

KARAKTERISASI ISOLAT *Vibrio parahaemolyticus* DAN EVALUASI POTENSI VIBRIOFAG DALAM MENGENDALIKAN PENYAKIT AHPND PADA UDANG VANAME

LUSIANAWATI



PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIS HEWAN
PEMINATAN MIKROBIOLOGI MEDIK
SEKOLAH KEDOKTERAN HEWAN DAN BIOMEDIS
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Karakterisasi Isolat *Vibrio parahaemolyticus* dan Evaluasi Potensi Vibriofag dalam Mengendalikan Penyakit AHPND pada Udang Vaname” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Mei 2025

Lusianawati
B3501222016

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



RINGKASAN

LUSIANAWATI. Karakterisasi Isolat *Vibrio parahaemolyticus* dan Evaluasi Potensi Vibriofag dalam Mengendalikan Penyakit AHPND pada Udang Vaname. Dibimbing oleh AGUSTIN INDRAWATI dan NOVIK NURHIDAYAT

Vibrio parahaemolyticus merupakan patogen utama penyebab Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) pada udang yang menimbulkan kerugian signifikan bagi industri akuakultur. Upaya pengendalian yang ramah lingkungan menjadi sangat penting untuk mengurangi ketergantungan terhadap antibiotik. Salah satu alternatif yang menjanjikan adalah penggunaan vibriofag sebagai agen biokontrol spesifik. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *V. parahaemolyticus* penyebab AHPND dari organ udang dan lingkungan tambak, mengisolasi dan mengarakterisasi vibriofag, serta mengevaluasi efektivitasnya dalam mematikan atau menghambat pertumbuhan *V. parahaemolyticus* secara *in vitro*. Isolasi bakteri dilakukan dari hepatopankreas, lambung, dan usus udang, serta sedimen dan air tambak menggunakan media selektif, diikuti uji fenotipik (biokimia dan fisiologis) dan genotipik untuk mendeteksi gen *pirB*. Vibriofag diisolasi menggunakan metode *spot assay* dan *plaque assay*, dan dikarakterisasi morfologinya menggunakan *Transmission Electron Microscopy* (TEM). Spesifisitas fag dianalisis melalui uji kisaran inang dan virulensinya diuji melalui *Efficiency of Plating* (EOP). Efektivitas fag dievaluasi menggunakan teknik *microplate assay* pada berbagai rasio *Multiplicity of Infection* (MOI). Sebagian besar isolat *V. parahaemolyticus* dari organ udang membawa gen *pirB*, menegaskan saluran pencernaan sebagai jalur infeksi utama. Hasil sekuensing menunjukkan *V. parahaemolyticus* BHP3N penyebab AHPND berpotensi sebagai mutan. Enam isolat vibriofag berhasil diperoleh dari berbagai sumber, dengan tiga diantaranya (FVPpD68, Gp, dan Ip) bersifat virulen dan dominan ditemukan pada sedimen dan air tambak. Ketiga vibriofag ini memiliki titer tinggi (10^7 – 10^{10} PFU/mL) dan menunjukkan spesifisitas serta virulensi tinggi terhadap *V. parahaemolyticus* AHPND berdasarkan hasil kisaran inang dan EOP. Hasil TEM menunjukkan perbedaan morfologi antar vibriofag, yang berpotensi memengaruhi mekanisme infeksi. Uji efektivitas *in vitro* menunjukkan bahwa FVPpD68 (MOI 0,0001), Gp (MOI 0,1), dan Ip (MOI 0,1) mampu melisis bakteri secara signifikan dalam waktu 20 jam, dengan aktivitas litik masing-masing sebesar 61,07%, 60,12%, dan 65,73%. Temuan baru dari studi ini mencakup isolasi vibriofag dari hepatopankreas udang, serta dari sedimen dan air tambak yang berasal dari kolam dengan kasus AHPND, terhadap *V. parahaemolyticus* yang berpotensi mutan. Selain itu, penelitian ini juga memperkenalkan pendekatan evaluasi efektivitas fag menggunakan variasi MOI yang dikombinasikan dengan teknik *microplate assay*. Pendekatan ini belum banyak dilaporkan dalam konteks pengujian fag terhadap *V. parahaemolyticus* penyebab AHPND di Indonesia. Secara keseluruhan, penelitian ini membuka peluang besar untuk pengembangan vibriofag sebagai alternatif yang efektif dan ramah lingkungan dalam mengendalikan AHPND pada budidaya udang, serta mendukung pengurangan penggunaan antibiotik dan penerapan akuakultur berkelanjutan.

Kata kunci: agen biokontrol, AHPND, efektivitas *in vitro*, vibriofag, *Vibrio parahaemolyticus*

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

SUMMARY

LUSIANAWATI. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Isolates and Evaluation of Vibriophage Potential for Controlling AHPND in Whiteleg Shrimp. Supervised by AGUSTIN INDRAWATI and NOVIK NURHIDAYAT

Vibrio parahaemolyticus is the primary pathogen causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in shrimp, which leads to significant losses in the aquaculture industry. Environmentally friendly control measures are crucial to reduce reliance on antibiotics. One promising alternative is the use of vibriophages as specific biocontrol agents. This study aims to identify *V. parahaemolyticus* causing AHPND from shrimp organs and pond environments, to isolate and characterize vibriophages, and to evaluate their effectiveness in killing or inhibiting the growth of *V. parahaemolyticus* in vitro. Bacterial isolation was conducted from shrimp hepatopancreas, stomach, and intestines, as well as pond sediment and water using selective media, followed by phenotypic (biochemical and physiological) and genotypic tests to detect the *pirB* gene. Vibriophages were isolated using spot assay and plaque assay methods, and their morphology was characterized using Transmission Electron Microscopy (TEM). Phage specificity was analyzed through host range tests, and virulence was assessed via Efficiency of Plating (EOP). Phage effectiveness was evaluated using a microplate assay technique at various Multiplicity of Infection (MOI) ratios. Most *V. parahaemolyticus* isolates from shrimp organs carried the *pirB* gene, confirming the digestive tract as the main infection route. Sequencing results showed that the *V. parahaemolyticus* BHP3N strain causing AHPND has potential mutations. Six vibriophage isolates were successfully obtained from various sources, with three of them (FVPpD68, Gp, and Ip) being virulent and predominantly found in sediment and pond water. These three vibriophages had high titers (10^7 – 10^{10} PFU/mL) and demonstrated high specificity and virulence against AHPND-causing *V. parahaemolyticus*, based on host range and EOP results. TEM analysis revealed morphological differences among the vibriophages, potentially influencing their infection mechanisms. In vitro efficacy tests showed that FVPpD68 (MOI 0.0001), Gp (MOI 0.1), and Ip (MOI 0.1) significantly lysed bacteria within 20 hours, with lytic activities of 61.07%, 60.12%, and 65.73%, respectively. New findings from this study include the isolation of vibriophages from shrimp hepatopancreas, sediment, and pond water collected from ponds with AHPND cases targeting potentially mutant *V. parahaemolyticus*. Additionally, this study introduces an evaluation approach of phage efficacy using varying MOI combined with microplate assay techniques, which has been rarely reported in the context of testing phages against AHPND-causing *V. parahaemolyticus* in Indonesia. Overall, this research opens significant opportunities for developing vibriophages as an effective and environmentally friendly alternative to control AHPND in shrimp aquaculture, supporting reduced antibiotic use and promoting sustainable aquaculture practices.

Keywords: AHPND, biocontrol agent, in vitro efficacy, vibriophage, *Vibrio parahaemolyticus*



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2025
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.



KARAKTERISASI ISOLAT *Vibrio parahaemolyticus* DAN EVALUASI POTENSI VIBRIOFAG DALAM MENGENDALIKAN PENYAKIT AHPND PADA UDANG VANAME

LUSIANAWATI

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister pada
Program Studi Ilmu Biomedis Hewan

**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIS HEWAN
PEMINATAN MIKROBIOLOGI MEDIK
SEKOLAH KEDOKTERAN HEWAN DAN BIOMEDIS
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

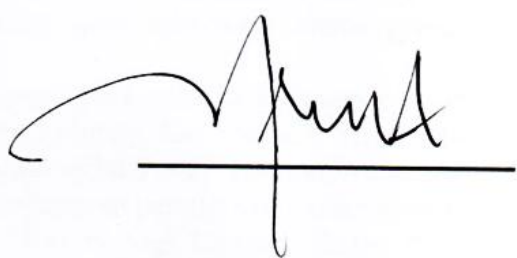
Judul Tesis : Karakterisasi Isolat *Vibrio parahaemolyticus* dan Evaluasi Potensi Vibriofag dalam Mengendalikan Penyakit AHPND pada Udang Vaname
Nama : Lusianawati
NIM : B3501222016

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Drh. Agustin Indrawati, M.Biomed



Pembimbing 2:
Dr. Novik Nurhidayat, M.Sc



Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. Drh. Bambang Pontjo Priosoeryanto, MS,
Ph.D, APVet, DACCM
NIP 196002281986011001



Dekan Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis:
Prof. Drh. Amrozi, Ph.D
NIP 197007211995121001



Tanggal Ujian: 21 Mei 2025

Tanggal Lulus:

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PRAKATA

Ucapan syukur penulis haturkan atas segala berkah, kesempatan, dan kelancaran yang memungkinkan tersusunnya karya ilmiah ini dengan baik. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Oktober 2023 sampai bulan Agustus 2024 ini ialah Biokontrol Penyakit Udang dengan Bakteriofag, dengan judul “Karakterisasi Isolat *Vibrio parahaemolyticus* dan Evaluasi Potensi Vibrio fag dalam Mengendalikan Penyakit AHPND pada Udang Vaname”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Drh. Agustin Indrawati, M.Biomed dan Dr. Novik Nurhidayat, M.Sc atas bimbingan, arahan, serta saran yang diberikan dengan penuh keikhlasan, ketulusan, dan kesabaran selama proses penelitian dan penulisan tesis ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Drh. Sri Murtini, M.Si selaku penguji luar komisi pada ujian tesis dan Prof. Drh. Bambang Pontjo Priosoeryanto, MS, Ph.D, APVet, DACCМ selaku Ketua Program Studi dan pimpinan sidang pada ujian tesis, atas masukan dan evaluasi yang sangat berarti. Penghargaan dan terima kasih yang tulus penulis sampaikan kepada Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis (SKHB), IPB University, atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan selama proses penyusunan tesis ini.

Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada para peneliti Kelompok Riset Pemulihan Mikrobiologis, khususnya Dra. Titin Yulinery, Evi Triana, S.Si, M.Kes, dan Qori Emilia, S.TP, serta Jerliman Manalu selaku staf Laboratorium atas dukungan dan bantuannya. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada Dr. Ahmad Fathoni, M.Eng dari Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Badan Riset Inovasi Nasional yang telah memberi izin penelitian, serta Bapak Heru Badaruddin selaku pengelola salah satu tambak udang di Sumatera Selatan atas kerja sama yang telah diberikan. Penulis juga menyampaikan apresiasi kepada rekan-rekan yang telah membantu selama proses pengumpulan data, yaitu Nurul Huda, Jennie Octavia Sinaga, Faisal Nulhak, dan Salma. Dukungan akademik, laboratorium, serta lingkungan ilmiah yang kondusif sangat berperan dalam kelancaran dan keberhasilan penelitian ini.

Ungkapan terima kasih yang mendalam dan penuh ketulusan juga penulis sampaikan kepada keluarga, khususnya tante dan sahabat yang senantiasa memberikan dukungan, doa, dan kasih sayangnya selama perjalanan studi ini.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Mei 2025

Lusianawati



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
1.5 Kebaruan (<i>novelty</i>)	3
1.6 Hipotesis	3
II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Budidaya Udang Vaname (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	4
2.2 Penyakit <i>Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease</i> (AHPND)	4
2.3 Bakteriofag sebagai Biokontrol AHPND	7
III METODE	10
3.1 Desain Penelitian	10
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	10
3.3 Prosedur Kerja	10
3.4 Analisis Data	15
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Identifikasi Sampel Terduga AHPND	17
4.2 Isolasi dan Identifikasi <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Penyebab AHPND	20
4.3 Penentuan Fase Mid-log untuk Efisiensi Isolasi Vibriofag	27
4.4 Isolasi Vibriofag dan Pemurnian Plak	28
4.5 Karakterisasi Morfologi Vibriofag	32
4.6 Kisaran Inang Vibriofag dan <i>Efficiency of Plating</i> (EOP)	33
4.7 Efektivitas Vibriofag secara <i>in Vitro</i>	35
V SIMPULAN DAN SARAN	41
5.1 Simpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
RIWAYAT HIDUP	55



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

1	Kriteria sampel	11
2	Urutan basa primer AP4	12
3	Rincian volume reaksi dan kondisi PCR	12
4	Hasil deteksi gen <i>pirA</i> dan <i>pirB</i> pada sampel	18
5	Hasil uji biokimia bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	22
6	Hasil uji fisiologis bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	22
7	Hasil deteksi gen <i>pirA</i> dan <i>pirB</i> pada isolat <i>V. parahaemolyticus</i>	24
8	Hasil isolasi vibriofag terhadap <i>V. parahaemolyticus</i> -AHPND	28
9	Hasil karakterisasi morfologi plak dan pengukuran titer vibriofag	31
10	Nilai <i>Efficiency of Plating</i> (EOP)	34

DAFTAR GAMBAR

1	Udang vaname (<i>L. vannamei</i>) dan struktur saluran pencernaannya	4
2	Karakteristik udang	5
3	Isolat <i>V. parahaemolyticus</i> penyebab AHPND	5
4	Virulensi dan patogenesis AHPND pada saluran pencernaan udang	6
5	Siklus replikasi pasca infeksi bakteriofag	8
6	Mekanisme infeksi bakteriofag	8
7	Mekanisme kerja enzim pengurai peptidoglikan	9
8	Alur penelitian dalam tesis	10
9	Lokasi pengambilan sampel	11
10	Preparasi sampel	17
11	Kondisi udang terinfeksi AHPND	17
12	Hasil visualisasi gen <i>pirB</i> pada sampel terduga AHPND	18
13	Hasil isolasi dan identifikasi isolat <i>V. parahaemolyticus</i> - AHPND	20
14	Karakter morfologi <i>V. parahaemolyticus</i>	21
15	Variasi hasil uji biokimia bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	23
16	Hasil visualisasi gen <i>pirB</i> pada isolat <i>V. parahaemolyticus</i>	25
17	Pohon filogenetik	26
18	Kurva pertumbuhan <i>V. parahaemolyticus</i> BHP3N penyebab AHPND	27
19	Hasil isolasi vibriofag dan pemurnian plak	29
20	Morfologi plak	30
21	Morfologi vibriofag dengan TEM	32
22	Kisaran inang dan <i>Efficiency of Plating</i> (EOP) vibriofag	33
23	Dinamika pertumbuhan <i>V. parahaemolyticus</i> setelah diinfeksi vibriofag	36
24	<i>Heatmap</i> aktivitas litik oleh berbagai vibriofag virulen	38



DAFTAR LAMPIRAN

1	Hasil pemurnian koloni hijau terduga <i>V. parahaemolyticus</i>	52
2	Hasil uji biokimia isolat <i>V. parahaemolyticus</i>	53
3	Hasil uji fisiologis dan uji gula-gula isolat <i>V. parahaemolyticus</i>	54

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.