



KEANEKARAGAMAN AGENSIA PENYEBAB VIBRIOSIS PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) DAN SENSITIVITASNYA TERHADAP ANTIBIOTIK

*The Variety of Vibriosis Causative Agent on Vaname Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Bacteria Susceptibility to Antibiotics*

Milza Apriliani, Sarjito*¹, A. H. Condro Haditomo

Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan,
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah – 50275, Telp/Fax. +6224 7474698

ABSTRAK

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu jenis udang ekonomis penting di Indonesia. Serangan vibriosis adalah salah satu kendala pada kegiatan budidaya udang vaname. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui agensia penyebab vibriosis yang menginfeksi udang vaname di Tambak Intensif Desa Wonorejo, Kendal, sensitivitasnya terhadap antibiotik eritromisin, enrofloksasin, dan oksitetrasiklin, serta gejala klinis udang vaname yang terserang vibriosis. Metode pada penelitian ini adalah metode eksploratif konfirmatori dan metode pengambilan sampel menggunakan metode *purposive sampling*. Bakteri *Vibrio* diisolasi dari bagian hepatopankreas dan ekor pada media *Thiosulphate Citrate Bile Salt Agar* (TCBSA). Berdasarkan karakteristik morfologi terdapat 37 isolat yang diperoleh, kemudian dilakukan identifikasi secara biokimia sehingga didapatkan 5 jenis bakteri *Vibrio*. Kelima jenis bakteri *Vibrio* dilakukan uji sensitivitas dan uji postulat Koch. Udang vaname yang digunakan dalam uji postulat Koch memiliki panjang tubuh 10-12 cm yang disuntik dengan kelima isolat bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL. Antibiotik yang digunakan dalam uji sensitivitas adalah eritromisin, enrofloksasin, dan oksitetrasiklin dengan dosis 35 μ g. Bakteri *Vibrio* sp., berdasarkan identifikasi secara biokimia adalah *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, dan *V. vulnificus*. Hasil uji sensitivitas menunjukkan bahwa kelima isolat bakteri resisten terhadap antibiotik eritromisin, enrofloksasin, dan oksitetrasiklin. Udang vaname yang terserang vibriosis di Tambak Intensif Desa Wonorejo, Kendal serupa dengan gejala klinis yang ditunjukkan udang vaname pada uji Postulat Koch yaitu hepatopankreas kecoklatan, uropoda kemerahan, pereopoda kemerahan, pleopoda kemerahan, nekrosis pada *antennal scale* dan berwarna kemerahan, serta terdapat melanosis pada abdomen. Hasil uji postulat Koch menunjukkan bahwa kelima isolat bakteri mengakibatkan udang vaname sakit dengan gejala klinis sama dengan udang vaname sampel dan menimbulkan kematian 92% - 100% selama 14 hari masa pemeliharaan.

Kata kunci: *Litopenaeus vannamei*; Vibriosis; Postulat Koch; Sensitivitas; Antibiotik

ABSTRACT

*Vaname shrimp is one of shrimp species that has an important economic value in Indonesia. The vibriosis disease is one of the constraints on vaname shrimp aquaculture activities. The purposes of this research are to discover clinical signs and vibriosis causative agent that infected vaname shrimp farmed intensively in the village of Wonorejo Kendal Regency as well as its sensitivity against antibiotics erythromycin, enrofloxacin, and oxytetracycline. The methods of this research are explorative confirmatory method and sampling method using purposive sampling method. Vibrio bacterium is isolated from hepatopancreas and tail on Thiosulphate Citrate Bile Salt Agar media (TCBSA). Based on morphology characteristic, there are 37 isolat, which are obtained and then identified biochemically, therefore they result 5 types of Vibrio sp., bacterium. After that, the 5 of Vibrio sp., bacterium is performed sensitivity test and Koch's postulates test. The length of vaname shrimp's body that is used during the Koch's postulates test is 10-12 cm and then injected by the 5 of isolat bacterium with concentration 10^6 CFU/mL. The antibiotic that is used during the sensitivity test are erythromycin, enrofloxacin, and oxytetracycline with the dose 35 μ g. Vibrio bacterium based on the biochemical test are *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, dan *V. vulnificus*. The result of sensitivity test shows that the five of isolates bacterium are resistant against antibiotics erythromycin, enrofloxacin, and oxytetracycline. Clinical signs that is shown by vaname shrimp farmed intensively in the village of Wonorejo Kendal Regency which contaminated vibriosis and Koch's postulates test are brownish on hepatopancreas, reddish on uropoda, pereopoda and pleopoda, reddish and necrosis on antennal scale, and melanosis on abdomen. The Koch's postulates result shows the five of isolat bacterium cause vaname shrimp get sick with similar clinical signs to vaname shrimp sample and they result on high mortality $\geq 92\%$ during 14 days of maintenance.*

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; Vibriosis; Postulat Koch; Sensitivity; Antibiotic

*Corresponding author : sarjito_msdp@yahoo.com



PENDAHULUAN

Produksi udang vaname (*L. vannamei*) tahun 2009 sebesar 170.969 ton dan terus mengalami peningkatan hingga 386.314 ton pada tahun 2013 (KKP, 2014). Secara ekonomi udang memberikan kontribusi terhadap nilai ekspor hasil produksi perikanan di Indonesia sebesar 33,1% (KKP, 2013). Penerapan sistem intensif pada kegiatan budidaya udang vaname (*L. vannamei*) menyebabkan penurunan kualitas air pemeliharaan pada tambak sehingga menyebabkan terjadinya serangkaian serangan penyakit yang menimbulkan kerugian besar (Suwoyo dan Mangampa, 2010). Bakteri merupakan agensia penyakit yang paling banyak ditemui (Hatmanti, 2003).

Vibriosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* sp., dan dapat menyebabkan kematian pada kegiatan budidaya udang vaname (*L. vannamei*) (Sukenda *et al.*, 2005). Serangan vibriosis dapat menimbulkan kematian mencapai 100% pada stadia larva atau juvenil (KKP, 2012). Jayasree *et al.* (2006) melaporkan bahwa beberapa jenis bakteri genus *Vibrio* yang menjadi penyebab vibriosis pada udang diantaranya adalah *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, dan *V. splendidus*. Gejala klinis udang yang terserang vibriosis adalah hepatopankreas kecoklatan (Lavilla-Pitogo *et al.*, 2000), terdapat bercak merah-merah pada pleopod, uropod dan abdominal, insang merah kecoklatan, berenang lambat (Ramesh *et al.*, 2014). Bakteri *Vibrio* sp., pernah dilaporkan menyerang pada lobster (Raissy *et al.*, 2011), udang windu (Tran, *et al.*, 2013), ikan nila dan ikan belanak (Abdellrazaq dan Khaliel, 2014), ikan kerapu macan (Hastari *et al.*, 2014), ikan lele (Indrarini *et al.*, 2014), dan kepiting bakau (Feriandika *et al.*, 2014).

Sarjito *et al.* (2014) menyatakan bahwa penelitian mengenai identifikasi agensia penyebab vibriosis penting untuk dilakukan dalam rangka memperoleh kepastian dan terapi yang tepat untuk merancang strategi pencegahan penyakit dan mendukung produksi. Pemerintah melalui Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 52 Tahun 2014 mengizinkan penggunaan beberapa obat keras sebagai antibiotik untuk pengobatan terhadap penyakit yang menyerang pada kegiatan budidaya. Obat keras yang diperbolehkan sebagai antimikroba (antibiotik, antibakteria non antibiotik, antifungal dan antiprotozoa) adalah tetrasiklina dengan kandungan zat aktif berupa klortetrasiklin, oksitetrasiklin, dan tetrasiklin; makrolida dengan kandungan zat aktif berupa eritromisina; dan kuinolon dengan kandungan zat aktif berupa enrofloksasina. Pemakaian bahan kimia dalam jangka panjang dapat menimbulkan dampak negatif diantaranya munculnya strain-strain bakteri resisten terhadap obat-obatan (Nurjanah *et al.*, 2014). Kategori resisten dari uji sensitivitas ditujukan pada isolat yang tidak dapat dihambat oleh konsentrasi obat yang sesuai dianjurkan berdasarkan spesifikasi zona hambat (CLSI, 2012).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui agensia penyebab vibriosis yang menginfeksi udang vaname secara alami, sensitivitasnya terhadap antibiotik eritromisin, enrofloksasin, dan oksitetrasiklin, serta gejala klinis yang ditunjukkan udang vaname (*L. vannamei*) yang terserang vibriosis. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2015 sampai Juli 2015. Pengambilan sampel udang vaname (*L. vannamei*) dilakukan di Tambak Intensif Desa Wonorejo, Kendal. Kegiatan isolasi dan uji sensitivitas antibiotik dilakukan di Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro. Postulat Koch dilakukan di Laboratorium Budidaya Perairan FPIK Universitas Diponegoro dan identifikasi bakteri dilakukan di Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Yogyakarta.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Udang sampel yang digunakan yaitu udang vaname (*L. vannamei*) yang diperoleh dari Tambak Intensif Desa Wonorejo, Kendal dengan ukuran panjang 14-15 cm sebanyak 10 ekor. Udang uji yang digunakan untuk Postulat Koch berasal dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau Jepara dengan ukuran 9-12 cm sebanyak 144 ekor. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksploratif konfirmatori yang bertujuan untuk menguji suatu teori atau hipotesis (Paul dan Jeanne, 2005). Pengambilan sampel menggunakan metode *purposive sampling* yaitu pengambilan sampel yang dilakukan secara acak dengan melihat ciri-ciri gejala klinis udang terserang penyakit yang sudah diketahui sebelumnya (Hadi, 2000). Gejala klinis udang sampel mengacu pada Lavilla-Pitogo *et al.* (2000) dan Ramesh *et al.* (2014) yaitu hepatopankreas kecoklatan, melanosis pada abdominal, pleopod dan uropod kemerahan, insang merah kecoklatan dan berenang lambat dan mengarah ke permukaan air. Tahap pelaksanaan meliputi pengambilan udang sampel, isolasi bakteri, pemurnian bakteri, kultur bakteri, identifikasi bakteri, uji sensitivitas antibiotik, dan Postulat Koch.

Isolasi bakteri menggunakan media agar TCBS (*Thiosulphate Citrate Bile Salt*) sedangkan untuk media miring menggunakan TSA (*Triptic Soy Agar*) dengan metode *streak*. Organ target isolasi bakteri adalah hepatopankreas dan ekor, dan dilakukan pemurnian untuk mendapatkan isolat bakteri murni. Identifikasi bakteri dianalisa dengan membandingkan isolat bakteri murni dengan buku Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria (Cowan and Steel, 2004).

Uji sensitivitas dilakukan secara *in vitro* dengan metode difusi sesuai dengan Huys (2000), Coyle (2005), OIE (2012) dan CLSI (2012) yaitu dengan cara mengkultur bakteri dengan kepadatan 10^8 CFU/mL pada *petridish* dan ditekankan dengan menggunakan *L glass* kemudian didiamkan beberapa menit agar bakteri uji meresap ke dalam media. *Paper disk* steril berukuran 6 mm direndam di dalam antibiotik eritromisin, enrofloksasina, dan oksitetrasiklin dengan dosis 35µg (Razali, 2011) diletakkan di atas media TSA laut yang



sebelumnya telah kultur bakteri. Suhu inkubasi pada saat uji sensitivitas yaitu 28°C selama 2x24 jam. Zona hambat diukur pada saat bakteri sudah berumur 24 jam dan 48 jam. Metode pengukuran zona hambat mengacu pada *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Hasil pengukuran zona hambat digolongkan dalam tiga kriteria, yaitu *Resistance* (R) apabila ukuran zona hambat ≤ 12 mm, *Intermediate* (I) apabila ukuran zona hambat 13-16 mm, *Sensitive* (S) apabila ukuran zona hambat ≥ 17 mm.

Postulat Koch dilakukan dengan mengkultur bakteri pada media cair *Zobell*. Dosis isolat bakteri yang digunakan dalam Postulat Koch sebanyak 10^6 CFU/mL sebanyak 0,1 mL (Huang *et al.*, 2013) dan disuntikkan pada udang sehat melalui rongga kedua pada abdomen udang. Udang uji dipelihara pada akuarium dengan salinitas air pemeliharaan sebesar 25 ppt dan jumlah masing-masing akuarium sebanyak 8 ekor. Gejala klinis setelah penyuntikan diamati selama ± 14 hari masa pemeliharaan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Gejala klinis udang vaname (*L. vannamei*) sampel yang berasal dari Tambak Intensif Desa Wonorejo, Kendal yaitu hepatopankreas kecoklatan, uropoda kemerahan, pereopoda kemerahan, pleopoda kemerahan, nekrosis pada *antennal scale* dan berwarna kemerahan, serta terdapat melanosis pada abdomen (Gambar 1).



Keterangan : (A) Nekrosis pada *antennal scale* (B) Pleopoda kemerahan
(C) Pereopoda kemerahan (D) Uropoda kemerahan

Gambar 1. Udang vaname (*L. vannamei*) sampel yang berasal dari Tambak Intensif Desa Wonorejo, Kendal.

Hasil isolasi bakteri dari udang vaname (*L. vannamei*) sampel yang dilakukan pada media TCBS (*Thiosulphate Citrate Bile Salt*) diperoleh 37 isolat bakteri. Ketiga puluh tujuh isolat bakteri tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.



Tabel 1. Karakter Isolat berdasarkan Warna, Bentuk, serta Karakteristik Koloni.

| No | Kode | Asal Isolat | Warna Koloni | Bentuk Koloni | Karakteristik Koloni | |
|-----|-------|----------------|--------------|---------------|----------------------|---------|
| 1. | MH1A | Hepatopankreas | Hijau | Bulat | Halus | Cembung |
| 2. | MH1B | Hepatopankreas | Putih | Bulat | Halus | Cembung |
| 3. | MH3 | Hepatopankreas | Hijau | Bulat | Halus | Cembung |
| 4. | MH5A | Hepatopankreas | Kuning | Bulat | Halus | Cekung |
| 5. | MH5B | Hepatopankreas | Hijau | Bulat | Halus | Cembung |
| 6. | MH6A | Hepatopankreas | Putih | Bulat | Halus | Cembung |
| 7. | MH6B | Hepatopankreas | Putih | Bulat | Halus | Datar |
| 8. | MH6C | Hepatopankreas | Kuning | Bulat | Halus | Cekung |
| 9. | MH6D | Hepatopankreas | Hijau | Bulat | Halus | Cembung |
| 10. | MH8 | Hepatopankreas | Hijau | Bulat | Halus | Cembung |
| 11. | MH9 | Hepatopankreas | Hijau | Bulat | Halus | Cembung |
| 12. | MH10 | Hepatopankreas | Hijau | Bulat | Halus | Cembung |
| 13. | ME1A | Ekor | Kuning | Bulat | Bergerigi | Cembung |
| 14. | ME1B | Ekor | Hijau | Bulat | Halus | Cembung |
| 15. | ME2A | Ekor | Kuning | Bulat | Halus | Cembung |
| 16. | ME2B | Ekor | Kuning | Bulat | Bergerigi | Cembung |
| 17. | ME2C | Ekor | Hijau | Bulat | Halus | Cembung |
| 18. | ME2D | Ekor | Putih | Bulat | Halus | Cembung |
| 19. | ME3A | Ekor | Kuning | Bulat | Bergerigi | Cembung |
| 20. | ME3B | Ekor | Hijau | Bulat | Halus | Cembung |
| 21. | ME3C | Ekor | Putih | Bulat | Halus | Cembung |
| 22. | ME4A | Ekor | Kuning | Bulat | Halus | Cembung |
| 23. | ME4B | Ekor | Hijau | Bulat | Halus | Cembung |
| 24. | ME5A | Ekor | Kuning | Bulat | Halus | Cembung |
| 25. | ME5B | Ekor | Hijau | Bulat | Halus | Cembung |
| 26. | ME6A | Ekor | Kuning | Bulat | Bergerigi | Cekung |
| 27. | ME6B | Ekor | Hijau | Bulat | Halus | Cekung |
| 28. | ME7A | Ekor | Kuning | Bulat | Bergerigi | Cembung |
| 29. | ME7B | Ekor | Hijau | Bulat | Halus | Cekung |
| 30. | ME8A | Ekor | Kuning | Bulat | Bergerigi | Cekung |
| 31. | ME8B | Ekor | Hijau | Bulat | Halus | Cekung |
| 32. | ME8C | Ekor | Putih | Bulat | Halus | Cekung |
| 33. | ME9A | Ekor | Kuning | Bulat | Halus | Cekung |
| 34. | ME9B | Ekor | Putih | Bulat | Halus | Cekung |
| 35. | ME10A | Ekor | Kuning | Bulat | Halus | Cekung |
| 36. | ME10B | Ekor | Hijau | Bulat | Halus | Cekung |
| 37. | ME10C | Ekor | Putih | Bulat | Halus | Cekung |

Berdasarkan pengamatan warna, bentuk, dan karakterisasi koloni bakteri terhadap 37 isolat yang didapatkan dari udang vaname (*L. vannamei*) sampel terpilih 5 isolat bakteri yang digunakan untuk uji selanjutnya (Tabel 2). Kelima isolat bakteri ini kemudian dilakukan uji identifikasi bakteri secara biokimia (Tabel 3). Hasil identifikasi bakteri secara biokimia menunjukkan bahwa kesembilan isolat bakteri teridentifikasi sebagai bakteri *V. vulnificus* (MH5A), *V. parahaemolyticus* (ME9B), *V. mimicus* (MH6B), *V. harveyi* (ME5A), dan *V. fluvialis* (ME6A).

Tabel 2. Lima Isolat Agensia Vibriosis pada Udang Vaname (*L. vannamei*) Sampel.

| No | Kode | Asal Isolat | Warna Koloni | Bentuk Koloni | Karakterisasi Koloni | |
|----|------|----------------|--------------|---------------|----------------------|---------|
| 1. | MH5A | Hepatopankreas | Kuning | Bulat | Halus | Cekung |
| 2. | MH6B | Hepatopankreas | Putih | Bulat | Halus | Datar |
| 3. | ME5A | Ekor | Kuning | Bulat | Halus | Cembung |
| 4. | ME6A | Ekor | Kuning | Bulat | Bergerigi | Cekung |
| 5. | ME9B | Ekor | Putih | Bulat | Halus | Cekung |



Tabel 3. Hasil Identifikasi Bakteri secara Biokimia Kelima Isolat Bakteri.

| Uji | MH5A | MH6B | ME5A | ME6A | ME9B |
|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--|
| Morfologi | | | | | |
| Bentuk : | | | | | |
| Bentuk Koloni | <i>Circular</i> | <i>Circular</i> | <i>Circular</i> | <i>Circular</i> | <i>Circular</i> |
| Bentuk Elevasi | <i>Concave</i> | <i>Even</i> | <i>Convex</i> | <i>Concave</i> | <i>Concave</i> |
| Bentuk Tepi | <i>Entire</i> | <i>Entire</i> | <i>Entire</i> | <i>Rough</i> | <i>Entire</i> |
| Media/Warna | TCBS/ Kuning | TCBS/ Putih | TCBS/ Kuning | TCBS/ Kuning | TCBS/ Putih |
| Sifat Fisiologi dan Biokimia : | | | | | |
| Pewarnaan gram | - | - | - | - | - |
| O/F | F | F | F | F | F |
| Motility | + | + | + | + | + |
| Gram KOH 3% | - | - | - | - | - |
| Katalase | + | + | + | + | + |
| Oksidase | + | + | + | + | + |
| TSIA | A/A | A/K | A/K | A/K | A/K |
| H ₂ S | - | + | + | - | + |
| Lisin dekarboksilase | + | + | + | - | + |
| Indole | + | + | + | + | + |
| Orithin dekarboksilase | + | + | + | - | + |
| Metyl-Red | + | + | - | - | + |
| Voges-proskauer | - | - | - | + | - |
| Urea | - | - | + | - | - |
| Pemecahan Gelatin | + | + | + | + | + |
| Produksi asam dari : | | | | | |
| Arabinose | + | + | - | - | - |
| Salisin | + | - | + | + | - |
| Sukrosa | + | - | + | + | - |
| Xylose | - | - | - | - | - |
| Hasil | <i>Vibrio vulnificus</i> (95,45%) | <i>Vibrio mimicus</i> (95,45%) | <i>Vibrio harveyi</i> (100%) | <i>Vibrio fluvialis</i> (90,90%) | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (100%) |

Uji sensitivitas selanjutnya dilakukan terhadap 5 isolat bakteri tersebut. Hasil pengukuran zona hambat dan data hasil sensitivitas bakteri berdasarkan besarnya nilai zona hambat dari kelima isolat bakteri terhadap antibiotik eritromisin, enrofloksasin, dan oksitetrasiklin dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 5.

Tabel 4. Hasil pengukuran (mm) Zona Hambat pada Uji Sensitivitas terhadap Antibiotik Eritromisin, Enrofloksasin, dan Oksitetrasiklin.

| No | Kode Isolat | Eritromisin | | | | | | Enrofloksasin | | Oksitetrasiklin | |
|----|----------------------------|-------------|----|------|------|-----|----|---------------|----|-----------------|----|
| | | Jam | | Jam | | Jam | | Jam | | Jam | |
| | | 24 | 48 | 24 | 48 | 24 | 48 | 24 | 48 | 24 | 48 |
| 1 | <i>V. vulnificus</i> | 6,8 | 7 | 9,1 | 7,3 | 6,9 | 0 | | | | |
| 2 | <i>V. harveyi</i> | 0 | 0 | 10,4 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| 3 | <i>V. mimicus</i> | 0 | 0 | 11,3 | 10,2 | 0 | 0 | | | | |
| 4 | <i>V. parahaemolyticus</i> | 0 | 0 | 9 | 7,1 | 8,3 | 0 | | | | |
| 5 | <i>V. fluvialis</i> | 0 | 0 | 9,7 | 6,7 | 0 | 0 | | | | |

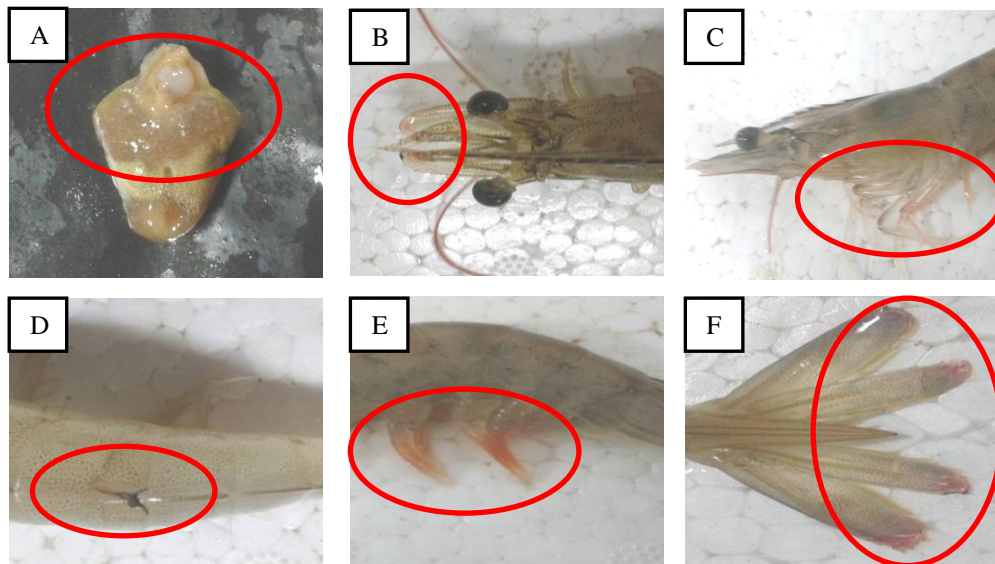
Nilai rata-rata zona hambat bakteri terhadap antibiotik Eritromisin adalah isolat bakteri *V. vulnificus* (6,8 mm), *V. harveyi* (0 mm), *V. mimicus* (0 mm), *V. parahaemolyticus* (0 mm), dan *V. fluvialis* (0 mm). Nilai rata-rata zona hambat bakteri terhadap antibiotik Enrofloksasin adalah isolat *V. vulnificus* (8,2 mm), *V. harveyi* (10,4 mm), *V. mimicus* (10,7), *V. parahaemolyticus* (2,68 mm), dan *V. fluvialis* (7,05 mm). Nilai rata-rata zona hambat bakteri terhadap antibiotik Oksitetrasiklin adalah isolat *V. vulnificus* (6,94 mm), *V. harveyi* (0 mm), *V. mimicus* (0 mm), *V. parahaemolyticus* (8,31 mm) dan *V. fluvialis* (0 mm). Kriteria zona hambat berdasarkan data hasil pengukuran zona hambat (Tabel 5) menunjukkan bahwa seluruh isolat bakteri termasuk dalam golongan *resistance* (R) terhadap antibiotik Eritromisin, Enrofloksasin, dan Oksitetrasiklin. Kelima isolat bakteri yaitu *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. fluvialis* selanjutnya dilakukan uji Postulat Koch.



Tabel 5. Data Hasil Sensitivitas Bakteri terhadap Antibiotik Eritromisin, Enrofloksasin, dan Oksitetrasiklin.

| No | Kode Isolat | Eritromisin | | Enrofloksasin | | Oksitetrasiklin | |
|----|----------------------------|-------------|----|---------------|----|-----------------|----|
| | | Jam | | | | | |
| | | 24 | 48 | 24 | 48 | 24 | 48 |
| 1 | <i>V. vulnificus</i> | R | R | R | R | R | R |
| 2 | <i>V. harveyi</i> | R | R | R | R | R | R |
| 3 | <i>V. mimicus</i> | R | R | R | R | R | R |
| 4 | <i>V. parahaemolyticus</i> | R | R | R | R | R | R |
| 5 | <i>V. fluvialis</i> | R | R | R | R | R | R |

Perubahan tingkah laku udang vaname (*L. vannamei*) selama uji Postulat Koch mulai terlihat setelah 30 menit pasca penyuntikkan yaitu udang mulai berenang miring dan menuju ke permukaan. Gejala klinis yang ditunjukkan oleh udang vaname (*L. vannamei*) selama masa pemeliharaan 14 hari (Gambar 2) adalah tubuh lunak, hepatopankreas berwarna kecoklatan (A), *antennal scale* berwarna kemerahan dan mengalami nekrosis (B), pereopoda kemerahan (C), abdomen mengalami melanosis (D), pleopoda kemerahan (E) dan uropoda berwarna kemerahan serta mengalami nekrosis (F). Pada udang vaname (*L. vannamei*) yang diinjeksi bakteri *V. harveyi*, uropoda berwarna kemerahan dan berpendar dalam gelap. Tingkah laku udang vaname (*L. vannamei*) selama masa pemeliharaan menunjukkan napsu makan menurun, udang berenang menuju permukaan air, berenang mendekati aerator kemudian berenang miring hingga lemas dan mati.



Keterangan : (A) Hepatopankreas kecoklatan (D) Abdomen mengalami melanosis
 (B) *Antennal scale* kemerahan dan mengalami nekrosis (E) Pleopoda kemerahan
 (C) Pereopoda kemerahan (F) Uropoda kemerahan dan nekrosis

Gambar 2. Gejala klinis udang vaname (*L. vannamei*) pada uji Postulat Koch

Kematian terjadi pada udang vaname (*L. vannamei*) setelah menunjukkan gejala klinis pada uji Postulat Koch, tetapi tidak semua udang mati setelah menunjukkan gejala klinis. Hasil pengamatan mortalitas udang vaname (*L. vannamei*) pada uji Postulat Koch dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Pengamatan Mortalitas Udang Vaname (*L. vannamei*) selama uji Postulat Koch

| Total Kematian | Nama Bakteri | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------------------|----|-----|----------------------------|----|-----|-------------------|----|-----|-------------------|----|-----|---------------------|----|-----|
| | V. <i>vulnificus</i> | | | V. <i>parahaemolyticus</i> | | | V. <i>harveyi</i> | | | V. <i>mimicus</i> | | | V. <i>fluvialis</i> | | |
| | Ulangan | | | | | | | | | | | | | | |
| | I | II | III | I | II | III | I | II | III | I | II | III | I | II | III |
| | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 7 | 8 | 7 | 8 | 8 | 8 |
| Persentase Mortalitas | 100% | | | 100% | | | 100% | | | 92% | | | 100% | | |



Pembahasan

Hasil identifikasi secara biokimia yang telah dibandingkan dengan Cowan and Steel (2004) menunjukkan bahwa kesembilan isolat bakteri teridentifikasi sebagai bakteri *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. harveyi*, dan *V. fluvialis*. Isolat dan MH5A memiliki kemiripan dengan bakteri *V. vulnificus* sebesar 95,45%. Strom dan Paranjpye (2000) menyebutkan bahwa bakteri *V. vulnificus* berbentuk batang dengan flagel tunggal, motil, dapat memfermentasi laktosa dan dalam kondisi tertentu dapat menyebabkan infeksi serius dan fatal. Bakteri *V. vulnificus* dilaporkan menyerang udang windu (*P. Monodon*) pada tambak di Bengkulu, Riau dan tambak BBPBAP, Jepara (Felix *et al.*, 2011), menginfeksi ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) (Desrina *et al.*, 2006 dan Hastari *et al.*, 2014), dan ikan lele (*C. gariepinus*) di Pati dan Demak (Indrarini *et al.*, 2014).

Isolat bakteri ME9B memiliki kemiripan 100% dengan bakteri *V. parahaemolyticus* sesuai dengan Cowan and Steel (2004). *V. parahaemolyticus* merupakan bakteri *halophilic* gram negatif dan secara alami terdapat di laut dan dapat ditemukan pada kepiting, udang, tiram, dan kerang lainnya (Rojas *et al.*, 2011). Bakteri *V. parahaemolyticus* dilaporkan menyerang kegiatan penggemukkan kepiting bakau (*S. serrata*) di Pemalang (Ferindika *et al.*, 2014), udang windu (*P. Monodon*) (Felix *et al.*, 2011; Tran *et al.*, 2013; dan Duan *et al.*, 2015), kerang dan tiram di Sao Paulo, Brazil (Rojas *et al.*, 2011), dan udang vaname (*L. vannamei*) (Tran *et al.*, 2013).

Hasil identifikasi secara biokimia isolat MH6B memiliki kemiripan 95,45% dengan bakteri *V. mimicus*. Menurut Thompson *et al.* (2009) dan Hasan *et al.* (2010) bakteri *V. mimicus* adalah bakteri gram negatif. Bakteri *V. mimicus* dilaporkan menyerang ikan nila (*O. niloticus*), ikan lele (*C. gariepinus*) dan ikan belanak (*M. cephalus*) di Mesir (Abdellrazaq dan Khaliel, 2014), lobster (*P. homarus*) di Iran (Raissy *et al.*, 2011), dan udang windu (*P. Monodon*) di India (Srinivasan dan Ramasamy, 2009).

Isolat bakteri ME5A memiliki kemiripan 100% dengan bakteri *V. harveyi*. Bakteri *V. harveyi* merupakan bakteri *halophilic* bercahaya, memiliki sifat gram negatif, dan merupakan patogen serius yang menyerang hewan laut di seluruh dunia (Thongkao, 2015). Bakteri *V. harveyi* dilaporkan menyerang udang windu (*P. Monodon*) (Srinivasan dan Ramasamy, 2009; Felix *et al.*, 2011), lobster (*P. homarus*) di Iran (Raissy *et al.*, 2011), kepiting bakau (*S. serrata*) (Ferindika *et al.*, 2014 dan Sarjito *et al.*, 2014), dan ikan lele dumbo (*C. gariepinus*) (Indrarini *et al.*, 2014).

Hasil identifikasi secara biokimia isolat ME6A memiliki kemiripan 90,90% dengan bakteri *V. fluvialis*. Bakteri *V. fluvialis* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang banyak terdapat di pesisir (Tsai *et al.*, 2011). Bakteri *V. fluvialis* dilaporkan menyerang ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) di Lampung dan Situbondo (Desrina *et al.*, 2006), udang windu (*P. Monodon*) (Srinivasan dan Ramasamy, 2009), ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) di Karamba Jaring Apung Teluk Hurun Lampung (Hastari *et al.*, 2014), ikan nila (*O. niloticus*), ikan lele (*C. gariepinus*) dan ikan belanak (*M. cephalus*) di Mesir (Abdellrazaq dan Khaliel, 2014).

Hasil uji sensitivitas kelima isolat bakteri terhadap antibiotik Eritromisin, Enrofloksasin, dan Oksitetrasiklin dengan dosis 35µg menunjukkan hasil *resistence*. Hasil ini berdasarkan hasil pengukuran rata-rata zona bening pada uji sensitivitas seluruh isolat terhadap antibiotik Eritromisin adalah 0 - 6,8 mm. Hasil pengukuran rata-rata zona bening seluruh isolat bakteri terhadap antibiotik Enrofloksasin adalah 2 - 10,7 mm. Hasil pengukuran rata-rata zona bening seluruh isolat bakteri terhadap antibiotik Oksitetrasiklin adalah 0-8,31 mm. Mengacu pada *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2012), zona bening dengan ukuran (≤ 12 mm) termasuk dalam golongan *resistence*, (13-16 mm) termasuk dalam golongan *intermediate*, dan (≥ 17 mm) termasuk dalam golongan *sensitive*. Resistensi terjadi ketika bakteri berubah yang menyebabkan turun atau hilangnya efektivitas senyawa kimia dan bahan lainnya dalam obat untuk mencegah atau mengobati infeksi (Bari, 2008). Sarjito (2010) menyebutkan bahwa spesies vibrio patogen memiliki plasmid yang berfungsi sebagai pembawa gen pengkode faktor keganasan dan ketahanan terhadap berbagai faktor lingkungan seperti antibiotik, sehingga perbedaan jenis plasmid yang dimiliki tiap bakteri menyebabkan perbedaan tingkat keganasan, karena keberadaan plasmid pada vibrio patogen mampu meningkatkan efisiensi pemanfaatan zat besi sehingga bakteri tetap bertahan hidup pada inang meskipun pada kondisi zat besi yang sangat rendah.

Gejala klinis yang ditunjukkan udang vaname (*L. vannamei*) sampel dan udang vaname (*L. vannamei*) yang diinfeksi oleh 5 bakteri berbeda pada uji Postulat Koch mengakibatkan gejala klinis yang identik sama baik secara morfologi maupun tingkah laku yaitu *antennal scale* berwarna kemerahan dan mengalami nekrosis, pereopoda dan pleopoda berwarna kemerahan, uropoda berwarna kemerahan dan mengalami nekrosis. Pada udang vaname (*L. vannamei*) yang diinfeksi oleh bakteri *V. harveyi* uropoda terlihat kemerahan dan berpendar dalam gelap, abdomen mengalami melanosis, dan hepatopankreas berwarna kecoklatan.

Lavilla-Pitogo *et al.* (2000), Soto-Rodriguez *et al.* (2010), KKP (2012) dan Huang *et al.* (2013) melaporkan udang vaname (*L. vannamei*) yang terinfeksi vibriosis menunjukkan gejala klinis berupa nekrosis, melanosis pada abdomen, bercak merah pada pleopoda dan pereopoda, dan rostrum berwarna kemerahan. Lavilla-Pitogo *et al.* (2000) menjelaskan bahwa gumpalan jaringan berwarna coklat yang menyebabkan hepatopankreas terlihat berwarna kecoklatan adalah tubulus hepatopankreas yang mengalami melanosis. Menurut Jithendran *et al.* (2010) warna kemerahan sampai hitam terjadi akibat adanya infeksi bakteri yang



memecah kitin dari eksoskeleton sehingga menyebabkan erosi dan pigmentasi kemerahan, coklat gelap hingga hitam.

Perubahan tingkah laku yang ditunjukkan oleh udang vaname (*L. vannamei*) selama uji Postulat Koch adalah napsu makan menurun, udang berenang menuju permukaan air, berenang mendekati aerator kemudian berenang miring hingga lemas dan mati. KKP (2012) dan Huang *et al.* (2013) menyebutkan perubahan tingkah laku yang terjadi pada udang vaname (*L. vannamei*) yang terserang vibriosis adalah kondisi tubuh lemah, napsu makan menurun, berenang miring, berenang lambat dan mendekati permukaan air. Hasil uji Postulat Koch menunjukkan kelima isolat bakteri bersifat patogen terhadap udang vaname (*L. vannamei*). Patogenesitas bakteri terhadap inang berbeda karena dipengaruhi oleh faktor pertahanan inang dalam melawan patogen, faktor patogenesitas bakteri yang berkaitan dengan kemampuan memproduksi toksin, plasmid, enzim, dan mengatasi ketahanan inang, serta kecepatan berkembang biak (Sarjito, 2010). Sarjito (2010) lebih lanjut menjelaskan bahwa spesies vibrio patogen memiliki plasmid yang berfungsi sebagai pembawa gen pengkode faktor keganasan dan ketahanan terhadap berbagai faktor lingkungan seperti antibiotik, sehingga perbedaan jenis plasmid yang dimiliki tiap bakteri menyebabkan perbedaan tingkat keganasan, karena keberadaan plasmid pada vibrio patogen mampu meningkatkan efisiensi pemanfaatan zat besi sehingga bakteri tetap bertahan hidup pada inang meskipun pada kondisi zat besi yang sangat rendah.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa agensia penyebab vibriosis pada pemeliharaan udang vaname (*L. vannamei*) di tambak intensif Desa Wonorejo, Kabupaten Kendal adalah *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. mimicus*, dan *V. fluvialis*. Kelima bakteri ini resisten terhadap antibiotik Eritromisin, Enrofloksasin, dan Oksitetrasiklin. Gejala klinis udang vaname (*L. vannamei*) yang terserang vibriosis pada udang sampel dan udang uji Postulat Koch serupa yaitu uropoda nekrosis dan berwarna kemerahan serta berpendar dalam gelap, perepoda berwarna kemerahan, pleopoda berwarna kemerahan, *antennal scale* berwarna kemerahan dan mengalami nekrosis, hepatopankreas berwarna kecoklatan, serta melanosis pada abdomen, napsu makan menurun, tubuh lunak, udang berenang ke arah permukaan air dan mendekati aerator dan berenang miring.

Saran

Penggunaan antibiotik Eritromisin, Enrofloksasin, dan Oksitetrasiklin untuk mengobati serangan vibriosis pada pemeliharaan udang vaname (*L. vannamei*) sebaiknya tidak dilakukan karena menimbulkan strain bakteri resisten terhadap antibiotik dan perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi isolat bakteri agensia penyebab penyakit vibriosis pada udang vaname (*L. vannamei*) secara biomolekuler.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan sebagian dari payung penelitian yang dilakukan oleh Dr. Ir. Sarjito, M.App.Sc., *et al.* Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Suprayogi, S.Pi, MP selaku kepala SKIPM Kelas I Yogyakarta yang telah memberikan fasilitas selama penelitian serta bapak Marsudi selaku penanggung jawab Laboratorium Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro yang telah membantu selama kegiatan penelitian di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdellrazaq, G. S dan S. A. Khaliel. 2014. *Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of Vibrios Isolated from Healthy and Diseased Aquacultured Freshwater Fishes*. Global Veterinaria. 13(3): 397-407.
- Bari, S. B; B.M. Mahajan; S. J. Surana. 2008. *Resistance to Antibiotic : A Challenge in Chemotherapy*. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 4 (2) : 286-291.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; Twenty-Second Informational Supplement. 188 p.
- Cowan, S.T dan K. J. Steel. 2004. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3rded., Cambridge University Press, United Kingdom., 352 p.
- Coyle, M.B. 2005. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. Department of Laboratory Medicine and Microbiology University of Washington. Seattle Washington. 241p.
- Desrina; A. Taslihan; Ambariyanto; S. Suryaningrum. 2006. Uji Keganasan Bakteri *Vibrio* pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Ilmu Kelautan. 11(3): 119-125.
- Duan, Y; J. Zhang; H. Dong; Y. Wang; Q. Liu; H. Li. 2015. *Oxidative Stress Response of the Black Tiger Shrimp *Peneus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* Challenge*. Fish and Shellfish Immunology. 46: 354-365.



- Felix, F; T. T. Nugroho; S. Silalahi; Y. Octavia. 2011. Skrining Bakteri *Vibrio* sp., Asli Indonesia sebagai Penyebab Penyakit Udang Berbasis Teknik 16s Ribosomal DNA. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 3(2): 85-99.
- Feriandika, F. B; Sarjito; S. B. Prayitno. 2014. Identifikasi Agenia Penyebab Vibriosis pada Penggemukan Kepiting Bakau (*Scylla serrata*) di Pemalang. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3(2): 126-134.
- Hadi, S. 2000. Metodologi Penelitian. Andi Yogyakarta. Yogyakarta.
- Hasan, N.A; C. J. Grim; B. J. Hley; J. C. M. Alam; E. Taviani; M. Hog; A. C. Munk; E. Saunders; T. S. Brettin; D. C. Bruce; J. F. Challacombe; J. C. Detter; C. S. Han; G. Xie; G. B. Nair; A. Hug; R. R. Colwell. 2010. *Comparative Genomics of Clinical and Enviromental Vibrio mimicus*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(49): 21134-21139.
- Hastari, I. F; Sarjito; S. B. Prayitno. 2014. Karakterisasi Agenia Penyebab Vibriosis dan Gambaran Histologi Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dari Karamba Jaring Apung Teluk Hurun Lampung. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3(3): 86-94.
- Hatmanti, A. 2003. Penyakit Bakterial pada Budidaya Krustasea serta Cara Penanganannya. Jakarta. Oseana, 28 (3): 1-10.
- Huang, H; X. Liu; J. Xiang; P. Wang. 2013. *Immune Response of Litopenaeus vannamei after Infection with Vibrio harveyi*. *Aquaculture*., 406-407: 115-120.
- Huys, G. 2002. *Standard Operating Procedur: Antibiotic Susceptibility Testing of Aquacultur-Associated Bacteria with the Disc Diffusion Method*. Laboratory of Microbiology Universiteit Gent, Belgium, 10p.
- Indrarini, Dani; S. B. Prayitno; Sarjito. 2014. Agenia Penyebab Vibriosis Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) pada Kolam Bekas Tambak Udang. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3(4): 299-307.
- Jayasree, L; P. Janakiram; R. Madhavi. 2006. *Characterization of Vibrio spp. Associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India)*. *Journal of the World Aquaculture Society*., 37(4): 523-532.
- Jithendran, K. P; M. Poornima; C. P. Balasubramanian; S. Kulasekarapandian. 2010. *Diseases of Mud Crabs (Scylla spp): an Overview*. *Indian J. Fish.*, 57(3): 55-63.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2012. Standar Nasional Indonesia (SNI) Budidaya Air Payau dan Laut. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Jakarta, 179 hlm.
- _____. 2013. Profil Kelautan dan Perikanan Provinsi Jawa Tengah untuk Mendukung Industrialisasi KP. Sekretariat Jenderal Kementerian Kelautan dan Perikanan. Jakarta. 344 hlm.
- _____. 2014. Kelautan dan Perikanan dalam Angka Tahun 2014. Pusat Data Statistik dan Informasi Kementerian Kelautan dan Perikanan. Jakarta. 330 hlm.
- Lavilla-Pitogo, C. R; G.D. Lio-Po; E.R. Cruz-Lacierda; E.V. Alapide-Tendencia; L.D. De La Pena. 2000. *Disease of Peneid Shrimps in the Philippines*. 2nded., Southeast Asian Fisheries Development Center, Philippines., 96 p.
- Nurjanah, S; S. B. Prayitno; Sarjito. 2014. Sensitivitas Bakteri *Aeromonas* sp. dan *Pseudomonas* sp. yang Diisolasi dari Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Sakit terhadap Berbagai Macam Obat Beredar. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3(4): 308-316.
- OIE Terrestrial Manual. 2012. *Laboratory Methodologies for Bacterial Antimicrobial Susceptibility Testing*. 11p.
- Paul, D.L and Jeane, E. O. 2005. *Practical Research: Planning and Design Research*. 8thed., Pearson Merrill Prentice Hall. Ohio.
- Raissy, M; H. Momtaz; M. Moumeni; M. Ansari; E. Rahimi. 2011. *Molecular Detection of Vibrio spp., in Lobster Hemolymph*. *African Journal of Microbiology Research*. 5(13): 1697-1700.
- Ramesh, K; M. Natarajan; H. Sridhar; S. Umamaheswari. 2014. *Virulence Determination Among Vibrio harveyi Hatchery Isolates Through Haemolysis and Growth Constraint*. *Global Journal of Bio-Science and Biotechnology*. 3(1): 109-114
- Razali. 2011. Isolasi dan Uji Antagonis Bakteri Resisten Antibiotik dari Tambak Udang terhadap Bakteri Penyebab Penyakit Vibriosis. [Tesis]. Program Magister Biologi Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Rojas, M. V. R; M. H. Matte; M. Dropa; M. L. Silva; G. R. Matte. 2011. *Characterization of Vibrio parahaemolyticus Isolated From Oyster and Mussels in Sao Paulo, Brazil*. *Rev. INST. Med. Trop. Sao Paulo*. 53(4) : 201-205.
- Sarjito. 2010. Aplikasi Biomolekuler untuk Deteksi Agenia Penyebab Vibriosis pada Ikan Kerapu dan Potensi Bakteri *Sponge* sebagai Anti Vibriosis [Disertasi]. Program Doktor Manajemen Sumberdaya Pantai Universitas Diponegoro. Semarang.



- Sarjito; S. Hastuti; I. Sumidjan; S. B. Prayitno. 2014. *The Diversity of Vibrios Related to Vibriosis in Mud Crabs (Scylla serrata) from Extensive Brackish Water Pond Surrounding of Semarang Bay, Indonesia. Proceeding of International Conference of Aquaculture Indonesia.* 113-119
- Soto-Rondriguez; G. Bruno; R. Lozano. 2010. *Bright Red Syndrome in Pasific White Shrimp Litopenaeus vannamei is Caused by Vibrio harveyi.* Dis Aquat Org. 2: 11-19.
- Srinivasan, P dan P. Ramasamy. 2009. *Occurrence, Distribution and Antibiotic Resistance Patterns of Vibrio Species Associated with Viral Diseased Shrimp of South Indian Aquaculture Environment.* International Journal of Agriculture Science. 1(2): 01-10.
- Strom, M. S dan R. N. Paranjpye. 2000. *Epidemiology and Pathogenesis of Vibrio vulnificus.* Microbes and Infection. 2: 177-188
- Sukenda; A.J. Sihombing; F. Novianti; Widanarni. 2005. *Penapisan Bakteri Probiotik dan Peranannya terhadap Infeksi Buatan Vibrio harveyi pada Udang Vanname (Litopenaeus vannamei).* Jurnal Akuakultur Indonesia. 4(2): 181-187.
- Suwoyo, H.S dan M. Mangampa. 2010. *Aplikasi Probiotik dengan Konsentrasi Berbeda pada Pemeliharaan Udang Vaname (Litopenaeus vannamei).* Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur., 239-247.
- Thompson, C. C; A. C. P. Vicente; R. C. Souza; A. T. R. Vasconcelos; T. Vesth; N. Alves; D. W. Ussery; T. Lida; F. L. Thompson. 2009. *Genomic Taxonomy of Vibriosis.* BMC Evol. Biol. 9: 258.
- Thongkao, K. 2015. *Establishment of Immunological-Based Assay and Molecular Assay for Rapid Detection of Vibrio harveyi.* Social and Behavioral Sciences, 197: 1627-1633.
- Tran, L; L. Nunan; R. M. Redman; L. L. Mohny; C. R. Pantoja; K. Fitzsimmons; D. V. Lightner. 2013. *Determination of the Infectious Nature of the Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome Affecting Penaeid Shrimp.* Diseases of Aquatic Organisms. 105: 45-55.
- Tsai, T; C. Chao; P. Chen; W. Liu; C. Hou. 2011. *A Case of Acute Appendicitis with Vibrio fluvialis Peritonitis.* Journal of Acute Medicine. 1: 50-51.