

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

TOKSISITAS SEL UTUH DAN *EXTRACELLULAR PRODUCT* (ECP) *Streptococcus agalactiae* β -HEMOLITIK DAN NON-HEMOLITIK PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

Achmad Suhermanto^{1*)}, Sukenda^{2)#}, Muhammad Zairin Jr.³⁾, Angela Mariana Lusastuti^{4**)}, dan Sri Nuryati¹⁾

¹⁾ Program Pascasarjana Ilmu Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Insitut Pertanian Bogor
Jalan Agatis, Kampus Dramaga, Bogor 1680, Jawa Barat

²⁾ Politeknik Kelautan dan Perikanan Sorong, KKD-BP Kesehatan Ikan dan Lingkungan
Jl. K. Pattimura, Tj. Kasuari, Sorong, Papua Barat

³⁾ Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan
Jl. Sempur No. 1, Bogor 16129

(Naskah diterima: 9 Januari 2019; Revisi final: 14 Februari 2019; Disetujui publikasi: 15 Februari 2019)

ABSTRAK

Bakteri *Streptococcus agalactiae* tipe β -hemolitik dan non-hemolitik menjadi agen penyebab infeksi streptococcosis yang mengakibatkan kematian dan kerugian besar pada budidaya ikan nila. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan toksisitas sel utuh dan *extracellular product* (ECP) bakteri β -hemolitik dan non-hemolitik yang diinjeksikan pada ikan nila. Karakterisasi *S. agalactiae* berdasarkan SNI dan API 20 STREP, serta pemisahan protein dengan metode SDS-PAGE. Pengujian toksisitas dilakukan dengan cara menginjeksikan sel utuh dan ECP *S. agalactiae* secara *intraperitoneal* (IP) dengan dosis 0,1 mL ekor⁻¹. Hasil uji biokimia, dan konfirmasi dengan API 20 STREP menunjukkan bahwa semua isolat positif *S. agalactiae*. Fraksinasi protein pada sel utuh bakteri diperoleh pita protein masing-masing sebanyak sembilan dan tujuh pita pada tipe β -hemolitik dan non-hemolitik. Fraksinasi ECP teridentifikasi pada β -hemolitik sebanyak tujuh pita dan non-hemolitik empat pita protein. Konsentrasi protein sel utuh dan ECP β -hemolitik lebih besar dibandingkan bakteri non-hemolitik. Gejala abnormalitas lebih cepat terjadi pada ikan nila yang diinjeksi ECP bakteri β -hemolitik dan berbanding lurus dengan kematian sebanyak 91%-100% pada jam ke-13 pascainjeksi. Hasil ini menunjukkan bahwa ECP bakteri *S. agalactiae* β -hemolitik lebih virulen dibandingkan tipe non-hemolitik. Hingga akhir pemeliharaan tidak ada kematian pada ikan yang diinjeksi sel utuh bakteri *S. agalactiae* β -hemolitik dan non-hemolitik. Studi histopatologi ikan yang diinjeksi ECP *S. agalactiae* pada organ hati, limpa, otak, dan ginjal menunjukkan adanya kongesti, hemoragi, dan nekrosis.

KATA KUNCI: fraksinasi; gejala klinis; *Streptococcus agalactiae*; sintasan; ikan nila

ABSTRACT: *Toxicity of whole cells and extracellular product (ECP) of β -hemolytic and non-hemolytic Streptococcus agalactiae in tilapia (Oreochromis niloticus). By: Achmad Suhermanto, Sukenda, Muhammad Zairin Jr., Angela Mariana Lusastuti, and Sri Nuryati*

The β -hemolytic and non-hemolytic biotype of Streptococcus agalactiae are the agents that cause streptococcosis infection which resulted in high mortality and major losses in tilapia culture. This study aimed to compare the toxicity of whole cell and extracellular product (ECP) β -hemolytic and non-hemolytic bacteria from injected tilapia. Characterization of S. agalactiae was based on SNI and API 20 STREP and protein separation by SDS-PAGE method. Toxicity test was carried out by injecting whole cells and ECP S. agalactiae intraperitoneally with a dose of 0.1 mL fish⁻¹. The results of biochemical tests, with confirmation by API 20 STREP showed that all isolates were positive for S. agalactiae. Protein fractionation of whole bacterial cells obtained as many as nine and seven bands of protein in β -hemolytic and non hemolytic biotype, respectively. ECP fractionation was identified in β -hemolytic biotype as many

Korespondensi: Program Pascasarjana Ilmu Akuakultur,
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Insitut Pertanian Bogor.
Jalan Agatis, Kampus Dramaga, Bogor 1680, Jawa Barat,
Indonesia.
Tel. + 62 251 8622935
E-mail: sukenda@ipb.ac.id

as seven bands and four protein bands in non-hemolytic. The whole cell protein concentration and ECP β -hemolytic were higher than non-hemolytic bacteria. Symptoms of abnormalities occurred faster in tilapia which was injected with ECP β -hemolytic bacteria and had positive correlation with 91%-100% mortalities at the 13th hours post-injection. This results indicated that ECP of *S. agalactiae* β -hemolytic are more virulent than non-hemolytic. Until the end of the trial, there were no deaths in fish injected with whole cells of β -hemolytic and non-hemolytic *S. agalactiae*. Histopathological studies of ECP-injected fish *S. agalactiae* in the liver, spleen, brain, and kidneys showed congestion, hemorrhage, and necrosis.

KEYWORDS: fractionation; clinical sign; *Streptococcus agalactiae*; survival rate; tilapia

PENDAHULUAN

Infeksi streptococcosis yang disebabkan bakteri streptococcus menjadi permasalahan besar dalam budidaya ikan air tawar di dunia termasuk Indonesia terutama pada ikan nila (Amal & Zamri-Saad, 2011; Lusiastuti *et al.*, 2014; Pradeep *et al.*, 2016). Ciri khas gejala yang muncul pada ikan positif terinfeksi streptococcosis yaitu peradangan otak (*meningoensefalitis*), mata menonjol (*pop-eye*), hilangnya nafsu makan, eksoptalmia lateral atau bilateral, perdarahan mata, kekeruhan pada kornea, perut buncit, sumsum tulang belakang melengkung membentuk huruf C, kekakuan, berenang tidak menentu (*erratic*), berputar (*whirling*), dan pendarahan di dasar sirip (Amal & Zamri-Saad, 2011; Li *et al.*, 2014). *Streptococcus agalactiae* merupakan patogen penting penyebab streptococcosis yang menimbulkan kematian dan kerugian besar pada budidaya ikan nila (Sukenda *et al.*, 2015; Kannika *et al.*, 2017). Bakteri *S. agalactiae* Group B Streptococcus (GBS) termasuk dalam kelompok bakteri Gram positif yang tidak membentuk spora, tidak bersifat asam, non motil, β -hemolitik, dan non-hemolitik berukuran diameter 0,6-1,2 μm (Pereira *et al.*, 2013).

Identifikasi isolat bakteri *S. agalactiae* dan *S. iniae* di berbagai belahan dunia telah dilakukan dan diketahui tingkat prevalensi *S. agalactiae* lebih besar pada ikan tilapia dari pada *S. iniae* (Sheehan *et al.*, 2009). Berdasarkan karakteristik biokimia dan fenotip, bakteri ini terbagi dalam dua kluster yaitu biotipe-1 (β -hemolitik) yang banyak menyerang budidaya ikan di kawasan Asia dan biotipe-2 (non-hemolitik) yang dilaporkan menyebabkan kematian pada budidaya ikan nila hampir di seluruh dunia (Sheehan *et al.*, 2009; Delannoy *et al.*, 2014). *S. agalactiae* tipe β -hemolitik identik dengan serotipe Ia ditemukan di kawasan Asia Tenggara dan tersebar luas di Thailand (Kayansamruaj *et al.*, 2015), Malaysia (Noraini *et al.*, 2013; Amal *et al.*, 2015), banyak menyebabkan kematian massal pada budidaya ikan nila. Penelitian terhadap ikan nila dengan gejala streptococcosis di Indonesia mulai dilakukan pada tahun 2009 dan diketahui bakteri tipe non-hemolitik lebih dominan dalam memberikan dampak kematian nila hingga 85% (Taukhid & Purwaningsih, 2009).

Beberapa kajian tentang patogenisitas telah dilakukan pada bakteri *S. agalactiae*, dan faktor virulensi menjadi salah satu faktor penting penyebab kematian pada ikan nila (Delannoy *et al.*, 2014; Kayansamruaj *et al.*, 2014, Kannika *et al.*, 2017). Perbedaan virulensi pada kedua tipe ini belum diketahui dominan faktor penyebabnya. Virulensi pada bakteri Gram positif (*S. agalactiae*) diketahui pada komponen eksotoksin *extracellular product* (ECP) dan toksin lainnya, sedangkan pada bakteri Gram negatif adalah *lipopolysaccharide* (LPS)/endotoksin yang bersifat lebih virulen (Williams *et al.*, 2003). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan toksitas sel utuh dan *extracellular product* (ECP) bakteri β -hemolitik dan non-hemolitik, gejala klinis dan histopatologi pada ikan nila.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari bulan November 2017-April 2018 di Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I) Depok, Jawa Barat. Pengujian profil dan konsentrasi protein dilakukan di laboratorium Pusat Antar Universitas (PAU) Institut Pertanian Bogor (IPB).

Ikan Uji

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) strain Nirwana-III sebagai ikan uji berasal dari Balai Pengembangan dan Pemacuan Stok Ikan Nila dan Mas Wanayasa, Jawa Barat. Ikan uji dengan bobot $17,44 \pm 1.400$ g; dipelihara dengan kepadatan 15 ekor akuarium⁻¹ ukuran 60 cm x 35 cm x 35 cm, dan ketinggian air 25 cm. Aklimatisasi dilakukan selama 14 hari hingga ikan siap digunakan. Ikan uji yang digunakan bebas atau *specific pathogen free* (SPF) terhadap bakteri *S. agalactiae*. Pengujian dilakukan pada lima ekor ikan dengan mengisolasi organ mata, otak, dan ginjal ikan kemudian dikultur pada media *brain heart infusion agar* (BHIA), hasilnya tidak ditemukan *S. agalactiae* pada semua organ.

Bakteri

Bakteri *S. agalactiae* berasal dari sampel ikan nila (*O. niloticus*) saat terjadi wabah streptococcosis di berbagai daerah dengan organ target yang diisolasi berasal dari otak, ginjal anterior, dan mata, kemudian

Tabel 1. Kode dan asal isolat bakteri
Table 1. Code and source of bacteria

Kode perlakuan <i>Code of treatments</i>	Kode isolat <i>Code of isolates</i>	Asal <i>Source</i>
B	NP105O	Danau Sentani, Papua (<i>Sentani Lake, Papua</i>)
E	N ₁₄ G	Waduk Cirata, Jawa Barat (<i>Cirata Lake, West Java</i>)
G	NT01O	Tasikmalaya, Jawa Barat (<i>Tasikmalaya, West Java</i>)
I	SG01-16	Muaro Jambi, Jambi

dikultur pada media BHIA (Oxoid Ltd, UK) (Tabel 1), diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam (SNI, 2009). Sebelum digunakan, empat isolat dilakukan *Postulat koch's* sebanyak dua kali dengan cara menginokulasikan bakteri pada ikan nila secara *intraperitoneal* (IP) dengan dosis 0,1 mL ekor⁻¹. Isolasi organ target dilakukan ketika ikan sudah mengalami gejala streptococcosis.

Uji fenotipe *S. agalactiae* dilakukan berdasarkan metode standar (SNI, 2009). Aktivitas katalase diuji dengan mereaksikan bakteri dengan hidrogen peroksida 3%. Katalase positif ditunjukkan dengan adanya gelembung saat terjadi reaksi (Kannika *et al.*, 2017). Uji konfirmasi menggunakan API 20 *Strep System* (bioMérieux Industry, Hazelwood, USA) sesuai protokol, data yang diperoleh diidentifikasi menggunakan *software* (<https://apiweb.biomerieux.com>). Penentuan biotipe bakteri dilakukan dengan pengujian aktivitas hemolitik yaitu isolat dikultur pada media *blood agar base* yang dicampur dengan 5% (v/v) darah kambing, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Indikator zona lisis pada media *blood agar base* menunjukkan isolat tersebut β -hemolitik.

Pengujian Toksisitas ECP dan Sel Utuh pada Ikan Nila

Pengujian toksisitas dilakukan menggunakan sel utuh dan ECP *S. agalactiae*, yang diinjeksikan secara IP pada 15 ekor ikan dengan dosis 0,1 mL ekor⁻¹, dan dilakukan pemeliharaan ikan selama 21 hari. Pengamatan gejala klinis hingga kematian ikan dan perubahan pola renang dilakukan hingga hari terakhir masa pemeliharaan.

Isolasi *Extracellular Product* (ECP)

Isolasi ECP mengacu pada Hardi (2011), bakteri dikultur dalam media cair BHI 10 mL, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C-30°C. Bakteri yang tumbuh kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 30 menit. Supernatan dan sel utuh bakteri dipisahkan dengan penyaringan menggunakan *filter paper* 0,22 μ m. Hasil filtrasi digunakan untuk pengujian

toksisitas ECP, sedangkan sel utuh bakteri dibilas sebanyak tiga kali dengan PBS sebelum dilakukan pengujian pada ikan nila. Ikan diinjeksi ECP dan sel utuh bakteri secara IP dengan dosis 0,1 mL ikan⁻¹.

Fraksinasi dan Konsentrasi Protein Sel Utuh dan ECP

Protein secara umum diukur menggunakan metode Bradford (1976) dan Sugiani (2012). Sebanyak 100 μ L sampel ditambahkan 1 mL pereaksi Bradford kemudian di-*vortex* dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Larutan stok pereaksi Bradford dibuat dengan cara melarutkan 350 mg *serva blue G* ke dalam 100 mL etanol 95% kemudian ditambahkan 200 mL *phosphoric acid* 88%. Sebanyak 30 mL larutan stok diambil dan ditambahkan 425 mL akuades, 15 mL etanol 95%, dan 30 mL *phosphoric acid* 88%. Konsentrasi protein contoh dihitung berdasarkan kurva standar yang dibuat dari *bovine serum albumin* (BSA). Protein pada tahap pemurnian diamati dengan mengukur serapan pada panjang gelombang 280 nm.

Elektroforesis dilakukan mengikuti metode Laemmli (1970); Zhang & Austin (2000) dengan tahapan persiapan gel pemisah (10%): 3,34 mL larutan A [30% (b/v) akrilamid dan 0,8% (b/v) bis-akrilamid]; 2,5 mL larutan B (1,5 M Tris-Cl pH 8,8; 0,4% SDS) ditambah 50 μ L APS 10% dan 5 μ L TEMED dituangkan ke dalam cetakan gel. *Stacking gel* (5%): 0,67 mL larutan C (1 M Tris- Cl pH 6,8 dan 0,4% SDS); 2,3 mL akuades; 30 μ L APS 10%; dan 5 μ L TEMED dituang di atas gel pemisah yang sudah beku kemudian dipasang sisir. Bufer elektroforesis berisi Tris 25 mM, glisin 192 mM, dan SDS 0,1%, yang diatur pada pH 8,3.

Pemisahan protein dilakukan dengan cara protein sampel (20 μ L) dicampur 5 μ L bufer sampel (60 mM Tris-Cl pH 6,8 25% gliserol; 2% SDS; 14,4 mM 2-merkaptioetanol; dan 0,1% bromfenol biru), dididihkan selama 2-3 menit dan dimasukkan ke dalam gel. Protein dipisahkan dengan memberikan aliran listrik (125 mA dan 150 V). Gel kemudian diwarnai dengan perak nitrat.

Mortalitas

Perhitungan jumlah kematian ikan dilakukan menggunakan rumus:

$$M (\%) = \frac{(No - Nt)}{No} \times 100$$

Keterangan (Note):

M : mortalitas/mortality (%)

No : jumlah ikan yang hidup pada awal pengamatan (ekor)

Nt : jumlah ikan yang hidup pada akhir pengamatan (ekor)

Rerata waktu kematian/mean time to death (MTD) dihitung berdasarkan Nitimulyo *et al.* (2005).

Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis makroskopis berupa perubahan tingkah laku pola berenang, perubahan anatomi organ luar (kondisi permukaan tubuh, kondisi mata, dan warna tubuh).

Histopatologi

Analisis histopatologi dilakukan pada organ hati, limpa, otak, dan ginjal ikan nila. Organ direndam dalam 10% *netral buffer formalin* (NBF) semalaman pada suhu ruang. Jaringan kemudian didehidrasi, ditanam dalam parafin dan dipotong dengan tebal 5 μ m menggunakan *Rotary MicrotomeHisto Line MRS 3500*. Pewarnaan menggunakan hematoxylin dan eosin (HE), hasil histopatologi dievaluasi sesuai standar.

Analisis Data

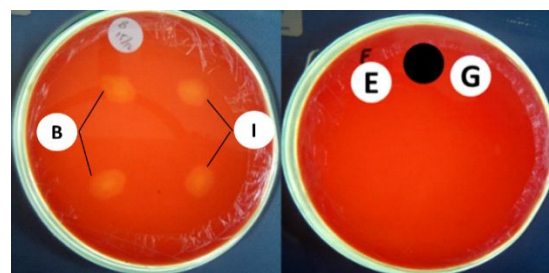
Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) terdiri atas delapan perlakuan. Empat perlakuan menggunakan sel utuh bakteri dengan kode B, E, G, dan I, perlakuan lainnya menggunakan ECP bakteri dengan kode B1, E1, G1, dan I1. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Data yang diperoleh ditabulasi dan dianalisis menggunakan program *Microsoft excel 2013*. Pengaruh perlakuan dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA) dengan bantuan *Software Minitab* versi 17. Analisis yang menunjukkan pengaruh nyata, dilanjutkan dengan uji *Fisher* pada taraf kepercayaan 95%. Hasil uji API 20 STREP dan berat molekul protein dianalisis secara deskriptif kualitatif.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil uji biokimia menunjukkan semua isolat yang diuji katalase dan motilitas diperoleh hasil negatif, pewarnaan Gram positif dan uji fermentatif positif. Uji aktivitas hemolitik menunjukkan isolat B (NP1050) dan I (SG01-16) positif β -hemolitik, sedangkan isolat N₁₄G dan NT010 tipe non-hemolitik (Gambar 1). Hasil uji tersebut sama dengan penelitian yang telah

dilakukan pada bakteri *S. agalactiae* yang diisolasi dari ikan nila (Al Harbi, 2016; Kannika *et al.*, 2017). Uji konfirmasi terhadap empat isolat dengan API 20 STREP diperoleh hasil 84,6%-98,1% *S. agalactiae*. Bakteri β -hemolitik memiliki kemampuan menghidrolisis gula lebih banyak daripada non-hemolitik termasuk *Trehalose*, dan *amidon/starch*, hal ini sesuai penelitian Sheehan *et al.* (2009) pada *S. agalactiae*.

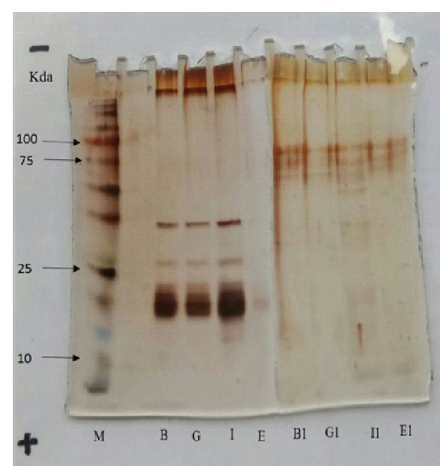
Fraksinasi sel utuh bakteri dan ECP *S. agalactiae* dilakukan menggunakan SDS-PAGE untuk mengetahui berat molekul (BM) protein pada sel utuh dan ECP bakteri (Gambar 2). BM protein sel utuh *S. agalactiae* berada pada kisaran 13.93-150 kDa (Tabel 2), sedangkan sampel ECP bakteri tipe β -hemolitik berkisar antara



Keterangan (Note): M: marker; B: NP1050; G: NT010; I: SG01-16; E: N₁₄G; B1: ECP NP1050; G1: ECP NT010; I1: ECP SG01-16; E1: ECP N₁₄G

Gambar 1. Aktivitas bakteri β -hemolitik (B, I) (kiri) dan non-hemolitik (E, G).

Figure 1. β -hemolytic (B, I) (left) and non-hemolytic (E, G) (right) activity on blood agar.



Gambar 2. Hasil fraksinasi protein dari sel utuh dan ECP bakteri.

Figure 2. Result of protein fractionation of whole cells and ECP.

Tabel 2. Berat molekul protein sel utuh bakteri
 Table 2. Molecular weight of protein in whole cell of bacteria

Berat molekul Molecular weight (kDa)	Perlakuan (kode bakteri) Treatments (Code of bacteria)				Protein
	B (NP1050)	I (SG01-16)	E (N ₁₄ G)	G (NT010)	
150.00	+	+	+	+	<i>Pili backbone protein*</i>
79.00	+	+	-	-	<i>CylE protein**</i>
65.92	+	+	+	+	BL/UD
38.66	+	+	+	+	BL/UD
24.00	+	+	+	+	<i>CAMP protein**</i>
19.01	+	+	+	+	BL/UD
17.14	+	+	+	+	BL/UD
15.45	+	+	-	-	<i>C protein alpha**</i>
13.93	+	+	+	+	BL/UD

Keterangan (Note): * Rosini & Margarit (2015); ** Doran & Nizet (2004); BL/UD: belum diketahui (*undetected*)

32.00-85.41 kDa dan 59.43-85.41 kDa pada bakteri non-hemolitik (Tabel 3).

Hasil fraksinasi protein pada sel utuh bakteri *S. agalactiae* menunjukkan jumlah pita protein yang muncul sebanyak sembilan pita (β -hemolitik) dan tujuh pita (non-hemolitik). Bakteri β dan non-hemolitik memiliki pita protein yang sama pada BM 150 kDa yang diperkirakan identik dengan *pili backbone protein* (Rosini & Margarit, 2015), dan BM 24 kDa kemungkinan identik dengan *CAMP protein* (Doran & Nizet, 2004).

Pili backbone protein berfungsi meningkatkan penempelan patogen pada permukaan keras atau

jaringan inang, sedangkan *CAMP factor* yang menjadi faktor virulensi penting dan merupakan protein yang disekresikan untuk membentuk pori-pori di sel inang, mempromosikan kerusakan, dan invasi pada jaringan (Rajagopal, 2009). Penelitian berat molekul protein sel utuh *S. agalactiae* N₁₄G yang diinkubasi selama 72 jam pada suhu 28°C-30°C diperoleh sebanyak 10 pita protein dengan berat molekul 15,97-111,86 kDa (Sugiani, 2012). Lama inkubasi berpengaruh terhadap kepadatan bakteri N₁₄G, inkubasi dalam rentang waktu 24 jam pertumbuhan bakteri sebesar 64,13 x 10⁹ CFU/mL; sedangkan pada waktu 72 jam pertumbuhannya mencapai 1,03 x 10¹¹ CFU/mL, kondisi ini kemungkinan berpengaruh terhadap profil protein bakteri. Hasil

Tabel 3. Berat molekul protein ECP bakteri
 Table 3. Molecular weight of protein for ECP bacteria

Berat molekul Molecular weight (kDa)	Perlakuan (kode bakteri) Treatments (code of bacteria)				Protein
	B (NP1050)	I (SG01-16)	E (N ₁₄ G)	G (NT010)	
150.00	+	+	+	+	<i>Pili backbone protein*</i>
79.00	+	+	-	-	<i>CylE protein**</i>
65.92	+	+	+	+	BL/UD
38.66	+	+	+	+	BL/UD
24.00	+	+	+	+	<i>CAMP protein**</i>
19.01	+	+	+	+	BL/UD
17.14	+	+	+	+	BL/UD
15.45	+	+	-	-	<i>C protein alpha**</i>
13.93	+	+	+	+	BL/UD

Keterangan (Note): * Doran & Nizet (2004); ** Spellerberg et al. (1999); BL/UD: belum diketahui (*undetected*)

penghitungan konsentrasi protein menunjukkan konsentrasi protein sel utuh dan ECP bakteri β -hemolitik lebih tinggi daripada non-hemolitik (Tabel 4).

Bakteri β -hemolitik memiliki pita protein berbeda dibandingkan non-hemolitik yaitu pita protein dengan BM 79 kDa (*cylE protein*) diperkirakan identik dengan α -hemolisin/cytolysin dan 15,45 kDa (*C protein alpha*) (Doran & Nizet, 2004; Spellerberg *et al.*, 1999). *cylE protein* merupakan toksin penting bagi bakteri *S. agalactiae* untuk menginfeksi inang, menginduksi respons inflamasi, dan berkontribusi terhadap gejala neurologis (Rajagopal, 2009).

Fraksinasi pada ECP teridentifikasi sebanyak tujuh pita protein (β -hemolitik) dan empat pita protein (non-hemolitik). Protein pada bakteri β -hemolitik dengan BM 79 kDa dan 32 kDa diduga identik dengan gen virulen *cylE protein* dan *cylB protein* (Doran & Nizet, 2004; Spellerberg *et al.*, 1999). Semua bakteri memiliki protein dengan BM 85.41 kDa diduga identik dengan gen *C protein beta* (Doran & Nizet, 2004), merupakan β -protein yang memblokir pemsunahan sel intraseluler oleh netrofil (Doran & Nizet, 2004; Delannoy *et al.*, 2014). Penelitian profil protein ECP NK1 diperoleh sebanyak 13 pita protein dengan BM 18,3-61,33 kDa (Suryadi *et al.*, 2017) sedangkan fraksinasi ECP N₁₄G menghasilkan dua pita protein dengan BM 21,99 dan 83,42 kDa (Sugiani, 2012). Perbedaan jumlah pita protein kemungkinan karena perbedaan *strain* dan biotipe bakteri, media kultur, serta lama inkubasi bakteri.

Terdapat perbedaan signifikan nilai konsentrasi protein sel utuh semua bakteri, dengan konsentrasi tertinggi sebesar 0,912 mg mL⁻¹ dihasilkan isolat SG-01-16 dan konsentrasi terendah isolat N₁₄G sebesar 0,421 mg mL⁻¹. Penelitian konsentrasi protein bakteri N₁₄G yang dikultur selama 72 jam diperoleh hasil pada sel utuh sebesar 1,37 mg mL⁻¹ dan ECP sebesar 1,89 mg mL⁻¹ (Sugiani, 2012).

Pengujian terhadap abnormalitas dan kematian ikan dilakukan dengan menginjeksikan sel utuh dan ECP bakteri *S. agalactiae*, hasil pengamatan menunjukkan gejala abnormalitas yaitu melanosis pada ikan nila terjadi pada semua perlakuan (Tabel 5). Ikan yang diinjeksi ECP tipe β -hemolitik dan non-hemolitik mengalami gejala klinis *gaspung*, *ocular opacity*, *erratic*, tubuh membentuk *C-shape*, *whirling*, ikan mengalami kekakuan, dan akhirnya mati.

Perbedaan hanya terjadi pada durasi waktu yakni ikan yang diinjeksi ECP bakteri β -hemolitik melanosis terjadi jam kedua pascainjeksi diikuti gejala lain yaitu ikan bernafas terengah-engah (*gaspung*), berenang tidak menentu (*erratic*), tubuh ikan membentuk huruf C (*C-shape*), berenang berputar (*whirling*), dan kaku. Hasil ini berbeda dengan penelitian Pretto-Giordano *et al.* (2010); Hardi (2011) menunjukkan ECP *S. agalactiae* yang diinjeksikan pada ikan nila menyebabkan eksophtalmia di hari kedua pasca-penyuntikan, sedangkan Suryadi *et al.* (2017) menyatakan gejala klinis berupa perubahan warna tubuh menjadi pucat terjadi pasca-penyuntikan ikan nila pada jam ke-24 dan ke-48.

ECP bakteri non-hemolitik yang diinjeksikan secara IP reaksinya lebih lambat, melanosis pada ikan nila terjadi pada jam ke-8 pascainjeksi, diikuti gejala lain termasuk mata berwarna putih (*ocular opacity*). Gejala klinis ini hampir sama dengan gejala klinis akibat infeksi bakteri yaitu perdarahan mata, kornea opacity, perut buncit, sumsum tulang belakang melengkung membentuk huruf C, kekakuan (Hardi *et al.*, 2011; Sugiani, 2012). ECP bakteri β -hemolitik memberikan reaksi yang cepat dalam menyebabkan abnormalitas pada ikan nila. Ikan nila yang diinjeksi sel utuh dan ECP menunjukkan hasil bervariasi berdasarkan perlakuan, kematian awal terjadi pada enam jam pascainjeksi ECP SG01-16. Mortalitas sebanyak 10% terjadi pada ikan yang diinjeksi ECP N₁₄G, 12 jam pasca-penyuntikan (Gambar 3).

Tabel 4. Konsentrasi protein sel utuh dan ECP *S. agalactiae*
Table 4. Protein concentration of whole cells and ECP *S. agalactiae*

Kode bakteri Code of bacteria	Konsentrasi protein sel utuh Protein concentration of whole cells (mg mL ⁻¹)	Konsentrasi protein ECP Protein concentration of ECP (mg mL ⁻¹)
NP1050	0.909 ± 0.005 ^a	0.215 ± 0.009 ^d
N ₁₄ G	0.421 ± 0.007 ^c	0.146 ± 0.13 ^d
NT010	0.754 ± 0.006 ^b	0.207 ± 0.008 ^d
SG01-16	0.912 ± 0.004 ^a	0.211 ± 0.007 ^d

Keterangan: Rerata dengan superscript berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan (p < 0,05)
Note: The mean value with different superscripts showed a significant difference (p < 0.05)

Tabel 5. Gejala klinis pada ikan nila yang diinjeksi sel utuh dan ECP *S. agalactiae*
 Table 5. Clinical signs on tilapia that were injected by whole cells and ECP *S. agalactiae*

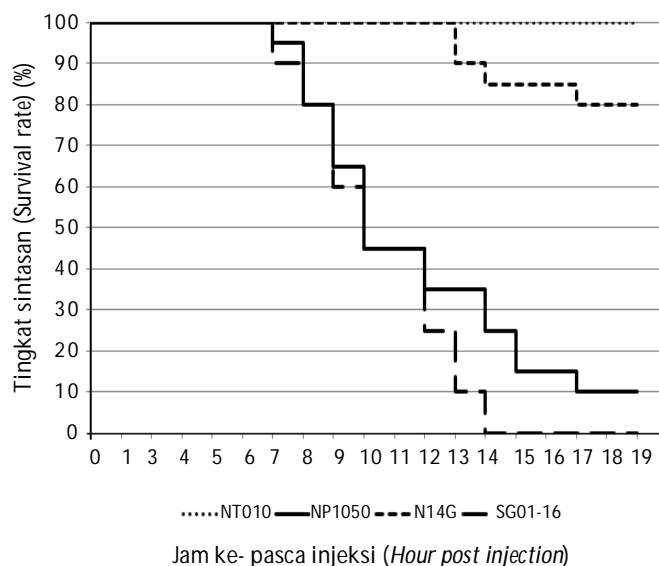
Gejala klinis <i>Clinical signs</i>	Kode perlakuan (<i>Code of treatments</i>)							
	B	E	G	I	B1	E1	G1	I1
Melanosis	+	+	+	+	+	+	+	+
Gasping	-	-	-	-	+	+	-	+
Ocular opacity	-	-	-	-	-	+	-	-
Erratic	-	-	-	-	+	+	-	+
C-shape	-	-	-	-	+	+	-	+
Whirling	-	-	-	-	+	+	-	+
Kaku (<i>Rigor</i>)	-	-	-	-	+	+	-	+

Mortalitas tertinggi terjadi pada perlakuan ECP SG01-16 dan ECP NP1050 sebesar 100% dan 91%. Rerata waktu kematian mengalami perbedaan yang signifikan yaitu kode perlakuan I1 rerata waktu 9,98 jam; B1 11,44 jam; dan E1 82,29 jam. Hingga masa pemeliharaan selama 21 hari tidak ada kematian pada ikan yang diinjeksi semua sel utuh bakteri *S. agalactiae*.

ECP berupa toksin yang dihasilkan bakteri *S. agalactiae* merupakan komponen protein terlarut yang disekresikan bakteri pada fase pertumbuhan eksponensial, biasanya *strain* virulen menghasilkan toksin protein sebagai penentu utama virulensi (Todar, 2012). *Aeromonas hydrophila* menghasilkan toksin protein bersifat sitotoksik, sitolitik, hemolitik, dan enterotoksik; dan sangat virulen terhadap ikan nila

(Khalil & Mansour, 1997), *Labeo rohita* (Sahu *et al.*, 2011), dan ikan lele (Pridgeon *et al.*, 2013). ECP *A. hydrophila* menyebabkan kematian sel, sitotoksitas ginjal, dan hemolisis saat diinjeksikan pada ikan (Grayfer *et al.*, 2014), serta menimbulkan kematian pada ikan *rainbow trout* (*Oncorhynchus mykiss*) dalam rentang waktu 5-9 jam pascainjeksi (Nieto *et al.*, 1991). ECP *Vibrio harveyi* mengandung *caseinase*, *gelatinase*, *phospholipase*, *lipase*, dan *hemolisin* menyebabkan kematian sebesar 60%-100% ikan *salmon* (*Salmo salar*) (Zhang & Austin, 2000).

Kematian yang cepat dan banyak pascainjeksi kemungkinan karena banyaknya produk dari gen virulen yang larut dalam ECP, terutama bakteri β-hemolitik. Penelitian pola kematian pada ikan yang terjadi secara



Gambar 3. Kurva Kaplan-Meier mortalitas ikan pascainjeksi ECP *S. agalactiae*.

Figure 3. Kaplan-Meier curve of fish mortality post injection by ECP *S. agalactiae*.

cepat dan banyak kemungkinan karena keberadaan beberapa enzim seperti hemolisin, lipase, elastase, gelatinase, chitinase dalam ECP (Austin & Austin, 2007).

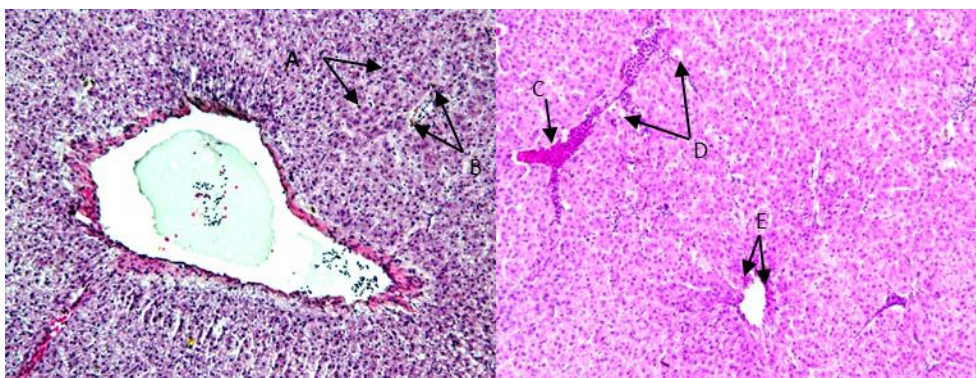
Konsentrasi protein pada sel utuh tidak berpengaruh terhadap patogenitas terhadap ikan nila. Ikan seperti hewan pada umumnya memiliki mekanisme pertahanan diri terhadap patogen (Shoemaker *et al.*, 2015). Sel utuh bakteri yang diinjeksikan ke ikan kemungkinan difagosit oleh sel-sel fagositik yang menghancurkan antigen melalui tiga tahap yaitu pelekatan, fagosit, dan pencernaan.

Toksin protein bakteri masuk ke dalam sel target melalui dua mekanisme, pertama toksin langsung berikatan dengan reseptor spesifik pada sel target dan menginduksi pembentukan pori dalam membran melalui aktivitas enzimatik ditransfer ke sitoplasma sel. Mekanisme kedua yaitu alternatif, toksin berikatan dengan sel target dan struktur toksin dibawa ke dalam sel melalui proses selektivitas dan efektivitas penangkapan makromolekul atau biasa disebut *reseptor-mediated endocytosis* (RME) (Todar, 2012). Studi *in vitro* menggunakan mutan group B *Streptococcus* (GBS) isogenik bakteri non-hemolitik maupun hiper-hemolitik menjelaskan peranan toksin β -hemolysin/cytolysin (β -h/c) terhadap patogenesis. Produksi β -h/c berkorelasi terhadap kerusakan sitolitik pada sel-sel epitel, sel endotel, dan makrofag, dibuktikan dengan berkurangnya kepadatan sitoplasma, pemisahan sitoplasma, dan membran inti, dan organel membesar karena adanya mekanisme aksi pembentukan pori. β -h/c menstimulasi transkripsi *intraseluler nitric oxide synthase* (iNOS) dan produksi *nitric oxide* (NO) dalam makrofag dan memicu apoptosis makrofag melalui jalur *MyD88-independent* (Nizet, 2002).

Pengamatan histopatologi pada ikan nila dengan organ target hati, limpa, otak, dan ginjal menunjukkan adanya abnormalitas dengan intensitas bervariasi. Abnormalitas pada hati berupa peradangan sel secara menyeluruh, kongesti sinusoid dan hilangnya hepatosit, nekrosis, pembuluh darah besar pada parenkima tampak berdilatasi dengan lumen terisi sel-sel darah (kongesti), vakuola-vakuola kosong pada sitoplasma sehingga mendorong nukleus ke tepi (diduga degenerasi) (Gambar 4). Limpa menunjukkan adanya nekrosis, infiltrasi sel radang, pulpa putih *germinal centres* tidak terlihat, dan degenerasi pulpa merah (Gambar 5), kongesti kapiler pada meninges, pigmen hemosiderin pada sitoplasma di jaringan otak (Gambar 6). Kongesti pembuluh darah tampak pada parenkima secara menyeluruh terjadi di ginjal, pendarahan, pembekuan darah di glomeruli dan tubulus, infiltrasi sel-sel radang, serta nekrosis (Gambar 7).

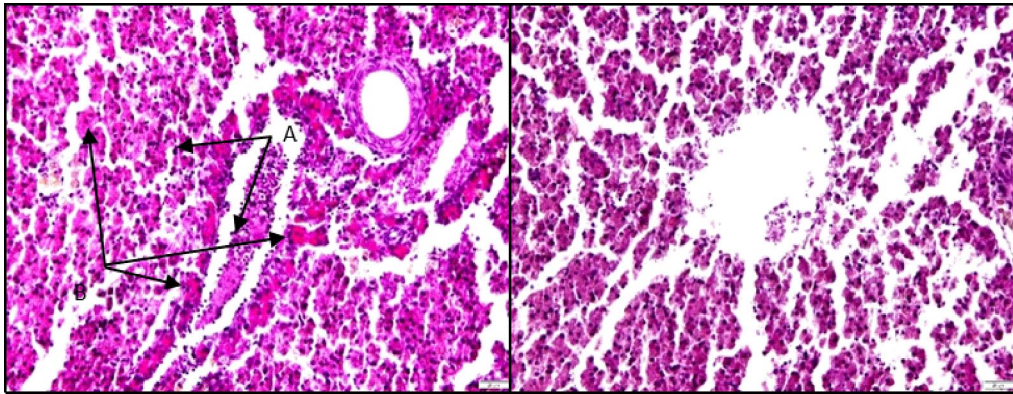
Organ hati mengalami perubahan histopatologi yang menyebabkan terjadinya disfungsi hati sehingga fungsi utama hati untuk detoksifikasi racun atau benda asing menjadi terganggu, ditunjukkan adanya degenerasi yang ditandai hepatosit dan kongesti di sinusoid. Adanya vakuola disebabkan pembengkakan hepatosit, penyempitan sinusoid, akibatnya terjadi pembengkakan sel hati. Infeksi *S. agalactiae* pada ikan nila menunjukkan pengeluaran hepatosit dengan perubahan lemak sebagai respons terhadap berkurangnya aliran darah karena tersumbatnya aliran darah dan trombus pembuluh darah portal (Chen *et al.*, 2007; Laith *et al.*, 2017).

Studi histopatologi jaringan otak menunjukkan adanya meningitis, infiltrasi sel inflamasi, disertai pendarahan seperti laporan penelitian Laith *et al.* (2017). Hasil ini berkorelasi positif pada ikan yang

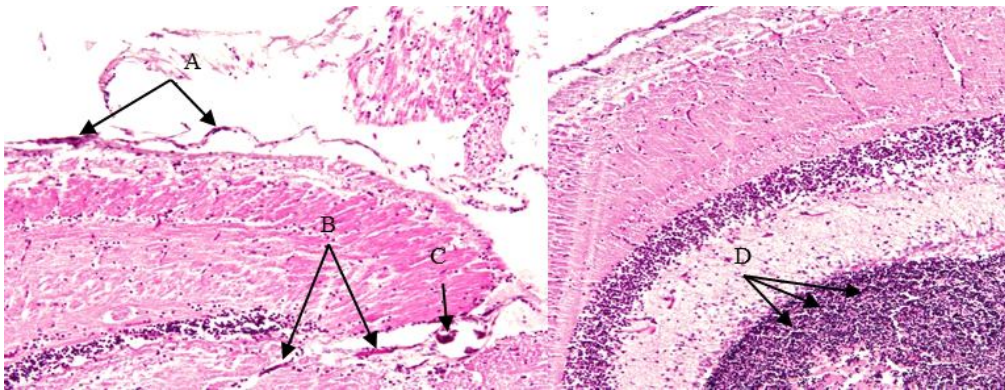


Gambar 4. Hati: peradangan sel (A), nekrosis (B), pendarahan (C), vakuola pada sitoplasma (D), kongesti di sinusoid dan hilangnya hepatosit (E).

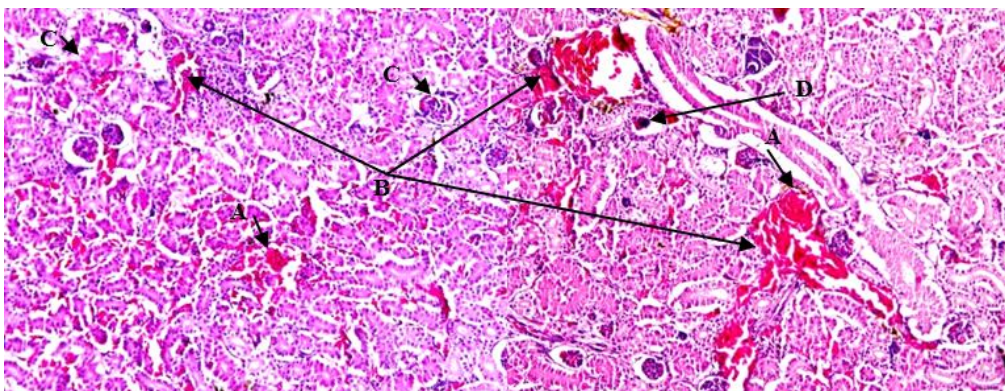
Figure 4. Liver: inflammatory cells (A), necrosis (B), hemorrhage (C), vacuole in the cytoplasm (D), congestion of sinusoids and loss of hepatocytes (E).



Gambar 5. Limpa: nekrosis (A), infiltrasi sel radang (B).
Figure 5. Spleen: necrosis (A), infiltration of inflammatory cell (B).



Gambar 6. Otak: kongesti kapiler pada meninges (A), kongesti kapiler (B), pigmen hemosiderin (C), infiltrasi sel radang (D).
Figure 6. Brain: congestion of the meninges (A), capillary congestion (B), hemosiderin pigment (C), infiltration of inflammatory cell (D).



Gambar 7. Ginjal: pembekuan darah (A), pendarahan (B), infiltrasi sel-sel radang (C), nekrosis (D).
Figure 7. Kidney: thrombosis (A), hemorrhage (B), inflammatory cell infiltration (C), necrosis (D).

diinjeksi ECP mengalami abnormalitas gejala klinis yaitu pola berenang tidak menentu dan berenang berputar. Hasil penelitian Hardi *et al.* (2011) menyatakan jaringan otak ikan nila yang terserang streptococcosis mengalami kerusakan dan berdampak negatif dengan melemahnya fungsi syaraf, akibatnya ikan berenang memutar (*whirling*) yang pada akhirnya menyebabkan kematian.

Jaringan limpa menunjukkan *periarterial lymphoid sheath* (PALS) tampak lebih kecil dari normal dan *germinal centers* jarang terlihat karena deplesi degenerasi pulpa merah, nekrosis, dan infiltrasi sel radang. Degenerasi pulpa merah menyebabkan fungsi filtrasi pengangkatan sel darah merah yang tua atau rusak dari peredaran menjadi terganggu. Limpa sebagai tempat terjadinya proliferasi hematopoitik dan aktivasi sel fagositik utama, melanomacrophages, mengalami abnormalitas kemungkinan disebabkan peran bakteri dan racun pada ikan yang terinfeksi (Amyes, 2007). Ginjal mengalami kongesti pembuluh darah tampak pada parenkima secara menyeluruh, pendarahan, dan pembekuan darah yang parah disertai infiltrasi sel inflamasi. Kerusakan jaringan hematopoitik ginjal mirip dengan penelitan pada ikan nila merah (*Oreochromis* sp.) yang diinfeksi dengan *S. agalactiae* (Su *et al.*, 2017).

KESIMPULAN

ECP bakteri β -hemolitik lebih virulen dibandingkan tipe non-hemolitik, sedangkan sel utuh yang diinjeksi pada ikan tidak memberikan dampak kematian. Pengamatan histopatologi ikan yang diinjeksi ECP *S. agalactiae* pada organ hati, limpa, otak, dan ginjal menunjukkan adanya kongesti, hemoragi, dan nekrosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Badan Riset Sumberdaya Manusia Kelautan dan Perikanan (BRSDMKP) KKP, BRPBATPP Bogor, IRP2I Depok, Politeknik KP Sorong, BKIPM 1 Jayapura, dan BPBAT Sungai Gelam Jambi.

DAFTAR ACUAN

- Al Harbi, A.H. (2016). Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). *Aquaculture*, 464, 515-20.
- Amal, M.N.A. & Zamri-Saad, M. (2011). Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34(2), 195-206.
- Amal, M.N.A., Zamri-Saad, M., Zahrah, A.S., & Zulkafli, A.R. (2015). Water quality influences the presence

- of *Streptococcus agalactiae* in cage cultured red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture Research*, 46(2), 313-23.
- Amyes, S.G. (2007). Enterococci and streptococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, S43-S52.
- Austin, B. & Austin, D.A. (2007). Bacterial fish pathogens. Fourth Edition. p. 552. New York: Praxis Publishing Ltd., 552 pp.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Chen, C., Chao, C., & Bowser, P.R. (2007). Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* infected tilapia. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 27(1), 1-9.
- Delannoy, C.M.J., Zadoks, R.N., Crumlish, M., Rodgers, D., Lainson, F.A., Ferguson, H.W., & Fontaine, M.C. (2014). Genomic comparison of virulent and non-virulent *Streptococcus agalactiae* in fish. *Journal of Fish Diseases*, 39(1), 13-29.
- Doran, K.S. & Nizet, V. (2004). Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Molecular Microbiology*, 54(1), 23-31.
- Grayfer, L., Hodgkinson, J.W., & Belosevic, M. (2014). Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 43(2), 223-242.
- Hardi, E.H. (2011). *Kandidat vaksin potensial Streptococcus agalactiae untuk pencegahan penyakit streptococcosis pada ikan nila (Oreochromis niloticus)*. Disertasi. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Hardi, E.H., Sukenda, Harris, E., & Lusiastuti, A.M. (2011). Karakteristik dan patogenisitas *Streptococcus agalactiae* tipe β -hemolitik dan non-hemolitik pada ikan nila. *Jurnal Veteriner*, 12(2), 152-164.
- Kannika, K., Pisuttharachai, D., Srisapoome, P., Wongtavatchai, J., Kondo, H., Hirono, I., Unajak, S., & Areechon, N. (2017). Molecular serotyping, virulence gene profiling and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia farms in Thailand by multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1497-1507.
- Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Katagiri, T., Hirono, I., & Rodkhum, C. (2014). Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(4), 488-495.

- Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Kondo, H., Hirono, I., & Rodkhum, C. (2015). Genomic comparison between pathogenic *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia in Thailand and fish-derived ST7 strains. *Infection, Genetics and Evolution*, 36, 307-14.
- Khalil, A.H. & Mansour, E.H. (1997). Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* in tilapia, *Tilapia nilotica*. *Letters in Applied Microbiology*, 25(4), 269-273.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Laith, A.A., Ambak, M.A., Hassan, M., Sheriff, S.M., Nadirah, M., Draman, A.S., Wahab, W., Wan Ibrahim, W.N., Aznan, A.S., Amina Jabar, A., & Najiah, M. (2017). Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary World*, 10(1), 101-111
- Li, Y.W., Liu, L., Huang, P.R., Fang, W., Luo, Z.P., Peng, H.L., & Li, A.X. (2014). Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Fish Diseases*, 37(8), 757-763.
- Lusiastuti, A.M., Textor, M., Seeger, H., Akineden, Ö., & Zschöck, M. (2014). The occurrence of *Streptococcus agalactiae* sequence type 261 from fish disease outbreaks of tilapia *Oreochromis niloticus* in Indonesia. *Aquaculture Research*, 45, 1260-1263.
- Nieto, T.P., Santos, Y., Rodriguez, L.A., & Ellis, A.E. (1991). An extracellular acetylcholinesterase produced by *Aeromonas hydrophila* is a major lethal toxin for fish. *Microbial pathogenesis*, 11(2), 101-110.
- Nitimulyo, K.H., Isnansetyo, A., Triyanto, T., Murdjani, M., & Sholichah, L. (2005). Efektivitas vaksin polivalen untuk pengendalian vibriosis pada kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 7(1), 95-100.
- Nizet, V. (2002). Streptococcal α -hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 10(12), 575-580.
- Noraini, O., Sabri, M.Y., & Siti Zahrah, A. (2013). Efficacy of spray administration of formalin killed *Streptococcus agalactiae* in hybrid red tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health*, 25(2), 142-148.
- Pereira, U.P., Santos, A.R., Hassan, S.S., Aburjaile, F.F., Soares, S.C., Ramos, R.T.J., Carneiro, A.R., Guimaraes, L.C., Diniz, C.A.A., Barbosa, M.S., de Sa, P.B., Ali, M., Bakhtiar, S.M., Dorella, F.A., Zerlotini, A., Araujo, F.M.G., Leite, L.R., Oliveira, G., Miyoshi, A., Silva, A., Azevedo, V., & Figueiredo, H.C.P. (2013). Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* strain SA20-06, a fish pathogen associated to meningoencephalitis outbreaks. *Standards in Genomic Sciences*, 8(2), 188.
- Pradeep, P.J., Suebsing, R., Sirthammajak, S., Kampeera, J., Jitrakorn, S., Saksmerprome, V., & Jeffs, A. (2016). Evidence of vertical transmission and tissue tropism of Streptococcosis from naturally infected red tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture Reports*, 3, 58-66.
- Pretto-Giordano, L.G., Müller, E.E., Freitas, J.C.D., & Silva, V.G.D. (2010). Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(1), 87-92.
- Pridgeon, J.W., Klesius, P.H., Song, L., Zhang, D., Kojima, K., & Mobley, J.A. (2013). Identification, virulence, and mass spectrometry of toxic ECP fractions of West Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila* obtained from a 2010 disease outbreak. *Veterinary Microbiology*, 164(3-4), 336-343.
- Rajagopal, L. (2009). Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiology*, 4(2), 201-21.
- Rosini, R. & Margarit, I. (2015). Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(6), 1-4.
- Sahu, I., Das, B.K., Marhual, N., Samanta, M., Mishra, B.K., & Eknath, A.E. (2011). Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* on rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Indian Journal of Microbiology*, 51(4), 515-520.
- Sheehan, B., Labrie, L., Lee, Y.S., Wong, F.S., Chan, J., Komar, C., Wendover, N., & Grisez, L. (2009). Streptococcal diseases in farmed tilapia. *Aquaculture Asia Pacific*, 5, 26-29.
- Shoemaker, C., LaFrentz, B., & LaPatra, S. (2015). Overview of fish immune system and infectious diseases. *Dietary nutrients, additives and fish health*. Wiley, Canada, p. 1-24.
- Standar Nasional Indonesia [SNI]. 7545.3. (2009). Metode identifikasi bakteri pada ikan secara konvensional – Bagian 2.
- Spellerberg, B., Pohl, B., Haase, G., Martin, S., Weber-Heynemann, J., & Lütticken, R. (1999). Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of *Streptococcus agalactiae* by ISS1 transposition. *Journal of Bacteriology*, 181(10), 3212-3219.

- Su, Y., Feng, J., Liu, C., Li, W., Xie, Y., & Li, A. (2017). Dynamic bacterial colonization and microscopic lesions in multiple organs of tilapia infected with low and high pathogenic *Streptococcus agalactiae* strains. *Aquaculture*, 471, 190-203.
- Sugiani, D. (2012). *Vaksin bivalen untuk pencegahan penyakit motile aeromonas septicemia dan streptococcosis pada ikan nila (Oreochromis niloticus)*. Disertasi. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Sukenda, Rusli, Nuryati, S., & Hidayatullah, D. (2015). Durasi proteksi vaksin *Streptococcus agalactiae* untuk pencegahan streptococcosis pada ikan nila. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 14(2), 192-201.
- Suryadi, I.B.B., Sukenda, & Nuryati, S. (2017). Fraksinasi dan uji toksistas ECP (extracellilar product) *Streptococcus agalactiae* isolat NK1 pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Perikanan Kelautan*, 8(1), 122-129.
- Taukhid, & Purwaningsih, U. (2009). 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*, 6(1), 103-118.
- Todar, K. (2012). Bacterial protein toxins. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Madison, Wisconsin.
- Williams, M.L., Azadi, P., & Lawrence, M.L. (2003). Comparison of cellular and extracellular products expressed by virulent and attenuated strains of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15, 264-273.
- Zhang, X.H. & Austin, B. (2000). Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 23(2), 93-102.