

Karakterisasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Penyakit *Pink-Blotch* di P. Sambangan, Karimun Jawa

Nirwani Soenardjo

Jurusan Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro
Kampus Tembalang, Semarang Indonesia
Tlp/Fax 024 7474698

ABSTRAK

Sindrome penyakit *blotch* yang menyerang karang *massive* mengakibatkan kehancuran sistem ekologi terumbu karang. Penyebaran penyakit ini berjalan sangat cepat dibandingkan dengan laju pertumbuhan karang. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri yang berasosiasi dengan sindrom penyakit pink-blotch (PBS) pada karang. Pelaksanaan penelitian meliputi sampling karang yang dilakukan dengan *ScubaDiving* pada kedalaman 3 dan 10 meter, identifikasi dan dokumentasi jenis karang yang terserang penyakit secara *in situ* dengan *underwatercamera* Nikonos, isolasi dan purifikasi bakteri yang berasosiasi dengan sindrome penyakit *blotch*, *contagious coral experiments* skala laboratoris, postulat Koch's experiment dilakukan di dalam laboratorium dan di lapangan dengan teknik *syringe*. Identifikasi bakteri yang berasosiasi dengan penyakit karang PBS secara mikrobiologis dilakukan untuk mengetahui genus agen penyebab penyakit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan sindrome penyakit pink-blotch adalah genus *Erythrobacter* sp.

Kata kunci: terumbu karang, *pink-blotch*, *Erythrobacter* sp

ABSTRACT

Pink-blotch syndrome that attacked on massive corals affected to the destroy of coral reef ecology. Compared to the coral growth rate, this disease grow faster. The objective of this research was to isolate and identify the bacteria associated with pink-blotch syndrome. The research's activities included coral sampling by scuba diving on 3 and 8 m in depth, coral identification and *in situ* documentation by using Nikonos underwater camera, bacterial isolation and purification, *contagious coral experiments* on laboratory scale, postulat Koch's experiment on laboratory and field by syringe technique. Bacterial identification of bacteria associated with PBS coral in genus level were conducted microbiologically. The experimental research showed that the bacterium associated PBS coral was *Erythrobacter* sp.

Key words: coral reefs, pink-blotch, *Erythrobacter* sp

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Terumbu karang kadangkala diibaratkan sebagai ekosistem hutan hujan tropis di dasar laut karena merupakan salah satu ekosistem laut yang paling beragam, produktif dan memiliki keindahan yang khusus di dunia. Ekosistem terumbu karang juga menyediakan habitat bagi keanekaragaman biologi terbesar di dunia yang saling

berinteraksi satu sama lainnya serta dengan lingkungan fisiknya.

Kerusakan struktur terumbu karang di berbagai tempat yang ditandai dengan menurunnya jumlah tumbuhan dan hewan dalam ekosistem karang. Perubahan-perubahan tersebut berkaitan erat dengan menurunnya kualitas perairan. Karena organisme pembentuk terumbu karang pada umumnya memerlukan suatu perairan yang jernih, suhu yang hangat, salinitas yang stabil,

dan cukup cahaya. Seiring dengan bertambahnya hunian di daerah pantai yang berdekatan dengan habitat karang yang diikuti pula dengan meningkatnya kegiatan konstruksi dan industrialisasi, menyebabkan siltasi dan turbiditas yang semakin meningkat. Kondisi lingkungan tersebut disamping menyebabkan tekanan pada ekosistem karang, juga dapat berpengaruh terhadap sensitivitas inang dan meningkatnya virulensi pathogen. Perubahan kondisi lingkungan justru lebih memungkinkan pathogen berkembang biak lebih cepat dan meningkatkan kemampuan pathogen di dalam menginfeksi karang yang sensitif.

Luas wilayah daratan Kepulauan Karimunjawa mencapai 7.115,00 ha serta luas perairannya seluas 1.626, 8 km², yang terdiri dari gugusan pulau sebanyak 27 buah pulau. Hanya 5 pulau yang berpenghuni, di setiap pulau ditumbuhi terumbu karang. Kondisi terumbu karang di Kepulauan Karimunjawa pada beberapa pulau dalam kategori sedang hingga baik namun pada sebagian besar pulau-pulau dalam kondisi rusak (Munasik, 2009). Rusaknya ekosistem terumbu karang ini mengakibatkan menurunnya hasil tangkapan ikan oleh nelayan. Volume hasil penangkapan ikan semakin menurun, ukurannya semakin kecil dan jarak tangkap yang semakin jauh. Kondisi geografis tersebut memungkinkan studi pengaruh antropogenik terhadap timbulnya penyakit karang.

Beberapa penyakit dan sindrom karang baru dilaporkan terjadi di beberapa lokasi pada tahun 1990-an. Penyakit/sindrom tersebut adalah penyakit *red band* (RBD), *white band* tipe-II (WBD-II), *white plague* tipe-II (WP-II), *yellow blotch* (YBS), *dark spot* (DSD), *white pox* (WPX), aspergillosis (ASP) dan *patchy* nekrosis (PNE). Epizootik ke-3 yang terjadi pada tahun 1990 ini (WP-II) sangat virulen dan membunuh dengan cepat karang *Dichocoenia stockesii*. Hanya

dalam waktu 2 tahun penyakit ini mampu menginfeksi 16 jenis karang (Richardson *dkk.*, 1998). Namun, saat itu pathogen WP-II berhasil diisolasi dan diidentifikasi (*Aurantimonas corallicida*). Epizootik ke-4 yang baru saja terjadi pada tahun 2000-an menyebabkan mortalitas masal jaringan karang *Montastrea* sp. yang disebabkan penyakit WP-III (Richardson dan Aronson, 2002; Weil *dkk.*, 2002).

Survei pendahuluan dengan penyelaman scuba pada 2 pulau kosong dan berpenghuni didokumentasikan adanya banyak syndrome penyakit karang, bahkan ditemukan syndrome baru penyakit karang yang belum pernah dilaporkan sebelumnya. Berdasarkan kepadatan dokumentasi bawah air dan kunci identifikasi gambaran penyakit oleh NOAA Coral Disease and Health Consortium, identifikasi visual menunjukkan kemiripan dengan syndrome penyakit Pink Line Syndrome (PLS). Walaupun survei pendahuluan ini hanya dilakukan pada 2 pulau, namun diyakini bahwa syndrome penyakit karang banyak ditemukan di gugusan pulau-pulau lainnya. Untuk mengkaji lebih dalam masalah penyakit karang yang terdapat di Kepulauan Karimunjawa, diperlukan adanya informasi lebih jauh tentang distribusi, ekologi, etiologi, epizootiologi, virulensi dan transmisi penyakit karang di Kepulauan Karimunjawa.

Pengetahuan tentang komunitas mikrobia yang berasosiasi dengan karang masih sangat sedikit, dan sebagian besar penelitian yang sampai saat ini dilakukan masih mengalami hambatan oleh keterbatasan teknik mikrobiologi tradisional yang berbasis pada mikroskopi dan kultivasi. Tentu saja, hasil yang diperoleh berbasis pada teknik-teknik tersebut secara substansi gagal untuk merefleksikan komponen fisiologi yang penting, terutama sekali pada kelimpahan yang relatif rendah (Bernard *et al.*, 2000).

Pendekatan secara mikrobiologi akan memberikan gambaran tentang populasi bakteri yang berasosiasi dengan karang. Aplikasi teknik mikrobiologi yang dikembangkan di sini dapat berperan didalam pemahaman mendalam dari bakteri yang berasosiasi penyakit karang. Sehingga didalam penelitian terapan selanjutnya akan tersedia materi dasar plasma dengan informasi genetik yang diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan identifikasi bakteri yang berasosiasi dengan syndrome penyakitkarang *pink-blotch*

METODOLOGI PENELITIAN

Deteksi *in situ* penyakit karang

Penyakit karang keras menjadi lebih mudah dikenali ketika terjadi perubahan penampakan karang yang mencakup perubahan warna dan perubahan bentuk. Perubahan-perubahan ini dapat digunakan untuk membedakan antara berbagai penyakit karang (Harvell, *et al.*, 2001). Kunci determinasi ini dimulai dengan cara memisahkan antara perubahan warna dan perubahan bentuk. Perbedaan diantara beberapa penyakit dari karang keras pertama kali sering didasarkan pada perbedaan warna garis atau band, atau noda/spots, atau *patch* di atas permukaan karang. Setelah itu dilihat apakah masih ada perbedaan jaringan pada koloni. Jika terdeteksi adanya perubahan warna atau kelainan pada jaringan permukaan karang, maka observasi dilanjutkan .

Dokumentasi bawah air

Dokumentasi karang yang terserang penyakit dilakukan dengan menggunakan *underwater camera* Sony MPK-NA pada setiap kejadian (prevalance) kaarang sakit. (English, *et al.*, 1994)

Sampling

Sampel diambil dari karang yang terserang penyakit dan karang sehat dengan menggunakan tатаh dan palu. Jika dimungkinkan, sampel juga diambil dari karang yang sehat yang letaknya jauh dari lokasi karang yang terserang penyakit. Kemudian sampel dimasukkan dalam kantong plastik steril dan disimpan dalam *cool box*. Sampling juga diambil dengan syringe pada permukaan karang. . Parameter oseanografis yang meliputi, suhu, salinitas, kecerahan, arus, Oksigen terlarut (DO) dilakukan pada lokasi disekitar karang sakit.

Isolasi bakteri

Isolasi bakteri dapat dilakukan dengan metoda *Pour plate* (lempeng tuang) menurut Brock dan Madigan (1991) dalam Sabdono dan Radjasa (2006). Sampel karang selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang sebagian berisi air laut steril. Kemudian dilakukan *scrapping* terhadap permukaan jaringan dan dengan alat pengerok steril secara aseptik. Selanjutnya dilakukan seri pengenceran terhadap sampel tersebut. Dari masing-masing cawan petri tersebut diambil 10 ml sampel dengan pipet steril, dan dimasukkan ke dalam labu erlemeyer yang berisi 90 ml air laut steril dan akan diperoleh pengenceran sampel sebesar 10^{-1} . Dari pengenceran 10^{-1} tersebut diambil 1 ml sampel dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml air laut steril dan akan diperoleh pengenceran 10^{-2} . Demikian selanjutnya sehingga diperoleh pengenceran sampel 10^{-3} ; 10^{-4} ; dan 10^{-5} . Dari masing-masing seri pengenceran tersebut selanjutnya diambil 1 ml sampel dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang dituangi dengan media agar Zobell 2216E. Cawan petri tersebut selanjutnya diinkubasikan pada suhu 30°C selama 2 hari. Koloni bakteri yang tumbuh pada permukaan agar tersebut, kemudian

dipisahkan dengan teknik goresan (*streak method*) sehingga diperoleh isolat bakteri yang berupa kultur murni.

Infeksi pathogen (*contagious coral experiment*)

Dalam akuarium yang berisi air laut filter, diletakkan koloni karang yang terserang penyakit dan koloni karang yang sehat. Teknik sirkulasi air laut diberikan secara terukur dan dilakukan pengamatan secara periodik. Dengan mencatat setiap kejadian.

Postulat Koch eksperimen

Eksperimen Koch dapat dilakukan dengan metode syringe *in situ* dan di laboratorium (Rosenberg and Loya, 2004). Kultur murni yang diperoleh dari jaringan karang yang sakit ditumbuhkan dalam media cair. Kemudian kultur murni dalam media broth diambil dengan menggunakan syringe, lalu diinokulasikan pada jaringan karang yang terlebih dahulu dilukai. Symptom penyakit karang yang muncul pada jaringan karang diamati, dan dilakukan lagi re-isolasi.

Penelitian skala laboratorium dilakukan pada bak akuarium tertutup yang berisi 4 liter air laut dengan diberi aerasi pada suhu kamar. Setiap akuarium berisi 3 fragmen karang, dimana 1 fragmen sebagai control dan 2 fragmen karang diambil dan diletakkan pada petridish steril. Kemudian karang diinokulasi dengan 30 μ l bakteri pathogen, dibiarkan selama 1 menit dan secara hati-hati dimasukkan kembali ke akuarium. Observasi dilakukan dengan mengamati jaringan karang yang mengalami infeksi (% area terinfeksi dengan total).

Karakterisasi Bakteri

Bakteri yang berasosiasi dengan karang diidentifikasi secara mikrobiologis yang meliputi uji morfologi, fisiologi dan biokimia (Garrity *et al*, 2004)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi sindrome *pink-blotch*

Sindrome penyakit karang keras *pink-blotch* dapat dideteksi secara *in situ* dari perubahan warna dan jaringan pada permukaan karang. Hasil deteksi penyakit karang *pink-blotch* di P. Sambangan, Karimunjawa pada Gambar 1 terlihat bahwa permukaan jaringan karang mengalami perubahan warna maupun struktur jaringannya. Fenomena tersebut sangat menarik, karena belum ada laporan studi tentang sindrome penyakit *pink-blotch*. Sehingga menjadi suatu tantangan untuk menjawab fenomena tersebut, apakah disebabkan oleh agen spesifik tunggal (penyakit) atau disebabkan oleh tekanan lingkungan seperti pemanasan global dan anthropogenik



Gambar 1. Sindrom penyakit karang *pink-blotch*
Kondisi Ekologis Lokasi Sampling

Tabel 1. Menunjukkan temperatur, pH, DO dan kecerahan perairan dari lokasi sampling memenuhi syarat-syarat kondisi yang diperlukan untuk pertumbuhan karang.

Tabel 1. Data parameter ekologis lokasi sampling Karimunjawa

No.	Parameter	Ulangan		
		1	2	3
1.	Temperatur (°C)	29,0	29,5	29,0
2.	pH	7,6	7,7	7,7
3.	DO	7,30	7,20	7,30
4.	Konduktivitas	2,05	2,9	3,10
5.	Turbiditas	0	0	0
6.	Kedalaman	6,0	7,6	7,8

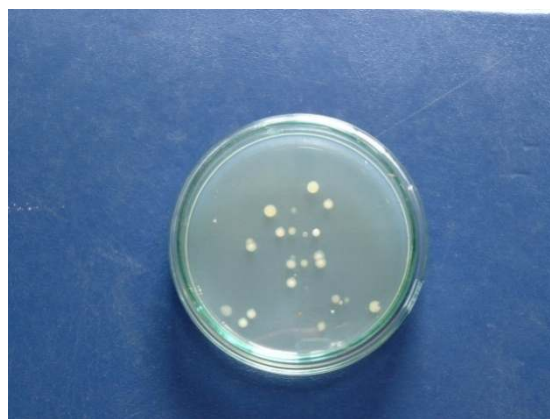
Isolasi Bakteri Karang

Hasil isolasi bakteri dari jaringan karang yang terinfeksi *pink-blotch* dapat dijumpai pada Tabel 2 dan Gambar 2. Dari table tersebut menunjukkan bahwa isolat.

jumlah bakteri yang berasosiasi dengan karang sehat sebanyak 20 isolat, sedangkan jumlah bakteri yang berasosiasi dengan syndrome pink-blotch sebanyak 4

Table 2. Hasil isolasi bakteri yang berasosiasi dengan karang

Jenis karang	Jumlah isolat	
	Karang sehat	Karang sakit
<i>Goniastrea</i> sp (massive)	20	4

**Gambar 2.** Koloni bakteri asosiasi dengan karang

Beberapa penelitian melaporkan keberhasilan mengisolasi bakteri karang. berhasil mengisolasi bakteri dari karang *Acropora* sp dan *Porites* sp. di Laut Merah. Demikian juga studi yang dilaporkan oleh Rohwer *et al.* (2001) berhasil melakukan isolasi bakteri karang dari beberapa spesies.

Studi Postulat Koch untuk mengetahui *causative agent* syndrome penyakit *pink-blotch* dilakukan dalam skala laboratorium maupun lapangan. Hasil pengamatan setelah inokulasi ke-4 isolat bakteri yang berasosiasi dengan sindrome penyakit *pink-blotch* (PB1, PB2, PB3 PB4) pada jaringan karang tidak menunjukkan adanya *symptom* (gejala) dan *sign* (tanda) syndrome penyakit tersebut. Hanya 4 jenis penyakit karang (30 jenis di dunia) yang memenuhi syarat-syarat postulat Koch. Karena sulitnya untuk membuat kondisi nyata (*mimicking*) pada skala laboratorium. Misalnya arah dan kecepatan arus, kedalaman dan sebagainya. Demikian juga pada percobaan postulat Koch di lapangan, kesulitan dijumpai pada saat melakukan inokulasi pada jaringan karang di badan air. Sebelum kultur bakteri tersebut

Eksperimen Postulat Koch

Karakterisasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Penyakit Pink-Blotch di P. Sambangan, Karimunjawa. (Nirwani Soenardjo)

melakukan settlement dan invasi, kemungkinan sudah dihempas oleh arus.

Uji virulensi

Uji virulensi dilakukan dengan meletakkan koloni karang sehat dan koloni karang yang terserang penyakit dalam satu bak akuarium. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa koloni karang sehat tidak tertular sindrome penyakit *pink-blotch*. Hasil studi

ini menunjukkan bahwa sindrome penyakit pink-blotch tidak virulen.

Karakterisasi Bakteri

Hasil karakterisasi bakteri secara mikrobiologis dapat dilihat pada Tabel 3. Dari tabel tersebut terlihat bahwa 4 isolat bakteri tersebut merupakan gram negatif (-), berbentuk batang, tidak membentuk spora dan tidak mampu melakukan fermentasi gula-gula..

Tabel 3. Hasil karakterisasi bakteri yang berasosiasi dengan sindrome karang PBS

N o	Nama Uji	PB1	PB2	PB3	PB4
1.	Gram	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
2.	Bentuk sel	Basil/Batang/Rods	Batang/Basil/Rods	Basil/Batang/Rods	Basil/Batang/Rods
3.	Panjang sel	<3µm	<3µm	<3µm	<3µm
4.	Pembentukan endospora	-	-	-	-
5.	Pertumbuhan pada 50 °C	-	-	-	-
6.	Respirasi	Aerob	Aerob	Aerob	Aerob
7.	Fermentasi Glukosa	-	-	-	-
8.	Fermentasi Laktosa	-	-	-	-
9.	Fermentasi Sukrosa	-	-	-	-
10	Indol	-	-	-	-
11	Oksidase	+	+	+	+
12	Katalase	+	+	+	+
13	Motil	+	+	+	+

Terdapat suatu hipotesis yang mengatakan bahwa timbulnya syndrome pink disebabkan adanya gangguan eksternal dari CO₂ yang mengganggu proses simbiose metabolisme antara alga dan inangnya (Frias-Lopez *et al*, 2002). Gangguan tersebut mengakibatkan karang kehilangan kendali terhadap zooxanthellae di dalam proses pembelahan. Proses ini

menyebabkan putusnya suplai fotosintesa ke inang yang menyebabkan karang kelaparan dan mengakibatkan mortalitas parsial. Dikatakan bahwa proses degenerasi ini dipicu adanya CO₂ yang diproduksi oleh *P. valderianum* dalam mekanisme konsentrasi karbonnya. Jika hipotesis ini benar maka tidak hanya bakteri cyanobacterium *P. valderianum*

saja yang dapat melakukan CO₂ triggering, namun simbiosis agen mikroorganisme lainpun dapat juga melakukan. Didalam penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri genus *Erythrobacter* merupakan agen tunggal penyebab syndrome pink-blotch.

Klasifikasi dari bakteri genus *Erythrobacter* adalah Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Erythrobacteraceae; *Erythrobacter*. Deskripsi dari bakteri tersebut merupakan gram negative, merupakan bakteri laut yang bersifat halotoleran aerobik, fototrop anoksigenik, tidak membentuk spora dan hanya hidup dalam kondisi aerob (Rohwer, *et al.*, 2002). Jenis bakteri ini kaya akan khlorofil a dan karotenoid. Sampai saat ini belum ada studi yang melaporkan bahwa genus *Erythrobacter* merupakan agen penyebab penyakit (Matsumura *et al.*, 1997). Namun bakteri tersebut memiliki sistem enzim LOV-histidin kinase yang sama dengan bakteri *Brucella* yang merupakan bakteri patogen yang ganas (Shioi *et al.*, 1998).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat diambil kesimpulan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan syndrome penyakit pink-blotch adalah genus *Erythrobacter* sp. Disarankan dalam penelitian selanjutnya adalah membuktikan bahwa pengaruh faktor abiotik, dalam hal ini, karbon dioksida (CO₂), merupakan faktor terjadinya syndrome pink-blotch. Sehingga dapat dijawab apakah pink-blotch merupakan penyakit karang atau hanya merupakan tekanan fisiologis (stress) yang mengganggu proses metabolisme.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kami sampaikan atas kesempatan dan dana yang telah diberikan oleh DIPA UNDIP sehingga penelitian ini dapat terlaksana dan terselesaikannya laporan

DAFTAR PUSTAKA

- Bernard, L., Schafer, H., Joux, F., Courties, C., Muyzer, G., and Lebaron, P. (2000) Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. *Aquat. Microb. Ecol.* 23: 1–11.
- English, S., C. Wilkinson and V. Baker. 1994. *Survey Manual For Tropical Marine Resources*. Australian Institute of Marine Science. Townsville-Australia. 368 pp.
- Frias-Lopez, J., A. L. Zerkle, G. T. Bonheyo, and B. W. Fouke. 2002. Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2214-2228.
- Garrity, G.M., J.A. Bell and T.G. Lilburn. 2004. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*, Second Edition. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 399pp
- Harvell, D., K. Kiho, C. Quirlo, J. Weir and G. Smith, 2001. Coral bleaching and disease: contributors to 1998 mass mortality in *Brearium asbestinum* (Octocorallia, Gorgonacea). *Hydrobiologia* 460: 97-104.
- Matsumura, H., H. Takeyama, E. Kusakabe, J.G. Burgess and T. Matsunaga. 1997. Cloning, sequencing and expressing the carotenoid biosynthesis genes, lycopene cyclase and phytoene desaturase, from the aerobic photosynthetic bacterium *Erythrobacter longus* sp. strain Och101 in *Escherichia coli*. *Gene* 189(2): 169-174.

- Munasik, 2009. Konservasi terumbu Karang, Badan Penerbit Universitas Diponegoro Semarang 117 hal
- Richardson , L.L. and R.B. Aronson. 2002. Infectious diseases of reef corals. *Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium* .Vol. 2 p. 1225-1230.
- Richardson, L.L., W.M. Goldberg, R.G. Carlton and J.C. Halas, 1998. Coral disease outbreak in the Florida Key: plague II. *Rev. Biol. Trop.* 46: 187-198.
- Rohwer, F., Breitbart, M., Jara, J., Azam, F., and Knowlton, N. (2001) Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. *Coral Reefs* 20: 85–91.
- Rosenberg,,E and Y Loya 2004. Coral Health and Disease, Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg 488pp
- Rohwer, F., V. Seguritan, F. Azam, and N. Knowlton, 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243:1-10
- Sabdono, A. and O.K. Radjasa, 2006. Karakterisasi Molekuler Bakteri yang Berasosiasi dengan Penyakit BBD (*Black Band Disease*) pada Karang *Acropora* sp di Perairan Karimunjawa. *Ilmu Kelautan* 11 (3) : 158-162.
- Shioi, Y., M. Doi, K. Tanabe, K..Shimokawa. 1988. Inhibition of porphyrin biosynthesis by exogenous 5-aminolevulinic acid in an aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter* sp. OCh 114. *Arch. Biochem. Biophys*
- .Weil, E., I. Urreiztieta, J. Garzon-Fereira, 2002. Geographic variability in the incidence of coral and octoral diseases in the wider Carribea. *Proc 9th Int. Coral reef Symp.* 2: 1231-1237.