

**FRAKSINASI DAN UJI TOKSISITAS ECP (*Extracellular Product*)  
*Streptococcus agalactiae* ISOLAT NK1  
PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

**Ibnu Bangkit Bioshina Suryadi<sup>1</sup>, Sukenda<sup>2</sup>, dan Sri Nuryati<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran

<sup>2</sup> Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor

**Abstrak**

Penelitian dilaksanakan dari bulan Januari hingga September 2016 di Laboratorium Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi protein toksik dari ECP (Extracellular Product) dari bakteri *Streptococcus agalactiae*. 70 fraksi protein ECP *S. agalactiae* yang dihasilkan melalui metode kolom kromatografi, masing-masing fraksi disuntikkan secara intraperitoneal pada lima ekor ikan nila dengan bobot rata-rata 20 g. Kemudian dilakukan analisis sodium dodecyl sulfate – polyacrilamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) untuk mengetahui bobot molekul fraksi protein toksik. Parameter yang diamati adalah konsentrasi protein ECP *S. agalactiae* isolat NK1, gejala klinis dan mortalitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat delapan fraksi protein toksik dari ECP *S. agalactiae* isolat NK1 yaitu fraksi protein no. 6, 15, 18, 23, 28, 54 dan 70.

**Kata kunci :**

**Abstract**

This research was conducted from January to September 2016 in Laboratory of Fish Health, Aquaculture Department, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Bogor Agricultural University. The aim of this research are to identify toxic protein fractions from ECP of *S. agalactiae*. 70 protein fractions that produced by chromatography column was injected intraperionally to five tilapia with average weight 20 g. Then to determine the molecular weight of toxin protein fractions was analyzed by sodium dodecyl sulfate – polyacrilamid gel electrophoresis (SDS-PAGE). Observed parameters are protein concentration from ECP of isolate NK1 *S. agalactiae*, clinical symptoms and mortality rate. Results showed that there are eight toxic protein fractions from *S. agalactiae* ECP isolate NK1 namely protein fraction no. 6, 15 18, 23, 28, 54 and 70.

**Keywords :**

## Pendahuluan

Salah satu penyakit yang menyebabkan kegagalan produksi ikan nila adalah streptococcosis yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus* sp. dan menyebabkan kematian masal pada ikan nila baik di pembenihan maupun pembesaran. Penyebab streptococcosis pada ikan nila adalah *Streptococcus* sp. namun yang paling umum ditemukan pada sentra budidaya ikan nila adalah *Streptococcus agalactiae* dan *Streptococcus iniae*. Dari hasil pemeriksaan 1.000 isolat bakteri yang berasal dari 74 lokasi di 14 negara termasuk Indonesia, dari kedua spesies bakteri tersebut yang paling umum teridentifikasi adalah *S. agalactiae* (Sheehan 2009).

Di Indonesia sendiri, streptococcosis terdapat di daerah Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Sulawesi Utara dan Papua Barat. Hasil isolasi dari daerah-daerah tersebut setelah diidentifikasi adalah sebanyak 80% merupakan *S. agalactiae* dan 20% merupakan *S. iniae* (Tauhid dan Purwaningsih 2011). Seperti bakteri Gram positif lainnya, bakteri *S. agalactiae* memiliki beberapa faktor virulensi yang dapat menyebabkan penyakit. Salah satu faktor virulensinya adalah kandungan eksotoksin yang terlarut pada *extracellular products* (ECP). Umumnya, strain bakteri patogen menghasilkan toksin yang virulen. Toksin protein bakteri *Streptococcus* merupakan zat antigenik yang kuat dan bekerja secara luas serta menyebabkan kematian dengan gejala yang tidak spesifik seperti nekrosis pada jaringan (Woolf 2000).

Salah satu strategi pengendalian penyakit yang telah digunakan untuk pengendalian penyakit streptococcosis adalah melalui vaksinasi. Vaksin merupakan strategi preventif yang ditentukan oleh kemampuan antigen untuk merangsang sistem kekebalan tubuh inang secara kontinu.

Vaksin dari protein yang disekresikan bakteri secara ekstraseluler belakangan ini juga mulai dikembangkan (Song *et al.* 2013). Produk ekstraseluler bakteri merupakan produk metabolisme bakteri yang mengandung bahan toksin yang dapat merangsang terbentuknya antibodi antitoksin. Protein ECP ini mudah mengaktifkan respon imun inang karena dikeluarkan dari sel sehingga lebih mudah bersentuhan dengan inang (Amrullah 2014).

Kelebihan lain dari metode vaksinasi ECP adalah bahan yang digunakan merupakan bahan toksin hasil metabolisme sehingga relatif lebih aman karena tidak terdapat lagi bakteri di dalamnya.

Kajian mengenai protein yang terdapat pada ECP *S. agalactiae* isolat NK1 yang berperan langsung dalam toksisitas pada ikan nila belum banyak diteliti. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian mengenai fraksi protein dalam ECP *S. agalactiae* isolat NK1 yang bersifat toksik serta komponen antigeniknya pada ikan nila, sehingga dapat dijadikan dasar dalam pengembangan pengendalian penyakit streptococcosis yang menimbulkan kerugian pada budidaya ikan nila

## Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Penelitian dilaksanakan selama sembilan bulan dari Januari hingga September 2016.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif dengan menyuntikkan 70 fraksi protein ECP *S. agalactiae* hasil kolom kromatografi masing-masing pada lima ekor nila.

### Paramater Pengamatan

#### 1) Konsentrasi Protein ECP *S. agalactiae* Isolat NK1

Penentuan identitas protein ECP diawali dengan menentukan konsentrasi protein terlarut pada ECP. Penentuan kadar protein ECP dilakukan dengan Spektrofotometer pada 595 nm. Sebagai blanko digunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA).

#### 2) Mortalitas

Perhitungan jumlah ikan uji yang mati dilakukan dari awal infeksi *S. agalactiae* isolat NK1 sampai akhir penelitian. Tingkat kematian (mortalitas) ikan dihitung dengan menggunakan rumus :

$$M = (N_0 - N_t) / N_0 \times 100\%$$

Keterangan :

M : Mortalitas (%)

N0 : Jumlah ikan yang hidup pada awal pengamatan (ekor)  
 Nt : Jumlah ikan yang hidup pada akhir pengamatan (ekor).

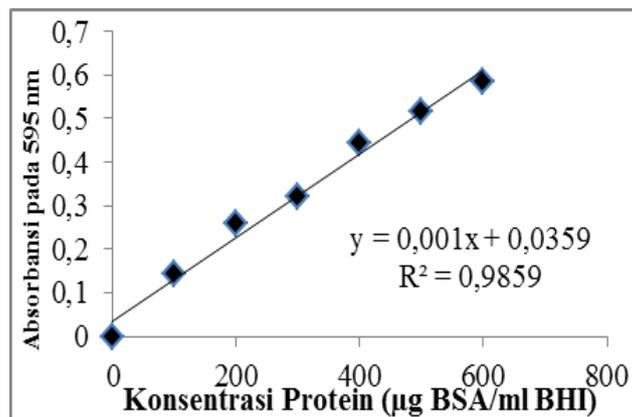
### 3) Gejala Klinis

Gejala klinis yang diamati berupa gejala klinis makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan gejala klinis makroskopis berupa perubahan tingkah laku yang meliputi pola berenang, perubahan anatomi organ luar (kondisi permukaan tubuh, kondisi mata dan warna tubuh). Sedangkan pengamatan patologi anatomi mikroskopis berupa pengamatan perubahan histologi dalam jaringan ikan.

## Hasil Dan Pembahasan

### Konsentrasi Protein ECP *S. agalactiae* Isolat NK1

Konsentrasi protein terlarut yang terkandung dalam ECP kasar pada *S. agalactiae* yang ditumbuhkan pada media BHI selama 72 jam pada absorbansi 0,6 adalah 126 ppm, dihitung berdasarkan nilai absorbansi yang di interpolasi pada persamaan  $y = 0,001x + 0,0359$  yang diperoleh dari kurva standar (Gambar 1).



**Gambar 1.** Kurva standar pengukuran konsentrasi protein pada ECP *S. agalactiae*.

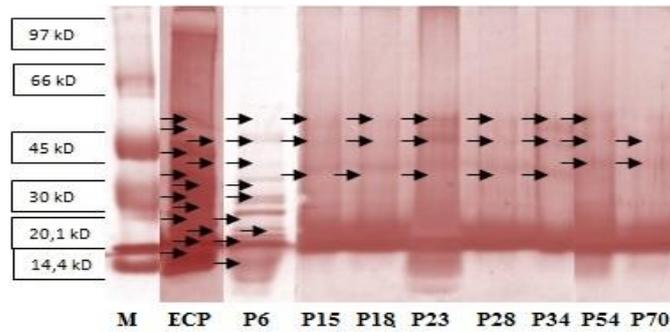
Menurut penelitian Dwinanti (2011), *S. agalactiae* isolat NK1 yang ditumbuhkan pada media BHI selama 72 jam memiliki konsentrasi protein terlarut pada nilai absorbansi 0,4 adalah 81,75 ppm, sedangkan penelitian Amrullah (2014) *S. agalactiae* isolat N14G yang ditumbuhkan pada media BHI selama 72 jam memiliki konsentrasi protein terlarut pada nilai absorbansi 0,45 adalah 8,6 ppm.

### Mortalitas

ECP difraksinasi menggunakan kolom kromatografi dan menghasilkan 70 fraksi protein dengan tiap fraksi memiliki volume sebanyak lima mililiter. Masing-masing fraksi protein (70 fraksi) dihitung konsentrasi protein

terlarutnya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm dan BSA sebagai blanko. Kemudian setiap fraksi disuntikkan secara intraperitoneal pada lima ekor ikan nila. Pada Tabel 1 dapat dilihat hasil pengamatan mortalitas dari 70 fraksi protein ECP *S. agalactiae*. Setelah dua minggu pengamatan kemudian didapatkan delapan fraksi protein yang bersifat toksik (fraksi protein no. 6, 15, 18, 23, 28, 34, 54 dan 70). Fraksi-fraksi protein kemudian diberi kode P1 – P70 untuk memudahkan penulisan.

Delapan fraksi toksik yang didapatkan kemudian dicari identitas proteinnya berdasarkan berat molekul dengan menggunakan SDS-PAGE (Gambar 2)



**Gambar 2.** Delapan fraksi protein ECP yang bersifat toksik pada ikan uji.

Dari hasil SDS-PAGE, diketahui bahwa fraksi protein no.6 (P6) memiliki sembilan fraksi protein yang hampir mirip ECP kasar yang memiliki 13 fraksi protein, hal ini dikarenakan awal tetesan fraksinasi kolom kromatografi yang dihasilkan masih belum murni. Sedangkan fraksi no. 15, 18, 23, 28, 34 dan 54 memiliki tiga fraksi protein dan fraksi no. 70 memiliki dua fraksi protein (Tabel 2).

*Gejala Klinis*

*Gejala Klinis Makroskopis*

Pengamatan gejala klinis setelah 14 hari pengamatan dapat dilihat pada Tabel 3.

Dari hasil pengamatan, terlihat bahwa P70 atau fraksi protein ke 70 memiliki tingkat virulensi yang lebih tinggi daripada fraksi lainnya. Hal ini berdasarkan kemunculan

gejala klinis yang lebih cepat dari fraksi protein lainnya. Sebagian besar gejala klinis muncul di hari pertama pasca infeksi *S. agalactiae*.

Kemunculan eksoptalmia (Gambar 3) pada ECP kasar sesuai dengan penelitian Pretto-Giordano et al. (2010) yang menyuntikkan *S. agalactiae* pada ikan nila dan penelitian Hardi (2011) yang menyuntikkan ECP *S. agalactiae* isolat NK1 pada ikan nila muncul di hari kedua pasca penyuntikan. Sedangkan pada perlakuan P23 dan P70 eksoptalmia terjadi lebih cepat yaitu pada hari pertama pasca penyuntikan. Sedangkan perlakuan lainnya lebih lambat memunculkan eksoptalmia, mulai dari 48 jam - 120 jam.

Tabel 1. Mortalitas ikan nila setelah disuntik 70 fraksi protein ECP *S. Agalactiae*

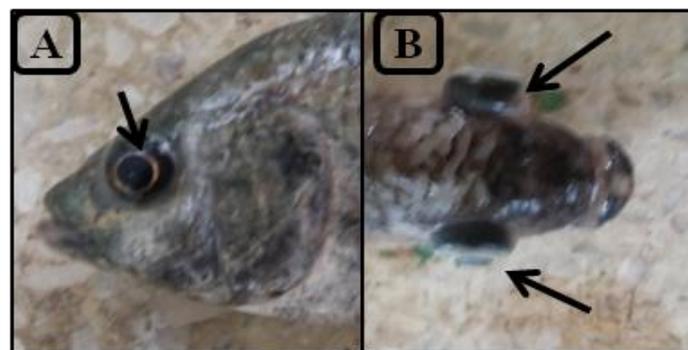
Fraksi Protein	Mortalitas (%)						
1	0	19	0	37	0	55	0
2	0	20	0	38	0	56	0
3	0	21	0	39	0	57	0
4	0	22	0	40	0	58	0
5	0	23	100	41	0	59	0
6	100	24	0	42	0	60	0
7	0	25	0	43	0	61	0
8	0	26	0	44	0	62	0
9	0	27	0	45	0	63	0
10	0	28	20	46	0	64	0
11	0	29	0	47	0	65	0
12	0	30	0	48	0	66	0
13	0	31	0	49	0	67	0
14	0	32	0	50	0	68	0
15	60	33	0	51	0	69	0
16	0	34	100	52	0	70	60
17	0	35	0	53	0		
18	60	36	0	54	60		

Tabel 2. Berat molekul fraksi protein yang bersifat toksik pada ECP *S. agalactiae*

Fraksi Protein (P)	ECP	P6	P15	P18	P23	P28	P34	P54	P70
	18,3	18,31	38,38	38,38	38,38	38,38	38,38	38,38	38,38
	19,66	19,66	45,01	45,01	45,01	45,01	45,01	45,01	45,01
	20,61	24,33	51,88	51,88	51,88	51,88	51,88	51,88	
	24,33	28,04							
	26,74	33,09							
Berat Molekul (KDa)	30,10	36,38							
	33,09	45,01							
	34,70	48,33							
	36,38	51,88							
	45,01								
	48,33								
	51,88								
	61,33								

Tabel 3. Gejala klinis pasca penyuntikan fraksi protein ECP *S. agalactiae* isolat NK1

Gejala Klinis	Waktu kemunculan (jam pasca penyuntikan)								
	ECP kasar	P6	P5	P18	P23	P28	P34	P54	P70
Garis vertikal tubuh menghitam	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Clear operculum	72	48	72	48	48	96	48	48	24
Mata mengkerut	-	-	-	-	120	-	144	-	24
Eksoptalmia & purulens	48	48	72	72	24	120	48	120	24
Pendarahan di mata	240	240	264	288	240	-	216	264	48
Warna tubuh pucat	48	48	24	24	24	48	48	96	24
Bercak merah di tubuh	24	24	48	24	48	72	48	48	24
Berenang miring, lemah atau tegak (perubahan pola renang)	24	24	48	48	24	48	24	48	24



Gambar 3. Eksoptalmia pada ikan nila pasca penyuntikan fraksi protein ECP *S. agalactiae* (tanda panah); A. Mata ikan normal, B. Eksoptalmia

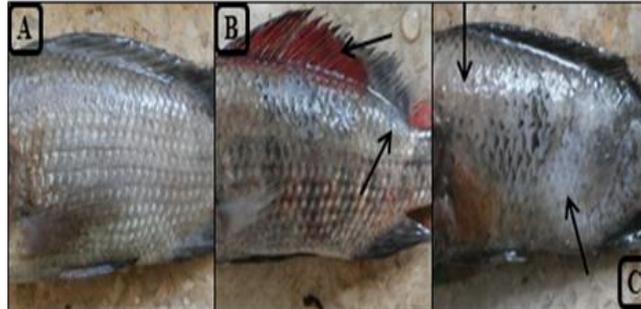
Gejala klinis berupa perubahan warna tubuh menjadi pucat tampak pada jam ke-24 pasca penyuntikan pada perlakuan P5, P18, P23 dan P70, sementara perlakuan ECP kasar,

P6, P28 dan P34 pada jam ke-48 pasca penyuntikan. Sedangkan untuk gejala klinis bercak merah muncul 24 jam – 72 jam pasca infeksi, hal ini menggambarkan bahwa gejala

awal dari serangan streptococcosis adalah berupa bercak merah pada tubuh ikan nila (Gambar 4).

Perubahan pada tubuh ikan nila sesuai dengan penelitian Evans *et al.* (2006) yang

menemukan adanya memar pada permukaan tubuh, pendarahan pada bagian sirip, berenang lambat dan lebih sering berada pada dasar akuarium setelah diinfeksi *S. agalactiae*.



Gambar 4. Perubahan pada tubuh ikan nila (tanda panah) A. Normal; B. Bercak merah dan warna tubuh pucat; C. Warna tubuh pucat.

Keseluruhan perubahan anatomi organ` luar pada penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Hardi (2011). Organ target dari serangan Streptococcosis adalah otak, mata dan ginjal. Organ otak yang terinfeksi menyebabkan perubahan pola renang karena terganggunya sistem koordinasi gerak tubuh serta menyebabkan perubahan warna tubuh, karena mengganggu produksi MSH (*Melanocyt Stimulating Hormone*).

#### Gejala Klinis Mikroskopis

Indikator histologis dapat menggambarkan perubahan yang terjadi dalam tubuh ikan baik akibat perubahan kualitas air, penanganan maupun infeksi patogen karena histopatologi merupakan hasil dari adanya perubahan secara biokimia dan fisiologis pada organisme (Sayed *et al.* 2012).

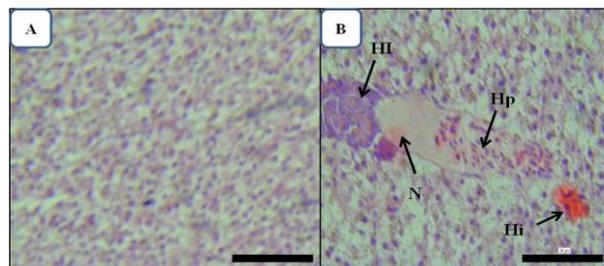
Namun, untuk mengamati perubahan histopatologi ini sangat bergantung pada

kualitatif pencahayaan mikroskop pada tiap jaringan yang diamati dan kebaruan teknologi analisis seluler dan molekuler (Hardi 2011).

Seperti telah dijelaskan sebelumnya bahwa organ target utama dari serangan streptococcosis adalah hati, ginjal dan otak. Maka, dalam penelitian ini peneliti mengambil sampel organ-organ tersebut untuk dilakukan pengamatan histologinya.

#### Organ Hati

Kerusakan pada organ hati ikan nila setelah penyuntikan dengan protein produk ekstraseluler *S. agalactiae* isolat NK1 berupa pembengkakan jaringan (hipertropi), pendarahan (hiperemi), kerusakan sel (nekrosis) dan penambahan jumlah sel dalam jaringan (hiperplasia) (Gambar 5). Kerusakan pada hati ikan nila akibat infeksi *S. agalactiae* terdapat pula pada penelitian Alsaid *et al.* (2013) dan Aryanto (2011).



Gambar 5. Kerusakan pada hati ikan nila (tanda panah).

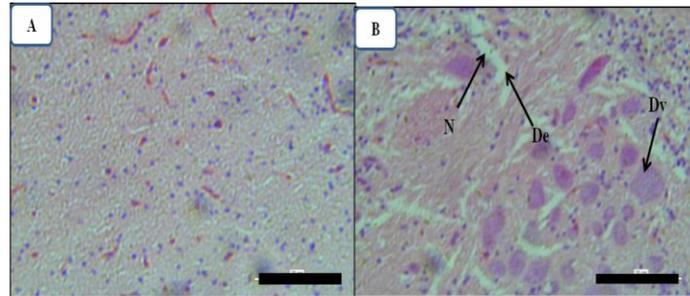
A) Jaringan hati ikan nila normal. B) Kerusakan jaringan hati pada perlakuan ujiantang. Keterangan : Hiperemi (Hi), nekrosis (N), hiperplasia (Hp) dan hipertrofi (HI). Garis hitam = 30  $\mu$ m.

### Organ Otak

Pada otak ikan uji terdapat kerusakan berupa nekrosis, degenerasi vakuola dan degenerasi jaringan (Gambar 6). Nekrosis adalah hilangnya jaringan setelah terjadinya degenerasi jaringan, degenerasi jaringan biasanya dapat dilihat pada tepian jaringan yang mengalami kerusakan. Sedangkan degenerasi vakuola adalah kerusakan sel dimana sitoplasma tampak bervakuola karena

organel sel menyerap air yang tertimbun dalam sitoplasma.

Ikan uji yang mengalami perubahan pola renang (berenang miring) mengalami kerusakan pada bagian otak. Perubahan pola renang terjadi karena kerusakan pada otak bagian metencephalon yang berfungsi mengatur keseimbangan tubuh dalam air (Hardi 2011).



Gambar 6. Kerusakan pada otak ikan nila (tanda panah).

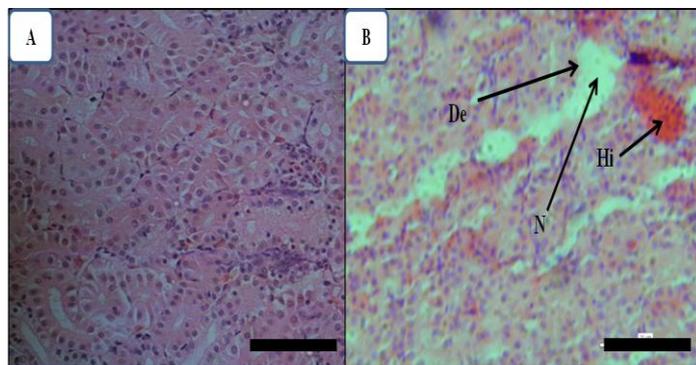
A) Jaringan otak ikan nila normal. B) Kerusakan jaringan otak pada perlakuan ujiantang.

Keterangan : Nekrosis (N), degenerasi vakuola (Dv) dan degenerasi jaringan (De). Garis hitam = 30  $\mu\text{m}$ .

### Organ Ginjal

Kerusakan pada ginjal hiperemi dan degenerasi jaringan (Gambar 7), yang mengakibatkan perubahan pada struktur dan fungsi ginjal sehingga mengganggu proses-proses fisiologis dalam tubuh ikan, bahkan mengakibatkan kematian. Kerusakan ginjal

ikan nila disebabkan oleh *S. agalactiae* yang 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 nekrosis pada tubulus (Filho *et al.* 2009).



Gambar 7. Kerusakan pada ginjal ikan nila (tanda panah).

A) Jaringan ginjal ikan nila normal.

B) Kerusakan jaringan ginjal pada perlakuan ujiantang.

Keterangan : Hiperemi (Hi), nekrosis (N) dan degenerasi jaringan (De). Garis hitam 30  $\mu\text{m}$ .

Ginjal merupakan salah satu organ imun pada ikan. Pada seluruh bagian organ ini mengandung sel-sel imun, terutama ginjal bagian depan. Ginjal bagian depan memiliki fungsi yang berbeda dengan vertebrata tingkat

tinggi lainnya, ginjal depan pada ikan berfungsi sebagai organ imun yang mengatur fagositosis, prosesing antigen, pembentukan IgM dan pembentukan imun memori melalui melanomakrofag (Rauta *et al.* 2012).

Kerusakan pada organ ginjal dan hati menyebabkan terganggunya sistem kekebalan tubuh. karena pada kedua organ tersebut terdapat *melano-macrophage centre* (MMC) yang berperan dalam sistem imun non-spesifik dan spesifik, serta pada bagian sinusoidnya berperan sebagai *reticuloendothelial system* (RES) yang dapat mendegradasi mikroba (Bols *et al.* 2001).

## Simpulan

Terdapat delapan fraksi protein toksik dari 70 fraksi protein pada ECP *S. agalactiae* isolat NK1 dengan kisaran berat molekul 36,38-51,88 KDa. Tidak ada perbedaan gejala klinis yang ditimbulkan oleh ECP maupun fraksi protein.

## Saran

Perlu adanya penelitian lanjutan mengenai toksisitas fraksi protein dua pita dengan tiga pita untuk mengetahui fraksi mana yang paling toksik sebagai dasar kajian pengembangan vaksin streptococcosis.

## Daftar Pustaka

- Alsaid M, Daud HHM, Mustapha NM, Bejo SK, Abdelhadi YM, Abuseliana AF, Hamdan RH. 2013. Pathological finding of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). *International Conference on Chemical, Agricultural and Medical Science (CAMS), Kuala Lumpur (Malaysia)*.
- Amrullah. 2014. Imunoproteksi vaksin toksoid bakteri *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Disertasi. Bogor (ID) : Institut Pertanian Bogor.
- Aryanto EW. 2011. Patogenesitas *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila. Skripsi. Bogor (ID) : Institut Pertanian Bogor.
- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LEJ. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 25 : 853-873.
- Dwinanti SH. 2011. Toksisitas dan Imunogenitas Produk Ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* Tipe Non-Hemolitik Pada Ikan Nila *Oreochromis niloticus*. Tesis. Bogor (ID) : Institut Pertanian Bogor.
- Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA. 2006. Streptococcus in warmwater fish. *Aquac. Health Int*. 7: 10-14.
- Filho CI, Muller EE, Pretto-Giordano LG, Ana Paula FRL, Bracarense. 2009. Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Braz J Vet Pathol*. 2 (1) : 12-15.
- Hardi EH. 2011. Kandidat Vaksin Potensial *Streptococcus agalactiae* untuk Pencegahan Penyakit Streptococcosis pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). Disertasi. Bogor (ID) : Institut Pertanian Bogor.
- Pretto-Giordano LG, Müller EE, de Freitas JC, da Silva VG. 2010. Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Archive of Biology and Technology* (53) 1 : 87-92.
- Rauta PR, Nayak B, Das S. 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study : A model for higher organisms. *Immunology letters*. 148 : 23-33.
- Sayeed AEH, Mekkawy IA, Mahmoud UM. 2012. Histopathological Alterations in some Body Organs of Adult *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Exposed to 4-Nonylphenol. *Zoology*. 8 : 163-184.
- Sheehan B. 2009. Streptococcal diseases in farmed tilapia. *Aquaculture Asia pacific* 5 (6): 26-29.
- Song M, Xie J, Peng X, Li H. 2013. Identification of protective immunogens from extracellular secretome of *Edwardsiella tarda*. *Fish Shellfish Immunol*. 35: 1932-1936.
- Tauhid dan Purwaningsih U. 2011. Penapisan isolat bakteri *Streptococcus* spp. sebagai kandidat antigen dalam pembuatan vaksin, serta efikasinya untuk pencegahan penyakit streptococcosis pada ikan nila, *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Riset Akuakultur*. 103-118.
- Woolf N. 2000. Cell, tissue and disease the basis of pathology 3<sup>rd</sup> edition. New York: WB Sanders.