

2 Juli 2010

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI *Vibrio alginolyticus*
PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*)
SEBAGAI FAKTOR VIRULENSI BAKTERI PATOGEN**Absalom Luturmas¹, Agapery Y. Pattinasarany²^{1,2} Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Pattimura**ABSTRAK**

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakter virulensi bakteri *Vibrio alginolyticus* penyebab penyakit pada ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) sehingga kemungkinan dapat dicari solusi pengendaliannya. Berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi, diperoleh karakter bakteri yang selanjutnya di sesuaikan dengan buku pedoman identifikasi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et.al* 1994), maka bakteri tersebut adalah *Vibrio alginolyticus*.

Hasil isolasi pilinya menggunakan alat potong pili dalam beberapa tahap. Tiap tahap pemotongan pili akan dimonitoring bobot molekul pili dengan metode SDS-Page. Hasil yang diperoleh adalah bobot molekul protein pili penentu virulensi *V.alginolyticus* pada ikan kerapu tikus adalah 38,51 kDa.

Kata kunci: karakterisasi, pili, virulensi, *V. alginolyticus*, *C. altivelis*

PENDAHULUAN

Timbulnya penyakit pada ikan disebabkan adanya interaksi antara inang (*host*), jasad penyebab penyakit (*patogen*) dan lingkungan (*envirotment*). Dalam interaksi ini faktor lingkungan berperan penting karena dapat menimbulkan pengaruh positif dan negatif terhadap hubungan antara inang dan patogen (Kabata, 1985). Jenis-jenis patogen yang sering menyebabkan penyakit pada ikan budidaya adalah bakteri, jamur, parasit dan virus.

Khususnya serangan penyakit bakterial yang sering menyerang ikan baik di tingkat pembenihan maupun pembesaran yang paling serius dan sering menyebabkan kematian pada ikan baik secara parsial ataupun massal adalah serangan bakteri *Vibrio alginolyticus*. dan sampai sekarang belum ditemukan solusi untuk mengatasi persoalan ini dengan baik.

Vibrio diketahui terdistribusi sangat luas di lingkungan, mulai dari manusia, mamalia lainnya, sampai-sampai dijumpai pada sebagian besar vertebrata, termasuk disini menyerang

2 Juli 2010

berbagai organ ikan air tawar maupun ikan air laut. Habitatnya yang paling banyak pada ikan terdapat pada saluran pencernaan, kulit dan insang. Kemampuannya untuk berkolonisasi pada lingkungan yang bervariasi tergantung pada ketersediaan makanannya.

Bakteri *Vibrio alginolyticus* merupakan gram negatif yang dapat menggunakan sejumlah komponen seperti satu-satunya sumber karbon dan energi tanpa membutuhkan vitamin atau *growth factor*. Banyak juga yang hidup pada kisaran suhu 4 – 42 °C dan dapat menetap selama berminggu-minggu di dalam lingkungan basah dengan sedikit atau tanpa makanan. Karakteristik ini menjelaskan mengapa *vibrio* adalah sebuah pathogen opportunistic yang efektif (Brogden, *at al*, 2000). Bakteri gram negatif memproduksi sejumlah toksin-toksin dan faktor-faktor virulensi ekstracelluler yang membuatnya menjadi sebuah patogen yang berat ketika sistem imune dirusak (Kaufman *et al*, 2002).

METODE PENELITIAN

Isolasi bakteri pada medium TCBSA dilakukan dari kerapu tikus yang diduga sakit akibat serangan bakteri, yaitu dari bagian hati dan ginjal. Inkubasi selama 24 jam dilakukan pada suhu 30°C. Tahap berikutnya adalah melakukan karakterisasi morfologi koloni bakteri dan uji biokimia. Berdasarkan karakteristik tersebut, maka dilakukan identifikasi untuk menentukan spesiesnya. Dalam identifikasi kali ini mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al, 1994) serta *Manual for the Identification of Medical Bacteria* (Cowan 1981). Selanjutnya, dilakukan isolasi pili dengan metode Ehara (1997) menggunakan *Omnimixer* dan *cold sentrifuge* pada suhu 4°C. Karakterisasi berat molekul protein *pili* dilakukan dengan menggunakan metode SDS-Page.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Karakterisasi Bakteri *Vibrio Alginolyticus*

Karakteristik yang dilakukan terhadap isolat ini menunjukkan bahwa spesies tersebut didasarkan pada pedoman identifikasi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al, 1994) adalah *V. alginolyticus*. Spesies ini bersifat fermentatif, mampu menghasilkan enzim oksidase dan katalase, sistem respirasinya secara anaerob, indol terdapat cincin merah pada batasan reagen ini menunjukkan bahwa bakteri ini bersifat positif, hasil pengujian gula dapat dilihat bahwa bakteri ini mampu memfermentasikan sebagian media gula diantaranya (glukosa,

2 Juli 2010

sukrosa dan manitol) sedangkan pada pengujian MR hasilnya positif dan VP hasil yang terlihat bersifat negatif (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik morfologi dan biokimia *Vibrio Alginolyticus* hasil isolasi dari ikan kerapu macan (*Cromileptes altivelis*).

Parameter	Hati*	Ginjal*
Warna koloni	H	H
Bentuk koloni	swarm	swarm
Tepian koloni	licin	licin
Elevasi koloni	cembung	cembung
O-F	F	F
Citrat	+	+
TSIA	A	A
Indol	+	-
MR	+	-
VP	-	-
Manitol	+	+
Glukosa	+	+
Sukrosa	+	+
Arabinosa	+	+
Mio Inositol	+	+
Oksidase	+	+

* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*

H : hijau ; ; A : asam ; + : positif ; - : negatif ; F : fermentative

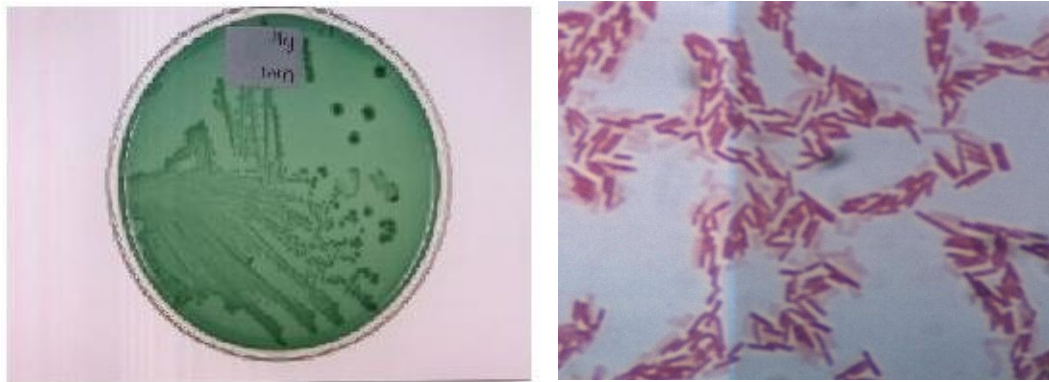
2. Pengecatan Gram *Vibrio alginolyticus*

Hasil pengamatan *Vibrio alginolyticus* dengan pengecatan Gram, berbentuk batang, gram negatif, seperti terlihat Gambar 1.

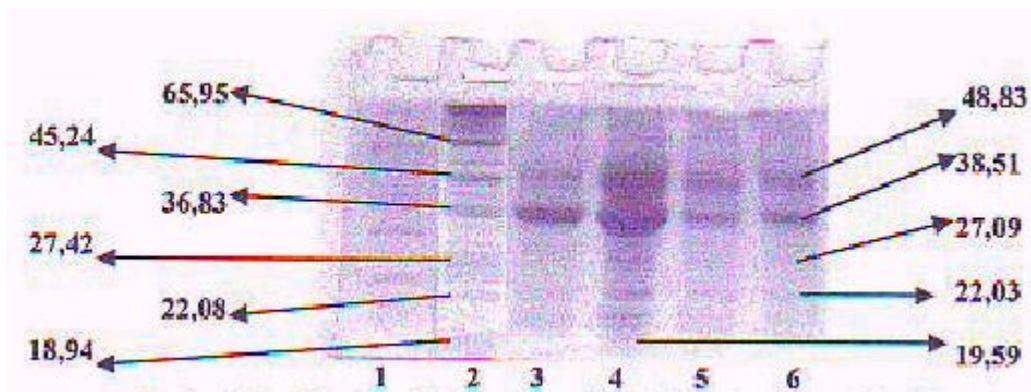
3. Pengamatan Berat molekul *Whole cell* dan *pili* *Vibrio alginolyticus*

Hasil monitoring bobot molekul pili *Vibrio alginolyticus* dengan eksperimen menggunakan SDS-Page, seperti terlihat pada Gambar 2. Dari bobot molekul *V.alginolyticus* yang muncul, tampak bahwa bobot molekul *Whole cell* (lajur 2) yang paling dominan adalah 65,95 kDa; 45,24 kDa; 36,83 kDa. Bobot molekul *pili* hasil pemotongan pertama sampai ke empat (lajur 3-6) yang paling dominan adalah 48,83 kDa dan 38,51 kDa.

2 Juli 2010



Gambar 1. Gambaran Koloni dan Morfologi *Vibrio alginolyticus* yang ditanam pada media padat dengan pengecatan Gram menunjukkan bentuk batang.



Gambar 2. Profil protein *Whole cell* dan pili *V. alginolyticus* dengan SDS-Page

Keterangan:

- Lajur 1.** Protein perunut Low marker
- Lajur 2.** Berat molekul *Whole cell V.alginolyticus* dengan bobot molekul protein 65,95 kDa; 45,24 kDa; 36,83 kDa, 27,42 kDa; 22,08 kDa; dan 18,94 kDa.
- Lajur 3.** Potongan Pili ke satu;
- Lajur 4.** Potongan Pili kedua;
- Lajur 5.** Potongan Pili ke tiga;
- Lajur 6.** Potongan Pili ke empat *V.alginolyticus* dengan bobot molekul protein 48,83 kDa; 38,51 kDa; 27,09 kDa, 22,03 kDa; dan 19,59 kDa.

Pemurnian molekul protein *Whole cell* dan *pili* kedua bakteri vibrio tersebut dilakukan dengan pemisahan berat molekulnya menggunakan SDS-Page. Pemurnian ini dimaksudkan untuk

2 Juli 2010

mengetahui profile karakter protein yang paling dominan dan virulen terhadap inangnya ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*).

Penentuan terhadap virulensi karakter protein-protein tersebut dilakukan dengan pedekatan uji molekul adhesi Haemaglutinin, karena mekanisme perlekatan vibrio ke inangnya dengan menggunakan molekul adhesi tersebut (Ehara, 1989). Protein paling virulen akan ditunjukkan dengan titer yang tertinggi.

Berdasarkan hasil uji molekul adhesi haemaglutinin, maka profile karakter protein yang paling virulen dari pili *Vibrio alginolyticus* adalah berat molekul 38,51 kDa. Infeksi bakteri pada inang melalui beberapa tahapan, yaitu mulai dari perlekatan/adhesi (*attachment*) pada permukaan sel inang, kemudian berkolonisasi yang dapat diikuti dengan tahap invasi. Pasca invasi diikuti penyebaran lokal atau sistemik dalam tubuh inang dan selanjutnya melakukan multiplikasi. Multiplikasi ini terus berlanjut apabila bakteri tersebut mampu mengelak dari system pertahanan tubuh inang, dan akhirnya tahap ini diikuti dengan kerusakan inang (Emancipator, .S, 1996).

Diawali dari tahap perlekatan hingga tahap perusakan inang, bakteri menggunakan faktor virulensi sehingga bakteri dapat bertahan dalam tubuh inang dan menimbulkan kerusakan.. Dari pandangan ini faktor virulensi dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu yang berkaitan dengan kolonisasi dan invasi inang dan yang mengakibatkan kerusakan inang (Riani, dkk. 2004).

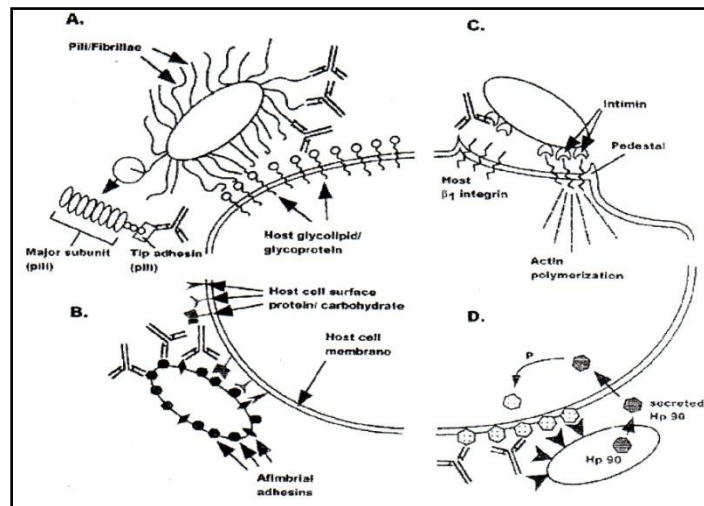
Mekanisme perlekatan yang akhr-akhir ini banyak dipelajari adalah mekanisme perlekatan spesifik. Perlekatan oleh struktur protein berbentuk batang yang disebut pili atau fimbria adalah merupakan perlekatan spesifik. Pilus adalah komponen bakteri yang mempunyai struktur berbentuk batang, terutama tersusun atas protein pilin berbentuk heliks untuk membentuk struktur silinder (Schuch dan Muray, 2000)

Bagian pili yang terletak diujung telah diketahui berfungsi untuk memperantai perlekatan bakteri. Perlekatan ini diperantarai oleh kesesuaian pili dan reseptor sel inang yang tersusun atas residu karbohidrat glikoprotein atau glikolipid, sehingga perlekatan ini sangat spesifik. Pada beberapa kejadian, pengikatan spesifik antara ujung pilin dan karbohidrat sel inang diperantarai oleh pilin sendiri, atau oleh struktur protein khusus yang berbeda dari pilin yaitu adhesin. Adesin lain yang memperkuat ikatan pili dan reseptor adalah adhesin afimbria (Schuch dan Muray, 2000).

Pili menurut Schuch dan Muray, (2000) dibedakan menjadi empat tipe pili, yaitu: pili tipe I sampai dengan IV. Pili tipe I merupakan sensitif manosa, yang berarti aglutinasi dengan

2 Juli 2010

eritrosit dihalangi dengan penambahan manosa. Pili tipe II adalah resisten terhadap manosa. Pili tipe III adalah berasal dari struktur tebal bakteri tanah termasuk *Agrobacterium* Pili tipe IV adalah struktur yang menunjukkan homologi yang tinggi pada ujung amino dan semua kecuali pada fimbria *Vibrio cholerae* mengandung N-metil fenilalanin pada residu pertama protein matang.



Gambar 2. Mekanisme perlekatan bakteri yang diperankan oleh pili dan molekul adhesin

Beberapa jenis bakteri ini menggunakan aktivitas pili/fimbriae menginfeksi epitel saluran pernafasan serta melekat melalui filamen haemagglutinin. *Salmonella Typhi* melekat pada usus kecil melalui pili/fimbriae tipe 1. Sedangkan bakteri golongan *Neisseria meningitidis* dan *Neisseria gonorrhoeae* melekat pada epitel melalui pili type IV (Beavis, G. K., 1996).

DAFTAR PUSTAKA

- Beavis, G.K., and Lisa A.W., 1996. Cellular and Molecular Pathology of Infectious Diseases. Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology, Thomas Jefferson University Hospital, Philadelphia.
- Brogden K.A, J.A Roth, T.B. Stanton, C.A. Bolin, F.C. Minion, M.J. Wannemuehler, 2000. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. American Society for Microbiology. ASM Press. Washington, DC.
- Holt, J.G, Noel R. Krieg, Peter H.A Sneath, James T Staley, and Stanley .T Williams.1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th edition. Williams &Wilkins. Baltimore. USA.

2 Juli 2010

- Ehara, M., Ishibasi, M., Ichinose, Y., Iwanaga, M., Shimotori, S. And Naito, T. 1987. Purification and partial characterization of Fimbriae of vibrio cholera O1. *Vaccine* 5: 283-288.
- Ehara, M., Sumarno,, and Ichinose, Y. 1989. Detecting of Protein Haemagglutinin pili *Vibrio cholerae* El Torr T79-6n by Using Anti 12 kDa Sub Unit Pili. Proceeding of Annual Meeting Japanese Microbiology Association Kyushu Branch Ogumi Japan.
- Emancipator, N.S., 1996. Cellular and Molecular Regulation of immune Responses. Department of Patology Case Western Reserve Univ. School of medicine. Cleveland. Ohio.
- Kaufmann, S.H.E, A. Sher, R. Ahmed. 2002. Immunology of Infection Disease. ASM Press, Washington, DC.
- Murdjani, 2002. *Identifikasi dan Patologi Bakteri Vibrio alginolitycus Pada Ikan Kerapu Tikus*. Disertasi. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya.
- Riani, C., dan Debby S. R. 2004. Faktor Virulensi Yang Berfungsi dalam Kolonisasi. KPP Bioteknologi. ITB. Bandung.
- Schuch, R. and T.M Maurelli. 2000. The Type III Secretion Pathway: Detecting The Outcome of Bacterial-Host Interactions. In *Virulens mechanisms of Bacterial Patogen-*, 3rd ed. Edited by K.A Brogden et. al. ASM Press. Wasington.
- Taufik, P., 2001. Bakteri Patogen pada Ikan Kerapu *Epinephelus* sp. Dan Bandeng *Chanos chanos*. *dalam* Prosiding Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia Departemen Kelautan dan Perikanan bekerjasama dengan JICA.
- Yuasa, K., Roza, D., Koesharyani, I., Johny, F., and Mahardika, K., 2001. The Importance of Fish Patology on Mariculture in Indonesia and The Role of Fish Patologist in Sustainable Aquaculture. *dalam* Prosiding Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia. Departemen Kelautan dan Perikanan bekerjasama dengan JICA.