

## Penggunaan *Repetitive Sequence-Based Polychain Reaction (REP-PCR)* Untuk Pengelompokan Bakteri *Vibrio* yang Berasosiasi dengan Ikan Kerapu Sakit dari Perairan Karimunjawa

Sarjito

Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,  
Universitas Diponegoro Jl. Prof. Soedarto, Kampus UNDIP Tembalang, Semarang  
email : sarjito\_msdp@yahoo.com

### Abstrak

Ikan kerapu sakit diperoleh dari keramba jaring apung yang berlokasi di perairan Karimunjawa. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji penggunaan *Repetitive Sequence-Based Polychain Reaction (REP-PCR)* untuk pengelompokan bakteri genus *Vibrio* yang berasosiasi dengan berbagai ikan kerapu sakit. Sebanyak 32 isolat *Vibrio* berhasil diisolasi dari bagian luka maupun ginjal berbagai ikan kerapu sakit dengan medium Thiosulfat Citrat Bile Salt Agar (TCBSA). Hasil rep-PCR diperoleh bahwa terdapat delapan kelompok bakteri *Vibrio* yang berasosiasi dengan ikan kerapu sakit. Oleh karena itu, pada penelitian ini, delapan isolat (JT 02, JT 07, JT 10, JT 13, JT 20, JT 24, JT 27, dan JT 31) yang masing-masing mewakili kelompoknya akan dilakukan uji selanjutnya. Teknik molekuler gen 16S rDNA digunakan untuk karakterisasi kedelapan isolat secara komprehensif. Berdasarkan analisis sekuen gen 16S rDNA, data menunjukkan bahwa isolat JT 02, JT 07, JT 10, JT 13, JT 20, JT 24, JT 27, dan JT 31 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Vibrio natriegens*, *V. olivaceus*, *V. damsella* ATCC33, *V. fortis*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* and *V. carchariae*. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa rep-PCR dapat digunakan untuk pendekatan molekuler secara efisien pada bakteri *Vibrio* yang berasosiasi dengan kerapu sakit.

**Kata kunci:** rep-PCR, *Vibrio*, Kerapu, Karimunjawa

### Abstract

Moribund grouper fish was taken from the cages located in Karimunjawa waters. The research aim was to apply *Repetitive Sequence-Based Polychain Reaction (REP-PCR)* to group the vibriosis on groupers from Karimunjawa waters. Thirty two isolates of *Vibrio* were isolated from external wound and kidney of groupers. Based on the rep-PCR results found eight groups of *Vibrio* bacteria associated with moribund groupers fish. Eight isolates, i.e. isolate of JT 02, JT 07, JT 10, JT 13, JT 20, JT 24, JT 27, and JT 31 were continued to characterize using the molecular techniques of 16S rDNA. Based on the results of sequen analysis, data showed that isolate of JT 02, JT 07, JT 10, JT 13, JT 20, JT 24, JT 27, and JT 31 was closely related to *Vibrio natriegens*, *V. olivaceus*, *V. damsella* ATCC33, *V. fortis*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* and *V. carchariae*, respectively. The present research concluded that rep-PCR was able to conduct biomoleculer approach efficiently for vibrios bacteria in moribund groupers fish.

**Key words:** rep-PCR, *Vibrio*, groupers, Karimunjawa

### Pendahuluan

Usaha budidaya ikan kerapu memiliki prospek yang sangat menguntungkan secara ekonomis. Namun, salah satu kendala dalam pengembangan budidaya ikan ini adalah serangan penyakit virus dan bakteri, karena infeksi bakteri ini dapat mengakibatkan kematian ikan kerapu di keramba jaring apung (Seng, 1994) dan panti benih (Koesharyani & Zafran, 1997; Murdjani, 2002). Kematian tersebut diakibatkan oleh infeksi bakteri

*Vibrio* spp (Koesharyani & Zafran, 1997; Taslihan et al., 2000).

Dalam bidang penyakit, identifikasi bakteri merupakan faktor yang sangat penting. Bakteri *Vibrio* telah dilaporkan berasosiasi dan agensia penyebab vibriosis pada ikan kerapu antara lain adalah *V. anguillarum* (Wijayanti & Hamid, 1997; Nitimulyo et al., 2005; Sarjito et al., 2007b); *V. alginolyticus* (Taslihan et al., 2000; Nitimulyo et al., 2005; Sarjito et al 2007b); *V. parahaemolyticus* (Nitimulyo et al., 2005;

Sarjito et al., 2007a), *V. fluvialis*, *V. furnisii*, *V. metchnikovii*, *V. vulnificus* (Nitimulyo et al., 2005). Akan tetapi, identifikasi bakteri agensia penyebab vibriosis pada ikan kerapu masih dilakukan secara konvensional (Seng et al., 1994; Wijayati & Hamid, 1997; Taslihan et al., 2000; Nitimulyo et al., 2005; Sarjito et al., 2007a,b).

Secara konvensional, isolasi genus *Vibrio* dilakukan dengan media selektif *Thio-Sulfate Citrate Bile Salt Sucrose* (TCBS), sedangkan untuk identifikasi dilakukan dengan pendekatan biokimia (Diggles et al., 2000). Selanjutnya, Sommary et al. (2002) menyatakan identifikasi bakteri secara fenotipe meliputi morfologi, kebutuhan nutrisi, resistensi antibiotik dan perbandingan perbedaan kemampuan memproduksi enzim. Metode ini memerlukan waktu yang lama atau *time consuming*. Dalam manajemen kesehatan ikan, identifikasi agensia penyebab penyakit secara cepat dan akurat diperlukan sebagai upaya memperoleh diagnosis dan penanganan yang tepat. Untuk itu, dalam pendeteksian agensia penyebab vibriosis perlu dikembangkan metode yang lebih efisien, cepat dan akurat dengan pendekatan diagnosa molekuler (Cunningham, 2002).

Metode biologi molekuler yang banyak digunakan antara lain, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Urakawa et al., 1997), *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) dan *repetitive based-sequenced polymerase chain reaction* (rep-PCR) (Versalovic et al., 1994). Identifikasi secara molekuler menggunakan 16S rDNA PCR telah dilakukan untuk bakteri karang (Sabdon, 2001); agensia gastroenteristis pada kerapu lumpur (Yii et al., 1997), bakteri psikrothropik (Radjasa et al., 2001; 2007) dan bakteri sponge (Radjasa et al., 2007). Sedangkan pendekatan dengan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) digunakan genotyping vibrionacea oleh Urakawa et al. (1997).

Berbagai metode secara molekuler untuk mendeteksi jenis bakteri ini telah pula berkembang (Myers et al., 2003) Aplikasi metode secara molekuler ini telah pula dilakukan oleh Sabdon (2001) dan Radjasa et al. (2001) untuk bakteri laut. Gomez-Gil et al. (2004) menerapkannya untuk mengelompokkan *Vibrio harveyi* yang berasosiasi dengan berbagai organisme laut yang sakit. Sarjito et al. (2008) mengaplikasikan metode ini untuk karakterisasi agensia penyebab vibriosis pada ikan kerapu macan (*Epinephelus gustatus*). Selanjutnya, *Repetitive sequence-based PCR* (rep-PCR) telah digunakan untuk pengelompokan pada berbagai mikroorganisme laut (Radjasa et al., 2007a,b) dan agensia penyebab vibriosis pada udang vanamei (*Litopenaeus vannamei*) (Sarjito et al., 2011). Pada penelitian ini

dilaporkan penggunaan rep-PCR untuk pengelompokan bakteri vibrio yang berasosiasi dengan ikan kerapu sakit dari keramba Jaring Apung di Karimunjawa.

## Materi dan Metode

Materi penelitian adalah ikan Kerapu sakit yang diperoleh dari keramba jaring yang berlokasi di perairan Karimunjawa yaitu ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), ikan Kerapu Bebek (*Cromileptis altivelis*) dan ikan Kerapu Sunu (*Plectropomus maculatus*).

Isolasi bakteri *Vibrio* dengan media *Thio-Sulfate Citrate Bile Salt Agar* (TCBSA) dengan metode tuang dan goresan (Brock & Madigan, 1991) dilaksanakan di Laboratorium Kelautan Terpadu, FPIK UNDIP. Isolat murni kemudian disimpan pada media *Nutrien Agar Trisalt* (NA, Merck). Tiga puluh dua isolat bakteri vibrio (isolat JT 01 sampai dengan JT 32) diperoleh dari berbagai ikan kerapu sakit tersebut.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metoda eksploratif (Nazir, 1999). Aplikasi rep-PCR dilakukan untuk mengelompokkan isolat yang diperoleh prior karakterisasi secara molekuler berdasarkan 16S rDNA. Hasil rep-PCR mendasari pemilihan isolat untuk uji selanjutnya dikarakterisasi secara molekuler. Ekstraksi DNA dan amplifikasi DNA untuk rep-PCR dilaksanakan di Laboratorium Kelautan Terpadu FPIK Universitas Diponegoro, sedangkan sekuensing DNA dilakukan BPPT Serpong, Jakarta.

### **Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR)**

Primer yang digunakan pada analisa *Repetitive sequence-based PCR* (rep-PCR) adalah BOX AIR (5'-CTACggCAAggCgACgCTgACg-3'). Rep 1 R-I dan REP 2-I primers berisi nucleotide inosine (I) pada posisi konsensus (34) (Versalovic et al., 1994). Rep-PCR dilakukan dengan menggunakan Eppendorf Mastercycler (Eppendorf Inc.Germany) adalah sebagai berikut: 1 µl template DNA, 1 µl primer BOX-Air, Reagen Megamix Royal 7,5 µl, 5 µl 10 x RedTaq™ PCR buffer (Sigma, Germany), 1.2 mg ml<sup>-1</sup> (konsentrasi akhir) bovine serum albumin (Sigma) dan 0.75 unit RedTaq™ DNA polymerase (Sigma) diatur konsentrasi akhir hingga volume 200 µl dengan aquabidest steril (Sigma). PCR dilakukan 30 siklus dengan kondisi 5 menit pada 95°C, annealing 1,5 menit 50 °C dan ekstensi selama 8 menit pada 68°C, final ekstensi selama 10 menit pada 68°C (Radjasa et al., 2007a).

### **Pengelompokan isolat**

Hasil amplifikasi rep-PCR isolat JT 01-JT 32,

selanjutnya diubah dengan bentuk matrik gel secara manual. Data matriks selanjutnya diolah menggunakan program Free Tree (Versi 0.9.1.50) (Pavlicek et al., 1999). Untuk memperoleh hasil pengelompokannya, data dari program Free Tree dimasukkan ke program Free Tree View (Versi 1.6.6) (Page, 2001).

**Ekstraksi dan amplifikasi DNA**

Untuk analisis PCR, DNA genom dari isolat JT 02, JT 07, JT 10, JT 13, JT 20, JT 24, JT 27, dan JT 31 diekstraksi dari sel dengan cara mengambil sel bakteri dari plate agar, disuspensi dalam air dengan mengacu pada metode Ausubel et al. (1995) yang dimodifikasi oleh Radjasa et al. (2007a,b). PCR dilakukan dengan DNA cycler thermal (Mini cycler TM, MJ Research Inc, Watertown, MA, USA) adalah sebagai berikut: 2 µl template DNA, 40 pmol primer, 125 µmol deoxyribonucleoside triphosphate, 5 µl 10 x RedTaq™ PCR buffer (Sigma, Germany), 1.2 mg ml<sup>-1</sup> (konsentrasi akhir) bovine serum albumin (Sigma) dan 0.75 unit RedTaq™ DNA polymerase (Sigma) diatur konsentrasi akhir hingga volume 50 µl dengan air steril (Sigma). PCR menggunakan metode Radjasa et al. (2007<sup>ab</sup>) yang telah dimodifikasi sebagai berikut : denaturasi awal pada 94°C selama 2 menit, kemudian 30 siklus denaturasi (94°C selama 2

menit), annealing (45°C selama 2 menit), dan ekstensi (72°C selama 2 menit), serta ekstensi terakhir pada 72°C selama 3 menit.

**Sekuen gen 16S rDNA hasil amplifikasi PCR**

Hasil amplifikasi PCR gen 16S rDNA dari isolat JT 02, JT 07, JT 10, JT 13, JT 20, JT 24, JT 27, dan JT 31 dipurifikasi. Kemudian analisis sekuensing dilakukan dengan metode dari Brinkhoff & Muyzer (1997) dan Radjasa et al. (2007a,b). Hasil sekuen isolat, kemudian dibandingkan homologynya dengan sekuen DNA pada DNA database Gen Bank. Penelusuran dilakukan dengan sistem internet, yaitu melalui sistem pelacakan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) pada National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA (Atschul et al., 1997).

**Hasil dan Pembahasan**

Hasil isolasi bakteri vibrio yang berasosiasi pada berbagai ikan kerapu sakit dengan menggunakan media TCBSA diperoleh tigapuluh dua isolat bakteri *Vibrio* dengan kode JT 01 sampai dengan JT 32. Adapun ikan sampel, asal isolat (sumber organ yang diisolasi), warna dan bentuk isolat pada media TCBS, serta kode isolat disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil Isolasi Bakteri *Vibrio* yang Berasosiasi pada Ikan Kerapu Sakit dari Keramba Jaring Apung di perairan Karimunjawa.

No	Ikan sampel	Asal isolat	Warna Isolat pada TCBS	Bentuk Koloni	Kode isolat
1	Kerapu Bebek 2	Luka	Kuning	Bundar	JT 01
2	Kerapu Bebek 2	Ginjal	Kuning tua	Bundar	JT 02
3	Kerapu Bebek	Mulut merah	Kuning	Bundar	JT 03
4	Kerapu Bebek MM	Mulut merah	Putih Ring kuning	Bundar	JT 04
5	Kerapu Sunu 2	Luka	Hitam	Bundar	JT 05
6	Kerapu Sunu 2	Ginjal	Hitam	Bundar	JT 06
7	Kerapu Bebek MM	Ginjal	Hijau	Bundar	JT 07
8	Kerapu Macan	Luka	Putih	Bundar	JT 08
9	Kerapu Bebek 1	Ginjal	Kuning	Bundar	JT 09
10	Kerapu Bebek	Ginjal	Kuning	Bundar	JT 10
11	Kerapu Bebek 1	Luka	Kuning	Bundar	JT 11
12	Kerapu Bebek kcl 1	Luka	Kuning	Bundar	JT 12
13	Kerapu Bebek kcl	Luka	Kuning	Bundar	JT 13
14	Kerapu Macan1	Luka	Kuning	Bundar	JT 14
15	Kerapu Macan	Ginjal Streak	Kuning	Bundar	JT 15
16	Kerapu Sunu 1	Luka	Kuning	Bundar	JT 16
17	Kerapu Sunu 2	Luka	Kuning	Bundar	JT 17
18	Kerapu Sunu 1	Ginjal	Kuning	Bundar	JT 18
19	Kerapu Sunu 2	Ginjal	Kuning	Bundar	JT 19
20	Kerapu Bebek	Ginjal	Kuning ring hitam	Bundar	JT 20
21	Kerapu Bebek 2	Luka	Putih	Bundar	JT 21
22	Kerapu Bebek kcl 1	Luka	Putih	Bundar	JT 22
23	Kerapu Macan	Ginjal (10 <sup>2</sup> )	Putih	Bundar	JT 23
24	Kerapu Bebek 1	Ginjal	Hijau	Bundar	JT 24
25	Kerapu Bebek 2	Ginjal	Hijau	Bundar	JT 25
26	Kerapu Bebek	Mulut merah	Hijau	Bundar	JT 26
27	Kerapu Macan 1	Luka	Hijau	Bundar	JT 27
28	Kerapu Macan	Ginjal (10 <sup>2</sup> )	Hijau	Bundar	JT 28
29	Kerapu Bebek	Ginjal	Hitam	Bundar	JT 29
30	Kerapu Bebek 1	Luka	Hitam	Bundar	JT 30
31	Kerapu Bebek 2	Luka	Hitam	Bundar	JT 31
32	Kerapu Bebek kcl 1	Luka	Hitam	Bundar	JT 32

Hasil pengelompokan tigapuluh dua isolat bakteri vibrio yang berasosiasi dengan ikan kerapu sakit dengan menggunakan *repetitive sequence-based polymerase chain reaction* (rep-PCR) tersaji dalam Gambar 1. Berdasarkan hasil tersebut diperoleh delapan kelompok bakteri yang berasosiasi dengan ikan kerapu sakit dari keramba jaring apung di Karimunjawa.

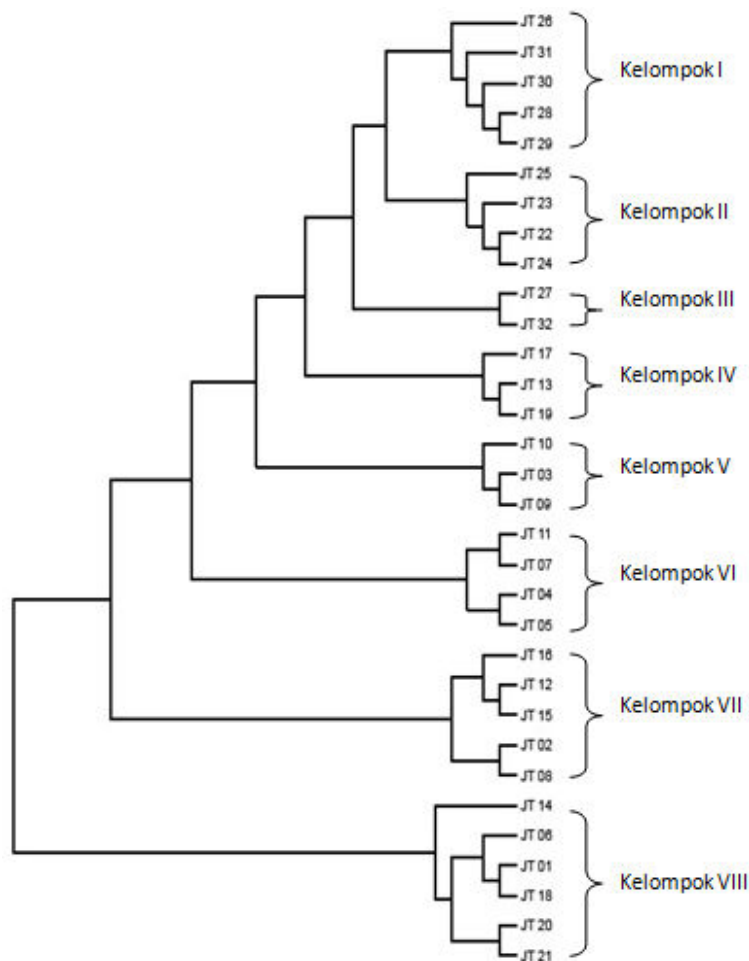
Berdasarkan rep-PCR, masing-masing kelompok diwakili oleh satu isolat (kelompok I – JT 02, kelompok II – 07, kelompok III – JT 10, kelompok IV – JT 13, kelompok V – JT 20, kelompok VI – JT 24, kelompok VII – JT 27, dan kelompok VIII – JT 31) untuk selanjutnya dilakukan karakterisasi secara molekuler dengan 16S rDNA.

Hasil penelusuran homologi sekuen 16S rDNA isolat JT 02, 07, 10, 13, 20, 24, 27, dan 31 dengan sekuen DNA *database Gen Bank* dengan menggunakan sistem BLAST dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan Tabel 2. dan Gambar 1., maka pengelompokan bakteri vibrio yang berasosiasi dengan ikan kerapu sakit dari keramba jaring apung di perairan Karimunjawa berdasarkan dendogram hasil rep-PCR disajikan pada Gambar 2.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa teknik biomolekuler dengan penggunaan rep-PCR (Gambar 2.; Tabel 2.) mampu mengelompokkan tigapuluh dua isolat bakteri vibrio yang berasosiasi dengan kerapu sakit dari keramba jaring apung di Karimunjawa menjadi delapan spesies berdasarkan homologinya yaitu *Vibrio fortis* (JT 13) dengan homologi 97%; *V. alginolyticus* (JT 20) dengan homologi 99%; *Vibrio natriegens* (JT 02), *V. olivaceus* (JT 07), *V. damsella* ATCC33 (JT 10), *V. harveyi* (JT 24) dan *V. carchariae* (JT 31) dengan homologi 99%; serta *V. parahaemolyticus* (JT 27) dengan homologi 100%.

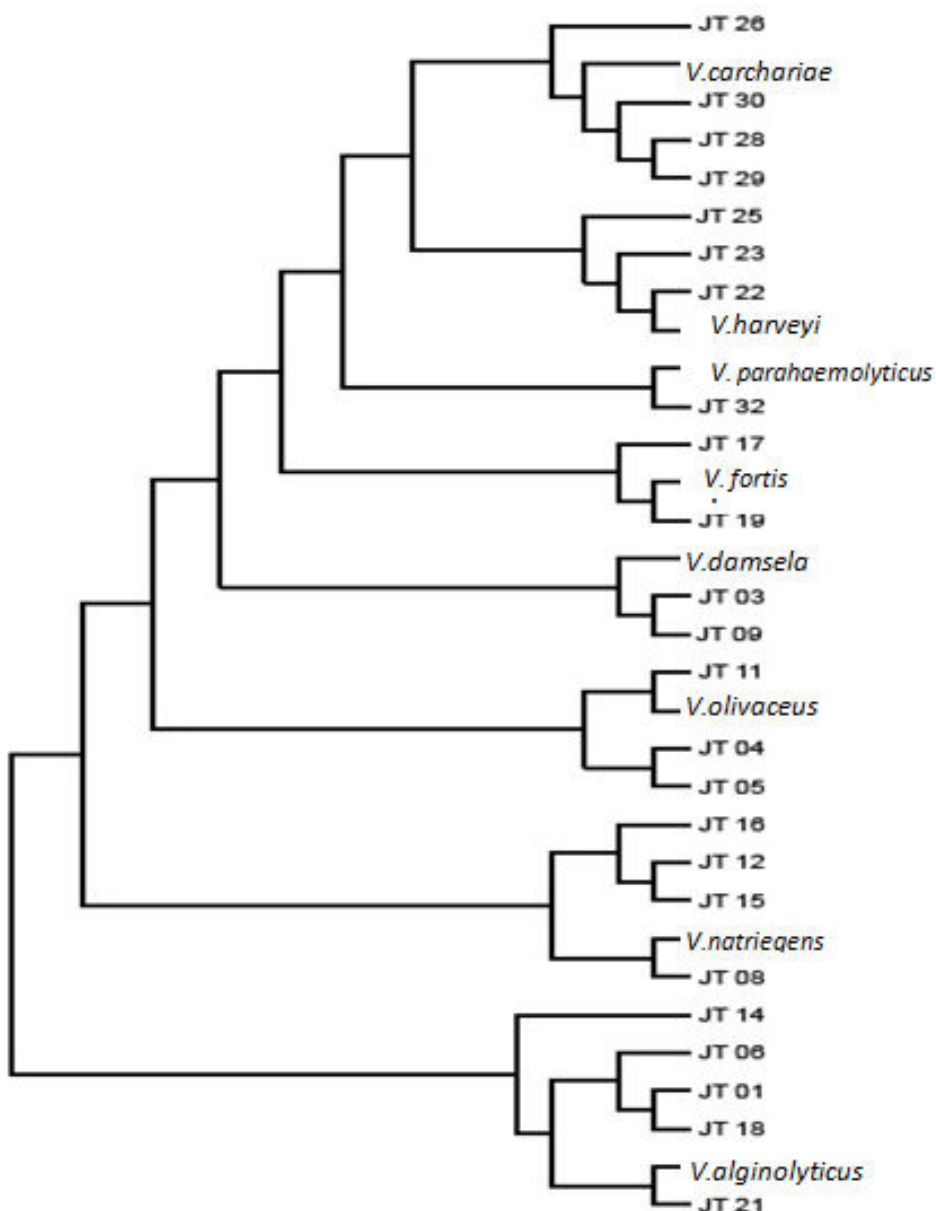
Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan teknik biomolekuler dengan rep-PCR mampu mengelompokkan tigapuluh dua isolat bakteri



**Gambar 1.** Dendogram Pengelompokan Bakteri Vibrio yang Berasosiasi dengan Vibriosis pada Ikan Kerapu dari Keramba Jaring Apung di Karimunjawa

**Tabel 2.** Homologi Isolat Bakteri Vibrio yang Berasosiasi pada Ikan Kerapu Sakit dengan Bakteri dari Database Gen Bank

No	Kode Isolat	Kekerabatan Terdekat	Homologi (%)	No. Akses
1.	JT 02	<i>Vibrio natriegens</i>	99	AJ874352.1
2.	JT 07	<i>Vibrio olivaceus</i>	99	AY827492.1
3.	JT 10	<i>Vibrio damsella</i> ATCC33	99	X74700
4.	JT 13	<i>Vibrio fortis</i>	97	AJ514914
5.	JT 20	<i>Vibrio alginolyticus</i>	98	AY332566
6.	JT 24	<i>Vibrio harveyi</i>	99	DQ146936.1
7.	JT 27	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100	EF4567290
8.	JT 31	<i>Vibrio carchariae</i>	99	AF134581.1



**Gambar 2.** Dendrogram Hasil Rep-PCR Bakteri Vibrio yang berasosiasi dengan Ikan kerapu sakit dari Keramba Jaring Apung di Karimunjawa

vibrio yang berasosiasi dengan kerapu sakit menjadi delapan kelompok (Gambar 1). Berdasarkan Gambar 1., kemudian dilanjutkan secara molekuler dengan sequence 16S rDNA diperoleh bahwa delapan bakteri yang berasosiasi dengan ikan kerapu sakit dari keramba apung di Karimunjawa yaitu *Vibrio natriegens* (JT 02), *V. olivaceus* (JT 07), *V. damsella* ATCC33 (JT 10), *V. fortis* (JT 13), *V. alginolyticus* (JT 20), *V. harveyi* (JT 24), *V. parahaemolyticus* (JT 27) dan *V. carchariae* (JT 31). Dari analisis secara molekuler didapatkan pula bahwa kedelapan isolat tersebut dengan tingkat homologi tinggi terhadap genus vibrio dengan kisaran 97–100% (Tabel 2). Oleh karena itu, hasil secara molekuler menunjukkan adanya persamaan sekuen 16S rDNA lebih dari 97% dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuen antara 93 – 97% dapat mewakili identitas bakteri pada tingkat genus tapi beda spesies (Hagström *et al.*, 2000). Jadi semua teridentifikasi secara molekuler memenuhi pada level species.

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa pendekatan berbasis molekuler dengan menggunakan rep-PCR terbukti sangat efektif untuk membedakan karakteristik diantara spesies vibrio yang diisolasi dari ikan kerapu sakit. Hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian Rademarker dan de Bruijn (1997) bahwa teknik molekuler dengan *repetitive sequenced-based polimerase chain reaction* (rep-PCR) mampu mengelompokkan bakteri cepat secara efektif pada level species. Selanjutnya metode ini telah diterapkan untuk bakteri psicotropik laut (Radjasa *et al.*, 2007a) dan bakteri simbiosis sponge (Radjasa *et al.*, 2007b). Akan tetapi, hal yang perlu digarisbawahi adalah hasil penelitian ini merupakan temuan awal pemanfaatan teknik rep-PCR untuk mengestimasi keanekaragaman bakteri yang berasosiasi dengan kerapu sakit di Indonesia.

## Kesimpulan

rep-PCR mampu mengelompokkan bakteri yang berasosiasi dengan kerapu sakit dari keramba jaring apung Karimunjawa menjadi delapan kelompok sampai genus dan bahkan ke level species. Delapan bakteri vibrio yang berasosiasi dengan kerapu sakit dari Keramba Jaring apung di Karimunjawa adalah *Vibrio natriegens* (JT 02), *V. olivaceus* (JT 07), *V. damsella* ATCC33 (JT 10), *V. fortis* (JT 13), *V. alginolyticus* (JT20), *V. harveyi* (JT 24), *V. parahaemolyticus* (JT 27) dan *V. carchariae* (JT 31).

## Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada

Prof. Dr. Ir. S. B. Prayitno, M.Sc.; Prof. Dr. Ir. S. Hutabarat, MSc; Dr. O.K. Radjasa M.Sc; Prof. Dr. A. Sabdono, MSc. yang telah memberikan masukan dan saran selama penelitian dan penyusunan tulisan ini. Terimakasih disampaikan pula kepada Mustika, Siti N., A. Faries, Dewi dan Junaedi yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian serta Sulistyaninsih yang membantu dalam sampling di Lapangan. Penelitian ini sebagian dibiayai oleh Hibah Penelitian Program Doktor, DIPA UNDIP, No : 0160.0/023-04.2/XIII/2009, sesuai dengan SK Rektor UNDIP, No : 180A/SK/H/7/2009 tanggal 18 Maret 2009.

## Daftar Pustaka

- Atschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleid Acid Res.*, 25: 3389-3402.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. 1995. Short Protocols in Molecular Biology. 3<sup>rd</sup> ed. J. Wiley & Sons, Toronto. 347 p.
- Brinkhoff, T. & G. Muyzer. 1997. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3789-3796.
- Brock, T.D. & M.T. Madigan, 1991. Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 368 p.
- Cunningham, C.O. 2002. Moleculer Diagnosis of Fish dan Shellfish Diseases: Present status dan Potential Use in Desases Control. *Aquaculture*, 206: 19–55.
- Diggles, B.K, J. Carson, P.M. Hine, R.W. Hiskman & M.J. Tait. 2000. *Vibrio* Species Associated with Mortalities in Hatchery-reared Turbot (*Colistium nudipinnis*) and Brill (*C. guntheri*) in New Zealand. *Aquaculture*, 183: 1-12.
- Gomez-Gil, B., S. Soto-Rodriquez, A. Garcia-Garca, R. Vazquez-Juarez, F.L. Thompson, & J. Swings. 2004. Moleculer Identification of *Vibrio harveyi* Related Isolates Associated with Diseases Aquatic Organisms. *Microbiol.*, 150: 1709-1777.
- Hagström, A., J. Pinhassi & U.L. Zweifel, 2000. Biogeographical Diversity Among Marine Bacterioplankton. *Aquat. Micro. Ecol.*, 21: 231-244.

- Koesharyani, I. & Zafran. 1997. Studi tentang Penyakit Bakterial pada Ikan Kerapu. *J. Penelitian Perikanan Indonesia*, 4 : 35 - 39.
- Murdjani, M. 2002 Patogenisitas dan Patologi Bakteri *Vibrio alginolyticus* pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Disertasi. Program Pasca Sarjana, Universitas Brawijaya. Malang, 115hal.
- Myers, M.L, G. Panicker, A.K. Bej. 2003. PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from Gulf Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(4): 2194-200.
- Nazir, M., 1999. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Nitimulyo, K.H, A.Isnanstyo, Triyanto, I. Istiqomah, & M. Murdjani. 2005. Isolasi, Identifikasi, dan Karakterisasi *Vibrio spp.* Patogen Penyebab Vibriosis pada Kerapu di Balai Budidaya Air Payau. *J. Perikanan*, VII (2): 80-94.
- Page, R.D.M., 2001. Tree View (Win 32). <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html> akse: 31 Maret 2010.
- Pavlicek, A., S. Hrda & J. Flegr., 1999. FreeTree-Freeware Program for Construction of Phylogenetic Trees on the Basis of Distance Data and Bootstrap/Jackknife Analysis of the Tree Robustness. Application in the RAPD Analysis of the Genus *Frenkelia*. *Folia Biologica.*, 45: 97-99.
- Rademaker, J.L.W. & F.J. de Bruijn., 1997. Characterization and Classification of Microbes by rep-PCR Genomic Fingerprinting and Computer-Assisted Pattern Analysis. In: Caetano-Anolles, G. & P.M. Gresshoff (Eds). DNA Marker: Protocols, Applications and Overviews. John Wiley and Sons. New York. Pp. 151-171.
- Radjasa, O.K., H. Urakawa, K. Kita-Tsukamoto & K. Ohwada., 2001. Characterization of Psychrotrophic Bacteria in the Surface and Deep-sea Waters from Northwestern Pacific Ocean Based on 16S Ribosomal DNA Approach. *Mar. Biotech.*, 3: 454-462.
- Radjasa, O., K., D. Nasima, A. Sabdono, K.K. Tsukamoto, K. Ohwada. 2007a. Characterization of Psychrotrophic Bacteria from Sea Waters of Makasar Street, Indonesia. *J. Biol., Sci.*, 7(4): 658-662.
- Radjasa, O.K., A. Sabdono, Junaidi, and E. Zoochi, 2007b. Richness of Secondary Metabolite-Producing Marine Bacteria Associated Sponge *Haliclone* sp. *Int. J. Pharm*, 3(3): 275-279.
- Sabdono, A. 2001. Identifikasi dan Analisis Genetik Bakteri Karang Pendegradasi Senyawa Herbisida 2,4-Diklorofenoksi Asetat di Laut Jawa. Disertasi UGM. 162 hal.
- Sarjito, Prayitno S.B., O.K. Radjasa, & S. Hutabarat, S. 2007a. Karakterisasi dan Pathogenisitas Agenia Penyebab Vibriosis Pada Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) Dari Karimunjawa. *Aquacultura Indonesiana*, 8(2) : 121 -133.
- Sarjito, O.K. Radjasa, S. Hutabarat, dan S.B. Prayitno. 2007b. Causative Agent Vibriosis Pada Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) Dari Karimunjawa I. Patogensitas pada Ikan Kerapu Macan (*Epinophelus fuscogutatus*). *Ilmu Kelautan*, 12(3): 173-180 .
- Sarjito, Desta Vivi Permana Sari & S. Budi Prayitno, 2011. Karakterisasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Vibriosis Pada Udang Vannamei (*Litopenaeus Vannamei*) Secara Molekuler. Makalah pada Seminar Nasional Tahunan VIII Hasil Penelitian Perikanan dan Perikanan dan Kelautan Tahun 2011 (*In Press*).
- Sarjito, S.B. Prayitno, O.K. Radjasa, & S. Hutabarat. 2008. Karakterisasi Molekuler Agenia Penyebab Utama Vibriosis pada Kerapu Macan (*Epinophelus fuscogutatus*) Dari Karimunjawa. *Aquacultura Indonesiana*, 9(2): 67 - 72.
- Seng, L.T., 1994. Parasite and Diseases of Cultured marine finfish in South East Asia. Pusat Pengkajian Sains Kajihayat, Universitas Sains Malaysia. 25 p.
- Sommary, W.M.Z., N.S. Mariana, V. Neela, R. Rozita, A.R. Raha. 2002. Differentiation of pathogenic *Vibrio* species by RAPD. *J. Medical. Sci.*, 2: 165-169.
- Taslihan, A., M. Murdjani, C. Purbomartono, & E. Kusnendar. 2000. Bakteri Patogen Penyebab Penyakit Mulut Merah Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). *J. Perikanan*, 11(2): 57-62.
- Urakawa, H., K. Kita-Tsukamoto & K. Ohwada 1997. 16S DNA genotyping using PCR/RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis among

the family Vibrionaceae. *FEMS Microbiol. Lett.*, 152: 125-132.

Versalovic, J.M., F.J. Schneider, de Bruijin & J.R. Lupski. 1994. Genomic Fingerprint of Bacteria Using Repetitive Sequence Based-Polymerase Chain Reaction. *Meth. Cell. Mol. Biol.*, 5: 25-40.

Yii, K.C., T.I. Yang, & K.K. Lee, 1997. Isolation and

Characterisazion of *Vibrio carchariae*, A Causative Agent of Gastroenteritis in the Grouper, *Ephinepelus coioides*. *Curr. Microbiol.*, 35 : 109-115.

Wijayanti, A. & N. Hamid, 1997. Identifikasi bakteri pada pembenihan ikan kerapu tikus (*Cromileptis altifelis*). Direktorat Jenderal Perikanan Departemen Pertanian.