

Identifikasi Spesies Stafilkokus Pada Ikan Kerapu Di Kabupaten Karangasem Dengan Analisis Sekuen 16S rRNA

(SPECIES IDENTIFICATION OF STAPHYLOCOCCUS ON GROUPE IN KARANGASEM REGENCY BASED ON 16S RIBOSOMAL RNA SEQUENCE ANALYSIS)

I Nengah Kerta Besung¹, Ketut Wella Mellisandy², I Gusti Ngurah Kade Mahardika³

¹Laboratorium Mikrobiologi Veteriner Universitas Udayana

²Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

³Laboratorium Biomedik Veteriner Universitas Udayana

Jl. PB. Sudirman Denpasar-Bali

Email: *kerta_besung@unud.ac.id*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi spesies stafilkokus pada ikan kerapu di Kabupaten Karangasem. Sampel feses ikan dikumpulkan ditumbuhkan pada media Blood Agar dan diidentifikasi dengan pewarnaan Gram. Kultur bakteri yang diduga stafilkokus, dimasukkan dalam media *Chelex 10%*. Fragmen gen 16S rRNA diamplifikasi dari DNA (*deoxyribonucleic acid*) dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer spesifik stafilkokus. Produk PCR disekuensing di Barkley Sequencing Facility di Amerika Serikat. Hasil sekuensing diedit dan dirurutkan dengan MEGA5.0. Sekuen akhir dari setiap isolat disepadankan dengan database dari GenBank dengan fitur BLAST. Beberapa sekuens standar diunduh untuk mengkontruksi pohon filogenetik. Spesies yang dapat dikonfirmasi adalah *Staphylococcus warneri* dengan nilai homologi 100%.

Kata kunci: ikan Kerapu, stafilkokus, PCR, 16S rRNA

ABSTRACT

This study aims to identify the species *Staphylococcus grouper* in Karangasem Regency. Faeces samples were collected and grown on media Blood order and identified by Gram staining. Suspected staphylococcal bacterial culture, included in the 10% *Chelex* media. The 16S rRNA gene fragments amplified from DNA (*deoxyribonucleic acid*) by *Polymerase Chain Reaction* (PCR) with specific primers that is Tsta G422 and Tstag 765. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) products were sequenced in Barkley Sequencing Facility in the USA The result of sequencing was edit and sorted using MEGA 5.0. Final sequence from each isolate was aligned using database in GenBank by fitur of BLAST. Several of standard sequences were downloaded to construct the filogenetik tree. Species which can be confimed was *Staphylococcus warneri*with homology value of 100% with the data in GenBank.

Key word: grauper, *Staphylococcus*, PCR, 16S rRNA.

PENDAHULUAN

Berbagai macam ikan memiliki nilai ekonomis tinggi, salah satu contohnya yaitu ikan kerapu (Sadovy *et al.*, 2003). Ikan kerapu diminati orang karena rasanya enak dan gurih, namun ikan kerapu sering sebagai pembawa berbagai

jenis penyakit. Penyakit pada ikan kerapu paling banyak diakibatkan oleh bakteri. Bakteri yang biasanya menyerang ikan kerapu adalah *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio Sp.*, *Salmonella dan Shigella*, *Streptococcus*, *Pseudomonas sp.*, *Pasteurella sp.* dan *staphylococcus sp.* (Hatmanti, 2009). Selama ini terdapat 36

spesies stafilocokus dan beberapa sub spesies bakteri stafilocokus yang diantaranya ada yang bersifat zoonosis dan patogen (Benerman *et al.*, 2006).

Umumnya identifikasi bakteri stafilocokus dilakukan secara konvensional. Identifikasi bakteri secara konvensional banyak mengalami hambatan, diantaranya memerlukan berbagai media biakan, waktu inkubasi yang lama, dan sering terjadi kontaminasi. Maka dari itu dibutuhkan uji yang lebih akurat dan cepat untuk mengidentifikasi bakteri secara spesifik (Macrae, 2000).

Seiring perkembangan teknologi, identifikasi spesies bakteri, termasuk stafilocokus, dapat dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Teknik PCR terhadap bakteri sering menggunakan analisis sekuen 16S rRNA (*ribonucleic acid*).

Metode ini digunakan karena sangat akurat dalam mengidentifikasi suatu spesies, baik itu dari organisme eukariotik dan prokariotik. Selain itu kelebihan utama penggunaan 16S RNA sebagai marker karena bersifat universal, representatif, dan praktis untuk menentukan spesies dan mengkonstruksi kekerabatan filogenetik (Aris, 2011). Penelitian tentang penentuan spesies bakteri stafilocokus dengan teknik PCR pada ikan kerapu belum banyak dilakukan. Data tersebut akan bermanfaat untuk mengatasi masalah kesehatan pada budidaya kerapu serta kesehatan masyarakat konsumen.

METODE PENELITIAN

Materi penelitian

Sampel ikan kerapu diperoleh dari Desa Antiga Kabupaten Karangasem Bali. Pengambilan sampel dilakukan selama dua hari berselang seminggu, dengan mendatangi nelayan yang baru turun dari perahu. Sampel yang diperoleh dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam

boks yang berisi es.

Metode penelitian

Sebanyak sembilan sampel ikan kerapu yang berhasil dikumpulkan diambil feses dan ususnya, lalu ditanam pada media agar darah domba dan *Mac Conkey Agar*.

Koloni yang tumbuh pada media agar darah domba tetapi tidak tumbuh pada media *Mac Conkey Agar* dilakukan pewarnaan Gram. Bakteri yang berbentuk bulat dengan Gram positif dan tersusun menyerupai buah anggur dicurigai sebagai bakteri stafilocokus (Holt *et al.*, 1994). Selanjutnya koloni yang dicurigai tersebut dimurnikan dan disimpan pada media Glycerol (Holt *et al.*, 1994).

Koloni bakteri yang dicurigai stafilocokus dimasukkan dalam media *Chelex 10%* untuk ekstraksi DNA. Setelah itu gen target diamplifikasi menggunakan *primer* TSta G422 (5'-GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC A-3') dan TSta G765 (5'-TIA CCA TTT CAG TAC CTT CTG GTA A-3') (Martineau *et al.*, 2001), dengan metode PCR selanjutnya dielektroforesis untuk memvisualisasi produk PCR.

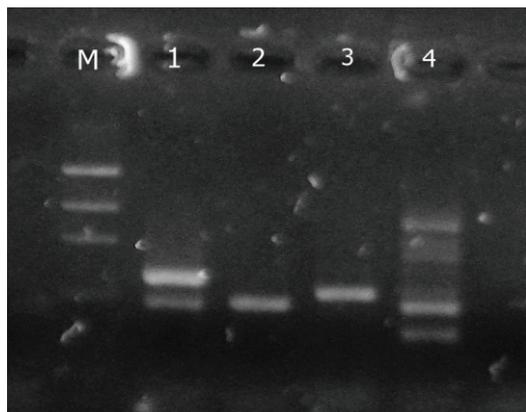
Visualisasi fragmen *deoxyribonucleic acid* (DNA) dilakukan di bawah sinar ultraviolet dan foto diambil menggunakan kamera digital. Hasil PCR disekuensing dengan Big-Dye Terminator di Universitas Barkley USA.

Analisis data

Data hasil sekuen dianalisis secara deskriptif dengan merunut (*aligned*) hasil sekuen menggunakan program berbasis computer (MEGA 5.0). Sekuen akhir dari setiap isolat disepadankan dengan database dari GenBank dengan fitur BLAST.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sembilan sampel yang ditanam pada media agar darah domba, empat sampel dicurigai sebagai bakteri stafilocokus.



Gambar 1. Elektroforesis Produk PCR dengan Gel Agalrose 1% yang diwarnai *Etidium Bromide* dengan *Marker* 100 bp DNA *Ladder*. Keterangan: *Marker* (M), sampel KRL01 (1), sampel KRN01 (2), sampel KRG01(3), dan sampel KRQ01 (4)

Isolat bakteri tersebut selanjutnya diambil untuk diekstraksi DNA dan amplifikasi 16S rRNA. Amplifikasi fragmen 16S rRNA menggunakan primer *Tsta G422 dan Tstag 765*. Dari sembilan sampel yang didapat, empat sampel diduga stafilocokus dan dapat di amplifikasi. Elektroforesis hasil PCR dapat dilihat pada Gambar 1.

Produk PCR yang telah dielektroforesis kemudian disekuensing untuk mendapatkan urutan DNA, dan hasil yang didapat diedit menggunakan program MEGA 5. Urutan DNA yang telah diedit selanjutnya dibandingkan dengan data yang ada di *GenBank* dengan menggunakan fasilitas *BLAST* untuk konfirmasi spesies, dengan hasil seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Rangkuman hasil dari hasil isolasi bakteri sampai dengan hasil BLAST dari data *GenBank*

No	Kode sampel di Karangasem	Isolasi bakteri	PCR (primer tstaG422 dan tstaG765)	Konfirmasi Spesies	Homologi terdekat dengan data <i>GenBank</i>
1	KR.E.01				
2	KR.F.01				
3	KR.G.01	Positif	Positif	Belum terkonfirmasi	Vagococcus 89%
4	KR.L.01	Positif	Positif	<i>Stafilococcus warneri</i>	<i>Stafilococcus warneri</i> 100%
5	KR.M.01				
6	KR.N.01				
7	KR.N.02	Positif	Positif	Belum terkonfirmasi	Vagococcus 89%
8	KR.P.01				
9	KR.Q.01	Positif	Positif	Sekuens tak terbaca	

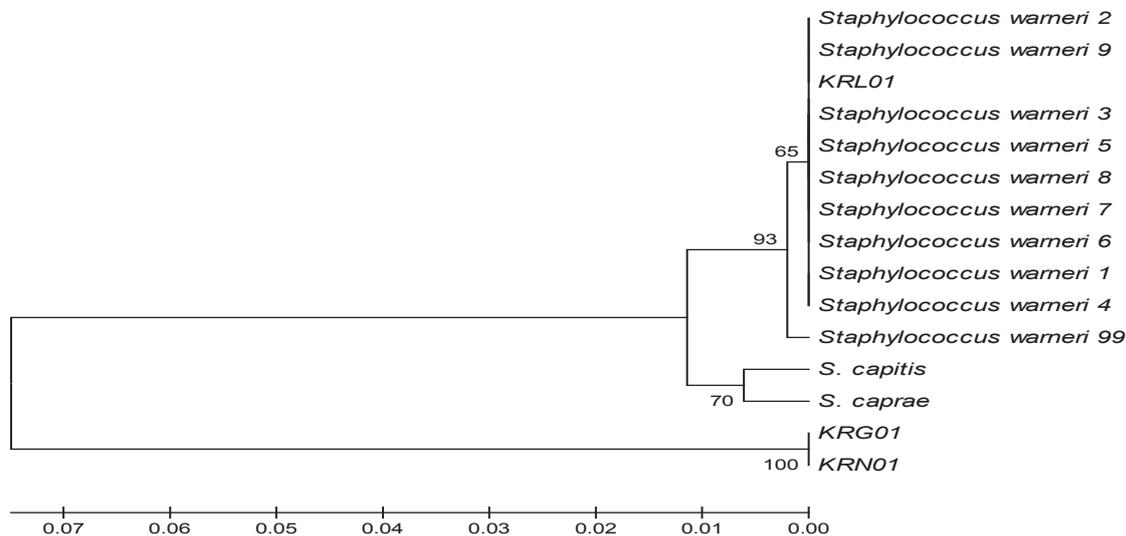
Tabel 1 menunjukkan satu isolat dapat diidentifikasi sebagai *Staphylococcus warneri*, sedangkan dua isolat lain disebut sebagai stafilocokus yang spesiesnya belum dapat ditentukan atau dikonfirmasi. *Staphylococcus warneri* (*S. warneri*) memiliki homologi yang tinggi dengan spesies yang sama dari *GenBank*. Konfirmasi homologi tersebut dapat dilihat pada gambar pohon

filogenetik seperti pada Gambar 2.

Analisis Evolusioner dilakukan di MEGA 5 seperti pada Gambar 2 menunjukkan bahwa antara isolat (KRL01) dengan spesies dan spesies stafilocokus yang diambil dari *GenBank* berada pada *cluster* yang sama dengan nilai *bootstrap* 41%. Hal ini menunjukkan bahwa KRL01 memiliki hubungan kekerabatan yang besar dengan spesies

stafilokokus yang diambil dari GenBank. Namun sampel lainnya (KRG01 dan KRN01) berada pada *cluster* yang berbeda dengan spesies stafilokokus yang

diambil dari GenBank. Hubungan kekerabatan spesies stafilokokus dapat dilihat juga pada Tabel 2.



Gambar 2. Pohon Filogenetik *Staphylococcus warneri* dari sampel KRL01 dengan data dari GenBank. Sampel KRG01 dan KRN01 berada pada *cluster* berbeda dengan *S. warneri* yang diambil dari GenBank. *S. capitis* dan *S. caprae* digunakan sebagai *outgroup*. Persentase pohon filogenetik untuk menentukan taksa yang sama dites *bootstrap* (100 ulangan) yang ditampilkan di samping cabang.

Tabel 2. Jarak genetik dari isolat KRL01 dengan beberapa data *S. warneri* yang diambil dari GenBank.

KRL01	Staphylococcus_warneri_1	Staphylococcus_warneri_2	Staphylococcus_warneri_99	Staphylococcus_warneri_3	Staphylococcus_warneri_4	Staphylococcus_warneri_5	Staphylococcus_warneri_6	Staphylococcus_warneri_7	Staphylococcus_warneri_8	Staphylococcus_warneri_9
1 KRL01										
2 Staphylococcus_warneri_1	0.000									
3 Staphylococcus_warneri_2	0.000	0.000								
4 Staphylococcus_warneri_99	0.004	0.004	0.004							
5 Staphylococcus_warneri_3	0.000	0.000	0.000	0.004						
6 Staphylococcus_warneri_4	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000					
7 Staphylococcus_warneri_5	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000				
8 Staphylococcus_warneri_6	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000			
9 Staphylococcus_warneri_7	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000		
10 Staphylococcus_warneri_8	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
11 Staphylococcus_warneri_9	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

genetik 0%.

Tabel 2 menunjukkan sampel jarak genetik terkecil adalah 0%. Persentase 0% tersebut menunjukkan bahwa dari 100

pasang basa, tidak satupun terdapat pasangan basa yang berbeda. Sampel yang menunjukkan jarak genetik yang

terkecil yaitu KRL01 dengan *S. warneri_1*, *S. warneri_2*, *S. warneri_3*, *S. warneri_4*, *S. warneri_5*, *S. warneri_6*, *S. warneri_7*, *S. warneri_8*, *S. warneri_9*. Jarak genetik terbesar yaitu 0,4% ditunjukkan oleh sampel KRL01, *S. warneri_1*, *S. warneri_2*, *S. warneri_3*, *S. warneri_4*, *S. warneri_5*, *S. warneri_6*, *S. warneri_7*, *S. warneri_8*, *S. warneri_9* *S. warneri_99*.

Berdasarkan tabel jarak genetik diatas terlihat sampel KRL01 merupakan bakteri *S. warneri* karena memiliki persentase jarak genetik 0%. Komponen 16S rRNA telah banyak dijadikan sumber analisis filogeni dan pengklasifikasian makhluk hidup, karena molekul rRNA bersifat homolog baik secara fungsional ataupun evolusinya pada organisme berbeda dan merupakan molekul yang strukturnya terkonservasi (Case *et al.*, 2007). Menurut Janda dan Abbott (2007) sekuen 16S rRNA sering digunakan karena memiliki tiga kelebihan yaitu ada pada semua bakteri, fungsinya tidak pernah berubah, dan gennya cukup besar (1500 bp) sehingga cukup untuk tujuan bioinformatika. Hasil sekuens kemudian dibaca dan diedit menggunakan program MEGA 5. Dari empat sampel yang telah dianalisis dan diedit menggunakan program MEGA 5 satu sampel merupakan bakteri stafilocokus yaitu *S. warneri*. Tidak semua feses ikan yang diisolasi dari penelitian ini mempunyai bakteri stafilocokus yang dapat dikultur. Bakteri lainnya yang ditemukan pada kultur adalah *Streptococcus sp.*, *E.coli sp.* dan *Klebsiela sp.*

Beberapa penelitian mengenai isolasi bakteri pada ikan kerapu telah berhasil dilakukan. Penelitian mengenai bakteri pada ikan kerapu macan yang telah diteliti yaitu bakteri probiotik yang terdapat pada ikan kerapu, dan salah satu yang ditemukan adalah bakteri stafilocokus. Belum dijelaskan secara rinci penyebab bakteri stafilocokus dapat menjadi bakteri probiotik dan spesies dari

bakteri stafilocokus yang dapat menjadi probiotik, penelitian tersebut terbatas pada identifikasi bakteri probiotik pada ikan kerapu macan (Feliatra *et al.*, 2004). Penelitian mengenai bakteri pada ikan kerapu juga pernah dilakukan oleh Asmara *et al.* (2011) mengenai bakteri asam laktat yang terdapat pada ikan kerapu macan, sebanyak 20 isolat bakteri asam laktat dengan aktivitas antivibrio telah berhasil diisolasi dari ikan Kerapu Macan asal perairan laut Situbondo.

Bakteri stafilocokus merupakan bakteri Gram +, tidak berspora, tidak motil, fakultatif anaerob, kemoorganotrofik (Holt *et al.*, 1994). Stafilocokus bertindak sebagai flora normal tetapi ada juga yang patogen. Pada penelitian ini stafilocokus yang teridentifikasi adalah *S. warneri*. Bakteri ini merupakan salah satu spesies stafilocokus dari 36 spesies dan beberapa sub spesies yang ada (Bannerman *et al.*, 2006). Bakteri *S. warneri* secara teoritis biasanya terdapat pada kulit manusia dan hewan. *S. warneri* dapat menyebabkan abortus pada sapi, meningosepalitis pada anjing dan endocarditis (Nino *et al.*, 2010). Menurut Vesanen *et al.* (1998) *S. warneri* ditemukan pada ikan, namun belum ada penjelasan lebih lanjut mengenai peran *S. warneri* pada ikan.

Penelitian ini berhasil menemukan bakteri *S. warneri* dengan nilai kekerabatan yang sangat dekat dengan bakteri *S. warneri* dari GenBank dengan nilai *bootstrap* 65% dan nilai homologinya 100%. Peranan bakteri pada ikan kerapu perlu dilakukan uji lebih jauh lagi untuk mengetahui *S. warneri* bersifat patogen atau sebagai flora normal pada ikan kerapu. Hal ini perlu dilakukan kerana *S. warneri* juga dapat menghasilkan bakteriosin untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Legiolla sp.* (Bruneteau *et al.*, 2005).

Satu dari empat isolat yang ada berhasil diidentifikasi sebagai bakteri *S. warneri*, dua sampel belum dapat

diidentifikasi dan satu sampel tidak terbaca. Dua isolat yang diidentifikasi sebagai bakteri vagokokus dengan persentase homologi 89%, namun hasil ini belum bisa dinyatakan benar. Menurut Janda dan Abbott (2007) jika homologi mempunyai persentase mendekati 100% atau diatas 97% dapat dikonfirmasi sebagai suatu spesies tetapi sebaliknya jika homologinya lebih kecil dari 97% kemungkinan isolat tersebut adalah spesies baru atau spesies belum dapat dikonfirmasi.. Identifikasi bakteri *S. warneri* dengan menggunakan sekuens 16S rRNA memiliki nilai homologi dan kekerabatan yang tinggi terhadap *S. warneri* yang diambil pada GenBank.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Hasil identifikasi sembilan sampel dengan analisis 16s rRNA berhasil menemukan satu isolat sebagai *Staphylococcus warneri* yang diuji dengan nilai homologi 100% dari data GenBank.

Saran

Ditemukan *S. warneri* pada ikan kerapu di Karangasem mengindikasikan diperlukannya pengawasan yang lebih terhadap sanitasi dan hygiene dari ikan kerapu yang dijual. Perlu dilakukan kajian lebih lanjut mengenai peranan bakteri *S. warneri* pada ikan, agar hasil yang didapat lebih lengkap. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada isolat yang belum dapat diidentifikasi agar dapat terkonfirmasi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Kepala Laboratorium Biomedik Veteriner yang telah memberikan fasilitas selama penelitian. Juga para nelayan di Desa Antiga yang membantu mencarikan sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- Aris M, 2011. *Identifikasi, Patogenitas Bakteri Dan Pemanfaatan Gen 16s rRNA untuk Deteksi Penyakit Ice-ice pada Budidaya Rumput Laut*. IPB. Bogor.
- Bannerman, Tammy, Gotz, Friedrich, Schleifer, Karl-Heinz, 2006. *The Genera Staphylococcus and Micrococcus*. *J Clin Microbiol*, 4: 5-75.
- Bruneteau E, Ferraz S, He'chard Y, 2005. Isolation and characterization of a *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide. *J Microbiol*, 252: 19-23.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S, 2007. "Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies". *Appl Environ Microbiol J*, 73(1): 278-88.
- Feliatra, Efendi I, Suryadi E, 2004. Isolasi dan identifikasi bakteri probiotik dari ikan kerapu macan (*epinephelus fuscogatus*) dalam upaya efisiensi pakan ikan. *J Natur Indonesia*, 6(2): 75-80.
- Hatmanti A, Ruyitno N, Julinasari D, 2009. Screening Bakteri Penghambat Untuk Bakteri Penyebab Penyakit Pada Budidaya Ikan Kerapu Dari Perairan Banten dan Lampung. *J Ilmu Kelautan dan Perikanan*, 13: 81-86.
- Holt G, Kreig NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST, 1994. *Bergeys Manual Determinative Bacteriology*. Baltimore: William and Wilkins Baltimore.
- Janda JM, Abbott SM, 2007. *16s rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification In the Diagnostic Laboratory : Pulses, Perils, dan*

- Pitfalls. *J Clin Microbiol*, 30: 3217-3219.
- Macrae A, 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *J Clin Microbiol*, 31(2): 77-82.
- Martineau F, Picard FJ, Ke D, Paradis S, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG, 2001. Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels. *J Clin Microbiol*, 39(7): 2541-2547.
- Nino R, Marcos H, Jackline C, Maria E, Dorsel SY, 2010. Staphylococcus warneri meningitis in a patient with strongyloides stercoralis. *hyperinfection and lymphoma* (first report of a case). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 52(3):169-170.
- Sadovy YJ, Donaldson TJ, Graham TR, McGilvray F, Muldoon GJ, Phillipps MJ, Rimmer MA, Smith A, Yeeting B, 2003. *While stock last: the live reed food fish trade*. ADB Pacific Studies Series. Asian Development Bank. Manila.
- Vesanen S, Nykanen A, Kallio H, 1998. Synergistic Antimicrobial Effect of Nisin Whey Permeate and Lactic Acid on Microbes Isolated from Fish. *J Clin Microbiol*, 27: 345-348.