

**KARAKTERISASI FENOTIPIK DAN EVALUASI AKTIVITAS
PROTEOLITIK BAKTERI *Streptococcus iniae* PADA KAKAP
PUTIH (*Lates calcarifer* Bloch) DAN KERAPU MACAN (*Epinephelus
fuscoguttatus* Forsskål)**

(Tesis)

Oleh

AZISA NABILA PUTRI

2327021001



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2026**

ABSTRAK

KARAKTERISASI FENOTIPIK DAN EVALUASI AKTIVITAS PROTEOLITIK BAKTERI *Streptococcus iniae* PADA KAKAP PUTIH (*Lates calcarifer* Bloch) DAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskål)

Oleh

Azisa Nabila Putri

Streptococcus iniae merupakan bakteri patogen penyebab *streptococcosis* pada ikan budidaya bernilai ekonomi tinggi, seperti kakap putih (*Lates calcarifer*) dan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), yang dapat menimbulkan perdarahan, eksophthalmia, gangguan saraf, hingga kematian massal. Tingkat virulensi bakteri ini terkait dengan faktor fenotipik dan kemampuan sekresi enzim protease yang berperan dalam degradasi jaringan inang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus–Oktober 2025 di Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung dan Laboratorium Biomolekuler Universitas Lampung. Isolat diperoleh dari organ internal (ginjal, hati, limpa) ikan, yang merupakan lokasi utama kolonisasi dan penyebaran sistemik *S. iniae*. Analisis dilakukan melalui uji hemolisis, pewarnaan Gram, identifikasi biokimia menggunakan API Kit, uji motilitas, dan uji proteolitik pada *Skim Milk Agar*. Semua isolat menunjukkan karakter fenotipik konsisten dengan *S. iniae*, koloni putih krem, kokus berpasangan atau rantai pendek, Gram positif, dan non motil. Profil biokimia menunjukkan pola reaksi khas *S. iniae*, dengan isolat AG 1 paling sesuai pola acuan biokimia spesies ini, sedangkan uji proteolitik menunjukkan kemampuan enzim protease yang efektif (3–4 cm), dengan isolat AG1 memiliki aktivitas tertinggi (4,5 cm). Temuan ini menunjukan bahwa isolat AG1, EL1 dan DG10 sesuai dengan *S. iniae*, sementara kemampuan proteolitik isolat AG1 menunjukkan potensi virulensi signifikan terhadap ikan budidaya.

Kata kunci: *Streptococcus iniae*, kakap putih, kerapu macan, fenotipik, patogen.

ABSTRACT

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITY OF *Streptococcus iniae* IN ASIAN SEABASS (*Lates calcarifer* Bloch) AND TIGER GROUPER (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskål)

By

Azisa Nabila Putri

Streptococcus iniae is a pathogenic bacterium causing streptococcosis in high value cultured fish such as Asian seabass (*Lates calcarifer*) and tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*), leading to hemorrhages, exophthalmia, neurological disorders, and mass mortality. Bacterial virulence is closely associated with phenotypic traits and the secretion of proteolytic enzymes that facilitate host tissue degradation. This study was conducted from August to October 2025 at the Center for Marine Aquaculture Development (BBPBL) Lampung and the Biomolecular Laboratory of the University of Lampung. Bacterial isolates were obtained from internal organs (kidney, liver, and spleen), which serve as primary sites for colonization and systemic dissemination of *S. iniae*. Phenotypic characterization included hemolysis testing, Gram staining, biochemical identification using the API kit, motility testing, and proteolytic activity assays on skim milk agar. All isolates exhibited phenotypic characteristics consistent with *S. iniae*, including creamy white colonies, paired cocci or short chains, Gram positive reactions, and non motile behavior. Biochemical profiles showed reaction patterns characteristic of *S. iniae*, with isolate AG 1 displaying the closest similarity to the reference biochemical profile. Proteolytic activity was detected in all isolates, with inhibition zones ranging from 3.0 to 4.0 cm, while isolate AG1 showed the highest proteolytic activity (4.5 cm). These findings indicate that isolate AG1, EL1, and, DG10 is most consistent with *S. iniae*, whereas the strong proteolytic activity observed in isolate AG1 suggests a higher virulence potential in cultured fish.

Keywords: *Streptococcus iniae*, asian seabass, tiger grouper, phenotypic, pathogen.

**KARAKTERISASI FENOTIPIK DAN EVALUASI AKTIVITAS
PROTEOLITIK BAKTERI *Streptococcus iniae* PADA KAKAP
PUTIH (*Lates calcarifer* Bloch) DAN KERAPU MACAN (*Epinephelus
fuscoguttatus* Forsskål)**

Oleh

AZISA NABILA PUTRI

Tesis

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
MAGISTER SAINS**

Pada

**Program Studi Magister Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2026**

LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Tesis : Karakterisasi Fenotipik dan Evaluasi Aktivitas
Proteolitik Bakteri *Streptococcus*
iniae Pada Kakap Putih (*Lates calcarifer*
Bloch) dan Kerapu Macan (*Epinephelus*
fuscoguttatus Forsskål)

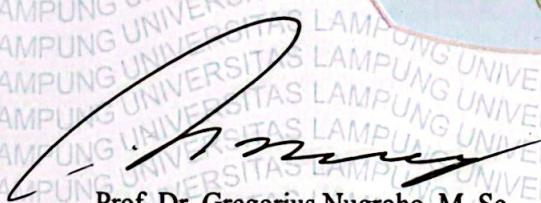
Nama Mahasiswa : Azisa Nabila Putri
NPM : 2327021001
Jurusan/Program Studi : Magister Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

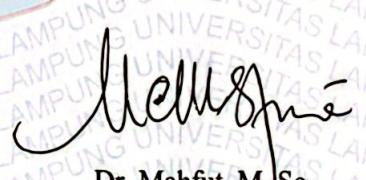
MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

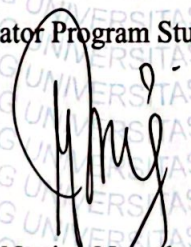
Pembimbing 1

Pembimbing 2


Prof. Dr. Gregorius Nugroho, M. Sc.
NIP.196103111988031001


Dr. Mahfut, M.Sc.
NIP.198109092014041001

2. Koordinator Program Studi Magister Biologi


Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.
NIP. 196603051991032001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Prof. Dr. Gregorius Nugroho, M.Sc.

Sekretaris : Dr. Mahfut, M.Sc.

Penguji
Bukan Pembimbing I : Dr. Agus Setyawan, M.P.

Bukan Pembimbing II : Munti Sarida, M.Sc., Ph.D.

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002

3. Direktur Program Pascasarjana

Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.
NIP. 196403261989021001

Tanggal Lulus Ujian Tesis: 6 Februari 2026

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Azisa Nabila Putri
NPM : 2327021001
Jurusan : Magister Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa apa yang tertulis dalam tesis saya dengan judul
**“KARAKTERISASI FENOTIPIK DAN EVALUASI AKTIVITAS
PROTEOLITIK BAKTERI *Streptococcus iniae* PADA KAKAP
PUTIH (*Lates calcarifer* Bloch) DAN KERAPU MACAN (*Epinephelus
fuscoguttatus* Forsskål) ”** adalah hasil karya sendiri berdasarkan
pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Tesis ini saya susun dengan
mengikuti pedoman dan norma akademik yang berlaku.

Demikian pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila
dikemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ilmiah ini, maka saya siap
mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 6 Februari 2026
Yang menyatakan,



Azisa Nabila Putri
2327021001

RIWAYAT HIDUP



Penulis lahir di Bandar Lampung pada tanggal 7 April 1999, sebagai anak pertama dari dua bersaudara dari pasangan Bapak M. Alhusnu Riski dan Ibu Desiana Hilda RA. Penulis menempuh pendidikan pertamanya di Taman Kanak-Kanak (TK) Kartika II-26 hingga tahun 2006, kemudian Penulis melanjutkan pendidikan

Sekolah Dasar (SD) pada tahun 2006 hingga lulus pada tahun 2012 di SD KARTIKA II-5 Bandar Lampung, selanjutnya Penulis melanjutkan Sekolah Menengah Pertama di SMPN 2 Bandar Lampung dan lulus pada tahun 2015. Penulis kemudian menyelesaikan pendidikan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMAN 2 Bandar Lampung dan lulus pada tahun 2017. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan sarjana di Jurusan Sains Program Studi Biologi Institut Teknologi Sumatera melalui jalur Seleksi Mandiri Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SMMPTN), dan meraih gelar Sarjana Sains (S.Si.) pada tahun 2021. Pada tahun 2023, penulis tercatat sebagai Mahasiswa Program Studi Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Selain itu, penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Mikrobiologi pada saat perkuliahan Strata 1.

MOTTO

“Or do you think that you will enter Paradise while there has not yet come to you the like of what came to those who passed on before you? They were touched by poverty and hardship and were shaken...”

(QS.Al-Baqarah 2:214).

“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.
Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan”

(QS.Al-Insyirah: 5-6).

PERSEMBAHAN



Dengan mengucapkan rasa syukur kehadiran Allah SWT juga shalawat yang senantiasa pada Rasulullah Muhammad SAW.

Saya persembahkan karya kecil ini kepada Orang Tua dan Keluarga
Yang telah merawat, memberikan kasih sayang, motivasi, dan senantiasa mendoakan setiap langkah yang saya jalani.

Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Biologi Universitas Lampung
Yang telah membimbing, mengarahkan, dan memberikan segala ilmunya dengan ikhlas kepada saya hingga gelar sarjana ini dapat saya raih.

Teman-Teman Magister Biologi Angkatan 2023 dan 2024
Yang telah berjuang sejak awal berada di bangku perkuliahan dan selalu memberikan semangat disetiap ada kesempatan hingga saat ini.

Almamater Tercinta, Universitas Lampung.

SANWACANA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala berkah, rahmat, dan hidayah-Nya sehingga tesis ini dapat diselesaikan sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar Magister Sains pada Program Studi Magister Sains pada Program Studi Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung dengan tesis yang berjudul “**KARAKTERISASI FENOTIPIK DAN EVALUASI AKTIVITAS PROTEOLITIK BAKTERI *Streptococcus iniae* PADA KAKAP PUTIH (*Lates calcarifer* Bloch) DAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal)**”. Penulisan tesis ini tidak terlepas dari perhatian, bimbingan, masukan, arahan, nasehat, serta motivasi yang tiada henti selama dalam penelitian, penulisan, serta dalam proses menyelesaikan studi. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Gregorius Nugroho Susanto, M.Sc., selaku pembimbing I atas waktu dan tenaga yang telah sabar memberikan ilmu, bimbingan, nasihat, arahan, saran serta masukan kepada penulis dalam proses perkuliahan, penelitian, dan penyusunan tesis ini.
2. Bapak Dr. Mahfut, M.Sc., selaku pembimbing II yang telah membimbing, memberi masukan, nasehat, kritik dan saran serta membantu penulis menyelesaikan tesis ini.
3. Bapak Dr. Agus Setyawan, M.P. selaku pembahas I yang telah memberikan saran, kritik, nasehat dan koreksi selama penulis menyelesaikan tesis ini.
4. Ibu Munti Sarida, M.Sc., Ph.D. selaku pembahas II yang telah memberikan saran, kritik, nasehat dan koreksi selama penulis menyelesaikan tesis ini.

5. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., I.P.M., selaku Rektor Universitas Lampung.
6. Bapak Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si., selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Lampung.
7. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
8. Bapak Dr. Jani Master, M. Si., selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
9. Ibu Dr. Nuning Nurcahyani, M. Sc., selaku Koordinator Prodi Program Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
10. Bapak dan Ibu Dosen serta segenap Karyawan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang tidak bisa disebutkan satu-persatu atas ilmu, bimbingan, dan bantuan kepada penulis.
11. Kedua orang tua saya terkasih, Bati dan Umi (Bapak M. Alhusnu Riski dan Ibu Desiana Hilda RA) sebagai penyemangat terbaik, terima kasih atas do'a, dukungan, dan nasehat kepada penulis.
12. Serta almamater Universitas Lampung yang tercinta.

Akhir kata, penulis berharap semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi seluruh pihak baik penulis maupun pembaca.

Bandar Lampung, 6 Februari 2026
Penulis,

Azisa Nabila Putri

DAFTAR ISI

SAMPUL DEPAN.....	i
ABSTRAK.....	ii
SAMPUL DALAM.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN.....	v
MENGESAHKAN.....	vi
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	vii
RIWAYAT HIDUP.....	viii
MOTTO.....	viii
PERSEMBAHAN.....	x
SANWACANA.....	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvi
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	5
1.4 Kerangka Pikir.....	5
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 <i>Streptococcus iniae</i>	7
2.2 Kakap Putih (<i>Lates calcarifer</i> Bloch).....	8
2.3 Kerapu Macan (<i>Epinephelus fuscoguttatus</i> Forsskal).....	12
2.4 Karakterisasi Fenotipik <i>Streptococcus iniae</i>	13
2.5 <i>Streptococcus iniae</i> sebagai Patogen Akuakultur.....	14
2.6 Faktor Virulensi dan Mekanisme Patogenitas.....	14
2.7 Aktivitas Proteolitik <i>Streptococcus iniae</i>	15

2.8 Kasus Infeksi pada Kakap Putih dan Kerapu Macan.....	16
III. METODE PENELITIAN.....	17
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.2 Alat dan Bahan.....	17
3.2.1 Alat.....	17
3.2.2 Bahan.....	17
3.3 Metode Penelitian.....	18
3.3.1. Isolasi dan Pemurnian Bakteri.....	18
3.3.2. Uji Hemolisis.....	18
3.3.3. Peremajaan Kultur Isolat.....	19
3.3.4. Pewarnaan Gram Bakteri.....	19
3.3.5. Pembuatan Larutan Standar Kekeruhan McFarland.....	20
3.3.6. Uji Biokimia.....	20
3.3.7. Uji Katalase.....	20
3.3.8. Uji Oksidase.....	21
3.3.9. Uji Motilitas.....	21
3.3.10. Uji Aktivitas Protease.....	21
3.4 Analisis Data.....	21
3.5 Diagram Alir Penelitian.....	22
VI. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	24
4.1. Isolasi Bakteri.....	25
4.2. Uji Hemolisis.....	28
4.3. Pewarnaan Gram.....	32
4.4. Uji Biokimia.....	35
4.5. Uji Motilitas.....	38
4.6. Uji Aktivitas Proteolitik.....	40
4.7. Pembahasan.....	46
V. KESIMPULAN.....	53
DAFTAR PUSTAKA.....	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Bakteri <i>Streptococcus iniae</i>	8
Gambar 2. <i>Lates calcarifer</i> Bloch.....	9
Gambar 3. <i>Epinephelus fuscoguttatus</i> Forsskål.....	11
Gambar 4. Diagram Alir Penelitian.....	23

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil Isolasi Bakteri.....	24
Tabel 2. Hasil Uji Hemolisis Isolat Bakteri.....	27
Tabel 3. Hasil Pewarnaan Gram.....	30
Tabel 4. Hasil Uji Biokimia.....	34
Tabel 5. Hasil Uji Motilitas.....	39
Tabel 6. Hasil Uji Aktivitas Proteolitik.....	41
Tabel 7. Tabel Similaritas Bakteri.....	51

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dalam dua dekade terakhir sektor perikanan budidaya di Indonesia mengalami perkembangan pesat. Indonesia bahkan termasuk salah satu produsen perikanan terbesar dunia karena memiliki sumber daya laut dan perairan yang melimpah. Namun kemajuan tersebut juga diiringi tantangan serius, terutama penyakit infeksius yang berpotensi membuat kerugian ekonomi besar. Infeksi bakteri patogen menjadi salah satu hambatan utama keberhasilan budidaya ikan karena dapat menurunkan produktivitas, kualitas hasil panen, bahkan memicu kematian massal (Liu *et al.*, 2020). Salah satu bakteri patogen yang mendapat perhatian global adalah *Streptococcus iniae*. Bakteri Gram positif berbentuk *coccus* ini telah dilaporkan sebagai agen penyebab penyakit *streptococcosis* pada berbagai jenis ikan budidaya, baik air tawar maupun laut. Manifestasi klinis infeksi *S. iniae* antara lain meliputi eksophthalmia, hemoragi, kelainan neurologis, hingga septicemia sistemik yang dapat berujung pada kematian. Mortalitas akibat serangan bakteri ini dapat mencapai lebih dari 50% pada populasi ikan yang padat dan dikelola dengan manajemen kurang optimal (Liu *et al.*, 2020).

Di Indonesia dua komoditas laut yang sangat rentan terhadap penyakit ini adalah kakap putih (*Lates calcarifer* Bloch) dan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskål). Keduanya merupakan ikan bernilai ekonomi tinggi yang menjadi unggulan ekspor. Serangan *streptococcosis*

pada kedua spesies ini tidak hanya menimbulkan kerugian langsung akibat kematian ikan, tetapi juga berdampak pada kepercayaan konsumen dan pasar internasional karena terkait isu keamanan pangan (Colussi *et al.*, 2022). Keberhasilan *Streptococcus iniae* dalam menimbulkan penyakit berkaitan erat dengan faktor virulensinya. Beberapa gen virulensi penting yang telah diidentifikasi pada isolat lapangan meliputi *scpI*, *simA*, *pdi*, *SagA*, *pgmA*, dan *cpsD*. Gen-gen ini berperan dalam mekanisme patogenisitas seperti kemampuan menghindari fagositosis, degradasi jaringan inang, hingga produksi hemolisin (Zhao *et al.*, 2022). Kondisi tersebut menegaskan pentingnya karakterisasi fenotipik dan biokimia isolat *Streptococcus* dari ikan budidaya sebagai langkah awal untuk memahami potensi virulensi, pola infeksi, serta mendukung upaya pengendalian streptococcosis yang berkelanjutan dalam sistem akuakultur laut.

Penelitian terbaru menunjukkan isolat modern *Streptococcus iniae* membawa ratusan gen virulensi sekaligus gen resistensi antibiotik, yang memperberat tantangan dalam pengendalian penyakit ini (Awate *et al.*, 2023). Meskipun analisis molekuler menjadi metode utama dalam identifikasi faktor virulensi, pendekatan fenotipik masih memiliki peran penting terutama dalam penelitian dasar dan laboratorium dengan fasilitas terbatas. Karakterisasi fenotipik memungkinkan identifikasi sifat dasar bakteri seperti morfologi, motilitas, profil biokimia, serta aktivitas enzimatik. Uji biokimia menggunakan kit komersial (seperti API kit) dapat memberikan informasi mengenai metabolisme bakteri, sedangkan uji *skim milk* agar digunakan untuk mendeteksi aktivitas proteolitik yang berkaitan dengan faktor virulensi enzim protease (Zhang *et al.*, 2021).

Penelitian ini difokuskan pada karakterisasi fenotipik isolat *Streptococcus iniae* yang berasal dari organ ginjal, hati, dan limpa ikan kakap putih dan

kerapu macan. Pengambilan sampel dari organ internal seperti ginjal, limpa, dan hati pada ikan kakap putih maupun kerapu macan dilakukan karena organ-organ tersebut merupakan lokasi utama terjadinya kolonisasi dan penyebaran sistemik bakteri patogen, termasuk *Streptococcus iniae*. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa ketika infeksi *Streptococcus* berlangsung, patogen cenderung bermigrasi menuju organ visceral dan menimbulkan lesi berupa nekrosis, kongesti, hingga infiltrasi sel inflamasi pada hati, ginjal, dan limpa (Colussi et al., 2022). Hal ini juga ditegaskan oleh Xu et al. (2024) yang melaporkan bahwa isolasi *S. iniae* paling berhasil diperoleh dari organ-organ internal tersebut karena tingginya beban bakteri pada fase infeksi sistemik. Selain itu, studi diagnostik penyakit ikan yang dilakukan oleh Moreira *et al.* (2021) menunjukkan bahwa ginjal, limpa, dan hati merupakan target primer dalam proses bakteremia, sehingga jaringan ini memberikan sensitivitas yang lebih tinggi dibanding jaringan permukaan seperti kulit atau insang. Dengan demikian, pemilihan ketiga organ internal ini bukan hanya metodologis, tetapi bersifat kritis untuk memastikan keberhasilan isolasi patogen, keakuratan diagnosis, dan representativitas data dalam studi etiologi penyakit ikan. Melalui uji motilitas, uji biokimia, serta uji aktivitas enzim proteolitik diharapkan dapat diperoleh informasi mendasar mengenai potensi virulensi isolat lokal. Dengan begitu penelitian mengenai karakterisasi fenotipik dan evaluasi aktivitas proteolitik *Streptococcus iniae* dari kakap putih dan kerapu macan menjadi sangat penting, khususnya pada sistem budidaya di Lampung sebagai sentra produksi ikan laut bernilai ekonomi tinggi.

Patogen ini telah dilaporkan menyebabkan wabah dengan mortalitas signifikan serta kerugian ekonomi pada berbagai komoditas budidaya, kemampuannya menghasilkan protease berhubungan langsung dengan virulensi melalui invasi jaringan dan penghindaran respons imun inang

(Agnew *et al.*, 2007). Karakterisasi isolat lokal dari spesies target seperti kakap putih dan kerapu macan akan memberikan data yang relevan untuk kondisi lapangan, sehingga dapat menjadi dasar dalam pengembangan strategi diagnosis, biosekuriti, serta inovasi vaksin atau terapi alternatif yang lebih efektif dalam mendukung keberlanjutan industri perikanan budidaya di Lampung (Cortés *et al.*, 2024). Konteks penelitian ini semakin penting mengingat masih terbatasnya data karakter fenotipik dan potensi virulensi isolat *Streptococcus* lokal di wilayah Lampung, sementara intensifikasi budidaya dan tingginya mobilitas benih berpotensi meningkatkan risiko penyebaran strain virulen secara luas.

potensi infeksi bakteri *Streptococcus iniae* pada komoditas perikanan bernilai tinggi seperti kakap putih (*Lates calcarifer*) dan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) memiliki signifikansi penting dalam konteks pengelolaan kesehatan ikan dan keberlanjutan industri budidaya. Dengan memahami karakteristik patogen, pola infeksi, serta kemampuan bakteri dalam mengekspresikan faktor virulensi seperti hemolisin dan protease, penelitian ini memberikan kontribusi ilmiah yang diperlukan untuk memperkuat strategi biosekuriti, meningkatkan akurasi diagnosis laboratorium, dan mendukung pengembangan pendekatan manajemen penyakit yang lebih efektif pada kedua spesies ikan.

Penelitian ini dibatasi pada karakterisasi fenotipik dan uji biokimia isolat bakteri, sehingga identifikasi spesies serta penentuan tingkat virulensi secara definitif masih memerlukan konfirmasi melalui pendekatan molekuler dan uji patogenisitas lanjutan. Pembatasan tersebut didasarkan pada pertimbangan metodologis bahwa karakterisasi fenotipik merupakan tahap fundamental dalam pendekatan identifikasi bakteri secara konvensional, khususnya untuk menggambarkan variasi ekspresi karakter

isolat lapangan yang secara alami dipengaruhi oleh kondisi inang dan lingkungan. Pendekatan ini memungkinkan evaluasi sifat biologis yang benar-benar terekspresikan (*expressed phenotype*), yang dalam banyak kasus tidak selalu sepenuhnya sejalan dengan informasi genotipik terutama pada isolat lapangan yang dipengaruhi oleh kondisi inang dan lingkungan (Madigan *et al.*, 2018). Oleh karena itu, karakterisasi fenotipik relevan untuk memperoleh gambaran awal potensi patogenisitas isolat sebelum dilakukan analisis molekuler yang bersifat konfirmatif.

1.2 Tujuan Penelitian

1. Mengidentifikasi sifat fenotipik isolat *Streptococcus iniae* melalui pengamatan morfologi dan uji motilitas.
2. Menganalisis profil biokimia isolat *Streptococcus iniae* menggunakan API kit.
3. Mengevaluasi aktivitas enzim proteolitik isolat *Streptococcus iniae* melalui uji *skim milk* agar.

1.3 Manfaat Penelitian

1. Menambah pengetahuan ilmiah mengenai faktor fenotipik dan aktivitas enzimatik *Streptococcus iniae*, khususnya isolat dari komoditas perikanan laut Indonesia.
2. Menjadi dasar dalam pengembangan strategi pencegahan penyakit *streptococcosis* pada usaha budidaya kakap putih dan kerapu macan.
3. Memberikan informasi awal bagi pembudidaya dan praktisi tentang kesehatan ikan terkait deteksi dini patogen berbasis karakter fenotipik.

1.4 Kerangka Pikir

Budidaya ikan laut, khususnya kakap putih (*Lates calcarifer* Bloch) dan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal), merupakan komoditas bernilai ekonomi tinggi. Namun, keberlanjutan produksi sering terhambat oleh serangan penyakit infeksius. Salah satu jenis penyakit adalah *streptococcosis* yang disebabkan oleh *Streptococcus iniae*. Penyakit ini dapat menimbulkan gejala klinis berupa perdarahan, eksophthalmia, hingga kematian massal yang berdampak pada kerugian ekonomi pembudidaya). Tingkat patogenisitas *S. iniae* sangat dipengaruhi oleh faktor virulensi yang dimilikinya, salah satunya adalah enzim proteolitik yang berperan dalam mendegradasi jaringan inang serta mempermudah invasi bakteri.

Identifikasi dan pemahaman karakteristik bakteri patogen perlu dilakukan melalui karakterisasi fenotipik, mencakup pengamatan morfologi koloni, uji Gram, hemolisis, katalase, oksidase, serta kemampuan memfermentasi karbohidrat. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa isolat *S. iniae* dari kakap putih memiliki ciri khas Gram positif, katalase dan oksidase negatif, *non* motil, serta mampu menghidrolisis pati dan esculin (Hoa *et al.*, 2019). Variasi fenotipik ini penting dipahami karena dapat berbeda antar inang maupun lingkungan budidaya. Selain itu, evaluasi aktivitas proteolitik penting dilakukan untuk mengetahui potensi virulensi isolat. Aktivitas proteolitik dapat diamati melalui uji hidrolisis kasein pada media agar susu, di mana terbentuknya zona bening menunjukkan adanya produksi enzim protease.

Studi pada isolat bakteri ikan menunjukkan produksi enzim protease berkorelasi dengan kemampuan bakteri menyebabkan kerusakan jaringan inang (El-Noby *et al.*, 2021). Dengan demikian, aktivitas proteolitik dapat dijadikan indikator tingkat virulensi *S. iniae*. Secara konseptual, penelitian

ini berangkat dari masalah seringnya terjadi infeksi *S. iniae* pada kakap putih dan kerapu macan yang menyebabkan kematian pada ikan dan mengakibatkan kerugian ekonomi. Melalui karakterisasi fenotipik dapat diperoleh identifikasi isolat, sedangkan melalui evaluasi aktivitas proteolitik dapat diperoleh gambaran potensi virulensinya. Keterpaduan kedua analisis tersebut diharapkan mampu memberikan informasi komprehensif mengenai sifat fenotipik sekaligus potensi patogenisitas *S. iniae*. Hasilnya dapat menjadi dasar bagi strategi pencegahan dan pengendalian penyakit *streptococcosis* dalam budidaya ikan laut.

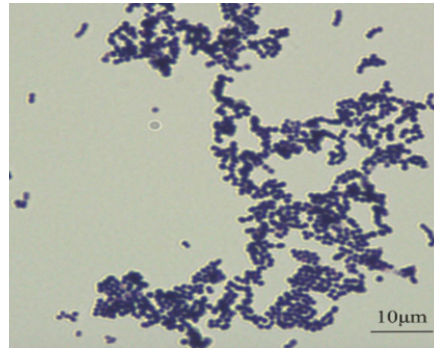
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Streptococcus iniae*

Sistematika bakteri *Streptococcus iniae* (Cortés *et al.*, 2024):

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Bacillota
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Lactobacillales
Famili	: Streptococcaceae
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Spesies	: <i>Streptococcus iniae</i>

Streptococcus iniae merupakan bakteri Gram positif berbentuk kokus. Bakteri ini bersifat fakultatif anaerob, katalase negatif, dan biasanya tersusun dalam rantai pendek (Hussain *et al.*, 2022). Patogen ini dikenal luas sebagai penyebab utama penyakit *streptococcosis* pada ikan budidaya di berbagai belahan dunia, terutama spesies bernilai ekonomi tinggi seperti nila, kakap putih (*Lates calcarifer*), dan kerapu (*Epinephelus* spp.) (Liu *et al.*, 2020). Gambar berikut memperlihatkan morfologi *Streptococcus iniae* sebagaimana dilaporkan dalam beberapa penelitian terbaru. *S. iniae* umumnya tampak sebagai kokus Gram positif yang tersusun dalam rantai pendek hingga panjang, dengan karakteristik koloni berwarna keputihan dan permukaan halus pada media agar darah. Struktur seluler yang khas ini merupakan salah satu indikator penting dalam proses identifikasi awal, terutama ketika dikombinasikan dengan pola hemolisis dan serangkaian uji biokimia lanjutan.



Gambar 1. Bakteri *Streptococcus iniae*. (Sun *et al.*, 2024)

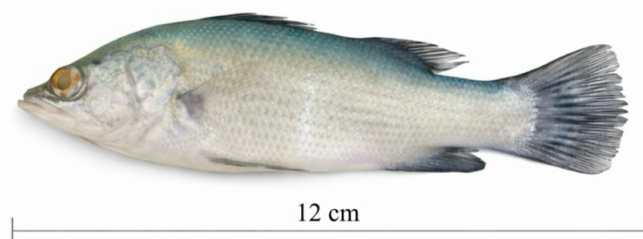
Sejak pertama kali ditemukan pada tahun 1970-an, kasus infeksi *Streptococcus iniae* terus meningkat baik pada ikan air tawar maupun ikan laut. Gejala klinis yang ditimbulkan meliputi exophthalmia, perdarahan, gangguan saraf, hingga kematian mendadak. Tingkat mortalitas bervariasi tergantung kondisi lingkungan, kepadatan tebar, serta tingkat virulensi isolat. Variasi genetik tertentu bahkan berkontribusi terhadap perbedaan patogenisitas antar *strain* (Liu *et al.*, 2020).

2.2 Kakap Putih (*Lates calcarifer* Bloch)

Sistematika ikan kakap putih (Huynh *et al.*, 2014) :

Kerajaan	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Infraphylum	: Gnathostomata
Kelas	: Actinopterygii
Ordo	: Perciformes
Famili	: Latidae
Genus	: <i>Lates</i>
Spesies	: <i>Lates calcarifer</i> Bloch

Kakap putih (*Lates calcarifer* Bloch) merupakan jenis ikan yang mampu hidup pada berbagai tingkat salinitas, baik di laut, payau, maupun air tawar karena bersifat euryhalin. Kemampuan ini didukung oleh sistem osmoregulasi yang bekerja melalui organ insang dan ginjal, terutama dengan peran enzim Na/K-ATPase dan protein transporter NKCC dalam menjaga keseimbangan ion tubuh (Saghafiankho *et al.*, 2020). Gambar berikut merupakan foto dokumentasi pribadi yang diambil langsung saat pengambilan sampel dari ikan kakap putih. Foto ini digunakan untuk menunjukkan kondisi ikan yang menjadi sumber isolat pada penelitian ini, terutama karena ikan tersebut menampakkan tanda-tanda klinis tertentu yang mengarah pada dugaan infeksi bakteri. Dengan menyertakan dokumentasi asli, penelitian ini menegaskan seluruh proses isolasi bakteri, mulai dari pengambilan organ hingga tahap identifikasi lanjutan.



Gambar 2. *Lates calcarifer* Bloch dengan panjang total ± 12 cm. Skala batang menunjukkan panjang total spesimen dan digunakan sebagai pembandingan visual proporsi tubuh. (Dokumentasi Pribadi)

Sebagai salah satu komoditas budidaya utama di Asia Tenggara, kakap putih banyak diminati karena pertumbuhan yang cepat, respons baik terhadap pakan, serta daya toleransi tinggi terhadap kondisi lingkungan. Kondisi ini mendorong berbagai penelitian yang menekankan aspek pertumbuhan, efisiensi pakan, dan kemampuan fisiologis ikan dalam beradaptasi dengan lingkungan budidaya (Windarto dkk., 2019).

2.3 Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskål)

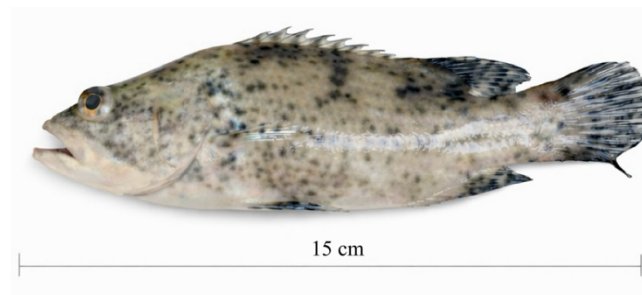
Sistematika ikan kerapu macan (Baharum *et al.*, 2015) :

Kerajaan	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Infraphylum	: Gnathostomata
Kelas	: Actinopterygii
Ordo	: Perciformes
Famili	: Serranidae
Genus	: <i>Epinephelus</i>
Spesies	: <i>Epinephelus fuscoguttatus</i> Forsskål

Kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskål) merupakan salah satu spesies kerapu yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan banyak dibudidayakan di wilayah tropis. Ikan ini umumnya dipelihara dalam keramba jaring apung di perairan pesisir, karena sistem tersebut memungkinkan sirkulasi air laut alami sekaligus menjaga kondisi lingkungan tetap stabil. Dibandingkan dengan beberapa spesies kerapu lainnya, kerapu macan juga dikenal memiliki pertumbuhan yang cukup cepat sehingga menjadi pilihan utama dalam budidaya laut (Pierre *et al.*, 2008).

Gambar berikut menampilkan ikan Kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang digunakan sebagai objek penelitian dalam studi ini. Penampilan morfologis ikan pada dokumentasi ini memberikan gambaran umum mengenai kondisi individu sebelum dilakukan proses isolasi jaringan

target (misalnya limpa, ginjal, atau jantung) untuk tujuan analisis bakteriologis. Dokumentasi visual ini juga berfungsi sebagai bukti pendukung bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian merupakan spesimen asli yang diperoleh langsung di lapangan, sehingga meningkatkan validitas proses pengambilan sampel dan keseluruhan tahapan penelitian.



Gambar 3. *Epinephelus fuscoguttatus* Forsskål dengan panjang total ± 15 cm. Skala batang menunjukkan panjang total spesimen dan digunakan sebagai pembandingan visual proporsi tubuh. (Dokumentasi Pribadi)

Untuk meningkatkan keberhasilan budidaya berbagai upaya telah dilakukan, salah satunya melalui hibridisasi dengan menyilangkan *E. fuscoguttatus* dan *E. lanceolatus*. Hasil persilangan ini biasanya menunjukkan sifat unggul, seperti laju pertumbuhan yang lebih tinggi, pemanfaatan pakan yang lebih efisien, serta ketahanan yang lebih baik terhadap kondisi lingkungan (Qu *et al.*, 2024). Penelitian terbaru mengungkapkan hibrida kerapu memiliki toleransi yang lebih tinggi terhadap suhu ekstrem. Hu *et al.* (2024) menyatakan bahwa ikan ini mampu bertahan hingga suhu 40°C dan mengalami perubahan fisiologis tertentu sebagai bentuk respons terhadap paparan panas. Temuan tersebut menunjukkan kemampuan adaptasi suhu pada hibrida menjadi faktor penting untuk mendukung keberhasilan budidaya, terutama di tengah tantangan perubahan iklim.

2.4 Karakterisasi Fenotipik *Streptococcus iniae*

Karakterisasi fenotipik merupakan langkah penting dalam memahami variasi *strain* bakteri patogen serta perannya dalam mekanisme infeksi. Pada *Streptococcus iniae*, karakterisasi fenotipik umumnya mencakup identifikasi morfologi koloni, pewarnaan Gram, hemolisis, pertumbuhan pada media spesifik, dan pengujian aktivitas enzimatik. Isolat biasanya memperlihatkan koloni kecil berwarna putih keabu-abuan, bersifat katalase-negatif, dan menghasilkan hemolisis β pada agar darah (Cortés *et al.*, 2024).

Analisis fenotipik dapat membedakan tingkat virulensi antar isolat. Beberapa *strain* memperlihatkan kemampuan membentuk *biofilm* yang lebih tinggi, yang berkorelasi dengan peningkatan kemampuan bertahan hidup di lingkungan inang (Xiong *et al.*, 2023). Uji fenotipik juga kerap digunakan untuk melengkapi data molekuler, karena ekspresi fenotipe tertentu dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan budidaya, seperti salinitas, suhu, dan ketersediaan nutrisi. Meskipun pendekatan molekuler semakin banyak digunakan, karakterisasi fenotipik tetap penting sebagai langkah awal identifikasi isolat lapangan. Karakterisasi fenotipik meliputi:

1. Pewarnaan Gram untuk mengidentifikasi sifat Gram positif.
2. Uji motilitas untuk menentukan pergerakan bakteri dalam medium semi *solid*.
3. Uji biokimia menggunakan kit API atau metode lain untuk mengetahui profil metabolisme.
4. Uji enzimatik, khususnya protease, menggunakan media *skim milk* agar atau metode *casein plate*.

Zhang *et al.* (2021) mengembangkan metode kuantitatif berbasis *casein plate* untuk mengukur aktivitas protease, yang dapat diaplikasikan juga pada penelitian patogen akuakultur. Colussi *et al.* (2022) menunjukkan kombinasi analisis fenotipik dengan pendekatan molekuler dapat memberikan gambaran lebih komprehensif mengenai virulensi *Streptococcus iniae*.

2.5 *Streptococcus iniae* Sebagai Patogen Akuakultur

Streptococcus iniae merupakan bakteri Gram positif yang bersifat zoonosis dan telah lama dikenal sebagai patogen utama pada sektor akuakultur. Infeksi bakteri ini menimbulkan penyakit *streptococcosis* pada berbagai spesies ikan budidaya bernilai ekonomi tinggi, termasuk kakap putih (*L. calcarifer* Bloch) dan kerapu macan (*E. fuscoguttatus* Forsskal) (Cortés *et al.*, 2024). Penyakit ini menyebabkan mortalitas tinggi, morbiditas yang meluas, dan kerugian finansial signifikan.

Data global menunjukkan bahwa *Streptococcus iniae* berkontribusi terhadap kerugian industri akuakultur dengan estimasi mencapai lebih dari US\$100 juta per tahun (Soh *et al.*, 2020). Penyebaran *Streptococcus iniae* sangat luas dan telah dilaporkan di Asia, Amerika, dan Eropa dengan prevalensi tinggi di daerah tropis tempat budidaya ikan laut intensif berkembang pesat (Deng *et al.*, 2024). Karakter zoonotiknya juga menjadikannya penting tidak hanya untuk sektor perikanan, tetapi juga kesehatan manusia, karena sejumlah kasus infeksi oportunistik pada manusia telah dilaporkan, terutama pada individu dengan sistem imun lemah atau dengan riwayat konsumsi ikan terinfeksi (Baiano & Barnes, 2009).

2.6 Faktor Virulensi dan Mekanisme Patogenitas *Streptococcus iniae*

Virulensi *Streptococcus iniae* dikendalikan oleh berbagai faktor, termasuk kapsul polisakarida, protein dinding sel, enzim ekstraseluler, dan toksin hemolitik. Protein M-like yang dimiliki patogen ini berperan penting dalam menghindari fagositosis oleh sel imun inang. Selain itu, adanya kluster gen yang berhubungan dengan produksi streptolisin patogen ini juga berkontribusi terhadap kerusakan jaringan dan keberhasilan infeksi sistemik. Enzim ekstraseluler seperti protease, hialuronidase, dan nuklease berfungsi mendukung kolonisasi serta invasi jaringan. Aktivitas proteolitik khususnya sangat relevan karena memungkinkan degradasi protein inang, membuka jalur bagi penetrasi bakteri, serta memfasilitasi penyebaran infeksi (Soh *et al.*, 2020). Penelitian menunjukkan bahwa aktivitas proteolitik yang tinggi sering berkorelasi dengan *strain* yang lebih virulen dan mampu menyebabkan mortalitas tinggi pada ikan budidaya (Cortés *et al.*, 2024).

2.7 Aktivitas Proteolitik *Streptococcus iniae*

Evaluasi aktivitas proteolitik *Streptococcus iniae* dapat dilakukan melalui uji enzim pada media selektif yang mengandung substrat protein seperti kasein atau gelatin. Hasil uji memperlihatkan zona bening di sekitar koloni bakteri, yang menandakan degradasi substrat akibat aktivitas protease. Perbedaan tingkat aktivitas proteolitik antar isolat dapat memberikan indikasi mengenai potensi virulensinya (Xiong *et al.*, 2023). Protease yang dihasilkan oleh *Streptococcus iniae* tidak hanya berperan dalam proses infeksi pada inang, tetapi juga mendukung kelangsungan hidup bakteri melalui pemanfaatan protein dari jaringan yang rusak atau bahan organik di sekitarnya. Selain itu, kondisi lingkungan seperti suhu dilaporkan memengaruhi regulasi ekspresi gen virulensi, termasuk gen yang berkaitan dengan produksi enzim proteolitik

(El-Noby *et al.*, 2021; Baiano & Barnes, 2009).

2.8 Kasus Infeksi pada Kakap Putih dan Kerapu Macan

Kakap putih (*Lates calcarifer* Bloch) dan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal) merupakan komoditas utama perikanan laut di Asia Tenggara. Infeksi *Streptococcus iniae* pada kedua spesies ini menimbulkan kerugian serius akibat mortalitas massal, penurunan pertumbuhan, dan peningkatan biaya pengobatan (Deng *et al.*, 2024). Laporan kasus menunjukkan isolat *S. iniae* dari kakap putih sering memperlihatkan aktivitas hemolitik yang kuat dan kemampuan proteolitik yang tinggi, sedangkan pada kerapu macan ditemukan variasi fenotipe, dengan beberapa strain menunjukkan pembentukan biofilm yang lebih tebal namun aktivitas protease yang lebih rendah (Cortés *et al.*, 2024). Perbedaan karakter fenotipik ini menunjukkan pentingnya kajian komparatif antar spesies inang untuk memahami dinamika penyakit. Informasi tersebut tidak hanya berguna dalam penyusunan strategi pengendalian penyakit, tetapi juga berpotensi mendukung pengembangan vaksin yang spesifik terhadap strain dominan di suatu wilayah (Soh *et al.*, 2020).

S. iniae dikenal sebagai bakteri patogen oportunistik yang mampu menginfeksi berbagai spesies ikan laut dan air tawar. Patogenisitas bakteri ini berkaitan erat dengan kemampuannya mengekspresikan berbagai faktor virulensi, seperti hemolisin, enzim proteolitik, serta kemampuan membentuk biofilm (Locke *et al.*, 2007). Faktor-faktor tersebut berperan penting dalam proses kolonisasi, invasi jaringan, dan penyebaran infeksi secara sistemik pada inang. Variasi tingkat ekspresi faktor virulensi antar isolat telah banyak dilaporkan dan sering dikaitkan dengan perbedaan spesies inang, kondisi lingkungan perairan, serta tekanan seleksi dalam sistem budidaya.

Selain faktor virulensi, karakter fenotipik dan biokimia *S. iniae* juga digunakan sebagai dasar dalam identifikasi dan penentuan kedekatan taksonomi antar isolat. Perbedaan pola hemolisis, aktivitas enzimatis, dan kemampuan pembentukan biofilm memberikan informasi penting mengenai potensi patogenitas dan adaptasi bakteri terhadap lingkungan inang. Oleh karena itu, kajian yang mengombinasikan analisis fenotipik, biokimia, dan virulensi menjadi pendekatan yang umum dalam memperoleh pemahaman yang lebih komprehensif mengenai peran *S. iniae* sebagai patogen pada ikan budidaya.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus–Oktober 2025. Pengambilan serta pembedahan sampel ikan kakap putih dan kerapu macan dilakukan di Balai Besar Perikanan dan Budidaya Laut (BBPBL) Provinsi Lampung. Selanjutnya, uji laboratorium terhadap isolat bakteri terpilih dilakukan di Laboratorium Biomolekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik, spatula, botol *scott*, erlenmeyer, *beaker glass*, *hotplate*, cawan petri, *autoclave*, laminar *air flow*, inkubator, bunsen, jarum ose bulat, jarum ose biasa, *spreader glass*, *showcase*, kertas saring, corong, pipet volumetri, bulb, jangka sorong, aluminium foil, tabung reaksi, *L-spreader*, rak tabung, oven, gelas ukur, mortal alu, stirrer, kapas, karet, plastik, kertas label, tisu, sarung tangan, dan masker.

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kakap putih, kerapu macan, media *Tryptic Soy Agar* (TSA), darah domba 5%, media *Tryptic Soy Broth* (TSB), *Skim Milk Agar* (SMA), *Motility Test Medium*

(MTM), API 20 E kit, *crystal violet*, *mordant lugol*, safranin, Etanol 96%, Etanol 70%, NaCl, H₂SO₄, H₂O₂, BaCl₂, strip oksidase, dan akuades steril.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Isolasi dan Pemurnian Bakteri

Potongan kecil organ target (ginjal, hati, dan limpa) dimasukkan ke dalam tabung yg berisi NaCl 10 mL kemudian cairan tersebut diambil sebanyak 1 mL dan diinokulasi pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) yang diperkaya 5% darah domba lalu disebar menggunakan *L-spreader*. Inkubasi dilakukan pada suhu 28–30 °C selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh diamati berdasarkan morfologi, termasuk bentuk, ukuran, warna, permukaan, dan mukoiditas (Yuasa *et al.*, 2008).

3.3.2. Uji Hemolisis

Uji hemolisis dilakukan untuk menentukan kemampuan isolat *Streptococcus iniae* dalam mendegradasi sel darah merah pada media *Blood Agar*. Media disiapkan dengan menambahkan 5% darah domba defibrinasi ke dalam *Blood Agar* yang telah disterilkan dan didinginkan hingga $\pm 45-50^{\circ}\text{C}$ sebelum dituangkan ke dalam cawan petri. Setelah media memadat, sebanyak 1 Ose kultur bakteri yang telah diremajakan distreak secara kuadran pada permukaan agar menggunakan metode streak plate. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu $28-30^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Pola hemolisis yang terbentuk di sekitar koloni diamati untuk menentukan tipe hemolisis (α , β , atau γ) sebagai salah satu karakter fenotipik penting dalam identifikasi dan penentuan potensi virulensi bakteri *streptococcus* patogen pada ikan (Quinn *et al.*, 2011; Austin & Austin, 2007; Forbes *et al.*, 2016).

3.3.3. Peremajaan Kultur Isolat

Isolat terpilih yang menunjukkan degradasi pada media agar darah dipindahkan dengan jarum Ose steril lalu digores pada media TSA dan diambil satu Ose kemudian diinokulasikan pada media TSB lalu diinkubasi di inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam (Nugraheni dkk., 2021).

3.3.4. Pewarnaan Gram Bakteri

Uji pewarnaan Gram diawali dengan fiksasi apus bakteri, pewarnaan dengan *crystal violet* dan *mordant lugol*, lalu dekolorisasi cepat dengan etanol atau aseton untuk membedakan bakteri berdasar ketahanan dinding sel mereka. Metode pewarnaan Gram digunakan untuk membedakan bakteri berdasarkan perbedaan struktur dinding selnya, sehingga terbagi menjadi Gram positif yang mempertahankan warna ungu *crystal violet* dan

Gram negatif yang terwarnai merah oleh safranin. Prosedur ini dilakukan dengan membuat preparat *smear* dari kultur bakteri yang telah difiksasi panas, kemudian diwarnai berturut-turut dengan *crystal violet* sebagai pewarna primer, larutan iodin sebagai *mordant*, alkohol sebagai dekolorisasi, dan safranin sebagai *counterstain*. Hasil pewarnaan kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya terang dengan perbesaran 400× menggunakan minyak imersi, sehingga dapat diamati morfologi dan reaksi Gram bakteri (Liu *et al.*, 2020).

3.3.5. Pembuatan Larutan Standar Kekeruhan McFarland

Standar McFarland adalah larutan yang terbuat dari 9,95 mL H₂SO₄ 1% dan 0,05 mL BaCl₂ 1% (Konsentrasi 1,5 x 10⁸ CFU/mL). Ketika tabung yang berisi larutan standar kekeruhan McFarland digoyangkan dan larutan memiliki tingkat kekeruhan yang sama dengan inokulum bakteri (Mahesh *et al.*, 2024).

3.3.6. Uji Biokimia

Identifikasi biokimia dilakukan menggunakan API 20 E kit sesuai protokol pabrikan (bioMérieux). Suspensi bakteri dengan standar McFarland 0,5 diinokulasikan ke strip API, kemudian diinkubasi 24 jam pada 30 °C. Profil metabolisme yang dihasilkan dibandingkan dengan database API untuk konfirmasi identitas bakteri. Kit API telah digunakan luas untuk identifikasi *Streptococcus* spp. pada ikan budidaya (Awate *et al.*, 2023).

3.3.7. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan mengambil koloni bakteri berumur 18–24 jam dari media padat, kemudian diletakkan di kaca objek dan ditetesi 1–2

tetes H₂O₂ 3%. Dengan terbentuknya gelembung cepat menandakan hasil positif, sedangkan tidak adanya gelembung menunjukkan negatif (Taylor & Achanzar, 1972; American Society for Microbiology, 2020).

3.3.8. Uji Oksidase

Uji oksidase metode strip dilakukan dengan mengoleskan koloni bakteri muda pada strip atau disk yang telah mengandung reagen tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD); perubahan warna menjadi ungu dalam ≤10 detik menunjukkan hasil positif, sedangkan tidak adanya perubahan warna atau muncul setelah >60 detik dianggap negatif (Chavan *et al.*, 2022).

3.3.9. Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan menggunakan media *Motility Test Medium* (0,4% agar). Koloni tunggal diinokulasikan secara tusuk lurus ke dalam media, kemudian diinkubasi pada 30 °C selama 24 jam, masing-masing dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Hasil positif ditunjukkan oleh difusi pertumbuhan menyebar dari garis inokulasi, sedangkan pertumbuhan terbatas hanya pada jalur tusukan menunjukkan hasil negatif. Uji ini penting untuk membedakan *Streptococcus iniae* yang bersifat non motil dari bakteri patogen lain (Colussi *et al.*, 2022).

3.3.10. Uji Aktivitas Protease

Isolat diinokulasikan pada medium *Skim Milk Agar* (10% susu *skim* dan 3% agar) yang telah dibuat sumuran dengan diameter 0.5 cm, dan sebanyak 1 mL suspensi bakteri dimasukkan ke dalam sumuran, kemudian masing-masing dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Kemudian diinkubasi pada suhu 28–37 °C. Aktivitas proteolitik ditunjukkan oleh zona bening di

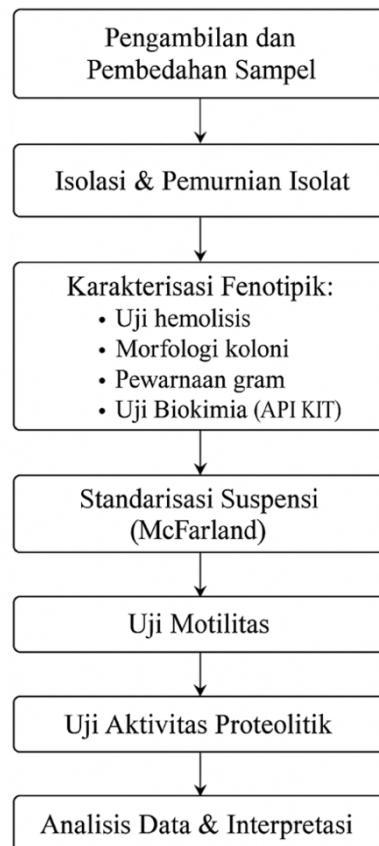
sekitar koloni akibat adanya degradasi kasein. Ukuran zona bening digunakan untuk menilai tingkat produksi protease (Vijayaraghavan, 2013).

3.4 Analisis Data

Data dianalisis secara deskriptif dengan menyajikan dokumentasi visual berupa morfologi koloni, zona bening pada uji proteolitik, serta pola pertumbuhan pada media. Hasil setiap pengujian dibandingkan dengan literatur terkait karakter fenotipik *Streptococcus iniae* serta database acuan untuk memperoleh gambaran karakter fenotipik dan aktivitas proteolitik isolat bakteri.

3.5 Diagram Alir Penelitian

Tahap penelitian ini disajikan dalam bentuk diagram alir yang dapat dilihat pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Diagram Alir Penelitian.

V. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah diuraikan pada bab sebelumnya, didapat kesimpulan yang berkaitan dengan kejadian infeksi bakteri pada ikan kakap putih (*Lates calcarifer*) dan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*).

1. Isolat bakteri yang diperoleh dari organ ginjal, hati, dan limpa ikan kakap putih serta kerapu macan menunjukkan karakter fenotipik yang konsisten dengan *Streptococcus iniae* ditandai dengan koloni berwarna putih krem, bentuk kokus rantai pendek, bersifat Gram positif, dan tidak motil.
2. Profil biokimia isolat berdasarkan pengujian menggunakan API Kit menunjukkan pola reaksi yang selaras dengan karakteristik *Streptococcus iniae*. Analisis kesesuaian terhadap profil acuan menunjukkan isolat AG1 memiliki kesamaan profil biokimia tertinggi terhadap karakter referensi *S. iniae*.
3. Seluruh isolat menunjukkan kemampuan proteolitik yang baik melalui uji *skim milk* agar dengan diameter zona bening yang berada pada rentang 3 cm. Dua isolat (DG10 dan AG1) menunjukkan aktivitas lebih kuat (diameter 4,0 cm dan 4,5 cm).

DAFTAR PUSTAKA

- Abd El Tawab, A., El Hofy, F., Ali, N., Saad, W., El-Mougy, E., & Mohammed, A. (2022). Antibiotic resistance genes in *Streptococcus iniae* isolated from diseased *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, 26(2), 413–428. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2022.230602>
- Agnew, W., & Barnes, A. C. (2007). *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*, 122(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.002>
- Ali, N. G. (2022). Virulence associated genes profiling of *Streptococcus iniae* isolated from diseased Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Benha Veterinary Medical Journal*, 42(2), 186–190. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2022.132871.1514>
- Amal, M. N. A., Zamri Saad, M., & Siti Zahrah, A. (2013). Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fishes in Malaysia. *Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, 115(1), 20–30. <https://doi.org/10.1111/jambio0020>
- Austin, B. (2011). Taxonomy of bacterial fish pathogens. *Veterinary Research*, 42, 20. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-20>
- Austin, B., & Austin, D. A. (2007). Bacterial pathogens of fish. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1473–1490. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03135.x>
- Austin, B., & Austin, D. A. (2012). Characteristics of bacterial pathogens of fish. *Veterinary Research*, 43, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-1>
- Awate, S., Mubarka, S., & Huber, R. G. (2023). Whole genomic characterization of *Streptococcus iniae* isolates from Barramundi (*Lates calcarifer*) and preliminary evidence of cross protective immunization. *Vaccines*, 11(9), 1443. <https://doi.org/10.3390/vaccines11091443>
- Baharum, S. N., Nurdalila, A'w., Kumar, S. V., Rodrigues, K. F., & Hamidun, B. (2015). Homogeneous Nature of Malaysian Marine Fish *Epinephelus fuscoguttatus* (Perciformes; Serranidae): Evidence Based on Molecular Markers, Morphology and Fourier Transform Infrared Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 14884–14900.

<https://doi.org/10.3390/ijms160714884>

- Bamba, M., Kaneko, Y., Ikeda, R., & Nakashima, T. (2024). Simple and quantitative image analysis of hemolysis zones produced by *Bacillus subtilis* on blood agar media. *Biology Methods and Protocols*, 9(1).
<https://doi.org/10.1093/biomethods/bpae044>
- Baiano, J. C. F., & Barnes, A. C. (2009). Towards control of *Streptococcus iniae*. *Emerging Infectious Diseases*, 15(12), 1891–1896.
<https://doi.org/10.3201/eid1512.090232>
- Brite, M., Susanto, G. N., Setyawan, A., Mahfut, Adiputra, Y. T., & Aditya, T. W. (2025). Exploring the microbiome of hematopoietic organs in Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch): Pathogen prevalence (Presentasi lisan). International Conference on Medical Science & Health (ICOMESH), Indonesia.
- Chakkour, M. (2024). Overview of *Proteus mirabilis* pathogenicity and virulence. *Microorganisms*, 12(2), 312. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020312>
- Chavan, D. D., Anokhe, A., & Kalia, V. (2022). Oxidase test: A biochemical method in bacterial identification. *AgriCos e-Newsletter*, 3(1), 229–232.
https://www.agricosemagazine.com/_files/ugd/93e822_5c9e350b414f4de5aacc49ddaba93945.pdf
- Chideroli, R. T., Pereira, D. F., da Silva, L. F., de Souza, L. D., & Ranzani-Paiva, M. J. T. (2019). *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Pathological and molecular characterization. *Aquaculture Reports*, 15, 100217. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100217>
- Colussi, S., Pastorino, P., Mugetti, D., Antuofermo, E., Sciuto, Esposito, G., Polinas, M., Tomasoni, M., Burrai, G. P., Fernández Garayzábal, J. F., Acutis, P. L., Pedron, C., & Prearo, M. (2022). Isolation and Genetic Characterization of *Streptococcus iniae* Virulence Factors in Adriatic Sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Microorganisms*, 10(5), 883.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10050883>
- Cortés Juárez M. Z., Casados Vázquez, L. E., Martínez Díaz, S., F., & Cardona Félix, C. (2024). *Streptococcus iniae* in aquaculture: a review of pathogenesis, virulence, and antibiotic resistance. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 12(1), 25–38.
<https://doi.org/10.1080/23144599.2024.2348408>
- Deng, Y., Lin, Z., Xu, L., Jiang, J., Cheng, C., Ma, H., & Feng, J. (2024). A first report of *Streptococcus iniae* infection in the spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1404054. DOI: 10.3389/fvets.2024.1404054. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1404054>

- Elgaml, A., & Miyoshi, S. (2017). Regulation systems of protease and hemolysin production in *Vibrio vulnificus*. *Microbiology and Immunology*, 61(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12465>
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8–9), 827–839. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00038-6)
- El-Noby, G. A., Hassanin, M., El-Hady, M., & Aboshabana. (2021). A review article on an emerging pathogen of farmed fishes *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 25(1), 123–139. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2021.138469>
- Facklam, R. (2002). What happened to the *streptococci*: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 613–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.613-630.2002>
- Figaj, D., Ambroziak, P., Przepiora, T., & Skorko-Static, R. (2019). The role of proteases in the virulence of plant pathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/mpp.12836>
- Fischer, A., Azam, N., Rasga, L., Barras, V., Tangomo, M., Renzi, G., Vuilleumier, N., Schrenzel, J., & Cherkaoui, A. (2021). Performances of automated digital imaging of Gram stained slides with on screen reading against manual microscopy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(10), 2171–2176. <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04233-2>
- Franco Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka Stępień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Alexandru, G., Sharifi Rad, J., Coutinho, H. D. M., & Martins, N. (2019). Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms: From conventional to modern methods. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2066. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02066>
- Frontiers Microbiology. (2024). Pathogenicity of *Streptococcus iniae* causing mass mortalities of yellow catfish. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1374688. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1374688>
- Fuller, J. D., Camus, A. C., Duncan, C. L., Nizet, V., Bast, D. J., Thune, R. L., Low, D. E., & de Azavedo, J. C. (2002). Identification of a streptolysin S associated gene cluster and its role in the pathogenesis of *Streptococcus iniae* disease. *Infection and Immunity*, 70(10), 5730–5739. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5730-5739>
- Fuller, J. D., Camus, A. C., Duncan, C. L., Nizet, V., Bast, D. J., Thune, R. L., & Mulks, M. H. (2007). *Streptococcus iniae* β hemolysin streptolysin S is a virulence factor in fish infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 76, 17–26.

<https://doi.org/10.3354/dao076017>

- Gai, C., Zheng, X., Xu, L., Diao, J., Ye, H., Yu, X., & Cao, H. (2023). Haemolytic *Bacillus subtilis*, a potential pathogen of hemorrhage disease in farmed yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 75(2), 1-12. <https://doi.org/10.46989/001c.84493>
- Gao, D., Zhang, Y., & Chen, L. (2023). Whole-genome characterization of *Streptococcus iniae* isolates from barramundi (*Lates calcarifer*). *Vaccines*, 11(9), 1443. <https://doi.org/10.3390/vaccines11091443>
- Green, E. R., & Mecsas, J. (2016). Bacterial secretion systems: An overview. *Microbiology Spectrum*, 4(1), VMBF-0012-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>
- Han, J., Luo, X., Xu, D., & Wang, Y. (2024). A first report of *Streptococcus iniae* infection of the spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). *Diseases of Aquatic Organisms*, 158, 45–52. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38895715/>
- Han, H. J., Kim, T.-H., Kim, S.-J., & Cho, M. (2024). Phenotypic, genotypic, and pathogenic diversities of *Streptococcus iniae* isolated from cultured rockfish (*Sebastes schlegelii*) in South Korea. *SSRN*. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4851348
- Heckman, T. I., Griffin, M. J., Camus, A. C., LaFrentz, B. R., Morick, D., Smirnov, R., Ofek, T., & Soto, E. (2020). Multilocus sequence analysis of diverse *Streptococcus iniae* isolates indicates an underlying genetic basis for phenotypic heterogeneity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 141, 53–69. <https://doi.org/10.3354/dao03521>
- Hussain, A., Murray, F. J., Vaughan, T. G., Haigh, R. D., & Bayliss, C. (2022). A high-quality reference genome for the fish pathogen *Streptococcus iniae*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 896191. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000777>
- Huynh, T., Smith, J., Vij, S., Purushothaman, K., Gopikrishna, G., Lau, D., Saju, J. M., Shamsudheen, K. V., Kumar, K. V., Basheer, V. S., Gopalakrishnan, A., Hossain, S. M., Sridhar, S., Scaria, V., Jena, J. K., Ponniah, A. G., & Orbán, L. (2014). Barcoding of Asian seabass across its geographic range provides evidence for multiple cryptic lineages. *Frontiers in Marine Science*, 1, Article 30. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00030>
- Hoa, T. T., Oanh, D. T. H., & Phuoc, N. N. (2018). Pathological characteristics of *Streptococcus iniae* isolated from Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Can Tho University Journal of Science*, 55(4), 84–90. <https://sj.ctu.edu.vn/ql/docgia/download/baibao-48742/13-TS-TRUONG%20THI%20HOA%28156-163%29052.pdf>

- Hu, Y ., Tan, Y ., Liu, J., Tang, H., Wang, K., Tang, F., Luo, J., & Wen, X. (2024). Analysis of the response to high temperature stress in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂). *Frontiers in Marine Science*, 11, 1466656. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1466656>
- Jom Faperika. (2022). Histopathology liver and kidney of tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Streptococcus iniae*. *Jurnal Online Mahasiswa Perikanan*, Universitas Riau. <https://jom.unri.ac.id/index.php/JOMFAPERIKA/article/view/11875>
- Kayansamruaj, P., Pirarat, N., & Katagiri, T. (2015). Susceptibility of freshwater rearing Asian seabass (*Lates calcarifer*) to pathogenic *Streptococcus iniae*. *Aquaculture Research*, 46(4), 1015–1023. <https://doi.org/10.1111/are.12917>
- Kim, S. J., Cegelski, L., Preobrazhenskaya, M., & Schaefer, J. (2014). Peptidoglycan architecture of Gram-positive bacteria by solid-state NMR. *Biochemistry*, 53(40), 6250–6260. <https://doi.org/10.1021/bi500774q>
- Klesius, P. H., Shoemaker, C. A., & Evans, J. J. (2011). Pathological changes in cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) spontaneously infected with *Streptococcus iniae*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(3), 473–477. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21932531/>
- Kroeker, K., & Shafir, S. (2020). Specific pathogens and microbial abundance within liver and kidney tissues of wild marine fish from the Eastern Mediterranean Sea. *Marine Biology Research*, 16(3), 234–246. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32059079/>
- Kusdarwati, R., Amin, M., & Wardana, A. B. (2021). DNase and Gelatinase Activities Of β Hemolysin *Aeromonas hydrophila* Isolated from Catfish (*Clarias batrachus*). *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 10(3), 331-340. DOI: 10.20473/jafh.v10i3.25918.
- Liu, J., Yang, F., Peng, S., Geng, Y., Huang, X., Ouyang, P., Li, Z., & Chen, D. (2020). Molecular characterization and pathogenicity of *Streptococcus iniae* in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture Research*, 51(12), 5259-5264. <https://doi.org/10.1111/are.14837>
- Liao, C., Li, Y., & Liu, J. (2022). Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and their roles in infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7536. <https://doi.org/10.3390/ijms23147536>
- Locke, J. B., Colvin, K. M., Varki, N., Vicknair, M. R., Nizet, V., & Buchanan, J. T. (2007). *Streptococcus iniae* β -hemolysin streptolysin virulence factor in fish infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 76, 17–26. <https://doi.org/10.3354/dao076017>

- Locke, J. B., Aziz, R. K., Vicknair, M. R., Nizet, V., & Buchanan, J. T. (2008). *Streptococcus iniae* M-like protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development. *Plos One*, 3(7), e2824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002824>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2018). Brock Biology of Microorganisms (15th ed.). *Pearson*. <https://www.pearson.com/store/p/brock-biology-of-microorganisms/P100000649220>
- Mahesh, P., Kolape, J., Sultana, H., & Neelakanta, G. (2024). McFarland standards based spectrophotometry method for calculating approximate multiplicity of infection for an obligate intracellular bacterium. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1520126. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13030662>
- Matsuyama, T., Kamaishi, T., Ooseko, N., Kurohara, K., & Iida, T. (2005). Pathogenicity of motile and non-motile *Edwardsiella tarda* to some marine fish. *Fish Pathology*, 40(3), 133–135. <https://doi.org/10.3147/jsfp.40.133>
- Moreira, M., Schrama, D., & Zambonino-Infante, J. L. (2021). Fish pathology research and diagnosis in aquaculture. *Pathogens*, 10(2), 187. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7827161/>
- Niu, G., Khattiya, R., Zhang, T., Boonyayatra, S., & Wongsathein, D. (2020). Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus* spp. isolated from tilapia (*Oreochromis* spp.) cultured in Thailand. *Journal of Fish Diseases*, 43(3), 391–398. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31984538/>
- Nugraheni, I. A., Setianah, & Wibowo, D. (2021). Aktivitas antibakteri dari bakteri endofit asal akar ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Biomedika*, 7(2), 50–61. <https://doi.org/10.23917/biomedika.v13i1.11009>
- Ortega, C., García, I., Irgang, R., Fajardo, R., Tapia Cammas, D., Acosta, J., & Avendaño Herrera, R. (2018). First identification and characterization of *Streptococcus iniae* obtained from tilapia (*Oreochromis aureus*) farmed in Mexico. *Journal of Fish Diseases*, 41(5), 773–782. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29315698/>
- Philip, J. S., McNally, L., Baker, M. A. B., Grewal, S., Scadden, J., & Puente-Lelievre, C. (2025). Mapping the loss of flagellar motility across the tree of life. *The ISME Journal*, 19(1), wraf111. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wraf111>
- Pierre, S., Gaillard, S., Prévot-D'Alvise, N., Aubert, J., Rostaing-Capaillon, O., Leung-Tack, D., & Grillasca, J.-P. (2008). Grouper aquaculture: Asian success and Mediterranean trials. *Aquaculture Research*, 39(10), 1063–1073.

<https://doi.org/10.1002/aqc.840>

- Putri, N. R., Sukenda, & Lusiastuti, A. M. (2023). Kidney and liver histopathology of sea bass (*Lates calcarifer*) infected with black body syndrome associated bacteria. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 22(1), 1–10.
<https://journal.ipb.ac.id/index.php/jai/article/view/46683>
- Qu, Y.; Yin, Z.; Fan, X.; Hu, H.; Cui, H.; Cui, Z.; Qu, K.; Li, H. (2024). A comparative analysis of growth and nutritional quality of the hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) in simulated pond system and recirculating aquaculture system. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1378735. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1378735>
- Rohde, M. (2019). The Gram-positive bacterial cell wall. *Microbiology Spectrum*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018>
- Ruedas, S., González-Escalona, N., & Martínez-Urtaza, J. (2008). Motility and flagellin gene expression in the fish pathogen *Vibrio salmonicida*: Effects of salinity and temperature. *Microbial Pathogenesis*, 45(4), 258–264.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.06.002>
- Saghafiankho, S., Salati, A. P., Haghighi, M., Dehghani, M., & Safari, R. (2020). Effects of different levels of salinity on NKA and NKCC expression in Asian sea bass (*Lates calcarifer*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 21(1), 1–7. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v21_1_01
- Shah, Z., Ahsan, A., Li, M., Zhang, X., & Sun, D. (2023). Comparative genomic analysis reveals virulence gene clusters and host adaptation mechanisms of *Streptococcus iniae*. *BMC Genomics*, 24, 102.
<https://doi.org/10.1186/s12864-023-09882-5>
- Shields, P., Cathcart, L., & Kennedy, M. (2020). Oxidase Test Protocol. *American Society for Microbiology*.
<https://asm.org/getattachment/00ce8639-8e76-4acb-8591-0f7b22a347c6/oxidase-test-protocol-3229.pdf>
- Soh, K. Y., Loh, J. M. S., Hall, C., & Proft, T. (2020). Functional analysis of two novel *Streptococcus iniae* virulence factors: extracellular nuclease (SpnAi) and secreted nucleotidase (S5nAi). *Microorganisms*, 8(9), 1361.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091361>
- Sun, J., Li, X., Zhang, Y., Wang, H., & Chen, L. (2024). Identification and characterization of *Streptococcus iniae* isolated from diseased farmed American bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Aquaculture Reports*, 30, 101345.
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.101345>

- Suzuki, Y., Ohnishi, M., & Watanabe, K. (2018). The impact of motility on the localization of *Lactobacillus agilis* in the murine gastrointestinal tract. *BMC Microbiology*, 18(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1219-3>
- Takahashi, E., Ozaki, H., Fujii, Y., Kobayashi, H., Yamanaka, H., Arimoto, S., Negishi, T., & Okamoto, K. (2014). Properties of hemolysin and protease produced by *Aeromonas trota*. *PLOS ONE*, 9(3), e91149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091149>
- Taylor, W. I., & Achanzar, D. (1972). Catalase test as an aid to the identification of *Enterobacteriaceae*. *Applied Microbiology*, 24(1), 58–61. <https://doi.org/10.1128/am.24.1.58-61.1972>
- Truckee Meadows Community College (TMCC). (n.d.). Blood agar and hemolysis patterns. *Microbiology Resource Center*. <https://www.tmcc.edu/microbiology-resource-center/culture-media>
- Upadhyaya, P. M. G., Umapathy, B. L., & Ravikumar, K. L. (2010). *Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Laboratory Physicians*, 2(2), 100–104. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.72159>
- Vijayaraghavan, P., & Vincent, S. G. P. (2013). A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresol green dye. *Journal of Biochemical Technology*, 4(3), 628-630. <https://jbiochemtech.com/storage/models/article/byB41QeyKSJsoAawA52SG1vYPJbXuo1Wmo3BgNvjYizBUSCPH469PdmGwb9H/a-simple-method-for-the-detection-of-protease-activity-on-agar-plates-using-bromocresolgreen-dye.pdf>
- Wang, Q., Zhang, J., & Liu, Y. (2022). Virulence factors and hemolytic activity of *Aeromonas hydrophila* isolated from cultured marine fish. *Aquaculture Research*, 53(6), 2245–2255. <https://doi.org/10.1111/are.16445>
- Whyte, S. K. (2007). The innate immune response of finfish. A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(6), 1127–1151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.06.005>
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2014). Prescott's Microbiology (9th ed.). *McGraw-Hill Education*. ISBN 978-981-4581-56-1.
- Windarto, S., Suryono, A., & Prasetyo, B. (2019). Performa pertumbuhan ikan kakap putih (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) yang dibudidayakan dengan sistem keramba jaring apung (KJA). *Jurnal Akuakultur Satwa Tropis*, 1(2), 45–53. <https://doi.org/10.14710/sat.v3i1.4195>

- Woo, P. T. K., & Cipriano, R. C. (Eds.). (2017). Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection. *CABI*.
<https://doi.org/10.1079/9781780647784.0000>
- Xiong, X., Chen, R., & Lai, J. (2023). Comparative genomics analysis of *Streptococcus iniae* isolated from *Trachinotus ovatus*: novel insight into antimicrobial resistance and virulence differentiation. *BMC Genomics*, 24(1), 775. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09882-5>
- Xu, D., Lin, M., Zeng, Q., Wang, Z., Li, J., & Chen, J. (2024). Pathogenicity of *Streptococcus iniae* causing systemic infection in yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*) and associated histopathological changes. *Aquaculture Reports*, 28, 101754. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101754>
- Yang, Y., Chen, H., Zhang, Y., Wang, H., Li, X., Lin, S., & Lian, X. (2025). Proteomic and functional analysis reveals temperature driven immune evasion strategies of *Streptococcus iniae* in yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*). *Biology*, 14(8), 986. <https://doi.org/10.3390/biology14080986>
- Yuasa, K., Kamaishi, T., Hatai, K., Bahnnan, M., & Borisuthpeth, P. (2008). Two cases of streptococcal infections of cultured tilapia in Asia. In M. G. Bondad-Reantaso, C. V. Mohan, M. Crumlish, & R. P. Subasinghe (*EdStreptococcus*), Diseases in Asian Aquaculture VI (pp. 259–268). *Fish Health Section, Asian Fisheries Society*.
https://www.fhs-afs.net/daa_vi_files/19.pdf
- Zhang, X., Shuai, Y., Tao, H., Li, C., & He, L. (2021). Novel method for the quantitative analysis of protease activity: the casein plate method and its application *Streptococcus* ACS Omega, 6(5), 3675-3680. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05192>
- Zhao, R., Wang, X., Wang, X., Du, B., Xu, K., Zhang, F., Jiang, C., Zhao, Y., & Zhu, Y. (2022). Molecular characterization and virulence gene profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with bloodstream infections in southern China. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1008052. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1008052>