

Full Paper

**PATOGENISITAS *Vibrio fluvialis* 24SK TERHADAP KERAPU TIKUS
(*Cromileptes altivelis*)**

**PATHOGENICITY OF *Vibrio fluvialis* 24SK IN HUMPBACK GROUPE
(*Cromileptes altivelis*)**

Indah Istiqomah¹⁾, Alim Isnansetyo^{2*)}, Triyanto³⁾, Kamiso Handoyo Nitimulyo³⁾, dan
Muhammad Murdjani^{4**)}

Abstract

This research was aimed to investigate the pathogenicity of *Vibrio fluvialis* 24SK in humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) based on its Lethal Dosage 50 (LD₅₀). *V. fluvialis* 24SK was isolated from ren of humpback grouper cultured in floating net cage at Brackishwater Aquaculture Development Center (BADC) Situbondo, with vibriosis signs. The bacterium was cultured in Tryptone Soy Broth (TSB) medium dissolved in trisalt solution (KCl, 0.75 g/l; MgSO₄.7H₂O; 14.2 g/l; NaCl, 18.4 g/l), incubated at 30°C for 24 h. Infection was carried out by interperitoneal injection to humpback grouper (8-9 cm of total length) at 10², 10⁴, 10⁶, and 10⁸ cfu/fish. Control fishes were injected with 0.2 ml trisalt solution. Disease sign and mortality of fishes were observed every eight hour for 40 days. LD₅₀ was calculated based on Dragstedt Behrens method (Hubert, 1980). Result indicated that infection of the bacteria at 10⁶ and 10⁸ cfu/fish caused sub-acute disease signs, such as haemorrhagic on operculum, base of fins (*pinnae pectorales*, *pinnae abdominales*, *pinna analis*), and also head and abdomen, while infection at 10² and 10⁴ cfu/fish caused chronic disease signs, such as haemorrhagic on fins base which was followed by necrotic on fins and skin tissue in prolonged time. Histopathologically, infection of the bacteria caused atrophy on the gills, infiltrations of lymphocyte, heterofel and plasma cell on the gills and fins base, vacuolar degeneration on the liver, and also present the bacteria colony on the fins base and intestine tissues. *V. fluvialis* 24SK has LD₅₀ at (1,1±0,5)x10⁷ cfu/fish.

Key words: Humpback grouper (*Cromileptes altivelis*), Lethal Dosage 50, Pathogenicity, *Vibrio fluvialis*

Pengantar

Kerapu tikus merupakan komoditas perikanan laut bernilai ekonomi tinggi (Hartono *et al.*, 1999). Vibriosis merupakan penyakit bakterial yang sering ditemukan pada budidaya kerapu tikus, mulai stadium telur, larva, benih, juvenil, sampai induk. Spesies *Vibrio* yang patogen mampu menimbulkan penyakit *epizootic* yang serius, namun beberapa spesies yang lain hanya bersifat patogen oportunistik yang menyebabkan penyakit apabila ikan mengalami luka fisik, luka akibat parasit, dan stres (Zafran *et al.*, 1998). Induk kerapu tikus yang terserang

vibriosis sering menunjukkan septisemia haemoragik, luka seperti borok pada kulit, dan nekrosis pada jaringan kulit pada berbagai tingkatan sesuai keganasan bakteri *Vibrio* yang menyerang. Pada stadium larva, serangan *Vibrio* patogen sering menunjukkan serangan penyakit akut tanpa gejala klinis yang jelas.

Beberapa spesies *Vibrio* patogen antara lain *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. charchariae*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. ordalii*, *V. vulnificus* (Austin & Austin, 1987), *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. fluvialis*, *V. metchnikovii*, dan *V. furnisii* (Rollins & Joseph, 2000).

¹⁾ Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan, Jurusan Perikanan, UGM. Jl Flora Bulaksumur, Yogyakarta.

^{2*)} Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau. Jl. Pemandian Kartini PO BOX 1, Jepara, Jawa Tengah.

⁴⁾ Penulis untuk korespondensi, E-mail: isnansetyo@yahoo.com.

Menurut Lightner (1996) *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, dan *Vibrio* sp. adalah bakteri yang selalu ditemukan pada hatchery dan pembesaran udang, sementara *V. damsella*, *V. fluvialis*, dan *Vibrio* spp. masih jarang dilaporkan. Sementara Wijayanti & Hamid (1997) berhasil melakukan identifikasi bakteri vibrio patogen pada kerapu tikus yaitu *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. marinus*. *V. fluvialis* merupakan bakteri patogen yang potensial menyebabkan vibriosis pada kerapu tikus dan belum ada kajian mengenai patogenisitasnya terhadap kerapu tikus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui patogenisitas *V. Fluvialis* 24SK terhadap kerapu tikus berdasarkan LD₅₀.

Bahan dan Metode

Isolasi dan pemurnian bakteri

Bakteri diisolasi dari sampel kerapu tikus ukuran 13 cm yang mengalami nekrosis pada bagian sirip pektoral dan sirip anal, dengan medium *Thio sulphate Citrate Bile Salt Agar* (TCBSA, Oxoid) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam sehingga tumbuh koloni-koloni berwarna kuning. Salah satu koloni yang dominan diambil menggunakan jarum ose, kemudian digores pada medium nutrient agar (Oxoid) yang ditambah Trisalt (KCl 0,75 g/l, MgSO₄.7H₂O 14,2 g/l, NaCl 18,4 g/l) dan diinkubasi selama 24 jam.

Karakterisasi bakteri

Karakterisasi dilakukan melalui pengujian postulat Koch (Saroni *et al.*, 1993), pengamatan morfologi koloni, morfologi sel, dan uji biokimia. Postulat Koch dilakukan dengan menginfeksi bakteri pada 3 ekor kerapu tikus ukuran 9-10 cm dengan penyuntikan *intraperitoneal* pada kepadatan 10⁶ cfu/ikan yang diperoleh dari kultur bakteri murni pada *Tryptone Soya Broth* (TSB, Oxoid) dengan Trisalt. Uji biokimia dilakukan berdasarkan Lightner (1996), Gerhardt *et al.* (1994), Macfaddin (1980), serta Jutono *et al.* (1973). Identifikasi bakteri dilakukan berdasarkan Holt *et al.* (1994).

Uji patogenisitas

Bakteri ditumbuhkan pada TSB dengan Trisalt (15 ml) pada suhu 30°C selama 24 jam. Penghitungan kepadatan bakteri dilakukan menggunakan metode tidak langsung berdasarkan jumlah koloni sesuai Jutono *et al.* (1973) dengan pengenceran berseri.

Bakteri disuntikkan secara *intraperitoneal* pada kerapu tikus (*C. altivelis*) dengan dosis 10², 10⁴, 10⁶, dan 10⁸ cfu/ikan. Tiap perlakuan menggunakan 7 ekor ikan uji (rata-rata panjang total 8-9 cm) dengan 3 ulangan. Ikan kontrol hanya disuntik TSB dengan Trisalt sebanyak 0,2 ml. Ikan dipelihara pada ember-ember plastik berisi 10 l air laut yang telah didisinfeksi dengan klorin 5 ppm dan diberi aerasi.

Pengamatan

Pengamatan gejala penyakit dan kematian ikan dilakukan setiap 8 jam selama 14 hari setelah infeksi. Pakan yang berupa pelet diberikan secara *ad libitum* setiap pagi hari kemudian dilakukan penyifonan. Pengamatan kualitas air (suhu, pH, dan oksigen terlarut) dilakukan pada pagi dan siang hari setiap 5 hari, dan pada akhir pengamatan.

Rerata waktu kematian (*Mean time to death*, MTD) dihitung dengan rumus:

$$MTD = \frac{\sum_{i=1}^n a_i b_i}{\sum_{i=1}^n b_i}$$

Keterangan:

MTD : *Mean Time to Death* (rerata waktu kematian)

a_i : waktu kematian pada jam ke- i (jam)

b_i : jumlah ikan uji yang mati pada jam ke- i (ekor)

Patogenisitas bakteri ditentukan menggunakan nilai LD₅₀ berdasarkan metode *Dragstedt Behrens* (Hubert, 1980). Spesimen (insang, kulit, usus, dan hati) difiksasi menggunakan larutan formalin 10%, kemudian dilakukan proses histologi de-

ngan pengecatan hematoksilin dan eosin (Anonim, 1957).

Hasil dan Pembahasan

Karakterisasi

Karakterisasi menunjukkan bahwa bakteri yang diisolasi merupakan anggota genus *Vibrio* dengan karakter tumbuh pada media TCBS, bersifat gram (-), bentuk *short rod*, oksidase (+), katalase (+),

Motility (+), indol (-), dan D-manitol (+). Selanjutnya berdasarkan postulat Koch diketahui bahwa bakteri tersebut patogen karena menyebabkan kematian (100%) terhadap ikan uji, dengan waktu kematian rata-rata 18 jam. Setelah dilakukan karakterisasi lebih lanjut berdasarkan morfologi koloni, morfologi sel, dan sifat biokimia yang lebih lengkap, isolat 24SK tersebut menunjukkan kesesuaian sifat yang paling tinggi terhadap *V. fluvialis* (Tabel 1).

Tabel 1. Karakter isolat bakteri 24SK

Karakterisasi	Isolat 24Sk	<i>V. fluvialis</i> (Holt et al. 1994)
Morfologi Koloni		
Bentuk	<i>Circular</i>	ND
Tepi	<i>Entire</i>	ND
Elevasi	<i>Low convex</i>	ND
Warna	Kuning	ND
Ukuran	kecil	ND
Morfologi Sel		
Bentuk	Short rot	Short rot
Gram	-	-
Sifat Biokimia		
Arginine dihidrolase	+	+
Suhu 30°C	+	+
L-arabinose, acid	+	+
D-galaktose, acid	-	+
Katalase	+	+
Oksidase	+	+
Luminescent	-	-
Indol	-	(-)
Methyl red	+	+
Simmon citrate	+	+
H ₂ S	-	-
Lisin dekarboksilase	-	-
Ornitin dekarboksilase	-	-
Motility	+	d
Gelatin	+	+
Glucose, acid	+	+
Glucose, gas	-	-
O/F	F	
Glycin	+	d
L-ornithin	+	+
D-mannitol, acid	+	+
D-mannosa, acid	-	d
D-sorbitol, acid	-	-
Sukrose, acid	+	+
NaCl 1%	-	+
NaCl 6%	-	+
NaCl 8%	-	d
Sensitifitas O/129	+	d
Novobiocin	+	

Keterangan: d, 11- 89% strain adalah positif; +, 90% atau lebih strain adalah positif; -, 90% atau lebih strain adalah negatif; ND, Tidak ada data.

Patogenisitas bakteri

Kematian ikan paling banyak terjadi pada 48 jam setelah infeksi. Kerapu tikus yang diinfeksi bakteri dengan dosis 10^8 cfu/ikan menunjukkan rata-rata waktu kematian yang lebih cepat yaitu 67,7 jam (Tabel 2), ditandai gejala penyakit berupa *haemorrhagik* pada pangkal sirip (*pinnae pectorales*, *pinnae abdominales*, *pinna analis*) bahkan pada beberapa ikan uji terdapat *haemorrhagik* yang merata pada kepala dan abdomen. Pada dosis penyuntikan yang lebih rendah, ikan uji menunjukkan gejala serangan penyakit kronis berupa *haemorrhagik* pada pangkal sirip, berlanjut munculnya nekrosis jaringan kulit, baik pada daerah abdomen maupun sirip. Hal tersebut berbeda dengan kelompok ikan kontrol yang tetap pada kondisi sehat (normal) tanpa adanya kematian.

Setelah 15 hari pengamatan, ikan yang diinfeksi bakteri dengan dosis 10^8 , 10^6 , 10^4 , dan 10^2 cfu/ikan mengalami kematian berturut-turut 76, 14, 0, dan 10%. Penyuntikan dosis 10^4 cfu/ikan tidak menyebabkan kematian pada ikan uji, namun menyebabkan gejala serangan penyakit kronis. Dengan mempertimbangkan dera-

jad kesalahan maka diperoleh nilai LD_{50} sebesar $(1,1 \pm 0,5) \times 10^7$ cfu/ikan.

Murdjani (2002) melakukan penelitian serupa dengan *V. alginolyticus* yang diinfeksi pada kerapu tikus (ukuran 4-5 cm) menyebabkan kematian pada ikan uji dengan nilai LD_{50} sebesar $4,5 \times 10^6$ cfu/ikan melalui penyuntikan *intra muscular* (IM), *intra peritoneal* (IP), dan *intra venal* (IV). Rajan *et al.* (2001) melaporkan infeksi *V. alginolyticus* pada juvenil ikan cobia (*Rachycentron canadum*) menyebabkan kematian ikan uji dengan LD_{50} sebesar $4,8-6 \times 10^6$ cfu/ikan melalui penyuntikan IM dan IP. Sementara itu, Esteve *et al.* (1995) melaporkan *V. furnisii* bersifat patogen terhadap juvenil sidat (*Anguilla anguilla*) dengan LD_{50} sebesar $4,4 \times 10^6$ dan 8×10^6 cfu/ikan melalui penyuntikan IP. *V. harveyi* memiliki LD_{50} 10^6-10^7 cfu/ml pada *P. vannamei* (Robertson *et al.*, 1998 *cit.* Saulnier *et al.*, 2000) sementara *V. campbellii* $3,5 \times 10^6-3,5 \times 10^7$ cfu/ml pada *P. monodon* (nauplium mysis), dan $3,5 \times 10^7-3,5 \times 10^8$ cfu/ml (Post-larva) (Hameed 1995 *cit.* Saulnier *et al.*, 2000).

Tabel 2. Kematian rata-rata kerapu tikus yang diinfeksi *V. fluvialis* 24SK

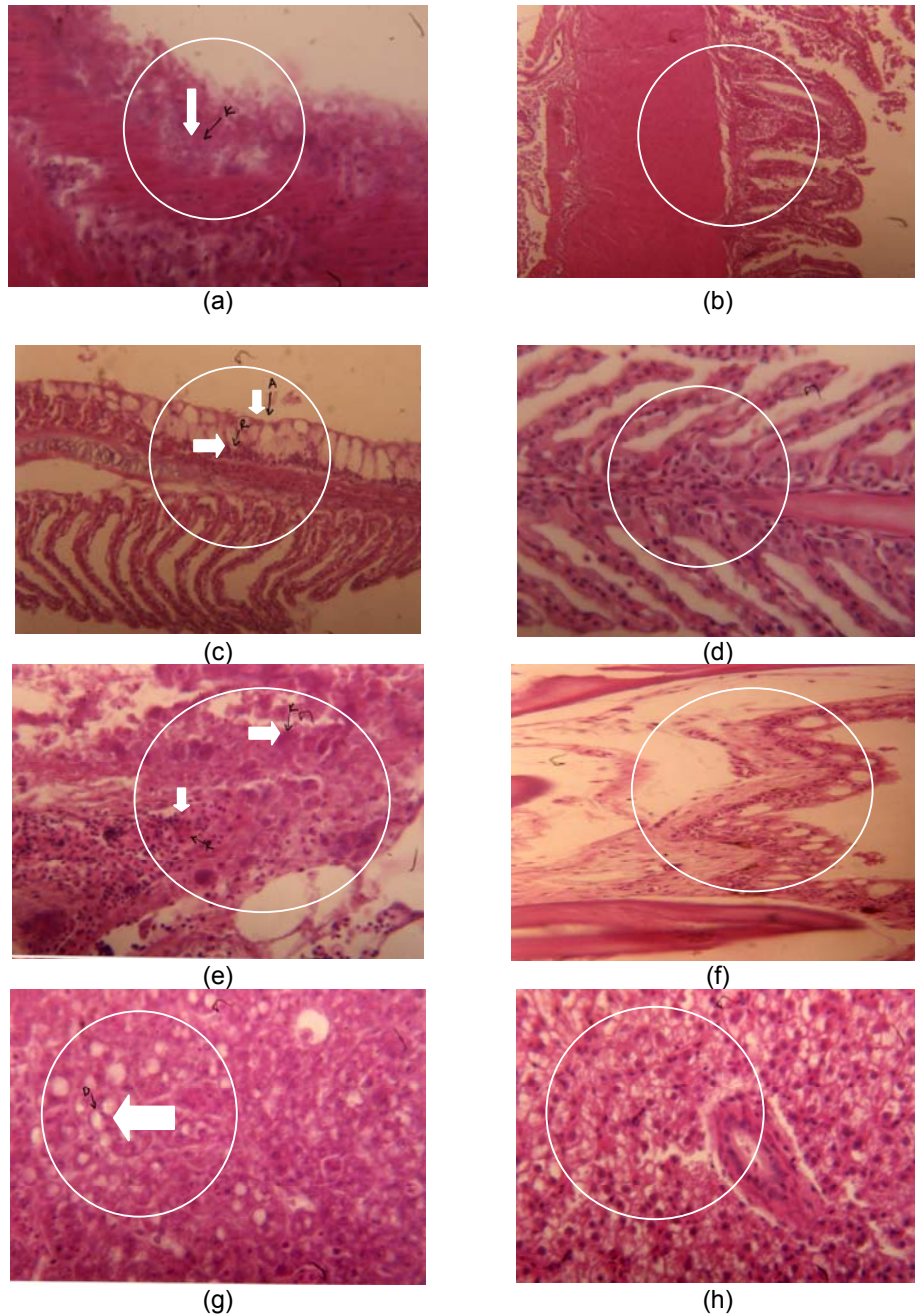
Dosis (cfu/ml)	Kematian ikan pada jam ke-n (ekor)									Waktu kematian rata-rata (jam)
	8	16	...	40	48	...	212	...	276	
Ulangan 1										
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	∞
10^2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	276
10^4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	∞
10^6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	∞
10^8	0	0	0	3	3	0	0	0	0	44
Ulangan 2										
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	∞
10^2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	276
10^4	0	0		0	0	0	0	0	0	∞
10^6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^8	0	0	0	1	2	0	1	0	0	87
Ulangan 3										
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	∞
10^2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	∞
10^4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	∞
10^6	0	0	0	0	2	0	0	0	0	48
10^8	0	0	0	0	4	0	1	0	0	81

Patogenisitas bakteri terhadap inang berbeda-beda, dipengaruhi oleh faktor pertahanan inang dalam melawan patogen, maupun faktor patogenisitas yang ada pada patogen, diantaranya kemampuan memproduksi toksin, enzim, mengatasi ketahanan inang, serta kecepatan berkembang biak. Aktivitas haemolysin maupun leukosidin yang dihasilkan oleh *Extracellular Products* (ECPs) bakteri menjadi faktor pertahanan bakteri untuk melawan pertahanan darah inang karena mampu melisis sel darah. Bakteri akan mengikuti aliran darah, menyebar ke seluruh sel tubuh inang maupun menuju organ target. Bakteri juga memiliki faktor patogenisitas berupa enzim-enzim yang terdapat pada ECPs, diantaranya *caseinase*, *gelatinase*, *amylase*, *phospholipase*, *lipase*, *chitinase*, *collagenase*, *hyaluronidase*, *elastase*, maupun *proteinase* yang mampu menguraikan senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana sehingga bakteri dengan mudah menerobos sel inang. Beberapa eksotoksin memiliki kemampuan penghambatan sintesis protein, merusak lapisan bilayer, serta merusak susunan sitoskeleton, sehingga berdampak pada degenerasi sel. Kemampuan beberapa eksotoksin untuk melakukan gangguan siklus sinyal sel (Moayeri & Welch, 1998) menyebabkan keberadaan patogen tidak dapat dideteksi oleh sel limfosit sebagai pengatur sistem pertahanan tubuh inang. Hal tersebut mengakibatkan kondisi serangan patogen menjadi terus berlanjut. Degenerasi sel inang secara terus menerus pada akhirnya berdampak pada kematian jaringan (nekrosis) yang makin meluas.

Spesies *Vibrio* patogen memiliki plasmid sebagai faktor keganasan, dimana perbedaan jenis plasmid yang dimiliki tiap bakteri menyebabkan perbedaan tingkat keganasan (Crosa *et al.*, 1983). Sementara itu, inang (ikan) memiliki salah satu sistem pertahanan tubuh berupa protein (laktoferin dan transferin). Protein tersebut akan mengikat zat besi sebagai unsur esensial yang dibutuhkan bakteri sehingga bakteri tidak dapat bertahan hidup (Neilands, 1981). Keberadaan plasmid pada *Vibrio* patogen mampu meningkatkan efisiensi pemanfaatan zat besi sehingga bakteri tetap bertahan hidup pada inang meskipun pada kondisi zat besi yang sangat rendah.

Berdasarkan pengamatan histologi terhadap jaringan tubuh kerapu tikus yang terinfeksi, *V. fluvialis* 24SK tampak berkoloni pada jaringan kulit maupun usus, menyebabkan terjadinya atrofi pada jaringan insang, degenerasi *vacuoler* pada jaringan hati, infiltrasi limfosit, heterofel, dan sel plasma pada jaringan insang maupun kulit (pangkal sirip) (Gambar 1).

Infeksi *V. fluvialis* 24SK pada kerapu tikus harus diwaspadai karena terbukti mampu menyebabkan gejala serangan penyakit serta kematian pada ikan uji. Kualitas air selama penelitian berada pada kisaran nilai yang sesuai untuk kerapu (Yushimitsu *et al.*, 1986), yaitu salinitas $30,5 \pm 0,5$ ppt; oksigen terlarut $3,8 \pm 0,4$ ppm; pH $7,8 \pm 0,2$; serta suhu $29 \pm 3^{\circ}\text{C}$.



Gambar 1. (a), Irisan jaringan usus yang terinfeksi *V. fluvialis* 24SK: tampak adanya koloni bakteri; (b), Irisan jaringan usus normal (kontrol); (c), Irisan jaringan insang yang terinfeksi *V. fluvialis* 24SK: terjadi atrofi, infiltrasi limfosit, heterofel dan sel plasma; (d), Irisan jaringan insang normal (kontrol); (e), Irisan jaringan kulit (pangkal sirip) yang terinfeksi *V. fluvialis* 24SK: tampak adanya koloni bakteri, infiltrasi limfosit, heterofel dan sel plasma; (f), Irisan jaringan kulit normal (kontrol); (g), Irisan jaringan hati yang terinfeksi *V. fluvialis* 24SK: tampak adanya degenerasi *vacuoler*; (h), Irisan jaringan hati normal (kontrol).

Kesimpulan

1. Infeksi *V. fluvialis* 24SK pada kerapu tikus perlu diwaspadai karena mampu menyebabkan kematian dengan gejala penyakit sub akut maupun kronik.
2. *Lethal Dosage* 50 (LD₅₀) *V. fluvialis* 24SK terhadap kerapu tikus adalah $(1,1 \pm 0,5) \times 10^7$ cfu/ikan.
3. Kematian ikan uji paling banyak terjadi pada 48 jam setelah infeksi, semakin tinggi dosis infeksi bakteri cenderung menyebabkan kematian dengan MTD lebih pendek.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan rangkaian Riset Unggulan Nasional (RUSNAS) kerapu yang dibiayai oleh Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Kementerian Negara Riset dan Teknologi.

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada drh. Kurniasih, MV.Sc., Ph.D. (Fakultas Kedokteran Hewan, UGM) atas bantuan dalam proses pembuatan preparat histologi.

Daftar Pustaka

- Anonim. 1957. Manual of histologic and special staining technics, Armed Forces Institute of Pathology. General Pathology Laboratory. Walter Reed Medical Center. Washington D.C. 29-36.
- Austin, B. and D.A. Austin. 1987. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood Limited. John Wiley and Sons. Chichester: 263-287.
- Crosa, J.H., M.A. Walter, and S.A. Potter. 1983. The genetics of plasmid-mediated virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. In: Bacterial and viral diseases of fish. J.H. Crosa (Ed.). Univ. of Washington: 21-30.
- Esteve, C., C. Amaro, E.G. Biosca, dan E. Garay. 1995. Biochemical and toxic properties of *Vibrio furnisii* isolated from an european eel farm. Aquaculture. 132: 81-90.
- Gerhardt, P., P.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg. 1994. Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology. Washington. 651 p.
- Hartono, P., Anindiasuti, dan Sudaryanto. 1999. Pembenihan ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Departemen Pertanian. Dirjen Perikanan. Balai Budidaya Laut. Lampung. 88 p.
- Holt, J.G., P.H. Sneath, J.T. Stanley, and S.T. Williams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th Ed. Williams and Wilkins. Baltimore. 787 p.
- Hubert, J.J. 1980. Bioassay. Department of Mathematics and Statistics. Kendall. Hunt Publishing Company. Iowa. USA. 164 p.
- Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun, D. Suhadi, dan Soesanto. 1973. Pedoman praktikum mikrobiologi umum untuk perguruan tinggi. Jutono (Ed). Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 153 p.
- Lightner, D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of culture penaeid shrimp. Sec.4: Bacteria, vibriosis culture and identification. The World Aquaculture Society. Baton Rouge. Louisiana. USA.
- Mac Faddin, J.F. 1980. Biochemical test for identification of medical bacteria. Second Ed. Williams and Wilkins. Baltimore. 528 p.
- Moayeri, M. and R.A. Welch. 1998. Bacterial exotoxins. In: Methods in microbiology bacterial pathogenesis. P. Williams, J. Ketley, and G. Salmond (Eds). Academic Press. New York. 27: 287-300.

- Murdjani, M. 2002. Identifikasi dan patologi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Ringkasan Disertasi. Program Studi Ilmu-ilmu Pertanian Kekhususan Perlindungan Tanaman. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang. 48 p.
- Neilands, J.B. 1981. Iron absorption and transport in microorganisms. *Ann. Rev. of Nutr.* 1: 27-46.
- Rajan, P.R., C. Lopez, J.H.Y. Lin, and H.L. Yang. 2001. *Vibrio alginolyticus* infection in cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in Taiwan. *Bulletin of the european association of fish pathologists.* 21 (6): 228-234.
- Rollins, D.M. and S.W. Joseph. 2000. List of bacterial pathogen. BSCL 424 Pathogenic microbiology. University of Maryland. <http://www.life.umd.edu/classroom/bci434/index.html>. Diakses tanggal 17 Agustus 2004.
- Sarono, A. Widodo, dan E.B.S. Haryani. 1993. Deskripsi hama dan penyakit ikan karantina golongan bakteri. Pusat Karantina Pertanian dan Fakultas Pertanian Jurusan Perikanan UGM. Yogyakarta. 90 p.
- Saulnier, D., P. Haffener, and C. Goarant. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture.* 191: 133-144.
- Wijayanti, A. dan N. Hamid. 1997. Identifikasi bakteri pada pembenihan ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Ditjen. Perikanan. Deptan. 9 p.
- Yushimitsu, T., H. Eda, and K. Hiramatsu. 1986. Grouper final report: marine culture research and development in Indonesia. ATA-192. JICA: 103-129.
- Zafran, D. Roza, I. Koesharyani, dan F. Johnny. 1998. Panduan untuk diagnosis penyakit ikan dan krustase laut di Indonesia. JICA dan Loka Penelitian Perikanan Pantai Gondol.