

Causative Agent Vibriosis dari Kerapu Bebek (*Cromileptis altivelis*): 2. Karakterisasi Secara Molekuler Berbasis 16 S Rdna

Sarjito

Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan,
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto, Kampus UNDIP Tembalang, Semarang. Telp./Fax. 0247474698
email : sarjito_msdp@yahoo.com

Abstrak

Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptis altivelis*) sakit diperoleh dari keramba jaring apung di Karimunjawa. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji causative agent utama vibriosis pada ikan kerapu bebek (*C. altivelis*) dari keramba jaring apung di perairan Karimun Jawa. Sebanyak tujuh isolat vibrio diisolasi dari bagian luka maupun ginjal kerapu bebek sakit yang menunjukkan gejala vibriosis. Hasil uji postulat koch dan pathogenisitasnya dari enam isolat, diperoleh bahwa tiga isolat (isolat JT 07; JT 10 dan JT 20) yang mengakibatkan 100% dan merupakan agensia penyebab utama vibriosis pada ikan Kerapu Bebek. Oleh karena itu, pada penelitian ini hanya tiga isolat ini yang akan dilakukan uji selanjutnya. Teknik molekuler gen 16S rDNA (amplifikasi 16S DNA ribosom) digunakan untuk karakterisasi ketiga causative agent utama secara komprehensif. Berdasarkan analisis sekuen gen 16S rDNA, data menunjukkan bahwa isolat JT 07 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Vibrio olivaceus* (99%); isolat JT 10 dengan *V. damsella* (99%) dan isolat JT 20 dengan *V. alginolyticus* (98%).

Kata kunci: causative agent, vibriosis, molekuler, Kerapu bebek.

Abstract

Moribound Humpbeck Grouper fish (*Cromileptis altivelis*) was taken from the cages of Karimunjawa. The research aim was to find out the main causative agent of vibriosis on humpbeck grouper (*C. altivelis*) from Karimunjawa waters. Seven isolates of *Vibrio* were isolated from external wound and kidney of the humpbeck grouper fish (*C. Altivelis*) which showed the clinical signs of vibriosis. Based on the koch postulate and pathogenecity test results indicated that three vibrios (isolate JT 07; JT 10 and JT 20) act as a main causative agents of vibriosis which caused mortality of 100% to *E. fuscogutatus*. Because of highest mortality as pathogenicity indicator, the three isolates were continued to investigate. A complementary molecular techniques of 16S rDNA genes (amplified 16S ribosomal DNA) was used to give a comprehensive characterization of these isolates. On the basis of the results of sequen analysis, our data showed that JT 07; JT 10 and JT 20 isolates were closely related to *Vibrio olivaceus* (99.0%); *V. damsella* (99%) and *V. alginolyticus* (98%) respectively..

Key words: causative agent, vibriosis, molecular, humpbeck grouper

Pendahuluan

Budidaya ikan kerapu bebek (*Cromileptis altivelis*) mempunyai prospek eknomis yang cerah. Hal ini dikarenakan permintaan akan komoditas ini, baik di pasar domestik maupun internasional yang cenderung meningkat dan harga yang tinggi. Harga ikan ini adalah berkisar antara US\$ 25 sampai US\$ 50/kg dalam keadaan hidup di tingkat pembudidaya (TROBOS, 2011). Di Jawa Tengah, budidaya ikan kerapu bebek *C. altivelis* dilakukan pada keramba jaring apung di Karimunjawa. Secara umum, kendala yang dihadapi

oleh pembudidaya ikan ini adalah ketersediaan benih siap tebar, belum diterapkannya *Better Manajemen Practice* (BMP) dan kematian (Dinas Kelautan dan Perikanan Provinsi Jawa Tengah, 2008). Kematian Ikan Kerapu Bebek secara massal sampai dengan 50 % dengan gejala klinis yang ditemukan adalah sirip geripis, pangkal sirip kemerahan dan luka pada ikan yang mati pernah pula dilaporkan oleh pembudidaya di daerah tersebut. Mengacu pada tanda-tanda klinis tersebut maka Ikan Kerapu Bebek diduga terserang oleh vibriosis (Sarjito et al, 2007a,b). Untuk itu, *Vibrio* merupakan patogen utama penyebab vibriosis pada

kegiatan budidaya ikan laut dan payau (Austin dan Austin, 1988; Seng, 1994; Irianto, 2005).

Genus *Vibrio* yang telah dilaporkan sebagai *causative agent* vibriosis pada berbagai ikan kerapu adalah *V. alginolyticus* (Wijayanti dan Hamid, 1997; Taslihan et al. 2000; Murdjani, 2002; Nitimulyo et al., 2005; Sarjito et al., 2007b); *V. parahaemolyticus* (Wijayanti dan Hamid, 1997; Nitimulyo et al., 2005, Sarjito et al. 2007a); *V. anguillarum* (Nitimulyo et al., 2005; Sarjito et al., 2007^b); *V. fluvialis*; *V. furnisii*; *V. metchnikovii*; *V. vulnificus* (Nitimulyo et al., 2005) dan *V. fuscus* (Sarjito et al., 2007^b). Sarjito et al. (2007^b) melaporkan bahwa *causative agent* vibriosis pada kerapu bebek dari keramba jaring apung di perairan Karimunjawa adalah *V. fuscus*; *V. alginolyticus* dan *V. anguillarum*. Akan tetapi, identifikasi *causative agent* vibriosis pada ikan Kerapu Bebek yang telah dilakukan oleh Sarjito et al. (2007^b) adalah secara konvensional dengan uji morfologi dan biokimia. Diggle et al. (2000) menjelaskan bahwa secara konvensional, isolasi genus *Vibrio* dilakukan dengan media selektif Thio-Sulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS), sedangkan untuk identifikasi dilakukan dengan pendekatan biokimia. Menurut Sommarly et al. (2002), metode ini adalah "time consuming". Oleh karena itu, dalam rangka diagnosis dan pengendalian penyakit ikan secara tepat, diperlukan pula identifikasi *causative agent* suatu penyakit secara cepat dan akurat. Untuk itu, sesuai saran Cunningham (2002), perlu adanya diagnostik biomolekuler (molekuler) untuk penyakit ikan dan udang.

Berbagai metode secara molekuler untuk mendeteksi jenis bakteri ini telah pula berkembang (Myers et al., 2003; Dwiyoitno, 2010). Penggunaan metode secara molekuler ini telah pula dilakukan oleh Sabdono (2001) dan Radjasa et al. (2001) untuk bakteri laut. Identifikasi secara molekuler menggunakan 16S rDNA PCR telah diaplikasikan untuk agensia gastroenteristis pada kerapu lumpur (Yii et al., 1997); bakteri karang (Sabdono, 2001); bakteri psikrothropik (Radjasa et al., 2001; 2007a) dan bakteri sponge (Radjasa et al., 2007^b) serta pandemic *Vibrio parahaemolyticus* (Boyd et al., 2008). Metode ini juga telah digunakan untuk karakterisasi *causative agent* utama vibriosis pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscogostatus*) (Sarjito et al., 2008), ikan kerapu (Sarjito et al., 2009) dan udang vanamae (*Litopenaeus vannamei*) (Sarjito et al., 2011). Oleh karena itu, menarik untuk dikaji *causative agent* vibriosis pada ikan kerapu bebek (*C. altivelis*) secara molekuler. Pada penelitian ini akan dilaporkan *causative agent* utama vibriosis pada ikan kerapu bebek (*C. altivelis*) sakit yang berasal dari keramba jaring apung di Karimunjawa berdasarkan pada 16 S rDNA PCR.

Materi dan Metode

Ikan Kerapu Bebek (*C. altivelis*) sakit diperoleh dari keramba jaring apung di Karimunjawa. yang kemudian dilanjutkan isolasi bakteri *Vibrio* dengan media TCBSA di Laboratorium Kelautan Terpadu, FPIK UNDIP dan penyimpanan pada media Nutrien Agar Trisalt (NA, Merck). Ikan sampel diambil secara selektif terhadap ikan yang menunjukkan gejala serangan vibriosis sesuai Koesharyani dan Zafran (1997) dan Austin dan Austin (1988).

Tujuh isolat bakteri vibrio (isolat JT 03; JT 04; JT 10; JT 20; JT 26; JT 29.) telah diperoleh dari ikan Kerapu Bebek sakit tersebut. Berdasarkan hasil postulat Koch dan uji pathogenisitas yang ditimbulkan, diperoleh bahwa isolat JT 07; JT 10 dan JT 20 adalah merupakan *causative agent* utama vibriosis pada kerapu bebek (Sarjito et al., 2007b). Oleh karena itu, isolat JT 07; JT 10 dan JT 20 ini yang terpilih untuk uji selanjutnya yaitu karakterisasi secara molekuler

Metoda penelitian yang digunakan adalah perpaduan antara metoda eksploratif dan ekperimental (Nazir, 1999). Karakterisasi *causative agent* utama (isolat JT 03, JT 10 dan JT 20) secara molekuler berdasarkan 16 S rDNA. Ekstraksi DNA dan amplifikasi DNA dilakukan di Laboratorium Kelautan Terpadu FPIK Universitas Diponegoro. Sedangkan sekuensing DNA dilakukan BPPT Serpong, Jakarta.

Ekstraksi dan amplifikasi DNA

Dalam rangka analisis *Polymerase chain reaction* (PCR), DNA genom dari ketiga isolat diekstraksi dari sel dengan cara mengambil sel bakteri dari plate agar, disuspensi dalam air steril (Sigma, Germany) dan diberi perlakuan fisik *freezing* (-70 °C) dan *thaw* (95 °C) mengacu pada metode Ausubel et al. (1995) yang dimodifikasi oleh Radjasa et al. (2007a,b). Amplifikasi DNA-PCR total gen 16S rDNA dari isolat JT 07, JT 10 dan JT 20, purifikasi hasil PCR dan analisis sekuen dilakukan menurut metode dari Brinkhoff dan Muzzer (1997) dan Radjasa et al. (2007a,b).

PCR dilaksanakan dengan menggunakan Eppendorf Mastercycler (Eppendorf Inc. Germany) adalah sebagai berikut: 2 l template DNA, 40 pmol primer, 125 µmol deoxyribonucleoside triphosphate, 5 l 10 x RedTaq™ PCR buffer (Sigma, Germany), 1.2 mg ml⁻¹ (konsentrasi akhir) bovine serum albumin (Sigma) dan 0.75 unit RedTaq™ DNA polymerase (Sigma) diatur konsentrasi akhir hingga volume 50 l dengan air steril (Sigma). PCR dilakukan sbb. : 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 (Radjasa et al., 2007a,b).

Sekuensing 16S rDNA hasil amplifikasi PCR

Hasil amplifikasi PCR gen 16S rDNA dari ketiga isolat tersebut dipurifikasi. Untuk analisis sekuensing dilakukan dengan metode dari Brinkhoff dan Muyzer (1997). Hasil sekuensing isolat selanjutnya dibandingkan homologinya dengan sekuensing DNA pada DNA database Gen Bank. Penelusuran dilakukan dengan sistem internet 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

Ikan Kerapu Bebek (*C. altivelis*) yang terserang oleh vibriosis mengalami gejala klinis adalah perubahan tingkah laku (bergerak lambat, keseimbangan terganggu dan ada kecenderungan di dasar keramba jaring apung); perubahan morfologi (warna tubuh menjadi gelap, timbul luka kemerahan atau *haemorrhagic* pada sekitar mulut dan pangkal sirip) serta mata yang agak menonjol. Selain itu, terjadi pula perubahan morfologi pada organ dalam berupa hati berwarna pucat dan akumulasi cairan pada rongga perut dan saluran pencernaan ikan

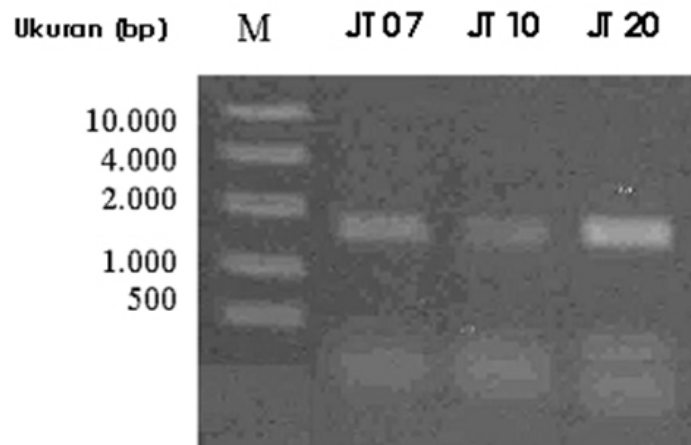
sampel. Gejala klinis serupa pernah pula dilaporkan oleh Koesharyani dan Zafran (1997); Murdjani (2002), Taslihan et al. (2000); Sarjito et al. (2007a,b); Wijayati dan Hamid (1997) pada ikan kerapu yang terserang vibriosis.

Isolasi bakteri *vibrio* dari ikan kerapu bebek sakit dari keramba jaring apung Karimunjawa diperoleh tujuh isolat bakteri *vibrio* yaitu JT 03; JT 04; JT 10; JT 20; JT 26; JT 29. Tujuh isolat tersebut berdasarkan warna koloni dan organ asal isolat pada media TCBSA serta uji postulat koch disajikan pada Tabel 1.

Hasil uji Postulat Koch menunjukkan bahwa dari tujuh isolat bakteri tersebut diperoleh lima isolat (isolat JT 04; JT 07, JT 10, JT 20 dan isolat JT 26) bersifat patogen atau sebagai *causative agent* vibriosis pada ikan kerapu bebek. Tiga isolat (isolat JT 07, JT 10 dan JT 20) mempunyai tingkat patogenisitas yang tertinggi yaitu menyebabkan kematian 100% dari ikan uji. Oleh karena itu, berdasarkan hasil uji Postulat Koch ini dapat diketahui bahwa isolat JT 07, JT 10 dan JT 20 merupakan *causative agent* utama vibriosis pada ikan Kerapu Bebek (*C. altivelis*) dari karamba jaring apung di perairan Karimunjawa.

Tabel 1. Isolat Bakteri *Vibrio* dari Kerapu Bebek (*C. altivelis*) Sakit.

No.	Kode isolat	Asala Isolat	Warna koloni	Postulat Koch / Mortalitas (%)
1	JT-03	Mulut merah	Kuning	0
2	JT-04	Mulut merah	Putih ring kuning	40
3	JT-07	Ginjal	Hijau	100
4	JT-10	Ginjal	Kuning	100
5	JT-20	Ginjal	Kuning ring hitam	100
6	JT-26	Mulut merah	Hijau	40
7	JT-29	Ginjal	Hitam	0



Gambar 1. Hasil Amplifikasi DNA-PCR Isolat JT 07, JT 10, JT 20 (Keterangan : M : Marker)

Tabel 2. Homologi Isolat Bakteri *Causative Agent* Utama Vibriosis Pada Ikan Kerapu Bebek (*C. altivelis*) dengan Bakteri dari *Database Gen Bank*

No	Isolat	Kekerabatan Terdekat	Homologi (%)	No. Akses
1.	JT 07	<i>Vibrio olivaceus</i>	99	AY827492.1
2.	JT 10	<i>Vibrio damsella</i> ATCC33	99	X74700
3.	JT 20	<i>Vibrio alginolyticus</i>	98	AY332566

Amplifikasi DNA dari isolat JT 07, JT 10, JT 20 dilakukan dengan menggunakan primer ribosomal (F: posisi 8 sampai 27; dan 1500 R: posisi 1510 sampai 1492 dari penomoran 16S rRNA *E. Coli* dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil amplifikasi DNA dari isolat JT 07, JT 10 dan JT 20 (Gambar 1.) menunjukkan bahwa ketiga isolat menghasilkan *single band* (pita tunggal) dengan ukuran sekitar 1500 bp sesuai dengan perbandingan menggunakan marker DNA. Besarnya ukuran ini sesuai dengan ukuran yang diharapkan dari gen-gen 16S rRNA bakteri yaitu sekitar 1500-1600 bp (Sabdono, 2001)

Hasil penelusuran homologi sekuen 16S rDNA terhadap ketiga isolat dengan sekuen DNA *database Gen Bank* menggunakan sistem BLAST menunjukkan bahwa isolat JT 07, JT 10, JT 20 memiliki kemiripan 99% dengan *Vibrio olivaceus* (AY827492.1); isolat JT 10 memiliki kemiripan 99 % dengan *Vibrio damsella* ATCC33 (X74700) dan isolat JT 20 memiliki kemiripan 98 % dengan *Vibrio alginolyticus* (AY332566). Hasil penelusuran dengan Gen Blast menunjukkan bahwa homologi masing-masing isolat dengan bakteri dari *database Gen Bank* dapat dilihat pada Tabel 2.

Perbandingan hasil sekuen gen 16S rDNA dari ketiga isolat (JT 07, JT 10 dan JT 20) dengan sekuen dari Gen Bank menunjukkan bahwa strain ini mempunyai kekerabatan dekat dengan *V. olivaceus* (99%), isolat JT 10 dengan *V. damsella* (99%) dan isolat JT 20 dengan *V. alginolyticus* (98%). Tabel 2 juga menunjukkan pula bahwa ketiga isolat tersebut memiliki tingkat homologi yang tinggi terhadap genus *vibrio* dengan kisaran 98– 99%. Sesuai dengan pendapat Hagström *et al.* (2000) bahwa isolat yang

mempunyai 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 tetapi berbeda spesies. Oleh karena itu, ketiga *causative agent* tersebut teridentifikasi secara molekuler memenuhi kaidah pada level *species*.

Hasil karakterisasi ketiga *causative agent* utama vibriosis pada ikan kerapu bebek secara molekuler ini dibandingkan pendekatan secara biokimia oleh Sarjito *et al.* (2007b) tersaji pada Tabel 3.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hanya satu *causative agent* utama (isolat JT 20) diidentifikasi sebagai *species* yang sama dengan karakterisasi secara biokimia yang dilakukan oleh Sarjito *et al.* (2007b), sedangkan dua isolat lainnya (JT 07 dan JT 10) teridentifikasi sebagai *species* yang lain. Karakterisasi secara biokimia yang sering digunakan dalam identifikasi bakteri adalah merupakan metoda identifikasi dalam memperoleh sifat fenotipe dari bakteri atau identifikasi secara fenotipe (Thompson *et al.*, 2001). Sommery *et al.* (2002) menjelaskan bahwa identifikasi bakteri secara fenotipe meliputi morfologi, kebutuhan nutrisi, resistensi antibiotik dan perbandingan perbedaan kemampuan memproduksi enzim. Sedangkan, karakterisasi secara molekuler, salah satunya dengan 16S rDNA dilakukan dalam rangka pembentukan pohon filogenetik dan menutupi kekurangan dari karakterisasi secara morfologi dan biokimia, lebih menghemat biaya, cepat dan akurat (Thompson, *et al.*, 2001). Selanjutnya dapat dijelaskan bahwa jumlah sekuen *vibrio* pada database DNA jauh melebihi jumlah yang ada pada buku identifikasi (Bergey's Manual of

Tabel 3. Hasil Karakterisasi Molekuler dan Biokimia *Causative Agent* Utama Vibriosis pada Ikan Kerapu bebek (*C.altivelis*)

No	Nama Isolat	Hasil Karakterisasi secara Molekuler	Hasil Karakterisasi secara Biokimia (Sarjito <i>et al.</i> (2007b))
1.	JT 07	<i>Vibrio olivaceus</i>	<i>Vibrio fuscus</i>
2.	JT 10	<i>Vibrio damsella</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
3.	JT 20	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>

Determination Bacteriology). Selain itu, proses revisi/pembaharuan pada buku identifikasi dilakukan dalam waktu yang lebih lama, sedangkan proses revisi/pembaharuan pada Database DNA bersifat harian. Oleh karena itu, identifikasi dengan teknik PCR memiliki tingkat sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan teknik konvensional melalui kultivasi (Dwiyitno, 2010).

Hasil karakterisasi secara molekuler diperoleh bahwa *causative agent* utama pada ikan kerapu bebek (*C. altivelis*) dari keramba jaring apung di Karimunjawa adalah *V. olivaceus*, *V. damsella* ATCC33 dan *V. alginolyticus*. *V. olivaceus* ditemukan sebagai *causative agent* penyakit bakteri pada ikan flounder (*Paralichthys olivaceus*) (Fang et al, 2004). Selanjutnya *V. damsella* juga dilaporkan sebagai salah satu penyebab kematian ikan damselfish, *Chromis punctifinnis* (Kreger, 1984; Pedersen et al., 1997) dan *causative agent* vibriosis pada ikan (Austin dan Austin, 1988). Selanjutnya *V. alginolyticus* dilaporkan patogen pada udang (Chen et al., 1999) dan ikan (Lee et al., 1995; Company et al., 1999). Balebona et al. (1998) menemukan bahwa bakteri ini merupakan *causative agent* vibriosis pada ikan Gilt Sea Bream (*Sparus aurata* L) dan kerapu bebek, *C. altivelis*, (Wijayanti dan Hamid, 1994; Taslihan, 2000); Kerapu Malabar (*Epinephelus malabaricus*) (Lee et al., 1995) dan udang (Chen et al., 1992, Sarjito et al., 2011). Selanjutnya *V. alginolyticus* juga dilaporkan sebagai penyebab kematian secara massal ikan budidaya di pesisir Guandong, China (Xie et al., 2005).

Kesimpulan

Hasil karakterisasi secara molekuler dengan 16S rDNA menunjukkan bahwa tiga *causative agent* utama vibriosis pada ikan Kerapu Bebek (*C. altivelis*) dari keramba jaring apung di perairan Karimunjawa memiliki kekerabatan terdekat dengan *V. olivaceus*, *V. damsella* dan *V. alginolyticus*.

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. Mas Junaedi, Agung, Mbak Dewi, Susi, Sri Nurhayati, dan Mustikawati yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian. Penelitian ini sebagian dibiayai oleh 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 melalui Hibah Penelitian Program Doktor.

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. *Nucleic Acid Res.*, 25: 3389-3402.
- Austin, B. & D. A. Austin., 1988. Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish, 3rd (revised) ed. Ellis Horwood, Chichester, England. 364p.
- 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. 3rd ed. J. Wiley & Sons, Toronto. 347 p.
- Balebona, M.C., I. Zorill, M.A. Morinigo, & J.J. Borrego, 1998. Survey of Bacterial Pathologies Affecting Farmed Gilt-head Sea Bream (*Sparus aurata* L) in South Western Spain from 1990 to 1996. *Aquaculture*, 166: 19 – 35.
- Brinkhoff, T. & G. Muyzer. 1997. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3789-3796.
- Boyd, E.F., A.L. Cohen, L.M. Naughton, D.W. Ussery, T.T. Binnewies, O.C. Stine, & M.A. Parent. 2008. Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol.*, 8:110
- Chen, S.C., S.L. Huang & G.H. Kou. 1992. Studies on the Epizootiology and Bacterial Infections in Cultured Giant Tiger Prawns, *Penaeus monodon* in Taiwan. Disease of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. Pp.: 195-205.
- Chen, F.R, P.C. Liu & K.K. Lee, 1999. An Evaluation of Chromogenic Substrate for Characterization of Serine Protease Produced by Pathogenic *Vibrio alginolyticus*. *Microbios.*, 98(389): 27 – 34.
- Company, R., A.A. Sitjo-Bobadilla, M.J. Pujalte, P. Garaylvarez-Pellitero & J. Perez -sanchez. 1999. Bacterial and Parasitic Pathogens in Culture Common Dentex, *Dentex dentex*. *J. Fish. Dis.*, 13(5): 369 – 376.
- Cunningham, C.O. 2002. Molecular Diagnosis of Fish dan Shellfish Diseases: Present status dan Potential Use in Diseases Control. *Aquaculture*, 206: 19 – 55.
- Dinas Kelautan dan Perikanan Provinsi Jawa Tengah., 2008. Kajian Hama dan Penyakit Ikan Kerapu di Karimunjawa, Semarang.

- 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.
- Dwiyitno, 2010. Identifikasi Bakteri Patogen Pada Produk Perikanan Dengan Teknik Molekuler. *Squalen*, 5(2): 67-77
- Fang, H., X.Zhang, & C.Z.Chen. 2004. Isolation and Characterization of A New Species of *Vibrio olivaceus* sp. Nov. from Diseases Flounder (*Praichthys olivaceus* Teminck et Shclegel). Department of Animal Science, Hebei Nirmal, University of Science and Technology, Changli, Qinghuangdao, Hebei.
- Hagström, A., J. Pinhassi & U.L. Zweifel. 2000. Biogeographical Diversity Among Marine Bacterioplankton. *Aquat. Micro. Ecol.*, 21: 231-244.
- Irianto, A., 2005. Patologi Ikan Teleostoi. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 256 hal.
- Kreger, A.S., 1984. Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.* 44: 326-331
- Koesharyani, I. & Zafran. 1997. Studi tentang Penyakit Bakterial pada Ikan Kerapu. *J. Penelitian Perikanan Indonesia*, 4: 35-39.
- Lee, K.K. 1995. Pathogenicity Studies on *Vibrio alginolyticus* in the Grouper, *Epinephelus malabaricus* Bloch et Schneider. *Microb. Pathogen*, 19: 39 -45.
- Murdjani, M. 2002 Patogenesis dan Patologi Bakteri *Vibrio alginolyticus* pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Disertasi. Program Pasca Sarjana, Universitas Brawijaya. Malang, 115 hal.
- 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 the Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(4): 2194-2000
- Nazir, M., 1999. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta. 70 hal.
- 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
- Pedersen, Karl., I. Dalsgaard, & L.J. Larsen, 1997. *Vibrio damsela* Associated with Diseases Fish in Denmark. *Appl. Environ. Microbiol.*, 6 : 3711-3715.
- 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, A. Junaidi, & E. Zochi, 2007b. Richness of Secondary Metabolite-Producing Marine Bacteria Associated with 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. Universitas Gajahmada. Jogjakarta. 162 hal
- Sarjito, O.K. Radjasa, S. Hutabarat & S.B. Prayitno, 2007a. Karakterisasi dan Pathogenesis Agen Penyebab Vibriosis pada Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dari Karimunjawa. *Aquacultura Indonesiana*, 76: 762-766.
- Sarjito, O.K. Radjasa, S. Hutabarat, & S.B. Prayitno. 2007b. Causative Agent Vibriosis Pada Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) Dari Karimunjawa I. Patogenesis pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Ilmu Kelautan*, 12(3): 173-180
- Sarjito, O.K. Radjasa, S. Hutabarat, & S.B. Prayitno, 2008. Karakterisasi secara Molekuler Agen Penyebab Vibriosis pada Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dari Karimunjawa. *Aquacultura Indonesiana*, 79: 674 - 678.
- Sarjito, O.K. Radjasa, S.B. Prayitno, A. Sabdono, & S. Hutabarat, 2009. Phylogenetic Diversity of the Causative Agent of Vibriosis Associated with Groupers Fish from Karimunjawa Island Indonesia. *Curr. Res. In Bac.*, 2: 14-21.
- 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*)

- 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.
- Thompson, F.L., B. Hoste, K. Vandemeulebroke, & J. Swings. 2001. Genomic Diversity amongs *Vibrio* Isolates from Different Source Determine by Flourescent Ampliflied Fragment Length Polymorphism. *Syst. Appl. Microbiol*, 24: 542-538.
- TROBOS, 2011. Birokrasi Hambat Perkembangan Bisnis Kerapu. *Majalah Trobos* Edisi Juni 2011.
- Wijayanti, A. & N. Hamid, 1997. Identifikasi bakteri pada pembenihan ikan kerapu tikus (*Cromileptis altifelis*) Direktorat Jenderal Perikanan Departemen Pertanian. 56 hal.
- Xie, Z.Y., C.Q. Hu, C. Chen, L.P. Zang, & C.H. Ren. 2005. Investigation of Seven *Vibrio* Virulance genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* from Coastal Marine culture System in Guandong, China. *Letter In Appl. Microbiology*, 41: 202-207
- 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.