Jurnal Ilmu-ilmu Perikanan dan Budidaya Perairan
Volume 18, Nomor 2, Desember 2023: 170-180
https://jurnal.univpgri-palembang.ac.id/index.php/ikan

TINGKAT PATOGENISITAS BAKTERI *Vibrio* sp. STRAIN IS8 YANG DIINFEKSI PADA KERANG BATIK (*Ruditapes philippinarum*) MENGGUNAKAN METODE *IN VITRO*

Pathogenicity level of Vibrio sp. strain IS8 bacteria infected to Manila Clam (Ruditapes philippinarum) using In Vitro Assays

Ciptaning Weargo Jati[*1], Huriyatul Fitriyah Noor[1], Juli Nursandi[2], Rahma Mulyani[3]

[1]Aquaculture Department, Universitas Lampung, Lampung, Indonesia
[2]Aquaculture Department, Politeknik Negeri Lampung, Lampung, Indonesia
[3]Fish Culture Department, Universitas PGRI Palembang, Palembang, Indonesia

**Corresponding author*: ciptaning.jati@fp.unila.ac.id

ABSTRAK

Kerang, khususnya jenis *Ruditapes* philippinarum, memiliki nilai ekonomis tinggi di Prancis dan banyak wilayah lainnya. Meskipun teknologi budidaya dan pengendalian penyakit berkembang pesat, penyakit musiman seperti *Brown Ring Disease* (BRD) atau penyakit cincin coklat tetap menjadi tantangan dalam budidaya *R. philippinarum*. Penyakit ini disebabkan oleh *Vibrio tapetis*, yang memiliki dampak patogenik yang signifikan pada kerang. Penelitian ini fokus pada pengujian tingkat patogenisitas *V. tapetis* strain IS8 pada kerang batik (R. philippinarum). Melalui uji aderensi dan fagositosis, kami mengevaluasi kemampuan bakteri ini untuk menyebabkan efek aderen pada hemosit kerang dan aktivitas fagositosis. Hasilnya menunjukkan bahwa V. tapetis strain IS8 memiliki tingkat patogenisitas yang sangat tinggi, dengan kemampuan aderensi dan aktivitas fagositosis yang lebih tinggi dari kontrol positif. Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa V. tapetis strain IS8 mampu menginduksi penyakit cincin coklat pada kerang batik dan memiliki dampak patogenik yang signifikan. Pengetahuan lebih lanjut tentang mekanisme infeksius bakteri ini diperlukan untuk meningkatkan pemahaman tentang peran mereka dalam budidaya kerang di masa depan.

Kata kunci: Penyakit Cincin Coklat, *Vibrio tapetis,* Kerang Batik, *Ruditapes philippinarum*

ABSTRACT

Clams, particularly Ruditapes philippinarum, hold significant economic value in France and various other regions. Despite rapid advancements in culture technology and disease control, seasonal diseases such as Brown Ring Disease (BRD) continue to pose a challenge in the cultivation of R. philippinarum. This ailment is attributed to Vibrio tapetis, exhibiting a substantial pathogenic impact on clams. This study concentrates on assessing the pathogenicity level of V. tapetis strain IS8 in the Manila clam (R. philippinarum). Through adhesion and phagocytosis assays, we evaluate the capability of V. tapetis strain IS8 to induce adhesion effects on clam hemocytes and phagocytic activity. The results demonstrate that V. tapetis strain IS8 exhibits a remarkably high level of pathogenicity, surpassing the positive control in both adhesion and phagocytosis assays. In conclusion, this research establishes that V. tapetis strain IS8 can induce Brown Ring Disease in Manila clams, showcasing a significant pathogenic

impact. Further comprehension of the infectious mechanisms of this bacterium is essential for enhancing our understanding of their role in clam cultivation in the future.

***Keywords**: Brown Ring Disease, Vibrio Tapetis, Manila Clam, Ruditapes philippinarum*

PENDAHULUAN

Kerang merupakan komoditas bernilai ekonomis tinggi (Bald dan Borja, 2002; Becker *et al.* 2008; Chen *et al.,* 2021). Baik di Asia maupun Benua Eropa, komoditas budidaya ini memiliki peminat yang tinggi. Salah satunya di negara Prancis. Kerang jenis *Ruditapes philippinarum* telah banyak dibudidayakan di Prancis (Jensen *et al.,* 2004, Chiesa *et al.,* 2017). Perkembangan pembudidayaan *R. philippinarum* diawali pada kisaran tahun 1970, kala awal kerang ini diintroduksi untuk pertama kali (Bodoy *et* al., 1982; Flassch dan Leborgne, 1992; Paillard *et al*.; 1994, Chiesa *et al*., 2016).

Perkembangan teknik dan teknologi budidaya berlangsung dengan pesat karena kerang ini tinggi peminat serta mudah dibudidayakan (Caill-Milly *et al.,* 2004; Bald *et al.,* 2009, Xing *et al.,* 2014). Walaupun perkembangan teknologi budidaya dan pengendalian penyakit sudah sangat maju, namun permasalahan dengan penyakit masih terus dihadapi dalam proses budidaya *R. Philippinarum* (Paillard, 2004). Salah satu penyakit musiman yang kerap menyerang kerang budidaya adalah *Brown Ring Disease* (BRD) atau penyakit cincin coklat (Paillard *et al*., 1994; Paillard *et al.,* 2014).

Penyakit cincin coklat ini disebabkan oleh salah satu jenis *Vibrio* sp. yang diidentifikasi sebagai *Vibrio tapetis.* Jenis *V. tapetis* ini diketahui sudah menyerang berbagai jenis organisme laut. Selain menyerang *R. philippinarum*, dilaporkan bahwa bakteri ini juga menyerang kerang jenis *Venerupis philippinarum* (Paillard and Maes, 1990; Paillard and Maes, 1994; Borrego *et al*., 1996; Paillard *et al.,* 2014) dan kerang *Polititapes aureus* (Borrego *et al*., 1996). Selain jenis kekerangan, *V, tapetis* juga dilaporkan menyerang ikan sebelah *Hippoglossus hippoglossus* (Reid *et al*., 2003), dan ikan kakatua *Symphodus melops* (Jensen *et al*., 2003).

Agensia penyakit cincin coklat, *V. tapetis* ini pertama kali diisolasi di Finister Utara, Prancis. Pada awal pengisolasian bakteri ini diberi nama VP1 atau *Vibrio Predominant* 1 (Paillard dan Maes, 1990). Laporan mengenai keberadaan virus ini tidak hanya di Eropa, namun juga ditemukan di Amerika Utara (Quayle, 1964; Utting dan Spencer, 1992; Cordero, *et al.,* 2017), Perairan Inggris (Flassch dan Leborgne, 1992; Humphreys *et al.,* 2015), serta daerah Asia, utamanya di Jepang (Ponurovsky dan Yakovlev, 1992; Matsuyama *et al.,* 2010, Kitada *et al.,* 2013).

Virus ini sangat patogen pada kerang. Selain persebarannya yang cepat, sangat umum ditemukan adanya kematian pada kerang yang disebabkan oleh *V. tapetis.* Bakteri ini memiliki karakterisasi fermentatif, gram-negatif, non-sporulasi, tumbuh dengan baik pada suhu 4°C hingga 22°C. Pada suhu yang lebih tinggi dari 22°C tidak ditemukan adanya pertumbuhan dari spesies ini (Paillard dan Maes, 1990; Allam *et al.,* 2014).

Tingkat kematian sangat tinggi yang disebabkan oleh *V.tapetis* pada kerang bukan berarti bahwa kerang tidak mampu untuk bertahan dari penyakit jenis ini (Paillard *et al.,* 2004; Rodrigues *et al.,* 2015b). Selain itu, masih banyak strain dari *V. tapetis* yang masih perlu untuk dilakukan pengecekan apakah bersifat virulen atau tidak, baik menggunakan metode *in vitro* maupun *in vivo.* Karena perbedaan jenis

kerang maupun strain dari *V, tapetis* akan menghasilkan kemampuan yang berbeda baik dari patogenisitas bakteri juga kekebalan kerang (Trinkler *et al.,* 2011; Rodrigues *et al.,* 2015b). Kami melaporkan hasil riset pengujian patogenisitas secara *In Vitro* bakteri *V. tapetis* strain IS8 yang memiliki kemampuan untuk menginfeksi kerang batik dan menyebabkan penyakit cincin coklat pada jurnal ini.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian aktivitas viruensi bakteri *Vibrio tapetis* strain IS8 menggunakan metode *in vitro* dilaksanakan selama 4 Bulan dari bulan Februari hingga Mei. Riset dilakukan *di Laboratoire des Sciences de L'énvironnement Marin* (Lemar), *Institute Universitaire Europeén de la Mer* (IUEM), Plouzané, Prancis.

Sampel atau Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah kerang batik dewasa dengan anteroposterior antara 15-20mm. sampel yang diujikan didapatkan dari pembudidaya kerang batik di daerah Marennes, Prancis. Aklimatisasi dilakukan pada kerang selama satu minggu sebelum riset dilakukan. Proses aklimatisasi dengan memelihara kerang batik menggunakan sirkulasi air laut murni dan diberikan aerasi. Air laut yang digunakan selama proses aklimatisasi memiliki salinitas 34ppt dan suhu 13°C.

Bakteri

Bakteri yang diujikan pada riset ini didapatkan dari hasil isolasi ikan dan kerang yang terjangkit penyakit cincin coklat dari waktu dan tempat yang bervariasi. Bakteri *Vibrio* strain IS8 yang diujikan merupakan bakteri yang diisolasi dari cangkang kerang yang terjangkit cincin coklat. Kontrol normal yang digunakan adalah air laut steril. Sebagai kontrol positif penyakit cincin coklat digunakan Vibrio strain CECT4600 (Paillard & Maes, 1990), sementara jenis *Vibrio splendidus* (ATCC 25914) (Choquet, 2004) digunakan sebagai kontrol negatif (Jati *et al.,* 2023).

Sel yang diuji ditumbuhkan pada media Zobell (Zobell, 1941) dalam suhu 18°C dan dikultur *overnight.* Sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 2500rpm dan suhu 4°C dilakukan untuk memanen bakteri yang telah dikultur selama satu malam. Proses bilas dilakukan sebanyak tiga kali menggunakan air laut steril. Proses penghitungan bakteri menggunakan spektofotometer pada 492nm *optical density*. Pengenceran bakteri dilakukan dengan menggunakan air laut steril untuk mendapatkan rasio bakteri 25x dari total hemolim,

Uji Aderensi

Pengulangan tiga kali dilakukan pada tiap uji aderensi. 100µl larutan bakteri diinkubasi pada 100µl hemolim di 24-well microplates menggunakan metode Choquet *et al.,* (2003). Inkubasi dilakukan pada kondisi gelap dan suhu 18°C selama 180 menit. Pemberhentian pertumbuhan bakteri dilakukan dengan cara menambahkan larutan Formalin 6% pada larutan dengan perbandingan yang sama (v/v), supernatant larutan dipindahkan ke *cytometry tube*. Penghitungan jumlah hemosit bakteri menggunakan *flow cytometry*. Hasil yang didapat berupa rasio sel yang non-aderen. Jumlah bakteri non-aderen dibagi dengan jumlah sel yang diinkubasi menggunakan air laut steril. Nilai rasio sel > 1 (lebih besar dari satu) menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik pada bakteri uji. Penghitungan nilai rata-rata dilakukan setelah dilakukan percobaan sebanyak 3 kali ulangan.

Uji Fagositosis

Uji fagositosis dilakukan sebanyak tiga ulangan per sampel dengan *fluorescent*

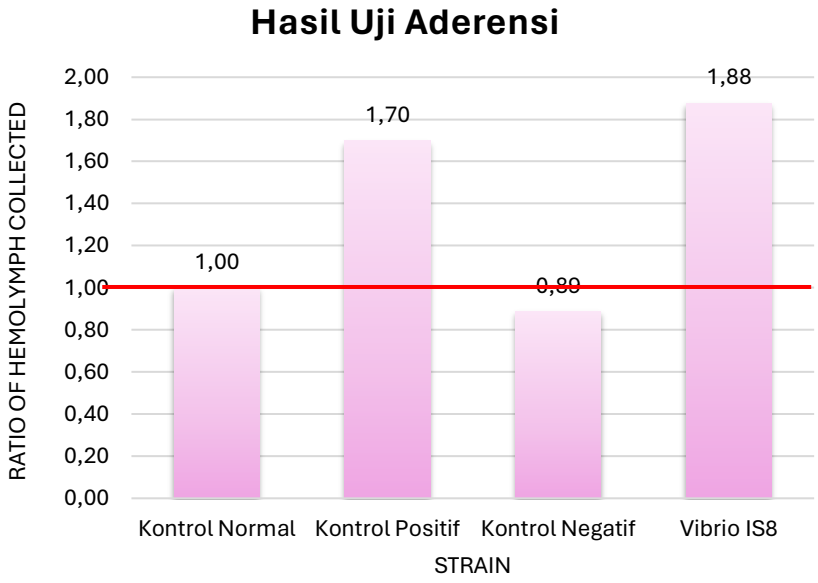
latex beads ((TM Fluoresbrite plain YG 2.0-microns microspheres 2.5% solids-latex (Polysciences, Inc., Warrington, PA 18976)). Perbandingan Lateks beads yang ditambahkan pada larutan hemolim bakteri sebanyak 9:10:1 (lateks beads: larutan hemolim: larutan bakteri).

Metode yang digunakan merujuk pada metode Delaporte *et al.* (2003). Pada uji yang dilakukan, control dipelihara menggunakan air laut steril yang diinkubasi pada suhu 18°C selama 120 jam. Uji fagositosis dilakukan dengan memindahkan larutan pada *flow cytometry*. Pengaturan yang digunakan pada FSC (*Forward Light Scatter*) adalah pada 118, sementara SSC (*Side Light Scatter*) pada 300. Distribusi sel diplotkan menggunakan plot titik. Basis ukuran sel diekspresikan FSC sementara kompleksitas dan granulitas diekspresikan SSC. Penghitungan hasil tiga kali ulangan dilakukan untuk menemukan rerata nilai dari uji yang dilakukan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aderensi

Uji aderensi dimaksudkan untuk mencari nilai aderen sel pada hemosit kerang yang disebabkan oleh bakteri yang menginfeksi hemosit. Jika nilai rasio pada hasil uji yang disajikan pada Gambar 1 dibandingkan dengan kontrol normal (air laut steril) adalah <1 itu artinya tidak ditemukan efek aderen pada hemosit kerang yang disebabkan oleh bakteri uji. Sementara apabila ditemukan nilai >1 pada nilai rasio yang dibandingkan dengan kontrol normal, dapat diindikasikan bahwa ditemukan adanya efek aderen disebabkan oleh bakteri uji. Rata-rata nilai dari uji aderensi yang dilakukan disajikan pada Gambar 1 berikut:



Gambar 1. Hasil Uji Aderensi

Berdasarkan hasil uji aderensi pada Gambar 1, *V. tapetis* strain CECT4600 (kontrol positif) menunjukkan nilai rasio 1,70 dibandingkan dengan kontrol normal. Nilai rata-rata rasio yang lebih tinggi dari kontrol normal dapat diartikan bahwa ditemukan efek aderen pada hemosit *R. philippinarum* yang diinfeksi oleh

CECT4600 (Paillard, 2004). Efek aderensi yang tinggi ini menunjukkan adanya kemampuan dari *V. tapetis* strain CECT4600 untuk menginduksi penyakit cincin coklat pada kerang batik (Paillard, 2004; Dias *et al.,* 2018; Rahmani *et al.*, 2019).

Nilai rata-rata dari uji aderensi pada kontrol negatif, *V. splendidus* menunjukkan nilai 0,88 dibandingkan dengan kontrol normal. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ditemukannya efek aderen pada hemosit kerang batik yang disebabkan oleh *V. splendidus.* Hal ini menunjukkan bahwa peran yang dimiliki oeh hemosit kerang yang diserang oleh *V. splendidus* tidak terganggu (Jati, *et al.,* 2023). Sehingga *V. splendidus* tidak mampu menginduksi *Brown Ring Disease* (BRD) pada kerang batik (Jensen et al. 2003; Jati *et al.,* 2023).

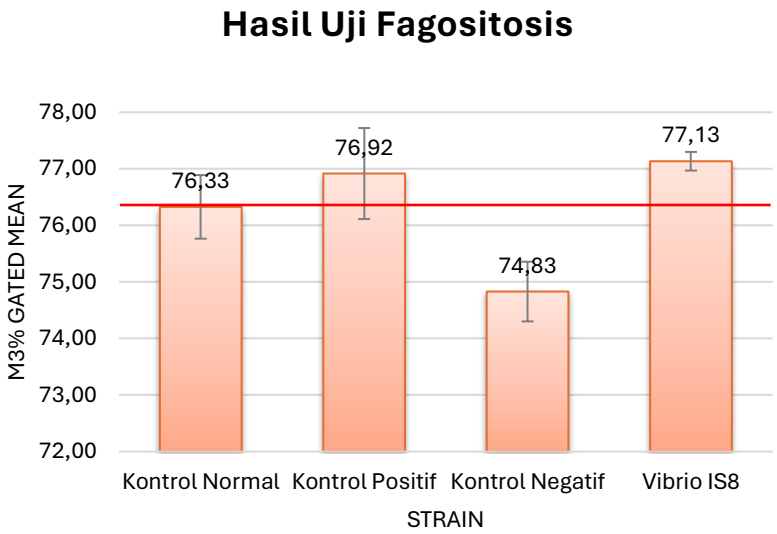
Rerata hasil uji bakteri *V. tapetis* strain IS8 yang dibandingkan dengan kontrol normal menunjukkan nilai 1,88. Nilai yang bahka lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif, *V. tapetis* strain CECT4600. Hal ini menggambarkan bahwa *V. tapetis* strain IS8 mampu memberikan efek aderen yang lebih tinggi dan berbahaya bagi hemosit kerang (Lane dan Birkbeck, 2000; Smits *et al.,* 2020). Efek aderen yang sangat tinggi ini menunjukkan tingkat patogenisitas bakteri yang sangat tinggi dan berbahaya bagi kerang batik (Paillard, 2004; Rodrigues *et al.,* 2015a; Jati *et al*., 2023).

Efek aderen yang disebabkan oleh serangan oleh bakteri akan menyebabkan hemosit kerang yang juga berperan sebagai sel darah terganggu fungsinya (Lane & Birkbeck, 1999). Efek aderen yang ditemukan pada hemosit kerang batik akan berpengaruh pada sistem pertahanan tubuh kerang batik (Lane dan Birkbeck, 2000). Bila pertahanan tubuh kerang batik tidak berfungsi dengan baik, hal tersebut mengindikasikan bahwa strain vibrio tersebut mampu menginduksi penyakit cincin coklat pada cangkang kerang (Maes, 1992; Smits *et al.,* 2020). Untuk mengurangi risiko kematian, preventif yang bisa diberikan adalah dengan memeberikan immunostimulan maupun vaksin (Jati, 2023; Noor *et al.,* 2023)

Berdasarakan hasil uji aderensi, dapat disimpulkan bahwa *V. tapetis* strain IS8 mampu memberikan efek aderen pada hemosit. Kemampuan ini mengindikasikan strain IS8 mampu membuat hemosit kehilangan kemampuan aderen dengan melakukan destrukturisasi sitoskeleton dan menyebabkan sel berbentuk bulat (Paillard, 2004b; Rahmani *et al.*, 2019)

Uji Fagositosis

Nilai dari uji fagositosis berupa nilai dari M3% Gated Mean yang mengekspresikan tingkat fagositosis dari lateks beads hemosit kerang yang terinfeksi bakteri uji. Nilai kontrol normal menunjukkan jumlah lateks beads hemosit kerang tanpa bakteri uji. Nilai yang lebih tinggi dari kontrol normal mengindikasikan adanya aktivitas fagositosis hemosit oleh bakteri uji. Sementara, nilai M3% Gated Mean yang lebih rendah dari kontrol normal mengindikasikan adanya kemampuan hemosit untuk bertahan dari aktivitas fagositosis oleh bakteri uji. Hasil rata-rata 3 ulangan uji fagositosis yang dilakukan disajikan pada Gambar 2:



Gambar 2. Hasil Uji Fagositosis

Berdasarkan nilai yang diperoleh, *V. tapetis* strain CECT4600 menunjukkan aktivitas fagositosis yang lebih tinggi dari kontrol normal. Hal ini menunjukkan aktivitas infeksius dari strain CECT4600 tinggi terhadap hemosit kerang. Tinkat lateks beads hemosit yang tinggi dibandingkan dengan kontrol normal mengindikasikan aktivitas fagositosis yang tinggi oleh bakteri strain CECT4600 (Paillard, 2004b; Rodrigus *et al.,* 2015b). Aktivitas fagositosis yang tinggi akhirnya akan menyebabkan hemosit tidak dapat bertahan yang menyebabkan bakteri akan memiliki kemampuan untuk menginduksi penyakit cincin coklat pada kerang (Allam dan Paillard, 1998; Rodrigues *et al.,* 2015a).

Nilai uji fagositosis yang didapat dari kontrol negatif, *V. splendidus* menunjukkan hasil yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol normal. Nilai uji fagositosis yang lebih rendah dari kontrol normal mengindikasikan proses pertahanan diri dan kemampuan homeostasis dari hemosit kerang yang diinfeksi oleh bakteri uji (Jensen et al. 2003). Proses homeostasis hemosit menunjukkan kemampuan bertahan hemosit dari infeksi bakteri *V. splendidus*. Kondisi lingkungan serta pH sangat mempengaruhi kondisi ini (Rahmani, *et al.,* 2020)

Pada bakteri uji *V. tapetis* strain IS8, didapatkan data rata-rata nilai M3% Gated Mean lebih tinggi dari kontrol normal dan kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa selain ditemukan aktivitas fagositosis yang tinggi, bahkan lebih tinggi dari kontrol positif. Tingginya aktivitas fagositosis yang tinggi mengindikasikan tingkat patogenisitas dari *V. tapetis* strain IS8 sangat tinggi. Semua aktivitas fagositosis menyebabkan perubahan tatanan dari actin sitoskleton (May dan Machesky, 2001; Smits *et al.,* 2020).

Aktivitas fagositosis yang tinggi menyebabkan hemosit kerang tidak dapat melakukan homeostasis yang dapat berakhir pada kematian kerang. Selain dapat menyebabkan penyakit cincin coklat, aktivitas fagositosis yang dihasilkan oleh strain IS8 ini menunjukkan patogenisitas yang dapat menyebabkan kematian massal

pada budidaya kerang yang dilakukan (Allam *et al.,* 2000; Jati *et al.,* 2023). Selain berfungsi sebagai pertahanan tubuh, hemosit pada kerang berperan pada mekanisme fisiologis antara lain transport nutrient, perbaikan jaringan tubuh, pemurnian diri dari polutan biotik dan abiotik (Donaghy *et al.,* 2009; Huang *et al.,* 2019).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Bakteri *V. tapetis* strain IS8 yang diujikan pada penelitian ini menunjukkan tingkat patogenisitas yang sangat tinggi. Hasil pengujian aderensi dan fagositosis yang dilakukan menunjukkan nilai yang lebih tinggi dari kontrol positif. IS8 mampu memberikan efek aderen pada hemosit kerang yang akan mempengaruhi kemampuan pertahanan diri kerang. Selain itu, aktivitas fagositosis yang sangat tinggi didapat dari uji fagositosis yang dilakukan. Aktivitas fagositosis sangat tinggi disebabkan oleh *V. tapetis* strain IS8 dapat menyebabkan aktivitas fisiologis hemosit terganggu bahkan terhenti. Berdasarkan pengujian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa bakteri *V, tapetis* strain IS8 memiliki kemampuan menginduksi penyakit cincin coklat di kerang batik (*R. philippinarum*) serta sangat patogen terhadap kerang.

Saran

Pemahaman yang lebih komprehensif perlu dilakukan mengingat strain dari *V. tapetis* yang menyerang kekerangan maupun ikan sangat bangat. Pengetahuan yang mendalam dan luas untuk proses evaluasi dan mekanisme infeksius bakteri *V. tapetis* akan berperan besar pada proses budidaya kerang di masa depan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis secara khusus memberikan penghargaan tertinggi untuk Christine PAILLARD *(Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin* (LEMAR), Plouzané, Prancis), Alain DUFOUR (*Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines* (LBCM), Lorient, Prancis), dan Gaëlle RICHARD atas dukungan dan bimbingan di penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Allam B, Paillard C (1998) Defense factors in clam extrapallial fluids. Dis Aquat Org 33:123–128.

Allam B, Paillard C, Auffret M (2000) Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. J Invertebr Pathol 76:63–69.

Allam, B., Espinosa, E. P., Tanguy, A., Jeffroy, F., Le Bris, C., & Paillard, C. (2014). Transcriptional changes in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in response to Brown Ring Disease. *Fish & shellfish immunology*, *41*(1), 2-11.

Bald, J., and Borja, A. (2002). "Modelling the management of clam (*Ruditapes decussatus*) exploitation in the Plentzia estuary (Basque Country, Northern Spain)," in Proceedings of the 20th International. Conference. System. Dynamic. Soc (Northern Spain), 1–26.

Bald, J., Sinquin, A., Borja, A., Caill-Milly, N., Duclercq, B., Dang, C., et al. (2009). A system dynamics model for the management of the Manila clam, Ruditapes philippinarum (Adams and

Reeve, 1850) in the Bay of Arcachon (France). *Ecol. Modell*. 220, 2828–2837.

Becker, P., Barringer. C. & Dan C. Marelli (2008) Thirty Years of Sea Ranching Manila Clams (*Venerupis philippinarum*): Successful Techniques and Lessons Learned, Reviews in Fisheries Science, 16:1-3, 44-50.

Bodoy, A., Maitre-Allain, T., and Riva, A. (1981). Croissance comparée de la palourde européene (*Ruditapes decussatus*) et de la palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*) dans un écosystème artificiel méditerranéen. *Vie Mar*. 2, 39–51.

Borrego J. J., Luque A., Castro D., Santamaría J. A., Martínez-Manzanares E. (1996). Virulence factors of Vibrio P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquat. Living Resour*. 9, 125–136.

Caill-Milly, N., de Casamajor, M.-N., Lissardy, M., Sanchez, F., Morandeau, G., (2003). Evaluation du stock de palourdes du bassin d'Arcachon – Campagne 2003. IFREMER, pp. 1–44.

Chen, L., Yu, F., Sun, S., Liu, X., Sun, Z., Cao, W., ... & Xue, C. (2021). Evaluation indicators of Ruditapes philippinarum nutritional quality. *Journal of Food Science and Technology*, *58*, 2943-2951.

Chiesa, S., Lucentini, L., Freitas, R., Nonnis Marzano, F., Breda, S., Figueira, E., ... & Argesse, E. (2016). Mapping the stranger: genetic diversity of Manila clam in European coastal lagoons. *Bulletin of Japan Fisheries Research and Education Agency*, *42*, 55-65.

Chiesa, S., Lucentini, L., Freitas, R., Marzano, F. N., Breda, S., Figueira, E., ... & Argese, E. (2017). A history of invasion: COI phylogeny of Manila clam Ruditapes philippinarum in Europe. *Fisheries Research*, *186*, 25-35.

Choquet G., Soudant P., Lambert C., Nicolas J.L., and Paillard C. (2003) Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis. Dis. Aquat. Org.*, 57, 109–116.

Choquet G. (2004) Pathogénie de Vibrio tapetis, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde : Approche cellulaire et moléculaire. Thèse de doctorat. Université de Brest.

Cordero, D., Delgado, M., Liu, B., Ruesink, J., & Saavedra, C. (2017). Population genetics of the Manila clam (Ruditapes philippinarum) introduced in North America and Europe. *Scientific Reports*, *7*(1), 39745.

Delaporte M., Soudant P., Moal J., Lambert C., Quere C., Miner P., and Samain J. (2003) Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species--*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. Journal Of Experimental Biology, 17, 3053.

Dias, G. M., Bidault, A., Le Chevalier, P., Choquet, G., Der Sarkissian, C.,

Orlando, L., ... & Paillard, C. (2018). Vibrio tapetis displays an original type IV secretion system in strains pathogenic for Bivalve molluscs. *Frontiers in microbiology*, *9*, 227.

Donaghy L., Lambert C., Choi K.S., and Soudant P. (2009) Hemocytes of the carpet shell clam (Ruditapes decussatus) and the Manila clam (Ruditapes philippinarum): current knowledge and future prospects. Aquaculture, 297, 10-24.

Flassch, J. & Leborgne, Y. (1992) Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam. *ICES mar. Sci. Symp* 194, 92–96.

Huang, J., Xie, L., & Zhang, R. (2019). Shell repair and the potential microbial causal in a shell disease of the pearl oyster Pinctada fucata. *Fish & Shellfish Immunology*, *86*, 934-941.

Humphreys, J., Harris, M. R., Herbert, R. J., Farrell, P., Jensen, A., & Cragg, S. M. (2015). Introduction, dispersal and naturalization of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in British estuaries, 1980–2010. *Journal of the marine biological Association of the United Kingdom*, *95*(6), 1163-1172.

Jati, C. W. (2023). EFEKTIVITAS VAKSIN INAKTIF Aeromonas salmonicida Terhadap Total Leukosit dan Aktifitas Fagositosis PADA IKAN KOI (Cyprinus carpio). *Jurnal Lemuru*, *5*(2), 313-319.

Jati, C. W., Noor, H. F., & Putriani, R. B. (2023). Karakterisasi Tingkat Virulensi Bakteri *Vibrio Splendidus* pada Kerang Manila (*Ruditapes philippinarum*) Menggunakan Tes *In Vitro*. *Jurnal Bahari Papadak*, *4*(1), 298-303.

Jensen S., Samuelsen O., Andersen K., Torkildsen L., Lambert C., Choquet G. (2003). Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Dis. Aquat. Organ*. 53, 25–31.

Jensen, A.C., Humphreys, J., Caldow, R.W.G., Grisley, C., Dyrynda, P.E.J., (2004). Naturalization of the Manila clam (Ruditapes philippinarum), an allien species, and establishment of a clam fishery within Poole Harbour, Dorset. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 84, 1069–1073.

Kitada, S., Fujikake, C., Asakura, Y., Yuki, H., Nakajima, K., Vargas, K. M., ... & Kishino, H. (2013). Molecular and morphological evidence of hybridization between native Ruditapes philippinarum and the introduced Ruditapes form in Japan. *Conservation Genetics*, *14*, 717-733.

Lane E, Birkbeck HT (1999) Toxicity of bacteria towards haemocytes of Mytilus edulis. Aquat Living Resour 12: 343–350.

Lane E, Birkbeck HT (2000) Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. J Fish Dis 23:275–279.

May RC, Machesky LM (2001) Phagocytosis and the actin

cytoskeleton. J Cell Sci 114:1061–1077.

Noor, H. F., & Jati, C. W. (2023). EFEKTIFITAS VAKSIN INAKTIF Aeromonas salmonicida TERHADAP IKAN MAS Cyprinus carpio. *Jurnal Bahari Papadak*, *4*(1), 32-37.

Paillard C., Maes P. (1990). Etiologie de la maladie l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogenicite d'un Vibrio sp. *Comptes rendus l'Académie des Sci*. 310, 15–20.

Paillard C., Maes P. (1994). Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification svstem. *Dis. Aquat. Organ*. 19, 137–146.

Paillard C. (2004) A short-review of Brown Ring Disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus. Aquatic Living Resources,* 17, 467-475.

Paillard C. (2004b). Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. *Habilit. À Dir. Rech. HDR Univ. Bretagne Occident. Brest* 180, 1–180.

Paillard C., Allam B., Oubella R.. (2004) Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Disease of Aquatic Organisms*, 59, 249–262.

Paillard, C., Jean, F., Ford, S. E., Powell, E. N., Klinck, J. M., Hofmann, E. E., & Flye-Sainte-Marie, J. (2014). A theoretical individual-based model of Brown Ring Disease in Manila clams, Venerupis philippinarum. *Journal of Sea Research*, *91*, 15-34.

Paillard C. Maes P, Oubella R., (1994) Brown ring disease in clams. *Annu Rev Fish Dis*, 4, 219–240.

Ponurovsky, S. K. & Yakovlev, Y. M. (1992) The reproductive biology of the Japanese littleneck, Tapes philippinarum. J. Shellfish Res. 11, 265–277.

Rahmani A., Corre E., Richard G., Bidault A., Lambert C., Oliveira L., et al. (2019). Transcriptomic analysis of clam extrapallial fluids reveals immunity and cytoskeleton alterations in the first week of Brown Ring Disease development. *Fish Shellfish Immunol.* 93, 940–948.

Rahmani, A., Mathien, C., Bidault, A., Le Goïc, N., Paillard, C., & Pichereau, V. (2020). External pH modulation during the growth of Vibrio tapetis, the aetiological agent of brown ring disease. *Journal of Applied Microbiology*, *129*(1), 3-16.

Rodrigues, S., Paillard, C., Dufour, A., & Bazire, A. (2015a). Antibiofilm activity of the marine bacterium Pseudoalteromonas sp. 3J6 against Vibrio tapetis, the causative agent of brown ring disease. *Probiotics and antimicrobial proteins*, *7*, 45-51.

Rodrigues, S., Paillard, C., Le Pennec, G., Dufour, A., & Bazire, A. (2015b). *Vibrio tapetis*, the causative agent of Brown Ring Disease, forms biofilms with spherical components. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1384.

Reid H. I., Duncan H. L., Laidler L. A., Hunter D., Birkbeck T. H. (2003). Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 221, 65–74.

Smits, M., Artigaud, S., Bernay, B., Pichereau, V., Bargelloni, L., & Paillard, C. (2020). A proteomic study of resistance to Brown Ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Fish & shellfish immunology*, *99*, 641-653.

Trinkler N., Bardeau J.-F., Marin F., Labonne M., Jolivet A., Crassous P., Paillard C., (2011) Mineral phase in shell repair of Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by Brown Ring Disease. *Disease of Aquatic Organisms*, 93, 149–162.

Utting, S. D. & Spencer, B. E. (1992) Introductions of marine bivalve molluscs into the United Kingdom for commercial culture- case histories. *ICES Mar. Sci. Symp*. 194, 84–91.

Quayle, D. B. (1964) Distribution of introduced marine mollusca in British Columbia waters. *J. Fish. Res. Board Canada* 21, 1155–1181.

Xing, K., Gao, M. L., & Li, H. J. (2014). Genetic differentiation between natural and hatchery populations of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) based on microsatellite markers. *Genet. Mol. Res*, *13*(1), 237-245.

Zobell C. (1941). Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J. Mar. Res.* 4, 41–75.