

Identifikasi bakteri *Vibrio* spp. penyebab vibriosis pada udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) di PT. Pilar Persada Parigi

[Identification of *Vibrio* spp. bacteria causes of vibriosis in vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at PT. Pilar Persada Parigi]

Stevano F. P Putra¹, Reiny A. Tumbol², Suzanne L. Undap², Reni L. Kreckhoff², Pankie N. L. Pangemanan²

¹) Mahasiswa Program Studi Budidaya Perairan FPIK Unsrat Manado

²) Program Studi Budidaya Perairan FPIK Unsrat Manado

Penulis korespondensi: R. A. Tumbol, reinytumbol@unsrat.ac.id

Abstract

The purpose of this study is to isolate and identify *Vibrio* spp. bacteria from vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in PT. Pilar Persada Parigi Bajo Village, South Minahasa Regency. The research was carried out by starting with shrimp sampling from shrimp cultivation locations at PT. Persada Parigi Pillar in Bajo Village, Tatapaan, South Minahasa, North Sulawesi as many as 9 fish from 3 ponds (1 pond took 3 shrimp). The pond was recommended by the pond technician of PT. The Persada Parigi pillar is related to the condition of the pond which is suspected of having *Vibrio* spp. bacteria that need special attention. The shrimp samples were then taken to the Laboratory alive. During transportation, the samples were put in 3 separate containers equipped with battery aerators, then the identification of *Vibrio* spp. bacteria was carried out at the Laboratory of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sam Ratulangi University and at the Manado Fishery Products Quality Control and Safety Quarantine Center. Isolation of *Vibrio* spp. bacteria using TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) agar media. The characterization of *Vibrio* spp. bacteria was carried out by a series of tests, namely gram staining tests (gram negative, positive and bacterial form), main tests (KOH 3%, H₂O₂ and oxidase), Oxidation/Fermentation (O/F), Glucose and Motility Indole Ornithin (MIO). The results of the isolation showed that there were 9 isolates of *Vibrio* spp. bacteria from 9 samples of vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from 3 different ponds. The results of bacterial characteristics obtained negative grams, yellow and green colony morphology, bacil/stem cell shape, KOH 3% (-), catalase (+), oxidase (+), O/F (fermentative), indole (+), and motility (+), glucose (+) from the results identified by *Vibrio* spp. bacteria.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio* spp., Vibriosis, isolation, identification

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri *Vibrio* spp. dari udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) di PT. Pilar Persada Parigi Desa Bajo, Kabupaten Minahasa Selatan. Penelitian dilaksanakan dengan diawali pengambilan sampel udang dari lokasi budidaya udang di PT. Pilar Persada Parigi di Desa Bajo, Tatapaan, Minahasa Selatan, Sulawesi Utara sebanyak 9 ekor dari 3 kolam (1 kolam diambil 3 ekor udang). Kolam direkomendasikan oleh teknisi tambak PT. Pilar Persada Parigi yang berhubungan dengan kondisi kolam yang dicurigai adanya bakteri *Vibrio* spp. yang perlu adanya perhatian khusus. Sampel udang selanjutnya dibawa ke Laboratorium dalam keadaan hidup. Selama transportasi sampel dimasukkan dalam 3 wadah terpisah yang dilengkapi dengan aerator baterai, selanjutnya untuk identifikasi bakteri *Vibrio* spp. dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi dan di Balai Karantina Pengendalian Mutu dan keamanan Hasil perikanan Manado. Isolasi bakteri *Vibrio* spp. menggunakan media agar TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile Sucrose*). Karakterisasi bakteri *Vibrio* spp. dilakukan dengan serangkaian pengujian yakni uji pewarnaan gram (gram negatif, positif dan bentuk bakteri), uji utama (KOH 3%, H₂O₂ dan oksidase), Oksidasi/Fermentasi (O/F), Glukosa dan Motility Indole Ornithin (MIO). Hasil isolasi terdapat 9 isolat bakteri *Vibrio* spp. dari 9 sampel udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) dari 3 kolam yang berbeda. Hasil karakteristik bakteri mendapatkan gram negatif, morfologi koloni berwarna kuning dan hijau, bentuk sel bacil/batang, KOH 3% (-), katalase (+), oksidase (+), O/F (Fermentatif), indole (+), dan motility (+), glukosa (+) dari hasil teridentifikasi bakteri *Vibrio* spp.

Kata kunci: *Litopenaeus vannamei*, Bakteri *Vibrio* spp., Vibriosis, isolasi, identifikasi

PENDAHULUAN

Udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu produk ekspor Indonesia yang dapat memberikan prospek yang baik untuk perekonomian Indonesia, hal ini membuat banyaknya pembudidaya udang vanname di Indonesia, udang vanname memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan udang yang lain seperti penebaran yang padat, tahan terhadap kondisi lingkungan yang buruk, tahan terhadap penyakit, serta waktu pemeliharaan yang tergolong cepat (Purnamasari *dkk.*, 2017). Namun meskipun udang vanname tahan terhadap penyakit, pembudidaya seringkali mendapatkan masalah penyakit pada udang. Penyakit merupakan salah satu kendala utama dalam budidaya ikan maupun udang. Timbulnya penyakit pada udang disebabkan karena adanya interaksi antara inang (host), lingkungan, dan pathogen. Faktor lingkungan berperan penting karena dapat menimbulkan pengaruh positif dan negatif terhadap hubungan antara inang dan pathogen (Kabata, 1985). Penyakit pada udang disebabkan oleh infeksi,

virus, bakteri, parasit dan jamur yang dikenal dengan penyakit patogenik (bibit penyakit) (Sachlan,1982). Penyakit yang disebabkan oleh bakteri dapat menjadi salah satu sumber dari penyakit yang dapat mengakibatkan kematian pada organisme budidaya. Bakteri merupakan salah satu patogen yang hidup berkoloni dan tidak mempunyai selubung inti namun mampu hidup dimana saja (Jawetz *dkk.*, 2004). Bakteri *Vibrio* spp. yang merupakan satu dari sekian banyak bakteri yang dapat merugikan kegiatan budidaya karena bakteri ini masuk dalam jenis patogen yang menginfeksi serta menimbulkan penyakit pada organisme budidaya khususnya udang, bakteri ini menyerang udang pada saat kondisi tubuh udang lemah dan kondisi lingkungan yang tidak baik (Feliatra *dkk.*, 2014). Penyakit yang biasa disebabkan oleh bakteri *Vibrio* spp. adalah vibriosis. Adanya keberadaan bakteri *Vibrio* spp. yang dapat menyebabkan penyakit vibriosis pada budidaya udang jika tidak dicegah atau ditangani akan memberikan dampak yang negatif sampai kematian massal pada udang yang dibudidayakan (Kurniawan *dkk.*, 2014).

METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel
(Sumber: Google Earth, 2024)

Keterangan : C30 : Kolam 1 C31 : Kolam 2 C33 : Kolam 3

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari – Agustus 2024. Lokasi pengambilan sampel dilakukan di tambak budidaya udang PT. Pillar Persada Parigi, Desa Bajo, Minahasa Selatan. Pewarnaan gram bakteri dan pengujian biokimia bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi dan di Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Manado.

Pengambilan Sampel

Pemilihan kolam untuk pengambilan sampel ditentukan dan direkomendasikan oleh teknisi tambak PT. Pilar Persada Parigi yang berhubungan dengan kondisi kolam yang dicurigai adanya bakteri *Vibrio* spp. dan diperlukan perhatian khusus. Sampel udang yang diambil sebanyak 9 ekor dari 3 kolam (1 kolam 3 ekor), selanjutnya dibawa dengan wadah yang terpisah dilengkapi dengan aerator baterai, kondisi udang masih hidup kemudian dibawa ke Laboratorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi. Selanjutnya akan dilakukan isolasi bakteri *Vibrio* spp. pada udang vanname (*L. vannamei*).

Pengambilan sampel udang diambil dari 3 kolam sebagai berikut :

Kolam C30 : sampel nomor 1, 2, 3

Kolam C31: sampel nomor 4, 5, 6

Kolam C33: sampel nomor 7, 8, 9.

Pembuatan Media TCBS

Media bakteri yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *Vibrio* spp. adalah menggunakan *Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose* (TCBS). TCBS adalah media selektif untuk menumbuhkan bakteri *Vibrio* spp. pembuatan media dilakukan dengan cara melarutkan 17,6 g TCBS kedalam 200 mL Aquades dalam gelas beaker sambil diaduk sampai tercampur dengan baik. Larutan media ini selanjutnya dipanaskan sampai mendidih. Peralatan yang digunakan untuk isolasi dan kultur seperti cawan petri, jarum ose, gunting, dan pinset disterilkan terlebih dahulu dalam autoclave selama 15 menit. Larutan media selanjutnya dituang ke dalam cawan petri dan didinginkan sambil didiamkan di dalam *laminar flow* sampai saat dibutuhkan.

Isolasi Bakteri *Vibrio* spp.

Pengambilan sampel dilakukan pada organ hepatopankreas sebagai target utama karena hepatopankreas merupakan organ pencernaan udang. Pengisolasian menggunakan jarum ose steril yang digoreskan di permukaan media TCBS dengan metode zig zag. Setelah itu, cawan petri berisi media dan isolat bakteri di inkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator selama 24 jam, pertumbuhan bakteri dalam media TCBS dapat dilihat secara visual, bakteri *Vibrio* spp. dalam media berkolonidan warna kuning atau jingga.

Uji Pewarnaan Gram

Gelas objek yang dipakai dibersihkan menggunakan alkohol 70% dan diberi aquades, lalu diambil isolat bakteri menggunakan jarum ose steril, ratakan pada kaca objek kemudian diletakkan pada laminari sampai kering, selanjutnya ditetesi dengan larutan Kristal Violet (Gram A), serta didiamkan 1 menit, kemudian dicuci menggunakan air mengalir serta dikeringkan. Setelah itu ditetesi menggunakan larutan Yodium (Gram B) serta abaikan selama 1 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir serta lalu dikeringkan. Kemudian tetesi Aceton Iodine (Gram C) diamkan selama 2 menit setelah itu dibilas menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Sehabis itu tetesi dengan Larutan Sarafin (Gram D) dibiarkan selama 30 detik lalu dicuci menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya diamati memakai mikroskop binokuler dengan perbesaran 100 µm.

Uji Biokimia Bakteri

Pengujian KOH 3%

Kaca preparat yang sudah disterilkan lebih dahulu menggunakan alkohol kemudian ditetesi dengan larutan KOH 3%, selanjutnya ambil isolat bakteri menggunakan jarum ose yang sudah steril lalu dilakukan pengamatan dengan melihat lendiran, jika terdapat lendiran maka isolat tersebut adalah gram negatif apabila tidak memiliki lendir isolat tersebut gram positif (Dwyana dan Gobel, 2011).

Pengujian KOH 3% dengan mengamati pembentukan lendir yang terjadi pada saat koloni bakteri yang telah diletakkan pada kaca objek. Setelah itu dicampurkan dengan larutan KOH 3%. Pengujian larutan KOH 3% dilakukan dengan cara ditetesi larutan ke atas kaca preparat yang sudah disterilkan menggunakan alkohol, lalu diambil isolat bakteri dengan menggunakan jarum ose steril setelah itu dilakukan pengamatan secara visual.

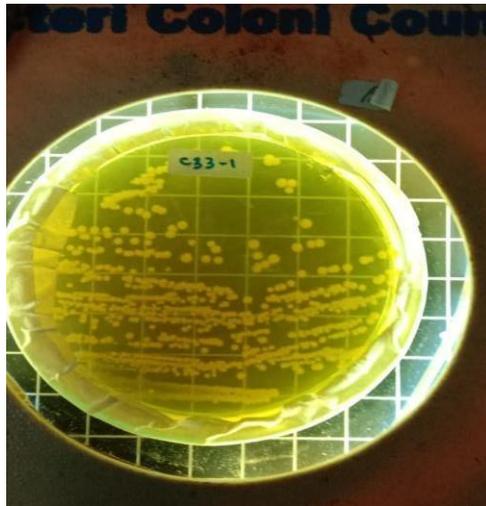
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri *Vibrio* spp.

Berdasarkan hasil isolasi bakteri *Vibrio* spp. pada udang vanname menggunakan media TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile Sucrose*) ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *Vibrio* spp. pada semua sampel yang sudah diinkubasi selama 24 jam Gambar 2. Gambar hasil isolasi dapat dilihat dari bentuk morfologi koloni bakteri yang tumbuh pada media dengan karakteristik koloni berwarna kuning/hijau, bentuk koloni tidak teratur (*irregular*), elevasi ketinggian koloni (*conver*) dan tepi koloni (*entire*) Tabel 1.

Tabel 1. Hasil isolasi koloni bakteri *Vibrio* spp. pada udang vanname (*Litopenaeus vannamei*)

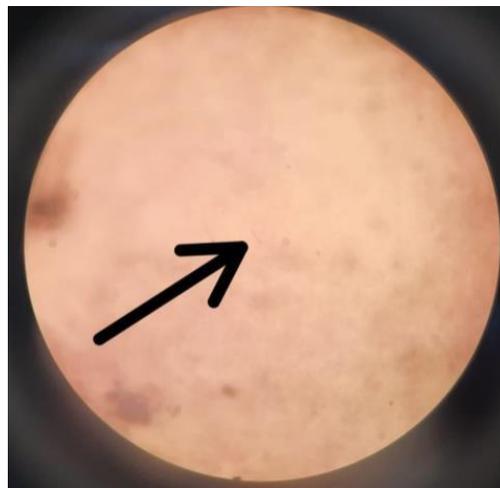
No	Kode isolat	Bentuk koloni	Warna koloni	Elevasi koloni	Tepi koloni
1	C30-1	Irregular	Kuning	Conver	Entire
2	C30-2	Irregular	Kuning	Conver	Entire
3	C30-3	Irregular	Kuning/hijau	Conver	Entire
4	C31-4	Irregular	Kuning	Conver	Entire
5	C31-5	Irregular	Kuning	Conver	Entire
6	C31-6	Irregular	Kuning/hijau	Conver	Entire
7	C33-7	Irregular	Kuning	Conver	Entire
8	C33-8	Irregular	Kuning/hijau	Conver	Entire
9	C33-9	Irregular	Kuning/hijau	Conver	Entire



Gambar 2. Bakteri *Vibrio* spp. yang tumbuh pada media TCBS.

Pewarnaan Gram

Hasil dari pewarnaan gram yang dilakukan terhadap 9 isolat terdapat bakteri *Vibrio* spp. yang bersifat gram negatif selain itu bentuk morfologi bakteri berbentuk batang/bacil (Gambar 2). Berdasarkan pewarnaan gram yang dihasilkan menunjukkan adanya patogenitas bakteri *Vibrio* spp. pada ke-9 sampel yang diambil dengan ditandai dengan warna merah saat dilakukan pewarnaan gram yang berarti ketiga kolam di PT. Pilar Persada Pargi yang diambil sampel terindikasi bahwa terdapat patogen *Vibrio* spp. Bakteri gram negatif mengandung lemak dalam presentase yang lebih tinggi dan memiliki peptidoglikan yang tipis sedangkan bakteri gram positif mempunyai dinding dengan lapisan peptidoglikan yang tebal (Sunatmo, 2007).



Gambar 3. Hasil pengamatan gram bakteri *Vibrio* spp. menggunakan mikroskop pembesaran 100x

Uji Biokimia bakteri

a. Uji KOH 3%

Hasil yang didapatkan dalam pengujian KOH 3% adalah terbentuknya lendiran pada kaca preparat yang berarti hasil pada pengujian ini negatif (-) (Gambar 4). Larutan KOH 3% yang dicampurkan dengan isolat bakteri dan terbentuknya lendiran menunjukkan isolat tersebut adalah gram negatif apabila tidak terbentuknya lendir isolat tersebut merupakan gram positif (Dwyana dan Gobel, 2011).



Gambar 4. Hasil uji KOH 3%.

b. Uji Katalase

Pengujian katalase dengan menggunakan larutan hydrogen peroksida (H_2O_2), pengujian ini diamati dengan pembentukan gelembung udara yang terjadi pada saat isolat bakteri yang dicampurkan bereaksi dengan larutan hydrogen peroksida (H_2O_2), pengujian katalase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim katalase yang bertujuan mendetoksifikasi hidrogen peroksida dengan memecahnya menjadi air dan gas oksigen. Berdasarkan pengujian yang dilakukan hasil yang didapatkan dengan pengamatan visual adalah terjadinya gelembung udara yang disimbolkan katalase (+) (Gambar 5).

Pengujian katalase dilakukan dengan cara larutan hydrogen peroksida (H_2O_2) ditetesi pada kaca preparat yang sudah disterilkan menggunakan alkohol lalu diambil isolat bakteri menggunakan jarum ose steril setelah itu dilakukan pengamatan secara visual. Isolat bakteri yang bersifat katalase positif (+) terlihat adanya pembentukan gelembung dan isolat bakteri yang tidak terjadi pembentukan gelembung adalah katalase negative (-) (Ijong, 2015).



Gambar 5. Hasil uji katalase

c. Uji Oksidase

Hasil dari uji oksidase berubah menjadi biru yang disimbolkan oksidase (+). Uji oksidase berfungsi untuk menentukan adanya sitokrom oksidase yang dapat ditemukan pada bakteritertentu. Pengujian ini dilakukan dengan pengambilan kertas paper oksidase lalu digoresi satu isolat bakteri, goreskan pada kertas oksidase lalu dilihat perubahan warna pada goresan isolat, reaksi oksidase positif ditandai dengan munculnya warna biru keunguan pada goresan (Dwyana dan Gobel, 2011).



Gambar 6. Hasil uji oksidase

d. Uji O/F

Dari hasil pengamatan perubahan uji O/F (Oksidatif/Fermentatif) menunjukkan hasil berubah warna kuning (acid) maka disebut Fermentatif (F). Sedangkan paraffin bertujuan untuk mengetahui sifat oksidatif atau fermentatif bakteri terhadap glukosa dengan menggunakan dua tabung reaksi yang salah satunya ditutupi dengan paraffin, sehingga diharapkan dalam media tidakterdapat udara yang dapat mendukung terjadinya fermentatif (Cowan and Steel's, 1974).



Gambar 7. Hasil uji O/F

e. Uji MIO

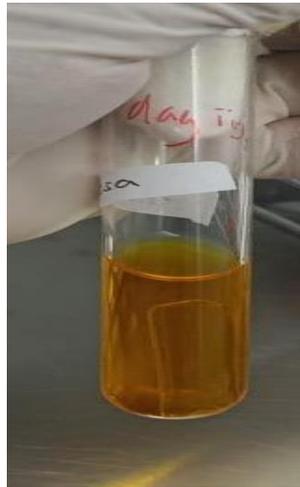
Pengujian pewarnaan media MIO (Motility Indol Ornithin) setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan melihat hasil media MIO yang dihasilkan.



Gambar 8. Hasil uji MIO

Hasil yang didapatkan adalah positif (+) (Gambar 8) karena bakteri pada daerah setrikan menyebar atau adanya perubahan warna pada dan hasil pengamatan Indole dilakukan dengan menambahkan satu tetes kovaks pada media MIO hasil yang didapatkan dari pengamatan secara visual adalah (+) (Gambar 8) karena tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media (Cowanand Steel's, 1974).

f. Uji Glukosa



Gambar 9. Hasil uji glukosa

Hasil yang didapatkan dengan pengamatan secara visual adalah (+) (Gambar 9) karena media berubah menjadi warna kuning (Cowan and Steel's, 1974). Pengujian glukosa melihat kemampuan bakteri dalam memfermentasikan gula-gula pada media. Proses fermentasi akan menghasilkan sejumlah besar asam (acid). Media glukosa merupakan media cair (liquid) yang berwarna merah.

Tabel 2 Hasil karakteriasi bakteri *Vibrio* spp. pada udang vanname (*Litopenaeus vannamei*)

No	Kode isolat	KOH 3%	Katalase	Oksidase	O/F	Motility	Indol	Glukosa
1	C30-1	-	+	+	F	+	+	+
2	C30-2	-	+	+	F	+	+	+
3	C30-3	-	+	+	F	+	+	+
4	C31-4	-	+	+	F	+	+	+
5	C31-5	-	+	+	F	+	+	+
6	C31-6	-	+	+	F	+	+	+
7	C33-7	-	+	+	F	+	+	+
8	C33-8	-	+	+	F	+	+	+
9	C33-9	-	+	+	F	+	+	+

Hasil identifikasi bakteri *Vibrio* spp. pada tambak PT. Pilar Persada Parigi Desa Bajo didapatkan udang vanname (*L. vannamei*) yang ada pada kolam C30, C31, C33 teridentifikasi bakteri *Vibrio* spp.

Tingkat serang bakteri *Vibrio* spp. yang terjadi di PT. Pilar Persada Parigi sangat tinggi dan bisa menyebabkan kematian massal, SR-nya mencapai 10% dari penebaran awal. Udang yang terinfeksi bakteri *Vibrio* spp. di awal budidaya sangat sulit diselamatkan sehingga para petambak terpaksa membuang atau memusnakan udang yang terinfeksi tersebut agar tidak menular lebih luas melalui media air. Udang vanname (*L. vannamei*) yang terinfeksi vibriosis menunjukkan gejala klinis berupa nekrosis, melanosis pada abdomen, bercak merah pada pleopoda dan pereopoda, dan rostrum berwarna kemerahan (Huang *et al.*, 2013). Warna kemerahan sampai hitam terjadi akibat adanya infeksi bakteri yang memecah kitin dari eksoskeleton sehingga menyebabkan erosi dan pigmentasi kemerahan, coklat gelap hingga hitam (Jithendran *et al.*, 2010). Gejala yang disebabkan bakteri *V. harveyi* dan *V. parahaemolyticus* menunjukkan kosongnya saluran pencernaan dan hepatopankreas berwarna pucat dan mengecil, kulit menjadi lunak, udang nafsu makannya berkurang, jaringan hepatopankreas dimana bentuk tubulus mulai meruncing, kurus dan berkerut, dan udang berenang tidak beraturan gejala tersebut dilaporkan juga oleh pengelola tambak di PT. Pilar Persada Parigi.

KESIMPULAN

Hasil isolasi terdapat 9 isolat bakteri *Vibrio* spp. dari 9 sampel udang vanname (*Litopenaeus vannamei*) dari 3 kolam yang berbeda. Hasil karakteristik bakteri mendapatkan gramnegatif, morfologi koloni berwarna kuning dan hijau, bentuk sel bacil/batang, KOH 3% (-), katalase (+), oksidase (+), O/F (Fermentatif), indole (+), dan motility (+), glukosa (+) dari hasil teridentifikasi bakteri *Vibrio* spp.

DAFTAR PUSTAKA

- Cowan and Steel. 1974. Manual for the identification of medical bacteria. (2nd ed.). Cambridge University Press: London.
- Dwyana, Z. dan Gobel, R. B. 2011. "Mikrobiologi Umum". Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Hassanuddin. Makassar.
- Fardiaz S. 1993. Keamanan pangan jilid 1. Bogor: Institut Pertanian Bogor Fakultas Teknologi Pertanian Jurusan Ilmu dan teknologi Pangan.
- Feliatra, Zainuri, Yoswaty D. 2014. Pathogenitas bakteri *Vibrio* sp. terhadap udang windu (*Penaeus monodon*). Jurnal Sungkai 2(1): 23-36.
- Huang HX, Xiang LJ, Wang P. 2013. Immune response of *Litopenaeus vannamei* after infection with *Vibrio harveyi*. Aquaculture 406-407: 115-120.
- Ijong FG. 2015. Mikrobiologi perikanan dan kelautan. penerbit. Rineka Cipta. Jakarta.
- Jawetz M, Adelberg's. 2004. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi 23. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC.

- Jithendran KP, Poornima M, Balasubramanian CP, Kulasekarapandian S. 2010. Diseases of Mud Crabs (*Scylla* spp.): an overview. *Indian J. Fish* 57(3): 55-63.
- Kabata Z. 1985. Parasites and diseases of fish cultured in the tropics. Taylor and Francis, London and Philadelphia. 318 p.
- Kurniawan K, Tompo A, Kadriah KIA. 2014. Uji patogenitas dan gambaran histologi hepatopankreas infeksi vibrio patogen secara penyuntikan. Seminar Nasional Tahun XI Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan Universitas Gadjah Mada. Poster Penyakit Ikan dan Kesehatan Lingkungan. Hal 417–424.
- Purnamasari ID, Purnama, Maya AFU. 2017. Pertumbuhan udang vaname (*L. vannamei*) di tambak intensif. *Jurnal Enggano* 21:58-67.
- Sachlan M. 1982. Planktonologi. UNDIP: Semarang.
- Sunatmo TI. 2007. Eksperimen mikrobiologi dalam laboratorium. Penerbit ArdyAgency, Bogor.