

Isolasi dan karakterisasi *Vibrio* patogen pada ikan kerapu macan *Epinephelus fuscoguttatus*

Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio* on tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus*

Ilmiah*¹, Sukenda², Widanarni², Enang Harris²

¹ Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Muslim Indonesia Makassar
Jl. Kakatua No. 27 Makassar 90121

² Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Darmaga Bogor 16680
*email: ilmikuruseng@gmail.com

ABSTRACT

This study was aimed to obtain pathogenic bacterial isolate causing vibriosis disease. Isolation of *Vibrio* was conducted from maribound tiger grouper collected from floating net cage in Barru Regency using TCBS medium. Ability to cause vibriosis was confirmed by pathogenicity test performed by mean injecting the tiger grouper juveniles with bacterial suspension at concentration of 10^6 CFU/fish and mortality of fish during seven days observation then was noted. Then, the *Vibrio* pathogenic isolate was characterized and identified based on morphology, growth, and biochemical features. Moreover, the most pathogenic isolate was identified by molecular analysis of 16S-rRNA gene sequences. The results showed that three potential isolates caused Vibriosis disease in tiger grouper culture. The isolates tested were biochemically identified as *Vibrio metschnikovii*, *V. parahaemolyticus*, and *V. mimicus*. The most virulent among isolates was *V. parahaemolyticus*.

Keywords: isolation, characterization, pathogenic, vibriosis, tiger grouper

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi *Vibrio* patogen penyebab penyakit vibriosis pada ikan kerapu macan. Isolasi bakteri *Vibrio* dilakukan dari ikan kerapu sakit yang diperoleh dari keramba jaring apung di Kabupaten Barru menggunakan media *Thiosulphate Citrate Bile Salt* (TCBS). Kemampuan bakteri menyebabkan vibriosis dikonfirmasi dengan uji patogenisitas yang dilakukan dengan menyuntik juvenil kerapu macan dengan suspensi bakteri pada konsentrasi 10^6 CFU/ikan dan kemudian diamati kematiannya selama tujuh hari. Isolat *Vibrio* patogen kemudian dikarakterisasi dan diidentifikasi berdasarkan morfologi, pertumbuhan, dan sifat biokimianya. Isolat yang paling patogen diidentifikasi secara molekuler dengan analisis sekuens gen 16S-rRNA. Didapatkan tiga isolat yang berpotensi menyebabkan penyakit vibriosis pada budidaya ikan kerapu macan. Isolat tersebut berdasarkan uji secara biokimiawi diidentifikasi sebagai *Vibrio metschnikovii*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. mimicus*. Isolat paling virulen diantara ketiga isolat tersebut adalah *V. parahaemolyticus*.

Kata kunci: isolasi, karakterisasi, patogen, vibriosis, kerapu macan

PENDAHULUAN

Vibriosis merupakan penyakit bakterial yang disebabkan oleh infeksi patogen golongan *Vibrio* dan mengakibatkan kematian ikan mencapai lebih dari 80% pada budidaya ikan di jaring apung (Yuasa *et al.*, 2000). Ada beberapa istilah yang berbeda untuk mengacu pada penyakit vibriosis ini, antara lain *red pest*, *saltwater furunculosis*, *boil disease*, dan *ulcer disease* (Plumb,

1994). Penyakit vibriosis menyerang hampir semua jenis ikan laut yang dibudidayakan (Plumb, 1994), serangan pada ikan kerapu dilaporkan oleh Wijayati & Hamid (1997) dan melibatkan beberapa spesies bakteri seperti *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, dan *V. marinus*. Bakteri ini bersifat sangat ganas dan berbahaya baik pada budidaya ikan air laut maupun air payau karena dapat bertindak sebagai patogen primer dan sekunder

(Taufik, 2001).

Studi spesifik pada determinasi agen etiologi vibriosis berdasarkan patogenitasnya pada ikan kerapu macan masih sedikit dilakukan. Hal tersebut mungkin dikarenakan selama ini kasus vibriosis muncul dengan gejala yang sama, tersebar pada geografi yang luas, dan menyerang hampir semua jenis ikan laut (Plumb, 1994). Penelitian ini akan menginventarisasi bakteri penyebab vibriosis khususnya pada ikan kerapu macan, memilih satu isolat yang paling virulen dan mengidentifikasi spesiesnya.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri *Vibrio* patogen penyebab penyakit vibriosis pada ikan kerapu macan.

BAHAN DAN METODE

Isolasi bakteri *Vibrio* sp.

Proses isolasi dilakukan pada ikan kerapu macan yang sakit dari keramba jaring apung di Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan. Organ hati dan ginjal ikan kerapu macan diambil sebanyak 1 g dan digerus dalam larutan fisiologis (NaCl 0,85%) dan kemudian diencerkan secara berseri. Suspensi pada pengenceran 10^{-6} diambil sebanyak 0,1 mL kemudian disebar secara duplo pada media TCBS (*thiosulfate citrate bile-salt sucrose*) agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28 °C. Koloni tunggal yang berbeda morfologinya kemudian diidentifikasi secara morfologi berdasarkan bentuk dan warna koloni (Austin, 1993; Hadioetomo, 1993) selanjutnya diisolasi kembali untuk dimurnikan, dan secara rutin dipelihara pada media SWC (*sea water complete*) agar miring.

Seleksi bakteri *Vibrio* patogen

Untuk efisiensi, isolat diseleksi berdasarkan sifat patogennya dengan *Postulat Koch* sehingga hanya isolat yang benar-benar patogenik pada ikan kerapu yang akan diuji lebih lanjut. Isolat ditumbuhkan dengan menggunakan media SWC cair selama 12 jam pada inkubator bergoyang bersuhu 29 °C. Sebanyak 0,1 mL suspensi bakteri dalam PBS (*phosphate buffer saline*)

dengan kepadatan 10^6 cfu/mL disuntikkan secara intramuskular pada ikan kerapu sehat (Murdjani, 2002). Isolat dianggap patogenik bila ikan kerapu yang diinfeksi menunjukkan gejala vibriosis.

Uji pertumbuhan bakteri *Vibrio* patogen

Isolat yang terbukti patogenik terhadap ikan kerapu kemudian diuji pertumbuhannya untuk mengetahui fase eksponensial. Sebanyak 0,1 mL suspensi bakteri dikultur ke dalam 10 mL media SWC cair dan diinkubasi selama 24 jam pada inkubator bergoyang bersuhu 29 °C. Sediaan ini kemudian diambil 1 mL dan diinokulasikan ke dalam media SWC steril 100 mL untuk diinkubasi kembali pada suhu 29 °C. Pertumbuhan bakteri diamati setiap dua jam dengan mengkonversi nilai kerapatan atau *optical density* (OD) yang terukur dari alat spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm pada kurva standarnya (Hadioetomo, 1993).

Uji patogenitas bakteri *Vibrio* patogen

Untuk mendapatkan isolat yang paling virulen maka dilakukan uji patogenitas. Masing-masing isolat dikultur secara terpisah ke dalam media SWC cair dan selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang dalam inkubator bergoyang bersuhu 29 °C. Pemanenan dilakukan berdasarkan pada fase eksponensialnya dan bakteri yang didapatkan diresuspensikan ke dalam larutan PBS. Ikan kerapu macan berukuran 10 cm disuntik *Vibrio* secara intramuskular dengan kepadatan 10^6 CFU/ikan (Murdjani, 2002). Ikan yang telah disuntik kemudian dipelihara dalam akuarium yang berisi 50 liter air laut steril dengan kepadatan sepuluh ekor/akuarium. Pengamatan pada kelangsungan hidup ikan kerapu dilakukan selama tujuh hari. Semakin tinggi tingkat kematian ikan kerapu macan hasil infeksi, maka semakin tinggi virulensi isolat yang diuji.

Tingkat kelangsungan hidup ikan dihitung menggunakan rumus Effendie (1979):

$$SR = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

Keterangan:

SR : tingkat kelangsungan hidup ikan (%)

N_t : jumlah ikan yang hidup pada akhir

pengamatan (ekor)

No : jumlah ikan pada awal pengamatan (ekor).

Karakterisasi dan identifikasi bakteri *Vibrio* patogen

Karakterisasi dan identifikasi bakteri *Vibrio* dilakukan dengan kombinasi uji biokimia dan metode molekular. Uji biokimia dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Austin (1993). Data hasil uji biokimia yang diperoleh diolah dengan menggunakan perangkat lunak *Fortran Computer Program* (Muir, 1996). Satu isolat yang paling virulen dianalisis kekerabatan genetiknya secara molekular melalui pohon filogeni.

Karakterisasi molekular terdiri dari ekstraksi genom, amplifikasi gen 16S-rRNA, analisis sekuens dan pembuatan pohon filogeni. Ekstraksi genom isolat menggunakan metode fenol-kloroform yang telah dikembangkan oleh Parenrengi (2000). Amplifikasi gen 16S-rRNA dilakukan dengan metode PCR menggunakan Kit PCR *Ready To Go* (RTG) dengan pasangan primer 0008F dan 1492RH (Yuhana et al., 2008). Hasil PCR selanjutnya disekuensing gen 16S-rRNAnya dan dibandingkan dengan rRNA yang terdeposit di NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) dengan menggunakan uji BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Hasil perbandingan dipresentasikan dalam bentuk pohon filogeni menggunakan perangkat lunak GENETYX Ver 0.7 untuk mengetahui kekerabatan isolat bakteri koleksi dengan bakteri sejenis yang terdeposit pada NCBI.

HASIL

Hasil isolasi bakteri *Vibrio* sp.

Hasil isolasi bakteri *Vibrio* yang diperoleh

dari ikan kerapu macan yang sakit adalah tujuh isolat yang berbeda berdasarkan morfologi koloninya. Karakterisasi dilakukan berdasarkan warna dan morfologi koloni yang tumbuh pada media TCBS (Tabel 1).

Hasil seleksi bakteri *Vibrio* patogen

Hasil seleksi bakteri *Vibrio* patogen dengan *Postulat Koch* dengan menyuntikkan *Vibrio* patogen pada juvenil ikan kerapu macan sehat, diperoleh gejala klinis yang ditimbulkan oleh masing-masing isolat (Tabel 2).

Dari seleksi isolat berdasarkan kemampuannya menimbulkan gejala vibriosis pada juvenil ikan kerapu macan hanya mendapatkan tiga isolat yang bersifat patogen dari tujuh isolat yang diujikan. Gejala klinis yang ditimbulkan oleh masing-masing isolat patogen sangat mirip antara satu dengan lainnya. Berdasarkan pada pengamatan gejala klinis, ikan yang diinfeksi dengan *Vibrio* patogen V6 mati pada jam ke-48, menyusul yang diinfeksi dengan *Vibrio* patogen V1 dan V8 pada jam ke-72, sedangkan ikan yang diinfeksi dengan *Vibrio* patogen V4, V10, V11 dan V12 kembali normal setelah jam ke-24. Ketiga isolat *Vibrio* patogen yaitu V1, V6 dan V8 selanjutnya diuji pertumbuhannya untuk melihat fase eksponensialnya.

Pertumbuhan isolat bakteri *Vibrio* patogen

Kurva pertumbuhan selama 24 jam periode pengamatan memperlihatkan pola pertumbuhan yang hampir sama diantara isolat (Gambar 1). Fase eksponensial terjadi antara jam kedua hingga jam kesepuluh untuk ketiga isolat pada media SWC cair, dan selanjutnya mengalami penurunan secara gradual hingga pada jam ke-24.

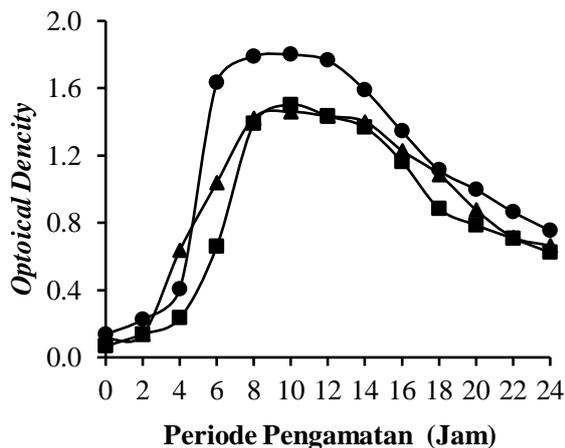
Bakteri *Vibrio* patogen isolat V1 memulai

Tabel 1. Karakteristik isolat *Vibrio* berdasarkan morfologi dan warna koloni

No.	Kode isolat	Organ asal	Morfologi pada media TCBSA	
			Bentuk koloni	Warna Koloni
1	V1	Hati	Bundar agak rata	Kuning
2	V4	Ginjal	Bundar agak rata	Kuning
3	V6	Hati	Bundar, cembung	Hijau
4	V8	Ginjal	Bundar, rata	Kuning
5	V10	Hati	Bundar, cembung	Hijau
6	V11	Ginjal	Bundar, cembung	Hijau
7	V12	Ginjal	Bundar, rata	Kuning

Tabel 2. Gejala klinis pada ikan yang telah diinfeksi *Vibrio*

No.	Kode isolat	Jam setelah infeksi	Perubahan perilaku	Patologi anatomi
1	V1	6	Ikan bergerak lamban, berenang berputar-putar dipermukaan.	Terjadi peradangan pada bekas injeksi, timbul bercak merah pada pangkal sirip Peradangan berubah jadi ulser
		24	Ikan sudah kehilangan nafsu makan	
		72	Ikan semakin lemah akhirnya mati	
2	V4	6	Ikan berenang teratur di dasar dan kolom air	Normal
		24	Ikan sudah kembali normal, dan aktif makan	
3	V6	6	Ikan berenang dipermukaan berputar-putar	Terjadi peradangan pada bekas injeksi, timbul bercak merah pada pangkal sirip
		24	Ikan semakin lemah, warna tubuh berubah menjadi kegelapan	
		48	Ikan kehilangan nafsu makan, semakin lemah dan akhirnya mati	
4	V8	6	Ikan bergerak lamban, berenang berputar-putar di permukaan	Terjadi peradangan pada bekas injeksi, timbul bercak merah pada pangkal sirip Peradangan berubah jadi ulser
		24	Ikan kehilangan nafsu makan	
		72	Ikan makin lemah, dan akhirnya mati	
5	V10	6	Ikan berenang teratur didasar dan kolom air	Normal
		24	Ikan kembali normal mulai aktif makan	
6	V11	6	Ikan berenang teratur, di dasar dan kolom air	Normal
		24	Ikan kembali normal dan mulai aktif makan	
7	V12	6	Ikan berenang teratur didasar dan kolom air	Normal
		24	Ikan kembali normal dan mulai aktif makan	



Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri *Vibrio* dengan kode isolat: V1 (—●—), V6 (—■—), dan V8 (—▲—).

fase logaritmanya pada jam keempat hingga jam kedelapan, sedangkan isolat V6 dimulai pada jam keempat hingga jam kesepuluh, sedangkan isolat V8 dari jam kedua hingga jam kedelapan. Fase eksponensial dicirikan dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Waktu pencapaian dari fase ini selanjutnya digunakan sebagai dasar

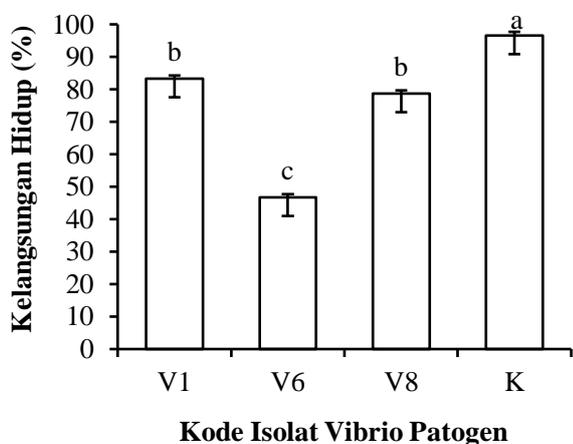
pemanenan bakteri pada uji-uji selanjutnya.

Fase stasioner bakteri *Vibrio* isolat V1 dan V8 dimulai pada jam kedelapan hingga jam kesepuluh, sedangkan isolat V6 dari jam kesepuluh hingga jam ke-12. Selanjutnya ketiga isolat bakteri *Vibrio* memasuki fase penurunan (kematian).

Hasil uji patogenisitas

Kelangsungan hidup ikan kerapu macan pada uji patogenisitas isolat bakteri disajikan pada Gambar 2. Semua isolat bakteri yang diinfeksi pada ikan kerapu macan menghasilkan tingkat kelangsungan hidup yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kontrol. Bakteri *Vibrio* yang diinfeksi pada juvenil ikan kerapu macan bersifat patogen, hal ini dapat dilihat dari tingkat kelangsungan hidup ikan kerapu pada semua perlakuan berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kontrol. Kelangsungan hidup ikan kerapu yang diinfeksi dengan isolat V6 sebesar $46,7\% \pm 5,77\%$, isolat V8 sebesar $78,7\% \pm 5,77\%$, isolat V1 sebesar $83,3\% \pm 5,77\%$ sedangkan

untuk kontrol tingkat kelangsungan hidupnya 96,7%±5,77%. Kondisi ikan yang telah diinjeksi dengan bakteri *Vibrio* patogen memperlihatkan warna kemerahan pada luka bekas injeksi (enam jam pascainfeksi) kemudian terjadi luka dan pembengkakan (12 jam pascainfeksi), dan kemudian kondisi luka berubah jadi ulser (24 jam pascainfeksi).



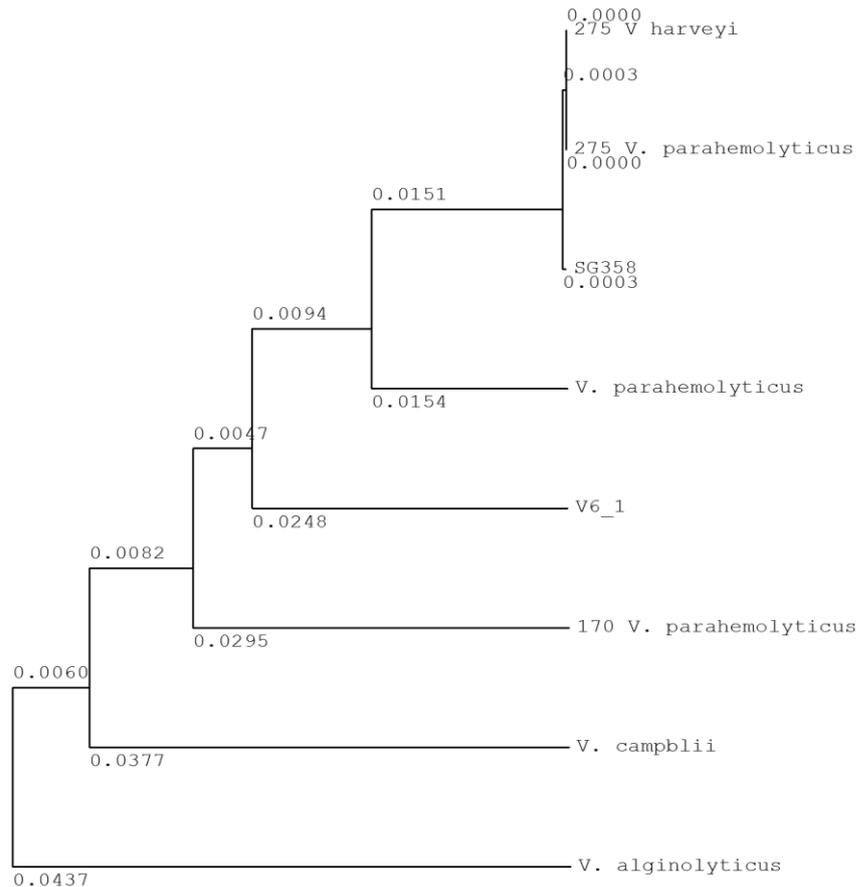
Gambar 2. Kelangsungan hidup pada uji patogenisitas bakteri *Vibrio*.

Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri *Vibrio* Patogen

Dari hasil uji biokimia, diperoleh bahwa isolat V1 diidentifikasi sebagai *V. metschnikovii*, dengan ciri: mampu memanfaatkan sukrosa sehingga koloninya berwarna kuning pada media TCBS, bereaksi negatif terhadap arginin dehidrolase, L-arabinosa dan sellubiosa (Tabel 3). Bakteri V6 diidentifikasi sebagai *V. parahaemolyticus* yang dicirikan, tidak dapat memanfaatkan sukrosa, sellubiosa dan arginin dehidrolase, koloninya berwarna hijau pada media TCBS. Bakteri isolat V8 diidentifikasi sebagai *V. mimicus* yang dicirikan dapat memproduksi enzim amylase, tidak dapat menghasilkan asam propionat dan sellubiosa dan berwarna kuning pada media TCBS. Sedangkan beberapa isolat *V. mimicus* dapat memproduksi enzim *amylase* namun sebagian lagi tidak, tidak dapat menghasilkan asam propionat dan sellubiosa. Identifikasi bakteri *Vibrio* V6 juga dilakukan dengan mengamati karakteristik gen 16S-rRNA bakteri hasil PCR dengan metode

Tabel 3. Hasil uji biokimia bakteri *Vibrio*

Uji biokimia	Isolat uji		
	V1	V6	V8
Swarming	-	-	-
Luminescence	-	-	-
VP Test	+	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Gas form glucose	-	-	-
Growth at 40 °C	+	+	+
Lysine decarb	+	+	+
Pigmentation	-	-	-
Amylase	+	+	+
Sucrose	+	-	-
Indole	-	+	-
Ornithine decarb	-	+	-
Putrescine	-	+	-
Ethanol	-	+	-
Serine	+	+	-
Heptanoate	-	+	-
Xanthine	-	-	-
Aminobutyrate	-	-	-
Arabinose	-	+	-
Cellubiose	-	+	-
Glucuronate	-	+	+
Ketoglutarate	-	+	-
L-alanine	+	+	-
Leucine	+	+	+
Propionate	+	+	-
Spesies	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. mimicus</i>



Gambar 3. Pohon filogeni bakteri *Vibrio*. Keterangan: V6-1: hasil sekuensing penelitian

sekuensing. Hasil sekuensing kemudian disejajarkan (*alignment*) dengan data yang ada di Gene Bank menggunakan program BLAST (NCBI) Hasil *alignment* isolat terpilih digunakan untuk membuat pohon filogeni dari isolat bakteri *Vibrio* menggunakan perangkat lunak GENETYX. Hasil uji BLAST yang dilanjutkan dengan pembuatan pohon filogeni (Gambar 3) menunjukkan isolat V6 memiliki kedekatan secara genetik dengan bakteri *V. parahaemolyticus* (No. akses Bank Gen EF467290).

PEMBAHASAN

Istilah vibriosis pada ikan budidaya biasanya diasosiasikan pada infeksi yang disebabkan oleh *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, dan beberapa jenis *Vibrio* lainnya (Plumb, 1994). Ditemukannya isolat bakteri *Vibrio* yang berbeda-beda pada kasus vibriosis juga dilaporkan oleh Wijayati & Hamid (1997), Taufik (2001), dan Sarjito et al. (2009). Pada isolasi awal yang dilakukan, diperoleh tujuh

isolat *Vibrio* yang berbeda morfologinya (Tabel 1). Isolat V1 diisolasi dari organ hati dengan bentuk koloni bundar agak rata dan berwarna kuning pada media TCBS. Isolat V6 diisolasi dari ginjal dengan bentuk koloni bundar agak rata dan berwarna hijau pada media TCBS sedangkan isolat V8 berasal dari ginjal dengan bentuk koloni bundar rata dan berwarna kuning pada media TCBS. Diduga tidak semua bakteri *Vibrio* tersebut merupakan patogen primer, hal tersebut mengingat bahwa bakteri *Vibrio* adalah mikroflora normal pada lingkungan akuatik dan pada kondisi tertentu saja dapat berubah statusnya menjadi patogen (Smith, 1988).

Beberapa studi patogenisitas membuktikan hanya beberapa spesies seperti *V. anguillarum*, *V. ordalii*, dan *V. salmonicida* yang bertindak sebagai patogen primer pada ikan laut yaitu isolat yang virulensinya tinggi dapat mengakibatkan vibriosis meskipun tanpa adanya faktor stres eksternal pada ikan (Smith, 1988; Plumb, 1994). Gejala klinis setelah dilakukan infeksi *Vibrio* oleh masing-masing isolat mirip satu dengan lainnya (Tabel 2), hampir sama

dengan gejala ikan yang diinfeksi dengan *V. alginolyticus* yaitu ikan terlihat kemerahan, terjadi peradangan, nekrosis, dan ulser. Selain itu ikan yang telah diinfeksi memperlihatkan perilaku berenang berputar-putar atau cenderung diam tidak mau makan dan produksi lendir meningkat (Murdjani, 2002).

Wang & Leung (2000) mengatakan vibriosis menyebabkan gejala septisemia dengan luka menyebar pada kulit, terjadi nekrosis pada hati, ginjal, dan jaringan yang lain. *V. alginolyticus* menyerang ikan dan organisme lainnya dimulai dari bagian lendir (mukus) yang diproduksi oleh tubuh, sebab lendir merupakan lapisan pertama pertahanan ikan. Selanjutnya Irianto (2005) menyatakan bahwa tanda-tanda klinis infeksi *Vibrio* adalah terjadi septisemia, hemoragik pada kulit, insang dan ekor, borok pada kulit, hemoragik pada jaringan otot, dan permukaan serosal. Limpa ikan yang terinfeksi akan mengalami pembengkakan dan berwarna merah cerah, secara histologis hati, ginjal, limpa, dan mukosa usus mengalami nekrosis.

Dalam seleksi awal pada sifat patogen, hanya tiga dari tujuh isolat yang diuji mampu memicu gejala vibriosis pada ikan kerapu macan. Kemampuan menimbulkan vibriosis oleh isolat yang diuji diduga terkait pada kecepatan bakteri mengakses organ atau jaringan target dan menghasilkan faktor virulensi (Kamiso, 1996). Isolat V1, V6, dan V8 adalah isolat yang berasal dari organ internal ikan kerapu yang sakit dan diduga mengakses organ tersebut melalui infeksi septisemia. Gejala klinis yang tercatat selama infeksi buatan meliputi *whirling*, kulit yang menjadi lebih gelap, hemoragik, dan pembentukan ulser. Gejala vibriosis pada ikan mirip sekali dengan gejala furunculosis yaitu terjadi infeksi septisemia yang disertai dengan gejala hemoragik dan ulser (Plumb, 1994).

Pada uji pertumbuhan bakteri, waktu pencapaian dari fase eksponensial ini digunakan sebagai dasar pemanenan bakteri (Gambar 1). Pertumbuhan bakteri pada fase logaritmik (eksponensial) dipengaruhi oleh sifat genetik yang diwariskan, kandungan nutrisi dalam media, suhu inkubasi, dan

kondisi pH. Jika pertumbuhan bakteri telah menghasilkan populasi yang maksimum, maka akan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang hidup dan yang mati (Volk & Wheeler, 1993).

Fase stasioner terjadi saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya sehingga jumlah keseluruhan bakteri akan tetap, keseimbangan jumlah bakteri terjadi karena adanya pengurangan pembelahan sel yang disebabkan oleh berkurangnya kadar nutrisi dalam media dan terjadinya akumulasi produk toksik. Fase stasioner ini dilanjutkan dengan fase kematian yang ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan, sehingga secara keseluruhan menyebabkan terjadinya penurunan populasi bakteri (Pelczar & Chang, 1988).

Hasil pengamatan gejala klinis yang ditimbulkan oleh masing-masing isolat, tidak terlihat adanya perbedaan yang jelas, begitu pula pada pola pertumbuhannya dalam media SWC cair, namun ada perbedaan pada virulensi isolat. Isolat V6 mampu mengakibatkan kematian yang lebih tinggi pada ikan kerapu macan dibandingkan isolat V1 dan V8 (Gambar 2). Sementara itu berdasarkan identifikasi biokimia diketahui bahwa spesies dari isolat-isolat tersebut adalah *V. metschnikovii* (isolat V1), *V. parahaemolyticus* (isolat V6), dan *V. mimicus* (isolat V8). Dari temuan tersebut, diduga bahwa isolat V6 yaitu *V. parahaemolyticus* adalah isolat yang paling virulen yang berhasil diisolasi pada penelitian ini. Analisis kekerabatan dengan pohon filogeni juga menunjukkan bahwa isolat V6 memiliki kedekatan genetik dengan *V. parahaemolyticus* (No. akses Bank Gen EF467290).

Efek kematian ikan kerapu yang ditandai dengan ulser, berenang berputar-putar, perut kembung disebabkan karena bakteri menghasilkan toksin. Simidu *et al.* (1987), menyatakan beberapa spesies bakteri *Vibrio* memproduksi toksin berupa anhidrotetrodotoksin. Meskipun toksin anhidrotetrodotoksin ini kurang toksik dibandingkan dengan tetradotoksin tetapi pada kondisi pH yang rendah sangat mudah terkonversi menjadi neurotoksin. Kondisi ikan

yang terinfeksi dengan bakteri ini, sering terlihat berenang berputar-putar, menjadi indikasi adanya gangguan keseimbangan yang diatur oleh syaraf pusat.

Pada uji patogenisitas, isolat V6 mempunyai kelangsungan hidup paling rendah yaitu 46,7%. Tingkat patogenisitas bakteri terhadap inang berbeda-beda tergantung pada faktor pertahanan inang dalam melawan patogen maupun faktor patogenisitas yang ada pada patogen itu sendiri seperti kemampuan memproduksi toksin, enzim, dan kecepatan berkembang biak (Kamis, 1996). Murdjani (2002) melaporkan bahwa infeksi *V. alginolyticus* pada ikan kerapu tikus (ukuran 4–5 cm) menyebabkan kematian pada ikan uji dengan LD50 sebesar $4,5 \times 10^6$ CFU/ikan melalui penyuntikan intramuscular (IM), intraperitoneal (IP), dan intravena (IV).

Terjadinya penyakit sangat berkaitan dengan faktor-faktor patogenisitas bakteri, kemampuan menginvasi jaringan, berkolonisasi dan kecepatan perkembangbiakan patogen, maupun faktor pertahanan inang dalam melawan patogen (Todar, 2002). Aktivitas haemolisis maupun leukosidin yang dihasilkan oleh ekstraseluler produk (ECPs) menjadikan faktor pertahanan bakteri untuk melawan pertahanan inang dengan melisis sel darah. Bakteri yang mampu bertahan, akan masuk ke dalam aliran darah sehingga menyebar ke seluruh sel tubuh inang maupun menuju organ target (Sudheesh & Xu, 2001). Bakteri memiliki faktor patogenisitas berupa enzim yang terdapat pada ECP, diantaranya kaseinase, gelatinase, amilase, protease, lipase, kitinase, kolagenase, hialuronidase, dan hemolisin, sehingga bakteri dengan mudah menerobos sel inang (Zhang & Austin, 2000; Austin & Austin, 2007).

Bakteri *Vibrio* dapat bersifat patogen apabila telah tercapai jumlah (*quorum*) yang dibutuhkan untuk mengekspresikan faktor-faktor virulensinya yang kemudian dapat membunuh ikan apabila melakukan komunikasi. *Quorum sensing* merupakan mekanisme bakteri mengkoordinasikan ekspresi gen tertentu dalam menanggapi kepadatan populasi mereka dengan memproduksi, melepaskan, dan mendeteksi

molekul sinyal yang digunakan untuk komunikasi intra spesies dan inter spesies (Defoirdt *et al.*, 2004).

Proses infeksi bakteri *Vibrio* diawali oleh proses interaksi dengan pelekatan atau adesi pada permukaan sel inang, yang diikuti dengan masuknya bakteri ke dalam sel, kemudian dilanjutkan dengan tahap invasi dan penyebaran lokal atau sistemik dalam tubuh inang. Tahap terakhir adalah pengeluaran dari tubuh inang, mulai dari tahap pelekatan hingga tahap perusakan inang, mikroorganisme menggunakan faktor virulensi antara lain oleh pili yang mengakibatkan mikroorganisme dapat bertahan dalam tubuh inang dan menimbulkan kerusakan (Yanuar *et al.*, 2004). Internalisasi dan sitotoksitas merupakan mekanisme virulensi dalam interaksi antara sel epitel ikan dengan bakteri *Vibrio*, pelekatan merupakan kejadian awal untuk internalisasi kemudian terjadi invasi ke dalam sel inang (Wang & Leung, 2000).

Bakteri *Vibrio* khususnya *V. parahaemolyticus* mempunyai gen spesifik yaitu *toxR*. Gen *toxR* ini akan mengaktifkan gen-gen lainnya untuk memproduksi toksin berupa hemolisin seperti *thermostable direct hemolysin (tdh)* dan *thermostable related hemolysin (trh)*. Patogenisitas *V. parahaemolyticus* berhubungan dengan produksi gen *tdh* dan gen *trh* ini yang memberikan respons terhadap β -hemolisin (Osawa & Yamai, 1996). Berdasarkan kemampuannya menghasilkan hemolisin bakteri *V. parahaemolyticus* dikelompokkan menjadi *V. parahaemolyticus* Kanagawa Phenomena (KP) positif yaitu jenis *V. parahaemolyticus* yang dapat memproduksi hemolisin (beta-haemolysis) dan kelompok KP negatif yang tidak dapat memproduksi hemolisin (Honda *et al.*, 1988).

Pada seleksi dan identifikasi bakteri *Vibrio* yang dilakukan oleh Sarjito *et al.* (2009) di perairan Karimunjawa, bakteri *V. parahaemolyticus* juga berhasil teridentifikasi bersama bakteri *Vibrio* lainnya. Pada penelitian tersebut walaupun tidak dinyatakan sebagai isolat yang paling virulen, namun dibuktikan bahwa bersama *Vibrio* lainnya, *V. parahaemolyticus* mampu memicu gejala vibriosis pada ikan kerapu

macam.

KESIMPULAN

Didapatkan tiga isolat yang berpotensi menyebabkan penyakit vibriosis pada budidaya ikan kerapu macam. Isolat tersebut melalui uji secara biokimiawi diidentifikasi sebagai *V. metschnikovii*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. mimicus*. Satu isolat yaitu V6 yang paling virulen di antara ketiga isolat tersebut telah diidentifikasi secara molekular sebagai *V. parahaemolyticus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Austin B. 1993. *Methods in Aquatic Bacteriology*. New York, USA: John Wiley and Sons Chichester.
- Austin B, Austin DA. 2007. *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*, 4th edition. New York, USA: Praxis Publishing Ltd.
- Defoirdt T, Boon N, Bossier P, Verstraete W. 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* 240: 69–88.
- Effendi IM. 1979. *Metode Biologi Perikanan*. Bogor: Yayasan Dewi Sri.
- Hadioetomo RS. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur dalam Laboratorium*. Jakarta: PT Gramedia.
- Honda T, Ni Y, Miwatari T. 1988. Purification and characterization of clinical isolate direct hemolysin. *Infect. Immun.* 56: 961–965.
- Irianto A. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Kamiso HN. 1996. Vibriosis pada ikan dan alternatif penanggulangannya. *J. Perikanan UGM*. 1: 78–86.
- Muir P. 1996. *Media Used in Vibrio and Photobacterium Identification*. Queensland, Australia: Departement of Microbiology, Biomedical and Veterinary Science James Cook Univerty of North Queensland Australia.
- Murdjani M. 2002. Identifikasi dan patologi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) [Disertasi]. Malang: Universitas Brawijaya.
- Osawa R, Yamai S. 1996. Production of thermostable direct hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus* enhanced by conjugate bile acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3023–3025.
- Parenrengi A. 2000. *Studies on genetic variability of grouper (Genus: Epinephelus) from Indo-Malaysian waters using PCR-RAPD analysis* [Tesis]. Trengganu: Kolej University Trengganu, University Putra Malaysia.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid I*. Jakarta: UI Press.
- Plumb JA. 1994. *Health Maintenance of Culture Fishes. Principal microbial diseases, Part Three: Microbial diseases*. USA: CRC Press.
- Sarjito, Radjasa OK, Sabdono A, Prayitno SB, Hutabarat S. 2009. Phylogenetic diversity of causative agents of vibriosis associated with grouper fish from Karimunjawa islands, Indonesia. *J. Current Research in Bacteriolog.* 2: 14–21.
- Simidu V, Naguchi T, Hwang D, Shida Y, Hashimoto. 1987. Marine bacteria which produce tetratoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1714–1715.
- Smith PD. 1988. Vaccination against vibriosis. *In: Ellis (ed). Fish vaccination*. London, UK: Academic Press.
- Sudheesh PS, Xu H-S. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture* 196: 37–46.
- Taufik P. 2001. *Bakteri Patogen Pada Ikan Kerapu Epinephelus sp. dan Bandeng Chanos chanos*. Prosiding Teknologi Budidaya Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia. Departemen Kelautan dan Perikanan bekerjasama dengan JICA (Asian) Japanese. pp 259–262.
- Todar KU. 2002. *Mechanism of Bacterial Pathogenicity*. www.textbookofbacteriology.net. [12 Mei 2012].
- Wijayati A, Hamid N. 1997. Identifikasi bakteri pada pembenihan ikan kerapu

- tikus (*Cromileptes altivelis*). Pertemuan Koordinasi dan Pemantapan Rekayasa Teknologi Pembenihan Lintas UPT Direktorat Jenderal Perikanan. BBAP Jepara. Ditjen Perikanan.
- Volk WA, Wheller MF. 1993. Mikrobiologi Dasar Jilid I. Jakarta: Erlangga.
- Wang XH, Leung KY. 2000. Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* sp. to fish epithel cel. *Microbiology* 146: 989–998.
- Yanuhar U, Maftuch, Satuman, Sukoso, Sumarno. 2004. Karakterisasi molekuler adhesi protein pili *Vibrio alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus* pada sel epitel ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Prosiding Pengendalian Penyakit pada Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity dalam Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV Purwokerto 18–19 Mei 2004. Universitas Soedirman, bekerja sama dengan Departemen Kelautan dan Perikanan serta Indonesia Network on Fish Health Management. pp 25–32
- Yuasa K, Rosa D, Koesharyani I, Johnny F, Mahardika K. 2000. General remarks on fish disease diagnosis. Training Course on Fish Disease diagnosis. Lolitkanta–JICA. Booklet 12: 5–18.
- Yuhana M, Widanarni, Sukenda. 2008. Pengembangan penanda molekuler untuk diagnostik cepat penyakit *Vibrio* berpendar pada budidaya udang *Litopenaeus vannamei*. Tahun pertama: pengumpulan isolat, desain primer, karakterisasi gen penyandi 16S-rRNA dan analisis phylogenetik *Vibrio* spp. [Laporan Penelitian Hibah Bersaing LPPM IPB]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Zhang XH, Austin B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonella. *J. Fish Dis.* 23: 93–102.