

SKRINING BAKTERI *VIBRIO* SP ASLI INDONESIA SEBAGAI PENYEBAB PENYAKIT UDANG BERBASIS TEHNIK 16S RIBOSOMAL DNA

SCREENING OF INDONESIAN ORIGINAL BACTERIA *VIBRIO* SP AS A CAUSE OF SHRIMP DISEASES BASED ON 16S RIBOSOMAL DNA-TECHNIQUE

Feliatra Felix*, Titania T Nugroho**, Sila Silalahi*, and Yuslina Octavia*

*) Marine Microbiology Laboratory, Department of Marine Science, Faculty of Fishery and Marine Science, University of Riau, Pekanbaru-Indonesia, feliatra@yahoo.co.id

***) Biochemistry Laboratory, Faculty of Science and Mathematics, University of Riau, Pekanbaru

ABSTRACT

*Shrimp disease caused by Vibrio sp is one of the main limiting factors in the increasing production in shrimp farming. This disease may kill the shrimp and cause high loss in shrimp culture in South East and East Asia. Samples of 10 individuals of a ten months cultured giant tiger prawn as well as 1 liter pond water and sea waters were collected from shrimp pond in Bengkalis Island, Sumatra. Samples of shrimps were also collected from Jepara shrimp pond in Central Java and they were selected by looking at their behavior and unhealthy physical characteristics. Amplification, rDNA 16s sequencing and bioinformatics analysis to identify Vibrio species were conducted in Biotech Center, BPPT Serpong Banten. The results of DNA sequencing of each bacteria isolate were compared to DNA sequence from international DNA bank database. Tracing were made by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) system accessed through the internet at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. The result of this study found seven strains of Vibrio sp bacteria where five of which (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. shilonii* and *V. vulnificus*) were already registered in the world gen bank with homolog level above 97%. Meanwhile, another two strain found in this study were not found in the list of world gen bank and therefore are considered as native Vibrio sp bacteria from Indonesia.*

Keywords: *Vibrio sp, bacteria, shrimp, aquaculture, fish disease*

ABSTRAK

Penyakit udang merupakan salah satu faktor penghambat dalam peningkatan produksi udang. Salah satunya adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* sp. Penyakit ini dapat menyebabkan kematian yang tinggi dan dianggap sebagai penyebab kematian massal dalam budidaya udang di wilayah Asia Tenggara dan Asia Timur. Sampel udang windu (*Penaeus monodon*) berumur sekitar 2 bulan diambil sebanyak 10 ekor dari tambak udang, demikian halnya air tambak dan air laut diambil sebanyak 1 liter dari Pulau Bengkalis, Sumatera Indonesia. Demikian juga dengan sampel udang yang diambil dari Laut Jawa di Jepara Indonesia. Sampel diambil dengan memperhatikan tingkah laku dan fisik udang dengan kondisi tidak sehat. Amplifikasi, sekuensing 16S rDNA, dan analisis bioinformatika untuk mengetahui spesies *Vibrio* dilakukan di Biotech Center BPPT Serpong, Banten. Hasil sequencing DNA tiap isolat bakteri dibandingkan dengan sekuen DNA pada DNA Database Bank. Penelusuran dilakukan melalui sistem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yang diakses melalui The World Wide Web dengan alamat situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Berdasar hasil penelitian diperoleh tujuh strain bakteri *Vibrio* sp, lima strain diantaranya sudah ada secara internasional pada gen Bank Dunia, yaitu *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio shilonii*, dan *Vibrio vulnificus*. dengan tingkat homolog diatas 97%, sedangkan dua strain diantaranya merupakan strain yang belum terdaftar secara Internasional dalam gen bank dunia, dan ini diyakini merupakan *Vibrio* sp asli Indonesia.

Kata Kunci: *Vibrio* sp, bakteri, udang, budidaya, penyakit ikan

I. PENDAHULUAN

Budidaya udang memberikan kontribusi yang besar bagi produksi sektor perikanan Indonesia. Ekspor produksi udang Indonesia pernah mencapai 50% dari seluruh ekspor perikanan pada tahun 2002 dan menempati urutan lima besar dalam komoditas ekspor non migas. Dalam menjaga kelangsungan produksi udang yang telah memberikan devisa yang besar bagi negara, maka berbagai faktor yang menyebabkan terhambatnya produksi udang perlu diperhatikan.

Berbagai kegagalan panen yang terjadi pada tambak udang di Indonesia menjadi fenomena yang sangat merugikan petani tambak. Kegagalan panen biasanya disebabkan serangan bakteri *Vibrio* yang mengakibatkan kematian udang dalam waktu yang cepat dan dalam jumlah yang besar. Udang yang terserang *Vibrio* umumnya ditandai dengan gejala klinis, di mana udang terlihat lemah, berwarna merah gelap atau pucat, antena dan kaki renang berwarna merah. Bakteri ini merupakan jenis patogen yang menginfeksi dan menyebabkan penyakit pada saat kondisi udang lemah dan faktor lingkungan yang ekstrim (Lopillo, 2000).

Indonesia yang merupakan salah satu produser udang terbesar di dunia, merupakan hal yang sangat penting untuk mengetahui jenis bakteri yang menyebabkan kematian pada udang, hal ini diyakini bahwa akan ada jenis *Vibrio* sp asli Indonesia yang kemungkinan tidak ditemui pada negara lain, karena keragaman jenis bakteri *Vibrio* sp masih sangat sedikit dipelajari dan dianalisis.

Terjadinya kematian udang akibat serangan bakteri *Vibrio* ini membuat para petani tambak udang mengalami kerugian yang besar. Potensi penyebaran *Vibrio* yang demikian besar hendaknya segera diatasi dengan melakukan berbagai

upaya penanggulangan. Dalam upaya penanggulangan terhadap kemungkinan serangan *Vibrio*, perlu dilakukan deteksi bakteri jenis *Vibrio* secara tepat, karena pada lokasi perairan yang berbeda dapat memiliki keragaman spesies *Vibrio* yang berbeda pula.

Salah satu teknologi terbaik yang mampu mengidentifikasi spesies *Vibrio* adalah dengan mengetahui struktur DNA, yakni dengan teknik sekuens 16S rDNA. Dalam mempelajari bakteri *Vibrio* penyebab penyakit udang, teknik ini merupakan teknik yang relatif baru yang belakangan sering diterapkan karena bisa dibandingkan dengan basis data di Gen Bank untuk mengetahui kemiripan homologi DNA dengan bakteri yang sejenis.

Skrining bakteri menggunakan teknik sekuens 16S rDNA merupakan suatu teknik dalam mengidentifikasi suatu spesies organisme. Teknik ini dilakukan dengan menganalisa struktur atau susunan basa DNA yang terdapat di daerah 16S DNA. Seiring semakin berkembangnya dunia bioteknologi, usaha untuk menentukan jenis spesifik bakteri penyebab penyakit pada udang secara tepat dan efisien sangat diperlukan, guna mempermudah dalam menanggulangi penyebaran penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen pada budidaya tambak udang.

Saat ini, banyak ahli taksonomi mikrobiologi menerima bahwa studi molekuler, terutama analisa asam nukleat merupakan metode terbaik dan terpercaya untuk menandakan spesies dan menentukan hubungan antara organisme yang berbeda. Analisis sekuens DNA mewakili referensi terakhir untuk mengenali subtipe dalam satu spesies atau skrining mikroba. Idealnya, perbandingan di antara strain-strain dalam suatu spesies dapat diketahui melalui DNA (Lusiano, 2007).

Basis data untuk bakteri-bakteri dari genus *Vibrio* telah dibentuk, dan terus berkembang dengan penemuan-penemuan spesies baru. Basis data ini dapat diakses secara virtual di Gen Bank yang terdapat pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> (Harth *et al.*, 2007).

Setiap spesies bakteri memiliki ciri-ciri molekuler yang dapat membedakannya dari satu spesies dengan spesies yang lain dalam satu genus (Andrito, 2007).

Identifikasi menggunakan teknik sekuens 16S rDNA mendapatkan bakteri pada udang windu, air tambak, dan air laut didominasi oleh genus *Vibrio*. Genus *Vibrio* merupakan patogen oportunistik, yaitu organisme yang dalam keadaan normal ada dalam lingkungan pemeliharaan lalu berkembang dari sifat yang saprofit menjadi patogenik karena kondisi lingkungan memungkinkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui spesies bakteri *Vibrio* sp yang menyebabkan penyakit pada udang windu di lokasi budidaya di tambak, yang merupakan bakteri *Vibrio* sp asli Indonesia, dan akan memperkaya khazanah gen dan basis data di Gen Bank dunia.

II. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Juli 2009. Waktu tersebut meliputi pengambilan sampel udang, sampel air tambak, dan sampel air laut pada tambak budidaya udang Pulau Bengkalis Sumatera, dan bulan Agustus-Desember 2009 untuk pengambilan sampel udang dan air tambak dari BBPBAP (Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau) Jepara. Isolasi bakteri *Vibrio* dilakukan di Laboratorium Terpadu Jurusan Ilmu Kelautan Universitas Riau. Selanjutnya, amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan sekuensing DNA

dilakukan di Biotech Center, Balai Pengkajian Pengembangan Teknologi (BPPT) di Serpong, Propinsi Banten.

Bahan yang digunakan adalah udang windu (*Penaeus monodon*), sampel air laut, air tambak, TCBS agar *Merck*, TSA agar *Merck*, TSI agar *Merck*, larutan kristal violet, safranin, iodine, immersion oil, hidrogen peroksida 3% (H₂O₂), tetrametyl-p-phenylendiamine 1 %, alkohol, aquabides, spiritus, NaCl 0,9 %, MR-VP broth, reagent metil red, kultur bakteri, fastPrep® DNA Kit (USA), agarosa, buffer TAE 1x, loading dye 6x, SYBR safe, marker DNA 1 kb DNA Ladder (*Fermentas*;#SM0311/2/3), Taq DNA polymerase, PCR buffer 10x, dNTPs mix, primer 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 765R (5'-CTGTTTGCTCCCCACGCTTTC-3'), 1114R, (5'-CCCGGAACCCAAAACTTTG-3'), MgCl₂ 25 mM.

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah: homogenizer Tomy MS-100R, mesin sentrifuse Tomy/MX-301, Mikropipet Gilson 2-20 µl (seri 05043C) 50-200 µl (seri 05044C) buatan Perancis, PCR thermal cycler (Takara Thermal Cycler Dice-model TP 600 v 2.00), UV Trans illuminator unit, Electrophoresis BioRad, Gel documentation system, dan AB 3130 Genetic Analyzer.

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen, untuk mengetahui dengan melakukan isolasi dan identifikasi morfologi dan kimia *Vibrio* dari udang windu, air tambak dan air laut.

Sepuluh ekor sampel udang windu (*Penaeus monodon*) berumur sekitar 2 bulan diambil dari tambak udang di Bengkalis, Sumatera Indonesia. Demikian juga dengan sampel udang yang diambil dari Laut Jawa di Jepara Indonesia. Sampel diambil dengan memperhatikan tingkah laku dan fisik udang. Ciri udang yang diambil yakni

bergerak lambat terhadap respon yang diberikan, lemah, dan memiliki warna yang lebih pucat dibandingkan udang yang lain. Udang sampel dimasukkan ke dalam *ice box* sebagai wadah penyimpanan sementara. Untuk sampel air laut dan tambak, pengambilan dilakukan dengan botol ukuran 1000 ml pada tambak udang dan air laut di pinggir pantai di Pulau Bengkalis. Sampel udang dicuci, dikeringkan, lalu ditimbang. Berat 46,4 gram dan diencerkan kedalam 417,6 ml air laut yang sudah steril (10^{-1}) dan diencerkan sampai pengenceran ke 10^{-3} . Pengenceran sampel air tambak dilakukan sama dengan pengenceran pada sampel udang. Demikian pula untuk sampel air laut. Selanjutnya dilakukan penanaman bakteri pada media TCBS yang diambil 1 ml dari pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} untuk masing-masing sampel pada cawan petri yang telah disiapkan dengan media TCBS.

Koloni yang tumbuh direinokulasi pada media yang baru. Setiap koloni berbeda yang diperoleh direinokulasi sebanyak tiga ulangan menggunakan media TSA. Penyimpanan isolat bakteri *Vibrio* dilakukan pada suhu 4°C dalam refrigerator dan siap untuk digunakan pada pengujian selanjutnya.

Pengamatan yang dilakukan secara langsung diidentifikasi (secara morfologi) antara lain : pengamatan bentuk sel, warna koloni, ukuran koloni dan tipe koloni. Selain itu, uji coba biokimia juga dilakukan terhadap uji bakteri. Uji morfologi maupun uji biokimia yaitu : Pewarnaan Gram, Pertumbuhan pada Medium TSI Agar, Uji Katalase, uji Oksidase, Uji Metil Red, Isolasi DNA *Vibrio*, Reaksi Polimerisasi Berantai, Elektroforesis dan Pengamatan Hasil PCR, Purifikasi Gel Elektroforesis, Sekuensing dan Analisis BLAST, Analisis BLAST dilakukan dengan mengedit urutan DNA hasil sekuensing dengan menterjemahkan N menjadi basa

sesuai elektroferogram. Urutan DNA dicopy ke program Notepad. Selanjutnya dilakukan penelusuran melalui website <http://www.ncbi.nih.nlm.gov/>. Data yang diperoleh dari hasil sekuensing dianalisis menggunakan teknik BLAST, paket program Clustal X, Genedoc, Treeview dan Bioedit. Kemudian hasil analisis disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan gambar. Penyejajaran (*Alignment*) sekuens sampel dengan sekuens dari data base semua DNA *Vibrio* yang diteliti dilakukan menggunakan program *allignment* dari paket Clustal X. Untuk memperoleh dendogram digunakan program N-J pada Clustal X dengan tingkat $100 \times$ bootstrap.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel udang windu (*P. monodon*) diambil dari tambak di Bengkalis Riau, Sumatera dan di tambak BBPBAP Jepara, Jawa Tengah, Indonesia. Berdasarkan hasil isolasi *Vibrio* dari udang, air tambak dan air laut menggunakan medium agar TCBS diperoleh 7 isolat bakteri *Vibrio* yang murni dengan memperhatikan warna, bentuk dan ukuran koloni. Untuk memudahkan dalam mengidentifikasi selama penelitian, ketujuh isolat tersebut diberi kode A, B, C, D, E, F, dan G. Pada pengkulturan selanjutnya, media yang digunakan adalah agar TSA *Merck*. Adapun ketujuh isolat yang diteliti, semua koloni isolat bakteri berbentuk koma (Tabel 1).

Semua isolat *Vibrio* menunjukkan hasil oksidase dan katalase positif. Uji menggunakan medium agar TSI untuk memperlihatkan terjadinya fermentasi glukosa dan sukrosa serta gas H_2S dengan memperhatikan warna pada agar miring dan agar tegak. Semua isolat adalah Glukosa positif sedangkan untuk sukrosa, A, C dan E adalah negatif dan sisanya adalah positif. Secara umum ciri-

Tabel 1. Hasil Pewarnaan, Pengamatan Morfologi dan biokimia

No	Isolat	Gram	Bentuk sel	Warna koloni	Motil	Oksi dase	Kata lase	Metil red	Glu kosa	Suk rosa	H2S	Kons. DNA (ng/ μ l)
1	A	-	koma	Kuning	+	+	+	+	+	-	+	108,43
2	B	-	koma	Biru Hijau	+	+	+	-	+	+	+	115,56
3	C	-	koma	Kuning	+	+	+	+	+	-	+	106,99
4	D	-	koma	Hijau	+	+	+	+	+	+	+	62,87
5	E	-	koma	Biru Hijau	+	+	+	-	+	-	-	62,87
6	F	-	Koma	Kuning	+	+	+	-	+	+	+	69,92
7	G	-	koma	Kuning	+	+	+	-	+	+	+	83,91

ciri masing-masing strain dapat dilihat pada Tabel 1.

Konsentrasi genom DNA dari masing-masing isolat yang sudah diekstraksi dapat diketahui. Konsentrasi ini membandingkan ekstrak DNA dalam satuan nano gram per 1 mikro liter air, berkisar antara 62,87 ng/ug sampai 115,56 ng/ug, yang mana konsentrasi tertinggi merupakan isolat D dan konsentrasi terendah adalah isolat H dan I (Tabel 1)

Menggunakan marker DNA 1 Kb Ladder, semua fragmen DNA yang terlihat pada gel agarose berukuran 1500 pb. Besarnya ukuran ini sesuai dengan ukuran yang diharapkan dari gen-gen 16S rDNA bakteri yaitu antara 1500-1600 bp (Lusiano, 2007).

Hasil elektroforesis menunjukkan ketujuh fragmen DNA dari isolat *Vibrio* yang bisa dilanjutkan hingga proses sekuensing, dengan menggunakan primer 8F, 765R, dan 1114R, dilakukan satu arah sebanyak satu kali pada setiap primer yang digunakan. Panjang basa yang diperoleh pada DNA A 526 pb, D 1015 pb, E 420 pb, H 1020 pb, dan I 1020 pb.

Sistem BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> dapat mencari nama spesies, persentase homologi DNA hasil sekuens. Pengajuan (*Submit*) ke Gen Bank dilakukan guna

mendapatkan nomor akses dan memperoleh kode strain sesuai yang diinginkan oleh peneliti, yang merupakan susunan basa yang dimiliki oleh masing-masing strain (Tabel 2).

Menurut Handayani (2008) homologi sekuens 16S rDNA dari masing-masing isolat bakteri dengan sekuens 16S rDNA dari database GenBank dapat diketahui bahwa tidak ada sekuens 16S rDNA bakteri yang identik.

Hasil BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, menunjukkan bahwa kelima strain adalah *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio shilonii*, dan *Vibrio vulnificus*. Hal ini diyakini bahwa bakteri-bakteri tersebut memiliki persamaan sekuens melebihi 97% dari yang ada pada gen Bank Dunia (Tabel 3). Sedangkan dua strain lain sudah diyakini merupakan genus *Vibrio* sp, tetapi spesiesnya belum diketahui. Strain keenam memiliki kesamaan sebesar 93% dengan bakteri *Vibrio* 6G2. Sedangkan strain ketujuh memiliki persentase homologi 94% dengan beberapa kandidat bakteri yang disebut sebagai *Uncultured bacteriu*. Isolat ketujuh yang memiliki top score adalah *Uncultured bacterium* clone nbw171g06c1 16S ribosomal RNA gene partial sequence. Berdasarkan informasi yang diperoleh dengan

Tabel 2. Sekuens Gen 16S rDNA

Isolat	Sekuen Gen 16S rDNA
A	<p>5' TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCT GGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCT GAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGA GTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAA ACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGAC CTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGT TGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG AGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCC TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT GATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAA GCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGTTAATAGCATTTGACGTTAGCG ACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA 3'</p>
B	<p>5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGC GGCAGGCCTAAGACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTTAA CCTTCGGGGAACGATAACCGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT GCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGAT GGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCG GGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTG AGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG ATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGG GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTT TCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACG TTAGCGACAGAAGAAGCACCGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGGAGGGTGCAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG CGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCA ACCTCGGAATAGCATTTGAAACCTGCAGACTAGAGTACTGTAGAG GGGGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGA AGGAAT 3'</p>
C	<p>5' TTTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAAC GCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTA TCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGT GAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGG AAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGG ACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTA GTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT GAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC TGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA 3'</p>
D	<p>5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGG CGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTGACC CTTCGGGTGACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCC TGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAA TACCGCATAATGCCTTCGTGCCAAAGAGTGGGACCTTAGGGCCTCTCG CGTCAGGAGATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCT CACCAAGGCGACGATACCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAC TGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGA AGATGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCAGTGAGGAAGGCGGGT</p>

	<p>ACGTTAATAAGTGCTCGTTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCT AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATC GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCGTTAAGTCAGATG TGAAAGCCCCGGGGCTCAACCTCGGAACTGCATTTGAAACTGGCGGACT AGCGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGCAATGCG TAGAGATCTGAAGGAATAC 3'</p>
E	<p>5' CAGGCCTAACACATGTAAGTCGAGCGGCAGC ACAGAGAACTTGTTTCTCGGGTGTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAA TGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATCACCATTGGAAACGAT GGCTAATACCGCATGATGCCCTTGATTATAATGAACAGGAGCCAAA GAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGAAATGCCCAGGCGGG ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCTA GCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAGACACGGT CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG CGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAGGGCCTTCG GGTTGTAAAGCACTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTGTTGTAATAG CAGCATCATTTGACGTTAGCAACAGAAGAAGCACCGGCGAACTCC GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAACGTTAATCGGA ATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTTAAGTCACATGT GAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTGAGACTGGCAAA CTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGTA ATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGTCCCCCT GGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG GTTTGC GAAGACGCAGGTGTGCCTTCGGGAGCTCTGAGACAG 3'</p>

F	<p>5'TGCCATACGGNCCAAATGGGGGGACCTTCNNGCCTCTCCNCGT CAGGATATGCCTAAGTAGTGCGATTAGCTGAGTTGGNGAGGNA ATGGCTCACCATATGGCACNATCCCTCAGCTGGTCTGACCAGGA TGATGACCCACNNGGAAGTACACGCTNCANACATCCTACGG AGAGGCCACCTAGCGCGGGGAGATATTGCACAATGGGCACANC TGATGCTACCCTTGCCGCGTGTGATGAATAAAGGCCTCTCGGGT TAGATAAAGCCACTTTCAATCTTGAGGCAAGGCTAGGCGTAGTT AATACCTGCGTTACTTGACGTTCANCGANATAACAGGCACCGAG CCTAACATCCGTAGCCAGCACCCCTCAGTAATACGGTAGAGTCC AGNGTTCATCNNAATTACTGGNCCTTAAAACNNATGCATGTGNA TTTGTTAAATACAATATGTGAAAANCCCGGGGTCTCAACCCTCG AAAATCACCTATTTGA'3 3'AAATTTCCCGCGGGCATTCTGATCCAATTNTCCTAGCGAAGGA AACTTTCATGGAGTTTTNCCTGCAGACCTAAATACGGACTGGGA GCGCCTTTTTGGGGATTGGGTCACTATCTTTCCCTTGCTGCCTTC GGGTATGCGCCCTTGTAGCAGGGGGTAGCCCTACTCGGAAGG GCCATGATGACTTGACGTCCTCCCACCTTCCCTCCGGTTTATCAC CGGGAGTCCTCCTGGAGTCCCGACATTAATCGCTGGCAAACAG GGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAATTAACCCAAAATTTTCGC AACACGAGGTGACTACCTCCATGGGGCACCTGTTCTCAAAGTTC CCAAAGGCAAGAATCCATCTCCGGACTCCCCAGGCGGATCTAAT TTAACGCGTTACTCCAGAAAGCCCCGGGCTCAAGGCCCCCAACC CTCCAAGATATACATGGTTTTAAGGGGTGGGACTACCCAGGGGT ATCTAAACTCTGTTTTGCCCCCAAAAGTTCTCTGGATGTCAAG AGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAAATTA AACACATGC TTCCCCCGCTTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTTGAGTTTTA TACTTGCGACCGGTTAAGCTTTTCGGCATTCTGAAATGTTGAAT ATTCGGGGTCTAGGGGGGCCGTCCTTCCACCACGGGGGTAGTTC CTTTAAAATACCAAAAACCCATTTCCCCCGCCTCCTCCCTGGA AATATTTGACCCCCCTCCTGAGAGTGAATTCTAAAGGGTGCTG AGGTTTCAAAGGGTTAAATCTCGCGAGGGGTGTAAGCCCCCG GCGGCTTATTTCCACTCACGGAATTTAAAAAAAACCCAACCTC GG¹GGGGGGGGCCTTTTCAG'5</p>
G	<p>3'CGTTCCCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGC TTCATATAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAAGTGAACAAC TTTATGGGATTTGCTTGACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTATT GTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGAGGGCATGA TGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACACGGCAGT CAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGG TTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGAGC TGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGG AAAACCTCTATCTCTAGAGGGGTCAGAGGATGTCAAGATTTGGTA AGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTT GTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTACT CCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACT'5</p>

mengakses kode tersebut menunjukkan bahwa bakteri dengan kode akses ini bukanlah bakteri *Vibrio* sp melainkan suatu spesies bakteri yang diperoleh dari sedimen. Tetapi dari morfologi dan hasil uji biokimianya menunjukkan bahwa

isolat ketujuh merupakan suatu bakteri dari genus *Vibrio* (Tabel 1), kemudian didukung juga oleh strain ini dapat tumbuh pada media TCBS, yang merupakan media spesifik bakteri *Vibrio* sp.

Tabel 3. Hasil BLAST dan Submit ke GenBank

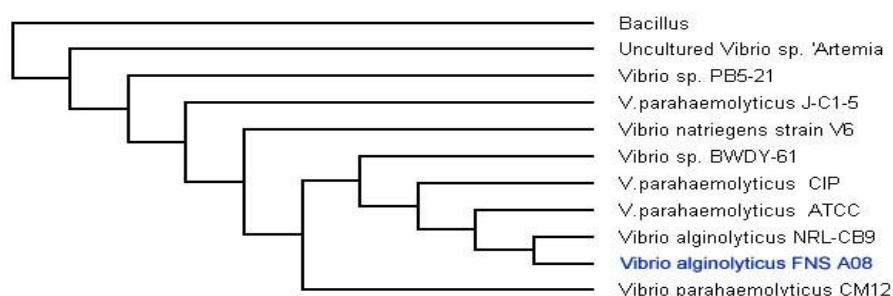
Isolat	Bakteri	Strain	Kode Akses	Homologi (%)
A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	FNS A08	FJ404761	98
B	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	FNS C08	FJ404763	99
C	<i>Vibrio harveyi</i>	FNS B08	FJ404762	98
D	<i>Vibrio shilonii</i>	FNS D08	FJ404764	98
E	<i>Vibrio vulnificus</i>	FNS E08	FJ404765	98
F	<i>unculture bacterium 1</i>	FNY F08	EU854942.1	93
G	<i>Unculture bacterium 2</i>	FNY G08	GQ075650.1	94

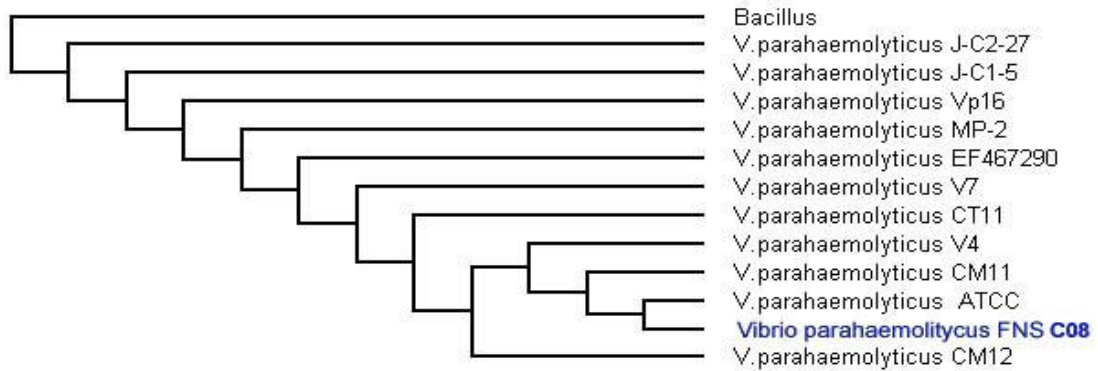
Hal ini di duga bahwa kedua strain tersebut merupakan spesies *Vibrio* asli Indonesia yang belum ada dalam gen bank Dunia. Hal ini dikuatkan oleh Hagstrom *et al.* (2000) menyatakan bahwa isolat yang mempunyai persamaan sekuens 16S rDNA lebih besar dari 97% dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuens antara 93%-97% dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies.

Pohon filogenetik (*Phylogenetic trees*) membuat percabangan yang menghubungkan titik (*nodes*), yang merupakan unit taksonomi, seperti spesies atau gen sedangkan akar pohonnya merupakan titik yang bertindak sebagai nenek moyang untuk seluruh

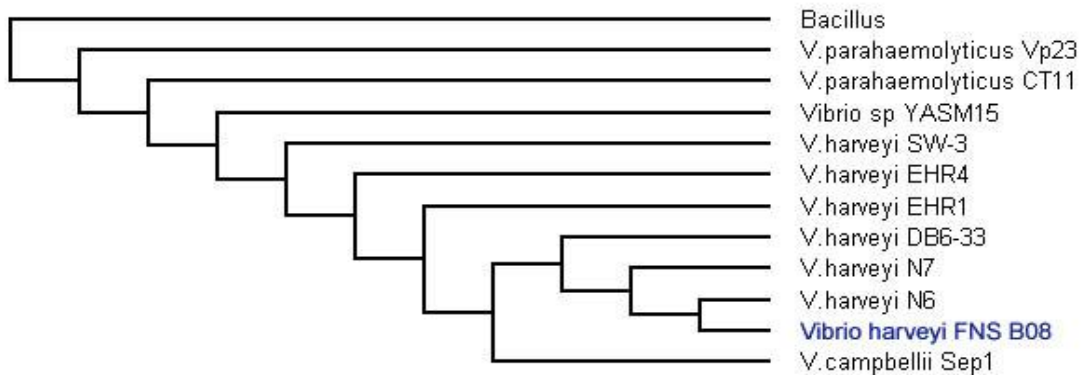
organisme yang sedang dianalisis (Pramana, 2007).

Penyejajaran (*Alignment*) sekuens sampel dengan sekuens dari basis data Gen Bank dilakukan menggunakan program Clustal X. Untuk memperoleh pohon filogenetik digunakan program N-J pada Clustal X dengan tingkat 100 x bootstrap, kemudian hasil dalam bentuk pohon filogenetik dapat dilihat pada program Treeview. Pohon filogenetik berguna untuk menunjukkan hubungan kekerabatan dari setiap spesies yang dilihat berdasarkan karakteristik molekuler antar spesies maupun antar strain dalam spesies yang sama. Pohon filogenetik dari beberapa spesies bakteri *Vibrio* dapat dilihat pada Gambar 1-6 berikut ini.

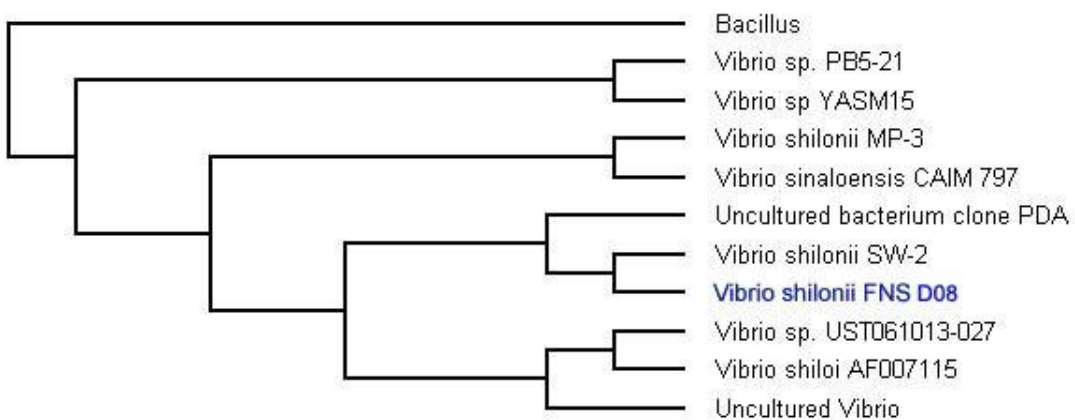
Gambar 1. Pohon filogenetik *Vibrio alginolyticus* FNS A08



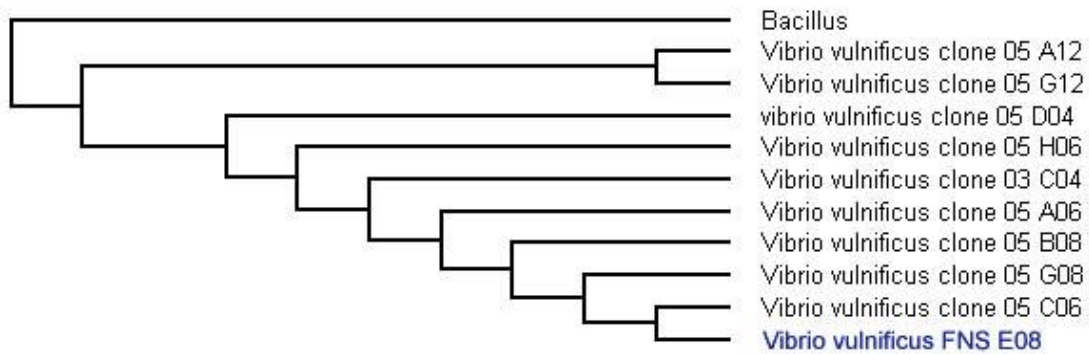
Gambar 2 . Pohon filogenetik *Vibrio parahaemolyticus* FNS C08



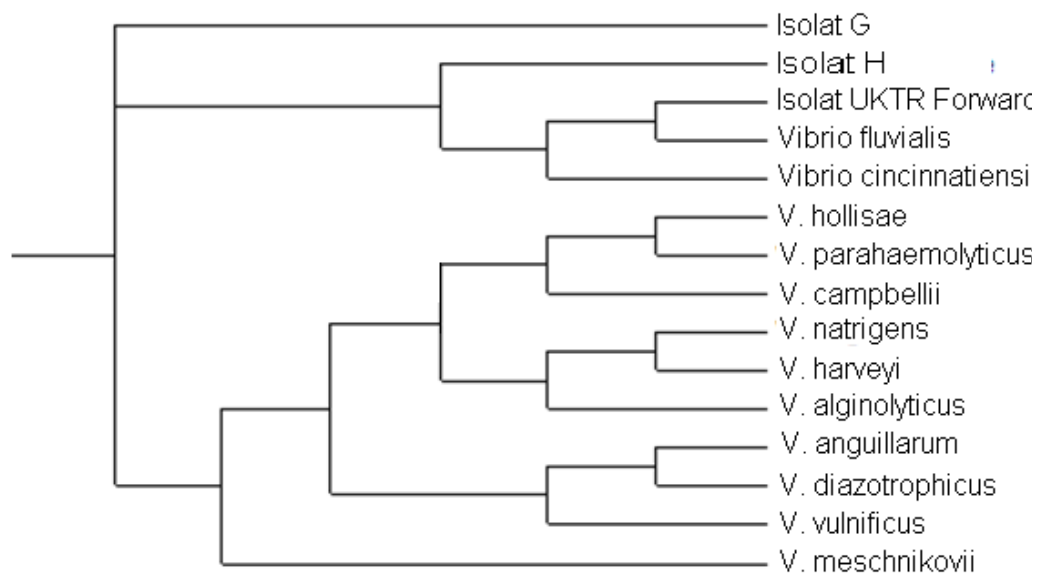
Gambar 3. Pohon filogenetik *Vibrio harveyi* FNS B08



Gambar 4. Pohon filogenetik *Vibrio shilonii* FNS D08



Gambar 5. Pohon filogenetik *Vibrio vulnificus* FNS E08



Gambar 6. Pohon filogenetik bakteri strain G dan Strain H

Dari ketujuh isolat dapat dilihat tingkat kekerabatan dari bakteri *Vibrio* sp yang ada, kelima isolat sudah dipastikan merupakan isolat yang sudah ada, tetapi isolat G dan Isolat H dari hasil sekuensing dan pohon filogenetik tidak merupakan dari bakteri *Vibrio* sp yang sudah ada. Tetapi dari hasil morfologi dan hasil uji biokimianya menunjukkan bahwa isolat G dan H merupakan suatu bakteri dari genus *Vibrio*, oleh karena itu dapat disimpulkan secara sementara bahwa isolat G dan H adalah bakteri spesies baru dari *Vibrio*.

Berdasarkan hasil identifikasi molekuler, *V. alginolyticus* FNS A08 diperoleh dengan tingkat homologi 98 % dengan panjang basa 526 pb dan strain FNS A08. Bakteri ini bersifat gram negatif, katalase positif, oksidase positif dan termasuk ke dalam bakteri motil.

V. alginolyticus dicirikan dengan pertumbuhannya yang bersifat koloni pada media padat non selektif. Ciri lain adalah, fermentasi glukosa, laktosa, sukrosa, dan maltosa, membentuk kolom berukuran 0,8-1,2 cm yang berwarna

kuning pada media TCBS (Buwono, 2004).

Toksin mematikan diproduksi oleh *V. alginolyticus* strain Swy asli diisolasi dari udang kuruma (*Penaeus japonicus*) sakit yang dipurifikasi dengan *Fast Protein Liquid Chromatography* dengan interaksi *hydrophobic* (*Sepharose High Performance*) kromatografi dan *gel filtration columns*. Toksin tersebut adalah *alkaline serine protease*, menunjukkan aktivitas maksimal pada pH 8 sampai 11 (Liu, dan Lee, 1999).

V. parahaemolyticus FNS C08 mempunyai ciri koloni berwarna biru sampai kehijauan, mempunyai sifat fermentatif, glukosa, laktosa, sukrosa dan produksi gas positif. Sedangkan, metil red dan H₂S negatif. Hasil identifikasi molekuler dengan homologi 99 % menunjukkan bahwa patogen ini mempunyai panjang basa 1015 pb.

V. parahaemolyticus memiliki diameter 3-5 mm, warna koloni biru kehijauan, pusat koloni berwarna hijau tua, memiliki banyak flagela (Richie, 2005). Bakteri *V. parahaemolyticus* adalah bakteri halofilik gram negatif yang terdistribusi di perairan pantai tropis di seluruh dunia dan menyebabkan gastroenteritis (De Paola *et al*, 1998).

Thermostable direct haemolysin (TDH), merupakan faktor virulensi utama dari *V. parahaemolyticus*, tidak bersifat racun jika dipanaskan pada suhu 60-70 °C, tetapi akan bersifat racun kembali jika dipanaskan lebih tinggi dari 80 °C. Fenomena yang berlawanan ini dikenal dengan efek *Arrhenius*, telah mengingatkan peristiwa yang belum terjelaskan selama 100 tahun. Hal ini menunjukkan bahwa efek ini berhubungan dengan perubahan struktural pada protein yang menghasilkan fibrilus (Fukui *et al.*, 2005).

V. harveyi strain FNS B08 mempunyai ciri koloni berwarna kuning

pada media TCBS, mempunyai sifat fermentatif, metil red, glukosa dan sukrosa positif. Sedangkan laktosa produksi gas dan H₂S negatif. Berdasarkan hasil identifikasi molekuler, bakteri ini diperoleh dengan tingkat homologi 98 % dengan panjang basa 420 pb.

Liu dan Lee (1999) menyatakan bahwa *Cysteine protease*, merupakan zat yang diproduksi oleh bakteri patogen bercahaya *V. harveyi* strain 820514, yang diisolasi dari udang windu (*Penaeus monodon*) sakit. Protease mematikan bagi *P. monodon* dengan kadar LD₅₀ dari 0,3 µg protein per gram udang. Selanjutnya disebutkan bahwa *Cysteine protease* merupakan toksin utama yang diproduksi oleh bakteri ini. Protease ini merupakan toksin *cysteine protease* pertama yang ditemukan pada *Vibrio*.

Selain itu, *V. harveyi* strain VIB 645, sangat patogen terhadap jenis salmon dan menghasilkan produk ekstraseluler dengan tingkat aktivitas *hemolytic* yang tinggi terhadap eritrosit ikan, ditemukan mengandung dua gen *hemolysin* yang berhubungan erat (*vhhA* dan *vhhB*). Sedangkan mayoritas strain yang diuji hanya terdapat gen *hemolysin* tunggal (Zhang, Meaden, dan Austin, 2001).

Vibrio shilonii mempunyai ciri koloni berwarna hijau pada media TCBS, mempunyai sifat fermentatif, metil red, glukosa, laktosa dan sukrosa positif. Sedangkan produksi gas dan H₂S negatif. Berdasarkan hasil identifikasi molekuler, bakteri ini diperoleh dengan tingkat homologi 98 % dengan panjang basa 1020 pb, dan tipe strain FNS D08.

Model sistem pemutihan karang oleh bakteri telah dipelajari secara ekstensif. Setiap musim panas, sedikitnya selama 12 tahun terakhir, sekitar 70% karang sudah menunjukkan terjadinya pemutihan. Organisme yang menyebabkan pemutihan karang ini

adalah *V. shilonii*. Patogen ini mengikat *galactoside* yang mengandung sel reseptor dalam lendir karang, dan kemudian menembus lapisan karang, di mana bakteri berkembang, mencapai > 10⁸ bakteri/cm³ jaringan. *V. shilonii* menghasilkan toksin (PYPVYAPPPVVP) yang menghalangi fotosintesis intraselular *zooxanthellae*. Pada musim dingin, ketika suhu air laut turun di bawah 20°C, *V. shilonii* tidak bisa bertahan pada karang inang dan karang pulih kembali (Koren dan Rosenberg, 2006).

Pemutihan karang disebabkan adanya infeksi dari bakteri spesifik (sebagai bantahan terhadap pendapat pengaruh tekanan lingkungan) terjadi ketika *zooxanthellae* hilang akibat pengaruh toksin yang diproduksi oleh bakteri patogen. Pemutihan karang oleh bakteri terjadi di laut Mediterania pada karang scleractinian *Oculina patagonica* oleh *V. shilonii* (patogen) dan di lautan India dan di laut Merah pada karang laut *Pocillopora damicornis* oleh *Vibrio coralliilyticus* patogen (Haim *et al.*, 2002).

V. vulnificus mempunyai ciri koloni berwarna biru sampai hijau pada media TCBS, mempunyai sifat fermentatif dan glukosa positif. Sedangkan metil red, laktosa, sukrosa, produksi gas dan H₂S negatif. Dari identifikasi molekuler, bakteri ini diperoleh dengan tingkat homologi 98 % dengan panjang basa 1020 pb dan tipe strain FNS E08.

Bakteri *V. vulnificus* berwarna biru sampai hijau pada TCBS, ada beberapa yang tumbuh *swarming* (bakteri tumbuh menutupi seluruh permukaan koloni datar/flat). Diameter koloni mencapai 2-3 mm, tumbuh bagus pada media TCBS pada suhu 37 °C (Prajitno, 1995).

Selama menginfeksi, *V. vulnificus* menjangkau usus dan kemudian menyerang aliran darah dengan menembus dinding *mucosal* usus inang

yang mengakibatkan septisemia. Lee, *et al.*, (2008) menemukan bahwa toksin RtxA *V. vulnificus* yang dikeluarkan melalui RtxE transporter berperan terhadap sitotoksitas *V. vulnificus* melawan sel epitel usus.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian didapat bahwa isolat bakteri yang berhasil diidentifikasi dengan menggunakan analisis 16S rDNA dari perairan Indonesia (kepulauan Bengkulu, Sumatera dan dari tambak di Jepara, Jawa), lima strain diantaranya sudah terdaftar secara internasional pada gen Bank Dunia, yaitu *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio shilonii*, dan *Vibrio vulnificus*. dengan tingkat homolog diatas 97%, sedangkan dua strain diantaranya merupakan strain yang belum terdaftar secara Internasional dalam gen bank dunia, dan ini diyakini merupakan *Vibrio* sp asli Indonesia.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap kadar toksik, dan kemampuan bahaya yang disebabkan terhadap udang, dan upaya pencegahan perkembangannya bakteri tersebut untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio* sp pada budidaya udang windu khususnya dan pada budidaya perikanan umumnya. Kemudian perlu dilakukan penelitian mendalam terhadap kedua strain yang diduga merupakan strain asli Indonesia yang diharapkan bisa menjadi pengkayaan strain *Vibrio* sp pada gen bank bakteri dunia.

DAFTAR PUSTAKA

- Alcama, I, E, 1983. Laboratory Fundamentals of Microbiology. Addison Wesley Publishing Company, Inc. New York. 324 pp.
- Andrito, W. 2007. Karakterisasi Molekuler Bakteri Probiotik pada Saluran

- Pencernaan Ikan Kerapu Bebek (*Chromileptes altivelis*) Berbasis Teknik 16 S rDNA. Skripsi, Faperika Universitas Riau. Pekanbaru. (Tidak diterbitkan).
- Buwono, D. 2004. Jenis Penyakit pada Ikan (Finfish) Budidaya Air Payau. Balai Besar Pengembangan Budidaya air Payau Jepara. Online <<http://www.dkp.go.id/content.php?c=1843>>.
- De Paola, A, C.A. Kaysner, and B. John. 1998. Environmental Investigation of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster after Outbreaks in Washington, Texas and New York. Online <<http://www.aem.asm.org/cgi/content/full/66/11/4649>>.
- Fukui T., K. Shiraki, D. Hamada, K. Hara, T. Miyata, S. Fujiwara, K. Mayanagi, K. Yanagihara. 2005. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a Bacterial Reversible Amyloid Toxin. *Biochemistry*, 44(29):9825–9832. Online <<http://pubs.acs.org/cgi-bin/abstract.cgi/bichaw/2005/44/i29/abs/bi050-311s.html>>. (Diakses 05 November 2008).
- Handayani, A. 2008. Karakteristik Molekuler Bakteri *Vibrio* sp Penyebab Penyakit pada Udang Windu (*Penaeus monodon*) dengan Sekuence DNA 16S. Pekanbaru. Skripsi Faperika Unri. (tidak diterbitkan).
- Hagstrom, A., J.F. Pinhassi, and U.L. Zweiefel. 2000. Biogeographical Diversity Among Marine Bacterioplankton. *Aquatic Microbial Technology*, 21: 231-244.
- Haim, B. 2002. Disease Overview. Coral Disease Identification and Information. <http://www.coral.noaa.gov/seakey/real_data.shtml>. (Diakses 16 September 2008)
- Harth, E., J. Romero, R. Torres, and R. Espejo. 2007. Intragenomic Heterogeneity and Intergenomic Recombination among *Vibrio parahaemolyticus* 16S rDNA. *Microbiology*, 153: 2640-2647.
- Liu, P.C. and K.K. Lee. 1999. Cysteine Protease is a Major Exotoxin of Pathogenic Luminous *Vibrio harveyi* in The Tiger Prawn, *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 28(6):428-430.
- Lopillo, R. 2000. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Heterotropik pada Tambak yang Antagonis Terhadap *Vibrio harveyi* dan *Vibrio parahaemolyticus*. Skripsi, Faperikan Unri. Pekanbaru, 27 hal.
- Lusiano, A. 2007. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Hidrokarbonoklastik dengan Sekuens 16S rDNA dari Sedimen Perairan Dumai. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau.
- Parjitno. 1995. Primadona Penyakit Udang Windu di Tambak. Makalah Penelitian Nasional Keterampilan dan Bina Usaha Mandiri bidang Budidaya Air Payau dan tawar. Malang: Mahasiswa Pemuda Pedesaan Brawijaya. Malang. 17 hal.
- Radjasa, K. O. 2006. Rapid Grouping of Marine Psychrotrophic Bacteria Using Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR Amplified 16S. Internet. <<http://www.karnaradjasa.com>>.
- Reed, A.P. and R.F. Floyd. 2002. *Vibrio* Infection of Fish. University of <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FA/FAO3600.pdf>>.

- Rhodes, A. N., J. W. Urbance, H. Youga, H. Corlew-Newman, C. A. Reddy, M. J. Klug, J. M. Tiedje, D. C. Fisher, 1998. Identification of Bacterial Isolates Obtained From intestinal Contents Associated with 12.000 years old Mastodon Remain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 651-658.
- Richie, J.P. 2005. Analisis Bakteri Vibrio Pada Udang Windu (*Penaeus monodon*) Tambak di Bengkalis Propinsi Riau. Skripsi, Faperikan UNRI. Pekanbaru (tidak diterbitkan).
- Wren, B.W. 1992. Bacterial Exotoxin Interaction. In *Molecular Biology of Bacterial Infections. Current Status and Future Prospective.* (Eds. C. E. Hormacce, C.W. Penn and C.I. Smith). P.127-148. Cambridge University Press.
- Zhang, X.H., P.G. Meaden, , and B. Austin. 2001. Duplication of Hemolysin Genes in a Virulent Isolate of *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7): 3161-3167.