

**MEKANISME INFEKSI VIBRIO PADA RESEPTOR IKAN KERAPU TIKUS
*Cromileptes altivelis***

THE MECHANISM OF VIBRIO INFECTION TO GROUPEL RESEPTOR *Cromileptes altivelis*

Uun Yanuhar

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia
Jl. Veteran, Malang 65145
Telp. 0341-553512

Abstract

One of the most favourite fish that farmer fish cultivated because its high economic value was grouper (*C. altivelis*). The obstacle in cultivation system was caused by *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* infection. Many diseases that attacked to the grouper was caused by the role of pathogen specific as a ligand and its receptor.

The aim of these study was to improve and to know the role of receptor in vibriosis mechanism with tested specific receptor protein of grouper *Cromileptes altivelis*. These study used experimental and descriptive methods with identified of grouper receptor, Hemagglutinin test and observation use electron microscope.

These study result showed that receptor protein of *C. altivelis* was found in its eyes. These showed specificity and reactivity to the vibriosis specific epitope.

Keywords : receptor, grouper, vibriosis

Pendahuluan

Sebagai komoditas ekspor kedua setelah udang, ikan kerapu bebek atau kerapu tikus (*C. altivelis*) saat ini merupakan salah satu jenis ikan yang sangat diminati oleh petani ikan untuk dibudidayakan karena mempunyai nilai ekonomis tinggi, akan tetapi dalam perkembangan budidaya ikan kerapu ini masih dihadapkan pada beberapa masalah, diantaranya adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroba yaitu bakteri seperti *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *V. harveyi* dan *V. fulnivicus*). Pada juvenil ikan kerapu tikus dengan rata-rata berat 9,91 gram-15,40 gram dan panjang 6-10 cm rentan terhadap infeksi mikroba. Kematian masal yang disebabkan oleh penyakit infeksi tersebut mencapai 90-100% (rata-rata 93,3%) selama 21 hari. Kematian ikan kerapu tidak hanya terjadi pada stadium larva dan *juvenile* secara masal tetapi juga pada induk kerapu yang dipelihara dalam bak induk hingga mencapai 40% (Mahardika & Zafran, 2004). Baru-baru ini ditemukan juga spesies *V. vulnificus* pada ikan kerapu tikus (Istiqomah *et al.*, 2006). Kerugian pada industri budidaya perikanan air laut dan tawar secara serius juga disebabkan oleh spesies *Vibrio* yang mengakibatkan kematian ikan budidaya pada tingkat benih mencapai 99% (Wang *et al.*, 1998) dan (Denkin & Nelson, 2004).

Hasil penelitian pendahuluan terhadap infeksi *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* dan *V. harveyi* dengan cara infeksi secara injeksi intramuscular dan juga secara perendaman menunjukkan bahwa kepadatan bakteri hingga 10^{8-10} CFU/ml pada ikan kerapu pasca infeksi terjadi kematian ikan pada jam ke- 8 dengan imonisasi, dengan gejala terjadinya luka borok menganga, dan perubahan perilaku, bergerak lamban, keseimbangan terganggu, yaitu berputar-putar (*whirling*) dan nafsu makan berkurang, akan tetapi ikan pada perlakuan perendaman ikan bertahan hingga 24 jam-96jam. Imonisasi secara intraperitoneal menunjukkan bahwa dengan imonisasi bakteri *V. alginolyticus* 10^{10} menunjukkan kematian hingga 5 jam pertama pasca infeksi dengan perubahan warna morfologi ikan menjadi kegelapan, inflamasi, sampai abses pada bekas injeksi, timbul bercak merah pada pangkal sirip, timbul perdarahan pada insang dan mulut, perut menggelembung hingga terjadi kematian. Yanuhar (2008) sebelumnya juga menjelaskan dalam penelitiannya bahwa gejala infeksi pada ikan kerapu dengan menggunakan jenis bakteri lain seperti *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* dan *V. harveyi*, akan tetapi tingkat keganasan berdasarkan identifikasi dengan menggunakan uji haemagglutinasinya, bakteri *V. alginolyticus* merupakan bakteri yang lebih virulen berdasarkan titer haemagglutinin yang telah

diujikan dengan eritrosit ikan kerapu . Berdasarkan tingkat serangan bakteri telah ditemukan sebelumnya bahwa pathogenesis bakteri *V. alginolyticus* diperankan oleh peran dan fungsi dari protein reseptor dan protein adhesi dari bakteri *V. alginolyticus* (Yanuhar, 2006), yaitu melibatkan peran reseptor spesifik pada permukaan sel (*specific cell surface molecule*) yang disebut sebagai reseptor adesi yang dapat digolongkan menjadi superfamili yaitu: immunoglobulin, cadherin, integrin dan selectin (Sudhakar & Subramani, 2006).

Materi dan Metode Penelitian

Material dalam penelitian ini meliputi, isolat bakteri *V. alginolyticus* , *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* dan ikan kerapu tikus dengan pemeriksaan scanning laser mikroskop.

Kultur *Vibrio* spp.

Dalam penelitian ini, bakteri yang digunakan adalah *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi* dan *V. parahaemolyticus*. Bakteri ini diperoleh dari BBAP Jepara dalam bentuk agar miring. Kemudian dilakukan kultur di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya. Kultur ini menggunakan media TCBS (uji konfirmasi), media BHI (uji protein) dan LB (uji DNA). Kultur dilakukan diawali dengan *Vibrio* ditanam pada media TCBS selama 24 jam pada suhu 24°C. Hasil dari biakan diambil dengan cara kerokan yang sebelumnya dituang PBS steril pH 7,4 secukupnya. Suspensi bakteri kemudian dimasukkan dalam botol yang berisi 500 ml Brain Heart Infusion Broth (BHI), kemudian digoyang kuat selama 30 menit pada penangas air suhu 37°C. selanjutnya suspensi bakteri sebanyak 250 ml dimasukkan dalam setiap botol yang mengandung media LB. Selanjutnya dilakukan pengeraman suhu 37°C selama 2 x 24 jam.

Test Haemagglutination

Petunjuk penelitian seperti dilakukan oleh Ehara dengan modifikasi (Sumarno *et al.*, 1991 dan Winarsih S., *et al.*, 1998). Hasil koleksi pili tersebut dilakukan SDS-PAGE. Gel dipotong lurus pada berat molekul yang diinginkan dan potongan pita tersebut dikumpulkan dan dimasukkan dalam tabung membran dialisa memakai cairan penyangga *elektroforesis running buffer*. Selanjutnya dilakukan elektroelusi menggunakan alat elektroforesis horisontal aliran 125 mV selama 25 menit. Hasil elektroforesis dilakukan dialisa dengan cairan penyangga PBS 2 liter pH 7,4 selama 1 x 24

jam dan 2 liter aquades selama 1 x 24 jam. Cairan dialisa yang berasal dari potongan pita SDS-Page tersebut dilakukan uji hemagglutination.

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-Page)

Monitoring berat molekul dikerjakan menggunakan SDS-Page metode *Laemmli* (1970). Sampel protein dipanaskan 100°C selama 5 menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris HCL pH 6,8, 5% 2-mercapto ethanol, 2,5% w/v sodium dodecyl sulfate, 10% v/v glycerol dengan warna pelacak *bromophenol blue*. Dipilih 12,5% mini slab gel dengan tracking gel 4%. Voltase yang digunakan 125 mV. Sebagai bahan warna adalah *coomassie brilliant blue* dan molekul standar *sigma low range marker*.

Teknik pemeriksaan Immunokimia

Antigen dan protein reseptor dari organ ikan kerapu *C. altivelis* sebanyak 20 µl diencerkan dalam sodium azida (NaN₃) 1% (1:4). Ditetaskan pada membran nitroselulosa yang telah dibasahi PBS yang terangkai pada alat Dot Blotter. Didegas selama 30 menit. Membran di-blocking dengan PBS-Skim 5% selama 1 jam. Dicuci dengan PBS-Tween 0,05% selama 3x3 menit. Inkubasi dengan antibodi primer (IgM) yang telah diencerkan dalam PBS-Skim 5% (1:200) selama 2 jam sambil digoyang. Dicuci 3x3 menit dengan PBS-Tween. Diinkubasi dengan antibody sekunder Anti IgM Alkaline Phosphatase (AP) Conjugated dalam TBS (1:2500) selama 1 jam sambil digoyang. Dicuci dengan PBS-Tween 0,05% selama 3x3 menit, dilanjutkan dengan inkubasi dalam substrat Western Blue (dalam ruang gelap) selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan aquades. Membran dikeringkan dan diamati ada tidaknya noda berwarna biru gelap.

Hasil dan Pembahasan

Tes Haemagglutination *Vibrio* spp.

Hasil penelitian terhadap tes haemagglutination pada *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* dan *V. harveyi* menunjukkan (Tabel 1) bahwa bakteri *V. alginolyticus* mempunyai titer haemagglutinin yang lebih tinggi konsentrasinya daripada *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus* dan *V. harveyi*.

Test Haemagglutination

Uji aglutinasi *V. alginolyticus* isolat *Vibrio* spp. ditentukan dari beberapa isolat yang mempunyai titer aglutinasi positif dari

Tabel . 1 Hasil uji Hemaglutinasi *Vibrio* spp. secara bertingkat terhadap eritrosit ikan kerapu tikus *C. altivelis*

Sumur/ materi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	K
<i>V. alginolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>V. anguillarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. harveyi</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

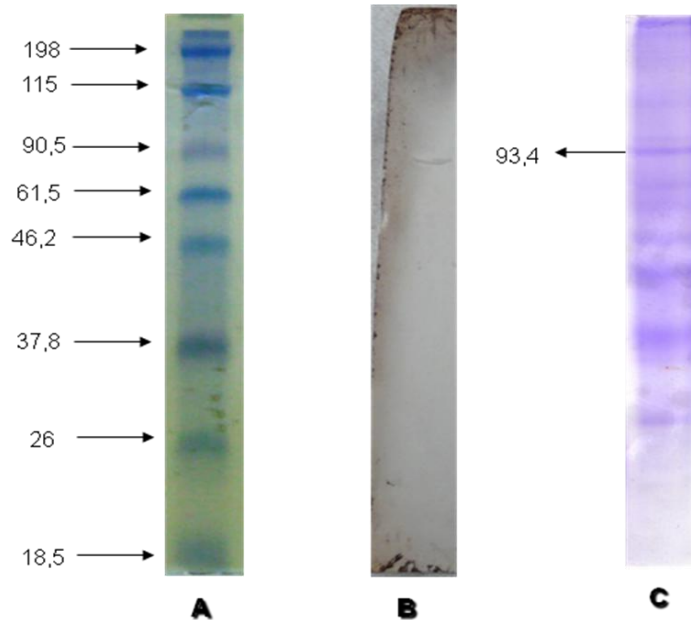
Keterangan :

V. alginolyticus titer positif haemaglutinin (1/512)

V. anguillarum titer positif haemaglutinin ()

V. parahaemolyticus titer positif haemaglutinin ()

V. harveyi titer positif haemaglutinin ()



Gambar 1. Hasil elektroforesis SDS-Page protein reseptor dari organ mata *C.altivelis* dengan pewarnaan *commassie brillian blue R-250*

Keterangan :

Lajur A : Protein perunut Low marker merk Sigma

Lajur B : pita protein reseptor organ mata *C. altivelis* berat molekul 93,4 kDa memberikan reaksi silang positif

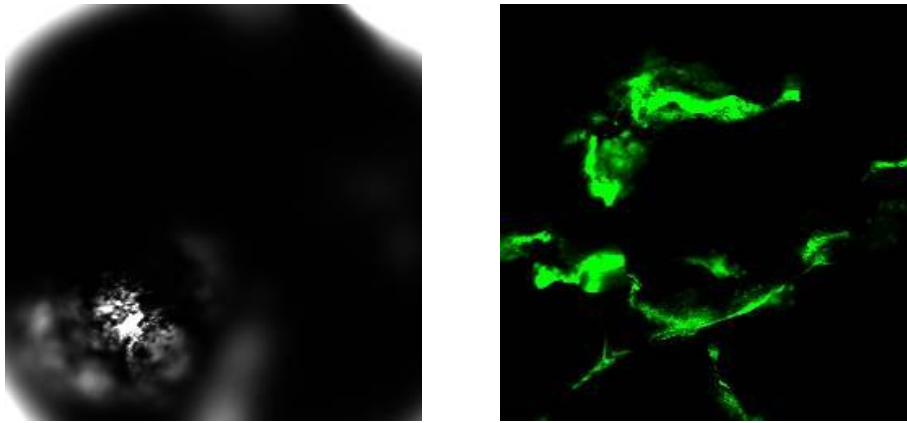
Lajur C : pita protein reseptor berat 93,4 kDa dilakukan uji untuk western blotting

konsentrasi tertinggi hingga terendah terhadap eritrosit ikan kerapu tikus *C.altivelis* .

Berdasarkan hasil penelitian terhadap uji aglutinasi menunjukkan bahwa whole cell bakteria memberikan titer positif haemaglutinin hingga pengenceran 1/512 untuk *V.alginolyticus*, berikutnya *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus* dan *V. harveyi* (Tabel 1).

Hasil uji haemaglutinin berdasarkan titer pengenceran konsentrasi bakteri terhadap eritrosit ikan kerapu menunjukkan bahwa titer tertinggi dari masing-masing bakteri mempunyai protein adhesi yakni haemaglutinin yang berarti mampu mengaglutinasi eritrosit ikan kerapu.

Elektroforesis SDS-PAGE Protein Reseptor Grouper



Gambar 2. Ekspresi Reseptor Mata normal dan terinfeksi *V. alginolyticus* dengan pemeriksaan CLSM

Hasil penelitian terhadap berat molekul reseptor organ mata ikan kerapu tikus *C. altivelis* dengan SDS-Page adalah 133,7; 115,8 kDa; 105,3 kDa; 93,4 kDa; 86,9 kDa; 79,0 kDa; 68,4 kDa; 59,2 kDa; 52,6 kDa; 48,9 kDa; 41,4 kDa; 33,3 kDa; 26,2 kDa (Gambar 2c). Hasil pita protein reseptor yang telah diuji adalah berat molekul 93,4 kDa yang sudah dilakukan uji reaksi silang terhadap serum ikan kerapu tikus *C. altivelis*, dengan pemeriksaan imunokimia memberikan reaksi silang positif.

Berdasarkan hasil elektroforesis protein reseptor organ mata ikan kerapu *C. altivelis* yang diisolasi dari organ sebagai reseptor protein terhadap adesi *V. alginolyticus* menunjukkan gambaran pita protein yang berbeda. Pada pengujian ini telah ditentukan bahwa berat molekul 93,4 kDa yang digunakan dengan pengujian imunokimia menggunakan teknik western blotting memberikan reaksi silang setelah dilakukan pengujian reseptor dengan protein adesi *V. alginolyticus*. Pengujian lebih lanjut perlu untuk *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. harveyi*.

Pemeriksaan ekspresi reseptor mata terhadap infeksi *Vibrio* spp.

Hasil pengujian terhadap ekspresi reseptor protein mata terhadap perlekatan bakteri *Vibrio* spp. diantaranya adalah *V. alginolyticus* terhadap menunjukkan bahwa ekspresi reseptor protein pada organ mata berbeda antara organ normal dan terinfeksi *Vibrio*. Gambaran hasil ekspresi reseptor protein mata terhadap perlekatan bakteri *V. alginolyticus* menunjukkan pola fluorescent yang kuat dibandingkan dengan yang normal tidak terinfeksi *Vibrio* (Gambar 2).

Mekanisme ekspresi reseptor protein mata ikan kerapu terhadap infeksi *Vibrio* spp

(dalam hal ini *V. alginolyticus*) ditemukan sementara bahwa berat molekul 93,4 kDa memberikan reaksi silang positif dengan pemeriksaan imunokimia menggunakan antibodi primer poliklonal antibodi anti-IgM grouper, dan sekunder anti IgM grouper.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan keempat bakteri *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus* dan *V. harveyi* mempunyai titer haemagglutinin, haemagglutinin ini merupakan protein adhesi dari bakteri tersebut. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan pengujian haemagglutinin bahwa haemagglutinin yang ditemukan merupakan protein adhesi dan juga merupakan molekul glikoprotein, dimana glikoprotein juga ditemukan pada organ usus tepatnya sel epitel usus ikan kerapu tikus (Yanuhar, 2006). Glikoprotein dijelaskan Beachy (1981) berfungsi untuk migrasi seluler selama perkembangan dan *wound healing*, regulasi pertumbuhan sel dan diferensiasi yang juga berperan utama dalam trombosis. Glikoprotein ini juga berperan pada perlekatan bakteri terhadap permukaan mukosa yang merupakan step awal patogenesis dari hampir semua penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri baik pada hewan maupun manusia. Mekanisme perlekatan terdiri dari ikatan adesi molekul dari permukaan bakteri (adhesin) dan membran sel host (reseptor).

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa protein mata *C. altivelis* dengan berat molekul 93,4 kDa memberikan reaksi silang terhadap protein adesi hemagglutinin *V. alginolyticus*. Reseptor organ ikan kerapu tikus berperan penting dalam mekanisme infeksi *Vibrio* spp.

Karena keterbatasan poliklonal antibodi seperti reaksi silang, kuantitas yang terbatas, latar belakang reaksi yang tidak diinginkan dan kemampuan mendeskriminasi antigen pada tingkat epitop menjadikan penelitian ini untuk dilakukan lebih mendalam terhadap peran protein reseptor dan juga protein adhesinnya.

Ucapan terima kasih

Ucapan terimakasih kepada program Insentif Riset Dasar Tahun 2008 yang telah memberikan grant untuk penelitian pengembangan vaksin berbasis peptida reseptor ikan kerapu tikus *C. altivelis* yang mengenali antigen general untuk transgenik antibodi untuk benih unggul.

Daftar Pustaka

- Mahardika, K. Zafran, 2004. *Infeksi Iridovirus Pada Juvenil Kerapu Bebek (Cromileptes altivelis) Di Karamba Jaring Apung*. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol. Bali. Prosiding. Pengendalian Penyakit Pada Ikan Dan Udang berbasis Imunisasi Dan Biosecurity.
- Istiqomah, I., Isnasetyo, A., Triyanto, Nitimulyo, K. H., Murjani, M., 2006, Pathogenicity of *Vibrio fluvialis* 24SK in Humpback Grouper. *Journal of Fisheries Science*. Vol III. No. 1. P. 17-24
- Wang, X.H., Oon, H.L., Ho, G.W.P., Wong, W.S.F., Lim, T.M., Leung, K.Y. 1998. Internalization and cytotoxicity are importance virulence mechanisms in vibrio-fish epithelial cell interactions. *Microbiology*, 144, p. 2987-3002
- Denkin, S.M., Nelson, D.R. 2004. Regulation of *Vibrio anguillarum* empA Metalloprotease Expression and Its Role in Virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, July. p.4193-4204.
- Yanuhar, U. 2008. *The role of Haemagglutinin Protein as Adhesin Molecule of Fimbriae Vibrio alginolyticus That Recognized by Receptor Membrane Protein of Intestine Cromileptes altivelis Within Pathomechanism Infection of Vibriosis*. Presented on International Seminar Management Strategy on Animal Health and Production Control in the Anticipation of Global Warming for the Achievement of Millennium Developmental Goals, Surabaya
- Yanuhar, U., Sukoso, Sumarno, Widodo, M. A. 2006. *Kajian Molekuler Faktor Virulensi Bakteri Dalam Patomekanisme Infeksi Vibrio alginolyticus Pada Cromileptes altivelis*. Presented on Conference of Indonesian Aquaculture, 6-8 Juni 2006, Surabaya
- Sudhakar, P., and Subramani, P., 2006, *Review: Mechanism of Bacterial Pathogenesis and Targets for Vaccine Design*. St. Peter's Chemical College, Tamil Nadu, India, P. 1-16
- Sumarno, Noorhamdani, A.S., Samsul Islam, Sjoekoer M. Dzen, Ehara, M, dan Ichinose, Y. 1991. *Purifikasi protein hambatan aglutinasi Vibrio cholerae El Tor T79-6*. Majalah Kedok. Univ. Brawijaya. Malang
- Winarsih, S., Sumarno, dan Roekistiningasih. 1998. *Fungsi dan sifat immunogenitas protein haemagglutinin 32 kDa dan 20 kDa pada Helicobacter Pylori*. Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya Malang 8:11-14
- Beachy E.H. 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *Journal Infect Diseases*, Mar; 143 (3): 325-45.