

KARAKTERISASI TINGKAT VIRULENSI BAKTERI *Vibrio splendidus* PADA KERANG MANILA (*Ruditapes philippinarum*) MENGUNAKAN TES *IN VITRO*

Ciptaning Weargo Jati¹, Huriyatul Fitriyah Noor², Rizha Bery Putriani³

^{1,2}Aquaculture Department, Universitas Lampung, Lampung, Indonesia

³Aquatic Resource Department, Universitas Lampung, Lampung, Indonesia

Email Korespondensi : ciptaning.jati@fp.unila.ac.id

Abstrak - *Vibrio splendidus* merupakan penyebab terjadinya *Brown Ring Disease* (BRD) pada kerang manila, *Ruditapes philippinarum*. Bakteri yang diujikan didapat dari *Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines* (LBCM), Prancis. Karakterisasi bakteri dilakukan dengan menggunakan tes *in vitro*. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi tingkat virulensi dai *V. splendidus* dengan menggunakan serangkaian tes *in vitro* pada kerang manila. Pada tes yang dilakukan, kami menemukan filopod pada hemosit kerang hilang, yang menandakan adanya sitotoksitas. Untuk menghitungnya, beberapa tes *flow cytometry* seperti uji adherensi, fagositosis, dan *reactive oxygen species* (ROS) tes dilakukan. Dua jenis bakteri *Vibrio tapetis* digunakan untuk membandingkan aktivitas keduanya. Hasil dari penelitian ini ditemukan bahwa aktivitas *Vibrio splendidus* lebih rendah dari *Vibrio tapetis* dan kontrol negatif.

Kata Kunci : *Ruditapes philippinarum*, *Vibrio tapetis*, *In Vitro*

Abstract - *Vibrio splendidus* is the causative agent of *Brown Ring Disease* (BRD). This bacterium affects the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. A strain of *V. splendidus* was obtained from LBCM. The bacterium was characterized its ability to form biofilms *in vitro*. This study was designed to evaluate the virulence of *V. splendidus* strain using *in vitro* assays to the *R. philippinarum*. In *in vitro* assay, we found clam hemocytes lose their filopods and become rounded, indicating cytotoxic activity of the bacteria. To quantify this cytotoxicity, several *flow cytometry* tests such as adherence test and phagocytosis test, and *reactive oxygen species* (ROS) were used. To compare the cytotoxicity degree, 2 bacteria strains of *V. tapetis* that pathogenic to bivalves and the mutant bacteria were tested. The results of this study showed that *V. splendidus*, showed lower cytotoxicity degree compared to *Vibrio tapetis* as positive control and compared to the normal control.

Keywords : *Ruditapes philippinarum*, *Vibrio tapetis*, *In Vitro*

I. PENDAHULUAN

Kerang manila (*Ruditapes philippinarum*), merupakan jenis kerang yang banyak dibudidayakan di Prancis, diintroduksi ke Prancis sekitar tahun 1970. Jenis kerang ini berkembang dengan pesat ke seluruh bagian Prancis setelahnya. Walaupun sudah dibudidayakan dan dikembangkan dengan sangat baik, permasalahan dengan penyakit turut menyertai proses budidaya yang dilakukan. Salah satu jenis penyakit yang kerap muncul adalah sindrom *Brown*

Ring Disease (BRD). Penyakit ini pertama kali muncul pada tahun 1987 di Inggris (Paillard *et al.*, 1994). Sejak saat itu, produksi kerang seringkali terjangkit vibriosis. Vibriosis ini dapat menyebabkan kematian yang tinggi pada pengembangan juvenil kerang (Figueras *et al.* 2000).

Agen penyebab BRD, *Vibrio tapetis* ditemukan sebagai penyebab utama penyakit ini. Bakteri ini pertama kali diisolasi di Landeda (Finistere Utara, Prancis). Pada masa awal ditemukan bakteri ini dinamakan *Vibrio Predominant 1* atau VP1 (Paillard dan Maes,

1990). *V. tapetis* sangat virulen terhadap kerang dan menyebabkan kematian yang tinggi pada budidaya kerang. Kehadiran bakteri vibrio pada kerang dapat diidentifikasi dengan munculnya lapisan coklat yang berada di ujung *body* kerang dan garis palial (Paillard *et al.*, 1994).

Karakterisasi strain *V. tapetis* berupa gram-negatif, fermentative, non-sporulasi, berbentuk batang melengkung, dan oksidatif-positif. Spesies ini akan tumbuh dengan baik pada suhu 4°C hingga 22°C. Pertumbuhan tidak akan terjadi pada suhu lebih dari 22°C dan pada salinitas lebih dari 5% NaCl (Paillard dan Maes, 1990)

Sindrom BRD ditemukan pada cakupan yang luas di Eropa. Tidak hanya di Eropa, hasil penelitian juga menunjukkan bahwa BRD juga ditemukan di Asia, yakni di Jepang (Matsuyama *et al.*, 2010). Lebih jauh lagi, BRD dapat menyebabkan tingkat mortalitas yang tinggi di pemijahan dan budidaya kerang. Namun bagaimanapun, kemungkinan kerang untuk dapat bertahan dari penyakit ini masih ada (Paillard *et al.*, 2004). Proses resistensi ini terjadi dengan kerang mengenkapsulasi bakteri yang menyebabkan lapisan coklat pada tubuh kerang dan kerang akan memperbaiki cangkangnya yang terpapar dan meninggalkan bintik coklat. Berbeda jenis kerang akan menghasilkan kemampuan yang berbeda untuk memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh *Vibrio* (Trinkler *et al.*, 2011). Pada jurnal ini, kami melaporkan hasil uji coba *in vitro* yang dilakukan pada bakteri jenis *Vibrio splendidus* sebagai penyebab *Brown Ring Disease* pada kerang *R. philippinarum*.

II. MATERI DAN METODE

2.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah kerang manila dewasa (Panjang anteroposterior: 15-

20mm) yang didapatkan dari budidaya kerang di Marenes, Prancis. Kerang dipelihara terlebih dahulu selama satu minggu sebelum eksperimen dilakukan pada wadah 500L dengan air laut mengalir dan diberikan aerasi (salinitas 34, suhu 13°C).

2.2 Bakteri

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini diisolasi dari kerang dan ikan yang terjangkit BRD dari berbagai waktu dan tempat. Strain yang diteliti adalah *V. splendidus* (ATCC 25914) (Choquet, 2004). *Filtered Sterile Sea Water* (FSSW) digunakan sebagai kontrol normal. Sementara strain CECT4600 (Paillard, 1990) digunakan sebagai kontrol positif. Isolat yang digunakan telah dikarakterisasi menggunakan metode molekular dan/atau metode fenotip.

Sel yang diujicobakan dikultur semalam dengan suhu 18°C pada media Zobell. Pemanenan dilakukan dengan sentrifugasi pada kecepatan 2500rpm selama 10 menit dan suhu 4°C. Pembilasan dilakukan dua hingga tiga kali dengan menggunakan FSSW. Konsentrasi bakteri dihitung dengan spektrofotometer pada 492nm *optical density*. Setelah dihitung, larutan bakteri akan di *re-suspended* menggunakan FSSW untuk mendapatkan rasio bakteri pada hemosit untuk percobaan dengan konsentrasi 25x total hemolim.

2.3 Uji Aderensi

Uji aderensi dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk tiap tes. Metode dijalankan dengan menginkubasi 100µl larutan bakteri pada 100µl hemolim di 24-well microplates (Choquet *et al.*, 2003). Konsentrasi bakteri yang digunakan sebanyak 25 kali jumlah hemosit untuk tiap strain. Waktu inkubasi untuk larutan tersebut dilakukan selama 180 menit pada kondisi gelap di suhu 18°C. Setelah dilakukan inkubasi, ditambahkan

formalin 6% dengan jumlah yang sama untuk larutan (v/v) untuk menghentikan pertumbuhan bakteri, supernatan kemudian dipindahkan ke *cytometry tube*. Jumlah hemosit bakteri yang terdapat pada supernatan dihitung dengan *flow cytometry*. Hasil yang ditunjukkan berupa rasio sel non-aderen. Jumlah non-aderen bakteri dibagi dengan jumlah sel yang diinkubasi menggunakan FSSW. Nilai rasio sel lebih dari 1 menunjukkan aktifitas sitotoksik bakteri yang diuji.

2.4 Uji Fagositosis

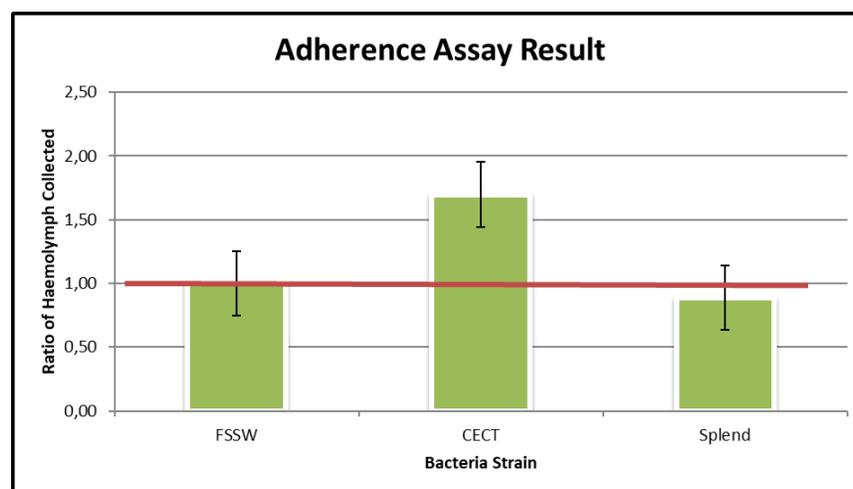
Tes fagositosis dilakukan sebanyak tiga kali ulangan per sampel dengan menggunakan manik fluoresen (TM Fluoresbrite plain YG 2.0-microns microspheres 2.5% solids-latex (Polysciences, Inc., Warrington, PA 18976). Partikel manik ditambahkan pada larutan hemolim bakteri dengan rasio 9:10:1 (Manik:Hemolim:Bakteri) (Delaporte *et al*, 2003). Kontrol yang diuji menggunakan

FSSW. Setelah inkubasi di kegelapan selama 120 jam pada suhu 18°C, larutan dipindahkan ke *flow cytometry* untuk dilakukan tes fagositosis. Pada *flow cytometry*, FSC (*Forward Light Scatter*) diset pada 118 dan SSC (*Side Light Scatter*) di set pada 300. Distribusi seluler di plot pada *dot-plot*. FSC menunjukkan basis ukuran sel sementara SSC untuk menilai kompleksitas dan granularitas sel.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Uji Aderensi

Nilai rata-rata dari rasio sel non-aderen dari masing-masing isolate dengan ulangan sebanyak 3 kali ditunjukkan pada Gambar 1. Jika nilai rasio dibandingkan dengan FSSW sebagai kontrol normal >1, itu artinya terdapat efek aderen dari bakteri terhadap hemosit kerang. Sebaliknya, bila nilai <1 itu artinya tidak ditemukan efek aderen pada hemosit kerang yang disebabkan oleh bakteri.



Gambar 1. Nilai Aderensi Tes

Berdasarkan grafik yang ditampilkan, dapat dilihat bahwa rata-rata nilai dari percobaan aderensi yang dihasilkan oleh *Vibrio splendidus* nilainya lebih kecil dari kontrol normal. Sebaliknya dari kontrol positif, strain CECT4600 bernilai sangat

tinggi disebabkan oleh efek aderensi yang begitu besar terhadap hemosit kerang.

V. splendidus tidak bersifat sitotoksik bila dibandingkan dengan CECT4600 sebagai kontrol positif dan FSSW sebagai kontrol normal. Nilai yang dihasilkan lebih rendah

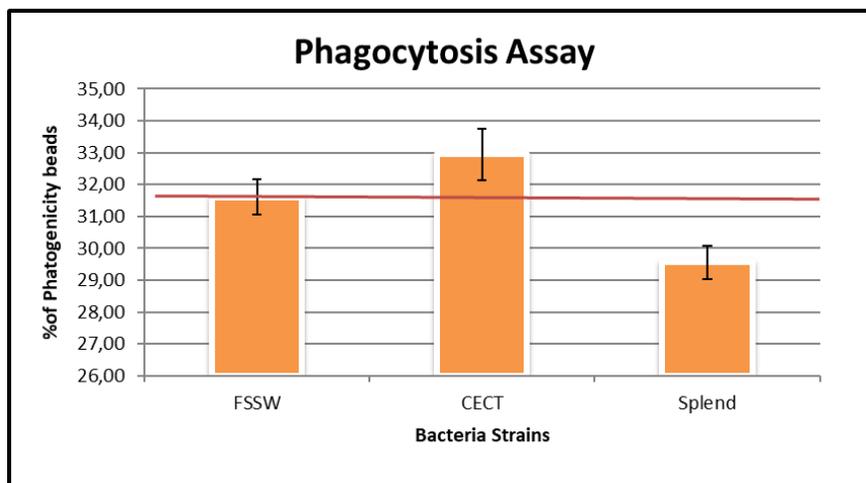
dari kontrol normal. Itu menandakan bahwa aktivitas bakteri pada hemosit kerang tidak begitu besar. Penjelasan lain, dapat disimpulkan bahwa *V. splendidus* pada kondisi penelitian ini tidak dapat menginduksi *Brown Ring Disease* (BRD) pada kerang manila.

Vibrio tapetis dapat menyebabkan hemosit kehilangan kemampuan aderen. Namun spesies *Vibrio splendidus* tidak menunjukkan hal yang demikian pada penelitian ini. Mekanisme ini berlaku untuk hewan vertebrata dan invertebrate. Beberapa kasus menunjukkan bahwa beberapa jenis

virus dapat menjadi ancaman bagi satu spesies tertentu sementara tidak berbahaya pada spesies yang lain. Hal ini berlaku juga pada kerang manila (*Ruditapes philippinarum*) (Lane dan Birkbeck, 2000).

3.2 Uji Fagositosis

Nilai rata-rata hasil dari uji fagositosis yang dilakukan berupa nilai *M3% Gated Mean* yang menunjukkan tingkat fagositosis dari manik hemosit kerang yang terinfeksi oleh bakteri yang diujikan. Pada Gambar 2. Nilai yang diperoleh adalah sebagai berikut:



Grafik 1 Nilai Fagositosis Tes

Berdasarkan nilai yang diperoleh dari uji fagositosis yang dilakukan, diambil kesimpulan bahwa tingkat infeksi oleh bakteri *V. splendidus* lebih rendah dibandingkan kontrol normal. Sementara nilai infeksi yang disebabkan oleh strain CECT4600 menunjukkan tingkat fagositosis yang sangat tinggi. Jenis bakteri yang menginfeksi hemosit meningkatkan jumlah manik yang difagositosis oleh hemosit. Nilai yang ditunjukkan oleh *V. splendidus* pada uji fagositosis tersebut lebih rendah dari kontrol normal. Hal ini menunjukkan bahwa strain bakteri tersebut dapat menekan jumlah manik yang difagositosis oleh hemosit.

Tingkat sitotoksisitas dari *V. tapetis* strain CECT4600 yang tinggi menunjukkan adanya perubahan morfologi dari hemosit kerang.

Adanya perubahan jumlah dari hemosit, jumlah sel, serta perlambatan metabolisme oksidatif. Berkebalikan dari nilai tersebut, *V. splendidus* menunjukkan hal yang bertolak belakang. Berdasarkan nilai tersebut, level toksisitas yang disebabkan oleh *V. splendidus* jauh lebih rendah dibandingkan dengan strain CECT4600 sebagai kontrol positif maupun dari kontrol normal yaitu FSSW.

Hemosit berhubungan dengan komponen besar dari proses homeostasis kekerangan. Hemosit bertanggung jawab atas peran mekanisme fisiologis dalam tubuh kerang.

Antara lain adalah pertahanan diri, perbaikan jaringan tubuh, transpor nutrient, dan juga mekanisme *self-purification* dari polutan biotik maupun abiotik (Donaghy *et al*, 2009).

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

1. Karakterisasi tingkat virulensi yang diujicobakan pada strain *Vibrio splendidus* terhadap kerang manila (*Ruditapes philippinarumi*) menunjukkan hasil bahwa tingkat virulensi yang disebabkan lebih rendah dari kontrol positif dan normal. Penelitian ini juga menghasilkan perspektif baru dalam hal proses infeksi bakteri terhadap kerang secara *in vitro*.
2. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa *V. splendidus* dimungkinkan untuk menyerang dan menjadi agensia penyebab sindrom *Brown Ring Disease* (BRD) pada kerang manila dalam tingkat yang rendah. Dibuktikan dari uji aderensi dan tingkat sitotoksik yang rendah dibandingkan dengan kontrol normal dan kontrol positif. Tingkat rendah ini menunjukkan bahwa kemungkinan terjadinya kematian pada kerang oleh infeksi yang disebabkan oleh *V. splendidus* tidak tinggi. Selain itu, hasil infeksi *V. splendidus* tidak menunjukkan adanya perubahan morfologis pada hemosit kerang.

4.2 Saran

Beberapa jenis *Vibrio tapetis* lain harus diujicobakan demi didapatkannya pemahaman yang lebih komprehensif. Utamanya pada proses pengevaluasian proses biofilm dan akibat yang terjadi pada perkembangan BRD yang disebabkan oleh bakteri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti secara khusus mengucapkan terima kasih kepada Christine PAILLARD dari Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), Plouzané, France, kemudian Alain DUFOUR dari Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM), Lorient, France, serta Gaëlle RICHARD atas dukungan serta bimbingan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Choquet G. (2004) Pathogénie de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde : Approche cellulaire et moléculaire. Thèse de doctorat. Université de Brest
- Delaporte M., Soudant P., Moal J., Lambert C., Quere C., Miner P., and Samain J. (2003) Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species--*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal Of Experimental Biology*, 17, 3053
- Donaghy L., Lambert C., Choi K.S., and Soudant P. (2009) Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects. *Aquaculture*, 297, 10-24
- Figueras, A., J. A. Robledo, and B. Novoa. 1996. Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. *J. Shellfish Res.* 15:363-368
- Lambert C., Soudant P., Choquet G., and Paillard C. (2003) Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & Shellfish Immunology*, 15(3), 225-240

- Lane E. and Birkbeck T.H. (2000) Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *J. Fish Dis.* 23, 275-279
- Matsuyama. T., Sakai. T., Kiryu I., Yuasa K., Yasunobu H., Kawamura Y., & Sano M. (2010) First isolation of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of Brown Ring Disease (BRD), in Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in Japan. *魚病研究*, 45(2), 77-79
- Paillard C., Allam B., Oubella R.. (2004) Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Disease of Aquatic Organisms*, 59, 249–262
- Paillard C. and Maes P. (1990) Etiologie de la maladie de l’anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d’un *Vibrio* sp. *C R Acad Sci Paris, Ser III, Sci Vie*, 310, 15–20
- Paillard C. Maes P, Oubella R., (1994) Brown ring disease in clams. *Annu Rev Fish Dis*, 4, 219–240
- Trinkler N., Bardeau J.-F., Marin F., Labonne M., Jolivet A., Crassous P., Paillard C., (2011) Mineral phase in shell repair of Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by Brown Ring Disease. *Disease of Aquatic Organisms*, 93, 149–162.

Article Info :

Received : 28-02-2023

Accepted : 15-03-2023