

ISOLASI BAKTERIOFAGA ANTI *Streptococcus agalactiae* DARI IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

Angela Mariana Lusiastuti, Uni Purwaningsih, dan Tuti Sumiati

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar
Jl. Raya Sempur No.1, Bogor 16154
E-mail: *lusiastuti@yahoo.com*

(Naskah diterima: 8 April 2010; Disetujui publikasi: 12 Agustus 2010)

ABSTRAK

Infeksi *Streptococcus* merupakan salah satu penyakit serius pada ikan yang disebabkan oleh bakteri gram positif. Infeksi oleh *streptococcus* beta-hemolitik paling sering dilaporkan menginfeksi ikan. Di antara *streptococci* beta-hemolitik, *Streptococcus iniae* penyebab septicemia, meningoencefalitis, dan kematian pada ikan budidaya. Selain itu, *Streptococcus agalactiae* juga menyebabkan streptococcosis parah pada ikan nila. Alternatif yang bisa digunakan untuk terapi infeksi streptococcosis adalah dengan penggunaan bakteriofaga yang merupakan virus yang hidup pada bakteri. Tujuan penelitian ini adalah isolasi bakteriofaga *S. agalactiae* sebagai kandidat agen terapi yang memberikan efek protektif melawan infeksi streptococcosis. Faga diisolasi dari *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) yang sudah ditanami dengan 15 isolat *S. iniae* dan *S. agalactiae*. Isolat *S. iniae* dan *S. agalactiae* diisolasi dari ikan sakit dengan gejala klinis Streptococcosis. Setelah itu diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, tes katalase, pertumbuhan pada agar darah dan API 20 *Strep System*. Pertumbuhan faga ditunjukkan dengan adanya zona lisis pada tempat yang ditetesi dengan sampel cairan usus dari ikan nila sehat. Faga yang tumbuh lalu dikoleksi secara steril, disentrifus dan supernatannya difiltrasi dengan membran filter 0,45 μm dan disimpan pada suhu 4°C. Dari 15 isolat *S. iniae* dan *S. agalactiae* hanya satu isolat yaitu PSaT-18 yang menunjukkan zona lisis seperti yang ditunjukkan pada cawan petri isolat kontrol *S. iniae*. Zona lisis tersebut timbul akibat adanya faga yang memberikan proteksi terhadap *S. iniae* dan *S. agalactiae*. Zona lisis yang tidak jernih disebabkan konsentrasi faga yang terlalu rendah akibat dilakukan pengenceran pada proses filtrasi. Faga yang diperoleh selanjutnya akan dilakukan uji *in vitro* dan *in vivo* untuk mengetahui efektivitasnya.

KATA KUNCI: *S. iniae*, *S. agalactiae*, bakteriofaga, ikan nila

ABSTRACT: *Isolation Streptococcus agalactiae bacteriophage from Oreochromis niloticus. By: Angela Mariana Lusiastuti, Uni Purwaningsih, and Tuti Sumiati*

Streptococcal infection is a serious disease in fish caused by gram positive bacteria. The causative agent is Streptococcus β -hemolytic. Streptococcus iniae, a β -hemolytic bacterium is the main causative agent of septicemia, meningoencephalitis, and fish mortality. Moreover, the other causative agent is S. agalactiae. Bacteriophages which are viruses that live on bacteria can be selected and used as therapy for Streptococcosis. The aim of this research is to isolate bacteriophage of S. agalactiae as therapeutic agent candidate giving protecting effect for Streptococcosis. Phages was isolated from Brain Heart Infusion Agar (BHIA) were obtained from cultures of S. iniae and S. agalactiae. Strains S. iniae and S. agalactiae were isolated from

Streptococcus fish. The predominant types of colonies were subcultured and subjected to biochemical and physiological tests such as Gram staining, catalase test, hemolytic activity in blood agar and API 20 Strep System. Phages were isolated by using a double agar layer method. A zona lysis with plaques was removed from the plate, centrifuged and the supernatant was filtered through a 0.45 μ m membrane filter and stored at 4°C. From 15 isolates of *S. iniae* and *S. agalactiae*, only one isolate PSaT-18 showed lysis zone. The lysis zone developed because the phages give protection to *S. agalactiae*. The lysis zone is not clear because the phage concentration is too low and the dilution in filtration process is too high. Later, these phages were used for invitro and invivo test.

KEYWORDS: *S. iniae*, *S. agalactiae*, *bacteriophages*, *Oreochromis niloticus*

PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan ikan budidaya yang menguntungkan tetapi serangan penyakit bakterial streptococcosis menyebabkan kerugian sekitar 30%-40%. Salah satu jenis bakteri *streptococcus* yang menimbulkan penyakit adalah *S. iniae*. Tetapi, Supriyadi *et al.* (2005) dan Lusiastuti *et al.* (2008) mengisolasi jenis *streptococcus* lain yang bersifat patogen selain *S. iniae* yaitu *S. agalactiae*. Nomoto *et al.* (2004) menemukan adanya infeksi campuran antara *S. iniae*, *Lactococcus garviae* dan *S. dysgalactiae*, sedangkan Evans *et al.* (2006) menemukan infeksi ganda antara *S. agalactiae* dan *L. garviae* pada dolfin. Jika sudah terjadi infeksi bakteri, antibiotika biasanya sebagai obat pilihan untuk terapi. Munculnya sifat resistensi mikroba terhadap antibiotika dan bahayanya residu antibiotika yang berdampak negatif bagi masyarakat menyebabkan beberapa jenis antibiotika *broad spectrum* dilarang beredar dan dipergunakan untuk obat ikan (Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan KepMen No. 26/MENKP/2002 tentang pelarangan penggunaan antibiotik dan KepMen No. 20/MENKP/2003 tentang klasifikasi obat ikan).

Alternatif yang bisa digunakan untuk terapi infeksi streptococcosis adalah dengan penggunaan bakteriofaga yang merupakan virus yang hidup pada bakteri. Bakteriofaga secara teoritis dapat sebagai terapi penyakit infeksius, tetapi hanya sedikit yang melaporkan potensinya sebagai agen kontrol biologis pada penyakit yang terjadi di alam. Faga dari beberapa bakteri patogen pada ikan, seperti *Aeromonas salmonicida* (Rodgers *et al.*, 1981), *A. hydrophila* (Merino *et al.*, 1990), dan *Yersinia ruckeri* (Stevenson & Airdrie, 1984) telah dilaporkan tetapi tidak ada tindak lanjut setelahnya untuk digunakan sebagai

agen kontrol infeksi bakteri pada ikan. Penelitian Wu *et al.* (1981) dan Wu & Chao (1982) pertamakali menjelaskan aplikasi faga sebagai kontrol biologis patogen pada ikan (*A. hydrophila* dan *Edwardsiella tarda*). Setelah itu, penelitian secara kontinu oleh Smith & Huggins (1982) di mana faga berhasil digunakan sebagai terapi infeksi *E. coli* yang menyerang tubuh dan otak tikus, diare *E. coli* pada anak sapi, kambing, dan babi (Smith *et al.*, 1987) dan Barrow *et al.* (1998) tentang pencegahan infeksi *E. coli* pada unggas. Nakai & Park (2002) telah melakukan terapi faga spesifik dari *L. garviae* melalui intra peritoneal dan per oral secara eksperimental pada ikan ekor kuning dan pada infeksi *Pseudomonas plecoglossicida* yang merupakan bakteri penyebab *haemorrhagic ascites* pada ikan Ayu.

Dibandingkan dengan antibiotika kimiawi, bakteriofaga mempunyai beberapa keuntungan (Lorch, 1999) yaitu: (1) dampaknya terbatas: tidak seperti antibiotik, bakteriofaga dapat bereplikasi sendiri secara eksponensial selama ada bakteri spesifik di sekitarnya. Menurunnya jumlah bakteri akan menurunkan pula jumlah faga dan secara perlahan faga akan menghilang dari ikan sakit dan lingkungannya. Faga baik diberikan pada dosis tunggal; (2) perkembangan resistensi terbatas: bakteri dapat resisten terhadap faga. Tetapi karena faga mempunyai daya mutasi dan tingkat replikasi yang tinggi, faga beradaptasi dan tidak bersaing dengan bakteri; (3) target spesifik: terapi dengan antibiotika sering menyebabkan ketidakseimbangan flora bakteri dan menimbulkan munculnya infeksi sekunder seperti *Pseudomonas* sp. atau *Clostridium difficile* yang menyebabkan infeksi dan diare pada kolon. Di lain pihak, target sasaran bakteriofaga pada bakteri yang spesifik saja sehingga gangguan pada flora

usus menjadi lebih ringan (Lorch, 1999). Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi bakteriofaga dari ikan yang terkena streptococcosis untuk diseleksi sebagai kandidat agen kontrol biologis terhadap *Streptococcus* sp.

BAHAN DAN METODE

Bakteri

Sebanyak 15 isolat bakteri yang berperan sebagai organisme indikator yaitu *S. iniae* (5 isolat) dan *S. agalactiae* (7 isolat) dan 3 isolat diduga *S. dysgalactiae* dan *L. garviae* digunakan dalam penelitian ini. Isolat-isolat tersebut berasal dari ikan sakit dengan gejala Streptococcosis yang berasal dari Jawa Tengah dan Jawa Barat. Isolat yang berasal dari otak, hati, limpa, dan ginjal dipelihara dalam *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) dan koloni yang tumbuh dikarakterisasi secara kimiawi.

Isolasi dan Karakterisasi *Streptococcus*

Cairan otak, hati, limpa, dan ginjal dari ikan sakit dengan gejala streptococcosis diinokulasi pada BHIA dan diinkubasi pada 25°C selama 48 jam. Koloni yang tumbuh dengan karakteristik koloni kecil, halus, dan tidak berwarna dilakukan pengujian selanjutnya meliputi: pewarnaan Gram, produksi katalase, tes tolerans garam (6,5% NaCl), aktivitas hemolitik pada agar darah, tes *API 20 STREP System*, dan sensitivitas antibiotika pada Mueller Hinton Agar.

Organ yang diduga terinfeksi juga dilakukan pemeriksaan patologi anatomi baik secara makroskopis maupun mikroskopis (histopatologis).

Isolasi faga dan *Plaque Forming Unit (PFU) Assay*

Faga diisolasi dari ikan sehat, ikan sakit, dan air kolam dari Jawa Tengah dan Jawa Barat. Organ yang digunakan berupa ginjal, hati, dan otak (*pooling*) serta isi usus dihomogenisasi dengan PBS dan disentrifus 3.000 x g selama 10 menit. Satu mL supernatan diinokulasi masing-masing dalam 100 mL BHIB yang sudah disuplementasi dengan isolat bakteri *S. iniae*, *S. agalactiae*, dan isolat *Streptococcus* lain (organisme indikator). Untuk sampel air, 100 mL air kolam difilter melalui 0,45 µm membran filter dan dicampur dengan 100 mL *double*

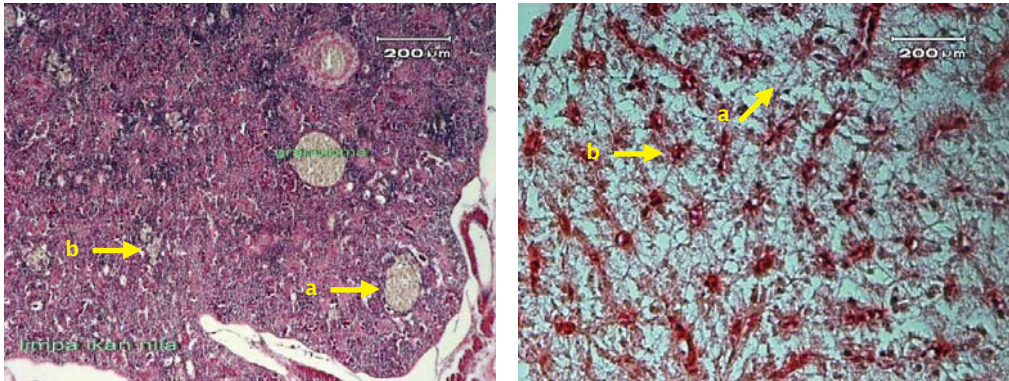
strength BHIB berisi organisme indikator. Setelah 48 jam ditumbuhkan dan diaduk perlahan pada suhu 25°C, kultur disentrifus dan di-filter, supernatannya dilakukan *Plaque Forming Unit Assay* (PFU).

HASIL DAN BAHASAN

Karakteristik Isolat Organisme Indikator

Bentuk koloni pada *S. iniae* dan *S. agalactiae* hampir sama. Koloni sangat halus, bentuknya kecil berdiameter ± 1 mm, tampak seragam dan tidak berwarna (*colorless, non pigmented*). Jika koloni tumbuh banyak, berkumpul menjadi satu dan tebal maka cenderung berwarna keputihan. *Streptococcus dysgalactiae* dan *L. garviae* yang juga digunakan sebagai organisme indikator mempunyai bentuk koloni yang lebih besar dan berwarna kekuningan. Baik *S. iniae*, *S. agalactiae*, dan *Streptococcus* yang lain menghasilkan reaksi terhadap API 20 STREP Sistem yang hampir sama hanya berbeda dengan hasil tes Voges Proskauer (VP). *Streptococcus iniae* dan *S. faecalis* hasil tes VP negatif sedangkan *S. agalactiae* positif. Menurut Evans *et al.* (2006), tes VP isolat *S. agalactiae* dari otot dolfin betina dewasa menunjukkan hasil negatif menggunakan metode konvensional sedangkan dengan API Rapid ID 32 test kit memberikan hasil yang positif. *Streptococcus iniae* dan *S. agalactiae* tidak toleran terhadap kadar garam 6,5% dan tes katalasenya negatif. Perbedaan yang tampak pada agar darah, *S. iniae* adalah beta hemolitik dengan terbentuknya zona lisis yang jernih dan tidak berwarna (*colorless*) sedangkan *S. agalactiae* adalah alfa hemolitik dikarakterisasi oleh zona lisis yang berwarna kehijauan. Jika pada satu cawan petri tumbuh dua jenis koloni yaitu *S. iniae* dan *S. agalactiae* maka *S. agalactiae* akan tumbuh dominan dan menekan pertumbuhan *S. iniae* pada hari kedua inkubasi.

Streptococcus agalactiae patogen pada ikan dan menyebabkan perubahan klinis dan histopatologis, termasuk exophthalmia, meningoencephalitis, vakuolisasi dan nekrosis sel-sel hati serta nekrosis dan kongesti limpa. Menurut Lindahl *et al.* (2005), *S. agalactiae* juga patogen pada mamalia termasuk manusia dan sapi. Gambar 1 menunjukkan kerusakan pada hati dan limpa akibat streptococcosis.



- a. Vakuolisasi dan nekrosis sel-sel hati (*Vacuolisation and necrosis of liver cells*)
- b. Nekrosis dan kongesti limpa (*Necrosis and congestion of spleen cells*)

Gambar 1. Kerusakan pada sel hati dan limpa
Figure 1. Necrosis of liver and spleen cells

Pada parensim hati sel-sel hepatosit menunjukkan atrofi, pembengkakan berwarna keabuan (*cloudy swelling*), vakuolisasi dan nekrosis. Vakuolisasi terbentuk sebagai akibat gangguan mekanisme penyerapan sodium sedangkan nekrosis terjadi karena aktivitas toksin dan enzim yang dihasilkan oleh *Streptococcus* sp. Kongesti (pembendungan pembuluh darah) terjadi akibat proses peradangan dan kerusakan dari organ. Nampak adanya endapan pigmen hemosiderin dan granulomatosis pada hati. Ada tiga tahapan kerusakan pada hati, tahap awal ditandai dengan inflamasi dan hiperemi (kemerahan), biasanya infeksi bersifat akut. Tahap selanjutnya mulai terjadi gangguan metabolisme dengan diawali munculnya degenerasi lemak, hati tampak pucat dan rapuh pada pemeriksaan eksternal.

Pada limpa tampak adanya inflamasi granulomatous menunjukkan produksi granuloma pada jaringan yang terinfeksi. Di dalam granuloma yang berwarna coklat keabu-abuan tersebut terdapat eksudat inflamasi dan bakteri yang terdapat dalam kondisi tidak terbentuk (*amorphous matter*). Beberapa kapiler tampak adanya eritrosit.

Isolasi Bakteriofaga dari *S. agalactiae*

Pada Tabel 1 menyajikan hasil isolasi bakteriofaga terhadap tiga jenis organisme indikator yaitu *S. iniae* dan *S. agalactiae*. Dua jenis faga dapat diisolasi dari 15 sampel

dengan tiga kondisi yaitu ikan sakit secara klinis streptococosis, ikan subklinis dan air kolam dan dinamai PSaT-1 dan PSaT-2. Zona lisis dari PSaT-1 tidak sejernih zona lisis yang dibentuk oleh PSaT-2. PSaT-2 menunjukkan zona lisis yang lebih tajam. Zona lisis terbentuk setelah 24 jam pada inkubasi 28°C. Organisme indikator yang digunakan oleh masing-masing faga berbeda, untuk PSaT-1 menggunakan *S. iniae* dan PSaT-2 dengan *S. agalactiae*. Tetapi jenis sampel dari keduanya sama yaitu dari isi usus ikan sublinis. Hal ini menunjukkan beberapa kemungkinan bahwa keduanya adalah faga yang sama dan spesifik terhadap *S. agalactiae* tetapi bersifat strain spesifik karena masih mampu melisis *S. iniae*.

Faga sulit diisolasi dari ikan sakit karena mikroba penyebabnya tumbuh dominan. Pada ikan yang sehat, fagapun sulit diisolasi. Menurut Lorch (1999), jika jumlah bakteri patogen menurun maka fagapun secara perlahan akan tereliminasi dan menghilang dari tubuh ikan dan lingkungannya. Pada ikan tampak sehat atau disebut dalam kondisi subklinis, faga dapat diisolasi. Pada kondisi subklinis, pertumbuhan faga dan mikroba patogen penyebabnya dalam keadaan seimbang atau jumlah faga lebih banyak dibanding mikroba penyebabnya. Ikan masih tampak sehat secara klinis tetapi mikroba patogen mulai berkembang biak. Ikan subklinis yang digunakan sebagai sampel masih aktif berenang dan tampak sehat hanya ada sedikit lecet-lecet pada kulitnya. Kondisi organnya juga tampak normal tidak ditemukan adanya

Tabel 1. Isolasi bakteriofaga terhadap *S. iniae* dan *S. agalactiae*
 Table 1. The isolation of bacteriophages from *S. iniae* and *S. agalactiae*

Jenis organisme indikator Kind of indicator organism	No. isolat Isolate number	Sampel faga Phages sample	Zona lisis Lysis zone	Desinasi faga Phages designation
<i>S. iniae</i>	N1.ot.JT	Ikan sakit (sick fish)	Tidak ada (none)	-
	N1.ht.JT	Ikan sakit (sick fish)	Tidak ada (none)	-
	N1.gj.JT	Ikan subklinis (subclinical fish)	Tidak ada (none)	-
	N2.ot.JT	Air (water)	Tidak ada (none)	-
	02.GM	Air (water)	Tidak ada (none)	-
	03.MND	Air (water)	Tidak ada (none)	-
<i>S. agalactiae</i>	N1.ot.CRT	Ikan subklinis (subclinical fish)	Ada (positive)	PSaT-2
	N1.gj.CRT	Ikan subklinis (subclinical fish)	Ada (positive)	PSaT-2
	N2.ot.CRT	Ikan subklinis (subclinical fish)	Tidak ada (none)	-
	N2.gj.CRT	Ikan subklinis (subclinical fish)	Tidak ada (none)	-
Isolat murni <i>S. iniae</i> Pure isolate of <i>S. iniae</i>	01.TB	Ikan subklinis (subclinical fish)	Ada (positive)	PSaT-1



Gambar 2. Faga yang membentuk zona lisis terhadap *S. agalactiae*
Figure 2. The lysis zone of phages from *S. agalactiae*

kelainan secara makroskopis. Di bawah ini dua jenis faga yang dapat tumbuh dengan membentuk zona lisis terhadap *S. agalactiae*.

Zona lisis yang tampak pada Gambar 2 tidak jernih disebabkan konsentrasi faga yang rendah dan kemungkinan akibat dilakukannya pengenceran pada waktu proses filtrasi menggunakan broth sehingga faga kurang kuat membentuk zona lisis.

KESIMPULAN

Bakteriofaga telah dapat diisolasi dari *S. agalactiae* dan spesifik terhadap *S. agalactiae* tetapi masih membentuk zona lisis terhadap *S. iniae*.

DAFTAR ACUAN

Barrow, P., Lovell, M., & Jr Berchieri, A. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. Clin. Diag. Lab. Immunol., 5: 294-298.

Evans, J.J., Pasnik, D.J., Klesius, P.H., & Al-Ablani, S. 2006. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garviae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. of Wildlife Dis.*, 42(3): 561-569.

Lindahl, G., Stalhammar-Carlemalm, M., & Areschoug, T. 2005. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clinical Microbiology*, 18: 102-127.

Lorch, A. 1999. Bacteriophages: An Alternative to Antibiotics? *Ausbiotech*, 9(5): 1-5.

Lusiastuti, A.M., Supriyadi, H., Aryati, Y., Mufidah, T., Gardenia, L., & Sumiati, T. 2008. Studi

kasus: Streptococcosis pada ikan gurame disebabkan oleh *Streptococcus iniae* dan *Streptococcus agalactiae*. *Prosiding Seminar Gelar Teknologi di Manado tanggal 2-3 Mei 2008*, 8 hlm.

Merino, S., Camprubi, & Tomas, J.M. 1990. Isolation and characterization of bacteriophage PM2 from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 68: 239-244.

Nakai, T. & Park, S.C. 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. In Microbiol.*, 153(2002): 13-18.

Nomoto, R., Munasinghe, L.I., Jin, D.H., Shimahara, Y., Yasuda, H., Nakamura, A., Misawa, N., Itami, T., & Yoshida, T. 2004. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalitas in Japan. *J. Fish Dis.*, 27: 679-686.

Rodgers, C.J., Pringle, J.H., McCarthy, D.H., & Austin, B. 1981. Quantitative and qualitative studies of *Aeromonas salmonicida* bacteriophage. *J. Gen. Microbiol.*, 125: 335-345.

Smith, H.W. & Huggins, M.B. 1982. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: Its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 307-318.

Smith, H.W., Huggins, M.B., & Shaw, K.M. 1987. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoeae in calves by means of bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 1,111-1,126.

Supriyadi, H., Widiyati, A., Sunarto, A., & Prihadi, T.H. 2005. Keragaan penyakit bakterial ikan nila (*O. niloticus*), pada KJA di lokasi berbeda. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 11(7): 35-46.

- Stevenson, R.M.V. & Airdrie, D.W. 1984. Isolation of *Yersinia ruckeri* bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 1,201-1,205.
- Wu, J.L. & Chao, W.J. 1982. Isolation and application of new bacteriophage ET-1 which infect *Edwardsiella tarda* the pathogen of edwardsiellosis. CAPD Fisheries Series No. 8, Reports on Fish Disease Res. (Taiwan), 4: 8-17.
- Wu, J.L., Lin, H.M., Jan, L., Hsu, Y.L., & Chang, L.H. 1981. Biological control of fish bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila* by bacteriophage AH1. *Fish Pathol.*, 15: 271-276.
- Yuasa, K., Kitancharoen, N., Kataoka, Y., & Al-Murbaty, F.A. 1999. *Streptococcus iniae*, the causative agent of mass mortality in rabbitfish *Siganus canaliculatus* in bahrain. *J. Aquat. Anim Health*, 11: 87-93.