

Bakteri yang Berasosiasi dengan Karang Keras yang Terinfeksi Penyakit *White Syndrome* di Perairan Sawopudo, Sulawesi Tenggara, Indonesia

Ratna Diyah Palupi^{1,4}, Aninditia Sabdaningsih², Diah Ayuningrum², Agus Sabdono^{3*}

¹Program Doktor Manajemen Sumber Daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

²Departemen Manajemen Sumber Daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

³Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Jacub Rais, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275, Indonesia

⁴Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Halu Oleo
Jl. Kampus Hijau Bumi Tridharma Anduonohu, Kendari 93232, Sulawesi Tenggara, Indonesia
Email: agus_sabdono@yahoo.com

Abstract

Characterization of hard coral associated bacteria-infected with *White Syndrome* Disease in Sawopudo Waters, Southeast Sulawesi, Indonesia

Coral disease is one of the most significant factors contributing to coral mortality, leading to a reduction in coral cover. The direct causes of coral disease remain a subject of ongoing investigation by researchers at both national and international levels. There is a relationship between corals and microbes that form the coral holobiont, which can be beneficial, harmful, or neutral. This study aims to isolate, purify, and identify bacteria associated with corals infected with white syndrome (WS) at the molecular level through 16S rRNA gene amplification. Coral samples infected with WS were collected from the Sawopudo Waters in Southeast Sulawesi using purposive sampling through snorkeling. The coral life forms sampled included massive, sub-massive, and branching types, collected from approximately three different colonies. Bacterial analysis associated with WS coral disease was conducted in the laboratory, initially with isolation using the spread plate method and purification through quadrant streaking on peptone, yeast, and agar media. Once pure bacterial colonies were obtained, the bacterial isolates associated with WS-infected corals were injected into healthy corals using laboratory-scale Koch's postulates. The results showed 8 (eight) bacterial isolates associated with WS-infected corals (SWS01, SWS02, SWS03, SWS04, SWS05, SWS06, SWS07, and SWS08). Based on Koch's postulates, isolates SWS01 and SWS07 exhibited visual signs of WS disease. Further isolation and purification were only conducted on isolate SWS01. Molecular identification using 16S rRNA gene amplification revealed that isolate SWS01 is closely related to *Priestia flexa* (99.72% similarity), isolate SWS07 is closely related to *Bacillus velezensis* (99.68% similarity), and the re-cultured isolate from Koch's postulates is closely related to *Alteromonas macleodii* (99.64% similarity).

Keywords : *Alteromonas macleodii*; *Bacillus velezensis*; Coral Disease; Photogenic Bacteria; *Priestia flexa*

Abstrak

Penyakit karang adalah salah satu faktor terpenting penyebab kematian karang dan dapat menurunkan tutupan karang. Penyebab langsung penyakit karang hingga saat ini masih terus dicari oleh para peneliti baik skala nasional maupun internasional. Terdapat hubungan antara karang dengan mikrobia yang membentuk *coral holobiont* yang dapat bersifat menguntungkan, merugikan, dan netral. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, memurnikan, dan mengidentifikasi bakteri yang berasosiasi dengan karang terinfeksi *white syndrome* (WS) secara molekuler dengan amplifikasi gen 16S rRNA. Sampel karang terinfeksi WS diambil di Perairan Sawopudo-Sulawesi Tenggara dengan metode *purposive sampling* melalui snorkeling. Bentuk pertumbuhan karang yang diambil sebagai sampel adalah *massive*, *sub massive*, dan *branching* yang diambil dari 3 koloni yang berbeda. Analisis bakteri asosiasi karang terinfeksi WS dilakukan di laboratorium dimulai dengan isolasi dengan metode sebar dan purifikasi dengan metode gores kuadran pada media pepton, yeast, dan agar. Setelah diperoleh koloni murni, isolat bakteri yang berasosiasi dengan karang WS diinjeksikan ke karang sehat menggunakan uji Postulat Koch skala laboratorium. Hasil dari penelitian ini adalah ditemukannya 8 (delapan) isolat bakteri yang berasosiasi dengan karang terinfeksi WS dengan kode isolat S.WS.01, S.WS.02, S.WS.03, S.WS.04, S.WS.05, S.WS.06, S.WS.07, dan S.WS.08. Uji Postulat Koch tidak berhasil dalam penelitian ini, akan tetapi isolat bakteri S.WS.01 dan S.WS.07 menunjukkan tanda-tanda penyakit WS secara visual pada saat uji Postulat Koch. Setelah dilakukan identifikasi molekuler menggunakan amplifikasi gen 16S rRNA, isolat S.WS.01 berkerabat dekat dengan *Priestia flexa* (99,72% kemiripan), isolat S.WS.07 berkerabat dekat dengan *Bacillus velezensis* (99,68% kemiripan), dan untuk isolat hasil kultur kembali dari Postulat Koch berkerabat dekat dengan *Alteromonas macleodii* (99,64% kemiripan).

Kata kunci: *Alteromonas macleodii*; *Bacillus velezensis*; Bakteri Patogen; Penyakit Karang; *Priestia flexa*

PENDAHULUAN

Penyakit karang pada masa sekarang ini merupakan salah satu penyebab utama kerusakan karang (Walker *et al.*, 2021; Zakaria *et al.*, 2021). Fenomena ini menjadi perhatian khusus peneliti karang di seluruh dunia. Hal tersebut dikarenakan mayoritas kematian karang bersumber dari penyakit karang yang mewabah (Greene *et al.*, 2020; Thome *et al.*, 2021). Kasus mewabahnya penyakit karang pernah terjadi di Perairan Meksiko, dimana rata-rata kehilangan jaringan karang akibat penyakit *White Syndrome* (WS) sebesar 7,8-10,8 cm² dalam waktu satu tahun (Thome *et al.*, 2021). Penyakit WS diketahui sebagai penyakit yang mempunyai tingkat kematian tinggi (Precht *et al.*, 2016). Penyakit WS merupakan istilah yang biasa digunakan di Perairan Indo-Pasifik terhadap beberapa penyakit yang menggambarkan hilangnya jaringan karang secara akut dan cepat (Greene *et al.*, 2020). Penyakit WS dapat berupa penyakit *White Plague* (WP), *Ulcerative White Spot* (UWS), *White Pox* atau *White Patch*, maupun *Stony Coral Tissue Loss Disease* (SCTLD) (Work *et al.*, 2012; Thome *et al.*, 2021).

Beberapa kasus kejadian penyakit karang di Indonesia nilai prevalensinya menunjukkan hasil sudah mulai mengkhawatirkan. Tercatat penelitian di Perairan Lembata, Nusa Tenggara Timur (NTT) menyebutkan nilai prevalensi penyakit dan gangguan kesehatan karang sebesar 42% (Abrar *et al.*, 2012), di Kessilampe, Kendari-Sulawesi Tenggara sebesar 15% (Palupi *et al.*, 2018), dan di Perairan Pulau Panjang, Jepara-Jawa Tengah telah mencapai 74,37% (Sabdonno *et al.*, 2015). Berdasarkan data tersebut, beberapa penelitian mengungkapkan nilai prevalensi penyakit WS selalu menunjukkan hasil dominansi (urutan pertama). Sebagai contoh, hasil prevalensi penyakit WS di Pantai Mayaria, Kessilampe, Kendari sebesar 4,3% (Palupi *et al.*, 2018), Perairan Langara, Konawe Kepulauan sebesar 13% (Hasma *et al.*, 2019), dan Perairan Waworaha, Konawe Selatan sebesar 10% (Muhammad, 2010).

Mekanisme infeksi biota karang oleh penyakit, salah satunya disebabkan karena infeksi bakteri patogen (Pamungkas *et al.*, 2014). Identifikasi bakteri patogen sebagai agen penyebab langsung biota karang merupakan tantangan tersendiri bagi peneliti karang. Hal tersebut dikarenakan penyakit karang dapat timbul dikarenakan beberapa *stressor*, yaitu karena mikroorganisme patogen, hewan asosiasi yang hidup pada karang sebagai pembawa penyakit, maupun pengaruh lingkungan (Sutherland *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2023). Sebagai contoh isu sampah plastik dan limbah manusia atau domestik juga dapat menyebabkan munculnya penyakit pada karang (Muhammad *et al.*, 2021; Young *et al.*, 2023).

Penelitian tentang agen penyebab langsung untuk beberapa jenis penyakit karang telah ditemukan dan terjadi sangat dinamis. Hal tersebut dikarenakan jenis penyakit yang sama dengan lokasi yang berbeda sangat dimungkinkan penyebabnya akan berbeda pula (jenis bakteri patogennya) (Work *et al.*, 2012). Contohnya bakteri *Vibrio* sp. diketahui sebagai penyebab penyakit WS yang banyak menyerang karang genera *Turbinaria*, *Acropora*, *Goniastrea*, *Pocillopora*, *Porites*, *Pavona*, *Stylophora*, *Montipora*, dan *Faviidae* di Teluk Mexico, akan tetapi jenis bakterinya masih belum diketahui secara pasti (Castañeda-Chávez *et al.*, 2018).

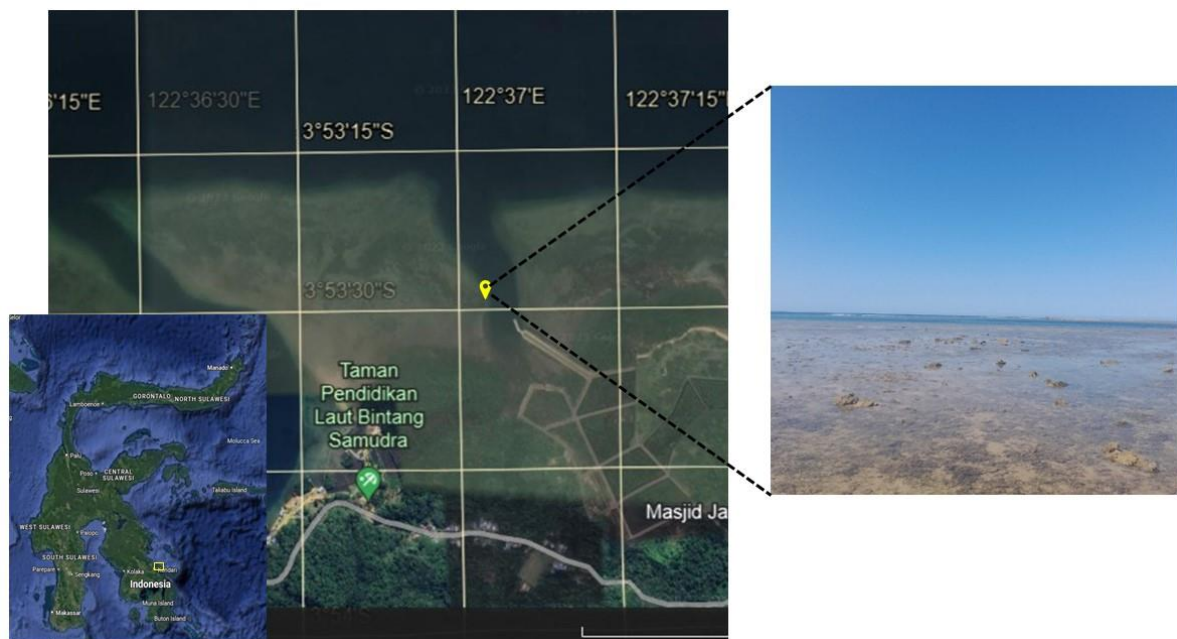
Pentingnya mengetahui jenis agen penyebab langsung penyakit karang akan sangat berguna dalam manajemen terumbu karang dari sisi pencegahan dan pengobatan penyakit karang. Di sisi lain, penelitian mengenai penanggulangan penyakit karang dilihat dari aspek mikrobiologi masih jarang dilakukan, khususnya di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan bakteri asosiasi karang terinfeksi penyakit WS dari segi biomolekuler di Perairan Sawopudo, Sulawesi Tenggara-Indonesia.

MATERI DAN METODE

Pengambilan sampel karang terinfeksi WS dilakukan pada bulan Juli 2023 di Perairan Sawopudo, Kecamatan Soropia, Kabupaten Konawe, Sulawesi Tenggara tepatnya di area resort

Taman Pendidikan Laut Bintang Samudera (Gambar 1). Sampel karang kemudian dianalisa di Laboratorium Produktifitas Lingkungan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Halu Oleo untuk tujuan isolasi, purifikasi, dan uji Postulat Koch. Selanjutnya isolat yang memenuhi kriteria uji Postulat Koch selanjutnya dianalisis berdasarkan identifikasi molekuler 16S rRNA di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Borneo Tarakan-Kalimantan Timur.

Pengambilan fragmen karang dilakukan dengan cara snorkeling pada daerah *reef flat* saat surut terendah (kedalaman perairan kurang lebih 100 cm). Fragmen karang diambil dari beberapa jenis bentuk pertumbuhan karang yang terinfeksi WS (*massive*, *sub massive*, dan *branching*) (Gambar 2). Sampel karang diambil kurang lebih 1-2 cm dari 3 koloni yang berbeda sebagai ulangan. Penyakit WS dapat dikategorikan sebagai *White Pox* atau *White Patch* (lesi berwarna putih berdiameter 1-8cm), *White Plague* tipe 1, 2, dan 3 (lesi berwarna putih di atas, bawah, dan samping dengan bentuk beraturan mengikuti morfologi karang), serta *Stony Coral Tissue Loss Disease* (SCTLD) yaitu warna putih kehilangan jaringan skeleton dengan lesi tak beraturan (Raymundo *et al.*, 2008).



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel karang di Perairan Sawopudo, Kabupaten Konawe, Sulawesi Tenggara



Gambar 2. Karang terinfeksi WS di Perairan Sawopudo, Kabupaten Konawe, Sulawesi Tenggara (infeksi WS ditunjukkan dengan skeleton karang berwarna putih yang ditunjukkan dengan anak panah)

Selain sampel karang terinfeksi, diambil juga sampel karang sehat guna uji Postulat Koch. Sampel karang sehat diambil di perairan yang sama dengan karang terinfeksi. Masing-masing sampel karang diambil kurang lebih berdiameter 5 cm (Thome *et al.*, 2021) dari 2 (dua) koloni karang yang berbeda sebagai ulangan. Pengambilan fragmen karang dilakukan dengan menggunakan alat bantu palu dan tatah. Pengambilan sampel karang sehat dilakukan di hari yang berbeda dengan karang terinfeksi, yaitu setelah didapatkan kultur murni bakteri asosiasi karang terinfeksi WS.

Perlakuan pengambilan sampel karang di perairan yaitu dimasukkan dalam plastik sampel (*ziplock*) yang diisi dengan air laut. Selanjutnya semua karang dimasukkan kedalam *cool box* yang sebelumnya telah diberi es (Zhenyu *et al.*, 2013). Fungsi dari pemberian es batu adalah untuk menurunkan metabolisme karang sehingga karang tidak stress selama perjalanan menuju laboratorium serta menekan pertumbuhan bakteri yang berasosiasi dengan karang tersebut.

Isolasi dan kultur bakteri asosiasi karang terinfeksi WS

Sebelum dilakukan isolasi bakteri, semua sampel karang terinfeksi WS dibilas menggunakan air laut steril untuk menghilangkan kotoran yang menempel di karang tersebut (Zhenyu *et al.*, 2013). Isolasi bakteri asosiasi karang terinfeksi WS dilakukan dengan cara pengambilan jaringan karang sekitar 2-3 cm pada zona transisi antara jaringan hidup dan kerangka yang terkena WS (Brown *et al.*, 2021). Tujuannya untuk mendapatkan variasi mikroorganisme dan biasanya menjadi tempat bakteri patogen berkembang. Kegiatan ini dilakukan secara hati-hati dan aseptik. Selanjutnya sampel karang dihaluskan menggunakan alat *mortal* dan *pestle*. Bagian karang yang diambil adalah bagian permukaan karang sampai dengan kerangka karang (jaringan tissue dan skeleton) (Zhenyu *et al.*, 2013).

Media bakteri yang digunakan pada saat isolasi adalah campuran pepton, yeast, dan agar, dengan komposisi per 1 L media sebagai berikut: pepton 5 gram, yeast 1 gram, agar 15 gram dan air laut 1 L. Metode yang digunakan dalam isolasi bakteri adalah metode sebar (*spread method*) dengan menggunakan alat *spreader* (Amalia *et al.*, 2021). Sampel karang terinfeksi WS diambil sebanyak 1 gr dan dilakukan serangkaian pengenceran menggunakan air laut steril. Pengenceran dilakukan sebanyak 7 kali (10^{-1} sd. 10^{-7}). Selanjutnya penanaman bakteri menggunakan 5 pengenceran terakhir (10^{-3} sd. 10^{-7}). Setiap seri pengenceran tersebut diambil 100 μ L sampel menggunakan mikropipet dan disebarkan ke dalam media agar. Selanjutnya diratakan menggunakan *spreader* dan diinkubasi selama minimal 2 x 24 jam pada suhu ruang. Pengamatan terhadap koloni bakteri yang tumbuh dicatat dari segi bentuk, warna, pinggiran, dan permukaan.

Tahapan kedua adalah purifikasi atau pemurnian bakteri. Tahapan ini bertujuan untuk mendapatkan kultur murni dari bakteri karang. Metode yang digunakan adalah metode goresan (*streak method*) (Amalia *et al.*, 2021). Masing-masing bakteri yang tumbuh dari koloni berbeda dipurifikasi kembali dengan metode gores kuadran sampai muncul satu warna (warna yang sama dengan koloni asal) dan koloni tunggal. Biakan bakteri yang sudah murni selanjutnya dikultur dalam media cawan dan media miring dalam tabung reaksi.

Identifikasi bakteri penyebab langsung penyakit WS dengan Uji Postulat Koch

Empat kriteria Postulat Koch yang harus terpenuhi dalam penelitian ini yaitu 1). Mikroba harus ditemukan di semua kasus penyakit, tetapi tidak pada organisme yang sehat; 2). Mikroba harus diisolasi dari individu yang sakit dan ditumbuhkan dalam kultur murni; 3). Organisme yang diisolasi harus menyebabkan penyakit pada individu yang sehat; dan 4). Mikroba harus diisolasi ulang dan diidentifikasi kembali sebagai agen penyebab asli (Todd & Peters, 2019).

Postulat Koch dilakukan dengan cara bakteri murni asosiasi karang terinfeksi WS dikultur kembali dalam media cair (pepton dan yeast) untuk diinokulasi terhadap karang sehat skala laboratorium dengan metode *syringe eksitu* (disuntik). Pembuatan media cair dengan cara

mengambil 1 ose bakteri murni dan diinokulasi pada 5 mL media cair untuk selanjutnya dishaker selama 1 x 24 jam. Biakan bakteri selanjutnya diambil 2 mL dan ditambahkan kedalam media cair 25 mL sebagai proses pengenceran. Selanjutnya kepadatan bakteri diukur hingga setara dengan 0,5 Mc Farland.

Karang uji berupa karang sehat diambil di perairan yang sama dimana karang terinfeksi diambil (Perairan Sawopudo). Karang sehat merupakan karang tanpa penyakit yang diambil dari bentuk pertumbuhan *acropora branching*, *digitata*, *massive*, dan *foliose* sekitar 2-3 cm. Perlakuan pengambilan sampel karang sehat sampai ke laboratorium dilakukan dengan cara yang sama dengan pengambilan karang terinfeksi. Setelah sampel karang sampai di laboratorium, sampel karang diaklimatisasi terlebih dahulu dalam bak penampungan selama 3 x 24 jam sebelum dimasukkan dalam akuarium uji (sampai proses pengeluaran lendir pada karang berhenti). Selanjutnya sampel karang uji dipindahkan ke dalam akuarium air laut yang lebih kecil guna pengujian Postulat Koch. Selama pengujian, akuarium diletakkan *indoor* dengan cahaya matahari masih bisa masuk ke dalam ruangan. Hal tersebut dimaksudkan agar simbiosis karang masih memungkinkan melakukan proses fotosintesis.

Penyuntikan isolat bakteri dilakukan dengan cara karang uji diambil dari akuarium dan diletakkan dalam cawan petri steril. Penyuntikan dilakukan dengan terlebih dahulu karang dilukai menggunakan pisau steril kemudian disuntik dengan isolat yang mengandung biakan bakteri asosiasi karang terinfeksi WS sebanyak 2 mL (proses tersebut dilakukan secara aseptik). Setelah karang uji disuntik, dibiarkan beberapa saat dalam cawan petri sebelum dikembalikan kembali dalam akuarium.

Pengamatan terhadap karang uji dilakukan setiap hari sampai terdapat tanda-tanda penyakit WS muncul. Jika terdapat tanda-tanda penyakit WS maka bakteri tersebut positif sebagai agen pembawa penyakit. Tahapan selanjutnya dilakukan reisolasi dan purifikasi kembali. Biakan bakteri murni dalam uji Postulat Koch selanjutnya dilakukan uji biomolekuler untuk mendapatkan jenis bakteri patogen melalui uji DNA (PCR dan sequencing).

Sampel uji berupa isolat bakteri positif penyakit WS menjalani proses ekstraksi DNA genomik, menggunakan kit ekstraksi ADN genomik (Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit) yang disediakan oleh Geneaid yang dilakukan di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Borneo Tarakan Kalimantan Timur. Identifikasi strain bakteri kemudian dilakukan melalui analisis gen 16S rRNA. Amplifikasi gen dilakukan dengan aplikasi primers 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTACCTGTACGACTT3') (Pauter *et al.*, 2022; Owoseni *et al.*, 2023), difasilitasi oleh penggunaan PCR Kit dan MyTaq Red Mix dari Bioline. Komposisi PCR terdiri dari volume total sebesar 35 µL, vol. PCR mix sebesar 17.5 µL, vol. Primer 1492R sebesar 1 µL, vol. Primer 27F sebesar 1 µL, vol. DNA Template sebesar 2 µL, dan vol. Nuclease free water sebesar 13.5 µL (Sumarlin *et al.*, 2024).

Prosedur PCR dilakukan dengan protokol sebagai berikut predenaturasi pada suhu 94°C selama 4 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 20 detik, penempelan pada suhu 51°C untuk 30 detik; dan perpanjangan pada 72°C selama 30 detik. Urutan ini diulang secara hati-hati dan teliti selama 30 siklus, berakhir dalam fase pendinginan akhir hingga 4°C. Setelah proses PCR, produk-produk dibersihkan menggunakan PCR purification kit (QIAquick PCR Purification Kit) yang disediakan oleh Qiagen, dan kemudian diurutkan secara komersial oleh 1st Base di Singapura. Output sekuensing diverifikasi menggunakan program SeqScanner v.2, diikuti oleh assembly untuk mencapai satu urutan primer F dan R, yang dilakukan menggunakan perangkat lunak DNA Baser (BioSoft, 2013). Identifikasi strain bakteri yang dihasilkan setelah menerapkan Blast Search pada server EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net>) (Yoon *et al.* 2017; Bibi *et al.*, 2021). Konfirmasi penyesuaian urutan gen rRNA 16S, CLUSTAL_W, yang terintegrasi dengan menggunakan perangkat lunak MEGA XI. Pohon phylogenetic kemudian dibangun berdasarkan urutan rRNA 16S menggunakan program MEGA, dikombinasikan dengan model optimal di MEGA (Tamura *et al.*, 2021).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian didapat 8 (delapan) isolat murni dari isolasi bakteri asosiasi karang terinfeksi WS (Tabel 1 dan Gambar 3). Berdasarkan karakterisasi koloninya didominasi oleh bentuk bulat, berwarna putih, dengan permukaan rata. Jumlah isolat yang ditemukan dalam penelitian ini sama dengan temuan penelitian Sawonua (2016) terhadap penyakit *Yellow Blotch Diseases* (YBL) di Perairan Pulau Panjang, Jepara, Jawa Tengah. Akan tetapi hasil penelitian ini jika dibandingkan dengan bakteri asosiasi karang terinfeksi *Brown Band Disease* (BrBD) di Perairan Karimunjawa, Jawa Tengah menunjukkan hasil lebih besar (Amalia et al., 2021).

Uji Postulat Koch dilakukan untuk mengetahui penyebab langsung penyakit WS pada karang *Scleractinia* Perairan Sawopudo, Sulawesi Tenggara. Inokulasi bakteri dilakukan terhadap 8 isolat (Tabel 1) dengan cara injeksi pada karang uji skala laboratorium. Karang yang disuntik dengan bakteri asosiasi karang terinfeksi penyakit WS beberapa menunjukkan sistem pertahanan diri, yaitu dengan mengeluarkan lapisan tipis berwarna putih yang mayoritas terjadi pada karang *massive* dan *digitata*. Penelitian Young et al., (2023) mengungkapkan bahwa karang yang diinokulasi oleh bakteri patogen penyebab penyakit akan meningkatkan ekspresi gen kekebalan tubuh, penyembuhan luka, dan proses metabolisme asam lemak. Lebih lanjut berdasarkan penelitiannya mengungkapkan bahwa karang yang diinokulasi dengan patogen akan meningkatkan produksi kolagen yang dapat mempercepat penyembuhan luka (Young et al., 2023).

Berdasarkan Uji Postulat Koch, isolat S.WS.01 dan S.WS.07 berhasil terpenuhi secara visual. Karang uji menunjukkan positif terinfeksi WS pada hari ke-8 setelah disuntik isolat SWS01. Lesi putih menyebar dan jaringan karang mengalami kematian kurang lebih sebesar 80% di hari ke-14. Isolat S.WS.07 baru menginfeksi karang uji pada hari ke-12 dengan kematian karang sebesar 74% di hari ke-14. Karang yang terinfeksi isolat SWS01 adalah dari jenis karang *Porites adrewsi* dan *Seriatopora hystrix* (Gambar 4). Selanjutnya kode isolat S.WS.01 dilanjutkan reisolasi dan repurifikasi. Hasilnya bakteri karang tumbuh dominan pada pengenceran 10^{-5} dan didapatkan 2 isolat dan salah satunya sama dengan isolat sebelumnya, yaitu SWS01 (Gambar 5). Uji DNA dilakukan terhadap 3 isolat, yaitu S.WS.01, S.WS.07, dan isolat hasil reisolasi dan repurifikasi dengan kode WSBP. Hasilnya terdapat dalam Tabel 2, yaitu isolat S.WS.01 berkerabat dengan *Priestia flexa* dengan kemiripan sebesar 99,72%, isolat S.WS.07 berkerabat dengan *Bacillus velezensis* (99,68%), dan isolat WSBP berkerabat dengan *Alteromonas macleodii* dengan tingkat kemiripan sebesar 99,64%. Berdasarkan pohon filogenetik, bakteri *Priestia flexa* dan *Bacillus velezensis* berada dalam clade yang sama, yaitu masuk dalam klaster genus *Bacillus* sp.. Sedangkan *Alteromonas macleodii* masuk dalam clade yang berbeda (Gambar 6). *Outgroup* yang digunakan dalam penentuan pohon filogenetik dari jenis *Pseudoalteromonas piscicida*.

Tabel 1. Karakterisasi Isolat Bakteri Asosiasi Karang Terinfeksi WS Hasil Isolasi di Perairan Sawopudo, Sulawesi Tenggara berdasarkan Bentuk, Warna, Tepi, dan Permukaan

No	Nama Isolat	Karakteristik			
		Bentuk	Warna	Tepi/Margin	Permukaan
1	S.WS.01	Bulat/circular	Krem	Rata/entire	Rata/flat
2	S.WS.02	Bulat/circular	Orange	Rata/entire	Rata/flat
3	S.WS.03	Bulat/circular	Putih pudar		Umbonate
4	S.WS.04	Bulat/circular	Putih perak	Rata/entire	Rata/flat
5	S.WS.05	Bulat/circular	Putih pudar	Bergelombang	Rata/flat
6	S.WS.06	Irregular	Putih tulang	Bergelombang	Rata/flat
7	S.WS.07	Irregular	Putih	Erose	Umbonate
8	S.WS.08	Filamentous	Putih	Filamentous	Rata/flat

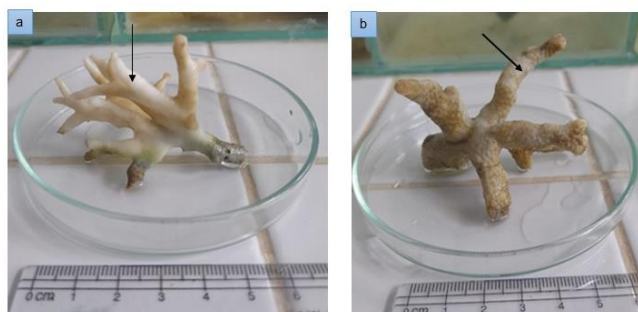
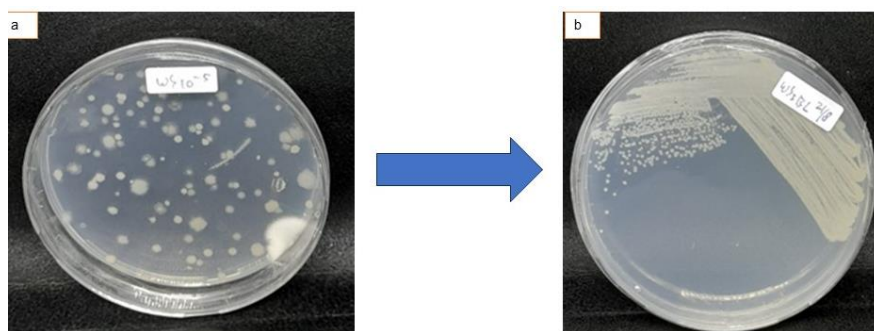
Ket: S (Sawopudo); WS (*White Syndrome*); 01, 02, ...dst (nomor kode)

Kode isolat yang dibold merupakan isolat yang positif patogen menggunakan uji postulat koch

Tabel 2. Hasil Analisis Homologi BLAST Isolat Bakteri Patogen Penyebab Penyakit WS

Sample ID	Species	Query cover (%)	Per Ident (%)	Reference Number
S.WS.01	<i>Priestia flexa</i> strain AB255	100	99,72	MT436094.1
S.WS.07	<i>Bacillus velezensis</i> strain LEM1054	100	99,68	MN242810.1
WSBP	<i>Alteromonas macleodii</i> strain HM-OE03	98	99,64	JN618128.1

Ket: isolat WSBP (isolat yang dikultur dan dipurifikasi kembali dari fragmen karang yang disuntik isolat SWS01)

**Gambar 3.** Isolat murni bakteri asosiasi karang terinfeksi WS.**Gambar 4.** Karang *Seriatopora hystrix* (a) dan *Porites andrewsi* (b) hari ke-14. Karang menunjukkan tanda-tanda penyakit WS setelah diinokulasi bakteri asosiasi karang terinfeksi WS (ditunjukkan dengan anak panah) dengan kode isolat SWS01.**Gambar 5.** Hasil reisolasi karang pada uji dari Postulat Koch(a) dan hasil Purifikasi bakteri karang isolat S.WS.01 (b) di Perairan Sawopudo, Sulawesi Tenggara.

Secara taksonomi, dua isolat yang dikultur dari alam (S.WS.01 dan S.WS.07) masuk dalam Famili Bacillaceae, Genus *Bacillus* dengan bentuk sel basil dan gram positif. Isolat dari uji Postulat Koch (WSBP) masuk dalam Famili Alteromonadaceae dan Genus *Alteromonas* dengan bentuk sel batang dan gram negatif (Bergey's, 2009). Selengkapnya sebagai berikut:

Domain : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Class : Bacilli

Order : Bacillales

Famili : Bacillaceae

Genus : *Bacillus*

Species : ***Priestia flexa***

Bacillus velezensis

Domain : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

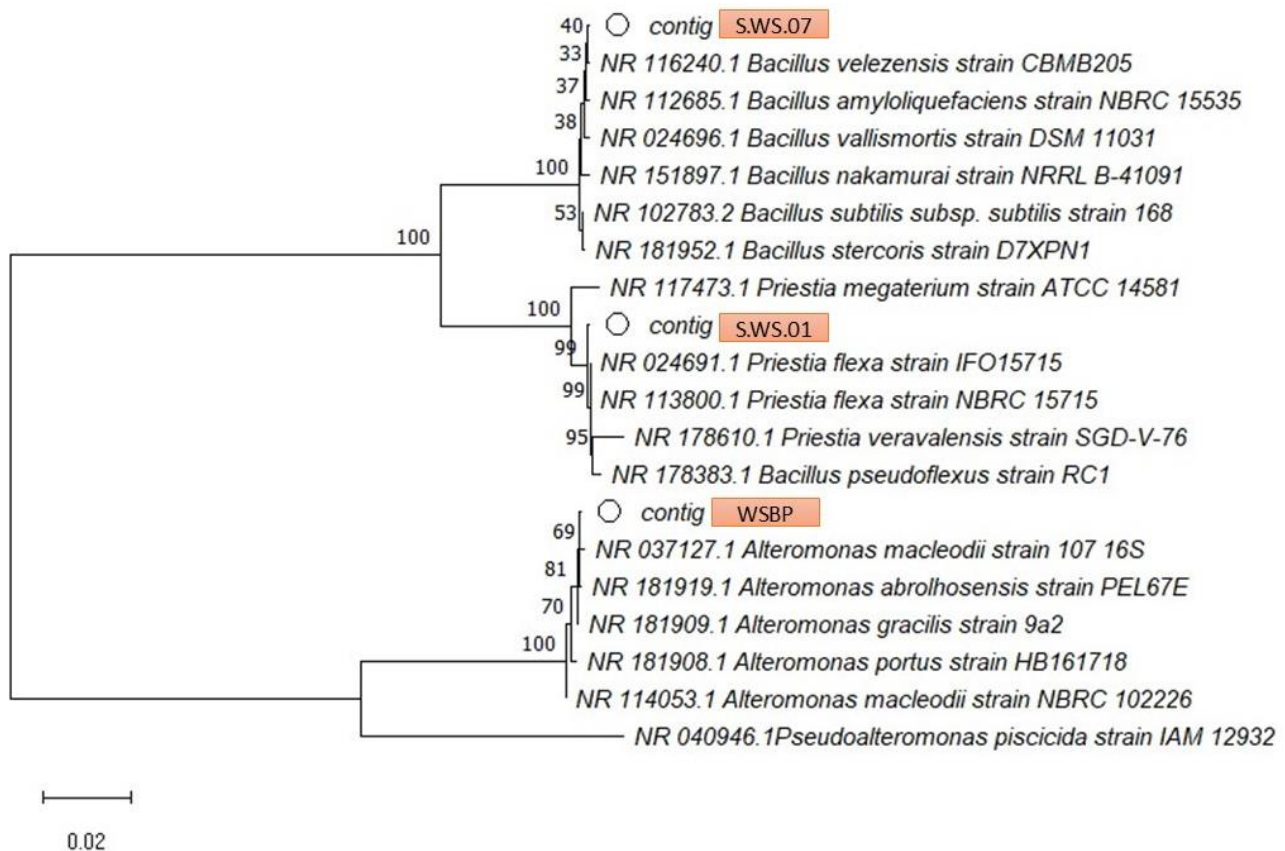
Class : Gammaproteobacteria

Order : Alteromonadales

Famili : Alteromonadaceae

Genus : *Alteromonas*

Species : ***Alteromonas macleodii***



Gambar 6. Pohon filogenetik berdasarkan analisis sekuens gen 16S rRNA isolat bakteri patogen penyakit WS (S.WS.01, S.WS.07, dan WSBP) menggunakan Pendekatan Neighbor Joining. *Pseudoalteromonas piscicida* digunakan sebagai outgroup.

Ketidakberhasilan uji Postulat Koch dalam penelitian ini dapat dikarenakan oleh beberapa sebab. Pertama, pengujian penyebab langsung suatu penyakit melalui uji Postulat Koch hampir sebagian besar dilakukan pada daerah terestrial dengan objek tanaman maupun hewan darat (Young *et al.*, 2023). Kedua, pengujian untuk sampel uji di laut khususnya penyakit karang mempunyai keterbatasan sehingga mempunyai tingkat keberhasilan yang rendah. Pengujian terhadap sampel laut harus menggunakan media air yang dipastikan air laut dan sirkulasi air dalam akuarium berlangsung secara steril. Hal ini menghindari tumbuhnya bakteri saprofitik atau bakteri yang dapat tumbuh pada jaringan yang telah mati (Badan Karantina Tumbuhan, 2008). Ketiga, diduga penyebab langsung penyakit WS pada penelitian ini bersumber dari polimikroba, sedangkan Uji Postulat Koch hanya digunakan untuk penyebab langsung dari monomikroba (Todd and Peters, 2019; Young *et al.*, 2023).

Bakteri jenis *Priestia flexa* merupakan jenis bakteri patogen yang terdapat di pasir laut (Soffritti *et al.*, 2023). Bakteri ini juga dikenal dengan jenis *Bacillus flexus* oleh *Qualified Presumption of Safety* (QPS) (Koutsoumanis *et al.*, 2022). Jenis *Bacillus* sp. di lingkungan laut dapat memiliki kandungan toksisitas yang tinggi akan tetapi dapat juga menghasilkan metabolit sebagai antimikroba dan antijamur (Gao *et al.*, 2024; Sa'adah *et al.*, 2018).

Bakteri jenis *Bacillus velezensis* banyak tersebar di lingkungan darat. Akan tetapi bakteri ini juga ditemukan pada limbah kulit udang, sehingga diduga hidup juga di lingkungan laut (Dahiya *et al.*, 2022). Bakteri ini mempunyai aktivitas biokontrol spektrum yang luas, dalam artian ada yang menghasilkan zat aktif sebagai antimikroba khususnya pada tanaman darat, akan tetapi beberapa juga dilaporkan bersifat patogen (Rabbee & Hwang, 2023). Lebih lanjut dilaporkan bakteri *B. velezensis* strain tertentu dapat berifat virulen yang menginfeksi tanaman jenis tertentu, misalkan pada bawang, kentang, dan buah persik (Id *et al.*, 2023; Rabbee & Hwang, 2023).

Genus *Alteromonas* merupakan bakteri laut asli dengan distribusi yang luas (He *et al.*, 2023; López-Pérez *et al.*, 2014). Meskipun demikian sebagian besar bakteri ini hidup di wilayah lintang sedang dan tropis dengan suhu 10-40 °C. Lebih lanjut disebutkan bakteri ini tumbuh dengan baik dengan bahan organik dan nutrisi yang tinggi karena dapat memfiksasi nitrogen (López-Pérez *et al.*, 2014; Manck *et al.*, 2020; He *et al.*, 2023). Bakteri *Alteromonas macleodii* merupakan anggota dari Kelas c-Proteobacteria atau Gammaproteobacteria dan termasuk dalam Famili Alteromonadaceae. Jika dibandingkan dengan penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, jenis bakteri patogen penyakit WS yang diisolasi dari Perairan Indo-Pacific berasal dari Kelas c-Proteobacteria Famili Vibrionaceae dengan jenis *Vibrio coralliilyticus* (Sussman *et al.*, 2008). Bakteri patogen penyebab *Stony Coral Tissue Loss Disease* (SCTLD) adalah salah satunya berasal dari *Alteromonas* sp. strain McT4-15 (GenBank genome sequence JAJALG000000000) (Ushijima *et al.*, 2023).

Perubahan dalam komposisi atau interaksi antara mikroorganisme dengan biota karang dapat memunculkan penyakit karang dan merusak stabilitas ekosistem terumbu karang (Krediet *et al.*, 2013; Mhuantong *et al.*, 2019). Penelitian eksperimental laboratorium dari Mao-Jones *et al.* (2010) mengungkapkan bahwa sifat antibiotik mukus *Acropora palmata* tidak dapat kembali normal setelah suhu turun. Kehilangan aktivitas antibiotik dalam jangka panjang dapat menghilangkan komponen penting dalam pertahanan karang melawan penyakit, disatu sisi memberikan patogen kesempatan untuk menginfeksi dan menyebar di dalam *host* atau inang karang, serta meningkatkan risiko pemutihan karang, penyakit, dan mortalitas (Mao-Jones *et al.*, 2010).

KESIMPULAN

Ditemukan 8 isolat bakteri asosiasi karang terinfeksi penyakit WS hasil isolasi di Perairan Sawopudo, Sulawesi Tenggara. Berdasarkan identifikasi biomolekuler, jenis bakteri yang berasosiasi dengan karang terinfeksi WS berkerabat dekat dengan *Priestia flexa* (99,72% kemiripan), *Bacillus velezensis* (99,68% kemiripan), dan *Alteromonas macleodii* (99,64% kemiripan).

DAFTAR PUSTAKA

- Abrar, M., Bachtiar, I., & Budiyo, A. (2012). Struktur Komunitas dan Penyakit pada Karang (Scleractinia) di Perairan Lembata, Nusa Tenggara Timur. *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 17(2), 109-118. doi: 10.14710/ik.ijms.17.2.109-118.
- Badan Karantina Tumbuhan. (2008). Pedoman Diagnosis OPTK Golongan Bakteri. *Pedoman Diagnosis OPTK Golongan Bakteri*, 110(9), 1-122.
- Bergey's. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 3rd Ed (3). The Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg. London New York. 1422pp. doi: 10.1007/b92997.
- Castañeda-Chávez, M.D.R., Lango-Reynoso, F., García-Fuentes, J.L., & Reyes-Aguilar, Á.R. (2018). Bacteria that affects coral health with an emphasis on the gulf of Mexico and the Caribbean Sea. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46(5), 880-889. doi: 10.3856/vol46-issue5-fulltext-2.
- Dahiya, D., Pilli, A., Raja, P., Chirra, R., Sreeramula, V., & Venkateswarlu, N. (2022). Morphological and structural characterization of chitin as a substrate for the screening, production, and molecular characterization of chitinase by *Bacillus velezensis*. *Environmental Science and Pollution Research*. 29:86550-86561. doi: 10.1007/s11356-022-22166-x.
- Gao, Y., Qiang, L., Wu, N., Tan, R., Sun, Y., & Li, Z. (2024). Study on the Potential Probiotics Isolated from Marine Aquaculture System and Evaluation for Aquaculture Application. *Wiley Aquaculture Research*. 9555271, 1-7. doi: 10.1155/2024/9555271.
- Greene, A., Donahue, M.J., Caldwell, J.M., Heron, S.F., Geiger, E., & Raymundo, L.J. (2020). Coral Disease Time Series Highlight Size-Dependent Risk and Other Drivers of White Syndrome in a Multi-Species Model. *Frontiers in Marine Science*, 7, 1-17. doi: 10.3389/fmars.2020.601469.
- He, W., Xue, H. P., Liu, C., Zhang, A. H., Huang, J. K., & Zhang, D. F. (2023). Biomineralization of struvite induced by indigenous marine bacteria of the genus *Alteromonas*. *Frontiers in Marine Science*, 10, 1-15. doi: 10.3389/fmars.2023.1085345.
- Id, Z. L., Li, J., Yu, M., Quandahor, P., Tian, T., & Shen, T. (2023). *Bacillus velezensis* FX-6 suppresses the infection of *Botrytis cinerea* and increases the biomass of tomato plants. *PLoS ONE*, 18(6), e0286971. doi: 10.1371/journal.pone.0286971.
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., Prieto-Maradona, M., ... Herman, L. (2022). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 15: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2021. *EFSA Journal*, 20(1), 1-41. doi: 10.2903/j.efsa.2022.7045.
- Krediet, C.J., Ritchie, K.B., Paul, V.J., & Teplitski, M. (2013). Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280, 1755. doi: 10.1098/rspb.2012.2328.
- López-Pérez, M., Gonzaga, A., Ivanova, E.P., & Rodríguez-Valera, F. (2014). Genomes of *Alteromonas australica*, a world apart. *BMC Genomics*, 15(1), 1-14. doi: 10.1186/1471-2164-15-483.
- Manck, L.E., Espinoza, J.L., Dupont, C.L., Barbeau, K.A. (2020). Transcriptomic study of substrate-specific transport mechanisms for iron and carbon in the marine copiotroph *Alteromonas macleodii*. *mSystems* 5, e00070-20. doi: 10.1128/mSystems.00070-20.
- Mao-Jones, J., Ritchie, K.B., Jones, L.E., & Ellner, S.P. (2010). How microbial community composition regulates coral disease development. *PLoS Biol*, 8(3), e1000345. doi:10.1371/journal.pbio.1000345.
- Mhuantong, W., Nuryadi, H., Trianto, A., & Sabdono, A. (2019). Comparative analysis of bacterial communities associated with healthy and diseased corals in the Indonesian Sea. *PeerJ*, p.1-20. doi: 10.7717/peerj.8137.
- Muhammad, F., Zamani, N.P., & Ismet, M.S. (2021). The effect of plastic debris attachment to the health of branching corals in Kelapa Dua Island, Thousand Islands. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 771(1), 012017 doi: 10.1088/1755-1315/771/1/012017.
- Palupi, R.D., Rahmadani, R., & Ira, I. (2018). Status of Coral Health and Disease in Kessilampe Waters, Kendari, South East Sulawesi. *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 23(3), 137-144. doi: 10.14710/ik.ijms.23.3.137-144.

- Pamungkas, Y.P., Sabdono, A., & Wijayanti, D.P. (2014). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Karang terhadap Bakteri yang Diisolasi dari Karang Terserang Penyakit Ulcerative White Spots di Perairan Pulau Panjang, Jepara. *Journal of Marine Research*, 3(3), 254–264. doi: 10.14710/jmr.v3i3.5997.
- Rabbee, M.F., & Hwang, B. (2023). *Bacillus velezensis* : A Beneficial Biocontrol Agent or Facultative Phytopathogen for Sustainable Agriculture. *Agronomy*, 13, 840. doi: 10.3390/agronomy1303 0840.
- Raymundo, L.J., Couch, C.S., Bruckner, A.W., & Harvell, C.D. (2008). *Coral Disease Handbook: Guidelines for Assessment, Monitoring & Management*. Currie Communications. Melbourne. Australia. 124pp. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Coral+Disease+Handbook+Guidelines+for+Assessment+,#0>.
- Sa'adah, N., Sabdono, A., & Wijayanti, P. (2018). Identification of Antipathogenic Bacterial Coral Symbionts Against Porites Ulcerative White Spots Disease. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 116(1), 012054. doi :10.1088/1755-1315/116/1/012054.
- Sabdono, A., Sawonua, P.H., Kartika, A.G.D., Amelia, J. M., & Radjasa, O.K. (2015). Coral Diseases in Panjang Island, Java Sea: Diversity of Anti-Pathogenic Bacterial Coral Symbionts. *Procedia Chemistry*, 14, 15–21. doi: 10.1016/j.proche.2015.03.004.
- Soffritti, I., D'Accolti, M., Bini, F., Mazziga, E., Volta, A., Bisi, M., Rossi, S., Viroli, F., Balzani, M., Petitta, M., Mazzacane, S., & Caselli, E. (2023). Characterization of the Pathogenic Potential of the Beach Sand Microbiome and Assessment of Quicklime as a Remediation Tool. *Microorganisms*, 11, 2031. doi: 10.3390/ microorganisms11082031.
- Sumarlin, Syamsidar, G., & Adriyana, E. (2024). Exploring the Hidden Biotechnological Treasure of Bacterial Symbionts in Xestospongia sp. from Derawan Island: A Study on Antimicrobial and Enzyme-Producing Bacteria. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 17(6), 2795-3. doi: 10.52711/0974-360X.2024.00439.
- Sussman, M., Willis, B.L., Victor, S., & Bourne, D.G. (2008). Coral pathogens identified for White Syndrome (WS) epizootics in the Indo-Pacific. *PLoS ONE*, 3(6), 1–14. doi: 10.1371/journal.pone .0002393.
- Sutherland, K.P., Shaban, S., Joyner, J.L., Porter, J.W., & Lipp, E.K. (2011). Human pathogen shown to cause disease in the threatened ehlhorn coral *Acropora palmata*. *PLoS ONE*, 6(8), e23468. doi:10.1371/journal.pone.0023468.
- Thome, P.E., Rivera-Ortega, J., Rodríguez-Villalobos, J.C., Cerqueda-García, D., Guzmán-Urieta, E.O., García-Maldonado, J.Q., Carabantes, N., & Jordán-Dahlgren, E. (2021). Local dynamics of a white syndrome outbreak and changes in the microbial community associated with colonies of the scleractinian brain coral *Pseudodiploria strigosa*. *PeerJ*, 9, 10695. doi: 10.7717/peerj.10695.
- Todd, O.A., & Peters, B.M. (2019). *Candida albicans* and *staphylococcus aureus* pathogenicity and polymicrobial interactions: Lessons beyond koch's postulates. *Journal Fungi*, 5, 81 doi: 10.3390/jof5030081.
- Ushijima, B., Gunasekera, S.P., Meyer, J.L., Tittl, J., Pitts, K.A., Thompson, S., Sneed, J.M., Ding, Y., Chen, M., Houk, L.J., Aeby, G.S., Häse, C.C., & Paul, V.J. (2023). Chemical and genomic characterization of a potential probiotic treatment for stony coral tissue loss disease. *Communications Biology*, 6(1), 248. doi: 10.1038/s42003-023-04590-y.
- Walker, B.K., Turner, N.R., Noren, H.K.G., Buckley, S.F., & Pitts, K.A. (2021). Optimizing Stony Coral Tissue Loss Disease (SCTLD) Intervention Treatments on *Montastraea cavernosa* in an Endemic Zone. *Frontiers in Marine Science*, 8, 1–12. doi: 10.3389/fmars.2021.666224.
- Work, T.M., Russell, R., & Aeby, G.S. (2012). Tissue loss (white syndrome) in the coral *Montipora capitata* is a dynamic disease with multiple host responses and potential causes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1746), 4334–4341. doi: 10.1098/rspb.2012.1827.
- Young, B.D., Rosales, S.M., Enochs, I.C., Kolodziej, G., Formel, N., Moura, A., D'Alonso, G.L., & Traylor-Knowles, N. (2023). Different disease inoculations cause common responses of the host immune system and prokaryotic component of the microbiome in *Acropora palmata*. *PLoS ONE*, 18(5), e0286293. doi: 10.1371/journal.pone.0286293.
- Zakaria, I.J., Wulandari, A., Febria, F.A., Nofrita, & Efrizal. (2021). Diseases and health disturbances on scleractinian corals in the west sumatra sea, Indian ocean. *AACL Bioflux*, 14(1), 462–477.
- Zhenyu, X., Shaowen, K., Chaoqun, H., Zhixiong, Z., Shifeng, W., & Yongcan, Z. (2013). First Characterization of Bacterial Pathogen, *Vibrio alginolyticus*, for *Porites andrewsi* White Syndrome in the South China Sea. *PLoS ONE*, 8(9), e75425. doi: 10.1371/journal.pone.0075425.