dengan kerentanan fisiologis tinggi terhadap patogen, sehingga sangat strategis untuk memetakan perubahan prevalensi dan intensitas infeksi dari tahap awal hingga fase pembesaran awal. Cakupan stadia yang diamati pada masing-masing lokasi disesuaikan dengan karakteristik sistem budidaya setempat; pada tambak masyarakat Labakkang, sampling difokuskan pada stadia larva dan nener, karena fase penggelondongan tidak dilakukan di lokasi tersebut. Pendekatan ini memberikan dasar epidemiologi yang lebih komprehensif untuk pengendalian penyakit sejak dini.

1.2. Rumusan Masalah

- 1.2.1 Bagaimana keberadaan patogen (bakteri dan parasit) pada ikan bandeng berbagai (*Chanos chanos*) di dua wilayah perairan di Sulawesi Selatan (ITP Marana–Maros dan tambak masyarakat, Labakkang Pangkep)?
- 1.2.2 Apakah terdapat perbedaan tingkat prevalensi, intensitas, serta kelimpahan parasit dan bakteri patogen antar lokasi, serta bagaimana kaitannya dengan kondisi histopatologi insang larva bandeng?

1.3. Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Mengidentifikasi keberadaan patogen (bakteri dan parasit) pada ikan bandeng berbagai stadia (*Chanos chanos*) di dua wilayah perairan di Sulawesi Selatan (ITP Marana–Maros dan tambak masyarakat Pangkep)?
- 1.3.2 Mendeskripsikan perbedaan tingkat prevalensi, intensitas, serta kelimpahan parasit dan bakteri patogen antar lokasi, serta bagaimana kaitannya dengan kondisi histopatologi insang bandeng.

1.4. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu bahan informasi mengenai informasi pathogen (bakteri dan parasit) pada ikan bandeng serta memperkuat dasar ilmiah bagi pengembangan kajian penyakit ikan budidaya di Indonesia. Hasil penelitian ini dapat menjadi data dasar mengenai jenis pathogen, prevalensi, intensitas, dan gambaran histopatologi insang bandeng yang bermanfaat bagi pembudidaya, pemerintah dan peneliti untuk merumuskan strategi biosekuriti dan pengendalian penyakit bandeng secara efektif dan berkelanjutan.

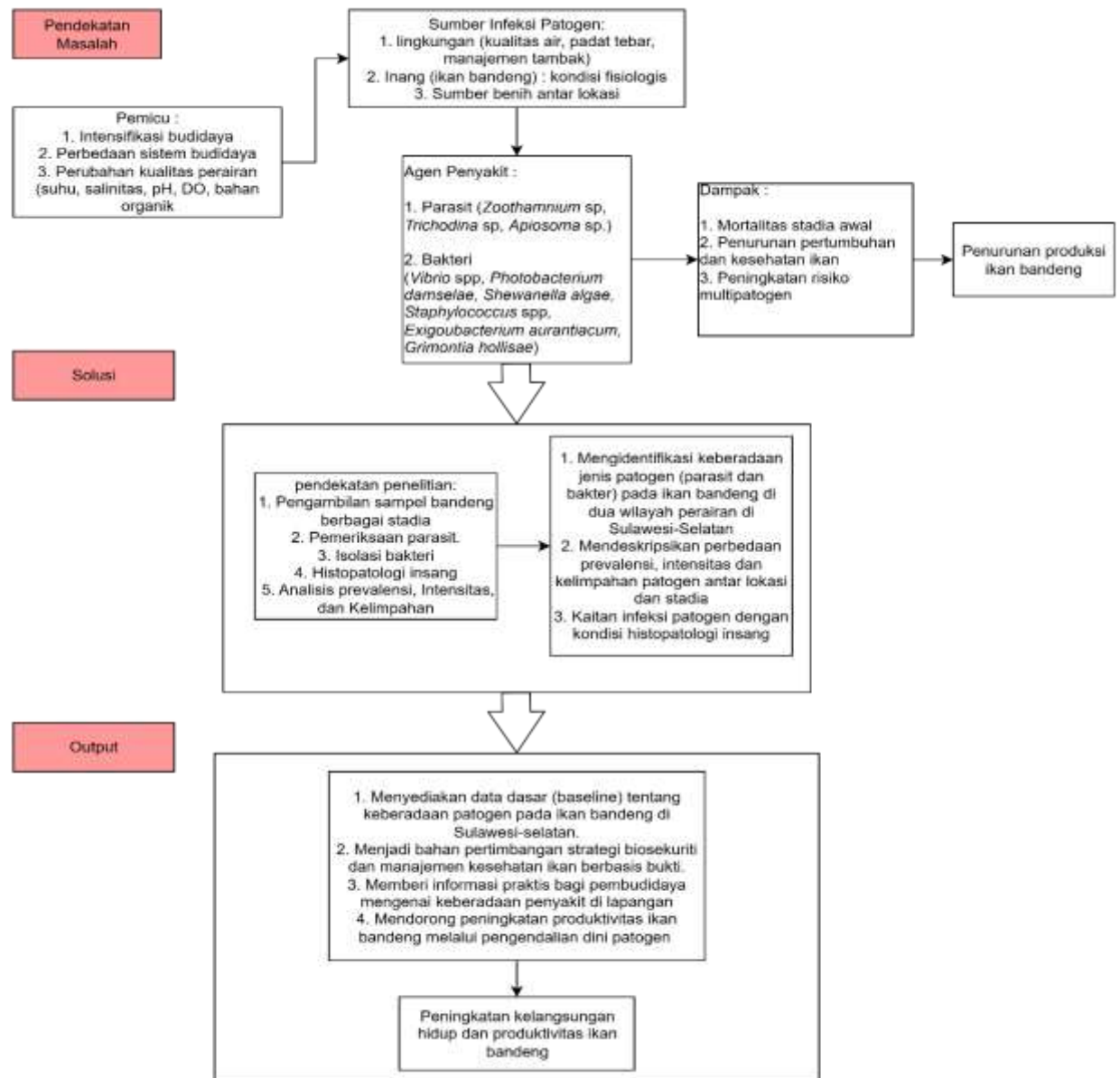
1.5. Kerangka Pikir

Kerangka pikir penelitian ini (gambar 1) menggambarkan alur dari permasalahan yang dihadapi dalam sistem budidaya bandeng di Sulawesi Selatan hingga terbentuknya profil infeksi multipatogen pada berbagai stadia ikan. Intensifikasi budidaya bandeng yang terus meningkat menyebabkan perubahan kondisi lingkungan, seperti kualitas air, padat tebar, serta praktik manajemen yang bervariasi. Perubahan tersebut berpotensi menimbulkan stres pada ikan, terutama pada stadia larva dan nener, ketika kondisi fisiologis dan sistem imun masih rentan.

Kondisi tersebut meningkatkan risiko terjadinya infeksi tunggal maupun multipatogen (parasit dan bakteri). Penelitian dilakukan pada dua lokasi dengan karakteristik sistem budidaya yang berbeda, yaitu ITP Marana, Maros yang bersifat semi-intensif dan tambak masyarakat Labakkang, Pangkep yang bersifat tradisional. Perbedaan sistem budidaya ini berimplikasi terhadap tekanan lingkungan dan potensi infeksi patogen.

Untuk memahami dinamika penyakit pada sistem budidaya tersebut, dilakukan serangkaian analisis yang meliputi pemeriksaan histopatologi (stadia nener), identifikasi parasit, dan isolasi bakteri pada ikan bandeng dari berbagai stadia pertumbuhan. Hasil pemeriksaan ini kemudian digunakan untuk membandingkan profil infeksi multipatogen berdasarkan jenis patogen, prevalensi, intensitas, kelimpahan, dan kepadatan antara dua lokasi dan beberapa stadia. Informasi yang diperoleh diharapkan dapat menjadi

dasar dalam perumusan strategi pengendalian penyakit yang lebih efektif pada budidaya bandeng di Sulawesi Selatan.



Gambar 1. Kerangka pikir penelitian

1.6 Landasan Teori

1.6.1 Bandeng (*Chanos-Chanos*)

Klasifikasi Ikan bandeng menurut Forsskål (1775) dalam *World Register of Marine Species* (WoRMS) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
 Filum : Chordata
 Subfilum : Vertebrata
 Kelas : Teleostei
 Ordo : Gonorynchiformes
 Famili : Chanidae
 Genus : *Chanos*

Spesies : *Chanos chanos*

Tubuh bandeng memanjang (fusiform/torpedo), sedikit gepeng, mulut kecil tanpa gigi, Sirip dorsal di pertengahan tubuh, sirip pectoral falcat, ekor bercagak dalam tanpa scute pada perut (Fishbase,2016). Seluruh permukaan tubuhnya bersisik *cycloid*, berwarna perak cerah, bagian punggungnya agak perak kehijauan. Pada bagian tengah tubuhnya terdapat garis sisi (gurat sisi) yang memanjang secara lateral dari *operculum* (tutup insang) sampai ke pangkal ekor. Bandeng jantan warna sisiknya lebih mengkilap dan lebih cerah, memiliki dua lubang kecil di bagian anus yang tampak jelas pada bandeng dewasa. Bandeng betina memiliki tiga lubang di bagian anus dan tanda tersebut tampak jelas pada bandeng dewasa (Winarsih, et al., 2011 dan Chaudhuri et al., 1997). Gambar ikan bandeng dapat dilihat pada Gambar 1.1.



Gambar 2. Ikan sampel penelitian , Bandeng (*Chanos-chanos* Forsskål (1775))

1.6.2 Habitat

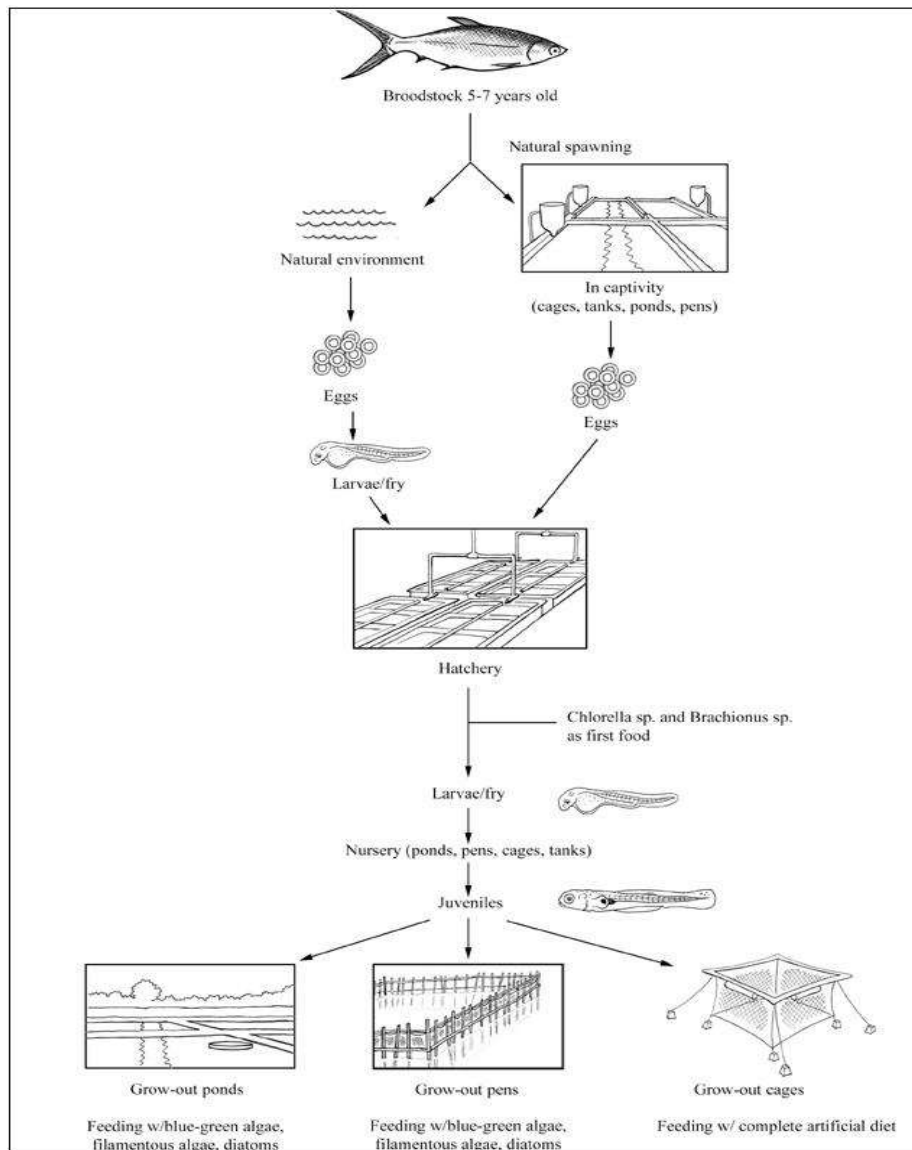
Bandeng merupakan ikan tropis-subtropis dengan distribusi alami luas di Indo-Pasifik, mulai dari pantai Afrika timur, India, Asia Tenggara, hingga Pasifik Tengah, namun konsentrasi terbesar berada di Asia Tenggara. Spesies anadromous semu (pseudo-anadromous) yang memijah di laut tetapi juvenile tumbuh di perairan pesisir, estuari, payau, sebelum kembali ke laut ketika dewasa. Kemampuan eurihalin inilah yang membuat bandeng menjadi komoditas penting di akuakultur tropis (Bagarinao, 1991). Bandeng hidup di salinitas 35 ppt hingga ke daerah muara sungai yang memiliki salinitas 15-20 ppt. Ikan bandeng digolongkan ke dalam *euryhaline* atau jenis ikan memiliki toleransi terhadap perubahan salinitas yang luas (Afrillia, 2024). Di alam nener bandeng sering dijumpai bersamaan dengan larva bandeng. Pada musim nener, nelayan menangkap dan mengumpulkan nener dengan alat seser, belabar, kimo dan waluh. Nener bandeng umumnya dijumpai pada daerah pasang surut yang airnya jernih, dasar pantai berpasir, berbatu atau berkarang (Winarsih, et al., 2011).

1.6.2 Siklus Hidup

Siklus hidup ikan dimulai dari fase telur yang kemudian menetas menjadi larva, dilanjutkan ke tahap benih atau juvenil, hingga akhirnya mencapai fase dewasa. Di Indonesia, musim pemijahan ikan bandeng umumnya berlangsung dua kali dalam setahun, yaitu pada periode Februari hingga Mei, dengan puncaknya terjadi sekitar Maret hingga April, serta pada periode Juli hingga Desember, dengan puncak pemijahan sekitar bulan September hingga Oktober. Proses pemijahan biasanya terjadi pada malam hari, antara pukul 20.00 hingga 22.00, dan telur akan menetas dalam waktu sekitar 24 jam setelah proses pembuahan (Mas'ud, 2011).

Menurut Mukhlis et al (2020) secara umum, pemijahan berlangsung antara pukul 24.00 hingga 04.00 dan terjadi sekitar lima hari sebelum hingga lima hari setelah fase

bulan purnama atau bulan gelap. Pembuahan terjadi secara eksternal, di mana induk betina terlebih dahulu melepaskan telur yang kemudian dibuahi oleh sperma dari induk jantan. Induk jantan biasanya mengikuti gerakan induk betina saat proses pemijahan akan berlangsung. Perilaku berenang berpasangan antara jantan dan betina menjadi indikator bahwa proses pemijahan segera terjadi. Siklus hidup dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Siklus produksi bandeng (*Chanos chanos*) dari broodstock hingga fase grow-out (FAO, 2006)

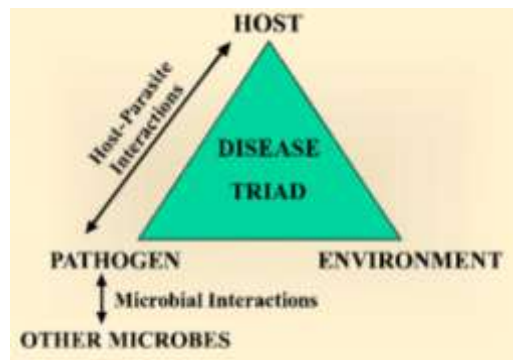
1.6.3 Pakan dan Kebiasaan Makan

Bandeng termasuk herbivora (pemakan tumbuh-tumbuhan). Ikan bandeng mempunyai kebiasaan makan pada siang hari. Di habitat aslinya ikan bandeng mempunyai kebiasaan mengambil makanan dari lapisan atas dasar laut, berupa tumbuhan mikroskopis seperti plankton, udang renik, jasad renik, dan tanaman multiseluler lainnya. Makan ikan bandeng disesuaikan dengan ukuran mulutnya (Marzuqi, 2015).

Pakan untuk benih bandeng (setelah berumur lebih dari 30 hari disebut nener) secara alami berupa fitoplankton dan zooplankton. Selanjutnya, setelah dibudidayakan di tambak dan mencapai ukuran gelondongan, pakan utama bandeng adalah alga yang hidup di dasar tambak yang lebih dikenal sebagai kelekup. Nener menjadi gelondongan setelah mencapai umur ± 2 bulan dengan ukuran 5-8 cm. Di alam nener banyak terdapat pada perairan pantai karang berpasir atau lumpu berpasir yang banyak mengandung plankton dan airnya jernih (Winarsih, et al., 2011).

1.6.4 Identifikasi Patogen

Model segitiga penyakit (disease triad) menjelaskan bahwa timbulnya penyakit pada ikan merupakan hasil interaksi dinamis antara tiga faktor utama: inang (host), patogen (pathogen), dan lingkungan (environment) gambar 3.



Gambar 3. disease triad pada ikan (dimodifikasi dari Snieszko, 1974; Roberts, 2012)

Ketidakseimbangan salah satu komponen dapat memperbesar kerentanan, misalnya inang dengan imunitas lemah, patogen dengan virulensi tinggi, atau lingkungan yang buruk (misalnya kualitas air menurun), sehingga memicu wabah penyakit. Konsep ini pertama kali diperkenalkan dalam konteks perikanan oleh Snieszko (1974), yang menekankan peran stres lingkungan sebagai pemicu utama munculnya penyakit, dan kemudian diperdalam oleh Roberts (2012) yang menegaskan pentingnya manajemen kesehatan ikan berbasis pendekatan integratif antara host–pathogen–environment. Panah “Host–Parasite Interactions” menunjukkan mekanisme spesifik interaksi inang–parasit, sedangkan “Microbial Interactions” menegaskan adanya peran mikroba lain yang dapat bersifat kompetitif atau sinergis terhadap patogen utama. Model ini banyak digunakan dalam kajian penyakit akuakultur, termasuk pada ikan bandeng (*Chanos chanos*), di mana faktor lingkungan seperti kualitas air, kepadatan tebar, dan nutrisi dapat memperburuk infeksi parasit (misalnya *Trichodina* sp.) dan memfasilitasi kolonisasi bakteri oportunistik (*Vibrio* spp.).

1. Parasit

Hubungan antara parasit dan inangnya memiliki karakteristik yang berbeda dengan interaksi antara predator dan mangsa. Parasit bergantung langsung pada organisme inang untuk bertahan hidup, sehingga keberlangsungan hidup inang menjadi penting bagi kelangsungan hidup parasit itu sendiri. Oleh karena itu, parasit umumnya tidak membunuh inangnya secara langsung, setidaknya tidak sebelum memiliki kesempatan untuk berkembang biak dan menyebarkan keturunannya ke inang yang baru. Jika inang mati terlalu cepat, maka parasit yang bergantung padanya juga berisiko mati. Efek

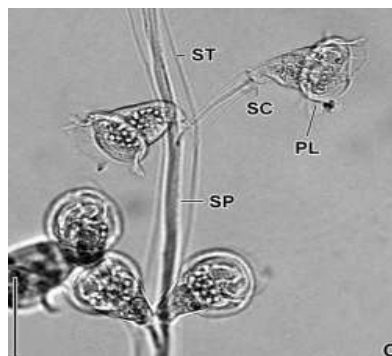
berbahaya ini bisa ditandai dengan penyerangan ektoparasit (Ridhwan et al., 2023). Parasit yang ditemukan menyerang ikan bandeng pada penelitian ini adalah :

a. *Zoothamnium* sp

Klasifikasi parasit *Zoothamnium* menurut Bory de St. Vincent (1824) dalam *World Register of Marine Species* (WoRMS) adalah sebagai berikut:

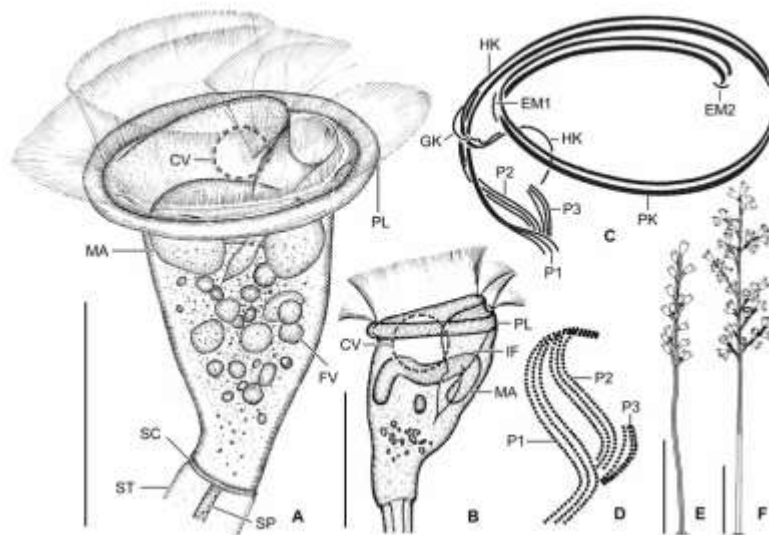
Kingdom : Chromista
 Filum : Ciliophora
 Subfilum : Intramacronucleata
 Class : Oligohymenophorea
 Ordo : Sessilida
 Family : Zoothamniidae
 Genus : *Zoothamnium*

Zoothamnium adalah genus protozoa bersilia (Ciliophora) (WoRMS). Organisme ini bersifat sessil (melekat), membentuk koloni, dengan tangkai (stalks) yang bisa bercabang, zooid (unit sel) seperti cawan (bell-shaped) yang tersambung ke tangkai, dan system silia oral dan garis-perak (silverline system) sebagai bagian dari struktur morfologi khas (Ji et al., 2015). *Zoothamnium* sp. (gambar 4) memiliki morfologi yang menyerupai lonceng terbalik, dengan struktur pelekak yang terletak di ujung batang dan menempel langsung pada permukaan. Batangnya bersifat transparan dan di dalamnya terdapat jaringan kontraktile yang disebut myonem. Parasit ini berwarna keputihan dan ketika masih hidup, tubuhnya yang menyerupai lonceng akan menunjukkan gerakan ritmis berupa membuka dan menutup. Organisme ini dapat hidup secara berkelompok dalam koloni maupun secara individu (Tompo dan Andi, 2016).



Gambar 4. Bentuk zooid *Zoothamnium* sp, PL = bibir peristomial; SC = skopula; SP = spasmonem; ST = tangkai. Skala: 20µm (Ji et al.,2015)

2



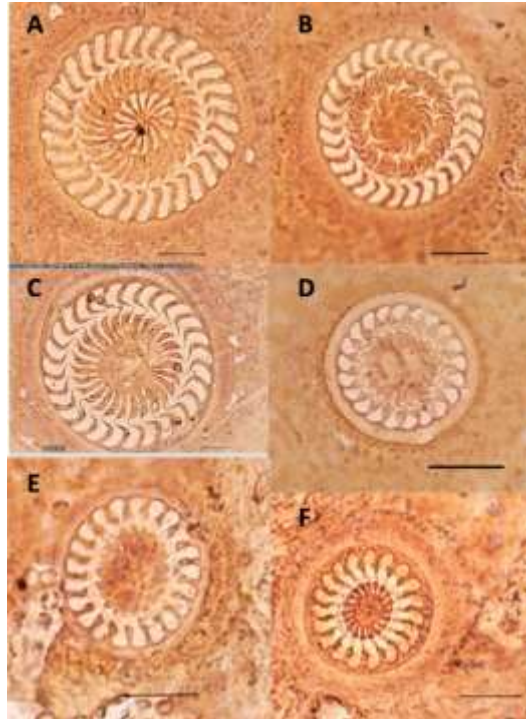
Gambar 4.2. Morfologi *zoothamnium* sp. CV = vakuola kontraktif, EM1–2 = membran epistomial 1–2, FV = vakuola makanan, GK = kinety germinal, HK = haplokinety, IF = infundibulum, MA = makronukleus, P1–P3 = polikineti infundibulum 1–3, PK = polikineti, PL = bibir peristomial, SC = skopula, SP = spasmonem, ST = tangkai. Skala: 40 μ m (A, B); 400 μ m (E, F).

b. *Trichodina* sp

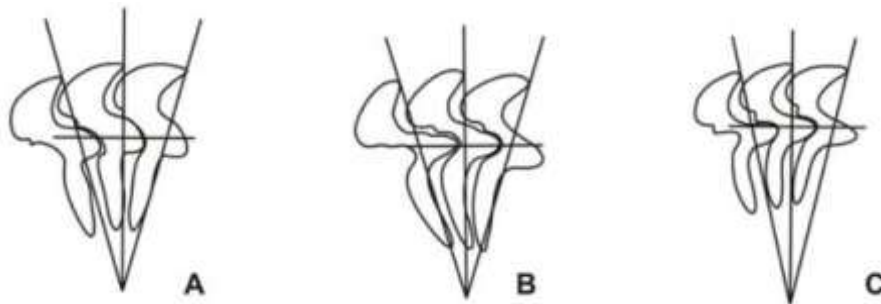
Klasifikasi parasit *Trichodina* sp. menurut Ehrenberg (1830) dalam *World Register of Marine Species* (WoRMS) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Chromista
 Filum : Ciliophora
 Subfilum : Intramacronucleata
 Kelas : Oligomonophora
 Ordo : Mobilida
 Family : Trichodinidae
 Genus : *Trichodina*

Trichodina sp. merupakan salah satu jenis protozoa bersilia yang bersifat parasitik dan dapat menginfeksi benih maupun ikan budidaya. Kehadiran ektoparasit ini berperan dalam menurunkan sistem pertahanan tubuh ikan, sehingga meningkatkan risiko terjadinya infeksi sekunder, khususnya pada permukaan tubuh. Parasit ini umumnya ditemukan menyerang bagian kulit dan insang ikan. *Trichodina* sp. berkembang biak dengan cara pembelahan biner, tidak memerlukan inang perantara dalam siklus hidupnya dan dapat menyebar dari ikan satu ke ikan yang lain melalui sentuhan (Rokhmani et al., 2017).



Gambar 5. Trichodinid pada ikan. A & B. *Trichodina centrostrigeata*, C. *Trichodina magna*, D. *Paratrachodina africana*, E. *Trichodinella* sp., F. *Tripartiella* sp. (Anshary et al., 2023)



Gambar 5.2 gambar dentikel *Trichodina* sp., A *Trichodina pseudoheterodentata* sp.; B, *Trichodina heterodentata* Duncan; C, *Trichodina paraheterodentata*.

Trichodina sp. memiliki struktur berbentuk cakram yang dilengkapi dengan kait-kait kecil yang menempel kuat pada permukaan tubuh ikan. Keberadaan parasit ini menimbulkan rasa tidak nyaman atau gatal pada inang, sehingga ikan sering kali menggesekkan tubuhnya ke dasar kolam. Gejala lain yang umum terlihat meliputi tubuh yang tampak lemas, perubahan warna menjadi lebih kusam atau pucat, peningkatan produksi lendir di permukaan tubuh, serta penurunan nafsu makan yang dapat menyebabkan kondisi tubuh ikan menjadi kurus (Farlizah et al., 2023).

c. *Apiosoma* sp

Klasifikasi parasit *Apiosoma* menurut Blanchard (1885) dalam *World Register of Marine Species* (WoRMS) adalah sebagai berikut:

Kingdom: Chromista

Filum : Ciliphora

Subfilum: Intramacronucleata

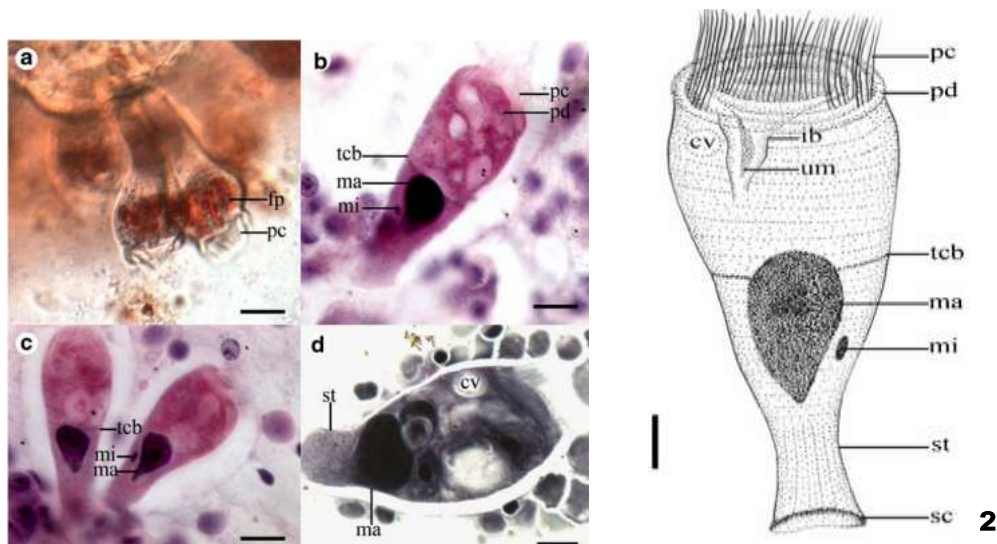
Class : Oligohymenophorea

Ordo : Sessilida

Family : Epistylididae

Genus : *Apiosoma*

Apiosoma sp. (gambar 6) adalah protozoa bersilia (Ciliophora), termasuk peritrich hidup melekat (sessile) pada kulit, insang, sirip ikan atau permukaan tubuh ikan. Bentuk tubuh seperti lonceng terbalik yang melekat langsung ke permukaan dengan alat perekat. seperti *Zoothamnium*, *Apiosoma* juga melekat pada tubuh ikan, tapi *Apiosoma* biasanya tanpa stalk panjang, mungkin sedikit atau sangat pendek, berbeda dari *Zoothamnium* yang jelas bercabang dan memiliki stalk/turut kolonialitas. *Apiosoma* bisa muncul dalam jumlah banyak terutama di lingkungan dengan banyak materi organik, kondisi air buruk, padat tebar tinggi



Gambar 6. a. Spesimen hidup yang diwarnai dengan Neutral Red, silia peristomial (pc) yang kuat pada peritrich ini serta partikel makanan (fp) Skala batang = 20 μm . b, c. Spesimen yang diwarnai, cakram peristomial (pd), silia adoral (pc), pita silia (tcb) dan inti (ma = makronukleus, mi = mikronukleus). Skala batang b dan c = 10 μm . d. memperlihatkan vakuola kontraktile (cv), makronukleus (ma), dan tangkai (st). Skala batang = 10 μm . (Li et al., 2008).

Gambar 6.2. Morfologi *apiosoma sp.* Cakram peristomal (pd), silia adoral (pc), infundibulum (ib), membrane bergelombang (um), vakuola kontraktile (cv), pita silia transversal (tcb) makronukleus (ma) mikronukleus (mi), tangkai (st), skopula (sc)

2. Bakteri

Serangan bakteri patogen pada ikan bandeng tentunya dapat berdampak pada kerugian pembudidaya, sehingga diperlukan pencegahan untuk mengatasi masalah tersebut. Pencegahan yang dapat dilakukan adalah dengan memantau dan mengidentifikasi jenis bakteri yang menyerang ikan bandeng agar tidak terjadi serangan bakteri patogen (Klau et al., 2021).

Menurut Felix *et al* (2011), salah satu jenis bakteri yang kerap menjadi penyebab penyakit pada ikan bandeng adalah bakteri dari genus *Vibrio*. Penyebaran infeksi dari bakteri ini terbilang cepat dan mudah terjadi, terutama melalui pergerakan organisme pembawa. Bakteri ini dikenal sebagai penyebab penyakit yang disebut penyakit fluorescent atau sering juga disebut penyakit kunang-kunang. Secara umum, *Vibrio* termasuk dalam kategori bakteri oportunistik, yang artinya bakteri ini tidak selalu bersifat patogen, tetapi dapat menjadi penyebab penyakit ketika kondisi lingkungan atau daya tahan tubuh ikan melemah. Berdasarkan pernyataan Krishnani et al. (2019), *Vibrio spp.*

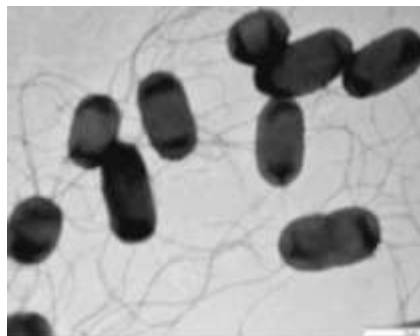
pada ikan budidaya sulit dikendalikan, terutama pada kolam dengan kepadatan tebar yang tinggi. Selain itu, jenis bakteri lain yang menyerang bandeng seperti *Staphylococcus* sp. *Vibrio* sp. *Grimontia hollisae*, *Photobacterium damsela*, *Shewanella algae*, dan *Exiguobacterium aurantiacum*. *Staphylococcus scui*.

a. *Staphylococcus arlatta*

Staphylococcus arlatta merupakan bakteri dari genus *Staphylococcus*, memiliki gram positif, coagulase-negative. Selain ditemukan pada ikan juga umumnya ditemukan sebagai flora kulit/permukaan hewan (termasuk ternak, unggas) dan lingkungan. *S. arlatta* tidak dikenal sebagai agen penyakit primer pada ikan. Bakteri ini biasanya hadir sebagai kontaminan lingkungan atau kolonisasi pada kulit/insang. Faktor predisposisi yang menyebabkan salah satunya stress lingkungan (ammonia tinggi, DO rendah) serta luka akibat parasite ektoparasit.

b. *Exiguobacterium aurantiacum*

Merupakan genus *Exiguobacterium*, yang secara resmi diklasifikasikan pada tahun 1983. Genus ini diketahui memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi, terbukti dari keberadaannya yang telah diisolasi dari berbagai jenis lingkungan ekstrem, seperti gletser di wilayah Greenland dan Siberia, serta sumber air panas di kawasan Yellowstone. *E. aurantiacum* merupakan salah satu spesies bakteri gram positif (Gambar 7). Bakteri ini umumnya ditemukan di lingkungan akuatik, baik tawar, payau maupun laut (Gusman et al., 2021).



Gambar 7. *Exiguobacterium aurantiacum* (Gusman et al., 2021)

Dalam konteks perikanan budidaya, khususnya pada budidaya ikan bandeng, keberadaan *Exiguobacterium aurantiacum* menjadi perhatian karena kemampuannya untuk berkembang di lingkungan tambak yang memiliki beban organik tinggi. Walaupun bakteri ini umumnya tidak dikenal sebagai patogen utama pada ikan, namun dalam kondisi tertentu seperti stres lingkungan, dan kualitas air yang menurun, *E. aurantiacum* dapat berperan sebagai bakteri oportunistik yang memicu gangguan kesehatan pada ikan (Vishnivetskaya et al., 2009).

c. *Vibrio vulnificus*

Klasifikasi bakteri *Vibrio vulnificus* menurut Reichelt et al (1979) dalam *World Register of Marine Species* (WoRMS) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Vibrionales
Family	: Vibrionaceae

Genus : *Vibrio*
 Species : *Vibrio vulnificus*



Gambar 8. *Vibrio vulnificus* (Annisa, 2018)

Sebagian besar spesies *Vibrio* justru sering ditemukan pada insang serta permukaan kulit ikan yang sehat. Faktor lingkungan perairan pesisir seperti suhu, salinitas, pH, dan ketersediaan nutrisi umumnya mengalami perubahan musiman yang turut memengaruhi tingkat prevalensi bakteri *Vibrio*. Kemampuan bakteri ini untuk bertahan terhadap perubahan lingkungan tercermin dari keragaman genetiknya, khususnya yang berperan dalam siklus nutrisi di perairan. Secara umum, tingkat kelangsungan hidup dan potensi infeksi *Vibrio* spp. cenderung lebih tinggi di perairan payau dan laut dibandingkan di perairan tawar (Manchanayake et al., 2023).

d. *Vibrio parahaemolyticus*

Klasifikasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* menurut Sasaki et al (1963) dalam *World Register of Marine Species* (WoRMS) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Proteobacteria
 Class : Gammaproteobacteria
 Ordo : Vibrionales
 Family : Vibrionaceae
 Genus : *Vibrio*
 Species : *Vibrio parahaemolyticus*



Gambar 9. *Vibrio parahaemolyticus* (Annisa, 2018)

Vibrio parahaemolyticus termasuk dalam kelompok bakteri gram negatif berbentuk batang yang mampu bertahan hidup di lingkungan dengan salinitas tinggi atau bersifat halofilik. Dalam proses pertumbuhannya, bakteri ini memerlukan kadar garam tertentu dan umumnya ditemukan di wilayah perairan payau, muara, serta laut, yang juga berpotensi mencemari bahan pangan. Pada manusia, bakteri ini dapat menimbulkan gangguan saluran pencernaan jika makanan yang dikonsumsi telah terkontaminasi, dengan gejala seperti nyeri perut, demam, mual, muntah, hingga diare yang bisa disertai darah. *Vibrio*

parahaemolyticus dikenal sebagai salah satu penyebab utama penyakit vibriosis (Hasanah et al., 2022).

e. *Grimontia hollisae*

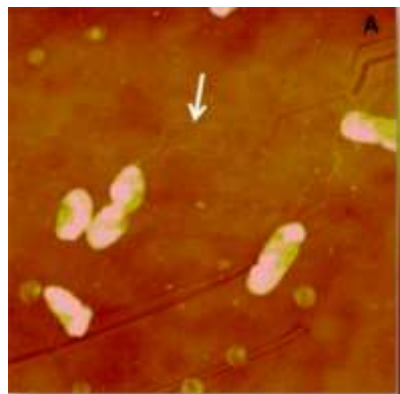
Nama *Grimontia* dipakai setelah revisi taksonomi oleh Thompson et al. 2003, memisahkannya dari genus *Vibrio* berdasarkan filogenetik.

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Proteobacteria
 Class : Gammaproteobacteria
 Ordo : Vibrionales
 Family : Vibrionaceae
 Genus : *Grimontia*
 Species : *Grimontia hollisae* (dahulu dikenal sebagai *Vibrio hollisae*)

Grimontia hollisae adalah bakteri Gram-negatif dari famili Vibrionaceae, sebelumnya diklasifikasikan sebagai *Vibrio hollisae*. Ia dikenal sebagai patogen zoonotik pada manusia melalui konsumsi seafood mentah, tetapi bukan patogen utama ikan. Perannya dalam akuakultur lebih pada aspek keamanan pangan daripada penyakit ikan, sehingga penting diidentifikasi bila ditemukan pada produk bandeng atau ikan laut lain.

f. *Shewanella algae*

Merupakan kelompok bakteri gram negatif *Shewanella* spp. merupakan kelompok bakteri gram negatif berbentuk batang yang memiliki kemampuan bergerak. Salah satu ciri fenotipik yang paling khas dari bakteri ini adalah kemampuannya menghasilkan gas hidrogen sulfida. Spesies ini pertama kali dideskripsikan pada tahun 1931 oleh Derby dan Hammer. Pada tahun 1941 Hammer mengusulkan spesies ini berada dalam genus *Pseudomonas* dengan nama *Pseudomonas putrefaciens*. Pada tiga dekade berikutnya, bakteri *Shewanella* sp. menjadi golongan bakteri yang dapat menyebabkan pembusukan pada ikan (Holt et al., 2005).



Gambar 10. *Shewanella algae* (Weiss et al., 2022)

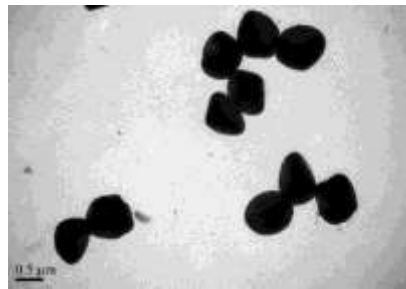
Secara umum, *Shewanella algae* dapat dikategorikan sebagai patogen oportunistik yang berpotensi menginfeksi manusia. Infeksi yang disebabkan oleh *Shewanella algae* juga sering dikaitkan dengan konsumsi makanan laut mentah, terutama pada individu yang memiliki gangguan pada sistem hepatobilier. Hal ini menjadi perhatian khusus di beberapa wilayah Asia, di mana konsumsi makanan

laut mentah cukup tinggi dan beragam. Bakteri ini dapat ditemukan di berbagai jenis habitat perairan, mulai dari air tawar, estuari, hingga perairan laut (Tseng et al., 2018).

g. *Staphylococcus cohnii ssp urealyticus*

Klasifikasi bakteri Klasifikasi bakteri *Staphylococcus cohnii* spp *World Register of Marine Species* (WoRMS) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Family	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus cohnii</i> sp. <i>Urealyticus</i>

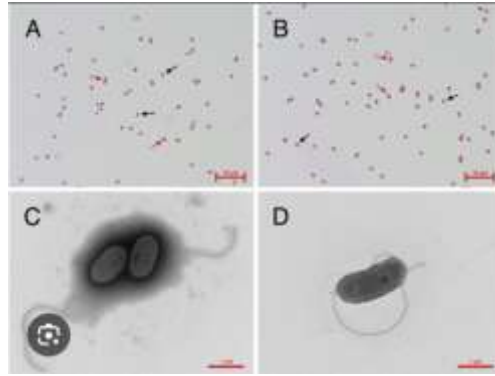


Gambar 11. *Staphylococcus cohnii Urealyticus* (Hu et al., 2014)

Staphylococcus cohnii subsp. *urealyticus* merupakan jenis bakteri gram positif dengan bentuk bulat (kokus) dan ukuran diameter sekitar 0,6 hingga 1,2 mikrometer. Bakteri ini umumnya ditemukan dalam bentuk tunggal atau berpasangan. Koloninya memiliki tampilan khas, yaitu berbentuk bulat, permukaan halus, sedikit menonjol, berwarna abu-abu keputihan, tampak mengilap, dan berukuran antara 1 hingga 3 milimeter. Bakteri ini tidak memiliki kemampuan gerak, tidak membentuk spora, serta menunjukkan hasil negatif pada uji koagulase dan positif pada uji katalase (Soldera et al., 2013). Isolasi bakteri ini pada ikan tidak selalu menunjukkan infeksi aktif, karena seringkali merupakan flora oportunistik atau kontaminan lingkungan (Austin & Austin, 2016). Namun, dalam kondisi stres lingkungan (misal: kualitas air menurun, kepadatan tinggi, luka pada integumen), bakteri ini dapat berkembang menjadi patogen sekunder.

h. *Photobacterium damsela*

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Pseudomonadota
Class	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Vibrionales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Photobacterium</i>
Spesies	: <i>Photobacterium damsela</i>



Gambar 12. *Photobacterium damsela* (Matanza & carlos 2020).

Merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang dan halofilik atau pertumbuhan memerlukan konsentrasi garam tertentu. *P. damsela* menginfeksi ikan budidaya dan juga jenis ikan maritime lainnya. Biasanya gejala seperti nodul granulomatous putih di organ dalam (limpa, ginjal), mortalitas bila tidak tertangani, Penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini adalah. *Photobacteriosis* atau penyakit yang disebut “pasteurellosis” (untuk subsp. *piscicida*) atau infeksi hemorrhagik & luka (untuk subsp. *damsela*) pada ikan laut budidaya.

i. Vibrio Aglinotycus

Klasifikasi Vibrio Aglinotycus World Register of Marine Species (WoRMS) (Miyamoto et al., 1961; Sazakaki 1968)

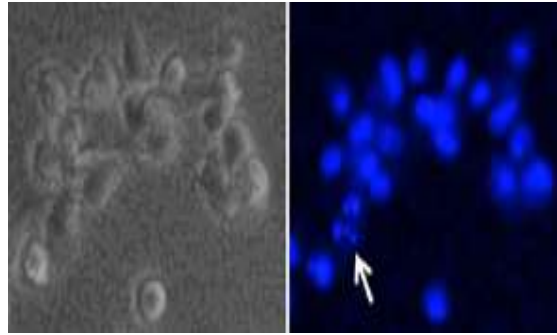
Kingdom : Bacteria
 Phylum : Pseudomonadota
 Class : Gammaproteobacteria
 Ordo : Vibrionales
 Family : Vibrionaceae
 Genus : *Vibrio*
 Spesies : *Vibrio alginotycus*

Merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang melengkung, motil, biasanya memiliki flagel polar. Agar bakteri bisa melekat di permukaan inang (misalnya mukosa, insang, kulit) dan bertahan dalam kondisi stres seperti variasi garam atau suhu. Bakteri ini memiliki gen-hemolisin (misalnya *tlh*) yang dapat menyebabkan lisis sel darah merah. merupakan patogen oportunistik di ikan dan udang; menyebabkan vibriosis: kematian massal, lesi pada kulit, kerusakan insang, hemoragi, mucoid atau nekrosis (Yuu et al., 2024).

j. Vibrio campbellii

Klasifikasi Vibrio campbellii adalah sebagai berikut (Bauman, bang & woolkalis, 1981) :

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Pseudomonadota
 Class : Gammaproteobacteria
 Ordo : Vibrionales
 Family : Vibrionaceae
 Genus : *Vibrio*
 Spesies : *Vibrio campbellii*



Gambar 13. *Vibrio campbellii* (Liu et al., 2017).

Vibrio campbellii dilaporkan luas pada biota akuatik dan merupakan penyebab utama “luminescent vibriosis” pada hatchery udang; banyak kejadian historis yang dilabeli *V. harveyi* kemudian direvisi sebagai *V. campbellii* setelah identifikasi molekuler. Laporan terbaru menunjukkan isolat *V. campbellii* patogen pada ikan laut tertentu (mis. seabream) dengan konfirmasi molekuler dan pengujian virulensi.

1.6.5 Histopatologi organ sampel

Pemeriksaan histopatologis merupakan suatu teknik pemeriksaan dengan mempelajari perubahan abnormal sel atau jaringan yang digunakan untuk menentukan peneguhan diagnosa penyakit pada ikan (Mohammadi, 2012). Pemeriksaan histopatologi pada ikan dapat memberikan gambaran perubahan jaringan ikan yang terinfeksi penyakit. Dalam penentuan penyakit pada ikan, diagnosis penyakit merupakan langkah awal yang perlu diterapkan (Sudayatma & Eriawati, 2012).

Trematoda biasanya melukai inangnya dengan kerusakan mekanis akibat memakan jaringan inang (Ochieng et al., 2012). Pembentukan kista di lapisan dalam rongga perut dan di dalam otot menyebabkan kerusakan pada jaringan otot dan organ dalam. Bergantung pada intensitas infeksi, hasilnya bervariasi dari pertumbuhan yang terhambat dan penurunan efisiensi reproduksi hingga manifestasi klinis gejala perdarahan pada permukaan tubuh dan kematian massal (Bera et al., 2021).

Histopatologi menunjukkan bahwa epitel operkular yang mengelilingi metaserkaria bersifat nekrotik, infiltrasi berat limfosit dan eosinofil di tempat infeksi dan jaringan sekitarnya. Jumlah limfosit tampaknya tinggi di tempat infeksi, sedangkan eosinofil tinggi di jaringan sekitarnya. Jaringan otot operkular yang mengelilingi metaserkaria menunjukkan nekrosis berat dan fibrosis. Ada kerusakan jaringan yang parah dan infiltrasi sel kekebalan di daerah infeksi. Sel-sel kekebalan yang disusupi di lokasi infeksi juga dicatat dalam penelitian sebelumnya (Shareef dan Abidi, 2012).

Infeksi cacing secara signifikan dapat mengubah jumlah leukosit dalam sirkulasi dan merekrut leukosit ke tempat infeksi. Adanya limfosit dan eosinofil pada bagian yang terinfeksi mungkin merupakan hasil respon imun dini. Mekanisme pertahanan bawaan dan adaptif mendukung ikan dalam meminimalkan dampak infeksi parasite (Jithila & Prasad, 2019). Saluran pencernaan ikan merupakan organ yang paling banyak diserang oleh cacing *Procamallus* sp dan *Camallanus* sp. Usus halus menyediakan sumber nutrisi bagi nematoda antara lain darah, sel jaringan, cairan tubuh dan sari-sari makanan yang terkandung dalam lumen usus halus, struktur dan fisiologi usus (mikrohabitat parasit) yang dapat mempengaruhi keberadaan dan jumlah parasit (Maryani et al., 2022).

1.6.6 Pengaruh lingkungan terhadap perkembangan pathogen

Timbulnya penyakit pada ikan merupakan suatu interaksi inang (ikan), jasad (patogen) dan lingkungan (air). Faktor lingkungan memegang peran penting dalam munculnya penyakit parasit pada ikan. Dalam interaksi tersebut air dapat menimbulkan pengaruh positif maupun negatif terhadap hubungan antara ikan dan parasit, dengan demikian lingkungan air dapat menjadi media penularan penyakit parasit pada ikan (Nurcahyo, 2018).

Kondisi lingkungan yang mengalami perubahan dapat menjadi pemicu menurunnya keseimbangan tubuh ikan (biota air) sehingga menyebabkan daya tahan tubuh ikan menjadi menurun, pada kondisi ini ikan menjadi lebih rentan terhadap infeksi patogen (Hardi, 2015). Parasit pada ikan membutuhkan kondisi lingkungan yang dapat mendukung untuk pertumbuhan dan perkembangan hidupnya. Jika Kondisi lingkungan berupa kualitas air yang buruk, banyaknya bahan organik dalam kolam, kondisi air yang tergenang, fluktuasi suhu yang drastis, suhu yang rendah dan padat penebaran kolam yang tinggi, maka parasit akan mudah menyerang ikan yang dibudidayakan. Selain itu jumlah inang tertentu juga dibutuhkan untuk kelangsungan hidup parasit. Kenaikan jumlah inang pada suatu kolam akan menaikkan jumlah penyebaran parasit pada inang (Anisah et al., 2016).

Menurut (Anshary.2019) kondisi lingkungan yang buruk dapat mempermudah perkembangan biakan parasit sehingga populasi parasit menjadi banyak, dimana parasit yang memiliki siklus hidup langsung seperti monogenean dan arthropoda, perkembangan parasitnya ditentukan oleh parameter kualitas air seperti suhu, ketika suhu relatif tinggi maka perkembangan parasit menjadi lebih cepat siklus hidupnya. Sedangkan menurut Azizah et al. (2023) menyatakan bahwa cacing trematoda membutuhkan media air dalam siklus hidupnya. Hal ini trematoda termasuk ke dalam siklus hidup tidak langsung, telur cacing trematoda akan menetas di dalam air dan berkembang menjadi mirasidium, kemudian menginfeksi hospes perantara pertama, lalu berkembang menjadi serkaria. Keadaan alam di Indonesia dengan curah hujan dan kelembapan yang tinggi memungkinkan parasit seperti cacing berkembang dengan baik karena sifatnya hermaprodit. bahwa cacing akan berkembangbiak dengan cepat pada kondisi lingkungan yang basah dan tercemar.

Lingkungan yang layak kehidupan ikan adalah suatu lingkungan yang mendukung kehidupan ikan. Kelayakan suatu perairan sebagai lingkungan hidup bagi ikan dan organisme lainya sangat dipengaruhi oleh sifat-sifat perairan seperti suhu, derajat keasamaan dan oksigen terlarut. Kualitas air dalam suatu akuakultur harus diperhatikan (Nurcahyo, 2018).

1.6.7. Polymerase Chain Reaction

Deteksi penyakit dan identifikasi parasit dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai teknik, di antaranya secara morfologi dan molekuler. Menurut Putri dan Madduppa (2020), identifikasi spesies dapat dilakukan baik dengan metode morfologi maupun molekuler. Morfologi merujuk pada ilmu yang mempelajari bentuk dan struktur tumbuhan atau hewan, sedangkan identifikasi molekuler menggunakan urutan basa nukleotida untuk menentukan spesies. Identifikasi Molekuler Menggunakan PCR Identifikasi molekuler sering dilakukan dengan teknik PCR (Polymerase Chain Reaction), yang digunakan untuk memperbanyak DNA secara in-vitro melalui reaksi enzimatik. PCR berfungsi untuk mengamplifikasi segmen DNA yang terletak di antara

dua primer yang sudah diketahui urutannya (Soegijanto, 2016). Teknik ini sangat sensitif, cepat, dan mudah, serta memungkinkan deteksi visual dari DNA yang diamplifikasi. Pemilihan dan desain primer yang optimal sangat penting dalam uji PCR, karena primer terdiri dari urutan basa nukleotida yang berasal dari template DNA target (Aqil et al., 2019). Penanda Molekuler ITS Penanda molekuler yang sering digunakan untuk identifikasi adalah ITS (Internal Transcribed Spacer). Gen ITS terletak di antara gen 16S dan 28S rRNA dan terdiri dari wilayah non-koding internal seperti ITS1, ITS2, dan gen 5,8S rRNA. Wilayah ITS memiliki keuntungan karena daerah ini sangat terkonservasi, memiliki kesamaan dengan organisme yang memiliki jarak evolusi jauh, dan memiliki variabilitas genetik yang tinggi. Penanda ITS sangat berguna untuk penentuan genus dan spesies (Habibi, 2010).

Gen 18S rRNA Gen 18S rRNA merupakan gen referensi pada organisme eukariot, sering digunakan sebagai kontrol internal dalam analisis ekspresi gen. Gen ini berukuran 1800 bp dan terletak pada genom inti. Ekspresi gen 18S rRNA stabil dan tidak terpengaruh oleh perlakuan eksternal (Hanifa et al., 2021). Gen ini juga digunakan dalam studi filogenetik karena memiliki daerah konservasi yang unik dan cepat terkonservasi, sehingga berguna untuk karakterisasi organisme dan dalam membangun pohon filogenetik yang menggambarkan hubungan kekerabatan antar organisme (Rohmani et al., 2021). Terdapat berbagai jenis sekuens DNA barcode yang dapat digunakan dalam identifikasi, salah satunya ITS (Internal Transcribed Spacer). ITS merupakan sekuens 14 DNA barcode universal dan bersifat konservatif serta berukuran pendek sehingga mudah untuk diamplifikasi (Umesha et al., 2016).

1.6.7 Vitek Maldi-MS

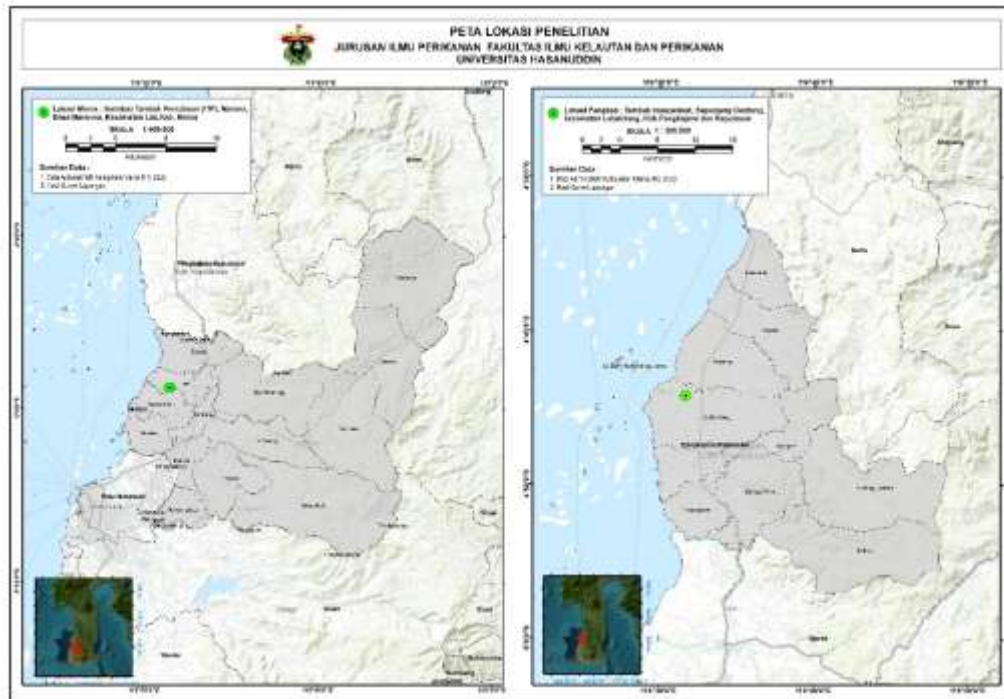
VITEK® MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) adalah teknologi identifikasi mikroba cepat yang bekerja dengan menganalisis pola spektrum protein, terutama protein ribosomal yang melimpah dan sangat konservatif pada bakteri. Proses dimulai dari isolat murni yang telah dikultur pada media padat. Koloni bakteri kemudian diambil menggunakan loop steril dan ditransfer ke target plate berbahan stainless steel. Sampel ditutupi dengan matriks kimia (misalnya α -cyano-4-hydroxycinnamic acid/CHCA) yang berfungsi menyerap energi laser dan memfasilitasi ionisasi protein. Setelah kering, plate dimasukkan ke dalam instrumen MALDI-TOF, lalu sinar laser ultraviolet ditembakkan ke permukaan, menyebabkan ionisasi protein tanpa fragmentasi signifikan (Bizzini & Greub, 2010; Patel, 2015).

Energi laser menghasilkan ion bermuatan positif (m/z 2–20 kDa, terutama protein ribosomal) yang kemudian dipercepat dalam medan listrik dan melintasi tabung penerbangan. Waktu tempuh tiap ion berbanding lurus dengan massa/rasio muatannya. Detektor merekam pola spektrum massa unik untuk tiap organisme. Spektrum ini dibandingkan dengan database referensi VITEK® MS, yang berisi ribuan profil mikroba klinis terverifikasi. Identifikasi dilakukan dengan algoritme pencocokan: semakin tinggi kesesuaian pola puncak (peak pattern), semakin akurat penentuan genus hingga spesies. Dengan demikian, VITEK MALDI-TOF MS mampu memberikan identifikasi bakteri dalam hitungan menit, jauh lebih cepat dibanding metode biokimia konvensional (De Carolis et al., 2014; bioMérieux, 2023)

BAB II. METODE PENELITIAN

1.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan maret-agustus 2025. Pengambilan sampel dilakukan di dua lokasi dimana Lokasi pertama Instalasi Tambak Percobaan (ITP) Marana, Desa Marannu, Kecamatan Lau, Maros, Sulawesi -Selatan dan Lokasi kedua, tambak Masyarakat di Labakkang, Pangkajene-Kepulauan, Sulawesi-Selatan. dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Peta lokasi pengambilan sampel

1.2. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada saat penelitian dapat dilihat pada tabel-tabel sebagai berikut :

Tabel 1. Alat yang digunakan selama penelitian (Lampiran 1)

Nama alat	Fungsi
Mikroskop binokuler (Olympus CX 23)	Pemeriksaan parasit
Mikroskop Stereo (Olympus SZ61)	Pengamatan parasite dan pengamatan bakteri
Mikroskop binokuler (Olympus BX53)	Mengamati parasit yang telah diwarnai
Kaca pembesar	Pengamatan parasit
Aerator	Memberikan aerasi pada sampel
Cawan petri	Wadah penyimpanan organ yang akan di amati
Slide glass	Pengamatan di mikroskop
Pinset	Mengambil organ
Pipet tetes	Mengambil cairan

Mikropipet	Mengambil parasit dan larutas fisiologis
Tube	Menyimpan sampel parasit
Rak tube	Menyimpan tube yang terdapat parasit
Gunting bedah	Membedah ikan sampel
Pisau bedah	Membedah ikan sampel
Jarum diseksi	Memisahkan parasit
Nampan	Menyimpan alat yang digunakan
Penggaris	Mengukur ikan sampel
Oxygen Meter Lutron DO 5510	Mengukur kualitas air
Laminar Air Flow	Penyinaran UV
Pemberat	Memberatkan <i>cover glass</i> dan <i>slide glass</i> tererat dengan sempurna
Cover glass	Penutup slide glass
Erlenmeyer	menyimpan larutan AgNO ₃ , Membuat media TCBS dan TSA
Timbangan analitik	menimbang
Bunsen	Mengurangi kontaminasi
Tabung reaksi	Menyimpan larutan sampel
Rak tabung reaksi	Menyimpan tabung reaksi
Korek	Menyalakan bunsen
Gelas ukur	Mengukur aquades
Inkubator	Menginkubasi bakteri
Autoclave	Mensterilkan media TSA
Spatula	Mengambil bubuk agar
Hotplate	Memanaskan media TCBS
Vortex	Menghomogenkan media atau sampel
Oven	Mensterilkan alat
Jarum ose	Mengisolasi bakteri
Spidol	Menandai bakteri
lumpang	Media menggerus sampel
Tip	Media sampel yang akan diisolasi
Mikrotom	Memotong preparat histologi
Reset deckel	Merendam preparat dalam parafin
Kotak preparat	Menyimpan slide glass yang telah diwarnai
Wadah organ sampel	Menyimpan sampel yang telah diberikan formalin
Water bath	Menginkubasi sampel
Uv transluminator	Membaca hasil elektroforesis
Elektroforesis	Melakukan elektroforesis
Thermal cycler	Mesin PCR

Tabel 2. Bahan yang digunakan selama penelitian (Lampiran 2)

Nama bahan	Fungsi
Ikan bandeng (<i>Chanos chanos</i>)	Hewan uji penelitian
Air payau	Media ikan sampel
Ethanol 70%	Pengawet spesimen parasit
Handscoon	Menjaga tangan tetap steril
Alkohol 70%	Mensterilkan alat yang telah digunakan
AgNO ₃ 2%	Pewarnaan preparat
Aquades	Membilas preparat dan melarutkan bubuk Silver Nitrat
Silver Nitrat	Bahan dasar AgNO ₃
Parasit air laut	Objek pewarnaan
Etelan	Perekat <i>cover glass</i> dan <i>slide glass</i>
Larutan Xylol	Pencampuran etelan
Aluminium foil	Untuk media menimbang dan menutup Erlenmeyer
Alat tulis	Menulis
Bubuk TSA (<i>Tryptit Soya Agar</i>)	Media non selektif bakteri
Bubuk TCBS (<i>Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar</i>)	Media selektif bakteri
Bubuk NaCl	Mendukung lingkungan pertumbuhan bakteri
Aquadest	Melarutkan media
Plastic wrap	Merekatkan media bakteri agar tetap steril
Homogenizer manual plastic	Menghaluskan ikan sampel
Larutan fisiologis	Media suspensi netral sampel
Tissue	Membersihkan
Label	Memberikan kode pada media bakteri
Plastic Seal Lem bening	Menyimpan bakteri hasil isolasi
Formalin	Pengawetan sampel untuk histology
hematoxylin	Pewarnaan histologi
Eosin	Pewarnaan histologi
Paraffin	Lilin pencetak organ histologi
Buffer ATL A1, AW-1, AW-2, dan TAE 1X	Sebagai buffer
Proteinase K	Penghancur protein sampel
Destilasi water	Penyusun master mix

Loading dye	Pemberat DNA
Marker	Penanda ukuran DNA
Primer	Template DNA
Gel red	Zat warna untuk DNA
Agarose	Gel agar yang digunakan untuk pembuatan sumur

1.3. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode pengambilan sampel bandeng secara acak pada kedua lokasi wilayah perairan. Sampel pada lokasi pertama diperoleh sebanyak 150 ekor dan lokasi kedua sebanyak 120 ekor, ($n = 270$). Sampling dilakukan dengan menelusuri stadia larva – pembesaran.

1.4. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian terdiri dari pengambilan sampel di dua lokasi berbeda yang kemudian sampel dibawa ke Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin, Kota Makassar untuk dilakukan pengamatan dan identifikasi parasit dan isolasi bakteri. Pemeriksaan parasit yang dilanjutkan pewarnaan preparat parasit yang bertujuan untuk memudahkan dalam mengidentifikasi spesies parasit yang menyerang. Tahapan berikutnya adalah isolasi bakteri yang dilanjutkan kultur bakteri yang bertujuan untuk mendapatkan koloni tunggal dalam suatu cawan petri agar memudahkan dalam pengidentifikasian bakteri. Identifikasi bakteri dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Masyarakat Makassar, Sulawesi-Selatan.

1.4.1. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan bandeng (*Chanos-chanos*). Lokasi pertama (ITP Marana, Maros) sampling dilakukan mulai dari stadia larva (fase awal), dilanjutkan pada stadia nener (juvenil awal), kemudian penggelondongan (Nursery), hingga pembesaran (grow out) dimana berasal dari sumber larva yang sama. Larva ini bersumber dari Hatchery Barru yang kemudian dipindahkan ke ITP Marana, Maros jika sudah memasuki fase Nener. Sedangkan pada lokasi kedua (Tambak Masyarakat, Labakkang Pangkep) sampel yang diambil yaitu nener dan larva dimana larva ikan bandeng pada lokasi ini berasal dari Bali.

Sampling hewan uji dilakukan dengan cara di seser menggunakan jaring seser, kemudian pindahkan ke dalam plastik packing yang berisikan 50% air tambak dan 50% oksigen. Selanjutnya sampel hewan uji dibawa ke Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin Makassar untuk diamati.

Tabel 3. Total sampel pada kedua lokasi

Lokasi 1	Total sampel	Lokasi 2	Total sampel
Sampling 1 (larva)	30	Sampling 1 (larva)	30
Sampling 2 (nener)	30	Sampling 2 (nener)	30
Sampling 3 (gelondongan)	30	Sampling 3 (gelondongan)	30
Sampling 4 (gelondongan)	30	Sampling 4 (gelondongan)	30
Sampling 5 (pembesaran)	30		
Total Sample	150		120

1.4.2. Pemeriksaan parasit

Pertama-tama Sampel diambil satu persatu dari wadah selanjutnya diletakkan di atas nampan. Pemeriksaan parasit stadia larva dan nener yang dalam hal ini berukuran kecil dilakukan dengan mengukur panjang total dan langsung mengamati keseluruhan bagian tubuh dibawah mikroskop lalu digerus dan kemudian diamati kembali. Ikan stadia penggolondongan dan pembesaran akan dianestesi dengan menusuk bagian syarafnya dengan jarum, selanjutnya sampel akan diukur panjang totalnya dan berat ikan menggunakan timbangan. kemudian dilakukan pengamatan ektoparasit dan endoparasite. Ektoparasit dilakukan pengamatan pada bagian lendir, insang, sirip dan eko. Kemudian endoparasit dilakukan pengamatan pada dan usus dan hati. Langkah selanjutnya setelah ikan pingsan. Mengamati kondisi morfologi ikan dengan seksama, lalu lendir digerus kemudian diletakkan pada slideglass. Organ selanjutnya yaitu sirip, ekor, dan Insang, untuk pengamatan endoparasite perlahan bagian perut ikan dibedah lalu mengambil bagian usus dan hati pada ikan dengan menggunakan pinset dan gunting bedah kemudian diletakan pada slide glass dan berikan diberikan air sampel (air tawar) selanjutnya dilakukan pengamatan dibawah mikroskop.

1.4.3. Identifikasi parasit

Pengamatan parasit dilakukan dengan menggunakan mikroskop binokuler dan stereo, dan identifikasi menggunakan buku (Kabata, 1985) dan berbagai referensi jurnal.

1.4.4. Pewarnaan Parasit Ikan Air Laut

Pewarnaan preparat parasit pada ikan digunakan untuk memudahkan dalam melihat organ-organ tertentu pada parasit. Adapun prosedur perwanaaan preparat parasit ikan air laut menurut Anshary (2014), adalah sebagai berikut :

- Kelebihan air laut dari organ mengamati ditarik menggunakan kertas saring
- Organ yang lembab dengan suhu ruang, lalu digoreskan pada *slide glass*
- Slide* dibiarkan kering udara
- Dibilas dengan aquades
- Slide* diberikan larutan AgNO_3 2% sampai menutupi semua parasit dan dibiarkan selama 8 menit
- Setelah itu dibilas dengan aquades
- Slide glass* ditempatkan pada cawan petri yang telah diisi air dan diekspos dengan cahaya ultra violet selama 20 sampai 30 menit
- Slide glass* dibiarkan kering udara, kemudian di beri etellan dan *cover* menggunakan *cover glass*.
- Amati di bawah mikroskop.

1.4.5. Identifikasi Molekuler

Apabila ditemukan parasit pada organ sampel, untuk dilakukan Identifikasi secara molekuler, parasit yang didapatkan kemudian diawetkan di dalam tube yang berisi alkohol 70%, selanjutnya diidentifikasi menggunakan metode PCR. Adapun prosedur dari PCR yaitu:

1. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan petunjuk Menurut Anshary et al. (2016) dengan mengikuti sesuai prosedur kerja. Ekstraksi DNA dengan QiaAmp Mini Kit yaitu:

- 1) Sampel yang telah difiksasi menggunakan alkohol 70%.
- 2) Masukkan jaringan inang atau parasit utuh dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL dan tambahkan 100 µL buffer ATL. 18
- 3) Tambahkan proteinase K 20 µL, vortex untuk mencampurkan, dan inkubasi pada suhu 56 oC pada shaking water bath selama 3 jam atau lebih baik dilakukan semalam (overnight).
- 4) Sentrifugasi dengan spin down agar cairan yang melekat pada dinding tabung berkumpul di dasar tabung.
- 5) Tambahkan 200 µL buffer AL pada sampel dan vortex selama 15 detik, lalu diinkubasi pada 70oC selama 10 menit. Selanjutnya sentrifus dengan spin down.
- 6) Tambahkan 200 µL etanol (96 - 100%) pada sampel lalu vortex selama 15 detik. centrifus dengan spin down.
- 7) Pindahkan secara hati-hati sampel dari tabung micro ke dalam QiaAmp mini spin column, tutup lalu sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Pindahkan QiaAmp mini spin column pada tabung koleksi yang baru, buang tabung yang mengandung filtrate.
- 8) Tambahkan 500 µL AW1 pada QiaAmp mini spin column, lalu sentrifus pada 8000 rpm 1 menit, pindahkan QiaAmp mini spin Column pada tabung koleksi yang baru buang yang mengandung filtrate.
- 9) Tambahkan 500 µL AW2, sentrifusi pada 14000 rpm selama 3 menit.
- 10) Buang filtrat dari tabung koleksi dan letakkan kembali QiaAMP mini spin column pada tabung koleksi yang sama. Lakukan sentrifud kembali pada 14000 rpm selama 1 menit.
- 11) Pindahkan QiaAmp mini spin column pada tabung mikrosentrifus 1,5 mL yang steril dan buang koleksi yang mengandung filtrate. Tambahkan 100 µL nucleas free water/distille water pada spin column dan inkubasi pada suhu ruang selam 1 menit, lalu sentrifus pada 8000 rpm selama 1 menit.
- 12) Tambahkan kembali 100 µL nuclease free water pada spin column, inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, lalu sentrifud pada 8000 rpm selama 1 menit.
- 13) Total DNA yang diperoleh sebanyak 200 µL dan disimpan pada freezer - 20 0C sebelum digunakan.

2. Pembuatan master mix untuk PCR

Jenis primer yang akan digunakan dalam amplifikasi DNA parasit adalah primer universal 18S rDNA yaitu primer forward 5'-AACCTGGTTGATCCTGCC-3 dan Reverse 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTC-3. Primer ini banyak digunakan dalam penelitian taksonomi dan identifikasi molekuler untuk ciliate seperti *Trichodina*, *Apiosoma*, *Zoothamnium*, dan sejenisnya (Ciliophora). Persiapkan campuran PCR untuk 20 uL reaksi. Buat Master Mix dengan: primer f 1uL, primer r 1uL, Kod MM 10uL, DNA sampel 1 uL dan NFW 7 uL. Hidupkan thermal cycler dan masukkan

tabung PCR pada thermal cycler. Jalankan PCR dengan mengatur kondisi PCR yaitu Pre-denaturasi 94°C selama 3 menit, Denaturasi 94 °c selama 45 detik, Annealing 56°C selama 45 detik , Extension 72 °c selama 2 menit dan Final Extension 72 °c selama 10 menit, 35 siklus.

3. Elektroforesis

Sampel yang telah diamplifikasi dilanjutkan dengan tahap elektroforesis, prosedur kerja elektroforesis yaitu:

- 1) Siapkan larutan agarose 1,5 % dengan menambahkan 1,5 gram agarose 100 mL TAE 1X. panaskan sampai mendidih lalu biarkan sampai cukup dingin namun tidak sampai membeku Kembali.
- 2) Tuangkan dalam cetakan yang sudah dilengkapi dengan sisir (comb). 3) Biarkan sampai membeku.
- 3) Pindahkan cetakan yang sudah mengandung agarose yang sudah beku ke dalam mesin elektroforesis. Isi dengan larutan TAE 1X sampai agarose terendam. Lepaskan cpmb/ sisir secara hati-hati.
- 4) Siapkan sepotong parafilm sebagai wadah untuk mencampur produk PCR dengan loading dye.
- 5) Pipet sebanyak 3 µL loading dye untuk setiap sampel yang akan dielektroforesis dan letakan pada parafilm.
- 6) Ambil sebanyak 5 µL produk PCR dan campur dengan loading dye yang sebelumnya telah diletakan diatas parafilm. Lakukan pemipetan berulang-ulang sampai produk PCR dan loading dye bercampur dengan merata.
- 7) Pipet produk PCR yang telah dicampur dengan loading dye dan masukkan ke dalam sumur agarose yang telah dibuat. Setiap sampel dimasukan pada sumur-sumur yang telah berbeda.
- 8) Bagian paling kiri dari sumur biasanya disiapkan untuk marker/ladder, sedangkan sumur 1,2,3 dst diperuntukkan untuk sampel. Marker dimasukan pada sumur tanpa harus mencampur dengan loading dye.
- 9) Setelah selesai memasukan semua sampel dan marker, mesin elektroforesis ditutup rapat, kabel dari power dihubungkan ke mesin elektroforesis.
- 10) Proses elektroforesis dilakukan pada 120 volt selam 30 menit.
- 11) Selanjutnya gel yang ada pada cetakan dilepas dan dimasukan kedalam larutan pewarnaan Gel RED selama 10 menit, bilas dalam aquades.
- 12) Lakukan pengamatan pada UV transiluminator untuk melihat ada tidaknya pita pada ukuran bp yang dikehendaki.
- 13) Foto gel untuk melihat hasilnya.

3.1.1. Isolasi Bakteri

Tahapan awal dalam identifikasi bakteri diawali dengan mensterilkan seluruh peralatan dan bahan yang akan digunakan selama proses kerja laboratorium menggunakan oven. Setelah itu, dilakukan persiapan media kultur berupa TCBS dan TSA yang akan digunakan sebagai media awal untuk menumbuhkan bakteri dari sampel yang diperiksa (Klau et al., 2021). Media TSA merupakan jenis media pertumbuhan yang bersifat universal karena dapat mendukung pertumbuhan berbagai macam bakteri, termasuk yang memiliki kebutuhan nutrisi khusus maupun yang tidak, serta bakteri yang tumbuh di lingkungan dengan atau tanpa oksigen. Di sisilain, media TCBS diformulasikan secara khusus untuk menyeleksi dan mengenali bakteri yang berasal dari

kelompok *Vibrio*, seperti *Vibrio vulnificus* dan *Vibrio parahaemolyticus*, yang umumnya terdapat di lingkungan akuatik (Felix et al., 2011).

a) Pembuatan Media TSA (*Tryptic Soya Agar*)

Proses pembuatan media TSA dilakukan dengan menimbang bubuk TSA sebanyak 10gram dan ditambahkan 5gram NaCl. Setelah itu bubuk TSA dan NaCl dipindahkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan aquades sebanyak 250 ml kemudian aduk menggunakan spatula. Selanjutnya, media TSA cair dipanaskan dan disterilkan menggunakan autoclave selama 60 menit menggunakan suhu 121°C.

b) Pembuatan Media TCBS (*Thiosulphate Citrate Bile Salt Sukrose Agar*)

Proses pembuatan media TCBS dilakukan dengan menimbang bubuk TCBS sebanyak 20gram yang kemudian dapat dipindahkan ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya, bubuk TCBS ditambahkan aquadest sebanyak 250 ml dan diaduk menggunakan spatula. Kemudian, media TCBS cair dipanaskan menggunakan hotplate sampai mendidih.

c) Proses Isolasi

Proses isolasi bakteri diawali dengan menyiapkan ikan sampel sebanyak 2-3 ekor atau seberat 1gram yang kemudian digerus hingga hancur di dalam tabung Eppendorf untuk pembuatan larutan pengenceran. Kemudian sampel di tuang ke dalam tabung reaksi 10^{-1} yang berisikan larutan fisiologis sebanyak 9 ml dan vortex hingga homogen. Selanjutnya, 1000 μL sampel tabung reaksi 10^{-1} menggunakan mikropipet dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^{-2} dan homogenkan menggunakan vortex. Hal yang sama dilakukan untuk tabung reaksi 10^{-3} , 1000 μL sampel tabung reaksi 10^{-2} menggunakan mikropipet dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^{-3} dan homogenkan menggunakan vortex. Lakukan prosedur yang sama untuk sampel tabung reaksi 10^{-4} . Proses isolasi bakteri menggunakan teknik tuang (*pour-plate*). Tuang TSA/TCBS ke cawan petri hingga dasar cawan petri tertutup ($\pm 20\text{ml}$), kemudian tambahkan larutan sampel 10^{-1} sebanyak 100 μL dan homogenkan dengan cara mengayunkan cawan petri di meja Laminar Air Flow dengan membentuk angka 8. Lakukan teknik yang sama untuk isolasi bakteri sampel 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} . Tunggu hingga memadat kemudian di rekatkan dengan plastic wrap. Terakhir, inkubasi bakteri dengan incubator selama 24 jam dan suhu 37°C.

3.1.2. Kultur Bakteri

Kultur bakteri dilakukan setelah isolasi bakteri selesai di inkubasi. Sebelum melakukan kultur bakteri, media bakteri TSA dan TCBS yang telah di isolasi bakteri diamati terlebih dahulu di bawah mikroskop stereo. Kultur bakteri berfungsi untuk mendapatkan satu isolat murni tunggal. Kultur bakteri dilakukan dengan metode goresan 4 kuadran yang bertujuan untuk memaksimalkan pemurnian bakteri. Isolat-isolat yang diperoleh kemudian akan diidentifikasi (Jamaluddin et al., 2015).

Isolasi bakteri yang telah tumbuh pada media TSA dan TCBS, kemudian di ambil satu koloni yang berbeda untuk dilakukan kultur bakteri. Bakteri diambil menggunakan jarum ose yang sebelumnya sudah dipijar hingga memerah. Menggoreskan bakteri ke media penggoresan, kemudian menggores bagian sisi tepi media hingga ke bagian tengah media. Lakukan hal yang sama ke bagian tepi sisi lain media. Setelah dilakukan penggoresan, cawan petri di rekatkan menggunakan plastic wrap, kemudian di inkubasi selama 24 jam dan suhu 37°C.

3.1.3. Morphological and Biochemical Characterization:

Secara morfologis, karakteristik koloni bakteri diamati berdasarkan warna, bentuk, transparansi, elevasi, dan bentuk margin kemudian Identifikasi bakteri dilakukan menggunakan sistem VITEK® MALDI-TOF MS (bioMérieux, software v1.00.46). Koloni tunggal dari media TSA/TCBS diambil dengan loop steril lalu di-*smear* tipis pada target plate. Setiap spot ditetesi 1 µL larutan matriks α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) dan dikeringkan 1–3 menit sebelum dijalankan dalam instrumen. Pada beberapa isolat Gram-positif atau bersel tebal, dilakukan *on-plate extraction* menggunakan asam format 70% untuk memperkuat sinyal protein. Akuisisi spektrum berlangsung otomatis dan dibandingkan dengan database pustaka VITEK MS. Hasil identifikasi ditampilkan dalam bentuk *confidence value*, dengan nilai ≥99% dianggap valid pada level spesies. Isolat yang menghasilkan skor <99% atau *low discrimination* diuji ulang melalui replikasi spot atau subkultur baru. (Catagay., 2024; Piamsomboon et al., 2020; Patel, 2013; Sivanesan et al., 2023)

3.2. Parameter yang diamati :

a. Prevalensi Parasit :

Prevalensi parasite dianalisis dengan menghitung prevalensi (P) sebagai proporsi jumlah inang yang terinfeksi dibandingkan dengan jumlah inang yang akan diperiksa (Williams & Bunkley, 1996)

$$p(\%) = \frac{\text{Jumlah ikan yang terinfeksi parasit (ekor)}}{\text{jumlah sampel yang diamati (ekor)}} \times 100\%$$

Tabel 4. Kriteria prevalensi infeksi parasite menurut Williams & Bunkley, (1996)

No	Tingkat infeksi	Keterangan	Prevalensi (%)
1	Selalu	Infeksi sangat parah	100 - 99
2	Hampir selalu	Infeksi parah	98 - 90
3	Biasanya	Infeksi sedang	89 - 70
4	Sangat sering	Infeksi sangat sering	69 - 50
5	Umumnya	Infeksi sering	43 - 30
6	Sering	Infeksi biasa	29 - 10
7	Kadang	Infeksi kadang	9 - 1
8	Jarang	Infeksi jarang	>1 – 0,1
9	Sangat jarang	Infeksi sangat jarang	>0,1-0,01
10	Hampir tidak pernah	Infeksi tidak pernah	>0, 01

b. Intensitas Parasit :

Intensitas parasite akan dihitung menggunakan rumus jumlah parasite yang ditemukan dibagi dengan jumlah ikan yang terinfeksi (William & Bunkley, 1996) :

$$\text{Intensitas} = \frac{\text{Jumlah parasit yang ditemukan(ind)}}{\text{Jumlah ikan yang terinfeksi parasit (ekor)}}$$

Tabel 5. Kriteria Intensitas menurut William & Bunkley (1996)

No	Tingkat infeksi	Intensitas (Ind/ekor)
1	Sangat rendah	<1
2	Rendah	1-5
3	Sedang	6-55
4	Parah	51-100
5	Sangat parah	>100
6	Super infeksi	>1000

c. Kelimpahan: (dihitung menggunakan rumus Bush et al., 1997)

$$\text{kelimpahan} = \frac{\text{jumlah parasit yang ditemukan(ind)}}{\text{jumlah sampel yang diamati (ekor)}}$$

d. Kepadatan bakteri: (dihitung menggunakan rumus Fardiaz, S. 1993)

$$\text{CFU/ml} = (\text{Jumlah bakteri} \times \frac{1}{\text{Faktor pengencer}}) \times 10$$

3.3. Kualitas Air

Kualitas air diukur menggunakan alat pengukur kualitas air yang berupa Oxygen meter Lutron DO 5510 yang dapat mengukur parameter salinitas, oksigen terlarut, dan suhu. Untuk pengukuran pH menggunakan pH meter. Pengukuran kualitas air dilakukan ketika pengambilan sampel ikan.

3.4. Analisis Data

Data mentah dicatat pada aplikasi Microsoft excel dan dianalisis secara deskriptif dengan menggunakan gambar dan bentuk tabel. Selanjutnya, data akan dianalisis secara statistic (SPSS 25.0) dengan uji statistic non-parametrik Kruskall-Wallis