

# Penghambatan Faktor Virulensi *Vibrio parahaemolyticus* Menggunakan Isolat Bakteri dari Saluran Pencernaan Ikan Kerapu

(*Inhibition of Vibrio parahaemolyticus* Virulence Factors Using Bacterial Isolates from Digestive Tract of Grouper)

Siti Nurlatifah<sup>1,2</sup>, Ida Bagus Gede Darmayasa<sup>1</sup>, Pande Gde Sasmita Julyantoro<sup>3\*</sup>, Putu Eka Sudaryatma<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Magister Biologi, Fakultas Matematika dan IPA, Universitas Udayana

<sup>2</sup>Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Denpasar, Kementerian Kelautan dan Perikanan

<sup>3</sup>Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Kelautan dan Perikanan, Universitas Udayana

\*Penulis untuk korespondensi: pande.sasmita@unud.ac.id

Diterima 12 Juli 2022, Disetujui 26 September 2022

## ABSTRAK

Ikan kerapu adalah komoditas perikanan yang bernilai ekonomis tinggi pada pasar domestik dan internasional. Akan tetapi, dalam budidaya ikan kerapu masih sering ditemukan kasus penyakit vibriosis yang berdampak terhadap kerugian ekonomi akibat kematian yang ditimbulkan. Penyakit ini disebabkan salah satunya oleh bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yang faktor virulensinya diregulasi oleh mekanisme *quorum sensing* (QS). Pencegahan penyakit bakteri selama ini sering dilakukan dengan menggunakan antibiotik yang berisiko munculnya bakteri resisten antibiotik. Salah satu upaya untuk menghindari hal tersebut adalah dengan menghambat sistem QS menggunakan bakteri pendegradasi molekul sinyal *N-acyl homoserine lactone* (AHL). Pada penelitian ini dilakukan isolasi kandidat bakteri pendegradasi AHL pada media menggunakan AHL komersial sebagai sumber N tunggal dan juga melakukan isolasi bakteri *V. parahaemolyticus* pada media *Thiosulfate-Citrate-BileSalts-Sucrose Agar* dari saluran pencernaan ikan kerapu. Pengaruh penambahan isolat kandidat pendegradasi AHL terhadap tiga faktor virulensi *V. parahaemolyticus* yaitu motilitas, produksi kaseinase dan hemolisa diuji dengan mengkultur *V. parahaemolyticus* dengan dan tanpa penambahan isolat pendegradasi AHL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2 isolat kandidat pendegradasi AHL yaitu SNA02 dan SNA03 mampu menurunkan ketiga faktor virulensi yang diuji tersebut. Hal ini mengindikasikan bahwa isolat SNA02 dan SNA03 berpotensi sebagai kandidat bakteri untuk mencegah penyakit vibriosis. Hasil ini diharapkan dapat membantu pembudidaya ikan kerapu dalam mengendalikan patogenitas bakteri *V. parahaemolyticus*.

**Kata kunci:** hemolisa, kaseinase, motilitas, *quorum sensing*, *Vibrio parahaemolyticus*

## ABSTRACT

The grouper fish has a high economic value both in domestic and international markets. However, vibriosis disease, which can cause the death of this fish, still becomes the major problem of grouper larviculture. This disease is caused by *Vibrio parahaemolyticus*, which is their virulence regulated by the quorum sensing (QS) mechanism. Prevention of bacterial diseases has been done by using antibiotics that led to the risk of development and spread of resistant pathogenic bacteria. To avoid these resistances, the inhibition of the QS system using *N-acyl homoserine lactone* (AHL) degrader bacteria has been well explored. In this study, the candidate of AHL-degrading bacteria was isolated on AHL-contained media as the single source of nitrogen (N), and *V. parahaemolyticus* was isolated using TCBS agar from the digestive tract of groupers. The effect of adding AHL-degrading bacteria candidates on the three virulence factors of *V. parahaemolyticus*, namely motility, caseinase production, and hemolysis, was carried out by culturing *V. parahaemolyticus* with and without the addition of AHL-degrading bacteria candidate. The results showed that two candidate isolates of AHL-degrading bacteria, namely SNA02 and SNA03, were able to reduce those three tested virulence factors. It indicates that SNA02 and SNA03 bacteria have a potency to prevent vibriosis disease. These results are expected to improve grouper fish aquaculture, especially in controlling the pathogenicity of *V. parahaemolyticus*.

**Keywords:** hemolysis, caseinase, motility, quorum sensing, *Vibrio parahaemolyticus*

## PENDAHULUAN

Kabupaten Buleleng Provinsi Bali merupakan salah satu sentra penghasil benih ikan kerapu di Indonesia. Data Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Kementerian Kelautan dan Perikanan menunjukkan bahwa produksi kerapu pada bulan Januari-Oktober 2017 mencapai 46.504 ton dengan kenaikan mencapai 300% dibandingkan tahun 2016 sebesar 11.504 ton (Sari, 2018). Komoditas ikan kerapu merupakan komoditas unggulan dalam ekspor perikanan dengan nilai ekonomis tinggi. Badan Pusat Statistik Provinsi Bali mencatat nilai ekspor ikan kerapu dalam kelompok ikan dan udang mencapai 26,84% segmen pasar dan volume 19.521.420 kg dalam tahun 2020 (BPS, 2021). Akan tetapi, kesuksesan budidaya ikan kerapu diikuti dengan penyakit yang dapat menggagalkan hasil pembenihan atau pembesaran (Sugama et al., 2012). Patogen penyebab penyakit infeksi ikan antara lain virus, jamur, protozoa dan bakteri (Yanuhar, 2019). Salah satu penyakit yang menyerang terutama pada tahap larva ikan kerapu adalah penyakit vibriosis yang disebabkan oleh bakteri air laut dari genus *Vibrio* dan menimbulkan kematian massal (Otta & Karunasagar, 2001; Noor, 2015).

Bakteri *Vibrio* ini biasanya ditemukan pada ikan kerapu yang memiliki “sindrom gelembung renang” dengan gejala klinis hilangnya kontrol daya apung ikan dan mata menonjol (Soemarjati et al., 2015). Beberapa penelitian menemukan bakteri patogen air laut menggunakan mekanisme *quorum sensing* untuk menimbulkan penyakit (Kievit & Iglewski, 2000). *Quorum sensing* (QS) merupakan proses komunikasi bakteri melalui pelepasan dan penangkapan sinyal molekuler dari dan menuju lingkungan sekitar sampai batas yang dibutuhkan bakteri untuk mengekspresikan faktor virulensi yang dapat memunculkan penyakit (Wiyoto & Ekasari, 2010). Oleh karena itu, pengukuran tingkat patogenitas dan kejadian penyakit oleh bakteri dapat ditentukan oleh aktivitas *quorum sensing* bakteri tersebut (Soto et al., 2006).

Penanganan penyakit bakteri pada budidaya ikan kerapu pada umumnya menggunakan terapi antibiotik (Soemarjati et al., 2015). Jenis antibiotik yang umum digunakan di Indonesia dalam budidaya ikan adalah kloramfenikol, oksitetrasiklin dan furazolidon (Zafran et al., 1997). Sedangkan penggunaan jenis sediaan antibiotik dapat berbeda seperti di Brazil dilaporkan menggunakan sediaan jenis tetrasiklin, ampisilin, nitrofurantoin, gentamisin, oksitetrasiklin, siprofloksasin, kloramfenikol dan streptomisin (Rocha et al., 2016). Penggunaan antibiotik dengan dosis yang tidak tepat secara berulang berpotensi memunculkan strain bakteri resisten terhadap antibiotik (Zafran et al.,

1997). Beberapa isolat bakteri genus *Vibrio* dari lokasi budidaya komersial di Bali dan Jawa Timur dilaporkan menunjukkan resistensi terhadap oksitetrasiklin, kloramfenikol, dan furazolidon (Zafran et al., 1997). Pada sampel bakteri yang diisolasi dari sedimen dan air budidaya tambak udang di Brazil ditemukan 70 spesies *Vibrio* yang resisten terhadap antibiotik (Rocha et al., 2016) dan khusus *Vibrio parahaemolyticus* dari lingkungan tambak udang diketahui resisten terhadap oksitetrasiklin dan ampisilin (Yano et al., 2014). Resistensi antibiotik yang telah diketahui pada spesies *Vibrio* antara lain ditemukan pada *V. parahaemolyticus*, *V. cholera*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* dan *V. campbellii* (Wang et al., 2015).

Metode baru yang telah diterapkan untuk menekan pertumbuhan bakteripatogen pada budidaya ikan tanpa harus mematakannya dilakukan dengan mekanisme *quorum quenching* atau penghambatan *quorum sensing* (Soto et al., 2006). Metode ini menggunakan aktivitas bakteri lain untuk mengintervensi sistem *quorum sensing* bakteri patogen. Intervensi yang dilakukan berupa penghambatan biosintesis molekul sinyal, biodegradasi molekul sinyal dan aplikasi antagonis molekul sinyal (Wiyoto & Ekasari, 2010). Di Indonesia, metode ini masih sedikit dilakukan pada budidaya perikanan. Beberapa penelitian yang telah dilakukan antara lain terkait intervensi *quorum sensing* *Vibrio campbellii* pada larvikultur udang galah (Pande et al., 2013b), serta aplikasi bakteri anti-*quorum sensing* untuk menghambat virulensi penyakit bakteri patogen pada ikan lele dan bakteri pendegradasi N-acylhomoserine lactone (AHL) sebagai anti-*quorum sensing* *Aeromonas hydrophila* (Novita et al., 2016).

N-acylhomoserine lactone (AHL) merupakan salah satu sinyal molekuler yang digunakan oleh bakteri gram negatif dalam sistem *quorum sensing* (Molina et al., 2003). Sehingga untuk menurunkan faktor virulensi pada bakteri patogen gram negatif dapat dilakukan dengan mendegradasi AHL menggunakan enzim pendegradasi AHL laktonase (Molina et al., 2003) dan acylase (Defoirdt et al., 2004), halogen furanon dari alga *Delisea pulchra*, N-hepilsulfanylacetyl-L-homoserine-lactone dari *Allium sativum* dan flustramine dari bryozoa *Flustrafollaceae* (Aini & Setyawan, 2006). Kelompok bakteri gram positif seperti *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* dan *Myoides*, diketahui memiliki kemampuan untuk mendegradasi AHL (Defoirdt et al., 2004) serta ditemukannya gen *nmul* sebagai pendegradasi AHL dari *Nitrosospira multififormis* (Aini and Setyawan, 2006). Penghambatan mekanisme QS dapat menghambat ekspresi faktor virulensi bakteri patogen (Dong et al., 2002). Berdasarkan hal itu, tujuan dari penelitian ini adalah mencari

bakteri pendegradasi AHL yang diisolasi dari ikan kerapu (*Epinephelus fuscoguttatus*) sebagai kandidat penghambat faktor virulensi dari *V. parahaemolyticus* dengan melakukan uji kultur bersama dan melihat penghambatan faktor virulensi secara *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Denpasar (Balai KIPM Denpasar) di Jalan Sunset Road, Kuta, Badung-Bali dari bulan Agustus 2020 sampai dengan November 2021. Sampel ikan kerapu yang digunakan diperoleh dari Unit Usaha Pembudidaya Ikan (UUPI) yang ada Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng, Bali.

### Pengambilan Sampel Ikan Kerapu

Sampel ikan kerapu yang digunakan untuk mengisolasi bakteri diambil dari empat Unit Usaha Pembudidaya Ikan (UUPI) yang ada di Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng, Bali. Kriteria sampel ikan yang diambil yaitu ikan yang sehat tanpa menunjukkan gejala klinis penyakit virus. Ikan diambil langsung dari kolam budidaya, dikemas menggunakan plastik, diberi oksigen dan dimasukkan ke dalam boks yang berisi es untuk menjaga kestabilan suhu selama proses transportasi ke laboratorium Balai KIPM Denpasar.

### Isolasi Bakteri

Ikan kerapu dipingsankan dengan perendaman air laut dan es sebanyak 1:1 selama 2 menit. Setelah pingsan, ikan dieuthanasia dengan cara memotong bagian kepala dan tubuh. Kemudian dilanjutkan dengan pembedahan dengan mengambil saluran pencernaan bagian depan dan belakang ikan kerapu sebanyak 1 gram, kemudian dicacah dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL larutan 3% NaCl steril (NaCl 3%), kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Homogenat ini disiapkan untuk isolasi bakteri *Vibrio* dan bakteri pendegradasi bakteri AHL.

#### a. Bakteri genus *Vibrio*

Homogenat dipindahkan 1 mL ke *Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agar* mengandung 3% NaCl (TCBSA 3%; Merck, Germany) dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu  $37 \pm 2$  °C untuk mengisolasi bakteri genus *Vibrio* (Lindow, 1982). Koloni *Vibrio*

yang tumbuh berwarna hijau pada media TCBSA dimurnikan dan diperbanyak pada media *Tryptone Soy Agar* (Merck, Germany) dengan 3% NaCl (TSA 3%), kemudian disimpan sebagai stok pada media semi solid pada suhu ruang untuk pengerjaan selanjutnya (Holt et al., 1994).

#### b. Bakteri pendegradasi AHL

Larutan sampel diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 mL NaCl 3% steril dan mengandung 50 mg/L N-acyl-homoserine-lactone (AHL; Sigma Aldrich, UK) dan diinkubasi pada suhu 24°C. Isolasi bakteri pendegradasi AHL dilakukan sebanyak empat siklus berturut-turut dengan waktu 72 jam untuk siklus pertama dan 48 jam untuk siklus kedua hingga keempat. Di setiap siklus, 50 µl suspensi awal dipindahkan ke tabung reaksi baru yang berisikan NaCl dan AHL di atas. Pada akhir siklus keempat, satu ose digoreskan pada agar *Luria-Bertani broth* (Merck, Germany) yang mengandung 3% NaCl (LB3%) kemudian diinkubasi pada 24°C. Setelah 48 jam koloni diinokulasikan kembali dalam LB3% selama 24 jam pada suhu 24°C dan dilakukan tiga kali pemurnian. Isolat murni tersebut diperbanyak pada media TSA 3%, kemudian disimpan sebagai stok pada media semi solid.

### Identifikasi Bakteri

Bakteri *Vibrio* dan pendegradasi AHL dikarakterisasi dengan uji morfologi, uji fisiologis, dan uji biokimia. Uji tersebut merupakan suatu cara untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologis dan fenotipnya (Petczer and Chan, 2010). Uji morfologi bakteri dilakukan dengan cara pengamatan makroskopis langsung pada koloni bakteri yang terbentuk. Uji fisiologis bakteri dilakukan dengan metode pewarnaan gram. Uji biokimia disesuaikan dengan kunci determinasi dari *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994) untuk identifikasi hingga tingkat spesies. Sebagai kontrol positif jenis koloni dan uji biokimia isolasi bakteri *Vibrio*, maka digunakan *V. parahaemolyticus* ATCC 17802.

### Polymerase chain reaction (PCR)

DNA isolat *Vibrio* diekstraksi menggunakan Viral Nucleic Acid Extraction Kit II® (GeneAid, Taiwan) mengikuti protokol yang diterbitkan perusahaan penyedia. DNA tersebut diidentifikasi sebagai spesies *V. parahaemolyticus* dengan menggunakan PCR sesuai dengan Yu et al (2010), dengan konsentrasi akhir masing-

masing primer adalah 0,32  $\mu\text{M}$  dan menggunakan 2  $\mu\text{l}$  template DNA. Amplifikasi PCR menggunakan reagen *MyTaq HS MixII* (Bioline, Germany) dengan total reaksi 25  $\mu\text{l}$ . Penelitian ini menggunakan setengah volume reaksi yang dipersyaratkan dengan alasan efisiensi. Primer target gen *irgB* pada *V. parahaemolyticus* sesuai dengan RIMD 2210633 *chromosome-1* yang didapatkan dari *Gen Bank* akses No. BA000031 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) didesain sebagai berikut: VP-irgF: 5'-CGATACACACCACGATCCAG-3' dan VP-irgR: 5'-ATACGGCCGGGGTGATGTTTCT-3'.

Kondisi amplifikasi mengikuti proses denaturasi awal 94 °C selama 2 menit, diikuti dengan 30 siklus proses (94 °C selama 30 detik, 58 °C selama 30 detik and 72 °C selama 30 detik) dan ekstensi final 72 °C selama 10 min. Hasil amplifikasi di elektroporesis menggunakan Mupid-one (Advance, Jepang) dengan media agarose 1,5% (Biorad, USA), produk 369 bp merupakan produk target PCR yang didokumentasikan menggunakan UV-transilluminaor (Clever Scientific, China). *V. parahaemolyticus* ATCC 17082 digunakan sebagai kontrol positif pada uji sensitifitas PCR, yang diencerkan dengan kelipatan 10 dan diamplifikasi dengan metoda diatas.

#### Kultur Bakteri *V. parahaemolyticus* dan Bakteri pendegradasi AHL

eri pendegradasi AHL dan *V. parahaemolyticus* yang didapat dari hasil isolasi di saluran pencernaan ikan kerapu, diuji kemampuannya dalam menghambat faktor virulensi dari *V. parahaemolyticus*. Kultur *V. parahaemolyticus* dan bakteri pendegradasi AHL yang telah disimpan pada media semi solid, dikultur di 500 $\mu\text{l}$  3% NaCl *Nutrient Broth* (NB 3%; Merck, Germany) selama 24 jam dengan suhu 37°C. Selanjutnya di-vortex selama 10 detik, kemudian diambil 100  $\mu\text{L}$  dan ditambahkan pada 9,9 mL NB 3%, dan diinkubasikan pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, masing-masing bakteri diambil sebanyak 1 ml dengan kepadatan  $10^6$  CFU/ml untuk *V. parahaemolyticus* dikultur bersama dengan 1 ml kandidat bakteri pendegradasi AHL pada kepadatan masing-masing  $10^4$ ,  $10^6$  dan  $10^8$  CFU/ml secara terpisah dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Pada kultur bersama tersebut dihitung kepadatan *Vibrio parahaemolyticus* pada media TCBSA 3% yang dilanjutkan dengan inkubasi selama 24 jam. Kontrol pada metode ini adalah kultur *V. parahaemolyticus* tanpa penambahan bakteri pendegradasi AHL. Jumlah koloni bakteri kontrol dan koloni kultur bersama yang berwarna hijau pada media TCBSA 3% yang tumbuh disebut sebagai *Total Vibrio Count* (TVC).

#### Uji Penghambatan Faktor Virulensi dari *V. parahaemolyticus*

Untuk melihat kemampuan bakteri pendegradasi AHL dalam menekan faktor virulensi pada *V. parahaemolyticus*, dilakukan uji motilitas, kaseinase dan hemolisa. Kultur bersama antara bakteri *V. parahaemolyticus* ( $10^6$  CFU/ml) dan bakteri pendegradasi AHL ( $10^4$ ,  $10^6$  dan  $10^8$  CFU/ml) dengan perbandingan volume 1:1 yang diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Hasil kultur bersama itu diinokulasikan pada bagian tengah media TSA 3% semi padat (5% agar) dan diukur luasan masing-masing pertumbuhan bakteri pada uji motilitas, luasan permukaan bakteri mendegradasi kasein pada media skim agar (uji kaseinase) dan luasan hemolisa darah pada media *blood agar* (uji hemolisa) (Fajriani et al., 2018). Kultur tunggal *V. parahaemolyticus* digunakan sebagai kontrol.

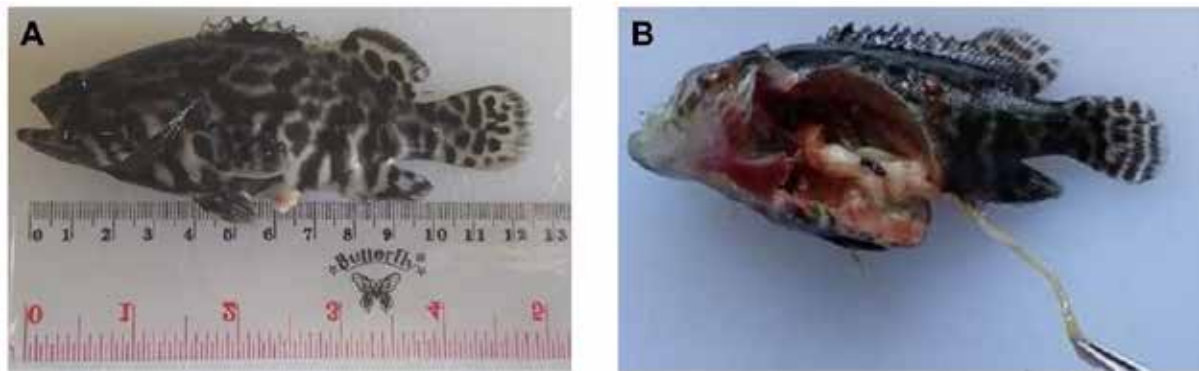
#### Analisis Data

Data yang didapat diolah dan dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif dalam bentuk grafik menggunakan software microsoft excel ver. 16.64 (22081401) (<https://www.office.com/>) dan R studio ver. 1.0.143 (<https://www.rstudio.com/>).

## HASIL

Ikan kerapu yang digunakan untuk isolasi bakteri sejumlah 31 ekor berukuran  $12,3 \pm 7,37$  cm dengan berat  $138,2 \pm 12,45$  gram (Gambar 1). Sebanyak tujuh kandidat isolat yang diduga genus *Vibrio* dari hasil uji morfologi, fisiologis, dan biokimia, selanjutnya dikonfirmasi menggunakan PCR. Hasil menunjukkan bahwa hanya satu isolat yang dikonfirmasi sebagai *V. parahaemolyticus*. Bentuk koloni dari bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan hasil PCR dapat dilihat pada Gambar 2 dan pada Tabel 1 dapat dilihat hasil uji biokimia *V. parahaemolyticus*.

Bakteri pendegradasi AHL dikoleksi sebanyak empat jenis koloni bakteri yang berhasil diisolasi dan dimurnikan, yaitu isolat SNA01, SNA02, SNA03 dan SNA04. Hasil uji biokimia terhadap seluruh isolat bakteri pendegradasi AHL disajikan pada Tabel 2. Seluruh isolat bakteri pendegradasi AHL ini digunakan untuk uji kultur bersama sebagai penghambat faktor virulensi dari bakteri *V. parahaemolyticus*. Untuk mengetahui adanya interaksi agonis atau antagonis dari pertumbuhan dari bakteri pendegradasi AHL terhadap *V. parahaemolyticus* maka *Total Vibrio Count* (TVC) dapat dilihat pada Tabel 3. Bakteri SNA01–SNA04



Gambar 1 Sampel ikan kerapu yang digunakan pada penelitian (A) dan dilakukan nekropsi untuk tujuan pengambilan sampel pada saluran pencernaan belakang (B).

Tabel 1 Hasil uji biokimia isolat bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan kerapu dan ATCC No. 17802

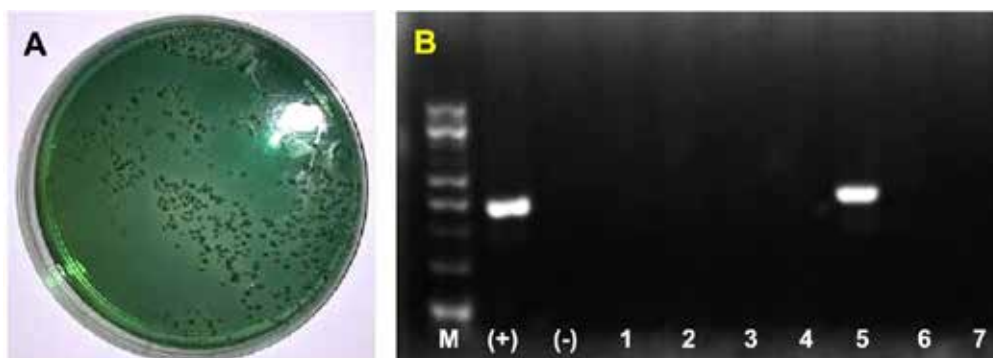
Karakter	ATCC 17802	SNV01
Gram	negatif	negatif
Katalase	+	+
Oksidase	+	+
Produksi indol	+	+
Methyl Red	+	+
VP	-	-
Simon sitrat	+	+
Produksi H <sub>2</sub> S	-	-
Hidrolisis urea	-	-
Lisin dekarboksilase	+	+
Ornitin dekarboksilase	+	+
D-Glucose, acid	+	+
D-Glucose, gas	-	-
Arabinose, acid	+	+
Cellobiose, acid	-	-
Dulcitol, acid	-	-
Myo-Inositol, acid	-	-
Lactose, acid	-	-
D-Mannitol, acid	+	+
D-Sorbitol, acid	-	-
Sucrose, acid	-	-
Nitrate reduction	+	+
Oxidase	+	+

Tabel 2 Hasil uji biokimia isolat bakteri gram positif pendegradasi AHL yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan kerapu

Karakter	SNA01	SNA02	SNA03	SNA04
Produksi indol	-	-	-	-
Methyl red	+	+	+	+
VP	-	-	-	-
Simon sitrat	-	+	-	+
Produksi H <sub>2</sub> S	+	+	+	+
Hidrolisis urea	+	+	+	-
Lisin dekarboksilase	+	+	+	+
Ornitin dekarboksilase	+	+	+	+
D-Glucose, acid	-	-	-	+
D-Glucose, gas	-	+	-	+
Arabinose, acid	-	-	-	-
Cellobiose, acid	-	-	-	-
Dulcitol, acid	-	-	-	-
Myo-Inositol, acid	-	-	-	-
Lactose, acid	-	-	-	-
D-Mannitol, acid	-	-	-	+
D-Sorbitol, acid	-	-	-	-
Sucrose, acid	-	-	-	+
Nitrate reduction	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+

Tabel 3 Total Vibrio Count (TVC) pada kultur bersama *Vibrio parahaemolyticus* (Vp; 10<sup>6</sup> CFU/ml) dan bakteri pendegradasi AHL pada berbagai konsentrasi (SNA01 – SNA04; 10<sup>4</sup> – 10<sup>6</sup> CFU/ml).

Konsentrasi awal bakteri AHL	Total Vibrio Count (TVC)				
	SNA01	SNA02	SNA03	SNA04	Vp
10 <sup>4</sup>	6,05 × 10 <sup>5</sup>	1,24 × 10 <sup>6</sup>	2,85 × 10 <sup>4</sup>	1,82 × 10 <sup>6</sup>	
10 <sup>6</sup>	1,22 × 10 <sup>6</sup>	1,63 × 10 <sup>6</sup>	3,75 × 10 <sup>5</sup>	1,51 × 10 <sup>6</sup>	4,16 × 10 <sup>6</sup>
10 <sup>8</sup>	3,36 × 10 <sup>6</sup>	2,39 × 10 <sup>6</sup>	2,5 × 10 <sup>5</sup>	1,79 × 10 <sup>6</sup>	

Gambar 2 *Vibrio parahaemolyticus* dari saluran pencernaan ikan kerapu menggunakan media TCBSA yang berwarna hijau (A) dan dilakukan PCR dengan target gen *irgB* (B) tampak produk 369 bp pada sampel positif no. 5, dengan rincian berikut M: Ladder 100 bp, (+) kontrol positif ATCC, (-) kontrol negatif, 1 - 7 sampel dari koloni yang berwarna hijau.



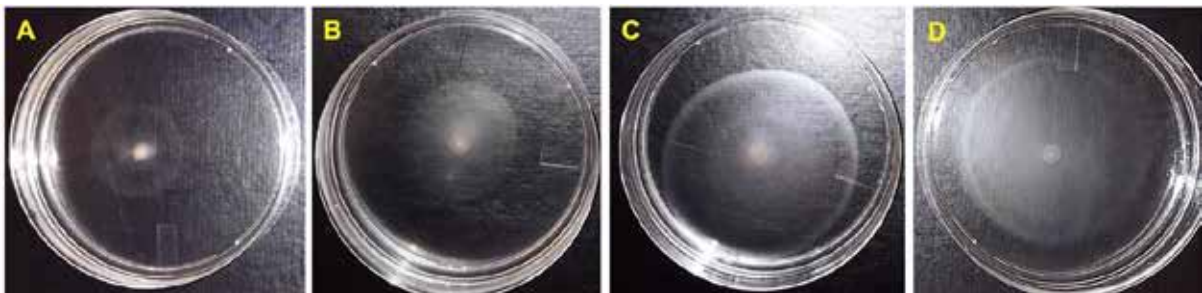
dengan konsentrasi yang berbeda menunjukkan adanya proses penghambatan pertumbuhan koloni bakteri *Vibrio parahaemolyticus*.

Pada media uji motilitas bakteri SNA01, SNA02 dan SNA03 menunjukkan adanya korelasi progresif dengan meningkatnya konsentrasi bakteri pendegradasi AHL dengan semakin besar luasan tumbuhnya kultur bersama bakteri dibandingkan bakteri kontrol. Luasan bakteri kultur bersama SNA02 dan SNA03 pada berbagai konsentrasi lebih kecil dibandingkan bakteri kontrol, hal ini dapat menjadi salah satu kandidat bakteri yang dapat menghambat faktor virulensi *V. parahaemolyticus*. Akan tetapi, hal ini tidak terjadi pada kultur bersama bakteri SNA04 (Gambar 3 dan 4).

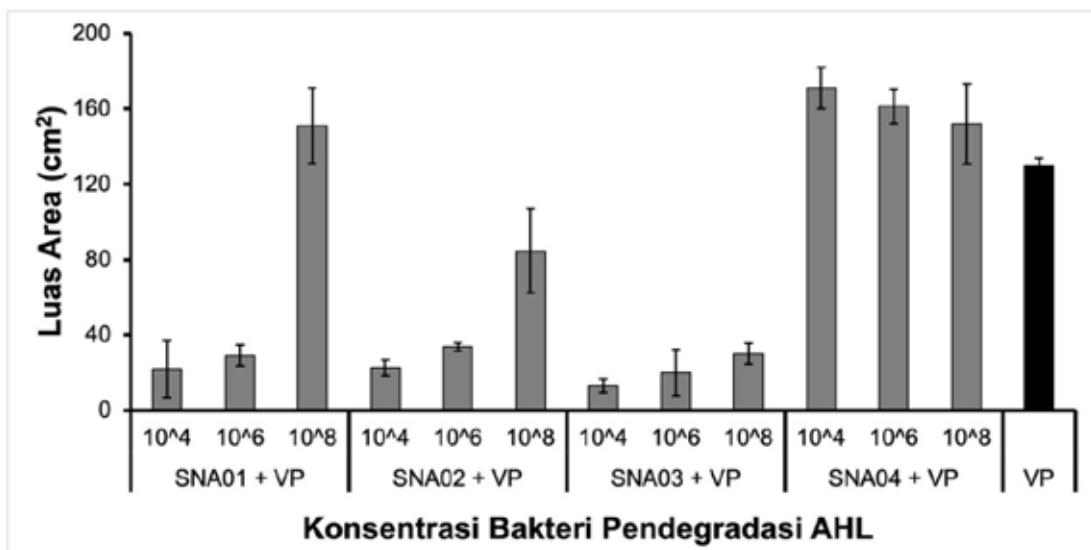
Pada uji kaseinase menggunakan agar susu skim, bakteri SNA02 dan SNA03 menunjukkan adanya penurunan luasan pada media dengan meningkatnya konsentrasi bakteri pendegradasi AHL. Akan tetapi,

hanya SNA03 konsentrasi  $10^6$  dan  $10^8$  CFU/ml yang luasannya lebih kecil dari bakteri kontrol. Hasil ini dapat menjadikan kandidat bakteri yang dapat menghambat faktor virulensi *V. parahaemolyticus*. Sedangkan luasan area tumbuh kultur bersama SNA01 meningkat sesuai dengan peningkatan konsentrasi SNA01 dan hanya konsentrasi  $10^4$  CFU/ml yang lebih kecil dibandingkan dengan bakteri kontrol. Kultur bersama bakteri SNA04 pada seluruh konsentrasi luasan tumbuhnya lebih kecil dari bakteri kontrol. Hasil penelitian ini dapat dilihat pada gambar 5 dan 6.

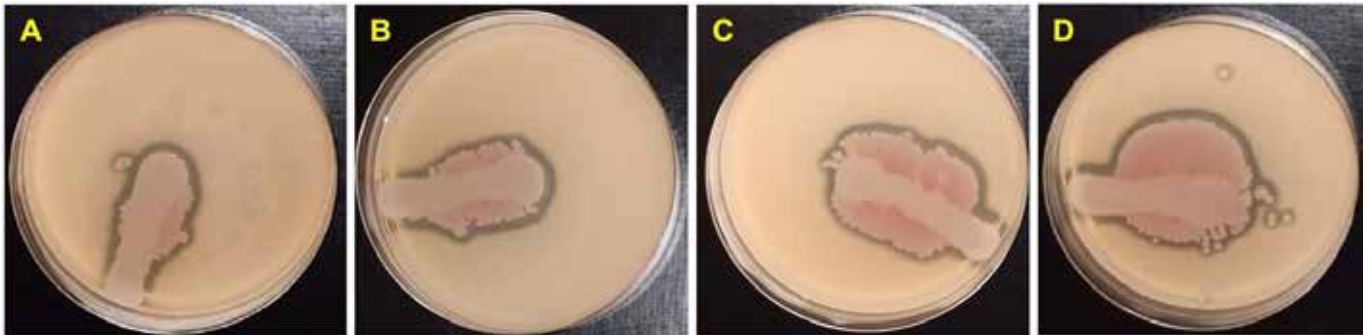
Pada uji hemolisa pada agar darah didapatkan bahwa bakteri SNA02 dan SNA03 menunjukkan adanya penurunan luasan pada media dengan meningkatnya konsentrasi bakteri pendegradasi AHL pada konsentrasi  $10^6$  dan  $10^8$  CFU/ml. Sedangkan hasil terbalik ditunjukkan pada bakteri SNA01 dan SNA04 seperti terlihat pada Gambar 7 dan 8.



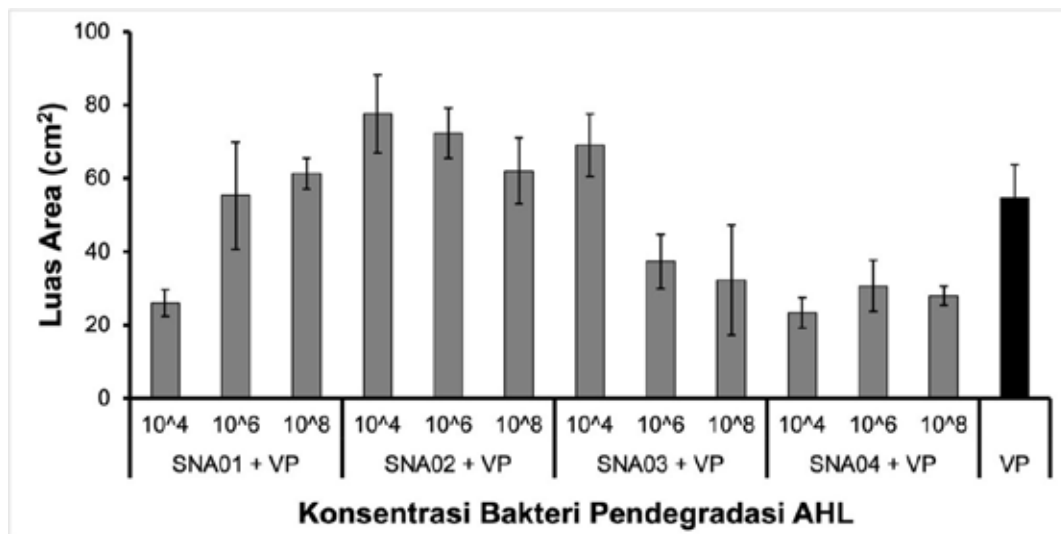
Gambar 3 Perbandingan luas area uji motilitas pada kultur bersama *Vibrio parahaemolyticus* dan bakteri pendegradasi AHL (SNA01) dengan konsentrasi yang berbeda-beda  $10^4$  (A),  $10^6$  (B),  $10^8$  (C) CFU/ml dan kontrol *Vibrio parahaemolyticus*  $10^6$  CFU/ml (D).



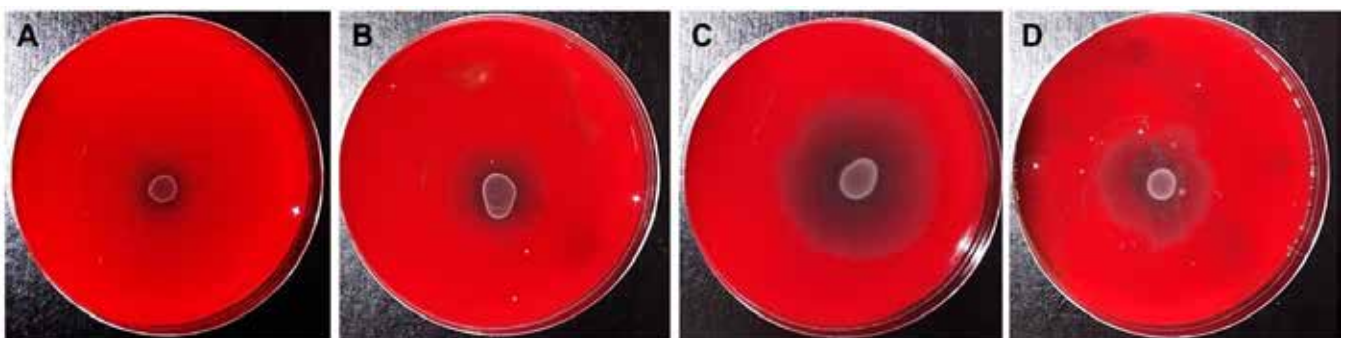
Gambar 4 Uji motilitas pada kultur bersama *Vibrio parahaemolyticus*  $10^6$  CFU/ml dan bakteri pendegradasi AHL dengan konsentrasi yang berbeda-beda.



Gambar 5 Perbandingan luas area uji kaseinase pada kultur bersama *Vibrio parahaemolyticus* dan bakteri pendegradasi AHL (SNA01) dengan konsentrasi  $10^4$  (A),  $10^6$  (B),  $10^8$  (C) CFU/ml dan kontrol *Vibrio parahaemolyticus*  $10^6$  CFU/ml (D).

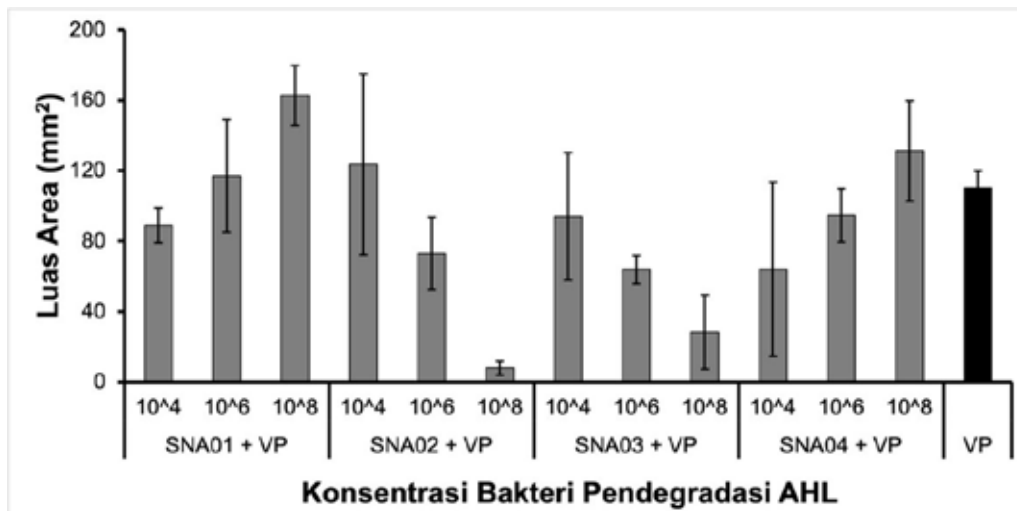


Gambar 6 Uji kaseinase pada kultur bersama *Vibrio parahaemolyticus*  $10^6$  CFU/ml dan bakteri pendegradasi AHL dengan konsentrasi yang berbeda-beda.



Gambar 7 Perbandingan luas area uji hemolisa pada kultur bersama *Vibrio parahaemolyticus* dan bakteri pendegradasi AHL (SNA01) dengan konsentrasi yang berbeda-beda  $10^4$  (A),  $10^6$  (B),  $10^8$  (C) CFU/ml dan kontrol *Vibrio parahaemolyticus*  $10^6$  CFU/ml (D).





Gambar 8 Uji hemolisa pada kultur bersama *Vibrio parahaemolyticus* 10<sup>6</sup> CFU/ml dan bakteri pendegradasi AHL dengan konsentrasi yang berbeda-beda.

## PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri *V. parahaemolyticus* pada ikan kerapu yang tidak menampilkan gejala klinis penyakit virus maupun bakteri menunjukkan bahwa bakteri tersebut dapat hidup sebagai mikro flora normal pada saluran pencernaan ikan kerapu. Akan tetapi, bakteri ini dapat menjadi sumber penyakit bersumber makanan dari laut (*seafood borne pathogen*) dan menjadi penyakit pada ikan bersisip dan bertulang belakang (Kanjanosapa *et al.*, 2011). *V. parahaemolyticus* serotype O3:K6, O4:K68 dan O1:K<sub>untypeable</sub> pernah dilaporkan sebagai sumber penyebab penyakit pada ikan dan manusia (Jones *et al.*, 2012) dan strain unik dari bakteri ini menyebabkan *Early Mortality Syndrome* pada budidaya udang yang disebut sebagai penyakit *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (Li *et al.*, 2017).

Untuk dapat menyebabkan penyakit, *V. parahaemolyticus* memiliki kemiripan dengan *V. harveyi* yang memiliki sistem QS *type III secretion* (Henke & Bassler, 2004). *V. harveyi* menggunakan QS dalam banyak alur seperti *harveyi autoinducer-1* (HAI-1), *harveyi autoinducer-2*, dan *cholera autoinducer-1* (Henke and Bassler, 2004) dan sistem ini berbeda dengan bakteri gram negatif pada umumnya. Pada hal ini, *harveyi autoinducer-2* memiliki peran penting dalam mengatur produksi faktor virulen dan respons terhadap stres pada genus *Vibrio* (Chen *et al.*, 2002).

Berdasarkan hasil dari TVC menunjukkan adanya korelasi antara pertumbuhan bakteri patogen dengan ekspresi bakteri lain pada lingkungan *in vitro* tersebut. Penurunan pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* sinergi dengan penurunan faktor virulensi yang ditunjukkan pada ketiga jenis uji, yaitu:

kaseinase, motilitas dan hemolisa. Intervensi yang diberikan oleh bakteri SNA01 – SNA04 pada bakteri patogen *V. parahaemolyticus* dapat dijadikan kandidat dalam penghambatan QS. Penghambatan proses QS menjadi salah satu strategi dalam pengendalian penyakit bakterial pada budidaya perikanan. Teknik penghambatan adanya QS dapat dilakukan dengan menghambat biosintesa molekul sinyal, aplikasi antagonis dari QS, inaktivasi sinyal QS degradasi molekul sinyal menggunakan senyawa biologi atau kimia dan proses agonis QS lainnya (Defoirdt *et al.*, 2004).

Sistem komunikasi *quorum sensing* pada bakteri dengan menghasilkan molekul sinyal untuk dapat diekresikan sebagai media komunikasi bakteri tersebut di lingkungan yang sesuai dengan kebutuhan bakteri tersebut. Akumulasi dari sinyal yang dihasilkan pada konsentrasi tertentu dapat dideteksi oleh bakteri lain untuk dapat mengaktifkan gen target sebagai agonis atau antagonis komunikasi yang diperlukan (Defoirdt *et al.*, 2005). Bakteri gram negatif menggunakan sinyal molekul berupa AHL yang berfungsi sebagai sinyal interseluler yang menstimulasi ekspresi gen yang berkaitan pada kepadatan/konsentrasi sel pada lingkungan secara *in vivo* atau *in vitro* (Henke & Bassler, 2004; Kim *et al.*, 2005).

Bakteri pendegradasi AHL SNA01 – SNA04 pada hasil uji penghambatan faktor virulensi menghasilkan penurunan luas dari area tumbuh bakteri pada media spesifik masing-masing. Bakteri pendegradasi AHL dapat menghambat faktor virulen bakteri patogen, sehingga bakteri tersebut menjadi kandidat dalam terapi atau perlakuan mengurangi patogenitas *V. parahaemolyticus*. Hal ini dapat dijadikan sebagai cara pencegahan infeksi pada pembudidayaan ikan

dan udang sehingga tidak mengontaminasi manusia sebagai konsumen akhir tanpa menggunakan antibiotik atau disinfektan yang dapat menyebabkan resistensi organisme. Selain itu, komunikasi antar bakteri dapat dihambat dengan adanya penurunan konsentrasi bakteri pendegradasi AHL di lingkungan seperti yang terjadi pada fenomena uji kaseinase dan hemolisa bakteri SNA02 dan SNA03. Hal ini diakibatkan peningkatan jumlah AHL yang terjadi secara non-enzimatik, dari hidrolisis metabolit yang dihasilkan oleh konsentrasi bakteri pada pH tinggi. Dong et al. (2002) menunjukkan bahwa enzim AiiA yang diproduksi oleh *Bacillus* sp. dapat menghidrolisa AHL dengan adanya penurunan aktivitas enzim pektolitik ekstraseluler dan pelepasan sinyal AHL. Sejumlah kelompok peneliti telah berhasil menemukan senyawa yang berfungsi dalam penghambatan proses pembentukan biofilm, antibiofouling, penghambat biopendar, dan penghambat sintesis eksoenzim tanpa membunuh bakteri tersebut (Defoirdt et al., 2004). Selain itu, Kim et al. (2005) memperoleh senyawa penghambat quorum sensing AHL (Defoirdt et al., 2004) pada bakteri gram negatif.

Dalam menjaga ekosistem mikrobiologi dalam lingkungan perairan dapat dilakukan dengan menggunakan bahan biologis dengan cara menghambat atau mendukung pertumbuhan mikroorganisme tertentu, tanpa menggunakan antibiotik atau disinfektan. Selain itu, mekanisme penghambatan faktor virulensi yang menggunakan QS sebagai aktivitasnya dapat ditekan untuk membatasi perluasan infeksi target inang yang lainnya (Pande et al., 2013a). Sehingga didapatkan keseimbangan mikroorganisme perairan tersebut dan pelaku pembudidaya perikanan dapat dengan baik mengelola lingkungan tanpa bahan kimia. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai interaksi mikrobiom pada saluran pencernaan kerapu secara *in vivo* untuk melihat interaksi QS bakteri pendegradasi AHL dengan bakteri patogen lainnya.

Penghambatan faktor virulensi dari bakteri patogen *V. parahaemolyticus* ditunjukkan oleh kandidat bakteri pendegradasi AHL yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan kerapu. Bakteri yang menjadi kandidat sebagai penghambat faktor virulensi tersebut adalah SNA02 dan SNA03 sedangkan SNA01 dan SNA04 tidak memberikan efek faktor menghambat virulensi. Sinyal molekuler yang diekspresikan oleh bakteri pendegradasi AHL menghambat stimulasi dari faktor virulen *V. parahaemolyticus* yang menyebabkan penyakit vibriosis pada larva ikan kerapu. Untuk mengaplikasikan sistem ini pada budidaya perikanan, maka diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai interaksi dan kultur bersama secara *in vivo* pada budidaya ikan kerapu.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”

## DAFTAR PUSTAKA

- Aini, N., Setyawan, A.D., 2006. Review: Senyawa Bioaktif Penghambat Sistem Quorum Sensing pada Bakteri Gram Negatif. *Biofarmasi* 4, 34–40.
- BPS, 2021. Ekspor Provinsi Bali Menurut Kelompok Komoditas Utama 2019-2020 [WWW Document]. Badan Pus. Stat. Provinsi Bali. URL <https://bali.bps.go.id/statictable/2018/02/27/41-ekspor-provinsi-bali-menurut-kelompok-komoditas-utama-2019-2020.html> (accessed 5.20.21).
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczar, I., Bassler, B.L., Hughson, F.M., 2002. Structural identification of a bacterial quorum sensing signal containing boron. *Nature* 415, 545–549.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., Verstraete, W., 2004. Disruption of Bacterial Quorum Sensing: unexplored strategy to fight infection in aquaculture. *Aquaculture* 240, 69–88.
- Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2005. The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Env. Microbiol* 7, 472–479.
- Dong, H., Gusti, A., Zhang, Q., Xu, J., Zhang, L., 2002. Identification of quorum quenching N-acyl-homoserine lactone from *Bacillus* species. *Appl Env. Microbiol* 64, 1754–1759.
- Fajriani, B., Budiharjo, A., Pujiyanto, S., 2018. Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Antagonis Terhadap *Vibrio parahaemolyticus* Patogen pada Udang *Litopenaeus vannamei* dari Produk Probiotik dan Sedimen Mangrove di Rembang. *J. Biol* 7, 52–53.
- Henke, J.M., Bassler, B.L., 2004. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol* 186, 3794–3805.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., William, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore.
- Jones, J.L., Ludeke, C.H., Bowers, J.C., Garret, N., Fischer, M., Parson, M.B., Bopp, C.A., DePaola, A., 2012. Biochemical, serological and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Clin. Microbiol* 50, 2343–2352.
- Kanjanosapa, D., Pimpa, B., Chowpongpan, S., 2011. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadara ganosa*) harvested from the south coast

- of Thailand. *Songklanakarin J. Sci. Technol* 33, 295–300.
- Kievit, T.R., Iglewski, B.H., 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68, 49.
- Kim, Y.H., Kim, Y.H., Kim, J.S., Park, S., 2005. Development of sensitive bioassay method for quorum sensing inhibitor screening using recombinant *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10, 322–328.
- Li, P., Kinch, L.N., Ray, A., Dalia, A.B., Cong, Q., Nunan, L.M., Camilli, A., Grishin, N. V., Salomon, D., Orth, K., 2017. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease-Causing *Vibrio parahaemolyticus* strains Maintain an antibacteriophage type IV secretion system with versatile effector repertoires. *Appl. Environ. Microbiol* 16.
- Lindow, S., 1982. *Phytopathogenic Prokaryotes*, 2nd ed. Elsevier.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michael, L., Reimann, C., Duffy, B., Defago, G., 2003. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 71–81.
- Noor, N., 2015. Effect Of Quorum Sensing And Its Degradation On The Virulence Of *Vibrio harveyi* Towards Tiger Grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal Larvae. *Universiti Putra Malaysia*.
- Novita, H., Rusmana, I., Yuhana, M., Pasaribu, G.H., Lusastuti, A.M., 2016. Uji In Vitro Bakteri Anti Quorum Sensing Pendegradasi Acyl Homoserine Lactone *Aeromonas hydrophila*. *J. Ris. Akuakultur* 11, 291–296.
- Otta, S.K., Karunasagar, I., 2001. Bacteriological Study of Shrimp *Penaeus monodon* Fabricius, Hatcheries In India. *J. Appl Ichthyology* 17, 59–63.
- Pande, G.S.J., Natrah, F.M.I., Sorgeloos, P., Bossier, P., Defoirdt, T., 2013a. The *Vibrio campbellii* quorum sensing signals have a different impact on virulence of the bacterium towards different crustacean hosts. *Vet. Microbiol.* 167, 540–545.
- Pande, G.S.J., Scheje, A.A., Benneche, T., Wille, M., Sorgeloos, P., Bossier, P., Defoirdt, T., 2013b. Quorum sensing-disrupting compounds protect larvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* from *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 406–407, 121–124.
- Petczar, M.J., Chan, E.C.S., 2010. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. UI Press, Jakarta.
- Rocha, R.S., Sousa, O. V., Vieira, R.H., 2016. Multidrug-resistant *Vibrio* associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 105, 337–340.
- Sari, 2018. *Produksi Ikan Kerapu 2017 Melompat*. *Bisnis Indonesia [WWW Document]*. *Bisnis Indones.* URL [industri.bisnis.com/read/20180114/99/726346/produksi-ikan-kerapu-2017-melompat](http://industri.bisnis.com/read/20180114/99/726346/produksi-ikan-kerapu-2017-melompat) (accessed 7.5.21).
- Soemarjati, W., Muslim, A.B., Susiana, R., Saparinto, C., 2015. *Bisnis dan Budi Daya Kerapu*. Penebar Swadaya.
- Soto, M., Sanjuan, J., J, O., 2006. Rhizobia and plant pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* 152, 3167–3174.
- Sugama, K., Rimmer, M.A., Ismi, S., Koesharyani, I., Suwirya, K., Giri, N.A., Alava, V.R., 2012. *Hatchery management of tiger grouper (Epinephelus fuscoguttatus): a best-practice manual*, 2nd ed. *ACIAR Monograph Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra*.
- Wang, L., Chen, Y., Huang, H., Huang, Z., Chen, H., Shao, Z., 2015. Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 46, 395–404.
- Wiyoto, Ekasari, J., 2010. Kuorum Sensing Bakteri dan Peran Alga dalam Pengendalian Penyakit Bakterial dalam Akuakultur. *J. Akuakultur Indones.* 9, 110–118.
- Yano, Y., Hamano, K., Satomi, M., Tsutsui, I., Ban, M., Aue-umneoy, D., 2014. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. *Food Control* 38, 30–36.
- Yanuhar, U., 2019. *Budi Daya Ikan Laut “Si Cantik Kerapu.”* UB Press, Malang.
- Yu, S., Chen, W., Wang, D., He, X., Zhu, X., Shi, X., 2010. Species-specific PCR detection of the food-borne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* using the *irgB* gene identified by comparative genomic analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 307, 65–71.
- Zafran, D., Rosa, Koesharyani, 1997. Resistensi Isolat dari Beberapa Pantu Benih Udang Windu (*Penaeus monodon*) terhadap Antibiotik. *J. Penelit. Perikan. Indones.* 3, 11–15.