

# Toksitas Produk Ekstrasellular (ECP) *Streptococcus agalactiae* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Esti Handayani Hardi<sup>1\*</sup>, Sukenda<sup>2</sup>, Enang Harris<sup>3</sup>, dan Angela Mariana Lusastuti<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Mikrobiologi Perairan, Universitas Mulawarman, Samarinda 75119

<sup>2</sup>Laboratorium Kesehatan Ikan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

<sup>3</sup>Laboratorium Sistem dan Teknologi Akuakultur, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

<sup>4</sup>Laboratorium Kesehatan Ikan Balai, Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Bogor, Bogor 16436

Diterima 06-08-2010

Disetujui 08-04-2011

## ABSTRACT

This research aimed to know the toxicity of extracellular products (ECP) of *Streptococcus agalactiae* was tasted in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Streptococcus agalactiae* had two haemolytic types: -haemolytic and non-haemolytic type. Toxicity test of ECP to know the virulency factor of *S. agalactiae* was still limited. It was found that after tested on 15 fish weighing 15 g through intraperitoneal injection 0,1 ml/fish, both bacteria caused changes in swimming pattern, palatability, external and internal anatomy macroscopically and microscopically. *Extracellular products* of *S. agalactiae* non-haemolytic type (BHIA and BHI 24 h) and -haemolytic type (BHI 72 h) caused mortality 12 hours after injection and the mortality continued till day 7<sup>th</sup> of culture. Whirling happened 96 hours after injection with ECP *S. agalactiae* -haemolytic type (BHIA 72 h incubation) whereas injection with ECP (BHI 24 h) on 72 h after injection and continued until day 7<sup>th</sup>. Behavior disease signs caused by *S. agalactiae* occurred on eyes. There were opacity, purulens, eye shrink, lateral and bilateral exophthalmia and haemorrhage on infected-fish. Silver staining of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to *S. agalactiae* revealed that predominant 51.8-69.6 kDa bands were present in BHIA ECP fraction. The 69.6 kDa was absent from the BHI ECP. Total protein on non-haemolytic *S. agalactiae* ECP are 28.18 ppm on BHIA medium and 13.64 ppm on BHI medium. Whereas -haemolytic *S. agalactiae* ECP are 2.73 ppm on BHIA medium and 8.18 ppm on BHI medium. Concentration of protein in ECP was one of factor that caused non-haemolytic *S. agalactiae* more virulent than -haemolytic type. The conclusion from the research that ECP was virulent factor on -haemolytic and non-haemolytic *S. agalactiae* in fish which caused changes in behavior disease signs.

**Keywords** : ECP, *Oreochromis niloticus*, *Streptococcus agalactiae*, toxicity

## PENDAHULUAN

Penyakit yang mewabah pada budidaya ikan nila di Jawa Barat dan beberapa pulau di Indonesia pada tahun-tahun belakangan ini adalah penyakit Streptococcosis yang disebabkan oleh *Streptococcus agalactiae* (Taukhid, 2009). Bakteri *S. agalactiae* termasuk gram positif, motilitas dan oksidatif fermentatif positif, katalase negatif (Evans *et al.*, 2006b). Sheehan *et al.*, (2009), mengelompokan bakteri *S. agalactiae* dalam dua tipe yaitu tipe 1 ( -hemolitik) dan tipe 2 (non-hemolitik). Bakteri *S. agalactiae* tipe 1 tumbuh baik (cepat) pada suhu 37°C dan mampu menghidrolisis gula lebih banyak sedangkan bakteri tipe 2 memiliki sifat yang bertolak belakang dengan tipe 1. Bakteri tipe 2 lebih ganas dibandingkan dengan tipe 1 dilihat dari kemampuan menyebabkan kematian pada ikan. Selain itu penyebaran bakteri tipe 2 lebih luas dan hampir ditemukan di beberapa wilayah di Asia seperti China,

Indonesia, Vietnam, dan Philippina juga di wilayah Amerika Latin seperti Ekuador, Honduras, Mexico dan Brazil.

Evans *et al.*, (2006a), menunjukkan hasil pengamatan bahwa *S. agalactiae* menyebabkan 90% kematian dalam 6 hari setelah injeksi. Gejala tingkah laku ikan nila sebelum mati terlihat seperti berenang lemah dan berada di dasar akuarium, respon terhadap pakan lemah, berenang *whirling* (menggelepar), tubuh membentuk huruf C, perubahan pada warna tubuh, dan bukaan operkulum menjadi lebih cepat. Taukhid (2009), berhasil mengisolasi *S. agalactiae* dari ikan nila yang berasal dari beberapa daerah seperti Cirata, Klaten, Kalimantan, Sulawesi, dan Aceh. Gejala klinis yang tampak pada ikan-ikan yang terinfeksi *S. agalactiae* ini adalah *clear operculum*, berenang *whirling*, warna tubuh menjadi gelap, dan pada kasus kronis ikan yang ditemukan mengalami eksophtalmia.

\*Telp: +628115812442

Email: estie\_hardie@yahoo.com

Untuk mengoptimalkan upaya pencegahan dan ..... *S. agalactiae*, maka perlu diketahui terlebih dahulu mengenai mekanisme patogenisitas pada ikan nila. Faktor virulensi bakteri *S. agalactiae* pada ikan sampai sekarang belum diketahui secara jelas sehingga diperlukan penelitian lebih mendalam. Untuk memahami kemampuan *S. agalactiae* menyebabkan sakit pada ikan maka perlu diketahui bagian dari *S. agalactiae* yang bersifat virulen. Kajian ECP dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri menghasilkan eksotoksin serta melihat mekanisme infeksi pada ikan nila. Menurut Williams, (2003), bagian yang bersifat virulen pada bakteri gram positif (*S. agalactiae*) adalah eksotoksinnya (ECP dan toksin lainnya), sebaliknya dengan bakteri gram negatif, LPS (endotoksin) bersifat lebih virulen. Penelitian ini meliputi isolasi ECP dan pengujian toksisitas masing-masing fraksi ECP terhadap ikan nila, dengan melihat kematian ikan, nafsu makan, gejala klinis (gerakan renang, bukaan operkulum, patologi anatomi, histopatologi), dan gambaran darah.

## BAHAN DAN METODE

**Ikan uji** yang digunakan adalah ikan nila (*Oreochromis niloticus*) berukuran 15 g sebanyak 15 ekor setiap akuarium. Dimana setiap perlakuan diuji sebanyak 3 kali. Sehingga jumlah ikan digunakan dalam percobaan ini berjumlah 765 ekor. Ikan berasal dari satu sumber, diadaptasi dan dikarantina dalam akuarium uji selama 14 hari sebelum digunakan untuk memastikan tidak adanya gejala penyakit streptococcosis, dengan cara mengisolasi organ mata, otak dan ginjal ikan sampel ke media BHIA.

**Bakteri *Streptococcus agalactiae*** yang digunakan untuk pengujian toksisitas adalah isolat tipe non-hemolitik yaitu NK<sub>1</sub> dan isolat tipe  $\alpha$ -hemolitik N<sub>14</sub>G (Hardi, 2011). Seluruh isolat telah melalui uji Postulat Koch dan uji karakteristik. Postulat Koch dilakukan dengan menyuntikan 0,1 ml bakteri pada 5 ekor ikan. Setelah 5-7 hari pasca injeksi, sampel ikan diisolasi organ mata, otak dan ginjal pada media BHIA untuk mendapatkan isolat *S. agalactiae* kembali. Selanjutnya, dilakukan pengujian karakteristik *S. agalactiae* untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah *S. agalactiae* dan memiliki tipe non-hemolitik dan tipe - hemolitik. Metode identifikasi merujuk pada metode identifikasi bakteri *S. agalactiae* pada ikan secara

konvensional (SNI 7545.3: 2009) yang mencakup perwarnaan Gram, uji motilitas dengan media semi solid, aktivitas hemolitik, uji oksidatif-fermentatif, uji katalase, uji *bile salt* 40%, uji pertumbuhan dalam NaCl 6,5%, uji hidrolisis aesculin dan uji produksi asam dari D-mannitol.

**Isolasi produk ekstrasellular (ECP)** mengikuti prosedur Suprpto et al., (1997), dengan berbagai modifikasi. Bakteri dikultur dalam media cair BHI dan media padat BHIA. Kultur bakteri diinkubasi selama 24, 48, 72 dan 96 jam pada suhu 28-30°C. Bakteri yang tumbuh pada media BHI dan bakteri yang tumbuh dalam media BHIA (terlebih dahulu ditambahkan PBS sebanyak 5 ml) kemudian dipanen. *Slurry* berupa suspensi bakteri kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan disaring dengan *filter paper* 0,22  $\mu$ m dan selanjutnya hasil filtrasi digunakan untuk pengujian toksisitas ECP terhadap ikan nila.

**Pengujian toksisitas total ECP terhadap ikan nila** dilakukan untuk membuktikan adanya kandungan toksin dalam ECP *S. agalactiae* yang menyebabkan infeksi (perubahan gejala klinis) dan kematian ikan nila. Selain itu, diketahui biakan bakteri pada media dan lama kultur yang menghasilkan ECP yang bersifat toksin terhadap ikan. Untuk pengujian toksisitas ECP, digunakan semua ECP yang berasal dari hasil isolasi sebelumnya dan diinjeksikan secara IP pada 10 ekor ikan, sebanyak 0,1 ml/ekor. Ikan dipelihara selama 7 hari dan dilakukan pengamatan kematian ikan, perubahan pola renang, perubahan nafsu makan dan patologi anatomi organ luar pada jam ke-3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 hingga hari ke-7. Sedangkan gambaran darah dan histopatologi diamati pada hari ke-1, 4, dan 7 pasca injeksi. Untuk memudahkan dalam penulisan, maka dilakukan pengkodean berdasarkan jenis bakteri, media tumbuh dan lama inkubasi ECP yang dihasilkan. Pengkodean ini digunakan dalam keseluruhan data hasil pengamatan (Tabel 1).

**Fraksinasi protein ECP melalui SDS-PAGE** (Laemmli, 1970) dengan standar protein BM rendah, 10% gel pemisah dan 4% gel penahan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui fraksi dari protein ECP yang bersifat toksik pada ikan nila. Dalam penelitian ini digunakan ECP dari *S. agalactiae* tipe -hemolitik dan non-hemolitik hasil pengujian toksisitas ECP yang menyebabkan kematian ikan terbanyak dan secara

terus menerus pasca injeksi ECP yaitu ECP hasil isolasi dari *S. agalactiae* tipe -hemolitik yang dikultur di media BHIA dan BHI dengan lama inkubasi berturut-turut 24 jam dan 72 jam, serta ECP hasil isolasi dari *S. agalactiae* tipe non-hemolitik yang dikultur di media BHIA dan BHI dengan lama inkubasi berturut-turut 96 jam dan 72 jam.

Fraksinasi dilakukan melalui SDS-PAGE, gel *dirunning* dalam 600 ml buffer elektroforesis pH 8,3 mengandung 192 mM glisin + 0,1% SDS + 24,8 mM Tribase (Trishidroksiaminometan). Sebelum dimasukan ke dalam sumur, ECP dan marker + buffer sampel (rasio 1:1) dicampurkan, kemudian diinkubasi dalam air mendidih selama 1 menit. Buffer sampel mengandung 1 gram SDS, 2 ml gliserol 50%, 2 ml bromofenol biru 0,1%; 1,25 ml TrisCl 1 M pH 6,8 dan ditambahkan akuades hingga volume menjadi 10 ml, volume marker dan ECP adalah 20 µl. Kondisi elektroforesis adalah 100 mA, 100 volt selama 90–120 menit. Deteksi pita menggunakan metode *Silver Staining*.

Pewarnaan dengan metoda *Silver Staining* dengan cara gel difiksasi dengan larutan (25% methanol, 12% Asam asetat) selama 1 jam, kemudian direndam dalam etanol 50%, selama 20 menit. Setelah itu direndam kembali dalam etanol 30%, selama 20 menit sebanyak 2 kali. Selanjutnya dienhancer (0,1 gram  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) dalam 500 ml akuades selama 1 menit, dicuci dengan akuades 20 detik, diulang 3 kali. Kemudian dicelupkan ke dalam larutan silver nitrat (0,4 g  $\text{AgNO}_3$  dicampurkan dengan 70 µm formaldehid dalam 200 ml akuades) selama 30 menit. Langkah berikutnya adalah dibilas dengan akuades sebanyak 2 kali selama 20 detik dan dicelupkan ke dalam larutan (15 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 120 µl

formaldehid). Maka akan terlihat band hitam, saat itulah reaksi dengan larutan fiksasi dihentikan.

Hasil elektroforesis kemudian dianalisis untuk mengetahui berat molekul masing-masing fraksi protein dengan cara setiap band yang terbentuk dibandingkan dengan protein marker.

**Penentuan kadar protein** hasil elektroforesis dilakukan dengan Spektrofotometer pada 595 nm. Sebagai blanko digunakan Bovine Serum Albumin (BSA). Sebanyak 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 dilarutkan ke dalam 50 ml etanol 95%. Kemudian ditambahkan 100 ml asam fosfat 85% (w/v) dan diencerkan dengan akuades sampai 1 liter. Selanjutnya larutan disaring dengan kertas saring. Konsentrasi akhir dari setiap pereaksi adalah 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (w/v) etanol, 8,5% (w/v) asam fosfat. Larutan ini akan stabil untuk jangka waktu beberapa bulan, tergantung pada kondisi penyimpanan. Larutan standar harus dibuat segar akan stabil hanya 1 minggu jika disimpan dalam lemari pendingin. Sebagai standar digunakan Bovine Serum Albumin (BSA) fraksi V, sebanyak 100 mg BSA ditimbang dan dicampur dengan 50 ml akuades atau 0,1 M NaCl. Kemudian didiamkan agar larut dengan sendirinya, pengkocokkan dilakukan secara perlahan untuk menghindari terbentuknya busa. Setelah larut semuanya, dilanjutkan dengan menambahkan akuades sampai 50 ml.

Larutan protein diambil masing-masing sebanyak 0,1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang bersih dan terpisah. Pemberian tanda pada setiap tabung reaksi dilakukan untuk memudahkan pekerjaan. Sebanyak 0,1 ml akuades diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebagai blanko (3 blanko). Langkah ini juga dilakukan untuk sampel ECP.

Tabel 1. Pengujian toksisitas ECP *Streptococcus agalactiae* tipe -hemolitik dan non-hemolitik

Perlakuan	Tipe bakteri dan media tumbuh	Lama inkubasi (jam)	Kode
1	BHI	-	Kontrol
2	-hemolitik BHIA	24	3A24
3	-hemolitik BHIA	48	3A48
4	-hemolitik BHIA	72	3A72
5	-hemolitik BHIA	96	3A96
6	-hemolitik BHI	24	3i24
7	-hemolitik BHI	48	3i48
8	-hemolitik BHI	72	3i72
9	-hemolitik BHI	96	3i96
10	non-hemolitik BHIA	24	5A24
11	non-hemolitik BHIA	48	5A48
12	non-hemolitik BHIA	72	5A72
13	non-hemolitik BHIA	96	5A96
14	non-hemolitik BHI	24	5i24
15	non-hemolitik BHI	48	5i48
16	non-hemolitik BHI	72	5i72
17	non-hemolitik BHI	96	5i96

Selanjutnya Coomassie Blue ditambahkan ke dalam setiap tabung reaksi, lalu dikocok. Setelah 2 menit, absorbans larutan dapat diukur pada 595 nm, semua pengukuran diusahakan sebelum satu jam. Untuk mengnolkan alat gunakan akuades. Semua data pengukuran dikurangi rata-rata blanko, terakhir kurva standar protein dibuat dengan absorbans terkoreksi sebagai ordinat (Y) dan jumlah protein.

**Parameter yang diukur** antara lain Pengamatan tingkah laku berenang, tingkah laku makan, perubahan anatomi organ luar dan organ dalam diamati mengikuti metoda Hardi (2011). Pengamatan gambaran darah, pengukuran kadar hemoglobin menurut metode Sahli dengan Sahlinometer (Wedemeyer & Yasutake, 1977), kadar hematokrit menurut metode Anderson dan Siwicki (1995), diferensial leukosit dan pengamatan total leukosit serta total eritrosit dilakukan mengikuti prosedur Blaxhall dan Daisley (1973). Pengamatan histopatologi ikan, dilakukan untuk mengetahui kerusakan jaringan ikan yang terinfeksi bakteri *S. agalactiae* yaitu jaringan pada organ mata, otak dan ginjal ikan. Pengamatan kematian, diamati dengan menghitung jumlah ikan yang mati pada tiap jam pengamatan.

Analisa data, percobaan dilakukan dengan menggunakan RAL (Rancangan acak Lengkap) 2 faktor yaitu jenis bakteri dan jenis media tumbuh yang dibuat dalam 17 perlakuan 3 ulangan. Analisa untuk data pengamatan gambaran darah (total leukosit, diferensial leukosit, kadar glukosa hemoglobin, hemotokrit dan total eritrosit) dianalisa dengan menggunakan *Statistica 8*. dan uji lanjut Uji Duncan, sedangkan perubahan tingkah laku berenang, perubahan pola makan dan perubahan patologi anatomi (makroskopis dan mikroskopis) dianalisa secara deskriptif.

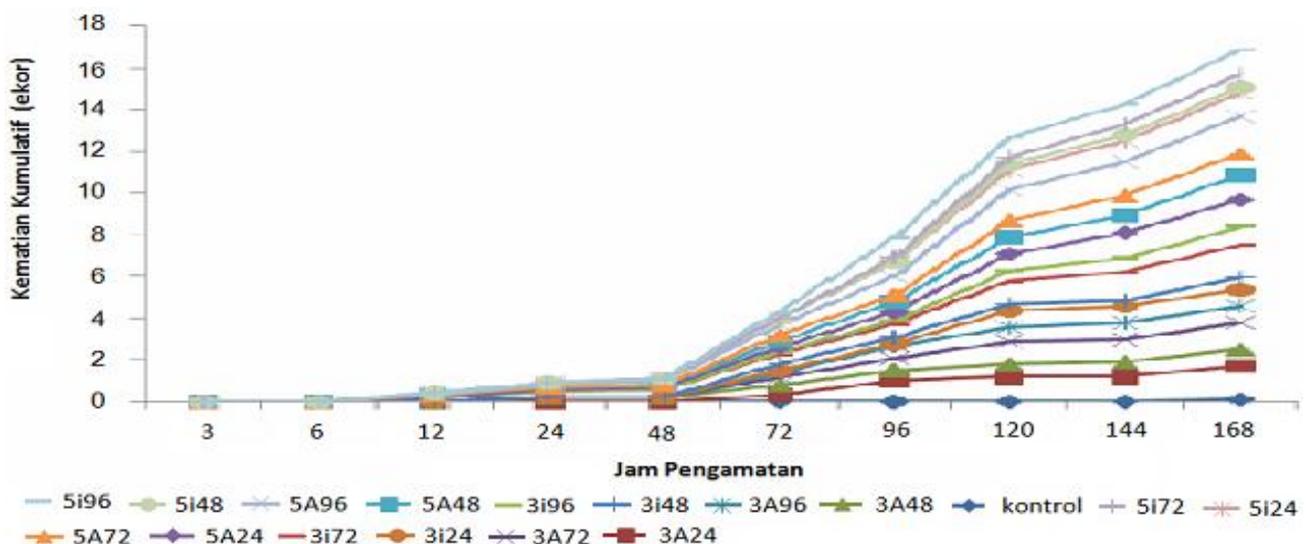
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Uji Karakteristik *S. agalactiae*.** Untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah *S. agalactiae*, maka bakteri hasil postulat koch dilakukan pengujian karakteristik kembali. Dari hasil pengamatan, kriteria suatu bakteri digolongkan dalam *S. agalactiae* apabila memiliki memiliki karakteristik seperti pada Tabel 2.

**Kematian ikan nila.** Pengujian toksisitas ECP ini dilakukan untuk mengetahui faktor penyebab kelainan bahkan kematian pada ikan akibat infeksi *S. agalactiae*. Dari hasil pengamatan selama 7 hari

Tabel 2. Karakteristik morfologi, fisika dan biokimia *Streptococcus agalactiae*

Pengujian	Isolat N <sub>14</sub> G	Isolat NK <sub>1</sub>	SNI 2009
Pewarnaan gram	Gram +	Gram +	Gram +
Motilitas	-	-	-
Oksidatif-fermentatif	Fermentatif +	Fermentatif +	Fermentatif +
Katalase	-	-	-
Bile salt 40%	+	+	+
Pertumbuhan NaCl 6.5%	+	+	+
Aesculin hydrolysis	-	-	-
D-mannitol	-	-	-
Aktivitas hemolitik	-hemolitik	Non-hemolitik	, ,non-hemolitik



Gambar 1. Kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi dengan total ECP *S. agalactiae*  
Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 1

diketahui kematian yang muncul lebih cepat dibandingkan dengan infeksi sel utuh. Selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 1.

Kematian ikan yang diinjeksi ECP bakteri *S. agalactiae* tipe non-hemolitik (BHIA 24 jam dan BHI 24 jam) dan -hemolitik (BHI 72 jam) mulai terjadi 12 jam pasca injeksi dan kematian terus terjadi hingga hari ke 7 pemeliharaan. Baik bakteri tipe dan non-hemolitik menyebabkan kematian ikan nila yang diinjeksi, artinya ECP dari kedua tipe bakteri yang ditumbuhkan pada media padat dan cair bersifat patogen terhadap ikan.

Kematian yang terjadi secara cepat dan banyak, yaitu dalam waktu 12 jam kemungkinan disebabkan karena adanya beberapa enzim seperti hemolisin, lipase, elastase, gelatinase, chitinase (Austin & Austin, 2007). Pola ini juga telah dilaporkan oleh peneliti lain (Lamas *et al.*, 1994), yaitu dengan perlakuan ECP *Vibrio anguillarum* pada ikan rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) dapat mematikan ikan secara cepat.

**Perubahan Pola Renang.** Umumnya perubahan pola renang yang terjadi hampir sama dengan pola renang saat diinjeksi dengan bakteri sel utuh (Tabel 3). Penginjeksian ECP *S. agalactiae* tipe -hemolitik menyebabkan perubahan berenang abnormal (miring) pada jam ke-96 pasca injeksi (BHIA 72 jam), dan berlanjut *whirling* pada hari ke-7. Ikan berenang *whirling* ditunjukkan pada ikan nila yang diinjeksi dengan ECP (BHI 24 jam) bakteri tipe non-hemolitik pada jam ke-72

pasca injeksi. Umumnya gejala yang ditunjukkan hampir sama dan seragam baik pada bakteri tipe -hemolitik maupun bakteri tipe non-hemolitik yang ditumbuhkan di media cair dan media padat.

**Tingkah laku makan.** Perubahan tingkah laku makan terjadi hampir pada seluruh ikan yang diinjeksi dengan ECP. Ikan berkurang nafsu makannya sejak 24 jam pertama pasca injeksi, bahkan ikan mulai tidak mau makan setelahnya. Hal ini disebabkan oleh ECP yang masuk dalam otak ikan bagian diencephalon yang terdapat hipotalamus sehingga mengganggu keseimbangan rasa lapar ikan (Rahardjo, 1985). Sama halnya dengan penginjeksian dengan bakteri utuh yang menyebabkan ikan berkurang nafsu makannya bahkan tidak mau makan pasca injeksi.

**Perubahan anatomi organ luar dan organ dalam secara makroskopis.** Pada pengujian toksisitas ECP *S. agalactiae* tampak adanya perubahan pada patologi anatomi ikan nila. Perubahan yang tampak pada anatomi organ luar antara bakteri tipe dan non-hemolitik tidak jauh berbeda (Tabel 4).

Secara makroskopis, organ mata tampak mengalami eksoptalmia yang terjadi pada jam ke-48 (2 hari pasca injeksi), lebih cepat dibandingkan dengan injeksi sel utuh dimana eksoptalmia baru terjadi pada jam ke-120 (hari ke-5) pasca injeksi pada bakteri tipe -hemolitik. Sama halnya dengan bakteri tipe non-hemolitik yang mulai tampak eksoptalmia pada jam ke-48. Tidak seperti saat penyuntikan dengan sel utuh *S. agalactiae* (tipe non-hemolitik lebih patogen dilihat

Tabel 3. Perubahan pola renang ikan nila pada uji toksisitas ECP *Streptococcus agalactiae* tipe -hemolitik dan non-hemolitik

Perubahan pola renang (jam ke)	Tipe -hemolitik								Tipe non-hemolitik							
	3A				3i				5A				5i			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Berenang lemah	72	72	48	12	48	144	48	72	24	48	48	12	48	48	72	24
Gasping	24	144	168	-	-	6	96	168	-	-	-	48	96	6	-	-
Berenang lemah	-	-	168	-	-	-	168	-	168	144	168	-	72	-	168	-

Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 1

Tabel 4. Patologi anatomi makroskopis organ luar ikan nila pasca diinjeksi ECP *Streptococcus agalactiae* tipe -hemolitik dan non-hemolitik

Perubahan patologi anatomi (jam ke)	Tipe -hemolitik								Tipe non-hemolitik							
	3A				3i				5A				5i			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Tubuh menghitam	48	72	48	48	72	48	-	72	24	48	72	48	48	96	72	96
Clear operculum	-	168	72	72	-	-	-	-	144	96	72	-	72	-	-	144
Mata mengkerut	-	-	72	48	-	72	-	-	72	-	72	72	-	-	-	-
Lateral eksoptalmia	48	48	72	48	72	96	72	72	96	72	48	-	48	72	72	-
Bilateral eksoptalmia	-	72	-	96	168	144	96	-	168	-	-	-	-	96	-	96
Opacity	72	72	96	-	-	144	144	-	-	96	144	48	-	72	-	-
Purulens	96	-	96	-	-	96	72	-	-	72	144	144	96	-	-	96
Ulcer di kepala "C" shape	144	-	-	-	96	96	-	144	72	96	-	-	-	96	96	72

Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 1

dari perubahan pada anatomi dan kematian yang lebih cepat dari tipe -hemolitik).

Penyuntikan ECP yang berasal dari media padat (BHIA) tampak lebih cepat menyebabkan perubahan anatomi organ luar secara makroskopis dibandingkan dengan media cair (BHI). Ini disebabkan karena media padat lebih mendukung pertumbuhan bakteri dalam memproduksi ECP. Sama halnya dengan penginjeksian dengan ECP bakteri *Edwardsiella tarda*, kematian hanya timbul pada ikan *Japanese eel* dan *flounder* yang diinjeksi dengan ECP dari media padat (NA, TSA dan BHIA) dan tidak ada kematian pada saat diinjeksi dengan ECP dari media cair (NB, TSB, BHIB) (Suprpto, 1995).

Ulcer pada kepala ikan nila banyak ditemukan pada penginjeksian dengan ECP *S. agalactiae*, tidak dengan halnya saat ikan nila diinjeksi dengan bakteri sel utuh, ulcer hanya tampak pada ikan yang diinjeksi dengan bakteri tipe non-hemolitik pada hari ke-8 pasca injeksi. Ulcer terjadi pada ikan yang diinjeksi ECP kedua tipe bakteri di kedua media tumbuh. Ini menandakan bahwa penginjeksian dengan ECP menyebabkan kerusakan sel lebih cepat dibandingkan dengan penginjeksian sel utuh *S. agalactiae*. Hal ini disebabkan karena ECP langsung beredar ke seluruh tubuh dan mempengaruhi kerja dan metabolisme sel lebih cepat dibandingkan dengan bakteri sel utuh yang harus berkembang dan berada dalam sel yang rusak untuk memproduksi dan mengeluarkan eksotoksinya (Williams, 2003). Beberapa perubahan pada mata ikan nila yang diinjeksi dengan ECP *S. agalactiae* selama pengamatan terlihat pada Gambar 2.

Eksoptalmia yang terjadi pada ikan tampak berbeda (Gambar 2 no 9-12), terkadang disertai dengan kekeruhan pada mata (*opacity*). *Purulens* terjadi dalam beberapa tahapan hingga akhirnya mata menjadi sangat putih dan kornea mata menjadi tidak tampak. *Purulens* hampir selalu muncul pada keseluruhan ikan yang diinjeksi dengan ECP *S. agalactiae* kedua tipe. Menurut Evans (2004), gejala yang muncul pada mata ikan yang

terinfeksi *S. agalactiae* adalah *opacity* dan *purulens*, namun dapat juga menyebabkan mata lisis. Eksotoksin (ECP) *S. agalactiae* menyebar pada mata yang menyebabkan adanya hipertropi, inilah yang menyebabkan ikan mengalami eksoptalmia dan perubahan lainnya. Hal ini menandakan bahwa ECP *S. agalactiae* sebagai penyebab timbulnya perubahan pada mata.

**Gambaran darah ikan nila.** Sama halnya dengan kematian ikan nila yang diinjeksi dengan ECP terjadi lebih cepat dibandingkan dengan saat diinjeksi dengan sel utuh, perubahan gambaran darah juga terjadi relatif lebih cepat. Perbedaan gambaran darah ikan yang diinjeksi dengan ECP kedua tipe *S. agalactiae* yang ditumbuhkan pada media BHI dan BHIA dengan lama inkubasi yang berbeda dijabarkan dalam Tabel 5.

**Total leukosit.** Total leukosit cenderung mengalami peningkatan pada 24 jam awal dan mengalami penurunan pada jam ke-96 pasca injeksi. Sama halnya dengan infeksi sel utuh, ECP bakteri juga menyebabkan perubahan total leukosit. Saat adanya infeksi, leukosit sebagai penjaga pertama berperan



Gambar 2. Beberapa perubahan pada mata ikan nila pasca injeksi dengan ECP *Streptococcus agalactiae*. 1 & 2: pengerutan mata; 3-9: *opacity* (kekeruhan mata); 10-12: eksoptalmia dan 13-16: *purulens* (mata putih)

Tabel 5. Hubungan berat molekul protein standar dengan migrasi relatif (Rm)

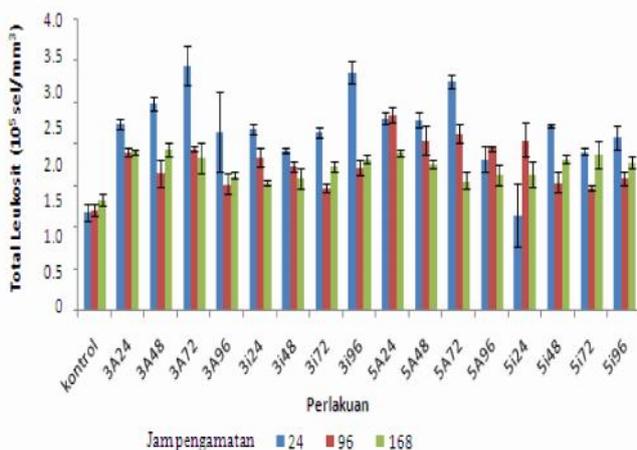
Protein standar	BM	Log BM	Run	Band	Rf
Phosphorylase	97000	4,98677	5,7	0,6	0,105263
Albumin	66000	4,81954	5,7	1,3	0,228070
Ovalbumin	45000	4,65321	5,7	2,2	0,85965
Carbonic anhydrase	30000	4,47712	5,7	3,2	0,61404
Trypsin inhibitor	20100	4,39320	5,7	4,6	0,07018
- Lactalbumin	14400	4,15836	5,7	5,7	1

untuk menghalau sehingga ditemukan adanya total leukosit yang lebih banyak pada areal infeksi. Secara alamiah pada ikan yang terinfeksi patogen akan ditemukan jumlah leukosit yang lebih banyak dari kondisi normal, karena salah satu antisipasi tubuh untuk mencegah perkembangan bakteri dalam tubuh dengan mengirimkan darah lebih banyak ke daerah infeksi.

Hasil uji statistik, hanya ikan yang diinjeksi dengan ECP bakteri tipe non hemolitik, lama inkubasi 24 jam (5i24) yang tidak berbeda nyata dengan kontrol (ikan yang tidak diinjeksi dengan *S. agalactiae*). Artinya, ECP *S. agalactiae* umumnya menyebabkan perubahan pada total leukosit ikan nila secara nyata semenjak jam ke-24 (Gambar 3).

**Diferensial leukosit.** Diferensial leukosit diamati selama pengujian toksisitas ECP untuk mengetahui perubahan pada leukosit akibat toksin ECP *S. agalactiae*. Limfosit ikan yang disuntik dengan ECP *S. agalactiae* mengalami peningkatan dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) pada jam ke-24 pasca injeksi (kecuali ikan yang disuntik dengan ECP dari bakteri tipe non-hemolitik yang ditumbuhkan pada media BHI dengan lama inkubasi 24 jam). Hal ini disebabkan karena toksin ECP bakteri menstimulir produksi limfosit.

Jumlah monosit ikan yang disuntik dengan ECP *S. agalactiae* lebih tinggi namun tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kontrol tidak seperti saat ikan diinjeksi dengan sel utuh bakteri *S. agalactiae*. Namun peningkatan terjadi pada sel neutrofil pada jam ke-24 dan jam ke-96 jam pasca injeksi ECP *S. agalactiae* dan pada akhir penelitian (168 jam) neutrofil dan monosit ditemukan lebih rendah dari kontrol.

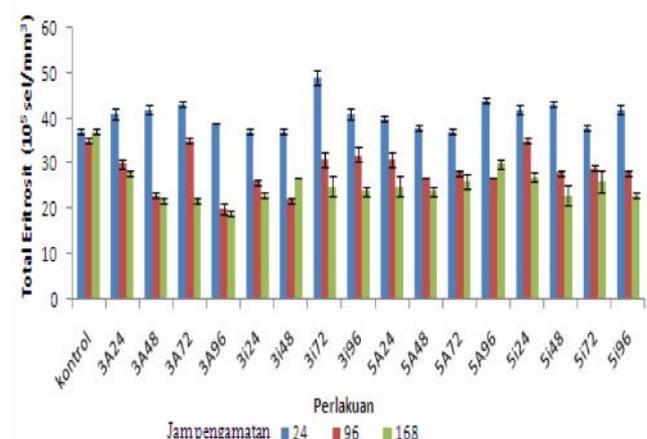


Gambar 3. Grafik total leukosit ikan nila yang diinjeksi ECP *Streptococcus agalactiae*  
Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 1

Jumlah granulosit mengalami penurunan karena adanya pendarahan pada organ ikan (ginjal dan mata) yang disebabkan oleh granulosit yang keluar dari pembuluh darah dan berada di tempat radang dan jaringan yang rusak untuk mengfagosit antigen yang masuk. Baik granulosit maupun mononuklear dapat menelan bakteri namun makrofag lebih aktif. Makrofag berada di dalam jaringan sebagai pelindung tubuh, juga pemakan bakteri dan sisa (debris), sedangkan monosit berada di dalam darah. Bakteri setelah dicerna diubah menjadi bentuk terlarut sehingga dapat dimanfaatkan tubuh, dibuang sebagai hasil limbah atau untuk merangsang respon imun. Jadi pertahanan non spesifik pada ikan fungsinya selain untuk mencegah infeksi, membatasi penularan, juga menyingkirkan jaringan yang rusak.

**Total Eritrosit.** Sejalan dengan kadar hemoglobin yang menurun, total eritrosit juga terjadi penurunan 96 jam pasca injeksi. Penurunan yang berbeda nyata dengan kontrol terjadi pada ikan nila yang diinjeksi dengan ECP yang dihasilkan oleh bakteri -hemolitik dan non hemolitik. Kerja toksin hemolisin (dihasilkan bakteri -hemolitik) menyebabkan sel eritrosit berada dalam cairan yang osmolaritasnya lebih rendah mengalami lisis (Dellmann, 1989), sehingga ditemukan jumlah lebih rendah pada 168 jam pasca injeksi (Gambar 4).

**Patologi klinik darah.** Hematokrit. Kadar hematokrit ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dari isolat non-hemolitik dan bakteri -hemolitik mengalami perubahan peningkatan mulai terjadi pada jam ke-96 dan menurun pada jam ke-168. Keberadaan ECP menyebabkan stress pada ikan yang ditandai adanya



Gambar 4. Grafik total eritrosit ikan nila yang diinjeksi ECP *Streptococcus agalactiae*  
Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 1

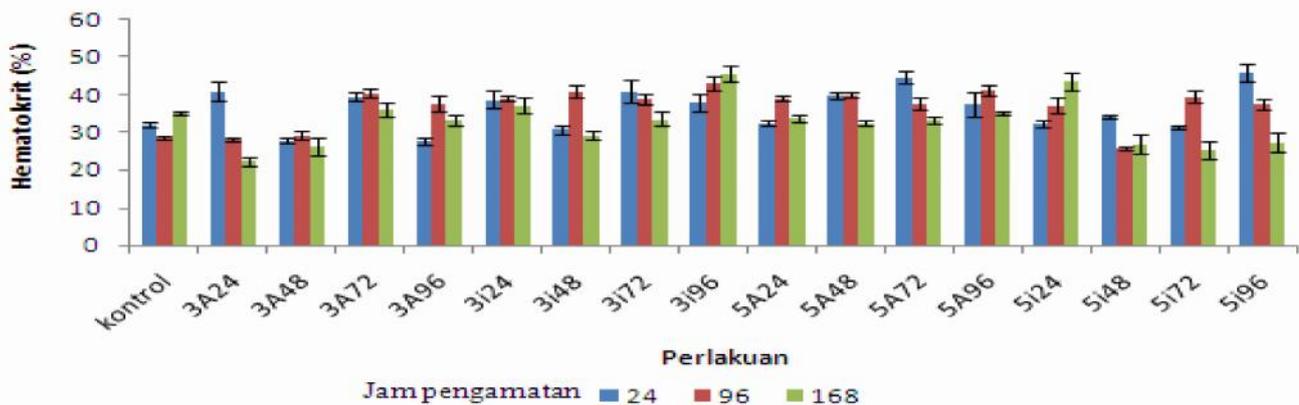
peningkatan hematokrit. Ini menandakan bahwa keberadaan ECP ini cepat menyebabkan perubahan pada kondisi ikan. Dari hasil uji statistik, semua ikan yang diinjeksi dengan ECP berbeda nyata (96 jam) dengan kontrol (ikan yang tidak diinjeksi dengan *S. agalactiae*) ( $p < 0,05$ ). Artinya, keberadaan ECP *S. agalactiae* umumnya menyebabkan perubahan pada hematokrit ikan nila secara nyata (Gambar 5).

**Hemoglobin.** Penurunan kadar hemoglobin terjadi sangat berbeda nyata dengan kontrol pada 96 jam pasca injeksi di hampir semua ikan yang diinjeksi dengan semua jenis ECP baik yang dihasilkan pada media padat maupun media cair dengan lama inkubasi yang berbeda. Namun penurunan kadar hemoglobin terjadi pada ikan yang diinjeksi dengan ECP di kedua media yang diinkubasi selama > 48 jam. Ini menandakan bahwa benar toksin hemolisin pada bakteri -hemolitik dan ECP bakteri non-hemolitik menyebabkan perubahan pada hemoglobin ikan.

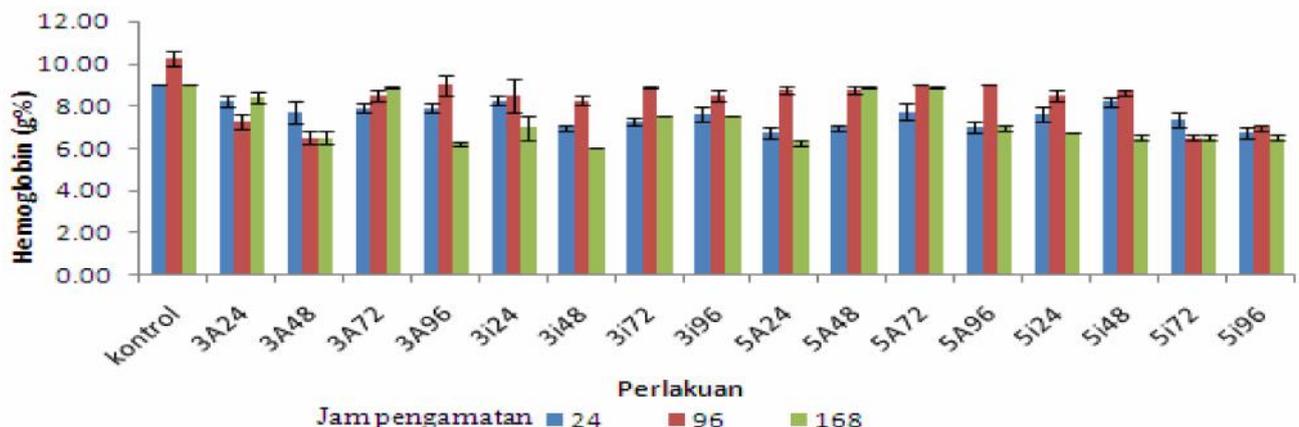
Kadar Hb berkaitan dengan keseimbangan osmolaritas plasma darah. Adanya *S. agalactiae* yang diduga mengandung toksin hemolisin mempengaruhi

kestabilan Hb. Hemolisin ini menyebabkan osmolaritas plasma darah lebih rendah sehingga menyebabkan eritrosit lisis, hal inilah yang diduga sebagai faktor virulensi pada *S. agalactiae*. Rendahnya kadar Hb menyebabkan laju metabolisme menurun dan energi yang dihasilkan menjadi rendah. Hal ini membuat ikan menjadi lemah dan tidak memiliki nafsu makan serta terlihat diam di dasar atau berenang lemah. Uji statistik, semua perlakuan berbeda nyata nilai dengan kontrol (ikan yang tidak diinjeksi dengan *S. agalactiae*) ( $p < 0,05$ ). Artinya, keberadaan ECP *S. agalactiae* umumnya menyebabkan perubahan pada hemoglobin ikan nila secara nyata semenjak jam ke-24 pasca injeksi ECP (Gambar 6).

**Glukosa darah.** Glukosa sebagai salah satu parameter yang menunjukkan kondisi stress pada ikan terlihat mengalami peningkatan pada ikan yang diinjeksi dengan ECP bakteri non-hemolitik yang ditumbuhkan pada media BHIA dan berbeda nyata dengan kontrol pada jam ke-168. Ini menandakan bahwa ikan mengalami gangguan keseimbangan dalam tubuhnya atau dapat dikatakan ikan menjadi stress.



Gambar 5. Grafik hematokrit ikan nila yang diinjeksi ECP *Streptococcus agalactiae*  
Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 1



Gambar 6. Grafik hemoglobin ikan nila yang diinjeksi ECP *Streptococcus agalactiae*  
Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 1

Penginjeksian dengan ECP dari media BHI menyebabkan pada glukosa darah lebih rendah.

Data ini digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk memilih ECP yang akan digunakan sebagai vaksin pada uji selanjutnya. Dari keseluruhan data ditetapkan bahwa vaksin yang akan digunakan adalah bakteri yang ditumbuhkan pada media BHI dengan lama inkubasi 72 jam karena protein yang dikandung pada ECP yang dihasilkan sudah sesuai dengan protein target yang mampu menstimulus kerja sistem imun ikan (Pasnik *et al.*, 2005). Selain itu juga, stress atau dampak negatif yang ditimbulkan terhadap ikan mampu diminimalisir sehingga diharapkan ikan yang di vaksin mampu melawan adanya infeksi bakteri *S. agalactiae* kedua tipe (Gambar 7).

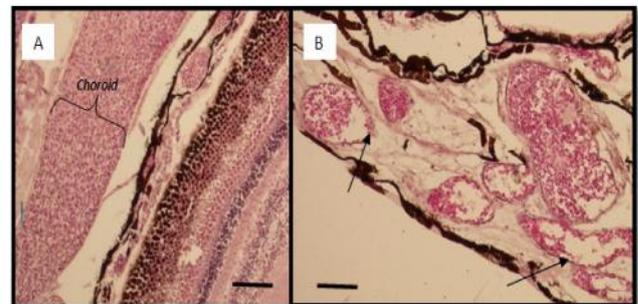
Peningkatan glukosa yang berbeda nyata dengan kontrol terjadi pada ikan yang diinjeksi dengan ECP *S. agalactiae* tipe non-hemolitik pada jam ke-96 pasca injeksi. Penurunan glukosa yang berbeda nyata dengan kontrol terjadi pada ikan yang diinjeksi dengan ECP *S. agalactiae* tipe -hemolitik pada jam ke-96 pasca injeksi. Peningkatan glukosa terjadi karena adanya infeksi bakteri/toksin pada bagian otak (hipotalamus) yang mengganggu kerja *syaraf sympathetic* yang berhubungan dengan ginjal depan (*cromaffin cell*) untuk membentuk catecholamines. Catecholamins ini salah satunya menyebabkan glukosa plasma meningkat. (Andersen *et al.*, 1991 dalam Evans *et al.*, 2004)

**Toksitas ECP *S. agalactiae* terhadap histopatologi organ mata, otak dan ginjal ikan nila**. Perubahan histologi dalam jaringan ikan dapat digunakan sebagai salah satu indikator untuk mengevaluasi dampak stress pada ikan yang

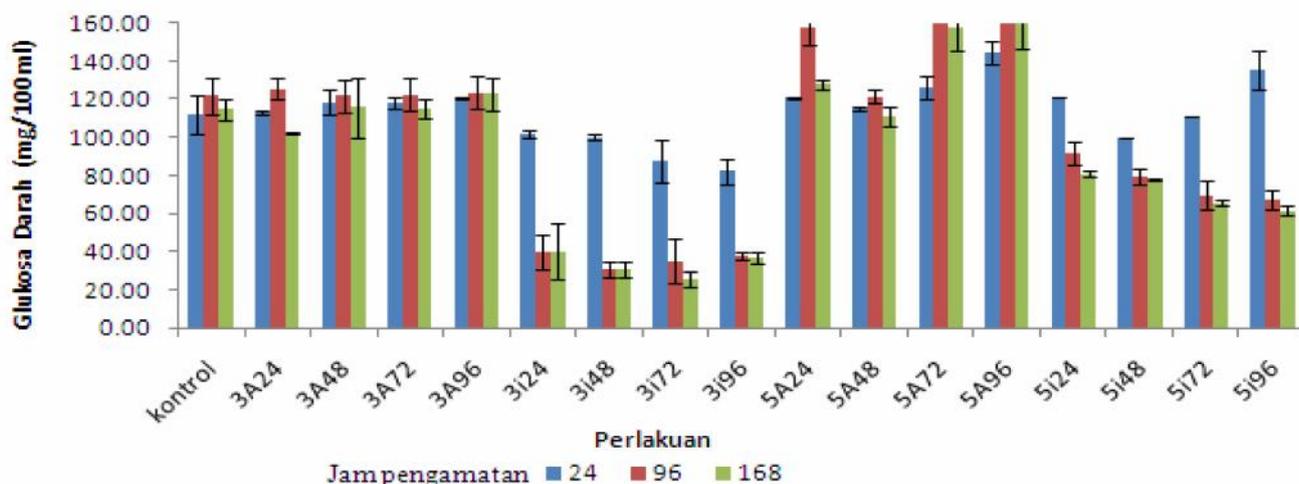
perubahannya dapat dilihat dalam jangka waktu yang lama (Adams, 1990). Untuk melihat virulensi dari ECP *S. agalactiae* dilakukan pengamatan pada jaringan organ target yaitu mata, otak dan ginjal ikan. Dari hasil pengamatan perubahan mulai tampak pada jam ke-96 hingga jam ke-168 pasca injeksi ECP dan perubahan hampir ditemukan di seluruh perlakuan.

**Organ Mata.** Perubahan pada mata ikan nila yang diinjeksi dengan ECP *S. agalactiae* secara makroskopis tampak adanya beberapa perubahan yaitu: pengerutan retina mata; *opacity* (kekeruhan mata); eksoptalmia dan *purulens* (mata putih). Secara histologi (mikroskopis) perubahan tampak seperti pada Gambar 8.

Hiperplasi, terjadi pada bagian *choroid* yaitu adanya penambahan jumlah sel dalam jaringan. Hiperemi ini tampak pada ikan yang mengalami eksoptalmia baik lateral maupun bilateral. Selaras saat penginjeksian dengan sel utuh *S. agalactiae*, eksotoksin (salah satunya hemolisin) langsung menyebar melalui darah dan merusak bagian *choroid*



Gambar 8. Histopatologi mata ikan nila yang diinjeksi ECP *Streptococcus agalactiae*. A. mata ikan normal 1 bar =500 µm, B. bagian *choroid* mata ikan yang diinjeksi ECP mengalami hiperplasi (tanda panah) 1bar = 100 µm



Gambar 7. Grafik glukosa darah ikan nila yang diinjeksi ECP *Streptococcus agalactiae* Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 1

mata sehingga menyebabkan mata mengalami perubahan-perubahan tersebut. Adanya hiperplasi pada bagian *choroid* menyebabkan ikan mengalami eksoptalmia yang tampak secara makroskopis pada mata ikan.

**Organ Otak.** Perubahan yang tampak akibat penginjeksian dengan ECP *S. agalactiae* terhadap otak ikan adalah munculnya nekrosa dan juga hiperemi yaitu pembesaran jaringan karena adanya peningkatan jumlah sel (Gambar 9). Kerusakan yang tampak seperti hiperemi, degenerasi dan nekrosa ditemukan pada ikan yang mengalami abnormalitas dalam berenang (berenang miring bahkan *whirling*) pasca diinjeksi dengan ECP kedua tipe *S. agalactiae*. Sama halnya dengan infeksi sel utuh *S. agalactiae* yang ditemukan adanya nekrosa dan hiperemi pada otak ikan (Hardi et al., 2011) ECP pun menyebabkan kerusakan yang sama pada otak ikan.

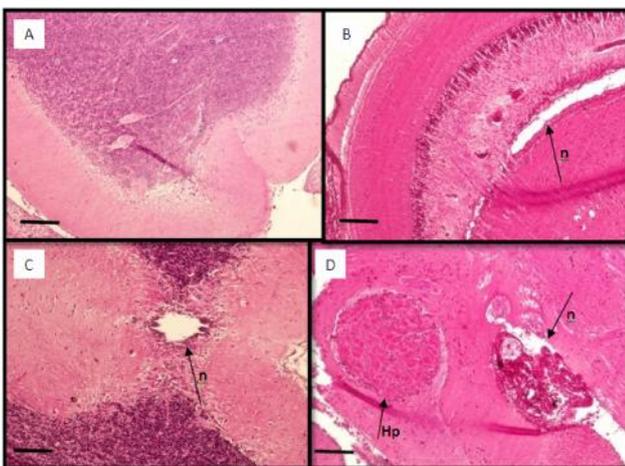
Kerusakan jaringan otak yang disebabkan ECP *S. agalactiae* terjadi lebih cepat karena toksin cepat menyebar melalui darah menuju ke otak dan seluruh tubuh. Perubahan pola renang (*whirling*) ditemukan pada hampir seluruh ikan yang diinjeksi dengan semua jenis ECP. Kerusakan otak (degenerasi dan nekrosa) sudah terjadi sejak hari ke-3 (72 jam) pasca injeksi dan makin parah setelah 7 hari penginjeksian. Hal ini menguatkan dugaan bahwa ECP merupakan faktor virulen dari *S. agalactiae* pada ikan nila.

**Organ Ginjal.** Ginjal ikan nila yang diinjeksi dengan ECP *S. agalactiae* menunjukkan adanya perubahan yang hampir sama dengan saat diinjeksi

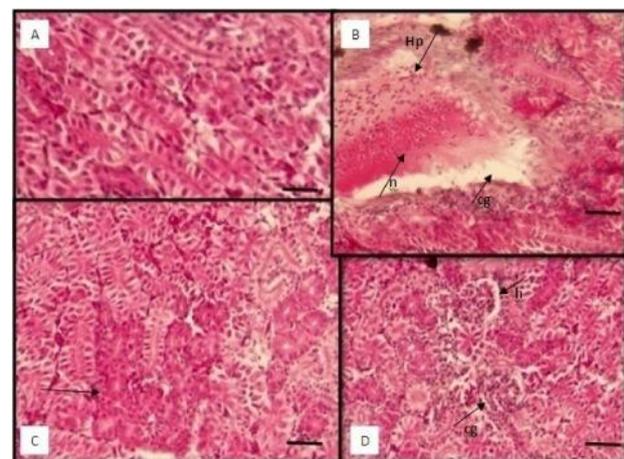
dengan sel utuh yaitu adanya kerusakan struktural seperti hipertropi dan nekrosa (Gambar 10).

Hipertropi disebabkan karena *S. agalactiae* masuk ke dalam ginjal melalui aliran darah dan menginfeksi tubulus ginjal. Infeksi *S. agalactiae* juga mempengaruhi metabolisme dan proses-proses enzimatik dalam sel, yang dapat menyebabkan terjadinya degenerasi dan nekrosa pada tubulus. Filho et al., (2009).

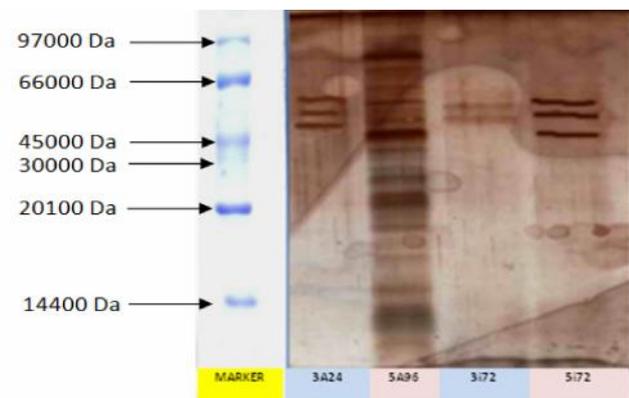
**Fraksinasi protein ECP.** Untuk masuk ketahap selanjutnya yaitu vaksinasi, dipilih ECP dari *S. agalactiae* yang mampu merespon peningkatan sistem imun terbaik dan juga dilihat ECP yang paling toksik pada ikan nila dengan mengamati kematian secara terus menerus. Pengujian fraksinasi ECP dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE untuk mengetahui protein yang terkandung dalam ECP dan untuk mengetahui jumlah atau banyaknya protein yang



Gambar 9. Histopatologi otak ikan nila yang diinjeksi ECP *Streptococcus agalactiae* A. Bagian *cerebellum* otak ikan normal 1 bar =500 µm, B. Bagian *cerebellum* dan C otak bagian belakang (*myelencephalon*) 1bar = 200 µm, D.otak bagian belakang, Hp. Hiperemi, n. degenerasi dan nekrosa 1 bar = 50 µm



Gambar 10. Histopatologi ginjal ikan nila yang diinjeksi ECP *Streptococcus agalactiae* A. ginjal ikan normal 1 bar =100 µm, B ginjal mengalami nekrosa dan hiperplasi, cg. kongesti. I bar = 100 µm. C. degenerasi yang diikuti dengan pendarahan (tanda panah) 1bar = 200 µm, D. h. Hipertropi, cg. Kongesti



Gambar 11. Hasil elektroforesis ECP melalui SDS PAGE dengan pewarnaan *silver stain*. Marker : BS. Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 1

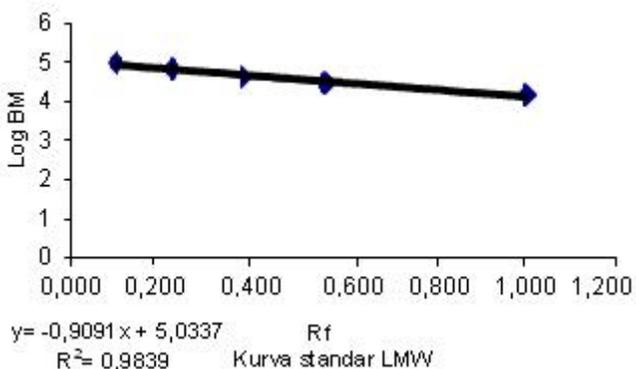
dikandung menggunakan elektroforesis. Hasil fraksinasi protein melalui SDS-PAGE diperoleh protein dengan berbagai berat molekul (Gambar 11).

Hasil ECP *S. agalactiae* yang ditumbuhkan pada media dan lama waktu inkubasi yang berbeda memiliki pita protein yang hampir sama. Produk ekstraselluler yang dihasilkan *S. agalactiae* tipe  $\beta$ -hemolitik yang ditumbuhkan pada media BHIA selama 24 jam memiliki 3 pita protein dan yang ditumbuhkan pada media BHI selama 72 jam memiliki 2 pita protein. Sedangkan ECP yang dihasilkan *S. agalactiae* tipe non-hemolitik yang ditumbuhkan pada media BHIA selama 96 jam memiliki 17 pita protein dan yang ditumbuhkan pada media BHI selama 72 jam memiliki 3 pita protein.

Untuk mengetahui berat molekul protein yang terdapat di dalam ECP *S. agalactiae* kedua tipe bakteri, dilakukan perhitungan pergerakan relatif (Rf) masing-masing protein (Tabel 5), dengan bantuan kurva baku protein standart dan nilai Rf diperoleh persamaan  $Y = -0,909X + 5,033$  (Gambar 12).

Perkiraan BM protein pada ECP *S. agalactiae* berkisar antara 19,2-100,4 kDa, dengan rata-rata BM protein pada sampel ECP adalah 51,8-65,8 kDa. Bakteri *S. agalactiae* mengandung protein dengan berat molekul 51,8, 55,8 dan 62,3 kDa pada ECP yang dihasilkan di media BHI dan protein dengan berat molekul berkisar 51,8-69,6 kDa pada media BHIA (Tabel 6).

Menurut Pasnik *et al.*, (2005), kandungan protein pada ECP *S. agalactiae* yang digunakan sebagai vaksin pada ikan berkisar antara 47-75 kDa dan yang lebih dominan adalah protein 54 dan 55 kDa. Sehingga dari hasil fraksinasi dipilih ECP dari kedua tipe bakteri yang ditumbuhkan pada media BHI dengan lama inkubasi > 48 jam.



Gambar 12. Regresi antara berat molekul protein standart dengan migrasi relatif (Rm)

Penentuan kadar protein hasil elektroelusi yang dibaca berdasarkan standar protein BSA (Bovine Serum Albumin) seperti disajikan pada Tabel 7.

Dengan melihat ketebalan band ini diduga bahwa band yang tebal memiliki peranan yang penting dalam aspek patogenisitas ikan yang diinjeksi dengan ECP. Sebagai sumbu X adalah variable kadar BSA dan sumbu Y adalah hasil bacaan *Optical Density* (OD), diperoleh persamaan  $Y = 0,001X + 0,008$ . Persamaan tersebut digunakan untuk menghitung kadar protein hasil elektroelusi. Konsentrasi protein dalam ECP bakteri non-hemolitik (28,18 ppm pada media BHIA dan 13,64 ppm pada media BHI) lebih banyak di bandingkan dengan bakteri  $\beta$ -hemolitik (2,73 ppm pada media BHIA dan 8,18 ppm pada media BHI). Konsentrasi protein dalam ECP menjadi salah satu faktor yang menyebabkan patogenisitas bakteri non-hemolitik lebih tinggi.

Kematian ikan akibat infeksi bakteri merupakan fenomena yang menarik. Beberapa kajian menunjukkan bahwa ECP diduga menjadi salah satu faktor virulensi bakteri dan dapat menyebabkan timbulnya penyakit atau kematian ikan. Produk ekstraselluler sebagai penyebab perubahan gejala klinis dan kematian yang diproduksi oleh bakteri telah dikaji oleh beberapa peneliti terdahulu. Diantaranya adalah ECP yang dihasilkan oleh *Aeromonas hydrophila* (Kawahara & Nomura, 1990), *Edwardsiella tarda* (Suprpto *et al.*, 1995), *Flavobacterium* sp. (Ototake & Wakabayashi, 1985), *Mycobacterium* sp. (Chen *et al.*, 1997), *Vibrio anguillarum* (Lamas *et al.*, 1994; Murdjani, 2002). Dari hasil keseluruhan uji coba ternyata ECP bakteri bersifat toksik bagi ikan dan dapat dimanfaatkan sebagai vaksin. Menurut Subowo (1993), penggunaan komponen vaksin yang dimurnikan seperti eksotoksin

Tabel 6. Berat molekul protein pada ECP *Streptococcus agalactiae* (kDa)

ECP <i>S. agalactiae</i>				
3A.24	5A.96	3i.72	5i.72	
• 65,8	• 100,4	• 43,1	• 62,3	• 62,3
• 60,1	• 93,3	• 40,1	• 55,8	• 55,8
• 55,8	• 83,6	• 35,9		• 51,8
	• 77,7	• 32,2		
	• 69,6	• 29,9		
	• 62,3	• 24,9		
	• 55,8	• 20,7		
	• 51,8	• 19,2		
	• 48,2			

Tabel 7. Konsentrasi protein dalam ECP *Streptococcus agalactiae*

Sampel bakteri	3A.24	5A.96	3i.72	5i.72
Konsentrasi protein (ppm)	2,73	28,18	8,18	13,64

yang dihasilkan sudah banyak digunakan sebagai imunogen. Namun sebaiknya sebelum digunakan perlu ditawarkan sifat toksiknya dengan cara menambahkan formaldehid yang tidak merusak determinan imunogenik yang dikehendaki.

Ekstrasellular *Mycobacterium* spp. mengandung protein 14–65 kDa yang bersifat toksik terhadap ikan *rainbow trout* dan *Nile tilapia* yang diinjeksikan ECP sebanyak 400 µg secara intramuscular. Perbedaan lama inkubasi atau kultur pada media tumbuh berpengaruh terhadap produksi ECP *Mycobacterium* spp. (Chen *et al.*, 1997); Suprpto *et al.*, (1995), membandingkan toksisitas produk selular (ICC) dan produk ekstrasellular (ECP) bakteri *Edwardsiella tarda* baik yang virulen maupun yang tidak terhadap ikan *Japanese eel* dan *flounder*, hasilnya baik ECP maupun ICC sama-sama menyebabkan kematian pada kedua ikan. Kematian pada ikan *Japanese eel* hanya terjadi pada percobaan ECP yang ditumbuhkan pada media padat dimana kematian rata-rata terjadi mulai hari ke-4 hingga 9 pasca injeksi. Produk ekstrasellular bakteri *Aeromonas hydrophila* yang virulen menyebabkan 100% kematian benih lele dalam 18 jam pasca injeksi dan ECP *Aeromonas hydrophila* yang tidak virulen menyebabkan 100% kematian dalam 96 jam (Kawahara & Nomura, 1990). Sama halnya dengan ECP dari *S. agalactiae*, yang menyebabkan kematian pada ikan nila mulai 12 jam pasca injeksi. Produksi ECP pada media BHI dan BHIA dan perbedaan lama inkubasi berpengaruh terhadap kematian kumulatif. Kematian ikan yang diinjeksi dengan ECP dari media tumbuh BHIA cenderung lebih banyak dibandingkan dengan ECP yang berasal dari media tumbuh BHI, hal ini disebabkan oleh kemampuan bakteri saat memproduksi ECP, sifat media padat lebih mendukung untuk memproduksi ECP, dan hasil fraksinasinya menunjukkan bahwa jenis dan jumlah protein dalam ECP yang diproduksi pada media padat lebih beragam dan lebih banyak dibandingkan pada bakteri yang ditumbuhkan pada media cair.

## KESIMPULAN

Pengujian toksisitas ECP *S. agalactiae* tipe -hemolitik dan non-hemolitik menghasilkan simpulan bahwa: Produk ekstrasellular merupakan salah satu faktor virulensi *S. agalactiae*, karena gejala yang muncul pada ikan nila saat diinjeksi dengan ECP sama dengan

gejala yang ditemukan pada ikan nila yang diinjeksi dengan sel utuh *S. agalactiae*.

Perubahan pada tingkah laku berenang, nafsu makan, perubahan anatomi organ luar secara makroskopis dan mikroskopis yang diinjeksi ECP tipe -hemolitik dan tipe non-hemolitik hampir sama.

Kematian dan perubahan gejala klinis ikan yang diinjeksi dengan ECP kedua tipe bakteri yang ditumbuhkan pada media BHIA dan BHI dengan lama inkubasi lebih dari 48 jam cenderung lebih bersifat toksik.

Protein yang terkandung di dalam ECP *S. agalactiae* tipe -hemolitik dan non-hemolitik yang ditumbuhkan dalam media padat dan media cair dengan masing-masing masa inkubasi berturut-turut adalah 65,8; 60,1; 55,8 kDa (3A24); 19,2-100,4 kDa (5A96); 62,3; 55,8 kDa (3i72); 62,3; 55,8; 51,8 kDa (5i72) dan konsentrasi total protein di dalam ECP yaitu 2,73 ppm (3A24); 28,18 ppm (5A96); 8,18 ppm (3i72) dan 13,64 ppm (5i72). Hasil fraksinasi menunjukkan bahwa konsentrasi protein ECP tipe non-hemolitik lebih tinggi dari pada tipe -hemolitik, hal ini yang diduga sebagai salah satu penyebab bakteri tipe non-hemolitik lebih virulen.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pemanfaatan ECP sebagai vaksin untuk mencegah infeksi Streptococcosis akibat *S. agalactiae*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Sempur, Bogor Jawa Barat dan Laboratorium Kesehatan Ikan Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor yang telah membantu dan memfasilitasi penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adam, S.M. 1990. Status and use of biological indicator for evaluating the effect of stress on fish. *American Fisheries Society Symposium* 8: 1-8.
- Anderson, D.P. & Siwicki, A.K. 1995. Basic hematology and serology for fish health programs. Paper presented in second symposium on diseases in Asian Aquaculture "Aquatic Animal Health and the Environment". Phuket, Thailand. 25 – 29 October 1993. 17 pp
- Austin, B. & Austin, D.A. 2007. Bacterial fish pathogens. Fourth Edition. New York: Praxis Publishing Ltd.
- Blaxhall, P.C. & Daisley, K.W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal Fish Biology* 5: 577-581
- Chen, S.C., Adams, A. & Richards, R.H. 1997. Extracellular products from *Mycobacterium* spp. in fish. *Journal of Fish Diseases* 20: 19-25

- Dellmann, H.D.** 1989. Veterinary histology. Penerjemah: Hartono R. Universitas Indonesia Press pp. 297.
- Djosoebagio, S.** 1996. Fisiologi kelenjar endokrin. Jakarta: UI Press.
- Evans, J.J., Phillip, H.K. & Craig, A.S.** 2004. Efficiency of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine* **22**: 3769-3773
- Evans, J.J., Klesius, P.H. & Shoemaker, C.A.** 2006a. An overview of Streptococcus in warmwater fish. *Aquac. Health Int.* **7**: 10-14.
- Evans, J.J., Phillip & Craig, A.S.** 2004. Efficiency of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine* **22**: 3769-3773.
- Hardi, E.H.** 2011. Kandidat vaksin potensial *Streptococcus agalactiae* untuk pencegahan penyakit streptococcosis pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Disertasi Pasca Sarjana*. Bogor:IPB.
- Hinton, D.E. & Lauren, D.J.** 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors of fishes. *American Fisheries Society Symposium* **8**: 51-66.
- Kawahara, E. & Nomura, S.** 1990. Lethality and immunogenicity of *Aeromonas salmonicida* extracellular products to salmonids p. 671-674 in R. Hirano and I.Hanyu (Eds), *Proc. Of The Second Asian Fisheries Forum*, Tokyo Japan, 17-22 April 1989.
- Lamas, J., Santos, Y., Bruno, D., Toranzo, A.E. & Anadon, R.** 1994. A comparison of pathological changes caused by *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Pathology*, **29(2)**: 79-89.
- Murdjani, M.** 2002. Identifikasi dan patologi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *Disertasi Pasca Sarjana*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Ototake, M. & Wakabayashi, H.** 1985. Characteristics of extracellular products of *Flavobacterium* sp., a pathogen of bacterial gill diseases. *Journal of Fish pathology* **20(2)**:167-171.
- Sheehan Brian et al.** 2009. Streptococcal diseases in farmed tilapia. *Aquaculture Asia pacific*. **5 (6)**.
- Suprpto, H., Nakai, T. & Muroga, K.** 1997. Toxicity of extracellular product and intracellular components of *Edwardsiella tarda* in japanese eel and flounder. *Journal of Aquatic Animal Health* **7(4)**: 292-297.
- Taukhid.** 2009. Efektivitas pemberian vaksin *Streptococcus* spp. pada benih ikan nila (*Oreochromis niloticus*) melalui teknik perendaman untuk pencegahan penyakit Streptococcosis. *Laporan Penelitian Hibah Penelitian Bagi Peneliti dan Perekrayasa Departemen Kelautan dan Perikanan*. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Pusat Riset Perikanan Budidaya Depertemen Kelautan dan Perikanan.
- Wedemeyer, G.A. & Yasutake, W.T.** 1977. Clinical methods for the assessment of the effect on environmental stress on fish health. Technical Papers of the U.S. Fish and Wildlife Service. US depert. Of the Interior. *Fish and Wildlife Service* **89**: 1-17.
- Williams, M.L., Azadi, P. & Lawrence, M.L.** 2003. Comparison of cellular and extracellular products expressed by virulent and attenuated strains of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* **15**: 264-273.