

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1. Isolasi Bakteri

Sampel udang windu (*P. monodon*) diambil dari tambak di Desa Bantan Air, Kabupaten Bengkalis. Isolasi *Vibrio* dari udang, air tambak dan air laut menggunakan medium agar TCBS diperoleh 14 biakan yang masih bercampur. Setelah diinokulasi lagi baru diperoleh 11 isolat bakteri *Vibrio* yang murni dengan memperhatikan warna, bentuk dan ukuran koloni. Untuk memudahkan dalam mengidentifikasi selama penelitian, sebelas isolat tersebut diberi kode A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, dan K. Pada pengkulturan selanjutnya, media yang digunakan adalah agar TSA Merck.

4.1.2. Pewarnaan Gram dan Pengamatan Morfologi

Perubahan warna pada isolat bakteri setelah diberi bahan-bahan pewarnaan gram dapat diketahui apakah bakteri gram negatif atau positif. Warna ungu pada isolat menunjukkan bakteri gram positif, sedangkan warna pink atau kemerah-merahan menunjukkan bakteri gram negatif.

Dari sebelas isolat yang diteliti, satu koloni isolat bakteri berbentuk koma dan delapan lainnya berbentuk batang. Kedua bentuk sel koloni tersebut merupakan kandidat *Vibrio*.

Tabel 1. Hasil Pewarnaan dan Pengamatan Secara Morfologi

No	Isolat	Gram (+/-)	Bentuk Sel	Warna Koloni	Motilitas(+/-)
1	A	-	Batang	Kuning	+
2	B	-	Spiral	Hijau	+
3	C	-	Batang	Hijau	+
4	D	-	Batang	Biru Hijau	+
5	E	-	Batang	Kuning	+
6	F	-	Spiral	Kuning	+
7	G	-	Batang	Kuning	+
8	H	-	Batang	Hijau	+
9	I	-	Batang	Biru Hijau	+
10	J	-	Koma	Kuning	+
11	K	-	Batang	Kuning	+

Sumber: Data Primer

4.1.3. Uji Biokimia

Semua isolat *Vibrio* menunjukkan hasil oksidase dan katalase positif. Pada uji oksidase terhadap koloni isolat *Vibrio*, ditunjukkan dengan perubahan warna setelah dua menit setelah ditetesi naptol. Sedangkan reaksi positif pada uji katalase ditandai dengan gelembung gas pada semua isolat setelah ditetesi H₂O₂.

Tabel 2. Hasil Pengujian Biokimia.

No	Isolat	Oksidase (+/-)	Katalase (+/-)	Metil Red(+/-)
1	A	+	+	+
2	B	+	+	+
3	C	+	+	-
4	D	+	+	-
5	E	+	+	+
6	F	+	+	-
7	G	+	+	-
8	H	+	+	+
9	I	+	+	-
10	J	+	+	-
11	K	+	+	-

Sumber: Data Primer

4.1.4. Uji Medium TSIA

Uji menggunakan medium agar TSI untuk memperlihatkan terjadinya fermentasi glukosa dan sukrosa serta gas H₂S dengan memperhatikan warna pada agar miring dan agar tegak.

Jika agar tegak berwarna merah dan agar miring berwarna kuning, ini menunjukkan fermentasi glukosa positif. Jika pada kedua agar miring dan tegak berwarna kuning, berarti fermentasi laktosa dan sukrosa positif. Sementara produksi gas H₂S positif jika terdapat warna hitam pada agar.

Hasil uji isolat dengan menggunakan medium agar TSIA dapat dilihat seperti

Tabel 3. Hasil Uji Menggunakan Medium TSIA

No	Isolat	Glukosa	Sukrosa	H ₂ S
1	A	+	-	+
2	B	+	+	+
3	C	-	-	-
4	D	+	+	+
5	E	+	-	+
6	F	-	-	-
7	G	-	-	-
8	H	+	+	+
9	I	+	-	-
10	J	+	+	+
11	K	+	+	+

Sumber: Data Primer

4.1.5. Konsentrasi DNA

Menggunakan alat Spectrophotometer ND-1000, 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.

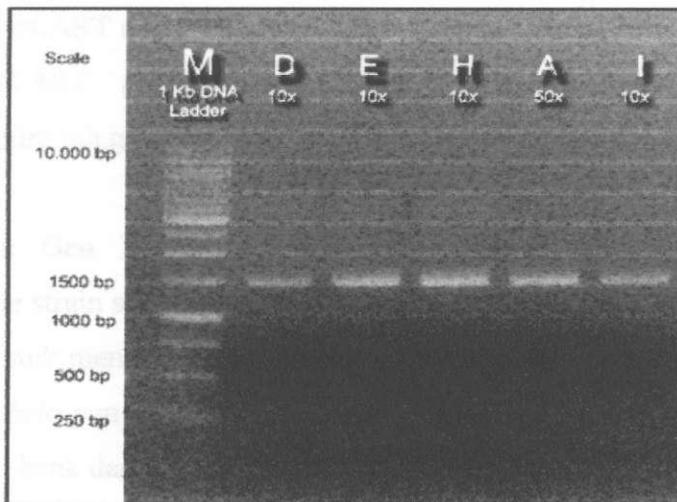
Tabel 4. Konsentrasi Genom Ekstrak DNA

Isolat	Konsentrasi DNA (ng/ μ l)
A	108,43
B	122,86
C	137,74
D	115,56
E	106,99
F	110,71
G	88,07
H	62,87
I	62,87
J	69,92
K	83,91

Sumber: Data Primer

4.1.6. Amplifikasi DNA

Sampel DNA yang sudah diamplifikasi, dielektroforesis untuk menunjukkan fragmen DNA. DNA isolat yang berhasil muncul adalah A, D, E, H, dan I (Lampiran 1).



Gambar 4. Hasil Elektroforesis DNA pada Gel Agarose.

Keterangan:

- M = Fragmen Marker DNA 1 kb Ladder
- D = Fragmen DNA *Vibrio* D
- E = Fragmen DNA *Vibrio* E
- H = Fragmen DNA *Vibrio* H
- A = Fragmen DNA *Vibrio* A
- I = Fragmen DNA *Vibrio* I

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). Dari sebelas isolat *Vibrio* yang di sekuensing, hanya lima isolat yang menunjukkan fragmen DNA. Tidak munculnya fragmen DNA dalam hal ini disebabkan berbagai faktor, yaitu kemungkinan suhu *annealing* yang terlalu tinggi, atau disebabkan primer yang dipakai tidak sesuai dengan DNA *Vibrio*.

4.1.7. Sekuensing 16S rDNA

Hasil elektroforesis menunjukkan lima fragmen DNA dari isolat *Vibrio* yang bisa dilanjutkan hingga proses sekuensing, yakni isolat A, D, E, H, dan I. Sekuensing kelima isolat ini 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. (Lampiran 6).

4.1.8. Analisis BLAST dan Submit Gen Bank

Sistem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> dapat mencari nama spesies, persentase homologi DNA hasil sekuen.

Submit ke Gen Bank dilakukan guna mendapatkan nomor akses dan memperoleh kode strain sesuai yang diinginkan oleh peneliti (dalam bentuk Flat File) dengan tujuan untuk mendaftarkan DNA yang diteliti ke dalam data base Gen Bank. Kelima DNA *Vibrio* yang disekuening dalam penelitian ini berhasil terdaftar dalam basis data di Gen bank dan telah mendapatkan kode akses (Lampiran 7).

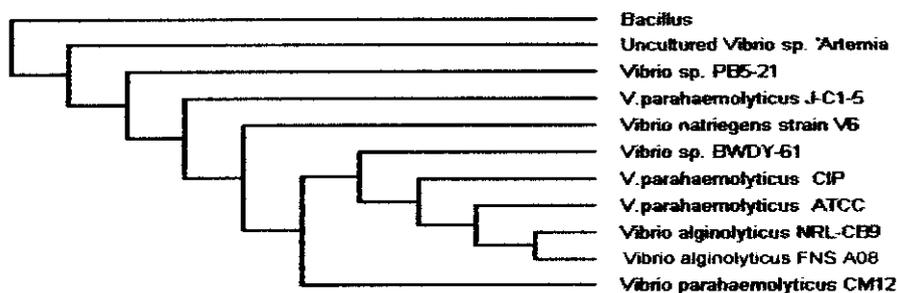
Tabel 5. Hasil BLAST dan Submit ke GenBank

Isolat	Bakteri	Strain	Kode Akses	Homologi (%)
A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	FNS A08	FJ404761	98
D	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	FNS C08	FJ404763	99
E	<i>Vibrio harveyi</i>	FNS B08	FJ404762	98
H	<i>Vibrio shilonii</i>	FNS D08	FJ404764	98
I	<i>Vibrio vulnificus</i>	FNS E08	FJ404765	98

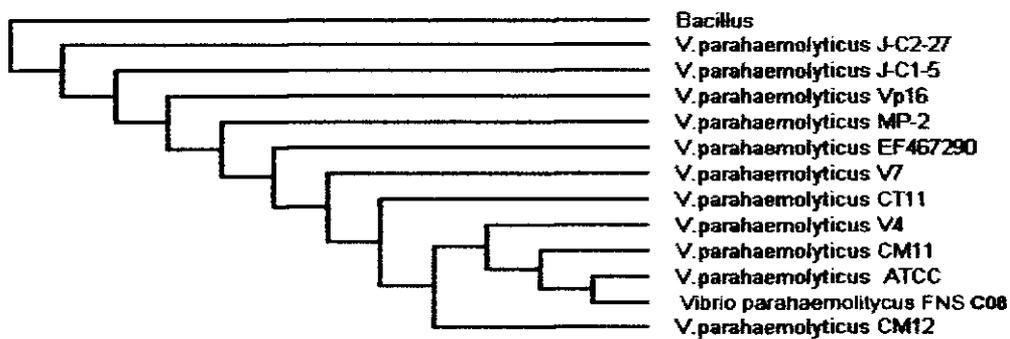
4.1.9. Pohon Filogenetik

Pohon filogenetik (*Phylogenetic trees*) membuat percabangan yang menghubungkan titik (nodes), yang merupakan unit taksonomi, seperti spesies atau gen; akar pohon merupakan titik yang bertindak sebagai tetua (nenek moyang) untuk seluruh organisme yang sedang dianalisis (Pramana, 2007).

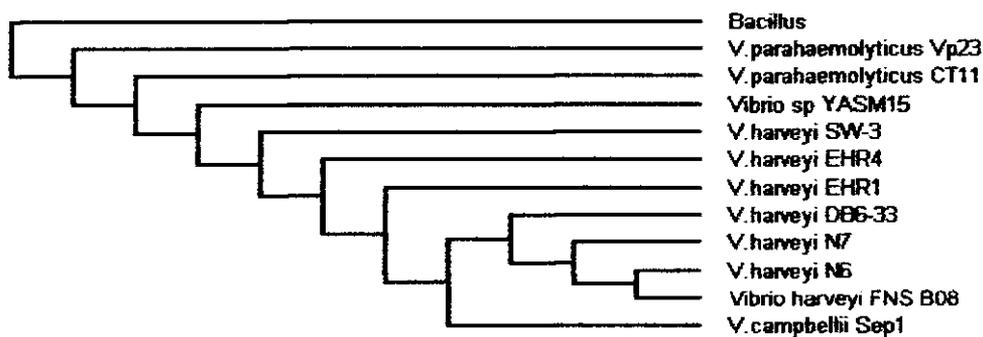
Alignment (penyejajaran) sekuens sampel dengan sekuens dari data base Gen Bank dilakukan menggunakan program Clustal X. Untuk memperoleh pohon filogenetik digunakan program N-J pada Clustal X dengan tingkat 100 x bootstrap.



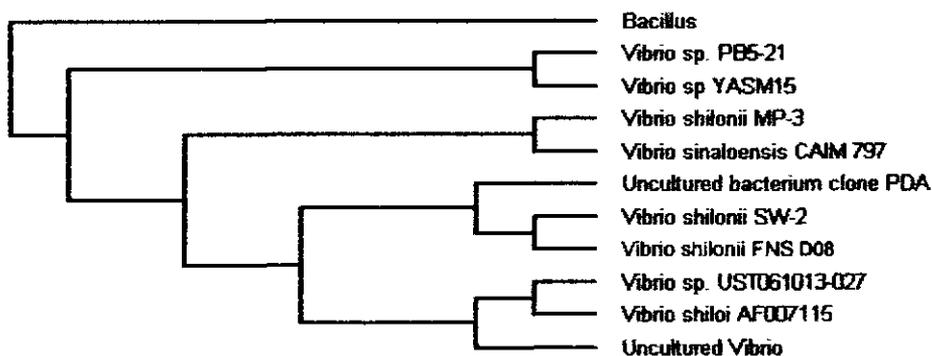
Gambar 5. Pohon filogenetik *Vibrio alginolyticus* FNS A08



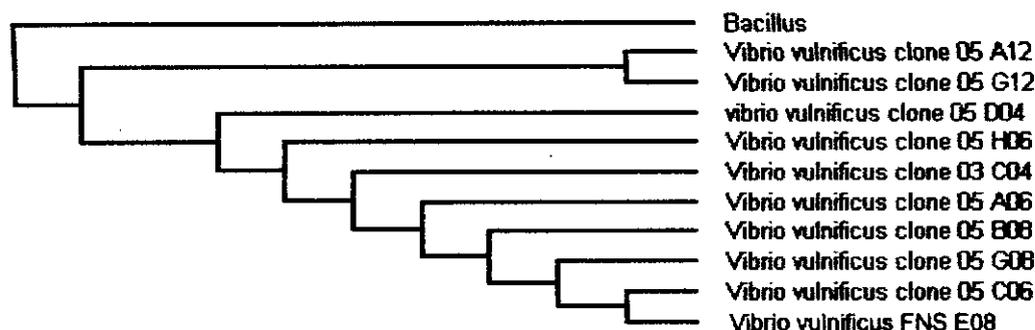
Gambar 6 . Pohon filogenetik *Vibrio parahaemolyticus* FNS C08



Gambar 7. Pohon filogenetik *Vibrio harveyi* FNS B08



Gambar 8. Pohon filogenetik *Vibrio shilonii* FNS D08



Gambar 9. Pohon filogenetik *Vibrio vulnificus* FNS E08

4.2. Pembahasan

Gen 16S rDNA merupakan komponen penting sel dan sangat menguntungkan dalam analisis filogenetik, karena terdiri dari daerah yang dikonversi sehingga mutasi akan terbatas, dan studi sistematika bakteri pada tingkat famili, genus, spesies, ataupun subspecies (Chen *et al*, 2003).

Analisis filogenetik dapat digunakan untuk menganalisa secara tepat keragaman genetik mikroba. Metode ini didasarkan proses urutan nukleotida gen 16S rDNA. Sekuen 16S rDNA pada banyak jasad mempunyai sekuen yang lestari sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk menganalisis kekerabatan antar jasad. Sekuen 16S rDNA dapat digunakan sebagai penanda filogenetik antara lain karena sekuen tersebut terdistribusi secara universal pada semua organisme, tidak mudah mengalami mutasi karena 16S rDNA merupakan salah satu komponen penting dalam ekspresi genetik, mempunyai sekuen lestari yang panjang dan mempunyai daerah yang bervariasi yang cukup untuk menentukan kekerabatan antar jasad (Yuwono, 2006).

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 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 pathogenik karena kondisi lingkungan memungkinkan.

Uji morfologi dan biokimia terhadap kesebelas isolat *Vibrio* mempunyai karakteristik yang sama dengan penjelasan Austin dan Austin (1993). Kesebelas isolat *Vibrio* yang diidentifikasi adalah bersifat gram negatif, memiliki motilitas positif, uji katalase dan oksidase positif, serta rata-rata memiliki bentuk sel yang hampir sama yaitu sel batang. Hal ini menunjukkan bahwa isolat memproduksi enzim katalase dan termasuk bakteri aerob.

Pengambilan gambar pada gel agarose yang telah dielektroforesis, fragmen DNA yang terlihat adalah DNA isolat A, D, E, H, dan I pada ukuran 1500 pb (pasang basa. Fragmen DNA keenam isolat lainnya tidak tampak karena tidak terjadi amplifikasi secara sempurna. Hal ini disebabkan beberapa hal, yakni bila suhu *annealing* yang terlalu tinggi, atau karena primer yang digunakan kurang sesuai.

Menurut Handayani (2008) dari tabel homologi sekuen 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. Hagstrom *et al* (2000) menyatakan bahwa isolat yang mempunyai persamaan sekuens 16S rDNA lebih besar dari 97% dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuen antara 93%-97% dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies.

Hasil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, menunjukkan bahwa kelima sampel yang berasal dari salah satu lokasi tambak di Desa Bantan Air Kabupaten Bengkalis adalah *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio shilonii*, dan *Vibrio vulnificus*.

Menurut Richie (2005), bahwa *Vibrio* sebagai patogen yang teridentifikasi dari sampel yang berasal tambak di Desa Kelapapati Kabupaten Bengkalis adalah *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus*.

Beberapa spesies *Vibrio* yang sering dijumpai menimbulkan penyakit pada udang antara lain: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, dan *V. parahaemolyticus*. Selanjutnya sifat serangan bakteri *Vibrio* adalah inveksi sekunder yaitu infeksi yang terjadi setelah adanya luka dan stres berat. Ciri-ciri udang yang terserang ditandai

dengan gejala klinis di mana udang terlihat lemah, berwarna merah gelap atau pucat, antena dan kaki renang berwarna merah (Marhadi, 2002).

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 swarm pada media padat non selektif. Ciri lain adalah gram negatif, motil, bentuk batang, 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 sakit (*Penaeus japonicus*) yang dipurifikasi dengan *Fast Protein Liquid Chromatography* dengan interaksi *hydrophobic* (sepharose Hig fenil 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, bentuk batang (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 a 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 fibrils (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.

V. harveyi bisa dideteksi dengan mengisolasi bakteri ini dari tubuh udang atau ikan yang sakit dan menanamnya pada media agar selektif untuk *Vibrio* (TCBS) agar. Koloni yang tumbuh berwarna kuning dan hijau (Hasan dan Parlindungan, 1993).

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 sakit (*Penaeus monodon*). Protease mematikan bagi *P. monodon* dengan kadar LD₅₀ dari 0,3 µg protein pergram udang.

Cysteine protease merupakan toksin utama yang diproduksi oleh bakteri ini. Protease ini merupakan toksin *cysteine protease* pertama yang ditemukan pada *Vibrio* (Liu dan Lee, 1999).

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 (11 dari 13) hanya terdapat gen *hemolysin* tunggal (Zhang, Meaden, dan Asutin, 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*. Pathogen ini mengikat *galactoside*-yang mengandung sel reseptor dalam lendir karang, dan kemudian menembus lapisan karang, di mana bakteri berkembang, mencapai $> 10^8$ 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 pathogen. 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).

Handayani (2008) menyatakan bahwa hasil penelusuran dari NCBI bahwa salah satu isolat yang ditemukan adalah *V. vulnificus*. Bakteri ini memiliki ciri-ciri yaitu berwarna biru sampai hijau, diameter 2-3 mm. Bentuk koloni batang, sel berbentuk basilus, bersifat motil dan dapat tumbuh pada suhu 25- 37 °C. Selain itu, bakteri ini juga bersifat katalase negatif.

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

septicemia. Pada penelitian sebelumnya, ditemukan bahwa toksin RtxA. *V. vulnificus* yang dikeluarkan melalui RtxE transporter berperan terhadap sitotoksitas *V. vulnificus* melawan sel epitel usus (Lee, Choi, dan Kim, 2008).