

# BAKTERI PATOGEN PADA IKAN AIR TAWAR

*Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas fluorescens*



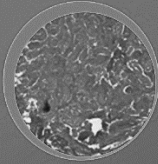
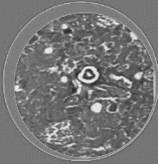
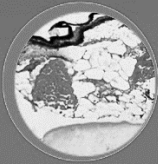
Dr. ESTI HANDAYANI HARDI, S.Pi, M.Si,



Mulawarman  
University PRESS

# BAKTERI PATOGEN PADA IKAN AIR TAWAR

*Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas fluorescens*



Dr. ESTI HANDAYANI HARDI, S.Pi, M.Si,



**Mulawarman  
University PRESS**

# BAKTERI PATOGEN PADA IKAN AIR TAWAR

*Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas fluorescens*

Penulis : Esti Handayani Hardi

Penata Letak : Maulina Agriandini

Cover Design : Pristiangga Dwi S

ISBN : 978-602-6834-57-7

© 2018. Mulawarman University Press

Cetakan Pertama : Agustus 2018

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun tanpa izin tertulis dari penerbit

Isi diluar tanggung jawab percetakan.

Hardi, Esti Handayani. 2018. Bakteri Patogen pada Ikan Air Tawar-  
*Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas fluorescens*. Mulawarman  
University Press. Samarinda.



**Mulawarman  
University PRESS**

Penerbit

Mulawarman University PRESS

Gedung LP2M Universitas Mulawarman

Jl. Krayan, Kampus Gunung Kelua

Samarinda – Kalimantan Timur – INDONESIA 75123

Telp/Fax (0541) 747432, Email : mup.unmul@gmail.com

# PRAKATA

*Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri septicemia yang berkembang di pembuluh darah sehingga gejala yang muncul terkait dengan adanya pendarahan dan pembengkakan seperti ulser dan borok. Sedangkan bakteri *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri umum yang ada di lingkungan perairan. Tidak seluruh bakteri *Pseudomonas* bersifat patogen, bahkan ada beberapa strain yang berperan baik sebagai probiotik.

Buku ini berjudul “BAKTERI PATOGEN PADA IKAN AIR TAWAR-*Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas fluorescens*” yang menjabarkan tentang tanda klinis yang meliputi perubahan dan kelainan morfologi, behaviour dan beberapa kelainan organ dalam, sebagai penciri awal aeromoniasis dan pseudomoniasis.

Buku ini diharapkan dapat menjadi panduan bagi mahasiswa untuk menjadi acuan dalam upaya mempelajari dan mendalami karakteristik bakteri Aeromonadaceae dan Pseudomonadaceae beserta proses patogenesis dan dampaknya bagi ikan budidaya khusus air tawar.

Penulis sangat menyadari bahwa penulisan buku ini masih terdapat kekurangan, sehingga dibutuhkan saran dan masukan untuk perbaikan tulisan-tulisan mengenai bakteri Aeromonadaceae dan Pseudomonadaceae.

Samarinda, Juli 2018

Penulis

# KATA PENGANTAR

Aeromoniasis dan Pseudomoniasis merupakan salah satu penyakit bakteriil pada budidaya ikan air tawar yang sering menyebabkan kematian masal. Kematian yang ditimbulkan akibat kedua penyakit ini dapat mencapai 90–100%. Oleh karena itu, aeromoniasis dan pseudomoniasis merupakan penyakit utama pada ikan air tawar setelah virus.

Salah satu genus *Aeromonas* yang sering menyebabkan penyakit pada ikan air tawar adalah *Aeromonas hydrophila*. Sedangkan dari genus *Pseudomonas* terdapat beberapa spesies patogenik antara lain *P. Anguilliseptica*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. plecoglossicida*, *P. pseudoalcaligenes*, dan *P. putida*. Mengenali potensi risiko dan tanda awal dari penyakit merupakan modal awal dalam mencegah terjadinya wabah penyakit. Buku ini berjudul “BAKTERI PATOGEN PADA IKAN AIR TAWAR-*Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas fluorescens*” yang dapat menjadi pintu untuk mengenali lebih dalam tentang patogenisitas bakteri patogen utama pada budidaya air tawar.

Buku ini membahas tentang tanda klinis yang meliputi perubahan dan kelainan morfologi, behaviour dan beberapa kelainan organ dalam, sebagai penciri awal aeromoniasis dan pseudomoniasis. Selain patogenisitas juga dibahas tentang morfologi, sifat biokimia, patogenisitas enzim ekstra seluler, sensitifitas bakteri terhadap beberapa antibiotik, virulensi fraksi protein bakteri *A. hydrophila*, serta potensi fraksi protein *Pseudomonas* sebagai biokontrol dari *A. hydrophila*. Buku ini sangat bermanfaat bagi para mahasiswa dan pembudidaya dalam mengenali dan mendalami karakteristik bakteri Aeromonadaceae dan Pseudomonadaceae beserta proses patogenisitas dan dampaknya bagi ikan budidaya.

Semarang, 11 Juli 2018

Prof. Dr. Ir. Slamet Budi Prayitno, M.Sc

# DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
BALIK HALAMAN JUDUL .....	ii
PRAKATA .....	iii
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR TABEL .....	xi

## BAB I AEROMONADACEAE

A. Karakteristik Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	2
1. Aktivitas hemolitik .....	3
2. Morfologi sel, uji fisika dan uji biokimia bakteri .....	5
3. Sensitivitas terhadap antibiotik .....	7
B. Postulat Koch dan Peningkatan Virulensi Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	10
C. Kepadatan Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	11
D. Uji Lethal Dose 50 (LD <sub>50</sub> ) .....	12
E. Patogenisitas Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	13
1. Perubahan pola berenang ikan pasca infeksi bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	13
2. Perubahan patologi anatomi ikan nila secara makroskopis ikan pasca infeksi bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	14
3. Gambaran darah ikan pasca infeksi bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	15
4. Kematian ikan pasca infeksi bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	22
F. Produk Ekstraseluler (ECP) dan Intraseluler (ICP) Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	24
1. Isolasi produk ekstraseluler (ECP) bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	25
2. Isolasi produk intraseluler (ICP) bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	26
3. Toksisitas ECP dan ICP bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	27
G. Karakteristik dan Distribusi ECP Protein <i>A. hydrophila</i> yang Tumbuh pada Kondisi Berbeda Berdasarkan Berat Molekul Protein .....	36
1. Karakteristik dan distribusi ekstraseluler protein (ECP) <i>A.</i> <i>hydrophila</i> .....	36
H. Potensial Antibakterial dan Imunostimulan dari Fraksi Protein dan Komponen Bakteri <i>A. hydrophila</i> (EA-01) pada Ikan Nila ( <i>Oreochromis</i> <i>niloticus</i> ) .....	40
1. Pendahuluan .....	40
2. Pengujian sensitivitas terhadap berbagai antibiotik .....	40

3. Persiapan fraksi protein dan komponen bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	41
4. Pengujian antibakterial fraksi protein dan komponen bakteri <i>A. hydrophila</i> terhadap bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. Secara in vitro .....	42
5. Pengujian toksisitas fraksi protein dan komponen bakteri <i>A. hydrophila</i> pada ikan nila ( <i>O. niloticus</i> ) .....	42
6. Pengujian kemampuan imunomodulator dari fraksi protein dan komponen bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	43
7. Aktivitas antibakterial dari fraksi ekstraseluler dan komponen bakteri <i>A. hydrophila</i> terhadap bakteri patogen <i>Pseudomonas</i> sp. ....	43
8. Uji toksisitas fraksi protein dan komponen bakteri <i>A. hydrophila</i> pada ikan nila ( <i>O. niloticus</i> ) .....	44
9. Uji fraksi komponen bakteri <i>A. hydrophila</i> sebagai bahan immunomodulator pada ikan nila .....	45
I. Kesimpulan .....	49
J. Latihan Soal .....	50
K. Daftar Pustaka .....	50

## BAB II PSEUDOMANADACEAE

A. Karakteristik Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. ....	55
1. Aktivitas hemolitik .....	57
2. Morfologi sel, uji fisika dan uji biokimia bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	58
3. Sensitivitas terhadap antibiotik .....	59
B. Postulat Koch Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. ....	62
C. Pertumbuhan Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. pada Media Buatan .....	63
D. Patogenisitas Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. pada Ikan Nila .....	65
1. Kematian, patologi anatomi organ luar dan organ dalam pasca infeksi .....	65
2. Gambaran darah ikan nila yang diinjeksi dengan <i>Pseudomonas</i> sp. ....	66
E. Produk Ekstraseluler (ECP) dan Intraseluler (ICP) Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. ....	68
1. kematian ikan nila .....	68
2. Perubahan pola renang .....	69
3. Histopatologi ikan nila pasca injeksi dengan ECP dan ICP bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. ....	70
4. Histopatologi ikan nila pasca injeksi dengan ECP dan ICP bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. ....	74

F. Karakteristik Protein Ekstraselular dari Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. yang di Tumbuhkan pada Kondisi yang Berbeda .....	76
1. Pendahuluan .....	76
2. Isolasi produk ekstraseluler (ECP) .....	77
3. Protein frasi dari ECP bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. ....	78
G. Aktivitas Antagonistik Ekstraselular Produk Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. Terhadap Bakteri Patogen <i>Aeromonas hydrophila</i> pada Ikan Nila .....	84
1. Pendahuluan .....	84
2. Aktivitas antagonistik .....	85
H. Kesimpulan .....	90
I. Latihan Soal .....	92
J. Daftar Pustaka .....	92



# DAFTAR GAMBAR

1.1	Tipe haemolitik yang dibentuk oleh bakteri <i>B. cereus</i> dan <i>B. thuringiensis</i> . <i>Haemolitic activity was determined at 30 °C on sheep blood agar plates</i> . Ada Sembilan tipe haemolitik yang terbentuk (A to I) .....	5
1.2	Gambaran darah ikan nila : hemoglobin (Hb) yang diinjeksi dengan <i>A. hydrophila</i> melalui jalur infeksi yang berbeda .....	15
1.3	Gambaran darah ikan nila : hematokrit (He) yang diinjeksi dengan <i>A. hydrophila</i> melalui jalur infeksi yang berbeda .....	17
1.4	Gambaran darah ikan nila (eritrosit) yang diinjeksi dengan <i>A. hydrophila</i> melalui jalur infeksi yang berbeda .....	18
1.5	Gambaran darah ikan nila (leukosit) yang diinjeksi dengan <i>A. hydrophila</i> melalui jalur infeksi yang berbeda .....	19
1.6	Diferensial leukosit ikan nila (a. Limfosit, b. Monosit, c. Neutrofil) .....	20
1.7	Kematian kumulatif ikan nila yang diinfeksi <i>A. hydrophila</i> melalui PM, PK, IM, IP .....	23
1.8	Kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	27
1.9	Beberapa perubahan pola renang ikan nila pasca injeksi dengan ECP dan ICP <i>A. hydrophila</i> . [A] Ikan normal [B] ikan berenang gasping [C] ikan berenang diam di dasar akuarium .....	28
1.10	Beberapa perubahan pada patologi anatomi organ luar ikan nila pasca injeksi dengan ECP dan ICP <i>A. hydrophila</i> (dari kiri-kanan). [A] ikan nila normal [B] sirip gripis. [C] pendarahan pada tubuh. [D] eksoptalmia. [E] opacity .....	30
1.11	Beberapa perubahan pada patologi anatomi organ dalam ikan nila pasca injeksi dengan ECP dan ICP <i>A. hydrophila</i> . [A] ikan nila normal [B] organ dalam berair. [C] hati dan ginjal pucat.....	31
1.12	Organ otak ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP <i>A. hydrophila</i> . Hp. Hiperemi. [H] hipertropi. [N] nekrosa .....	33
1.13	Organ ginjal ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP <i>A. hydrophila</i> . [A] ikan nila yang diinjeksi ICP dan [B], [C] ikan nila yang diinjeksi ECP. [H] hipertropi. [N] nekrosa .....	34

1.14	Organ mata ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP <i>A. hydrophila</i> tanda panah menunjukkan [A] hiperemi dan [B] hiperplasia .....	35
1.15	Hasil elektroforesis ECP <i>A. hydrophila</i> yang ditumbuhkan di media TSB melalui SDS PAGE dengan pewarnaan silver stain .....	37
1.16	Hasil elektroforesis ECP <i>A. hydrophila</i> yang ditumbuhkan di media TSA melalui SDS PAGE dengan pewarnaan silver stain .....	39
1.17	Uji in vitro fraksi <i>A. hydrophila</i> terhadap bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. ....	44
1.18	Patologi anatomi luar dan dalam ikan pasca injeksi fraksi protein bakteri <i>A. hydrophila</i> . Keterangan: [A] gejala eksoptalmia; [B] kantung empedu pecah; [C] Organ dalam berair; [D] kemerahan pada permukaan tubuh .....	46
1.19	Kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi fraksi protein dan komponen bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	47
1.20	Kadar hemoglobin (Hb), total eritrosit (TE), total leukosit (TL) dan hematokrit (He) Uji pencegahan komponen bakteri WCP(s) <i>A. hydrophila</i> dengan bakteri patogen <i>Pseudomonas</i> sp. ....	48
1.21	Kematian kumulatif ikan nila uji pencegahan komponen bakteri WCP(s) <i>A. hydrophila</i> dengan bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. ....	48
2.1	Uji Sensitivitas berbagai antibiotik terhadap bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. ....	59
2.2	Bakteri uji pada media GSP (panah putih bakteri <i>A. hydrophila</i> [A] dan panah biru bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. [B]) .....	63
2.3	Diferensial leukosit ikan nila (a. Limfosit, b. Monosit, c. Neutrofil) .....	66
2.4	Kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. ....	68
2.5	Beberapa perubahan pada patologi anatomi organ luar ikan nila pasca injeksi dengan ECP dan ICP <i>Pseudomonas</i> sp. (dari kiri-kanan). A= clear operkulum. B= sirip ekor gripis. C= opacity (kekeruhan mata). D= bilateral eksoptalmia .....	72
2.6	Perubahan pada ginjal ikan. Panah biru hipertrofi dan panah putih hiperplasi pada tubulus ginjal .....	74
2.7	Histopatologi organ mata dan otak ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. A. Bagian Choroid body mata ikan panah hitam menunjukkan	

	hipertropi. B. Otak ikan mengalami hiperplasi (panah hitam) dan nekrosa (panah putih) .....	75
2.8	Hasil elektroforesis ECP <i>Pseudomonas</i> sp. yang ditumbuhkan di media cair melalui SDS PAGE dengan pewarnaan silver stain. Marker : BS .....	79
2.9	Hasil elektroforesis ECP <i>Pseudomonas</i> yang ditumbuhkan di media padat melalui SDS PAGE dengan pewarnaan silver stain .....	81
2.10	Hasil pemurnian bakteri <i>Pseudomonas</i> sp.dengan sephadek G-100 .....	86

# DAFTAR TABEL

1.1	Jenis Bakteri yang diisolasi dari ikan nila yang mengalami gejala abnormalitas dari daerah budidaya Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur .....	3
1.2	Uji karakteristik bakteri <i>A. hydrophila</i> yang menginfeksi ikan nila asal Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur .....	5
1.3	Sensitivitas bakteri <i>A. hydrophila</i> terhadap antibiotik .....	7
1.4	Aktivitas antibakterial beberapa antibiotik terhadap bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	8
1.5	Abnormalitas dan kematian yang terjadi pada ikan nila pasca diinjeksi <i>A. hydrophila</i> .....	10
1.6	Hasil perhitungan TPC bakteri <i>A. hydrophila</i> dan <i>Pseudomonas</i> sp. ....	11
1.7	Hasil uji LD50 yang diinfeksi bakteri <i>A. hydrophila</i> pada ikan nila .....	12
1.8	Perubahan tingkah laku berenang dan nafsu makan ikan nila yang diinfeksi bakteri <i>A. hydrophila</i> (jam) melalui empat jalur infeksi yang berbeda .....	13
1.9	Pengamatan patologi anatomi organ luar dan organ dalam ikan nila yang diinfeksi dengan <i>A. hydrophila</i> melalui port entry yang berbeda .....	15
1.10	Abnormalitas dan kematian yang terjadi pada ikan nila pasca diinjeksi .....	23
1.11	Perubahan pola renang ikan nila pada uji toksisitas ECP bakteri <i>A. hydrophila</i> yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB .....	28
1.12	Patologi anatomi organ luar ikan nila pada uji toksisitas ECP dan ICP bakteri <i>A. hydrophila</i> yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB .....	29
1.13	Patologi anatomi organ dalam ikan nila pada uji toksisitas ECP dan ICP bakteri <i>A. hydrophila</i> yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB .....	31
1.14	Perubahan histopatologi ikan nila pada uji toksisitas ECP bakteri <i>A. hydrophila</i> yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB .....	33
1.15	Ekstrasellular produk bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> yang ditumbuhkan di media cair (TSB) dengan suhu dan lama inkubasi yang berbeda .....	36

1.16	Ekstrasellular bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> yang ditumbuhkan di media padat dengan lama inkubasi yang berbeda .....	38
1.17	Patologi anatomi luar dan dalam ikan nila ( <i>O.niloticus</i> ) yang telah diinjeksi dengan fraksi protein dan komponen bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	46
2.1	Uji karakteristik bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. yang menginfeksi ikan nila asal Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur ...	58
2.2	Uji sensitivitas berbagai antibiotik terhadap bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. ....	61
2.3	Hasil uji LD50 yang diinfeksi bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. pada ikan nila .....	64
2.4	Patologi anatomi ikan nila yang diinjeksi <i>Pseudomonas</i> sp. ....	65
2.5	Kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi <i>Pseudomonas</i> sp. ....	65
2.6	Gambaran darah ikan nila yang diinjeksi dengan <i>Pseudomonas</i> sp. ....	66
2.7	Perubahan pola renang ikan nila pada uji toksisitas ECP bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB .....	70
2.8	Patologi anatomi organ luar ikan nila pada uji toksisitas ECP dan ICP bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB .....	71
2.9	Patologi anatomi organ dalam ikan nila pada uji toksisitas ECP dan ICP bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB .....	73
2.10	Ekstrasellular bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. yang ditumbuhkan di media TSB diinkubasi pada suhu 30 <sup>o</sup> C dengan lama inkubasi yang berbeda .....	80
2.11	Ekstrasellulr bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. yang ditumbuhkan di media TSA diinkubasi pada suhu 30 <sup>o</sup> C dengan lama inkubasi yang berbeda .....	82
2.12	Hubungan antara berat molekul protein standar dengan migrasi relatif (R <sub>m</sub> ) dari ECP .....	87
2.13	Hasil uji in vitro fraksi ECPs bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. terhadap bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> pada inkubasi 24 dan 48 jam .....	88
2.14	Perbedaan pertumbuhan bakteri <i>A. hydrophila</i> dan <i>Pseudomonas</i> sp. pada beberapa media tumbuh yang berbeda .....	89

# Aeromonadaceae

**B**akteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri patogen yang menyebabkan kematian pada budidaya ikan air tawar, strain dari bakteri tersebut sangat beragam yang berpengaruh terhadap tingkat potegenisitasnya pada inang. Ada sekitar delapan galur dari *A. hydrophila* yang dikelompokkan dalam galur virulen dan non virulen yang diisolasi dari ikan lele di Jawa Barat (Angka, 2005). Pada mulanya *A. hydrophila* dikenal dengan nama *Bacillus hydrophilus fuscus*. Bakteri ini pertama kali diisolasi dari kelenjar pertahanan katak yang mengalami perdarahan septisemia.

Pada tahun 1936, Kluiver dan Van Niel telah mulai mengelompokkan genus *A. hydrophila*. Selanjutnya pada tahun 1984, Popoff 2000 telah memasukan genus *Aeromonas* ke dalam famili *Vibrionaceae*. Mikroorganisme ini secara normal dapat ditemukan dalam lingkungan perairan (Blair et al., 1999, dalam Robinson et al., 2000). Menurut Holt et al. (1994), *A. hydrophila* memiliki susunan klasifikasi sebagai berikut :

Filum : Protophyta  
Kelas : Schizomycetes  
Ordo : Pseudanondeles  
Family : Vibrionaceae  
Genus : *Aeromonas*  
Spesies : *Aeromonas hydrophila*

*Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri septicemia yang berkembang di pembuluh darah sehingga gejala yang muncul terkait dengan adanya pendarahan dan pembengkakan seperti ulcer dan borok. Bakteri septicemia lain yang menginfeksi ikan nila adalah Bakteri *Streptococcus*

baik *S. iniae* maupun *S. agalactiae* (Hardi et al, 2011). Masih menurut Hardi et al (2011) gejala ikan nila yang terinfeksi bakteri *S. agalactiae* adalah munculnya eksophtalmia, purulens, warna tubuh menghitam, clear operculum, ulcer dan pada saat ikan mati tubuh membentuk huruf "C", gejala ini hampir sama dengan infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila.

## **A. Karakteristik Bakteri *Aeromonas hydrophila***

Menurut Austin dan Austin (2007) persamaan nama bakteri ini antara lain *A. Formicans* dan *A. Liquefaciens* yang lebih dikenal *A. Salmonicida*. Bakteri *Aeromonas* banyak dilaporkan menginfeksi berbagai jenis ikan air tawar (Pathiratne et al., 1994), payau maupun laut (Larsen dan Jensen, 1977) dengan strain yang berbeda, yang menyebabkan pendarahan septicemia (Sanarelli, 1891) dan menyebabkan ulcer pada ikan cod (Larsen dan Jensen, 1977). Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri Gram negatif, fermentatif, dan berbentuk batang dengan ukuran 0.8-1.0x1.0-3.5 $\mu$ m, memiliki flagel polar tunggal. Bakteri ini mampu melisis Arginin,  $\beta$ -galactosidase, idole, lysin, decarboxylase. Bakteri ini juga mampu memproduksi pospat tapi tidak H<sub>2</sub>S.

*Aeromonas hydrophila* dapat ditemukan sepanjang tahun pada budidaya ikan nila, biasanya ditemukan bersamaan dengan bakteri *Pseudomonas*. Hasil pengamatan pada Tabel 1.1 menunjukkan bahwa ikan nila yang dibudidayakan di Kecamatan Loa Kulu Kabupaten Kutai Kartanegara, Kalimantan Timur terinfeksi kedua bakteri tersebut dengan prevalensi bakteri *Pseudomonas* sp. (67%) lebih tinggi dibandingkan dengan *A. hydrophila* (33%).

**Tabel 1.1** Jenis Bakteri yang diisolasi dari ikan nila yang mengalami gejala abnormalitas dari daerah budidaya Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur

Sampel Ikan Nila	Jenis Bakteri	
	<i>A. hydrophila</i>	<i>Pseudomonas</i>
1	✓	
2		✓
3		✓
4	✓	
5		✓
6		✓
Persentase (%)	33	67

Tabel 1.1 di atas menunjukkan bahwa prevalensi ditemukannya bakteri *Pseudomonas* pada ikan nila yang mengalami sakit dan/atau mati lebih tinggi dibandingkan *A. hydrophila*, ini disebabkan karena kemampuan bakteri *Pseudomonas* sp. yang menginfeksi organ dalam seperti empedu, ginjal, dan hati, sehingga menyebabkan kematian yang tinggi dibandingkan dengan bakteri *A. hydrophila*. Organ dalam ikan yang terinfeksi *Pseudomonas* sp. umumnya tampak berair dan kantung empedu ikan pecah.

### 1. Aktivitas hemolitik

Bakteri *Aeromonas* merupakan bakteri Gram negatif, yang menghasilkan ekstraseluler produk dan intraseluler produk. Perbedaan kedua produk ini adalah waktu produksi oleh bakteri. Ekstraseluler bakteri (ECP) diproduksi bakteri pada saat bakteri hidup dan menginfeksi inang, sedangkan intraseluler produk (ICP) dihasilkan bakteri saat bakteri mengalami kematian atau kerusakan membran sel bakteri.

Salah satu enzim ekstraseluler bakteri yang berperan dalam proses patogenesis pada inang atau ikan adalah enzim kitinase, dan lesitinase serta toksin ekstraseluler hemolisin (Hsu et al., 1981; Santos et al., 1999). Huys et al. (2002) menambahkan bahwa *A. hydrophila* menghasilkan lebih dari satu jenis toksin hemolitik. Enzim Hemolisin pada bakteri *A. hydrophila*



dapat melisis sel-sel darah merah dan sel-sel darah putih, serta menyebabkan nekrosis jaringan (Higerd & Fouler, 1997), inilah yang menyebabkan ikan terinfeksi mengalami anemia dan nekrosa atau luka borok pada organ terinfeksi.

Pengujian aktivitas hemolisin dilakukan dengan menggunakan media agar darah dan diinkubasi selama 24, 48 dan 72 jam. Pengujian aktivitas hemolisin bakteri *Aeromonas* sp. (A1G), (B7G), dan *Vibrio* sp. (A2L) pada masa inkubasi 72 jam membentuk beberapa tipe hemolisin, yaitu jika zona pada media agar darah berwarna hijau maka dikategorikan sebagai tipe  $\alpha$ -hemolisis, dan jika terbentuk zona bening pada sekitar koloni yang tumbuh, maka membentuk zona bening maka hemolisin termasuk pada tipe  $\beta$ -hemolisis. Keadaan tersebut memperlihatkan kemungkinan proses hemolisis sempurna yang memerlukan waktu lebih lama.

Kemampuan *A. hydrophila* dalam menginvasi ikan terjadi melalui mekanisme kerja toksin ekstraseluler produk yang dikeluarkan pada saat bakteri masih hidup dan menempel pada organ tubuh ikan. Tidak seperti intraseluler bakteri yang akan dikeluarkan pada saat bakteri lisis atau mengalami kematian. Menurut Eissa et al. (1994) dan Angka et al. (1995), infeksi bakteri *A. hydrophila* merupakan primari patogen pada ikan, dimana kerusakan atau luka yang ditimbulkan akibat infeksi akan menjadi pintu masuk infeksi patogen yang lain.

Patogenisitas patogen pada tubuh inang menurut Del Coral et al. (1990) dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jenis patogen yang menginfeksi, organ target yang terinfeksi, kondisi inang, dan kondisi lingkungan perairan. Beberapa jenis toksin selain hemolisin juga diproduksi oleh bakteri *A. hydrophila* seperti kitinase dan lesitinase, dimana menurut Swann & White (1991) dan Chopra et al. (2000), enzim-enzim tersebut dapat merusak kultur jaringan dan menimbulkan kerusakan pada jaringan

tubuh ikan. Sehingga ikan yang terinfeksi bakteri ini seperti ikan mas koki (*Carasius auratus*), ikan mas (*Cyprinus carpio*), dan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) akan menunjukkan gejala berenang lemah, berenang gasping, terjadi nekrosis pada jaringan terinfeksi, sel darah merah mengalami lisis, dan hemoragik di permukaan tubuh yang terinfeksi. Populasi ikan dengan kondisi demikian dapat mengalami kematian hingga 100% (Angka et al., 1995; Cipriano, 2001). Beberapa tipe hemolisin dapat dilihat pada gambar di bawah ini, sumber Ramarao dan Sanchis (1993).



**Gambar 1.1** Tipe haemolitik yang dibentuk oleh bakteri *B. cereus* dan *B. thuringiensis*. Haemolitic activity was determined at 30 °C on sheep blood agar plates. Ada Sembilan tipe haemolitik yang terbentuk (A to I)

## 2. Morfologi sel, uji fisika dan uji biokimia bakteri

Hasil dari uji karakteristik bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. yang diisolasi dari ikan nila asal Loa Kulu Kutai Kartanegara dijabarkan pada Tabel 1.2.

**Tabel 1.2** Uji karakteristik bakteri *A. hydrophila* yang menginfeksi ikan nila asal Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur

No.	Uji Karakteristik	<i>A. hydrophila</i> dari Ikan Uji	<i>A. hydrophila</i> (SNI, 2009)
1.	Pewarnaan Gram	Gram Negatif	Gram Negatif
2.	Bentuk Bakteri	Batang Pendek	Batang Pendek
3.	Oksidatif-Fermentatif	O/F	O/F
4.	Uji Katalase	Positif	Positif

Berdasarkan pengujian karakteristik, bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. termasuk dalam bakteri Gram negatif dengan bentuk batang dengan ukuran sekitar 0.8–1.0  $\mu\text{m}$ . Kedua bakteri ini memiliki karakteristik yang hampir sama perbedaannya adalah pada kemampuan oksidatif-fermentatif. Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri oksidatif-fermentatif (O/F) sedangkan *Pseudomonas* merupakan bakteri oksidatif, dan parameter inilah yang digunakan untuk membedakan keduanya. Bakteri *A. hydrophila* mampu merubah media O/F dari awal berwarna hijau menjadi kuning dengan atau tanpa parafin, yang artinya bakteri memiliki kemampuan memecah karbohidrat (glukosa) dalam suasana aerobik ataupun anaerobik, kemudian untuk hasil uji katalase, menunjukkan hasil positif. Cairan  $\text{H}_2\text{O}_2$  bergelembung saat bakteri uji diinokulumkan di dalamnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri memiliki enzim katalase untuk menguraikan  $\text{H}_2\text{O}_2$  menjadi oksigen dan air. Hasil uji karakteristik tersebut menunjukkan bahwa bakteri yang diisolasi dari ikan nila tersebut adalah bakteri *A. hydrophila* dengan mengikuti uji karakteristik berdasarkan prosedur Standar Nasional (2009).

Bakteri ini memiliki flagela untuk pergerakan ditunjukkan dengan pengujian motilitas positif. Pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* cenderung tumbuh cepat pada media buatan dengan temperatur optimum (28-30 °C), kenyataan ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Hoffman (1977) dalam Austin dan Austin (2007) bahwa bakteri *A. hydrophila* tumbuh optimum pada suhu 20-30°C, pada suhu 10°C pertumbuhannya akan lambat dan pada temperatur 35°C pertumbuhannya akan terhenti. Permukaan koloninya pada media TSA agak menonjol, berbentuk bulat putih dan sedikit seperti bergerigi pada pinggiran koloni. Menurut Austin dan Austin (2007), bakteri *A. hydrophila* memiliki ukuran berkisar 0.8-1.0 x 1.0-3.5  $\mu\text{m}$ , bersifat motil dan memiliki *single polar flagel*. bakteri *A.*

*hydrophila* mampu menghidrolisis arginine, katalase positif,  $\beta$ -galactosidase idole, lysin decarboxylase, cytochrome-oxidase dan memproduksi fosfat, namun tidak menghasilkan H<sub>2</sub>S.

### 3. Sensitivitas terhadap antibiotik

Hasil pengujian dengan beberapa antibiotik komersil menunjukkan bahwa bakteri *A. hydrophila* umumnya sensitive terhadap antibiotik Norfloxacin (Nor), Nitrofurantion (F), Chloramphenicol (C), Ciprofloxacin (CIP), Nalidixic Acid (NA), Oxytetracycline (OT), Gentamicin (CN).

**Tabel 1.3** Sensitivitas bakteri *A. hydrophila* terhadap antibiotik

Jenis Antibiotik	Diameter Zona Hambat Pada Jam Ke-				Kriteria
	6	12	18	24	
Norfloxacin	16,5	15,5	15	15	S
Nitrofurantion	20	19,5	20	19	S
Chloramphenicol	23,5	22,5	22,5	21,5	S
Ciprofloxacin	23,5	25	26,5	27,5	S
Nalidixic Acid	12	14	16,5	15,5	S
Oxytetracycline	17,5	18	19	19	S
Gentamicin	17,5	20	22,5	22,5	S
Tetrasiklin	27	28	30	35	S

Keterangan : S = Sensitif

Hasil pengujian terhadap delapan antibiotik (Tabel 1.3.) menunjukkan kriteria sensitif sehingga bakteri jenis *A. hydrophila* ini termasuk bakteri yang mudah ditanggulangi. Menurut Roman et al. (2012), Aeromonas merupakan bakteri umum yang memiliki Gram negatif, oxidase-fermentatif positif, dapat ditemukan di lingkungan perairan (Khardori dan Fainstein, 1988), makanan (Hänninen dan Siitonen, 1995), dan merupakan mikroflora pada ikan (Kirov, 1993). Resistensi terhadap bahan antibakterial biasanya dipengaruhi oleh susunan kromosom bakteri, namun  $\beta$ -lactamases yang dihasilkan oleh bakteri aeromonas dapat

menjadi ciri plasmids (Fosse et al., 2004, Sanchez-Cespedes et al., 2008) atau integrons (Barlow dan Gobius, 2009). Enzim tersebut memiliki kemampuan untuk menghambat  $\beta$ -lactam yang diproduksi oleh mikrobia, termasuk didalamnya cefepime dan spektrum cephalosporins lainnya.

Hasil pengujian sensitivitas terhadap antibakterial bakteri *Aeromonas* spp. sebanyak 144 isolat menunjukkan sebanyak sepuluh isolat *Aeromonas* spp.: *A. aquariorum* (58 strains), *A. veronii* bv. *sobria* (49 strains), *A. hydrophila* (39 strains), *A. caviae* (36 strains), *A. jandaei* (3 strains), *A. media* (3 strains), *A. salmonicida* (2 strains), dan masing-masing isolat *A. allosaccharophila*, *A. bestiarum*, dan *A. schubertii*.

**Tabel 1.4** Aktivitas antibakterial beberapa antibiotik terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*

Antimicrobial agent	MIC breakpoint(s) ( $\mu\text{g/ml}$ )	Percentage (no.) of strains susceptible		
		All isolates ( $n=193$ )	Clinical isolates ( $n=144$ )	Environmental isolates ( $n=49$ )
Amoxicillin (AMX)	8	1.6 (3)	0.7 (1)	4.0 (2)
Amoxicillin-clavulanate (AMC)	8/4	16.5 (32)	6.25 (9)	46.9 (23)
Norfloxacin (NOR)	4	100	100	100
Ciprofloxacin (CIP)	1	100	100	100
Nitrofurantoin (NIT)	32	99.5 (192)	99.3 (143)	100
Trimethoprim (TMP)	8	92.7 (179)	91 (131)	97.9 (48)
Cephalothin (CEF)	8	27.4 (53)	20.8 (30)	46.9 (23)
Meropenem (MEM)	0.25	100	100	100
	1	100	100	100
	4	100	100	100
Gentamicin (GEN)	4	99.5 (192)	99.3 (143)	100
Tobramycin (TOB)	4	95.3 (184)	93.8 (135)	100
Amikacin (AMK)	16	100	100	100
Ceftriaxone (CRO)	1	96.9 (187)	95.8 (138)	100
Ceftazidime (CAZ)	0.5	97.4 (188)	96.5 (139)	100
	4	99.5 (192)	99.3 (143)	100
Aztreonam (ATM)	4	99.5 (192)	99.3 (143)	100
Ticarcillin-clavulanate (TIM)	16/2	91.2 (176)	88.9 (128)	97.9 (48)
	64/2	95.9 (185)	95.1 (137)	97.9 (48)

Antimicrobial agent	MIC breakpoint(s) ( $\mu\text{g/ml}$ )	Percentage (no.) of strains susceptible		
		All isolates ( $n=193$ )	Clinical isolates ( $n=144$ )	Environmental isolates ( $n=49$ )
Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)	2/38	98.9 (191)	98.6 (142)	100
Cefepime (FEP)	0.5	98.9 (191)	98.6 (142)	100
	8	100	100	100
Nalidixic acid (NAL)	16	96.9 (187)	97.9 (141)	93.8 (46)
Cefoxitin (FOX)	8	65.2 (126)	65.9 (95)	63.2 (31)
Piperacillin-tazobactam (TZP)	16/4	97.4 (188)	96.5 (139)	100
	64/4	98.9 (191)	98.6 (142)	100
Moxifloxacin (MXF)	1	98.9 (191)	99.3 (143)	97.9 (48)
Tetracycline (TET)	4	94.3 (182)	95.1 (137)	81.6 (40)
Cefazolin (CFZ)	2	20.7 (40)	8.2 (9) <sup>±</sup>	10.2 (5)
Doxycycline (DOX)	S, $\leq 4$ ; I, 8; R, $\geq 16$	97.9 (189)	97.2 (140)	100
Tigecycline (TGC)	S, $\leq 2$ ; I, 4; R, $\geq 8$	100	100	100
Colistin (CST)	S, $< 2$	44.5 (86)	39.5 (57)	59.1 (29)

Sumber : Roman et al., 2012

Keseluruhan isolat dapat dihambat oleh beberapa antibiotik seperti amikacin, cefepime, ciprofloxacin, meropenem, norfloxacin, dan tigecycline. Antibiotik amoxicillin dapat menghambat 3 isolat (1.6%) *A. veronii* bv. *sobria* dan *A. aquariorum*. Sebanyak 22 isolat (16.5%) bakteri tidak tumbuh oleh antibiotik amoxicillin, 17 isolat (8.8%) nonsusceptible terhadap ticarcillin (16/2  $\mu\text{g/ml}$ ). Delapan isolat (4.4%) nonsusceptible terhadap ticarcillin konsentrasi tinggi (64/2  $\mu\text{g/ml}$ ). Bakteri yang sensitif terhadap cephalothin dan cefazolin berturut-turut 53 isolat (27.4%) dan 40 (20.7%) isolat. intermediate level terhadap antibiotik cefoxitin sebanyak 126 isolat (65.2%) dan colistin sebanyak 86 isolat (44.5%). Hasil uji dengan menggunakan metode MIC, antibiotik doxycycline berkisar antara 0.064 - 24.0  $\mu\text{g/ml}$ , tigecycline 0.064 - 3.0  $\mu\text{g/ml}$ , colistin berkisar 0.094 -  $>256$   $\mu\text{g/ml}$ . sensitivitas bakteri terhadap doxycycline dan tigecycline relative tinggi yaitu 97.2 dan 100%, secara berurutan.

## B. Postulat Koch dan Peningkatan Virulensi Bakteri *A. hydrophila*

Ikan nila yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* di alam menunjukkan gejala klinis abnormalitas seperti mata menonjol (eksoptalmia), tubuh menghitam, dan adanya memar merah atau luka pada permukaan tubuh atau sirip bahkan terkadang juga ditemukan ikan mengalami pendarahan. Pengujian Postulat Koch biasanya dilakukan dengan tujuan untuk menyakinkan jenis bakteri dan dampak yang ditimbulkan oleh bakteri pada inang. Pengujian dapat dilakukan dengan penginjeksian melalui intraperitoneal, dan diketahui bahwa infeksi *A. hydrophila* menyebabkan ikan mengami gejala eksoptalmia, *purulens* dan warna tubuh menghitam. Perubahan pada gejala renang dan patologi anatomi organ dalam maupun organ luar ikan nila yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dijabarkan pada Tabel 1.5.

**Tabel 1.5** Abnormalitas dan kematian yang terjadi pada ikan nila pasca diinjeksi *A. hydrophila*

Abnormalitas yang Terjadi	Waktu Terjadinya (pasca injeksi) (jam)
Garis Vertical Tubuh Menghitam	48
Eksoptalmia dan <i>Purulens</i>	96
Organ Dalam Berair dan Konsistensi Organ Menurun	-
Hati dan Ginjal Pucat	72
Kematian	48

Tabel 1.5 diatas menggambarkan gejala abnormalitas yang muncul pada ikan nila yang diinjeksi dengan bakteri *A. hydrophila* lebih banyak dibandingkan dengan ikan nila yang diinjeksi dengan *Pseudomonas* sp. Perubahan warna tubuh terjadi pada jam ke-48 pasca injeksi bakteri *A. hydrophila* dan tidak muncul pada ikan yang diinjeksi dengan *Pseudomonas*. Perubahan pada mata seperti eksoptalmia dan *purulens* terjadi pada jam ke-96 pasca injeksi bakteri *A. hydrophila* dan juga tidak muncul pada yang diinjeksi dengan *Pseudomonas* sp.

Secara umum gejala ikan nila yang terinfeksi bakteri kedua bakteri hampir sama. Infeksi dari bakteri *Pseudomonas* sp. menyebabkan terjadinya perubahan pada organ dalam ikan nila dan tidak tampak secara makroskopis pada organ luar. Perubahan yang terjadi seperti organ dalam berair dan terjadinya perubahan warna pada hati dan ginjal menjadi pucat. Kedua bakteri ini termasuk dalam bakteri Gram negatif yang memiliki kisaran inang yang luas. Perbedaan gejala yang muncul disebabkan karena perbedaan karakteristik dan sifat dari bakteri itu sendiri. Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri septicemia yang berkembang di pembuluh darah sehingga gejala yang muncul terkait dengan adanya pendarahan dan pembengkakan.

### C. Kepadatan Bakteri *A. hydrophila*

Hasil perhitungan TPC (Total plate count) yang dilakukan dengan metode tuang dengan pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-15}$ , bakteri yang tumbuh pada media sebanyak 30–300 dilakukan perhitungan, dan jumlah bakteri yang terhitung dapat dilihat pada Tabel 1.6.

**Tabel 1.6** Hasil perhitungan TPC bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp.

Faktor Pengenceran	Jumlah Bakteri
$10^{-8}$	270
$10^{-9}$	127
$10^{-10}$	42

Setelah dimasukkan ke dalam rumus TPC, maka diperoleh kepadatan bakteri *A. hydrophila* pada media TSB lama inkubasi 24 jam adalah yaitu  $1,91 \times 10^{11}$  CFU/ml.



## D. Uji Lethal Dose 50 (LD<sub>50</sub>)

Konsentrasi yang digunakan pada uji LD<sub>50</sub> bakteri *A. hydrophila* terdiri dari 5 kepadatan bakteri dan 1 kontrol dengan masing-masing 3 ulangan, dengan kisaran 10<sup>3</sup>–10<sup>11</sup> CFU/ml. Data hasil pengujian LD<sub>50</sub> bakteri *A. hydrophila* secara ringkas disajikan dalam Tabel 1.7.

**Tabel 1.7** Hasil uji LD50 yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila

Pengenceran	Jumlah Ikan	Jumlah Kematian	% Kematian
10 <sup>11</sup>	18	18	100
10 <sup>9</sup>	18	6	33,33
10 <sup>7</sup>	18	3	16,67
10 <sup>5</sup>	18	6	33,33
10 <sup>3</sup>	18	5	27,78
Kontrol	18	0	0

Persentase kematian ikan nila setelah penyuntikan dengan kepadatan bakteri yang berbeda mengalami peningkatan kematian sejalan dengan semakin tinggi kepadatan bakteri. Nilai LD<sub>50</sub> yang didapatkan dari penyuntikan bakteri *A. hydrophila* yang diisolasi dari lokasi budidaya Loa Kulu adalah 10<sup>10</sup> CFU/ ml. Konsentrasi bakteri yang tinggi tersebut disebabkan karena meningkatnya sistem imun pada ikan nila yang dimana saat ini telah banyak pembudidaya yang menggunakan imunostimulan dan vaksin untuk pencegahan dan penanggulangan bakteri tersebut.

Keadaan ini dengan sendirinya akan mempengaruhi kondisi ikan yang semakin meningkatkan daya tahan tubuhnya, strain bakteri yang berbeda akan berpengaruh terhadap tingkat patogenisitasnya pada inang. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sholikhah (2009), pada ikan lele hasil uji LD<sub>50</sub> yang diperolehnya yaitu bakteri *A. hydrophila* dengan konsentrasi 10<sup>8</sup> CFU/ ml mampu mematikan ikan sebanyak 53,82%.

## E. Patogenisitas Bakteri *A. hydrophila*

Patogenisitas merupakan kemampuan suatu organisme patogen menyebabkan penyakit atau menimbulkan sakit pada inang. Salah satu faktor yang mempengaruhi adalah *port entry* atau jalan masuk untuk mencapai organ target. Menurut Ellis (1988) jalan masuk bakteri ada 5 jalan, melalui kulit, mulut, hidung, anus, dan insang. Pintu masuk bakteri ini berpengaruh terhadap tingkat penyakit yang ditimbulkan.

### 1. Perubahan pola berenang ikan pasca infeksi bakteri *A. hydrophila*

Waktu terjadinya perubahan gejala tingkah laku ikan nila yang terinfeksi dengan *A. hydrophila* melalui berbagai jalur infeksi tampak berbeda seperti yang dijabarkan pada Tabel 1.8.

**Tabel 1.8** Perubahan tingkah laku berenang dan nafsu makan ikan nila yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila* (jam) melalui empat jalur infeksi yang berbeda

Parameter yang diamati	Waktu Awal Terjadinya Perubahan (Jam)			
	Rendam (PM)	Pakan (PK)	intraperitoneal (IP)	intramuscular (IM)
Berenang Gasping	48	96	72	48
Berenang di Dasar Akuarium	72	96	48	24
Gerak Refleks Lambat	96	120	120	96
Gerakan Operkulum Cepat	24	24	24	24
Nafsu Makan Menurun	24	168	48	24

Ikan nila yang tidak terinfeksi bakteri *A. hydrophila*, menunjukkan pola renang yang normal, yaitu berenang pada kolom air, respon terhadap pakan yang diberikan dalam kondisi baik dan gerakan operkulum pun juga terlihat normal (11 bukaan /10 detik). Infeksi bakteri *A. hydrophila* melalui injeksi intramuskular lebih cepat menyebabkan perubahan pada pola berenang di bandingkan dengan ketiga cara penginfeksi yang lain (Tabel 1.8). Ikan berenang lemah, gerakan operkulum melemah dan nafsu makan berkurang pada ikan nila yang terinfeksi *A. hydrophila* melalui intramuskular pada jam ke 24 pasca infeksi. Hal ini disebabkan karena

bakteri ini bersifat septicemia yang berkembang di dalam darah, sehingga penyebaran bakteri lebih cepat terjadi melalui injeksi intramuskular yang ditandai dengan munculnya gejala abnormalitas pada pola renang dan penurunan nafsu makan yang lebih cepat dibandingkan dengan jalur penginfeksi yang lain. Penginfeksi melalui pakan terlihat menyebabkan abnormalitas yang paling lambat, ikan nila berenang gasping atau diam di dasar akuarium baru muncul pada jam ke 96 sedangkan, jalur infeksi yang lain gejala tersebut sudah muncul pada jam ke 48-72 jam. Hal ini disebabkan karena perkembangan dan penyebaran bakteri dalam tubuh inang terhambat oleh adanya enzim dalam saluran pencernaan.

## **2. Perubahan patologi anatomi ikan nila secara makroskopis ikan pasca infeksi bakteri *A. hydrophila***

Ikan nila yang terinfeksi *A. hydrophila* mengalami pendarahan pada organ yang terinfeksi, penginjeksian melalui IM dan IP menyebabkan ikan nila mengalami luka/borok pada organ yang terinfeksi, namun gejala lebih cepat muncul pada jalur IM, ini disebabkan karena cepatnya penyebaran bakteri pada inang melalui injeksi IM (Tabel 1.9). Gejala klinis ikan nila yang terinfeksi sama dengan gejala pada ikan lele yang diinjeksi dengan *A. hydrophila* yaitu adanya pendarahan pada organ yang terinfeksi (Angka et al., 2000). Patologi anatomi organ dalam ikan nila lebih cepat terjadi pada ikan yang diinjeksi dengan kedua cara (IP dan IM) dibandingkan melalui PM dan PK. Menurut Sutrisno dan Yuli (2004) perubahan yang cepat tersebut disebabkan karena penyuntikkan intraperitoneal langsung menyebabkan kerusakan organ-organ viseral seperti hati dan ginjal. Menurutnya di dalam rongga viseral terdapat banyak pembuluh darah sehingga bakteri cepat menyebar melalui pembuluh darah.

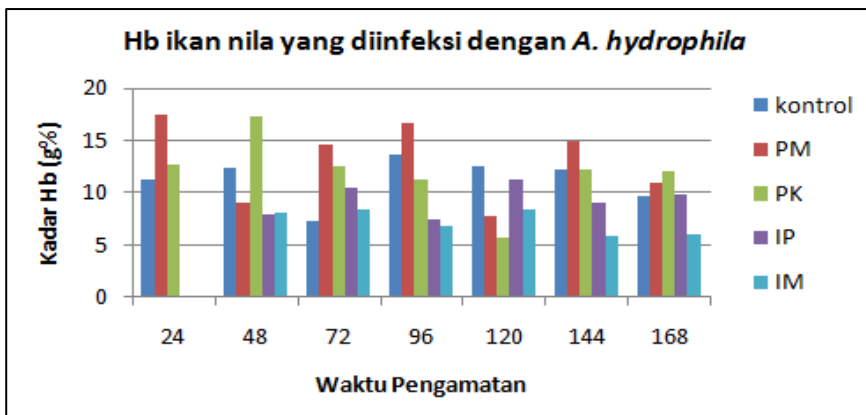
**Tabel 1.9** Pengamatan patologi anatomi organ luar dan organ dalam ikan nila yang diinfeksi dengan *A. hydrophila* melalui *port entry* yang berbeda

Perubahan PA yang Terjadi	Waktu Awal Terjadinya Perubahan (Jam)			
	PM	PK	IP	IM
Pendarahan di Tempat Infeksi	24	48	48	48
Sisik Lepas	24	24	72	72
Sirip Gripis	24	24	-	-
Luka/Borok di Tempat Infeksi	-	-	72	24
Eksoptalmia, Opacity, Purulens	24	-	72	72
Warna Tubuh Menghitam	72	120	-	96
Hati Hancur dan Warnanya Kehitaman	96	120	24	48
Ginjal Kekuningan	96	120	24	48

Ikan nila yang terinfeksi kedua bakteri ini di alam menunjukkan gejala klinis abnormalitas seperti mata menonjol (eksoptalmia), tubuh menghitam, dan adanya memar merah atau luka pada permukaan tubuh atau sirip bahkan terkadang juga ditemukan ikan mengalami pendarahan.

### 3. Gambaran darah ikan pasca infeksi bakteri *A. hydrophila*

Gambaran darah ikan yang menggambarkan sistem imunitas ikan juga diamati yaitu berupa total leukosit (TI), total eritrosit (Te), diferensial leukosit (DI), hematokrit (He), dan hemoglobin (Hb).

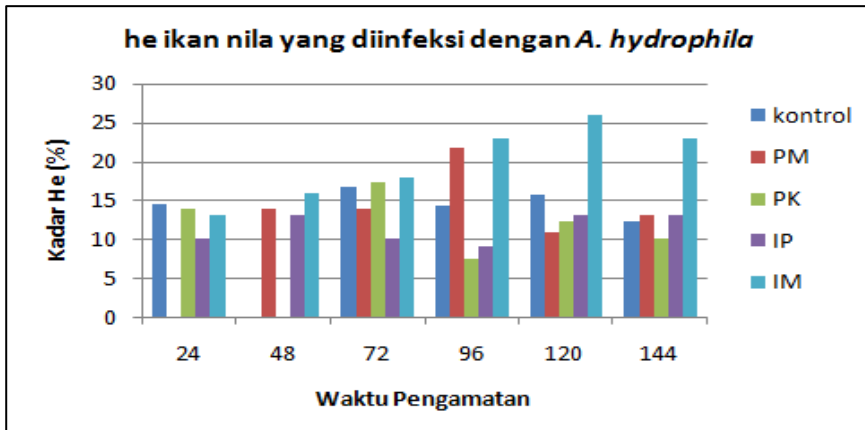


**Gambar 1.2** Gambaran darah ikan nila : hemoglobin (Hb) yang diinjeksi dengan *A. hydrophila* melalui jalur infeksi yang berbeda

Hemoglobin merupakan karakteristik dari eritrosit, seperti yang dikemukakan oleh Marthen (2005) bahwa warna merah dalam darah segar disebabkan adanya Hb dalam sel darah merah. Kemampuan darah untuk mengangkut oksigen bergantung pada kadar Hb dalam darah Marthen (2005). Hemoglobin (Hb) ikan nila yang diinfeksi melalui injeksi terlihat mengalami penurunan dari normal sejak jam ke 24-168 pada perlakuan IP dan IM (Gambar 1.2), ini menandakan bahwa keberadaan bakteri yang kemungkinan menghasilkan eksotoksin maupun endotoksin menyebabkan penurunan Hb. Hal ini sejalan dengan hasil pengamatan total eritrosit, yang mengalami penurunan lebih cepat pada perlakuan IP dan IM, diduga disebabkan oleh keberadaan toksin dari bakteri yang menyebabkan eritrosit mengalami lysis. Artinya, keberadaan *A. hydrophila* menyebabkan perubahan pada jumlah Hb ikan nila pada jam ke 120.

Kadar hemoglobin (Hb) ikan berkaitan dengan anemia dan jumlah sel darah, peningkatan Hb yang diikuti adanya penurunan yang sangat drastis terjadi karena adanya infeksi. Walaupun masih dalam kondisi normal, namun kadar Hb ikan yang disuntik *A. hydrophila* cenderung naik turun. Pada jam ke 72 kadar Hb 10,4 g% namun di jam ke 96 mengalami penurunan menjadi 7,5 g% dan kembali naik di jam 120 hingga 11,2 g%. Kadar rata-rata Hb ikan nila normal berkisar 6–11,01 (g%), Hb berfungsi mengikat oksigen yang kemudian akan digunakan untuk proses katabolisme sehingga dihasilkan energi (Lagler et al., 1997 dalam Bastiawan et al., 2001). Kemampuan mengikat oksigen dalam darah tergantung pada jumlah hemoglobin yang terdapat dalam sel darah merah. Bastiawan et al. (2001) menulis bahwa rendahnya kadar Hb menyebabkan laju metabolisme menurun dan energi yang dihasilkan menjadi rendah. Hal ini membuat ikan menjadi lemah dan tidak memiliki nafsu makan serta terlihat diam di dasar atau menggantung di bawah

permukaan air. Dellman dan Brown (1989) melaporkan bahwa apabila terkena infeksi, nafsu makan ikan akan menurun dan nilai hematokrit darah akan menurun. Pada kasus anemia mikrositik, jumlah dan ukuran sel darah merah berkurang, sehingga kadar hematokrit juga rendah.

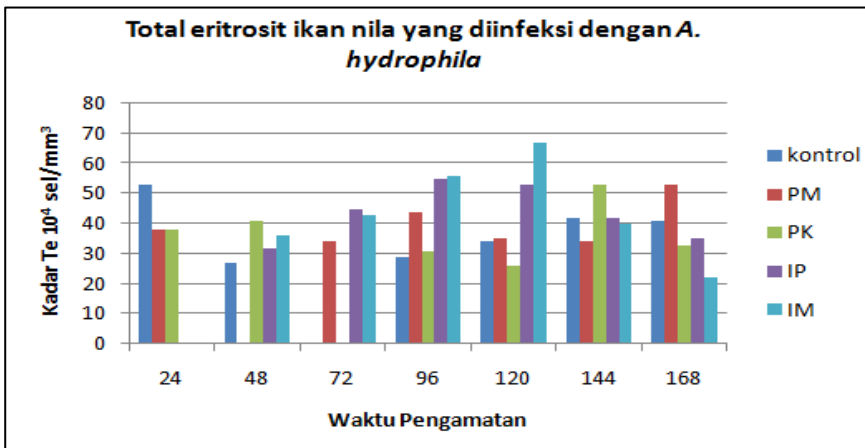


**Gambar 1.3** Gambaran darah ikan nila : Hematokrit (He) yang diinjeksi dengan *A. hydrophila* melalui jalur infeksi yang berbeda

Kadar hematokrit (He) ikan nila yang diinfeksi *A. hydrophila* mengalami penurunan pada jam ke 72 kedua perlakuan (PM dan IP). Sehingga dapat diartikan, bahwa keberadaan *A. hydrophila* menyebabkan perubahan secara nyata pada jumlah He ikan nila yaitu pada jam ke 72 dan jam ke 120. Rataan kadar hematokrit ikan nila normal berkisar 27,3–37,8% dan kadar hematokrit ikan uji yang di suntik *A. hydrophila* sepanjang penelitian berfluktuasi.

Pada ikan uji yang disuntik *A. hydrophila*, nilai hematokritnya berkisar antara 9–13%. Rendahnya nilai hematokrit pasca injeksi tersebut dikarenakan karena terjadinya pendarahan pada luka, seperti pada ikan-ikan yang menunjukkan perubahan patologi anatomi, tetapi dapat juga dikatakan bahwa ikan menunjukkan gejala anemia, biasanya salah satu penyebab anemia adalah kekurangan pakan. Ikan yang di suntik bakteri tersebut, menjadi tidak respon terhadap pakan yang diberikan.

Anderson (1992) menyatakan bahwa leukosit merupakan salah satu komponen sel darah yang berfungsi sebagai pertahanan non spesifik yang akan melokalisasi dan mengeliminasi patogen. Masih menurut Anderson perubahan populasi leukosit dapat diamati setelah 7 hari pasca pemaparan oleh bakteri. Adanya infeksi *A. hydrophila* menyebabkan ikan mengirimkan sel leukosit lebih banyak ke areal infeksi sebagai upaya pertahanan. Sel-sel leukosit tersebut bekerja sebagai sel yang memfagosit bakteri yang ada agar tidak berkembang dan menyebarkan virulensi dalam tubuh inang sehingga sering ditemukan jumlah total leukosit mengalami peningkatan pasca penyuntikan oleh bakteri.

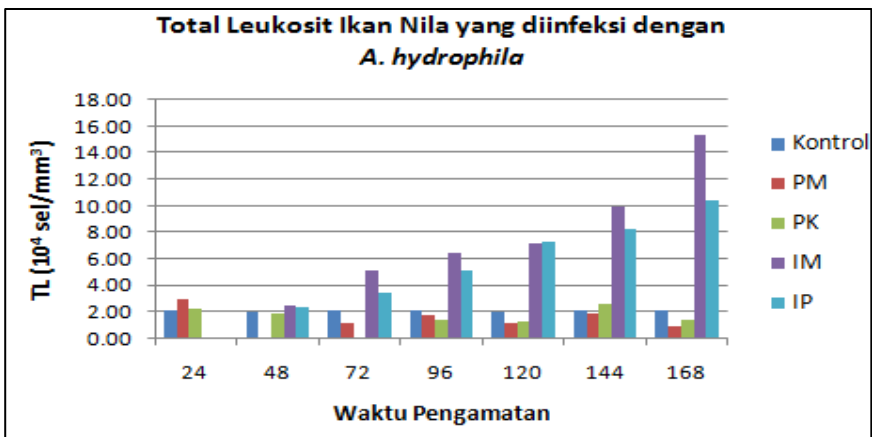


**Gambar 1.4** Gambaran darah ikan nila (eritrosit) yang diinjeksi dengan *A. hydrophila* melalui jalur infeksi yang berbeda

Total Leukosit mengalami peningkatan pada jam ke 48 dan ke 120 pada perlakuan PM, PK, IM, IP. Hasilnya diartikan, bahwa keberadaan *A. hydrophila* secara nyata dapat mempengaruhi perubahan total leukosit pada ikan nila. Rataan proporsi leukosit ikan nila normal yaitu: limfosit (68-86%), monosit (3,9-5,9%) dan neutrofil (10-18,1%). Leukosit merupakan komponen penting yang memiliki peran dalam sistem kekebalan tubuh ikan. Perubahan pada jumlah total dan jenis leukosit dapat dijadikan indikator adanya penyakit infeksi tertentu yang terjadi pada ikan (Blaxhall,

1972). Sel-sel leukosit akan ditranspor secara khusus ke daerah terinfeksi. Rataan total leukosit ikan nila yang disuntik *A. hydrophila* cenderung naik, mulai 48 jam pertama hingga jam ke 168 pasca penyuntikkan.

Keberadaan *A. hydrophila* yang memproduksi eksotoksin hemolisin yang merupakan enzim yang mampu melisiskan sel-sel darah merah dan membebaskan hemoglobinnya. Sehingga rataan eritrosit ikan uji umumnya menurun atau lebih rendah dari normal hingga jam ke 168. Rendahnya jumlah eritrosit tersebut di duga karena adanya infeksi bakteri yang menyebabkan anemia. Pendapat ini didukung oleh Wedemeyer dan Yasutake (1977) yang menyatakan bahwa rendahnya eritrosit merupakan indikator terjadinya anemia, sedangkan tingginya jumlah eritrosit menandakan ikan dalam keadaan stress.



**Gambar 1.5** Gambaran darah ikan nila (leukosit) yang diinjeksi dengan *A. hydrophila* melalui jalur infeksi yang berbeda

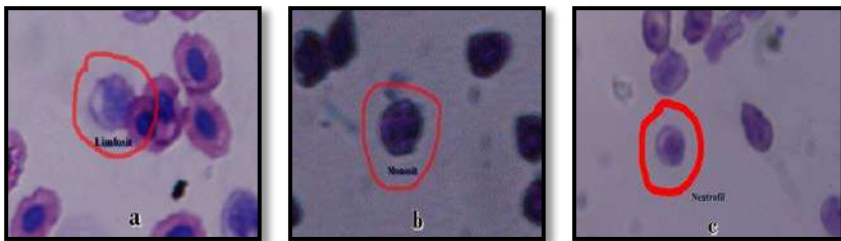
Peningkatan total eritrosit ini menandakan adanya upaya homeostatis pada tubuh ikan (infeksi patogen) tubuh memproduksi sel darah lebih banyak untuk menggantikan eritrosit yang mengalami lisis akibat adanya infeksi. Seperti yang ditunjukkan Tabel 5.9 di atas, ikan nila yang disuntik *A. hydrophila* gambaran darah ikan terus meningkat. Namun



di jam ke 120 ikan nila yang disuntik Te mengalami penurunan, walaupun hanya sedikit yaitu berkisar antara  $(54-55) \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$ .

Menurut Clem et al. (1985), bahwa jenis leukosit terdiri dari 3 jenis, begitu juga pada ikan nila yang tersusun dari limfosit, monosit dan neutrofil. Namun terkadang juga ditemukan basofil dan eosinofil. Rataan proporsi leukosit ikan nila normal yaitu: limfosit 68–86%, monosit 3,9–5,9% dan neutrofil 10–18,1%, sedangkan rata-rata proporsi leukosit ikan nila yang disuntik bakteri *A. hydrophila* bervariasi yaitu jumlah limfosit 20–59%, monosit 8–25%, neutrofil 23–38% dan kontrol memiliki jumlah limfosit 66-75%, monosit 4-7% dan neutrofil 11-14%.

Jumlah sel limfosit terus mengalami penurunan dari 48 jam pertama pasca penyuntikkan. Pada ikan nila yang disuntik penurunan jumlah limfosit yang sangat drastis terjadi pada jam ke 120 yaitu dari 50% menjadi 33%. Penurunan sel limfosit terus terjadi hingga pengamatan terakhir jam ke 168 dengan jumlah limfosit yang sangat kecil yaitu 22%.



**Gambar 1.6** Diferensial leukosit ikan nila (a. Limfosit, b. Monosit, c. Neutrofil)

Bijanti (2005) menjelaskan penurunan sel limfosit dipengaruhi adanya antigen asing sehingga zat kebal terganggu oleh masuknya infeksi yang menyebabkan jumlah limfosit menurun. Tizard (1982) menyatakan penurunan limfosit disebabkan di darah perifer ditarik dari sirkulasi ke dalam jaringan yang mengalami peradangan, adanya stres berkepanjangan

akan meningkatkan kadar kortisol dalam darah sehingga menyebabkan hilangnya limfosit dalam sirkulasi darah dan organ limfoid.

Penurunan jumlah limfosit ini diikuti dengan peningkatan jumlah sel monosit dan sel neutrofil. Sel monosit dan neutrofil ini merupakan leukosit fagosit kuat. Pasca penyuntikan ikan uji dengan bakteri *A. hydrophila*, jumlah kedua sel tersebut mengalami peningkatan dan penurunan yang hampir sama, yaitu peningkatan yang sangat drastis terjadi pada jam ke 72, yaitu dari 8,86% menjadi 17% dan mengalami penurunan di jam ke 120 dan meningkat kembali pada jam ke 144 dan jam ke 168.

Berdasarkan uji statistik menunjukkan perbedaan monosit antar perlakuan tersebut telah terjadi mulai 48 jam pasca penyuntikan dan pada jam ke 96 hingga jam ke 120 terjadi perubahan dan berbeda nyata dengan kontrol. Peningkatan persentase monosit selama proses infeksi ini mendorong monosit untuk menghancurkan benda asing yang masuk yaitu bakteri. Monosit merupakan sel dalam aliran darah dan berkembang menjadi makrofag. Ketika mengalami aktivasi, makrofag memiliki kapasitas fagosit lebih kuat dari pada neutrofil meskipun granulosit mempunyai jumlah lebih besar (Irianto, 2005). Maftuch (2007) mengatakan bahwa pada proses inflamasi saat terjadi kerusakan jaringan oleh infeksi maupun reaksi antigen-antibodi, akan meningkatkan produksi monosit menjadi dua kali lebih banyak. Peredaran monosit dalam darah menjadi lebih singkat, pematangan monosit menjadi makrofag lebih cepat dan segera menuju ke jaringan yang rusak.

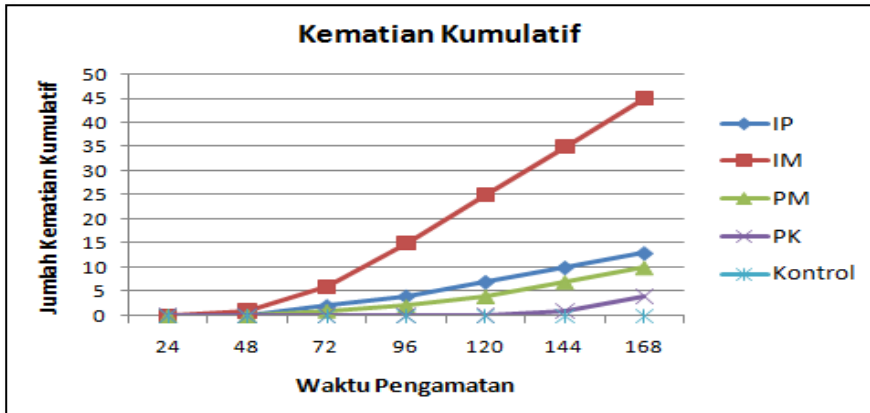
Neutrofil merupakan sel fagosit sistem polymorphonuklear yaitu sel yang bekerja cepat dalam melakukan fagosit tetapi tidak mampu bertahan lama. Sel ini berupa sel bundar dengan sitoplasma bergranula halus dan di tengahnya terdapat nukleus bersegmen (Tizard, 1982). Masih menurut Tizard (1982) juga mengungkapkan bahwa indikator respon imun non

spesifik ikan nila dapat dilihat dari aktivitas neutrofil. Sama seperti sel monosit, sel neutrofil ikan nila yang disuntik *A. hydrophila* juga terus mengalami peningkatan, peningkatan terjadi dari 48 jam pertama pasca penyuntikkan dan terus meningkat. Seperti yang dikemukakan oleh Harikrishnan et al. (2010) bahwa neutrofil dalam darah akan meningkat jika terjadi infeksi dan berperan sebagai pertahanan pertama dalam tubuh. Sel ini merupakan fagosit kuat, fagositosis dilakukan dengan cara mendekati partikel asing, mengeluarkan pseudopodi ke segala arah sekitar partikel (rangsangan kimiawi eksternal), satu neutrofil dapat memfagosit 5–20 bakteri sebelum kemudian tidak aktif (Tizard, 1982). Namun diakhir penelitian (168 jam) jumlah neutrofil mengalami penurunan.

Penurunan sel neutrofil baru terjadi pada jam ke 168 yang disebabkan adanya luka, jumlah neutrofil akan mengalami penurunan karena neutrofil akan keluar dari pembuluh darah dan bergerak menuju jaringan tubuh yang terinfeksi. Berdasarkan uji statistik, perbedaan yang nyata antar perlakuan dengan kontrol terjadi pada jam ke 48 dan jam ke 168 pasca penyuntikkan, artinya keberadaan bakteri *A. hydrophila* pada tubuh ikan nila umumnya menyebabkan perubahan pada neutrofil secara nyata.

#### **4. Kematian ikan pasca infeksi bakteri *A. hydrophila***

Kematian kumulatif ikan yang diinfeksi *A. hydrophila* melalui keempat jalur infeksi disajikan dalam Gambar 1.4. Kematian paling tinggi terjadi pada ikan nila yang diinfeksi melalui IM, ini menandakan bahwa bakteri septicemia lebih cepat menyebarkan virulensi melalui aliran darah dalam muscular.



**Gambar 1.7** Kematian kumulatif ikan nila yang diinfeksi *A. hydrophila* melalui PM, PK, IM, IP

**Tabel 1.10** Abnormalitas dan kematian yang terjadi pada ikan nila pasca diinjeksi

Abnormalitas yang Terjadi	Waktu Terjadinya (Pasca Injeksi) (Jam)	
	<i>A. hydrophila</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
Garis Vertical Tubuh Menghitam	48	-
Eksoptalmia dan Purulens	96	-
Organ Dalam Berair dan Konsistensi Organ Menurun	-	72
Hati dan Ginjal Pucat	72	120
Kematian	48	72

Tabel 1.10 di atas menggambarkan gejala abnormalitas yang muncul pada ikan nila yang diinjeksi dengan bakteri *A. hydrophila* lebih banyak dibandingkan dengan ikan nila yang diinjeksi dengan *Pseudomonas sp.* Perubahan warna tubuh terjadi pada jam ke 48 pasca injeksi bakteri *A. hydrophila* dan tidak muncul pada ikan yang diinjeksi dengan *Pseudomonas sp.* Perubahan pada mata seperti eksoptalmia dan purulens terjadi pada jam ke 96 pasca injeksi bakteri *A. hydrophila* dan juga tidak muncul pada yang diinjeksi dengan *Pseudomonas sp.*

Perubahan yang terjadi seperti organ dalam berair dan terjadinya perubahan warna pada hati dan ginjal menjadi pucat. Kedua bakteri ini termasuk dalam bakteri gram negatif yang memiliki kisaran inang yang luas. Perbedaan gejala yang muncul disebabkan karena perbedaan karakteristik dan sifat dari bakteri itu sendiri. Bakteri *A. hydrophila*

merupakan bakteri septicemia yang berkembang di pembuluh darah sehingga gejala yang muncul terkait dengan adanya pendarahan dan pembengkakan.

Kesimpulannya adalah bahwa Bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. telah ditemukan menginfeksi ikan nila di sentra budidaya Loa Kulu Kabupaten Kutai Kartanegara. Kondisi tersebut disebabkan makin buruknya sumber air yang digunakan untuk budidaya selain itu, sistem budidaya yang bercampur dalam satu area menyebabkan meningkatnya perpindahan bakteri dari satu spesies ikan yang satu ke spesies ikan yang lain. Seperti yang terjadi di Loa Kulu, sistem budidaya ikan nila dilakukan dalam karamba, dimana satu areal budidaya tidak hanya dipelihara ikan nila saja melainkan juga jenis ikan yang lain seperti mas, patin dan lele. Kondisi inilah yang memicu makin meluasnya penyebaran bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp.

## **F. Produk Ekstraseluler (ECP) dan Intraseluler (ICP) Bakteri *A. hydrophila***

Faktor virulensi dari bakteri *A. hydrophila* khususnya yang berasal dari daerah budidaya Kalimantan Timur, Indonesia belum banyak dikaji. Bakteri *A. hydrophila* menyebar di hampir seluruh sentra budidaya ikan air tawar di Indonesia, karakteristik bakteri ini pun dari satu daerah dengan daerah yang lain memiliki perbedaan. Hal ini berpengaruh terhadap berbedanya tingkat virulensi atau patogenisitas bakteri pada inang. Menurut Williams (2003), eksotoksin (ECP dan toksin lainnya) merupakan faktor virulen bakteri Gram positif, sedangkan LPS (endotoksin) bersifat lebih virulen pada bakteri gram negatif. Untuk mengetahui mekanisme infeksi pada ikan nila, dan cara penanggulangan yang tepat perlu dilakukan mekanisme infeksi dari bakteri pada inang.

## **1. Isolasi produk ekstraselluler (ECP) bakteri *A. hydrophila***

Isolasi ECP mengikuti prosedur Sirirat et al (1999) dengan urutan kerja : bakteri dikultur dalam media cair *Trypticase Soya Broth* (TSB) dan *Trypticase Soy Agar* dan media padat *Trypticase Soya Agar* (TSA). Kultur bakteri diinkubasi selama 24, 48, dan 72 jam pada suhu 30°C dan 40°C. Bakteri yang tumbuh pada media TSB dan bakteri yang tumbuh dalam media TSA (terlebih dahulu ditambahkan *Phospat Buffer Saline*/PBS sebanyak 5 mL) kemudian dipanen. *Slurry* berupa suspensi bakteri kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan disaring dengan *filter paper* 0,45 µm dan selanjutnya hasil filtrasi dan difraksinasi menggunakan SDS PAGE (Hardi et al., 2011).

Fraksinasi protein ini dilakukan melalui metode SDS-PAGE (Laemmli, 1970) dengan standar protein BM rendah, 10% gel pemisah dan 4% gel penahan. Fraksinasi dilakukan melalui SDS-PAGE, gel di *running* dalam 600 ml buffer elektroforesis pH 8.3 mengandung 192 mM glisin + 0.1% SDS + 24.8 mM Tribase (Trishidroksiaminometan). Sebelum dimasukkan ke dalam sumur, ECP dan marker + buffer sampel (rasio 1:1) dicampurkan, kemudian diinkubasi dalam air mendidih selama 1 menit. Buffer sampel mengandung 1 gram SDS, 2 ml gliserol 50%, 2 ml bromofenol biru 0.1%, 1.25 ml TrisCl 1 M pH 6.8 dan ditambahkan akuades hingga volume menjadi 10 ml, volume marker dan ECP adalah 20 µl. Kondisi elektroforesis adalah 100 mA, 100 volt selama 90–120 menit. Deteksi pita menggunakan metode *Silver Staining*.

Pewarnaan dengan metoda *Silver Staining* dengan cara gel difiksasi dengan larutan (25% methanol, 12% Asam asetat) selama 1 jam, kemudian direndam dalam etanol 50%, selama 20 menit. Setelah itu direndam

kembali dalam etanol 30%, selama 20 menit sebanyak 2 kali. Selanjutnya diencerkan (0.1 gram  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) dalam 500 ml akuades selama 1 menit, dicuci dengan akuades 20 detik, diulang 3 kali. Kemudian dicelupkan ke dalam larutan silver nitrat (0.4 g  $\text{AgNO}_3$  dicampurkan dengan 70  $\mu\text{m}$  formaldehid dalam 200 ml akuades) selama 30 menit. Langkah berikutnya adalah dibilas dengan akuades sebanyak 2 kali selama 20 detik dan dicelupkan ke dalam larutan (15 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 120  $\mu\text{l}$  formaldehid). Maka akan terlihat band hitam, saat itulah reaksi dengan larutan fiksasi dihentikan. Hasil elektroforesis kemudian dianalisis untuk mengetahui berat molekul masing-masing fraksi protein dengan cara setiap band yang terbentuk dibandingkan dengan protein marker.

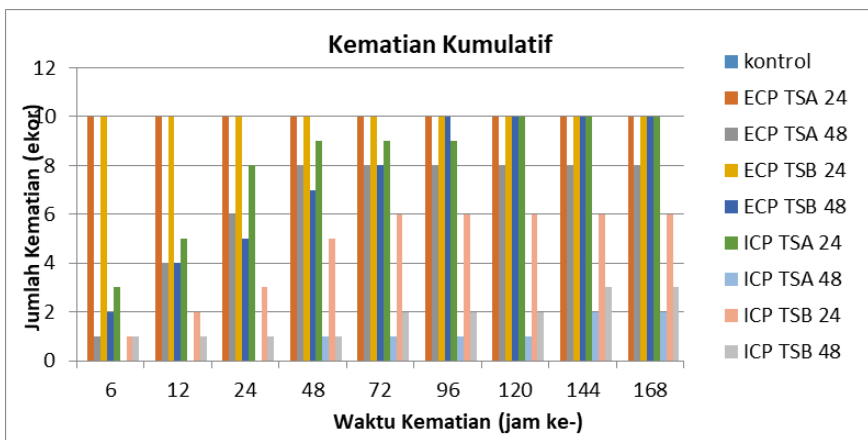
## **2. Isolasi produk intraseluler (ICP) bakteri *A. hydrophila***

Banyak metode Isolasi ECP dan ICP bakteri, salah satunya adalah Suprpto et al (1997) yang dimodifikasi. Bakteri dikultur dalam media cair (TSB) dan media padat (TSA) dan diinkubasi selama 24 dan 48 jam pada suhu 30 °C. Bakteri yang tumbuh pada media TSB dan bakteri yang tumbuh dalam media TSA (terlebih dahulu ditambahkan PBS sebanyak 5 ml) kemudian dipanen. Slurry berupa suspensi bakteri kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10000 g selama 30 menit, untuk mendapatkan ECP dilakukan sentrifuse pada suhu 4°C dan untuk ICP dilakukan sentrifuse pada suhu 40-50°C. Supernatan yang dihasilkan disaring dengan filter paper 0.45  $\mu\text{m}$  dan selanjutnya hasil filtrasi digunakan untuk pengujian toksisitas ECP dan ICP terhadap ikan nila.

### 3. Toksisitas ECP dan ICP bakteri *A. hydrophila*

a. Kematian ikan nila

Jumlah kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi dengan ECP (inkubasi 24 jam) mencapai 100% pada jam ke 6 baik yang ditumbuhkan pada media TSA maupun TSB, sedangkan yang diinjeksi dengan ICP (inkubasi 24 jam pada media TSA) kematian 100% baru terjadi pada jam ke 120 pasca injeksi. Media tumbuh juga berpengaruh terhadap jenis ECP yang dihasilkan.



**Gambar 1.8** Kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri *A. hydrophila*

Kematian yang tinggi disebabkan karena dalam ECP *A. hydrophila* diduga mengandung enzim hemolisin yang menyebabkan penurunan sel darah merah sangat cepat, hal ini sejalan dengan penelitian Karunakaran (1994), bahwa enzim hemolitik dihasilkan oleh bakteri *A. caviae* pada fase stasioner, jika dilihat dari data kematian yang diinjeksi dengan ECP diketahui bahwa jam ke 18-24 merupakan fase stasioner bakteri *A. hydrophila*. Penginjeksian dengan ECP lama inkubasi 24 jam menyebabkan kematian lebih cepat dibandingkan dengan lama inkubasi 48 jam, hal ini diduga *A. hydrophila* menghasilkan protein yang bersifat toksik saat diinkubasi 24 jam dibandingkan saat diinkubasi pada 48 jam.



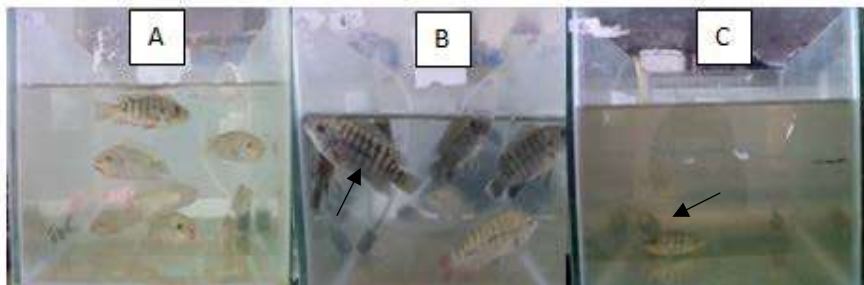
b. Perubahan pola renang ikan nila

Pola renang ikan yang diinjeksi dengan ECP dan ICP menunjukkan perubahan seperti tampak pada Tabel 1.11.

**Tabel 1.11** Perubahan pola renang ikan nila pada uji toksisitas ECP bakteri *A. hydrophila* yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB

Tingkah laku berenang	Kontrol	Waktu terjadinya perubahan								
		ECP				ICP				
		TSA 24	TSA 48	TSB 24	TSB 48	TSA 24	TSA 48	TSB 24	TSB 48	
Berenang lemah	-	6	-	6	24	24	24	-	48	-
<i>Gaspang</i>	-	-	-	6	-	-	-	-	48	-
Diam di dasar	-	6	24	-	-	-	-	-	-	-
Reflek lambat	-	6	24	6	24	24	24	24	48	24
Nafsu makan menurun	-	-	24	-	24	24	24	24	24	24

Ikan yang diinjeksi dengan ECP tampak berenang lemah dan diam di dasar akuarium pada jam ke 6-24, sedangkan yang diinjeksi dengan ICP gejala muncul lebih lama 24-48 jam. Perubahan pola makan terjadi hampir pada seluruh ikan yang diinjeksi dengan ECP.



**Gambar 1.9** Beberapa perubahan pola renang ikan nila pasca injeksi dengan ECP dan ICP *A. hydrophila*. [A] Ikan normal [B] ikan berenang gasping [C] ikan berenang diam di dasar akuarium

Ikan berkurang nafsu makannya sejak 24 jam pertama pasca injeksi, bahkan ikan mulai tidak mau makan setelahnya. Hal ini disebabkan oleh ECP yang masuk dalam otak ikan yang merusak hipotalamus sehingga mengganggu keseimbangan rasa lapar ikan.

c. Perubahan anatomi organ ikan nila

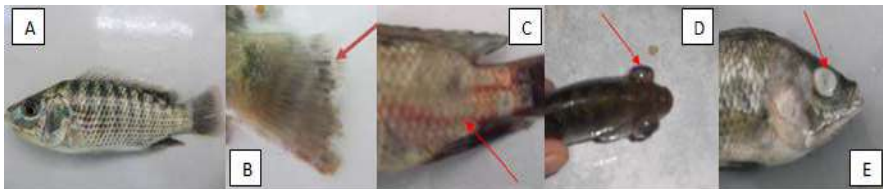
Pada pengujian patogenisitas ECP dan ICP bakteri *A. hydrophila* tampak adanya perubahan pada patologi anatomi ikan nila. Perubahan pada penginjeksian dengan ECP hanya diamati pada 6 jam pasca injeksi karena keseluruhan ikan uji mengalami kematian. Secara makroskopis, organ mata ikan nila yang diinjeksi dengan ECP maupun ICP lama inkubasi 48 jam tampak mengalami eksoptalmia atau mengalami opacity yang terjadi pada jam ke 48 pasca injeksi, lebih cepat dibandingkan dengan penginjeksian ECP lama inkubasi 24 jam, perubahan baru terjadi pada jam ke 120 pasca injeksi.

Secara keseluruhan, ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dengan lama inkubasi yang berbeda mengalami patologi anatomi organ luar lebih cepat dibandingkan dengan penginjeksian dengan ICP, abnormalitas yang muncul juga lebih banyak pada ikan yang diinjeksi dengan ECP. Penyuntikan ICP yang berasal dari media padat (TSA) tampak lebih cepat menyebabkan perubahan anatomi organ luar secara makroskopis dibandingkan dengan media cair (TSB) (Tabel 1.12).

**Tabel 1.12** Patologi anatomi organ luar ikan nila pada uji toksisitas ECP dan ICP bakteri *A. hydrophila* yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB

Patologi Organ Luar	Anatomi	Kontrol	Waktu Terjadinya Perubahan (Jam Ke)							
			ECP				ICP			
			TSA 24	TSA 48	TSB 24	TSB 48	TSA 24	TSA 48	TSB 24	TSB 48
<b>Permukaan Tubuh</b>										
Pendarahan Pada Tubuh		-	6	24	6	-	24	-	24	-
Warna Tubuh Menghitam		-	6	6	6	6	24	6	24	6
Sirip Gripis		-	6	-	6	-	48	48	48	-
Borok Pada Anus		-	6	24	-	-	-	24	-	24
<b>Operkulum</b>										
Clear Operculum		-	6	-	6	-	24	-	24	-
Pendarhanan		-	6	6	-	-	-	6	-	-
<b>Mata</b>										
Opacity		-	-	24	-	24	48	6	48	24
Eksoptalmia		-	-	-	-	-	72	-	72	-

Ikan yang diinjeksi dengan ECP dari kedua media lebih cepat mengalami clear operculum, yaitu pada jam ke 6 pasca injeksi dan gejala tersebut baru muncul pada 24 jam pasca injeksi dengan ICP dari kedua media. Hal ini menunjukkan bahwa ECP yang berasal dari bakteri yang diinkubasi selama 24 jam mengandung bahan toksik yang menyebabkan perubahan patologi anatomi organ luar lebih cepat. Media tumbuh bakteri tidak berpengaruh secara signifikan terhadap ECP dan ICP yang dihasilkan. Penginjeksian dengan ECP menyebabkan perubahan yang lebih cepat dan abnormalitas yang muncul lebih banyak dibandingkan dengan penginjeksian ICP, ini menandakan bahwa penginjeksian dengan ECP menyebabkan kerusakan sel lebih cepat dibandingkan dengan penginjeksian ICP. Hal ini diduga karena ECP mengandung lebih banyak bahan toksin dibandingkan dengan ICP. Beberapa patologi anatomi organ luar ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP dapat dilihat pada Gambar 1.10.



**Gambar 1.10** Beberapa perubahan pada patologi anatomi organ luar ikan nila pasca injeksi dengan ECP dan ICP *A. hydrophila* (dari kiri-kanan). [A] ikan nila normal [B] sirip gripis. [C] pendarahan pada tubuh. [D] eksoptalmia. [E] opacity

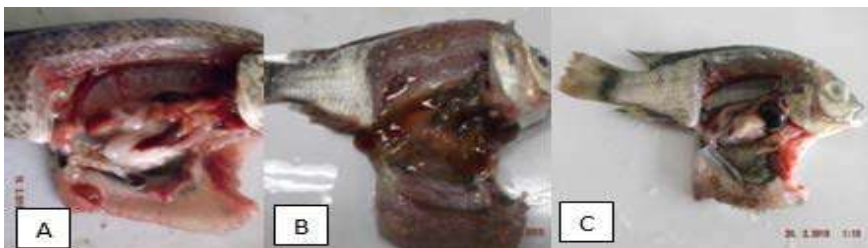
Eksoptalmia yang terjadi pada ikan terkadang disertai dengan kekeruhan pada mata (*opacity*). Menurut Hardi (2012) gejala yang muncul pada mata ikan yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* adalah eksoptalmia dan *opacity*. Eksotoksin dan endotoksin bakteri *A. hydrophila* diduga menyebar pada mata yang menyebabkan adanya hipertropi, inilah yang menyebabkan ikan mengalami eksoptalmia dan perubahan lainnya. Hal ini

menandakan bahwa ECP dan ICP bakteri *A. hydrophila* sebagai penyebab timbulnya perubahan pada mata. Perubahan pada organ dalam juga terjadi pada ikan nila yang diinjeksi dengan ECP maupun ICP, secara terperinci dijabarkan pada Tabel 1.13.

**Tabel 1.13** Patologi anatomi organ dalam ikan nila pada uji toksisitas ECP dan ICP bakteri *A. hydrophila* yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB

Patologi organ luar	anatomi	Kontrol	Waktu terjadinya perubahan (jam ke-)							
			ECP				ICP			
			TSA 24	TSA 48	TSB 24	TSB 48	TSA 24	TSA 48	TSB 24	TSB 48
Hati pucat	-	-	6	72	6	-	24	144	24	-
Ginjal pecah	-	-	6	-	-	-	24	-	-	-
Warna ginjal kehitaman	-	-	6	72	-	-	-	144	-	-
Organ dalam berair	-	-	6	-	6	-	24	-	24	-

Organ hati pucat terjadi sejak 6 jam pasca injeksi dengan ECP yang dihasilkan dari media TSA dan TSB (lama inkubasi 24 jam) sedangkan yang diinjeksi dengan ICP, gejala yang sama muncul lebih lama yaitu 24 jam pasca injeksi. Secara keseluruhan ikan yang diinjeksi dengan ECP dengan lama inkubasi 24 jam lebih cepat muncul abnormalitas pada organ dalam dibandingkan dengan yang diinjeksi pada waktu 48 jam. Hal ini menandakan bahwa 24 jam merupakan masa inkubasi dari bakteri *Aeromonas* untuk menghasilkan ECP dan ICP paling optimal.



**Gambar 1.11** Beberapa perubahan pada patologi anatomi organ dalam ikan nila pasca injeksi dengan ECP dan ICP *A. hydrophila*. [A] ikan nila normal [B] organ dalam berair. [C] hati dan ginjal pucat

Keseluruhan abnormalitas ikan yang diinjeksi dengan ECP dan ICP sama dengan ikan nila yang diinjeksi dengan sel utuh *A. hydrophila* yaitu organ dalam ikan berair dan terjadinya perubahan warna pada hati dan ginjal menjadi pucat (Hardi dan Pebrianto, 2012). Ginjal ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP *A. hydrophila* menunjukkan adanya kerusakan struktural, berupa hipertropi dan nekrosa. Hipertropi disebabkan karena ECP dan ICP masuk ke dalam ginjal melalui aliran darah dan masuk ke tubulus ginjal. Keberadaan ECP dan ICP *A. hydrophila* juga mempengaruhi metabolisme dan proses-proses enzimatik dalam sel, yang dapat menyebabkan terjadinya degenerasi dan nekrosa pada tubulus ginjal. Kondisi ini merusak struktur dan fungsi ginjal, yang mengakibatkan terganggunya proses-proses fisiologik di dalam tubuh ikan bahkan dapat menyebabkan kematian.

#### d. Histopatologi ikan nila

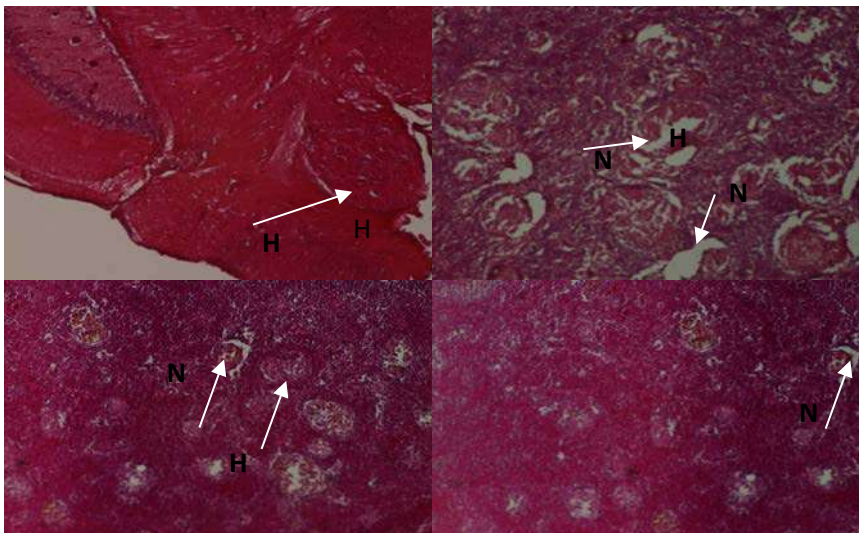
Menurut Angka (2005), bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri patogen yang menyebabkan kematian pada budidaya air tawar, strain dari bakteri tersebut sangat beragam yang berpengaruh terhadap tingkat patogenitasnya pada inang. Ada sekitar delapan galur dari *A. hydrophila* yang dikelompokkan dalam galur virulen dan non virulen. Ikan yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* di lokasi budidaya di Loa Kulu Kutai Kartanegara menunjukkan gejala klinis yang berbeda, untuk itu penting untuk dilakukan penelitian ini agar kerusakan organ yang disebabkan oleh bakteri ini dapat diketahui agar nantinya dapat digunakan sebagai acuan untuk penanggulangan infeksi bakteri *A. hydrophila* secara tepat. Tulisan ini menjabarkan mengenai histopatologi organ mata, otak dan ginjal ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP *A. hydrophila* yang ditumbuhkan pada media yang berbeda dan lama inkubasi yang berbeda. Ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri *A. hydrophila* menunjukkan

perubahan secara mikroskopis pada organ mata, otak dan ginjal. Secara terperinci perubahan yang terjadi dijabarkan pada Tabel 1.14.

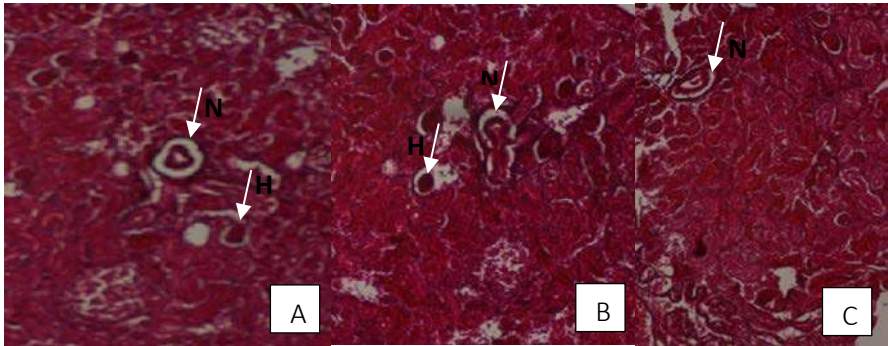
**Tabel 1.14** Perubahan histopatologi ikan nila pada uji toksisitas ECP bakteri *A. hydrophila* yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB

Histopatologi	Kontrol	Waktu Terjadinya Perubahan (Jam Ke)							
		ECP				ICP			
		TSA 24	TSA 48	TSB 24	TSB 48	TSA 24	TSA 48	TSB 24	TSB 48
<b>Organ Otak</b>									
Hipertropi	-	48	96	-	-	-	-	-	-
Hiperemi	-	48	96	48	96	96	96	144	96
Nekrosa	-	-	-	144	-	-	-	144	-
<b>Organ Ginjal</b>									
Hipertropi	-	48	48	48	48	96	48	96	48
Nekrosa	-	48	96	48	-	96	-	96	-
<b>Organ Mata</b>									
Hiperemia Dan Congesti	-	-	-	-	-	144	-	144	-

Ikan yang diinjeksi ECP dan ICP dari bakteri *A. hydrophila* yang ditumbuhkan di media TSA dan TSB dengan lama inkubasi 24 jam menunjukkan histopatologi pada organ otak dan ginjal lebih cepat dibandingkan dengan ECP dan ICP lama inkubasi 48 jam. Beberapa perubahan yang tampak pada kedua organ tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.12.



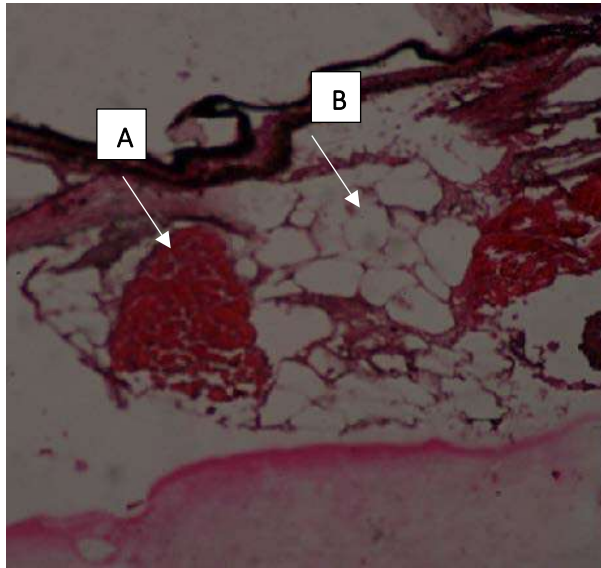
**Gambar 1.12** Organ otak ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP *A. hydrophila*. Hp. Hiperemi. [H] hipertropi. [N] nekrosa



**Gambar 1.13** Organ ginjal ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP *A. hydrophila*. [A] ikan nila yang diinjeksi ICP dan [B], [C] ikan nila yang diinjeksi ECP. [H] hipertropi. [N] nekrosa

Setelah diinjeksi dengan *A. hydrophila*, ikan menunjukkan gejala berenang lemah, diam didasar dan sesekali gasping atau mengambil oksigen tepat di bawah permukaan air. Ikan yang menunjukkan abnormalitas berenang secara histopatologi pada organ otak *cerebellum* ditemukan nekrosa di bagian kranial, ini biasanya yang menyebabkan meningitis dan encephalitis pada infeksi *Edwardsiella ictaluri* pada *channel catfish* dan infeksi *Streptococcus iniae* pada ikan *yellowtails* (Ferguson, 1989).

Hipertropi juga terjadi pada neuron yaitu adanya peningkatan komponen sel neuron. Nekrosis juga terjadi pada kapsul bowman yang diduga sebagai akibat toksin dari ECP dan ICP dapat merusak sel-sel ginjal. Dengan rusaknya ginjal, akan memudahkan bakteri masuk ke dalam jaringan ginjal dan menimbulkan kerusakan yang lebih besar. Sama halnya dengan ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada organ ginjalnya ditemukan adanya nekrosa dan pendarahan, yang diduga akibat toksin yang dikeluarkan bakteri (Murdjani, 2002).



**Gambar 1.14** Organ mata ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP *A. hydrophila* tanda panah menunjukkan [A] hiperemi dan [B] hiperplasia

Kerusakan pada organ mata ikan nila yang diinjeksi dengan ICP dari media TSA dan TSB dengan lama inkubasi 24 jam menyebabkan adanya hiperemi dan kongesti pada bagian choroid mata, yaitu adanya penambahan jumlah sel dalam jaringan dan adanya pembendungan sel darah. Hiperemi ini tampak pada ikan yang mengalami eksoptalmia secara makroskopis. Penginjeksian dengan ICP *A. hydrophila* yang diduga mengandung eksotoksin (salah satunya hemolisin) langsung menyebar melalui darah dan merusak bagian choroid mata sehingga menyebabkan mata mengalami perubahan-perubahan tersebut. Adanya hiperemi pada bagian choroid menyebabkan ikan mengalami eksoptalmia yang dapat tampak secara makroskopis pada mata ikan.



## G. Karakteristik dan Distribusi ECP Protein *A. hydrophila* yang Tumbuh pada Kondisi Berbeda Berdasarkan Berat Molekul Protein

### 1. Karakteristik dan distribusi ekstraseluler protein (ECP) *A. hydrophila*

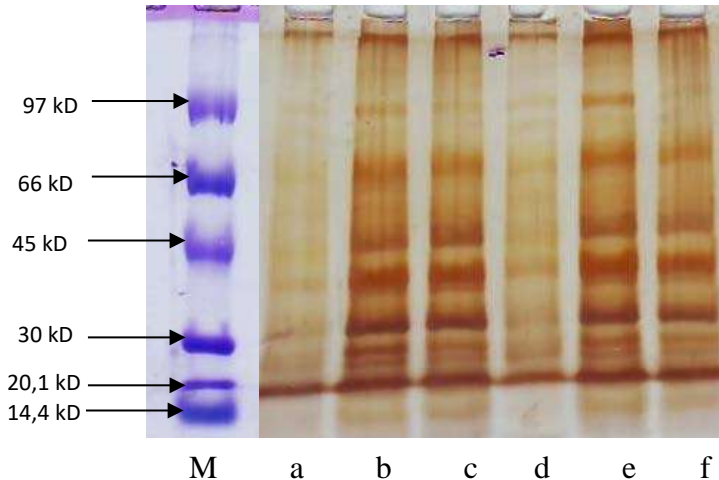
Protein ECP bakteri *A. hydrophila* memiliki beberapa fraksi dengan berat molekul yang berbeda. Waktu inkubasi yang berbeda, media tumbuh bakteri yang berbeda dan suhu inkubasi yang berbeda berpengaruh terhadap fraksi protein ECP yang dihasilkan (Tabel 1.15 dan 1.16).

**Tabel 1.15** Ekstraseluler produk bakteri *Aeromonas hydrophila* yang ditumbuhkan di media cair (TSB) dengan suhu dan lama inkubasi yang berbeda

Suhu	30 °C			40 °C		
Waktu	24 Jam (a)	48 Jam (b)	72 Jam (c)	24 Jam (d)	48 Jam (e)	72 Jam (f)
Berat Molekul	38,61	109,65	109,65	109,65	109,65	109,65
	29,74	80,17	80,17	80,17	80,17	80,17
	25,43	50,12	50,12	50,12	50,12	50,12
	24,14	38,61	38,61	38,61	38,61	38,61
	21,74	29,74	29,74	29,74	29,74	29,74
		25,43	25,43	25,43	25,43	25,43
		24,14	24,14	24,14	24,14	24,14
		21,74	21,74	21,74	21,74	21,74
	17,65	17,65		17,65	17,65	
	15,09	15,09		15,09	15,09	
<b>Total Fraksi Protein</b>	5 band	10 band	10 band	8 band	10 band	10 band

Tabel 1.15 memperlihatkan bahwa bakteri *A. hydrophila* yang dikultur dalam media TSB baik pada suhu 30°C maupun 40°C selama lebih dari 24 (48 dan 72) jam tidak menghasilkan protein yang berbeda baik jumlah maupun jenisnya. Namun pada saat diinkubasi dengan 24 jam jenis dan jumlah proteinnya berbeda. Sebanyak tiga jenis protein tidak dihasilkan bakteri saat diinkubasi pada suhu 30 °C dan hanya muncul pada

saat diinkubasi 40 °C yaitu protein dengan berat molekul 25,43; 24,14 dan 21,74 kDa. Lain halnya dengan bakteri *A. hydrophila* yang ditumbuhkan pada media TSA dan suhu 30°C. Jenis dan jumlah protein yang dihasilkan tidak sama saat diinkubasi dengan lama yang berbeda. Waktu 48 jam inkubasi menghasilkan jenis protein lebih banyak dibandingkan dengan waktu 24 atau 72 jam.



**Gambar 1.15** Hasil elektroforesis ECP *A. hydrophila* yang ditumbuhkan di media TSB melalui SDS PAGE dengan pewarnaan silver stain. Marker : BS. Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 1.15

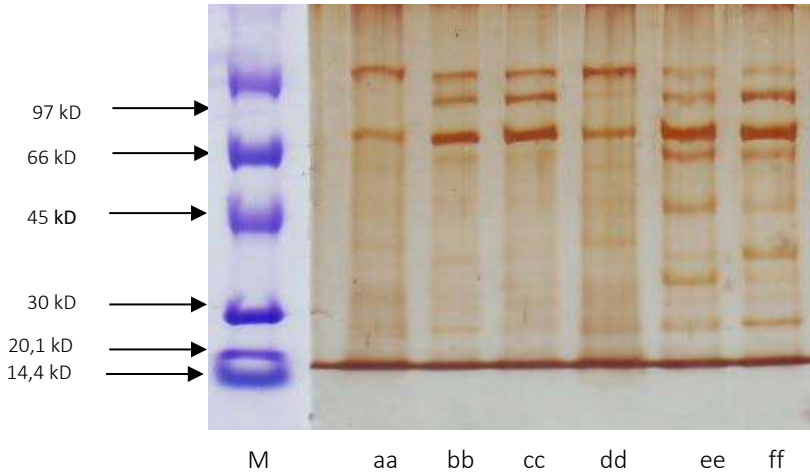
Beberapa penelitian menyatakan bahwa bakteri *A. hydrophila* memproduksi hemolisin dan protease (Wretlind et al. 1973; Riddle et al., 1981). Penelitian yang dilakukan oleh Riddle et al (1981) menunjukkan bahwa bakteri *A. hydrophila* memproduksi protease setelah diinkubasi 48 jam pada media TSYE dibandingkan dengan media BHI. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan bahwa bakteri yang diinkubasi 48 dan 72 jam memiliki jenis protein yang lebih banyak dibandingkan dengan bakteri yang diinkubasi 24 jam. Namun penelitian ini kontras dengan penelitian yang dilakukan oleh Wretlind *et al.* (1973) and Riddle *et al.*

(1981), aktivitas hemolitik optimal terdeteksi pada fase eksponensial, dan mencapai maximum sebelum mencapai pertumbuhan maksimum dan mengalami penurunan pada saat masa inkubasi diperpanjang.

**Tabel 1.16** Ekstrasellular bakteri *Aeromonas hydrophila* yang ditumbuhkan di media padat dengan lama inkubasi yang berbeda

Suhu	30°C			40°C		
	24 Jam (aa)	48 Jam (bb)	72 Jam (cc)	24 Jam (dd)	48 Jam (ee)	72 Jam (ff)
Berat Molekul	113,60	113,60	113,60	113,60	113,60	113,60
	76,74	98,06	98,06	98,06	98,06	98,06
		76,74	76,74	76,74	76,74	76,74
		66,25		66,25	66,25	66,25
				49,36	49,36	49,36
				40,57	38,63	38,63
			31,75	31,75	31,75	
			23,66	23,66	23,66	
<b>Total Fraksi Protein</b>	2 band	4 band	3 band	8 band	8 band	8 band

Hasil ECP *A. hydrophila* yang ditumbuhkan pada media dan lama waktu inkubasi yang berbeda memiliki pita protein yang berbeda. Produk ekstrasellular yang dihasilkan *A. hydrophila* yang ditumbuhkan pada media TSB dengan lama inkubasi yang sama memiliki jumlah jenis protein lebih banyak dibandingkan dengan yang diinkubasi pada media TSA. Lama inkubasi 48 jam merupakan waktu optimu bakteri untuk memproduksi ECP secara optimal, hal ini dilihat jenis bakteri yang dihasilkan lebih banyak pada lama inkubasi 48 jam dibandingkan dengan waktu inkubasi 24 dan 72 jam. Suhu inkubasi bakteri 30°C dan 40°C juga berpengaruh terhadap produksi ECP. Suhu yang lebih tinggi tinggi menyebabkan produksi ECP oleh bakteri *A. hydrophila* semakin banyak. Bakteri *A. hydrophila* yang ditumbuhkan pada media TSA dan diinkubasi pada suhu 40°C diketahui menghasilkan protein dengan berat molekul 31,75 kDa yang diduga sebagai protease (Esteve dan Birkbeck, 2004).



**Gambar 1.16** Hasil elektroforesis ECP *A. hydrophila* yang ditumbuhkan di media TSA melalui SDS PAGE dengan pewarnaan *silver stain*. Marker : BS. Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 1.16.

Bakteri *A. hydrophila* juga menghasilkan ECP dengan protein dengan BM 38,61-38.63 kDa yang merupakan mature protein (Esteve dan Birkbeck, 2004) dan tidak ditemukan intermediate protein (43/44 kDa). Aktivitas elastolitik dilakukan oleh protein AhpB (AG2 ahpB mutan), namun tidak menunjukkan aktivitas proteolitik (Casco'n et al., 2000). Namun mature AhpB protein (38 kDa) diidentifikasi oleh Rivero et al (1990) memiliki aktivitas hydrolyses casein dan bukan elastin (Rivero et al., 1990). Protein yang dihasilkan bakteri *A. hydrophila* lebih banyak pada saat bakteri diinkubasi pada suhu 40°C. Protein yang dihasilkan pada suhu inkubasi 40°C dan tidak dihasilkan pada suhu inkubasi 30°C adalah 23,66; 31,75; 40,57; 49,36 dan 66,25 kDa. Menurut Zacaria et al. (2010) protein dengan berat molekul 56 kDa adalah serine, 22 kDa metaloprotein dan 84 dan 93 kDa jenis gelatinase.

## **H.Potensial Antibakterial dan Imunostimulan dari Fraksi Protein dan Komponen Bakteri *A. hydrophila* (EA-01) pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)**

### **1. Pendahuluan**

Bakteri *Aeromonas* sp. pertama kali ditemukan pada tahun 1967 yang ditemukan pada perairan tawar dan laut (Haley et al., 1967). Menurut Austin Austin (2007) terdapat 6 jenis bakteri *Aeromonas* sp. yang ditemukan. Di Indonesia keberadaan bakteri *Aeromonas* sp. ditemukan menginfeksi ikan pada sistem budidaya di Jawa Tengah (Sarjito, 2013), Yogyakarta (Alim, 2013) dan di Kutai Kartanegara (Hardi, 2011). Keberadaan bakteri yang ditemukan menginfeksi ikan ini memiliki tingkat patogenisitas yang berbeda, hal tersebut disebabkan oleh beberapa faktor salah satunya adalah produk ekstraseluler (ECP). Produksi ekstraseluler dari *A. hydrophila* yang ditemukan di Kutai Kartanegara yang digunakan dalam penelitian ini memproduksi 5 protein dengan berat molekul yang berbeda antara 21.74 hingga 38.61 (Hardi et al., 2014).

Sebenarnya pemanfaatan bakteri patogen untuk menghambat bakteri lain sudah banyak dilakukan (Rattanachuy et al., 2009; Mohideen, 2010; Vijayan, 2005). Protein yang dihasilkan dari bakteri *A. hydrophila* diduga dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* sp. Pada kajian ini akan membahas tentang aktivitas antibakterial fraksi protein dan komponen bakteri *A. hydrophila* terhadap bakteri *Pseudomonas* sp. pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

### **2. Pengujian sensitivitas terhadap berbagai antibiotik**

Uji sensitivitas bertujuan untuk mengetahui mekanisme kerja/efektifitas dari suatu antibiotik. Beberapa antibiotik yang digunakan yaitu Norfloxacid (NOR), Nitroflorantion (F), Chloramphennicol (C),

Ciprofloaxcin (CIP), Nalidixic Acid (NA), Oxytetracycline (OT), dan Gentamicin (CN) terhadap bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metoda Kirby Bauer Disk-Diffusion (NCCLS,1998).

### **3. Persiapan fraksi protein dan komponen bakteri *A. hydrophila***

Fraksi protein ekstraselluler bakteri *A. hydrophila* yang digunakan adalah fraksi 16, 20, 21, dan 32. Fraksinasi ECP dilakukan dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Masing-masing fraksi diencerkan dengan pengenceran  $10^1$  sampai  $10^9$ , sedangkan komponen bakteri yang terdiri dari WCP, ICP, ECP, dan HK dari *A. hydrophila* diperoleh dengan metode menurut Kumar (2005). Untuk mendapatkan 4 komponen terbaik, bakteri *A. hydrophila* ditumbuhkan pada media TSB yang dinkubasi selama 24 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ . Masing-masing komponen dilakukan pemisahan sebagai berikut :

#### a. WCP (*Whole cell product*)

Suspensi bakteri *A. hydrophila* disentrifuse dengan kecepatan 10.000 g pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit untuk memisahkan antara pellet dan supernatant, setelah dipisahkan pellet dicuci dengan larutan PBS sebanyak 2 kali dan produk sel utuh siap digunakan untuk uji lanjut.

#### b. ECP (*Ekstracelluler product*)

Suspensi bakteri *A. hydrophila* disentrifuse dengan kecepatan 10.000 g pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit untuk memisahkan antara pellet dengan supernatant, setelah supernatant itu disaring  $0.45\ \mu\text{m}$  dan produk bisa digunakan untuk uji lanjut.

c. HK (*Heat wiled whole cell product*)

Suspensi bakteri *A. hydrophila* disentrifuse pada kecepatan 8.000 g untuk memisahkan antara pellet dan supernatant. Pellet dicuci dengan menggunakan PBS sebanyak 2 kali lalu direbus pada suhu 60°C selama 1 jam kemudian dapat langsung digunakan atau disimpan pada suhu 20°C.

d. ICP (*Intracelluler product*)

Suspensi bakteri *A. hydrophila* disentrifuse dengan kecepatan 8.000 g untuk memisahkan antara pellet dan supernatant. Pellet disonikasi pada 50 Hz selama 5 menit dan disaring dengan filter paper 0,45 µm kemudian dicuci dengan PBS 0.45 sebanyak 2 kali selanjutnya dapat langsung digunakan atau disimpan pada suhu 20°C.

#### **4. Pengujian antibakterial fraksi protein dan komponen bakteri *A. hydrophila* terhadap bakteri *Pseudomans* sp. Secara in vitro**

Pengujian ini dilakukan menggunakan metode Disc Difusion (Duloger dan Gonuz, 2004). Bakteri *Pseudomonas* sp. ditumbuhkan pada media TSA, sembilan pengenceran dari masing-masing fraksi *A. hydrophila* ditetaskan pada kertas cakram 25 µl, dilanjutkan dengan menginkubasi pada suhu 30°C dan pengamatan diameter zona hambat dilakukan pada jam ke 24 sampai 72 jam.

#### **5. Pengujian toksisitas fraksi protein dan komponen bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila (*O. niloticus*)**

Uji toksisitas dilakukan untuk membuktikan ada tidaknya kandungan bahan toksik pada fraksi protein dan komponen bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila (*O. niloticus*), pengujian dilakukan dengan menginjeksi fraksi protein dan komponen bakteri (konsentrasi terbaik) secara intraperitoneal sebanyak 0,1 ml/ekor pada ikan nila. Pengamatan berupa perubahan pola

renang dan patologi antomi luar dan dalam serta kematian kumulatif dilakukan pada jam ke 1, ke 6, ke 12, ke 18, ke 24, ke 48, ke 72, ke 96, dan ke 120 atau hingga hari ke 5 pasca penginjeksian.

## **6. Pengujian kemampuan imunomodulator dari fraksi protein dan komponen bakteri *A. hydrophila***

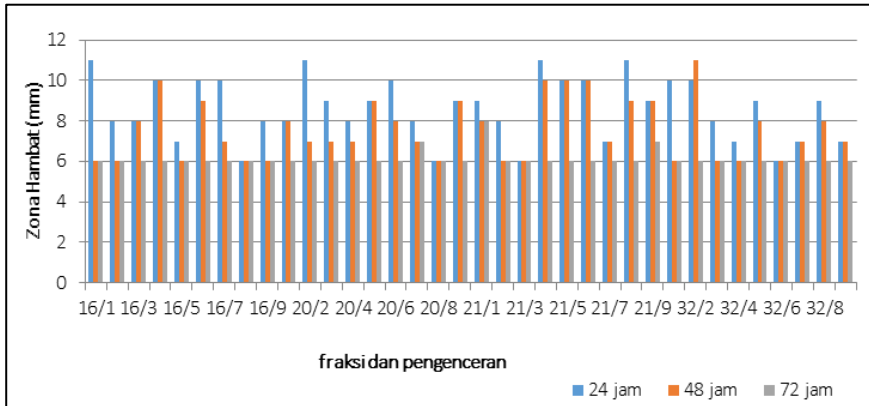
Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan sebagai bahan imunostimulan dan antibakterial dari fraksi protein ECP dan komponen bakteri *A. hydrophila*. Masing-masing fraksi protein dan komponen bakteri diinjeksi pada ikan melalui intraperitoneal sebanyak 0.1 ml/ekor dan dipelihara selama 6 hari, selanjutnya ikan di uji tantang pada hari ke-7 dengan cara menginjeksikan bakteri patogen *Pseudomonas* sp. pada ikan melalui intramuscular. Pengamatan berupa perubahan pola renang, patologi antomi luar dan dalam, serta kematian kumulatif dilakukan pada hari ke 1 hingga hari ke 7 pasca uji tantang. Untuk gambaran darah dilakukan pengamatan pada hari ke 3, ke 5, dan hari ke 7 pasca injeksi.

## **7. Aktivitas antibakterial dari fraksi ekstraseluler dan komponen bakteri *A. hydrophila* terhadap bakteri patogen *Pseudomonas* sp.**

Fraksi protein ke 16, 20, 21, dan 32, ada 19 dari masing-masing pengenceran yang memiliki zona hambat > 8 mm dan 4 dari masing-masing pengenceran yang memiliki zona hambat >10 mm yang mampu menghambat bakteri *Pseudomonas* sp.. Diameter zona hambat Komponen bakteri *A. hydrophila* terdiri dari WCP, ECP, ICP, dan HK memiliki diameter zona hambat dari ke 6 komponen bakteri *A. hydrophila*. Hanya ECP dan WCP yang memiliki zona hambat > 8 mm dari jam ke 6 sampai jam ke 72.



Untuk komponen WCP(s) memiliki zona hambat dengan kemampuan bertahan hingga 24 jam.



**Gambar 1.17** Uji in vitro fraksi *A. hydrophila* terhadap bakteri *Pseudomonas* sp.

Kemampuan antibakterial tersebut diduga karena bakteri *Pseudomonas* sp. menghasilkan protein siderophores yang bersifat bakteristatik (Guennot, 1994). Menurut Vijayan (2005) bakteri *Pseudomonas* PS-102 memproduksi siderophore dan vikosianin dalam jumlah besar yang bersifat menekan pertumbuhan bakteri vibrio.

## **8. Uji toksisitas fraksi protein dan komponen bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila (*O. niloticus*)**

Penginjeksian dengan fraksi 16 pengenceran 1 menyebabkan ikan mengalami perubahan pola renang seperti berenang pada dasar akuarium yg ditemukan jam ke 24, ikan mengalami gejala gasping (berenang tegak dibawah permukaan air). Penginjeksian dengan Fraksi 20/2 dan fraksi 21/4 ikan uji cenderung lemah dan diam di dasar akuarium mulai jam ke 16 penginjeksian dari WCP *A. hydrophila* tidak menyebabkan abnormalitas terhadap pola renang dibandingkan dengan fraksi protein yang lain, secara umum dapat dikatakan aman terhadap ikan nila.

Perlakuan dengan menggunakan fraksi 16, 20, dan 21 menunjukkan perubahan pada patologi organ dalam ikan. Pasca injeksi pada perlakuan 1, pada jam ke 24 terjadi kelainan pada empedu, ginjal kekuningan, dan hati hancur dengan warna kehitaman, pada jam ke 48 mengalami gejala eksoptalmi, sedangkan pada perlakuan ke 2 organ dalam berair pada jam ke 12, pendarahan pada tubuh jam ke 48 dan pada perlakuan ke 3 organ dalam berair pada jam ke 12, ginjal kekuningan jam ke 24, hati berwarna hitam dan hancur pada jam ke 48 dan sisik lepas pada jam ke 72. Berbeda dengan perlakuan ke 4 WCP yang perubahan hanya sisik lepas pada jam ke 96. Menurut Allan dan Stevenson, (1981), fraksinasi dari ECP *A. hydrophila* mengandung toksin yang memiliki aktivitas hemolitik sehingga menyebabkan perubahan abnormalitas pada patologi anatomi luar dan dalam ikan.

Kematian yang cepat dalam waktu kurang dari 12 jam pasca injeksi kemungkinan disebabkan protein ECP yang bersifat patogen terhadap ikan hal ini sejalan dengan penelitian (Lamas et al., 1994), yaitu dengan perlakuan ECP *Vibrio anguillarum* pada ikan rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) dapat mematikan ikan secara cepat. Pada perlakuan dengan menggunakan WCP sel utuh tidak menyebabkan kematian yang cepat sehingga dapat mengindikasikan aman digunakan sebagai bahan antibakterial.

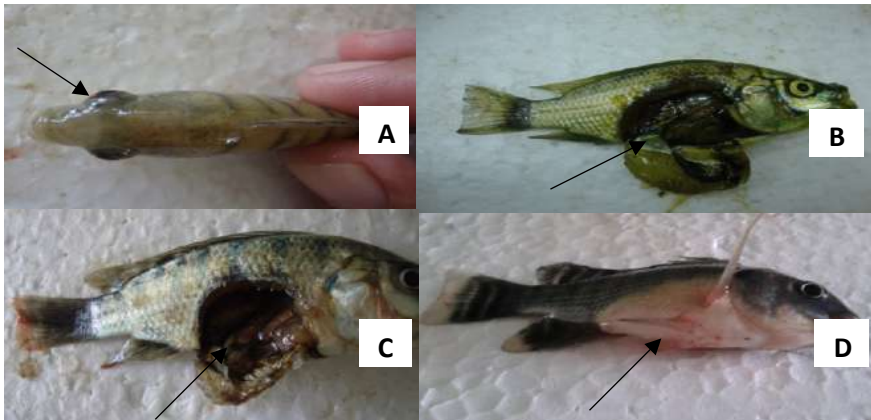
### **9. Uji fraksi komponen bakteri *A. hydrophila* sebagai bahan immunomodulator pada ikan nila.**

Perubahan gejala tingkah laku dan nafsu makan ikan selama 7 hari pemeliharaan pasca injeksi dengan bakteri patogen *Pseudomonas* sp, perubahan hanya terjadi pada pada jam ke 72 ikan berenang didasar

akuarium. Hal ini menunjukkan bahwa pada penginjeksian komponen sel utuh *A. hydrophila* tidak berdampak patogen pada ikan.

**Tabel 1.17** Patologi anatomi luar dan dalam ikan nila (*O. niloticus*) yang telah diinjeksi dengan fraksi protein dan komponen bakteri *A. hydrophila*

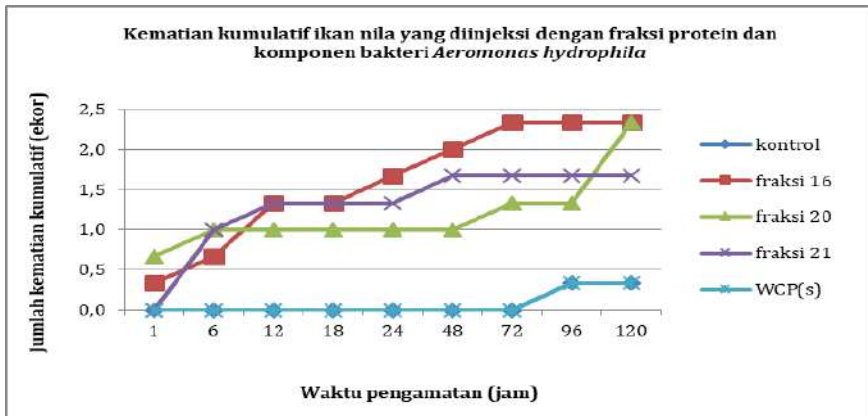
Perubahan Patologi Anatomi Organ Luar	Waktu Terjadi Perubahan (Jam)				
	Control	Fraksi 16	Fraksi 20	Fraksi 21	WCP
<b>Permukaan Tubuh:</b>					
Warna Tubuh Menghitam	-	-	-	-	-
Pendarahan pada Tubuh	-	-	48	-	-
<b>Sisik Lepas</b>	-	96	72	72	96
<b>Sirip Gripis</b>	-	-	-	-	-
<b>Mata:</b>					
Gejala <i>Esoptalmia</i>	-	48	72	-	-
Berwarna Merah	-	48	-	-	-
<b>Perubahan Patologi Anatomi Organ Dalam</b>					
Hati Hancur dan Warna Kehitaman	-	24	-	48	-
Organ Dalam Berair	-	-	12	12	-
Ginjal Kekuningan	-	24	-	24	-
Kelainan Pada Empedu	-	24	-	-	-



**Gambar 1.18** Patologi anatomi luar dan dalam ikan pasca injeksi fraksi protein bakteri *A. hydrophila*. Keterangan: [A] gejala eksoptalmia; [B] kantung empedu pecah; [C] Organ dalam berair; [D] kemerahan pada permukaan tubuh.

Patologi anatomi organ luar yang terjadi pada ikan pasca diinjeksi komponen sel utuh *A. hydrophila* tidak banyak terjadi, gejala yang muncul pada jam ke 120 adalah adanya sisik ikan yang lepas. Sementara pasca

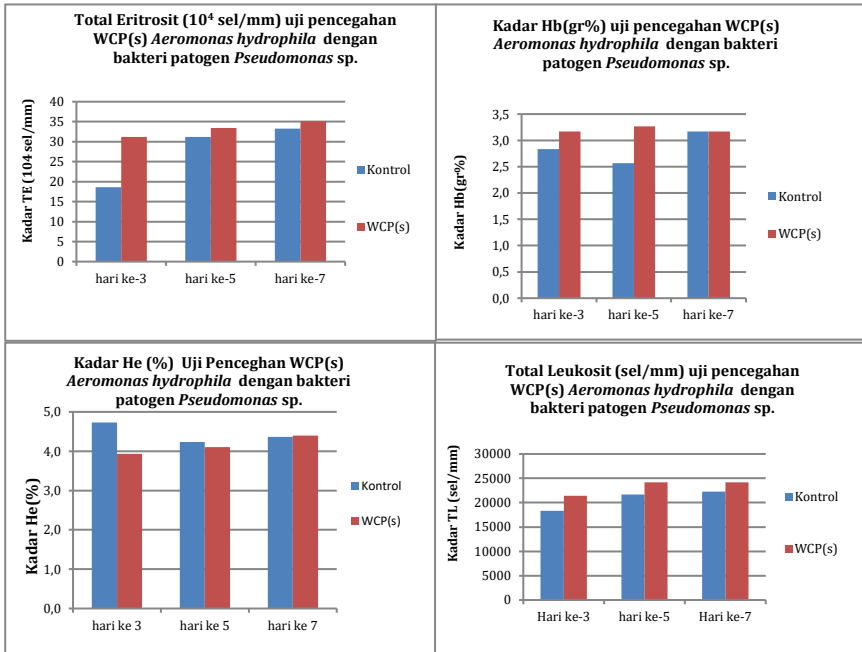
injeksi dengan bakteri pathogen *Pseudomonas* sp. ikan tidak tampak mengalami gejala abnormalitas terutama abses pada bagian perut. Hal ini menunjukkan bahwa pada penginjeksian tidak berdampak patogen pada ikan dan mampu memberikan perlindungan terhadap ikan yang diinjeksi dengan bakteri patogen *Pseudomonas* sp. hal ini semakin menguatkan bahwa sel utuh WCP tidak berdampak patogen pada ikan dan dapat digunakan sebagai antibakterial.



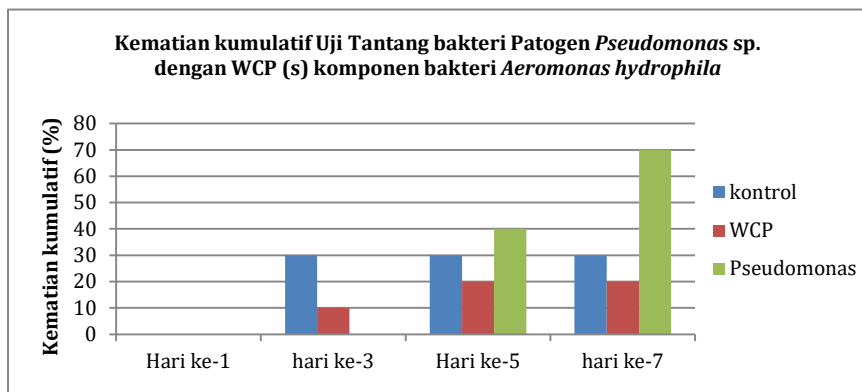
**Gambar 1.19** Kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi fraksi protein dan komponen bakteri *A. hydrophila*

Menurut Hardi et al. (2014), Kematian ikan yang diinjeksi ECP bakteri *Pseudomonas* sp. menunjukkan bahwa kematian ikan yang diinjeksi ECP bakteri *Pseudomonas* sp. umumnya mulai terjadi 12 jam pascainjeksi dan kematian terus terjadi hingga hari ke 7 pemeliharaan yang mencapai 60%, sedangkan yang diinjeksi dengan ICP, ternyata kematian sudah terjadi pada 6 jam pascainjeksi dengan kematian mencapai 100%. Pengamatan gambaran darah ikan bila dalam pengujian pencegahan infeksi bakteri *Pseudomonas* sp. dengan menggunakan fraksi komponen bakteri *A. hydrophila* disajikan pada gambar 1.20. Hasil kadar hemoglobin (Hb), total eritrosit (TE), total leukosit (TL) dan hematokrit (He) pada uji imunostimulan komponen bakteri WCP(s) *A. hydrophila* dengan bakteri

patogen *Pseudomonas* sp. menunjukkan tidak adanya perubahan, hal ini disebabkan karena komponen WCP bakteri *A. hydrophila* tidak mengandung bahan toksik sehingga ikan tetap pada kondisi normal.



**Gambar 1.20** Kadar hemoglobin (Hb), total eritrosit (TE), total leukosit (TL) dan hematokrit (He) Uji pencegahan komponen bakteri WCP(s) *A. hydrophila* dengan bakteri patogen *Pseudomonas* sp.



**Gambar 1.21** Kematian kumulatif ikan nila uji pencegahan komponen bakteri WCP(s) *A. hydrophila* dengan bakteri *Pseudomonas* sp.

## I. Kesimpulan

Keseluruhan uji yang dilakukan menghasilkan suatu kesimpulan bahwa ECP dan ICP bakteri *A. hydrophila* bersifat toksik atau menyebabkan perubahan pada gejala klinis, patologi anatomi organ luar dan dalam serta kematian ikan. Baik ECP dan ICP merupakan faktor virulensi dari *Aeromonas* sp., karena gejala yang muncul pada ikan nila saat diinjeksi dengan ECP dan ICP sama dengan gejala yang ditemukan pada ikan nila yang diinjeksi dengan sel utuh bakteri *A. hydrophila*.

Produk ekstrasellular dari bakteri *A. hydrophila* merupakan faktor yang menyebabkan ikan nila sakit dan/atau mati lebih cepat dibandingkan dengan ICP, lama masa inkubasi 24 jam merupakan masa inkubasi dari *A. hydrophila* untuk menghasilkan ekstraseluler produk yang menyebabkan ikan sakit dan/atau mati lebih cepat. Media tumbuh bakteri tidak berpengaruh terhadap ECP dan ICP yang dihasilkan oleh bakteri *A. hydrophila* dilihat dari jumlah kematian, perubahan gejala klinis maupun patologi anatomi organ luar dan organ dalam.

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa kerusakan organ ginjal dan otak ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP dengan lama inkubasi 24 jam lebih cepat terjadi dibandingkan dengan lama inkubasi 48 jam namun penginjeksian dengan ECP lebih cepat dibandingkan dengan ICP. Umumnya penginjeksian dengan ECP dan ICP dari media TSA dan TSB kerusakan pada organ otak dan ginjal menyebabkan kerusakan pada waktu yang hampir sama.

Berdasarkan hasil penelitian tentang aktivitas antibakterial fraksi protein dan komponen bakteri *A. hydrophila* terhadap bakteri patogen *Pseudomonas* sp. dapat disimpulkan bahwa fraksi protein dan komponen bakteri *A. hydrophila* bersifat antibakterial secara in vitro. Namun hanya fraksi 16 dan WCP yang memiliki kemampuan antibakterial tertinggi. Uji

toksitas menunjukan bahwa WCP yang tidak menyebabkan kematian, perubahan pola renang, serta patologi antomi luar dan dalam. Uji kemampuan imunomodulator WCP menunjukan bahwa pemberian WCP dapat meningkatkan sistem imun sehingga kematian ikan pasca ujiantang mengalami penurunan.

## J. LATIHAN SOAL

Kerjakan soal dibawah ini dengan benar dan tepat.

1. Dalam karakteristik bakteri terdapat uji hemolitik. Jelaskan bagaimana cara pengujian hemolitik bakteri dan ada berapa tipe hemolitik pada bakteri *Aeromonas hydrophila*?
2. Jelaskan apa tujuan dari uji postulat Koch bakteri *Aeromonas hydrophila*?
3. Jelaskan gejala umum yang ditimbulkan akibat infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan nila?
4. Jelaskan perbedaan antara ekstrasellular produk dan intraselular produk bakteri?
5. Mengapa ECP bakteri *A. hydrophila* lebih cepat menyebabkan ikan nila sakit atau terjadi kematian daripada ICP?

## K. DAFTAR PUSTAKA

- Alderman, D.J and C. Michel. 1992. Chemotherapy in Aquaculture Today. *In : Chemoterapy in Aquaculture from Theory to Reality Berkala Ilmiah Perikanan Vol. 3 No. 1, April 2008* 73 (ed. by C. Michel and D.J. Alderman). Office International Des Epizooties. Paris. p : 3-4.
- Allan BJ, Stevenson RMW. 1981. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infection. *Can J Microbiol*, 27:1114–1122

- Anderson DP, AK Siwicki. 1995. Basic hematology and serology for fish health programs. Paper presented in second symposium on diseases in Asian Aquaculture "Aquatic Animal Health and the Environment". Phuket, Thailand. 25 – 29<sup>th</sup>October 1993. 17 hal
- Angka, S.L. 2005. Kajian Penyakit *Motile Aeromonad Septicemia* (MAS) pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.): Patologi, Pencegahan dan Pengobatannya dengan Fitofarmaka. Doctoral Disertasi. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Austin B, DA Austin. 2007. Bacterial fish pathogens. Fourth Edition. New York: Praxis Publishing Ltd.
- Austin, B., Austin D.A. 1993. *Bacterial Fish Pathogens. In Disease in Farmed and wild fish*. Ellis Horwood Ltd, Publisher, Chichester, England.
- Blaxhall PC, KW Daisley. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal Fish Biology* 5: 577-581
- Brenden, R.A. and H.W. Huizinga. 1986. *Pathophysiology of Experimental Aeromonas hydrophila Infection in Goldfish*. J. Fish Diseases. 9: 163 – 167.
- Cahyono, B. 2001. Budidaya Ikan di Perairan Umum. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Eidman, M. K. Sumawidjaya, S. Hadjosworo, dan S. Hardjosworo dan S. L Angka. 1981. *Wabah Penyakit Bercak Merah Ikan. Laporan Kelompk Kausal Team Crash Program Penanggulangan Eoidemi Penyakit Ikan*. Institute Pertanian Bogor. Bogor. 45 hal.
- Ferguson, H.W. 1989. Systemic pathology of fish. Iowa State University Press: Ames. pp 263
- Ghufron dan Kordi. 2004. *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan*. PT. Sadi Mahasatya. Jakarta. 194 hal.
- Hardi EH, 2012. Bacteria Levels Difference Pathogenecity *Aeromonas* sp and *Pseudomonas* sp. On Tilapia. *Proceeding The international Symposium on Human Development and Sustainable Utilization on Natural reseources*.



- Hardi EH, Pebrianto CA. 2012. Isolasi dan Uji Postulat Koch *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Sentra Budidaya Loa Kulu Kabupaten Kutai Kartanegara. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis*. Vol.16, 2:35-39.
- Hardi EH, Septiani Gina, dan Lusiastuti AM, 2014. Characteristizin of Extracelluler protein Produced by *Aeromonas hydrophila* Cultur at Different Condition. *International Conference Of Aquaculture Indonesia 2014*. ISSN 2356-0800. Hal 81-85
- Hardi EH, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2011. Toksisitas Produk Ekstraselular (ECP) *Streptococcus agalactiae* pada Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*). *Jurnal Natur Indonesia*.13.3:187-199.
- Hardi, E.H. 2012. Bacteria Levels Difference Pathogenecity *Aeromonas* sp and *Pseudomonas* sp. On Tilapia. *Proceeding The international Symposium on Human Development and Sustainable Utilization on Natural reseources in asian countries* (ISBN : 978-602-98400-1-8) Balikpapan, 9-12 Juli 2012.
- Hardi, E.H., Sukenda, Harris, E., Lusiastuti, A.M. 2011. Toksisitas Produk Ekstraselular (ECP) *Streptococcus agalactiae* pada Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*). *Jurnal Natur Indonesia*.13.3:187-199
- Hoffman, GL. 1977. Methods for The Diagnosis of Fish Diseases. American Publ.co.put. Ltd., New Delhi.
- Kabata, Z. 1985. *Parasites and Diseases of Fish Cultured in Tropics*. Taylor and Fancis. London. 318 p.
- Kanai K, Wakabayashi H. 1984. Purification and some properties of proteases from *Aeromonas hydrophila*. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, 50:1367–1374.
- Karunakaran, T. and B.G. Devi. 1994. Characterisation of haemolytic activity from *Aeromonas caviae*. *Epidemiol Infect*. 112:291-298.
- Kawahara, E. and S. Nomura. 1990. Lethality and immunogenicity of *Aeromonas salmonicida* extracellular products to salmonids p. 671-674 in R. Hirano and I.Hanyu (*Eds*), Proc. Of The Second Asian Fisheries Forum, Tokyo Japan, 17-22 April 1989.

- Kusumawardani, I.R., R. Kusdarwati dan D. Handijatno. 2008. Daya AntiBakteri Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc.) Dengan Konsentrasi Yang Berbeda Terhadap Pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*. J. Berkala Ilmiah Perikanan., 3(1): 75-82.
- Lukistyawati I, dan Morina R,S. 2005. Analisis Penyakit Ikan. Penerbit UNRI PREES Pekanbaru.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, J. Parker. 2000. Brock Biology Mikroorganisms. Prentice Hall. Internasional Edition., New Jersey.
- Mariyono dan Sundana. 2002. Teknik pencegahan dan pengobatan penyakit bercak merah pada ikan air tawar yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Buletin Teknik Pertanian. Badan Litbang Pertanian. Jakarta. Vol. 7(1):33-36.)
- Munro, A.L. 1982. *The Pathogenesis of Bacterial Diseases of Fishes*. In: R.J. Roberts (ed), *Microbial Diseses of fish*. Academic Press. New York. P. 131 – 170
- Murdjani, M. 2002. Identifikasi dan patologi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) [Desertasi]. Malang: Program Pasca Sarjana, Universitas Brawijaya.
- Passaribu, H.F., Dalimunthe, N., Poeloengan, M. 1990. *Pengobatan Pencegahan Penyakit Ikan Bercak Merah*. Prosiding Seminar Nasional II Penyakit Ikan dan Udang. Editor A. Rukyani dkk. Bultkanwar Bogor.
- Ramarao N, Sanchis V. 2013. The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus Cereus*. *Toxins* 2013, 5(6), 1119-1139.
- Rattanachuy P., Kantachote D.,Tantirungkji M., Nitoda T.,Kanzaki H., 2009. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by extraceluller compounds from a proteolytic bacterium *Pseudomonas* sp W3. Vol.13 No.01, Issue January 15, 2009.
- Saanin, H. 1984. *Taksonomi dan Kunci Klasifikasi Ikan*. Bina Cipta. Jakarta.
- Sahu I, Das BK, Marhual N, Samanta M, Mishra BK, Eknath AE. 2011. Toxicity of Crude Extracellular Products of *Aeromonas hydrophila* on Rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Indian J Microbiol*, 51(4):515–520.

- Sarjito, Radjasa OK, Haditomo AHC, dan Prayitno SB (2013). Causative Agent Motile Aeromonas pada Ikan Lele (*Clarias gariepinus*) di Sentra Produksi Privinsi Jawa Tengah. *Prosiding Konferensi Akuakultur Indonesia 2013* ISBN 978-602-19680-2-4. Hal 146-152.
- Soetomo, H. A. 1989. *Teknik Budidaya Ikan Lele Dumbo*. Sinar Baru. Bandung. 109 hal.
- Suprpto H, T Nakai, K Muroga. 1995. Toxicity of Extracellular Product and Intracellular Components of *Edwardsiella tarda* in Japanese Eel and Flounder. *J. Aquat. Anim. Health*, 7 (4): 292-297.
- Thune, R.L. and J.A. Plumb. 1982. *Effect of delivery method and antigen preparation on the production of antibodies againts Aeromonas hydrophila in channel catfish*. Prog. Fish Cult. 44 (1) Januari 1982. P. 53 – 54.
- Vijayan.K.K, Bringht Singh I.S, Jayaprakash N.S, Somnath Pai A.S., Preetha. R, Rajan. J.J.S, dan Santiago. T.C. 2005. *A Breckiswater Isolate Of Pseudomonas PS-102, Potential Antagonistic Bacterium Against Pathogenic Vibrios in Penaeid And Non-Penaeid Rearing System*. ELSEVIER Aquaculture.
- Vilas-Boas, G.; Sanchis, V.; Lereclus, D.; Lemos, M.V.; Bourguet, D. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 1414–1424. [Google Scholar] [CrossRef]
- Wedemeyer GA, WT Yasutake. 1977. Clinical methods for the assessment of the effect on environmental stress on fish health. Technical Papers of the U.S. Fish and Wildlife Service. US depert. Of the Interior. Fish and Wildlife Service 89: 1 – 17
- Williams ML, Azadi P, Lawrence ML. 2003. Comparison of cellular and extracellular products expressed by virulent and attenuated strains of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* 15: 264 – 273
- Yanuhar, Uun. 2005. Peran Molekul Adhesi untuk Diagnostik dan Vaksin Bakteri Patogen. Makalah Seminar Nasional Aplikasi Bioteknologi Akuakultur. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 6 hal.

# Pseudomonadaceae

**B**akteri *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri umum yang ada di lingkungan perairan. Bakteri ini dapat hidup luas pada tanaman, hewan, substrat tanah dan air. Tidak seluruh bakteri *Pseudomonas* bersifat patogen, bahkan ada beberapa strain yang berperan baik sebagai probiotik. Menurut Austin dan Austin (2007), ada enam jenis *Pseudomonas* yang patogen terhadap ikan yaitu : *Pseudomonas anguilliseptica*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. plecoglossicida*, *P. pseudoalcaligenes*, dan *P. putida*.

## ***Pseudomonas anguilliseptica***

Bakteri ini ditemukan menginfeksi ikan sidat dengan gejala bintik merah pada kulit yang terinfeksi, namun inang bakteri *P. anguilliseptica* sangat luas, dapat ditemukan pada ikan *Clupea harengus membras*, *gilthead sea bream*, *black-spot sea bream (Pagellus bogaraveo)*, *orange-spotted grouper (Epinephelus coioides)* dan cod. Ikan yang terinfeksi menunjukkan gejala haemoragik pada mata, mulut, sirip, dan organ yang terinfeksi. Organ dalam yang terinfeksi tampak berair, hati, dan ginjal pucat dan ginjal juga tampak lembek dan berair.

## ***Pseudomonas chlororaphis***

Bakteri ini menyebabkan kematian pada benih, ikan tampak mengalami perut gembung dan berair, pendarahan pada organ dalam dan permukaan tubuh yang terinfeksi (Hatai et al., 1975).

### ***Pseudomonas fluorescens***

Bakteri *P. fluorescens* menginfeksi silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) dan bighead (*Aristichthys nobilis*) (Csaba et al., 1981b), goldfish (*Carassius auratus*) (Bullock, 1965), tench (*Tinca tinca*) (Ahne et al., 1982), grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) dan black carp (*Mylopharyngodon piceus*) (Bauer et al., 1973). Kematian ikan yang terinfeksi *P. fluorescens* mencapai lebih 90%.

### ***Pseudomonas plecoglossicida***

*Pseudomonas plecoglossicida* merupakan bakteri penyebab haemoragik ascites (BHA) yang ditemukan menginfeksi ikan air tawar di Jepang. Salah satu metode yang dilakukan untuk mendeteksi secara cepat keberadaan bakteri ini dengan menggunakan metode identifikasi teknik amplifikasi PCR dengan target DNA kromosom yang mengkode subunit B dari DNA girase (*gyrB*) digunakan (Izzumi et al., 2007). Menurut Nishimori et al. (2000), bakteri *Pseudomonas* berhasil diisolasi dari ikan yang tampak menunjukkan gejala abnormal pada organ dalam, namun Park et al. (2000) menemukan bakteri ini pada substrat dasar kolam dan air budidaya ikan ayu di Jepang dan menyebabkan kematian yang tinggi pada ikan ayu (*Plecoglossus altivelis*) di Jepang. Wakabayashi et al. (1996) memberikan julukan bakteri ini dengan sebutan bakterial haemorrhagic ascites (BHA), karena adanya pendarahan pada organ yang terinfeksi.

### ***Pseudomonas pseudoalcaligenes***

Bakteri *Pseudomonas pseudoalcaligenes* memiliki inang yang lebih luas dibandingkan spesies sebelumnya. Bakteri ini ditemukan di tanaman, buah, air, substrat dan ikan. Tidak semua spesies bakteri ini patogen. Penelitian yang dilakukan oleh Chaudhary dan Qazi (2007) terlihat bahwa

strain *Pseudomonas pseudoalcaligenes* dapat dimanfaatkan sebagai probiotik yang dapat meningkatkan pertumbuhan melalui efisiensi pakan benih ikan Rohu (*Labeo rohita*).

### ***Pseudomonas putida***

Eissa et al. (2010) mengisolasi beberapa bakteri patogen *Pseudomonas* pada budidaya ikan nila di danau Qaroun dan Wadi-El-Rayan, Egypt. Hasilnya ditemukan tiga isolat utama *Pseudomonas* sp. yaitu *P. anguilliseptica*, *P. putida* dan *P. aereginosa*. Ikan yang terinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. tersebut menunjukkan gejala klinis septicemia ditandai dengan adanya pendarahan tidak teratur di seluruh permukaan tubuh terinfeksi, terutama di bagian perut (Domenech et al., 1997), Ahmed dan Shoreit (2001), Sakar dan Abd El-Rhman (2008). Infeksi bakteri *P. putida* pada ikan trout menyebabkan ikan mengalami eksoptalmia, pigmentasi gelap pada kulit dan ulserasi terutama di sisi dorsal (Altinok et al., 2008).

## **A. Karakteristik Bakteri *Pseudomonas* sp.**

*Pseudomonas* sp. merupakan bakteri yang sering ditemukan menginfeksi ikan air tawar di Kalimantan Timur. Infeksi bakteri ini bersamaan dengan infeksi bakteri *A. hydrophila*, dengan prevalensi bakteri *Pseudomonas* sp. (67%) lebih tinggi dibandingkan dengan *A. hydrophila* (33%) (Hardi dan Pebrianto, 2012).

### **1. Aktivitas hemolitik**

Penelitian Vallet-Gely et al. (2010) menyebutkan bahwa patogenisitas bakteri *Pseudomonas entomophila* dipengaruhi oleh dua

komponen yaitu GacS/GacA. Bakteri *P. entomophila* menghasilkan enzim hemolitik yang kuat. Aktivitas ini dipengaruhi oleh lipopeptida siklik yang mengandung 14 asam amino dan asam lemak 3-C<sub>10</sub>OH yang dikenal entolysin yang disintesis oleh peptide nonribosomal (EtIA, EtIB, EtIC). Selain itu, *P. entomophila* (GacS/GacA) merupakan dua komponen yang mengatur produksi entolysin.

Masih menurut Vallet-Gely et al. (2010) enzim hemolitik bakteri *P. entomophila* merupakan lipopeptida siklik (CLP). CLPs yaitu molekul yang memiliki sifat antimikroba, sitokoksik, dan surfaktan yang juga diproduksi oleh genus *Bacillus*, *Serratia*, *Burkholderia*, dan *Pseudomonas*. Komponen-komponen tersebut diproduksi melalui mekanisme ribosom-independen yang memanfaatkan enzim nonribosomal peptida sintetase (NRPSs) (Marahiel et al., 1997; Stachelhaus et al., 1999). NRPS ini terdiri dari aktivasi asam amino yang mengandung domain untuk kondensasi, aminoasil adenilasi, dan tiolation.

## 2. Morfologi sel, uji fisika dan uji biokimia bakteri *A. hydrophila*

Hasil dari uji karakteristik bakteri *Pseudomonas* sp. yang diisolasi dari ikan nila asal Loa Kulu Kutai Kartanegara dijabarkan pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1** Uji karakteristik bakteri *Pseudomonas* sp. yang menginfeksi ikan nila asal Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur

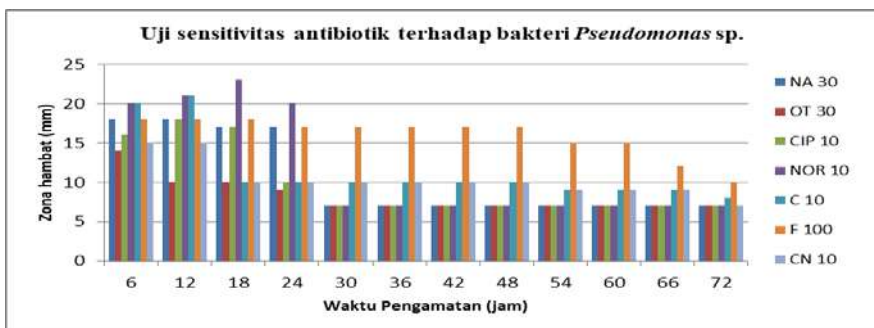
No.	Uji Karakteristik	<i>Pseudomonas</i> dari ikan uji	<i>Pseudomonas</i> (SNI, 2009)
1.	Pewarnaan gram	Gram negatif	Gram negatif
2.	Bentuk bakteri	Batang pendek	Batang pendek
3.	Oksidatif-fermentatif	O/F	O/F
4.	Uji katalase	Positif	Positif

Berdasarkan pengujian karakteristik, bakteri *Pseudomonas* sp. termasuk dalam bakteri gram negatif dengan bentuk batang dengan ukuran sekitar 0.8–1.0 µm. Bakteri *Pseudomonas* sp. tidak merubah media GSP sehingga media tetap berwarna merah. Hasil uji katalase

menunjukkan hasil positif ditunjukkan dengan cairan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bergelembung saat bakteri ini diinokulumkan di dalamnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri memiliki enzim katalase untuk menguraikan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi oksigen dan air. Hasil uji karakteristik tersebut menunjukkan bahwa bakteri yang diisolasi dari ikan nila tersebut adalah bakteri *Pseudomonas* sp. dengan mengikuti uji karakteristik berdasarkan prosedur Standar Nasional (2009). Bakteri ini memiliki flagela ditandai dengan uji motilitas positif. Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* sp. pada media cair TSB, tidak secepat pertumbuhan *A. hydrophila*. Pertumbuhan pada suhu 28-30°C selama 72 jam mencapai kepadatan 10<sup>11</sup> CFU/ml. Kepadatan yang sama terjadi pada masa inkubasi 48 jam pada bakteri *A. hydrophila*. Permukaan koloni bakteri ini pada media TSA tampak berwarna krem, bulat dan seperti berkilat.

### 3. Sensitivitas terhadap antibiotik

Uji sensitivitas bertujuan untuk mengetahui mekanisme kerja/efektifitas dari suatu antibiotik. Beberapa antibiotik yang digunakan dalam pengujian meliputi jenis Norfloxacid (NOR), Nitroflorantion (F), Chloramphennicol (C), Ciprofloaxcin (CIP), Nalidixic Acid (NA), Oxytetracycline (OT), dan Gentamicin (CN) terhadap bakteri *Pseudomonas* sp. Hasil dari pengamatan disajikan pada Gambar 2.1. berikut :



**Gambar 2.1** Uji Sensitivitas berbagai antibiotik terhadap bakteri *Pseudomonas* sp.



Sebanyak tujuh jenis antibiotik yang diuji terhadap bakteri *Pseudomonas* sp. terlihat hanya beberapa antibiotik yang memiliki daya hambat antibiotik Nalidixic Acid (NA) pada jam ke 6 dan ke 12 memiliki daya hambat 18 mm, pada jam ke 18 dan ke 24 memiliki daya hambat masing-masing 17 mm, pada jam ke 24 sampai jam ke 72 memiliki daya hambat 7 mm.

Daya hambat antibiotik Oxytetracycline (OT), pada jam ke 6 memiliki daya hambat 14 mm, pada jam ke 12 dan ke 18 memiliki daya hambat masing-masing 10 mm, pada jam ke 24 memiliki daya hambat 9 mm, pada jam ke 30 sampai jam ke 72 memiliki daya hambat 7 mm.

Daya hambat antibiotik Ciprofloaxcin (CIP), pada jam ke 6 memiliki daya hambat 16 mm, pada jam ke 12 memiliki daya hambat 18 mm, pada jam ke 18 memiliki zona hambat 17, pada jam ke 24 memiliki daya 10 mm, dan pada jam ke 30 sampai jam ke 72 memiliki daya hambat 7 mm.

Daya hambat antibiotik Norfloxacin (NOR), pada jam ke 6 memiliki daya hambat 20 mm, pada jam ke 12 memiliki daya hambat 21 mm, pada jam ke 18 memiliki daya hambat 23 mm, pada jam ke 24 memiliki daya hambat 20 mm, dan pada jam ke-30 sampai jam ke 72 memiliki daya hambat 7 mm.

Daya hambat antibiotik Chloramphenicol (C), pada jam ke 6 memiliki daya hambat 20 mm, pada jam ke 12 memiliki daya hambat 21 mm, pada jam ke 18 sampai jam ke 48 memiliki daya hambat masing-masing 10 mm, pada jam ke 54 dan jam ke 72 memiliki masing-masing daya hambat 9 mm, dan pada jam ke 66 dan 72 memiliki daya hambat masing-masing 8 mm.

Daya hambat antibiotik Nitroflorantion (F), pada jam ke 6, ke 12, dan ke 18 memiliki daya hambat 18 mm, pada jam ke 24 sampai jam ke 48 memiliki daya hambat 17 mm, pada jam ke 54 dan jam ke 60 memiliki daya

hambat 15 mm, pada jam ke 66 memiliki daya hambat 12 mm, dan pada jam ke 72 memiliki daya hambat 10 mm.

Daya hambat antibiotik Gentamicin (C), pada jam ke 6 dan jam ke 12 memiliki daya hambat 15 mm, pada jam ke 18 sampai jam ke 48 memiliki daya hambat masing-masing 10 mm, pada jam ke 54, ke 60, ke 66 memiliki daya hambat masing-masing 9 mm, dan pada jam ke 72 memiliki daya hambat 7 mm.

Berdasarkan hasil tersebut maka dapat dilihat karakter zona hambat berbagai antibiotik yaitu Norfloxacin (NOR), Nitroflorantion (F), Chloramphenicol (C), Ciprofloaxcin (CIP), Nalidixic Acid (NA), Oxytetracycline (OT), dan Gentamicin (CN) terhadap bakteri *Pseudomonas* sp. Hasil pengamatan disajikan pada Tabel 2.2.

**Tabel 2.2** Uji sensitivitas berbagai antibiotik terhadap bakteri *Pseudomonas* sp.

Bakteri Antibiotik	<i>Pseudomonas</i> sp.	
	K	D
Chloramphenicol/C	r	10
Ciprofloaxcin/CIP	s	17
Norfloxacin/NOR	s	23
Nitroflorantion/F	i	18
Nalidixic Acid/NA	s	17
Oxytetracycline/OT	r	10
Gentamicin/CN	r	10

Keterangan : K = karakter zona hambat, D = diameter zona hambat, r = resisten; i = intermediet; s = susceptible

Sebagian besar *Pseudomonas* sp. telah resisten (r) terhadap gentamicin/CN, Oxytetracycline/OT, dan Chloramphenicol/C. Hanya satu yang bersifat intermediet terhadap Nitroflorantion/F. Sifat intermediet terhadap beberapa antibiotik ini mengindikasikan bisa berubah menjadi resisten. Namun masih ada beberapa isolat yang susceptible (s) atau rentan terhadap antibiotik seperti Ciprofloaxcin/CIP, Norfloxacin/NOR, dan Nalidixic Acid/NA sehingga jenis antibiotik tersebut dapat digunakan untuk penanggulangan bakteri *Pseudomonas* sp.

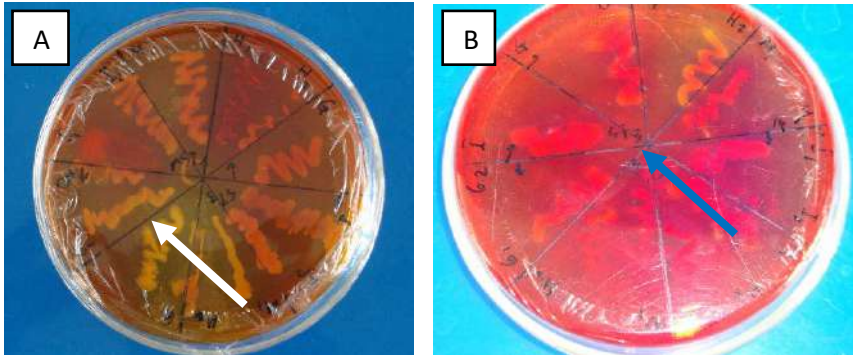
Melihat sifat resistensi terhadap berbagai antibiotik ini menunjukkan bahwa pengobatan penyakit Pseudomonosis dengan berbagai macam antibiotik tidak efektif lagi selain itu juga penggunaan antibiotik sudah dilarang untuk penanggulangan penyakit pada ikan budidaya, sehingga perlu dilakukan alternatif lain yang dapat digunakan untuk budidaya ikan. Sedangkan sifat rentan terhadap antibiotik ini dapat dijadikan acuan untuk penanganan dengan menggunakan antimikrobal herbal yang mekanisme penghambatannya dan kandungannya seperti antibiotik Ciprofloxacin/CIP, Norfloxacin/NOR, dan Nalidixic Acid/NA.

## **B. Postulat Koch Bakteri *Pseudomonas* sp.**

Ikan nila yang terinfeksi bakteri ini di alam menunjukkan gejala klinis abnormalitas seperti mata menonjol (eksoptalmia) dan gejala spesifik yang muncul adalah pecahnya kantung empedu, sehingga organ dalam tampak berair dan berwarna hitam. Pada pengujian Postulat Koch dilakukan penginjeksian melalui injeksi intraperitoneal (rongga perut) diketahui bahwa infeksi bakteri ini tidak banyak menyebabkan perubahan pada organ luar, ikan hanya tampak mengalami lemah dan turunnya nafsu makan. Perubahan terjadi pada organ dalam yang tampak berair dan terjadi penurunan konsistensi pada organ hati, ginjal dan saluran pencernaan. Perubahan warna tubuh kehitaman dan eksoptalmia biasanya terjadi pada infeksi bakteri *A. hydrophila* namun gejala tersebut tidak muncul pada bakteri *Pseudomonas* sp.

Infeksi dari bakteri *Pseudomonas* sp. menyebabkan terjadinya perubahan pada organ dalam ikan nila dan tidak tampak secara makroskopis pada organ luar. Perubahan yang terjadi seperti organ dalam berair dan terjadinya perubahan warna pada hati dan ginjal menjadi pucat.

Bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. merupakan dua bakteri gram negatif yang memiliki kisaran inang yang luas. Perbedaan gejala yang muncul disebabkan karena perbedaan karakteristik dan sifat dari bakteri itu sendiri. Perbedaan kedua bakteri pada media buatan GSP tampak pada gambar 2.2. bentuk koloni dan warna koloni yang tumbuh tampak berbeda.



**Gambar 2.2** Bakteri uji pada media GSP (panah putih bakteri *A. hydrophila* [A] dan panah biru bakteri *Pseudomonas* sp. [B])

### C. Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas* sp. pada Media Buatan

Media buatan (*Tryptone Soya Agar*) TSA dan (*Tryptone Soya Broth*) TSB merupakan media umum yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri. Selama inkubasi 24 jam pada media TSB kepadatan bakteri mencapai adalah yaitu  $1,72 \times 10^{10}$  CFU/ml. Kepadatan bakteri berbeda diinjeksikan pada ikan nila melalui intraperitoneal, menunjukkan jumlah kematian yang berbeda seperti Tabel 2.3 di bawah ini. Secara keseluruhan LD<sub>50</sub> bakteri *Pseudomonas* sp. mencapai  $10^{10}$  CFU/ml.

Bakteri *Pseudomonas* sp. dapat berperan sebagai patogen primer maupun second infeksi yang menyebabkan kematian ikan. Tidak seluruh bakteri *Pseudomonas* sp. bersifat patogen, ada strain yang bersifat sebagai

probiotik maupun sebagai bakteri pengurai di lingkungan budidaya. Hal ini disebabkan oleh perbedaan karakteristik bakterinya. Perlakuan untuk ikan yang terserang penyakit sangatlah beragam, menggunakan tanaman herbal sampai menggunakan bahan kimia. Penggunaan bahan kimia harus hati-hati, ketepatan dosis adalah kunci sukses berhasilnya suatu perlakuan tersebut. Perlu diwaspadai residu yang ditimbulkan akibat penggunaan bahan kimia. Hal ini tentu sangat berbahaya bagi lingkungan, sebagaimana yang diatur dalam peraturan menteri nomor 39/PERMEN-KP/2015 bahwa perlu adanya pengawasan terhadap residu, obat ikan dan kontaminan pada kegiatan budidaya skala pembenihan dan pembesaran.

**Tabel 2.3** Hasil uji LD50 yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. pada ikan nila

Pengenceran	Jumlah Ikan	Jumlah Kematian	% Kematian
10 <sup>11</sup>	18	18	100
10 <sup>9</sup>	18	7	38.89
10 <sup>7</sup>	18	6	33.33
10 <sup>5</sup>	18	5	27.78
10 <sup>3</sup>	18	5	27.78
Kontrol	18	0	0

Kematian ikan nila yang diinjeksi dengan bakteri *Pseudomonas* sp. tidak jauh berbeda dengan penginjeksian dengan bakteri *A. hydrophila*. Kepadatan bakteri *Pseudomonas* sp. yang menyebabkan 50% ikan sakit dan mati adalah 10<sup>10</sup> CFU/ ml. Kepadatan bakteri *Pseudomonas* sp. yang menyebabkan ikan nila sakit dan/atau mati sama dengan kepadatan *A. hydrophila*. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh karakteristik kedua bakteri yang tidak berbeda serta biasa ditemukan kedua bakteri menginfeksi secara bersama-sama pada organ target yang sama.

## D. Patogenisitas Bakteri *Pseudomonas* sp. pada Ikan Nila

### 1. Kematian, patologi anatomi organ luar dan organ dalam pasca infeksi

Ikan nila yang diinjeksi dengan kedua jenis bakteri menunjukkan perubahan patologi anatomi organ luar dan dalam yang hampir sama, secara terperinci dijabarkan pada Tabel 2.4.

**Tabel 2.4** Patologi anatomi ikan nila yang diinjeksi *Pseudomonas* sp.

Patologi Anatomi	Waktu Terjadinya Pasca Injeksi (Jam Ke)
<b>Organ Luar</b>	
Warna Tubuh Pucat	48
Eksoptalmia dan <i>Purulens</i>	120
Sirip Gripis	72
Luka pada Permukaan Tubuh	-
<b>Organ Dalam</b>	
Organ Dalam Berair	48
Organ Dalam Pucat	24
Organ Hati, Ginjal Merah Kehitaman	24

Bakteri *Pseudomonas* sp. menyebabkan perubahan pada organ dalam lebih cepat, seperti organ dalam berair dan terjadinya perubahan warna pada hati dan ginjal menjadi pucat. Kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi dijabarkan pada Tabel 2.5.

**Tabel 2.5** Kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi *Pseudomonas* sp.

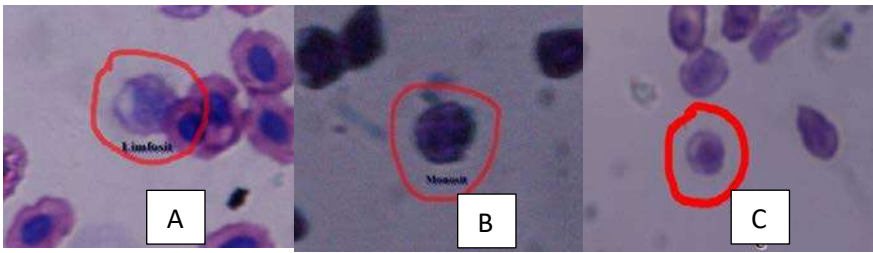
Waktu Kematian Jam Ke-	Jumlah Kematian
24	2
48	4
72	5
96	7
120	7
148	8
172	8

Kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi dengan *Pseudomonas* sp. lebih tinggi dibandingkan dengan yang disebabkan oleh *A. hydrophila*. Hal ini disebabkan karena kerusakan organ dalam pada ikan yang diinjeksi *Pseudomonas* sp. lebih tinggi, hati dan ginjal ikan mengalami kerusakan

mulai dari warnanya yang merah kehitaman hingga pendarahan, hal inilah yang diduga menyebabkan kematian ikan lebih cepat terjadi.

## 2. Gambaran Darah Ikan Nila yang Diinjeksi dengan *Pseudomonas* sp.

Infeksi bakteri *Pseudomonas* sp. menyebabkan terjadinya penurunan nilai hemoglobin, total eritrosit dan hematokrit, namun memicu peningkatan total leukosit sejak jam ke- 48 pasca injeksi. Secara terperinci gambaran darah ikan nila pasca injeksi *Pseudomonas* sp. dapat dilihat pada Tabel 2.6.



**Gambar 2.3** Diferensial leukosit ikan nila (a. Limfosit, b. Monosit, c. Neutrofil)

**Tabel 2.6** Gambaran darah ikan nila yang diinjeksi dengan *Pseudomonas* sp.

Jam	Perlakuan	Gambaran Darah			
		Hemaglobin (g %)	TE ( $10^4$ sel/ $mm^3$ )	TL ( $10^4$ sel/ $mm^3$ )	Hematokri (%)
48	Injeksi	6	30	3,42	11
	Kontrol	11,8	38	1,89	12,67
72	Injeksi	8,5	33	3,42	11,7
	Kontrol	12,2	36	2,13	16,33
96	Injeksi	7,5	44	5,165	9,9
	Kontrol	13,2	50	3,215	18
120	Injeksi	8,8	50	6,65	9,8
	Kontrol	14,8	61	3,385	22,43
144	Injeksi	9	33	8,54	8,3
	Kontrol	12,5	36	3,18	25,23
168	Injeksi	9,2	34	8,45	11,5
	Kontrol	13,3	37	3,805	23,16

Penurunan hemoglobin ikan nila yang diinjeksi *Pseudomonas* sp. mulai terjadi pada jam ke 48 hingga jam ke 168 pasca injeksi hal ini disebabkan karena di duga bakteri memproduksi toksin (seperti hemolisin). Toksin ini masuk ke dalam darah menyebabkan cairan hemoglobin menurun. Hemoglobin ini terkait dengan jumlah sel darah merah (eritrosit), dimana pada jam ke 48 pasca injeksi total eritrosit ikan nila yang diinjeksi *Pseudomonas* sp. mengalami penurunan. Hemolisin merupakan enzim yang menyebabkan sel darah merah mengalami lisis. Kerja toksin hemolisin (dihasilkan bakteri gram negatif pada umumnya) menyebabkan sel eritrosit berada dalam cairan yang osmolaritasnya lebih rendah sehingga lisis (Dellmann, 1989) inilah yang menyebabkan penurunan total eritrosit mulai jam ke 48 pasca injeksi.

Hematokrit ikan juga menggambarkan bagaimana kondisi kesehatan pasca injeksi dengan *Pseudomonas* sp. umumnya mulai mengalami penurunan (lebih rendah dari kontrol) pada jam ke 48 pasca injeksi. Turunnya nilai hematokrit dapat disebabkan karena menurunnya nafsu makan ikan, seperti diketahui, pasca diinjeksi dengan bakteri, ikan nila mulai tidak mau makan pada jam ke 24. Menurut Anderson dan Siwicki (1995) menurunnya hematokrit dapat mengindikasikan adanya infeksi, sedangkan meningkatnya kadar hematokrit dalam darah menunjukkan bahwa ikan dalam keadaan stress.

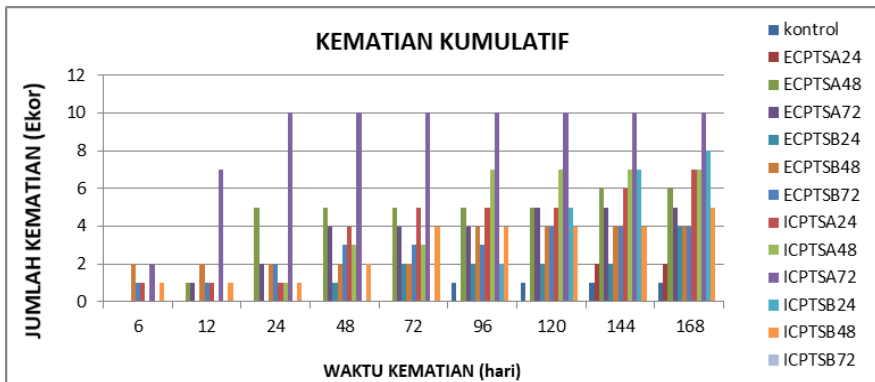
Peningkatan total leukosit terjadi karena adanya infeksi patogen. Seperti yang telah dijelaskan pada patogenesis *A. hydrophila*, sel darah putih bertanggungjawab terhadap pertahanan tubuh, sehingga saat ada infeksi tubuh kan memproduksi sel darah putih lebih banyak dan mengirimkan ke daerah infeksi untuk menanggulangi patogen.



## E. Produk Ekstraseluler (ECP) dan Intraseluler (ICP) Bakteri *Pseudomonas* sp.

### 1. Kematian ikan nila

Jumlah kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP terlihat pada Gambar 2.4. Kematian ikan yang diinjeksi dengan ICP lebih tinggi (50-100%) dibandingkan dengan yang diinjeksi dengan ECP (20-60%). Perbedaan media tumbuh dan lama inkubasi juga berpengaruh terhadap tingkat kematian. Bakteri *Pseudomonas* sp. yang diinkubasi pada media padat dengan lama inkubasi 72 jam menghasilkan ICP yang dapat menyebabkan kematian 100% ikan uji. Hal ini dapat disebabkan karena toksin dalam intaselular produk lebih banyak dan protein dalam ICP diduga merupakan salah satu faktor virulensi *Pseudomonas* sp. Menurut Hardi et al. (2011) protein di dalam ECP bakteri *Streptococcus agalactiae* yang ditumbuhkan dalam media padat BHIA lebih banyak konsentrasi dan jenis proteinnya, inilah yang menjadi penyebab kematian ikan yang diinjeksi ECP BHIA lebih cepat menyebabkan kematian dibandingkan dengan yang ditumbuhkan di media cair BHIB.



Gambar 2.4 Kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp.

Kematian ikan yang diinjeksi ECP bakteri *Pseudomonas* sp. umumnya mulai terjadi 12 jam pasca injeksi dan kematian terus terjadi hingga hari ke 7 pemeliharaan yang mencapai 60%, sedangkan yang diinjeksi dengan ICP ternyata kematian sudah terjadi pada 6 jam pasca

injeksi dengan kematian mencapai 100%. Kematian yang terjadi secara cepat dan banyak, yaitu dalam waktu 6 jam dan kematian mencapai 100% pada 24 jam pasca injeksi, hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya beberapa enzim seperti hemolisin, lipase, elastase, gelatinase, chitinase (Austin and Austin, 2007). Karunakaran (1994), enzim hemolitik dihasilkan oleh bakteri *A. caviae* pada fase stasioner, jika dilihat dari data kematian yang diinjeksi dengan ICP diketahui bahwa jam ke 6–24 merupakan fase eksponensial dan stasioner bakteri *Pseudomonas* sp.

## 2. Perubahan pola renang

Pola renang ikan nila yang diinjeksi dengan ECP menunjukkan adanya abnormalitas (Tabel 2.7), perubahan pola renang yang muncul sama dengan pola renang saat diinjeksi dengan bakteri sel utuh (Hardi, 2012). Penginjeksian ECP bakteri *Pseudomonas* sp. menyebabkan ikan berenang whirling (miring) pada jam ke 24 pasca injeksi (TSA lama inkubasi 48 dan 72 jam). Gejala umum yang muncul saat penginjeksian dengan ICP adalah ikan berenang lemah, diam di dasar akuarium dan gasping yang dimuali pada jam ke 12 baik yang ditumbuhkan di media padat maupun cair. Umumnya perubahan pola renang baru terjadi pada jam ke 24 pasca injeksi dengan gejala awal ikan berenang gasping, lemah dan bukaan operkulum lemah. Berenang whirling hanya tampak pada ikan yang diinjeksi dengan ECP yang diinkubasi pada 48 jam, hal ini menunjukkan bahwa bahan ECP menyebabkan kerusakan pada otak ikan sehingga keseimbangan berenang ikan terganggu. Menurut Hardi et al. (2011) ikan yang menunjukkan pola berenang whirling disebabkan karena adanya kerusakan pada bagian otak. Pada otak ikan nila yang diinjeksi dengan ECP bakteri *S. agalactiae* mengalami nekrosa dan hiperemi, kedua kerusakan

ini yang menyebabkan ikan mengalami abnormalitas dalam berenang yaitu ikan berenang miring bahkan *whirling*.

**Tabel 2.7** Perubahan pola renang ikan nila pada uji toksisitas ECP bakteri *Pseudomonas* sp. yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB

Perlakuan	Waktu Pengamatan									
	3	6	12	24	48	72	96	120	144	168
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ECP</b>										
TSA 24	-	-	-	-	E,D	B	-	C	-	-
TSA 48	-	-	-	A,B,D	-	-	-	-	-	-
TSA 72	-	-	-	C,D,F	C	-	B	B	B,D,F	-
TSB 24	-	-	-	-	B,D	C	-	-	-	-
TSB 48	-	-	-	C	D	-	-	-	-	-
TSB 72	-	-	-	C,D,F	C	C	-	B	C,D,F	-
<b>ICP</b>										
TSA 24	-	-	-	B,C,E	D	-	-	-	-	-
TSA 48	-	-	-	-	-	C	D	-	-	-
TSA 72	-	-	-	C,D,F	-	-	-	-	-	-
TSB 24	-	-	-	C,E	D	B	-	-	-	-
TSB 48	-	-	-	B	D	-	-	-	-	-
TSB 72	-	-	-	D,F	-	-	-	-	D,F	-

Keterangan: Berenang berputar (*whirling*), B. Mengambil udara tepat dibawah permukaan air (*gasping*), C. Diam di dasar, D. Reflek lambat, E. Berenang lemah, F. Bukan operculum lambat

Perubahan pola makan terjadi hampir pada seluruh ikan yang diinjeksi dengan ECP. Ikan berkurang nafsu makannya sejak 24 jam pertama pasca injeksi, bahkan ikan mulai tidak mau makan setelahnya. Hal ini disebabkan oleh ECP yang masuk dalam otak ikan yang merusak hipotalamus sehingga mengganggu keseimbangan rasa lapar ikan.

### 3. Perubahan anatomi organ ikan nila

Pada pengujian patogenisitas ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. tampak adanya perubahan pada patologi anatomi ikan nila. Secara makroskopis, organ mata ikan nila yang diinjeksi dengan ECP maupun ICP lama inkubasi 48 jam tampak mengalami eksotalmia atau mengalami purulens yang terjadi pada jam ke 48 pasca injeksi, lebih cepat

dibandingkan dengan penginjeksian ECP lama inkubasi 24 jam, perubahan baru terjadi pada jam ke 120 pasca injeksi. Secara keseluruhan, ikan nila yang diinjeksi ECP dengan lama inkubasi yang berbeda mengalami patologi anatomi organ luar lebih cepat dibandingkan dengan penginjeksian dengan ICP, abnormalitas yang muncul juga lebih banyak pada ikan yang diinjeksi dengan ECP.

**Tabel 2.8** Patologi anatomi organ luar ikan nila pada uji toksisitas ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB

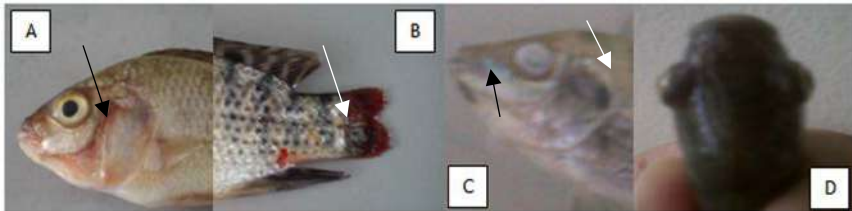
	Waktu pengamatan									
	3	6	12	24	48	72	96	120	144	168
Kontrol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>ECP</b>										
TSA 24	-	-	7	-	4,6	-	-	3,5	-	-
TSA 48	-	-	-	7,9	2	3,10	-	-	6,8	-
TSA 72	-	-	-	7,8,9	2,6,7	3	3,7	3,7	7,9	-
TSB 24	-	6	7	9	3	5	-	2,4	-	-
TSB 48	-	-	-	-	-	10	3,7,9	-	6,8	-
TSB 72	-	-	-	7	6,7,10	8	7	7,10	-	-
<b>ICP</b>										
TSA 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSA 48	-	-	8,9	-	3,6,10	-	-	-	-	-
TSA 72	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-
TSB 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSB 48	-	-	-	-	2,3,9	-	-	6	-	-
TSB 72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan. : 1. Normal, 2. Eksoptalmia, 3. Opacity, 4. Abses pada perut, 5. Mulut putih dan luka, 6. Garis vertikal tubuh menghitam, 7. Pendarahan, luka pada tubuh, 8. *Clear operculum*, 9. Sisik lepas, 10. sirip gripis.

Penyuntikan ICP yang berasal dari media padat (TSA) tampak lebih cepat menyebabkan perubahan anatomi organ luar secara makroskopis dibandingkan dengan media cair (TSB) (Tabel 2.8). Ikan yang diinjeksi dengan ICP dari media TSA lebih cepat mengalami *clear operculum*, yaitu pada jam ke 12 pasca injeksi dan gejala tersebut tidak ditemukan pada ikan nila yang diinjeksi dengan ICP dari media TSB. Hal ini menunjukkan bahwa media tumbuh bakteri berpengaruh terhadap ICP yang dihasilkan, untuk mengetahui lebih lanjut mengenai jumlah dan jenis ICP dan ECP yang

dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas* sp. perlu dilakukan fraksinasi lebih lanjut.

Penginjeksian dengan ECP menyebabkan perubahan yang lebih cepat dan abnormalitas yang muncul lebih banyak dibandingkan dengan penginjeksian ICP, ini menandakan bahwa penginjeksian dengan ECP menyebabkan kerusakan sel lebih cepat dibandingkan dengan penginjeksian ICP. Hal ini diduga karena ECP mengandung lebih banyak bahan toksin dibandingkan dengan ICP. Beberapa patologi anatomi organ luar ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP dapat dilihat pada Gambar 2.5.



**Gambar 2.5** Beberapa perubahan pada patologi anatomi organ luar ikan nila pasca injeksi dengan ECP dan ICP *Pseudomonas* sp. (dari kiri-kanan). A= clear operkulum. B= sirip ekor gripis. C= opacity (kekeruhan mata). D= bilateral eksoptalmia.

Eksoptalmia yang terjadi pada ikan terkadang disertai dengan kekeruhan pada mata (*opacity*). Menurut Hardi (2012) gejala yang muncul pada mata ikan yang terinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. adalah eksoptalmia dan *opacity*. Eksotoksin dan endotoksin bakteri *Pseudomonas* sp. diduga menyebar pada mata yang menyebabkan adanya hipertropi, inilah yang menyebabkan ikan mengalami eksotalmia dan perubahan lainnya. Hal ini menandakan bahwa ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. sebagai penyebab timbulnya perubahan pada mata. Perubahan pada organ dalam juga terjadi pada ikan nila yang diinjeksi dengan ECP maupun ICP, secara terperinci dijabarkan pada Tabel 2.9.

**Tabel 2.9** Patologi anatomi organ dalam ikan nila pada uji toksisitas ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. yang ditumbuhkan pada media TSA dan TSB

Kode	Waktu pengamatan jam ke-									
	3	6	12	24	48	72	96	120	144	168
Kontrol	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<b>ECP</b>										
TSA 24	-	-	-	b,d	c	e	-	-	-	-
TSA 48	-	-	-	b,d	-	-	-	-	-	-
TSA 72	-	-	-	-	b	c	-	-	-	-
TSB 24	-	-	-	-	b	c,d	-	-	e	-
TSB 48	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-
TSB 72	-	-	-	-	-	B	-	c	-	-
<b>ICP</b>										
TSA 24	-	-	-	-	-	-	-	b,d	-	c,e
TSA 48	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-
TSA 72	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-
TSB 24	-	-	-	-	-	-	-	b,c	-	d,e
TSB 48	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-
TSB 72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

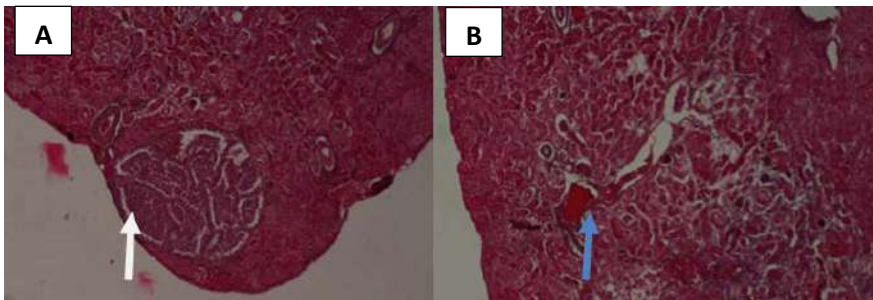
Keterangan. : a. Normal, b. organ hati pucat, c. organ hati berwarna kehijauan dan ukurannya mengecil, d. bentuk ginjal tidak beraturan, e. Warna ginjal merah kehitaman.

Organ dalam ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. menunjukkan adanya abnormalitas. Organ hati pucat terjadi sejak 24 jam pasca injeksi dengan ECP yang dihasilkan dari media TSA dengan lama inkubasi 24 dan 48 jam sedangkan yang diinjeksi dengan ICP yang dihasilkan bakteri pada media TSA lama inkubasi 72 jam. Baik ECP maupun ICP bakteri *Pseudomonas* menyebabkan abnormalitas pada organ dalam ikan nila namun penginjeksian dengan ECP menyebabkan perubahan lebih cepat dibandingkan dengan ICP dan lama inkubasi 24-48 jam mengandung bahan lebih toksik dibandingkan dengan yang diinkubasi lebih lama. Abnormalitas ikan yang diinjeksi dengan ECP dan ICP sama dengan ikan nila yang diinjeksi dengan sel utuh *Pseudomonas* sp. yaitu organ dalam ikan berair dan terjadinya perubahan warna pada hati dan ginjal menjadi pucat (Hardi, 2012).

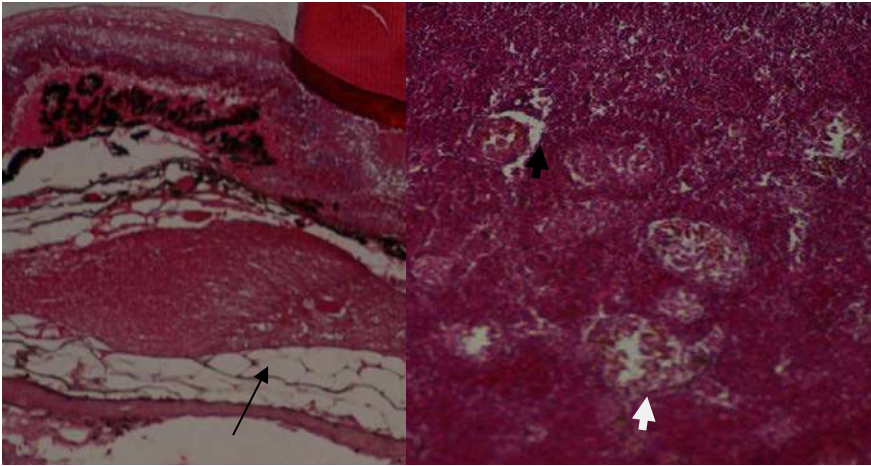
#### 4. Histopatologi ikan nila pasca injeksi dengan ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp.

Ginjal ikan nila yang diinjeksi dengan ECP *Pseudomonas* sp. menunjukkan adanya kerusakan struktural, seperti hipertrofi dan nekrosa. Hipertrofi disebabkan karena ECP dan ICP masuk ke dalam ginjal bersama aliran darah dan menuju tubulus ginjal. Ikan yang diinjeksi dengan ECP, degenerasi dan nekrosa pada tubulus ginjal lebih cepat terjadi dibandingkan dengan penginjeksian dengan ICP.

Kerusakan pada tubulus ginjal dapat berpengaruh pada struktur dan fungsi ginjal, mengakibatkan terganggunya proses-proses fisiologik di dalam tubuh ikan bahkan dapat menyebabkan kematian. Sama halnya dengan ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada organ ginjalnya ditemukan adanya nekrosa dan hemoragi, yang diduga akibat toksin yang dikeluarkan bakteri (Murdjani, 2002).



**Gambar 2.6** Perubahan pada ginjal ikan. Panah biru hipertrofi dan panah putih hiperplasi pada tubulus ginjal



**Gambar 2.7** Histopatologi organ mata dan otak ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. A. Bagian Choroid body mata ikan panah hitam menunjukkan hipertropi. B. Otak ikan mengalami hiperplasi (panah hitam) dan nekrosa (panah putih).

Ikan nila yang diinjeksi ECP yang berasal dari media TSA lama inkubasi 48 jam menunjukkan berenang *whirling*, organ otak secara histopatologi tampak terjadi nekrosa pada bagian cranial (Gambar 2.7B), ini biasanya yang menyebabkan meningitis dan encephalitis pada infeksi *Edwardsiella ictaluri* pada *channel catfish* dan infeksi *Streptococcus iniae* pada ikan *yellowtails* (Ferguson, 1989). Organ mata ikan mengalami hipertropi (Gambar 2.7A), kelainan ini tampak pada ikan yang mengalami eksotalmia baik lateral maupun bilateral. Bahan ECP dan ICP yang diinjeksikan merusak bagian choroid mata sehingga menyebabkan mata mengalami perubahan tersebut.



## **F. Karakteristik Protein Ekstraselular dari Bakteri *Pseudomonas* sp. yang di Tumbuhkan pada Kondisi yang Berbeda**

### **1. Pendahuluan**

*Pseudomonas* sp. merupakan jenis bakteri yang memiliki inang cukup luas dan merupakan penyebab pseudomonas septicemia pada budidaya ikan air tawar. Bakteri ini tidak hanya ditemukan pada biota akuatik namun juga ditemukan di tanah, air, dan tumbuhan. Bakteri ini berbentuk batang motil, tumbuh pada suhu 18-25° C; cytox positif, katalase positif, dan bersifat aerob. Karakteristik bakteri *Pseudomonas* sp. ini hampir sama dengan *Aeromonas* hanya perbedaannya tampak saat kedua bakteri ini ditumbuhkan di media spesifik GSP. Bakteri *Pseudomonas* sp. akan tumbuh pada media GSP tanpa merubah warna media (tetap merah), sedangkan bakteri *Aeromonas hydrophila* akan tumbuh pada media GSP dan merubah warna media menjadi kuning.

Infeksi bakteri *Pseudomonas* ini ditemukan pada budidaya ikan nila di Mesir (Khalil et al., 2010), ikan mas (Mastan, 2013), ikan mas di India dan Jepang (Khalil et al., 2010; Saleh et al., 2012). Jenis *Pseudomonas* yang bersifat patogen pada ikan adalah jenis *Pseudomonas anguilliseptica* (Wakabayashi dan Egusa, 1972) yang dominan ditemukan pada ikan air tawar (Allen et al., 1993) dan *P. fluorescens* penyebab penyakit pada sidat (*Red pest, Red fish disease*) dan penyakit red spot disease pada *Cyprinids*, *Percids* dan *Coregonids* Ikan yang terinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. kulit akan menjadi merah (Schaperclaus et al., 1992) kurangnya penanganan yang baik dapat menyebabkan kematian yang tinggi (Stoskopf, 1993 dan Fayed et al., 1997).

Ekstrasellular produk (ECP) dari bakteri *Pseudomonas* sp. merupakan salah satu faktor virulensi bakteri yang menyebabkan ikan nila di Kutai Kartanegara, Kalimantan Timur mengalami sakit dan mati (Hardi et al., 2013), namun kandungan protein di dalam ECP kedua bakteri tersebut belum diketahui. Tulisan ini akan membahas mengenai jenis dan jumlah masing-masing protein di dalam ECP bakteri *Pseudomonas* yang ditumbuhkan pada media dan waktu inkubasi yang berbeda.

## 2. Isolasi produk ekstraseluler (ECP)

Metode Isolasi ECP terstandar adalah prosedur Sirirat et al. (1999) yang dimodifikasi, dengan urutan kerja: bakteri dikultur dalam media cair *Tryptone Soya Broth* (TSB) dan *Tryptone Soy Agar* (TSA). Kultur bakteri diinkubasi selama 24, 48, dan 72 jam pada suhu 30°C dan 40°C. Bakteri yang tumbuh pada media TSB dan bakteri yang tumbuh dalam media TSA (terlebih dahulu ditambahkan *Phospat Buffer Saline/PBS* sebanyak 5 mL) kemudian dipanen. *Slurry* berupa suspensi bakteri kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan disaring dengan *filter paper* 0,45 µm dan selanjutnya hasil filtrasi dan difraksinasi menggunakan SDS PAGE (Hardi et al., 2011).

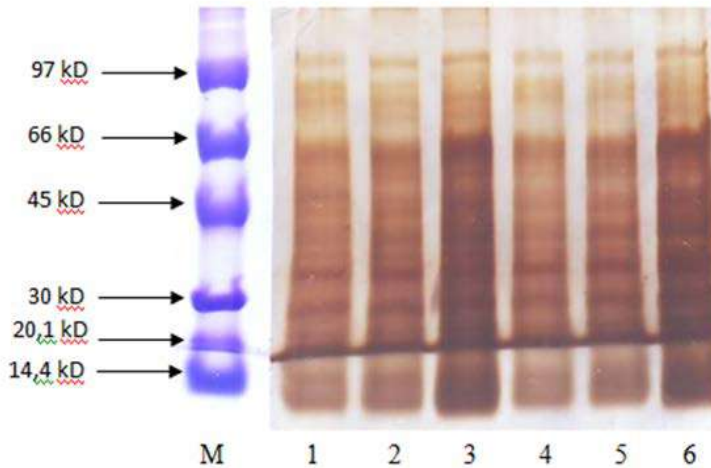
Fraksinasi protein ini dilakukan melalui metode SDS-PAGE (Laemmli, 1970) dengan standar protein BM rendah, 10% gel pemisah dan 4% gel penahan. Fraksinasi dilakukan melalui SDS-PAGE, gel di-*running* dalam 600 ml buffer elektroforesis pH 8.3 mengandung 192 mM glisin+0.1% SDS+24.8 mM Tribase (Trishidroksiaminometan). Sebelum dimasukkan ke dalam sumur, ECP dan marker+buffer sampel (rasio 1:1) dicampurkan, kemudian diinkubasi dalam air mendidih selama 1 menit. Buffer sampel

mengandung 1 gram SDS, 2 ml gliserol 50%, 2 ml bromofenol biru 0.1%, 1.25 ml TrisCl 1 M pH 6.8 dan ditambahkan akuades hingga volume menjadi 10 ml, volume marker dan ECP adalah 20  $\mu$ l. Kondisi elektroforesis adalah 100 mA, 100 volt selama 90–120 menit. Deteksi pita menggunakan metode *Silver Staining*.

Pewarnaan dengan metoda *Silver Staining* dengan cara gel difiksasi dengan larutan (25 % methanol, 12 % Asam asetat) selama 1 jam, kemudian direndam dalam etanol 50 %, selama 20 menit. Setelah itu direndam kembali dalam etanol 30%, selama 20 menit sebanyak 2 kali. Selanjutnya di-enhancer (0.1 gram  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) dalam 500 ml akuades selama 1 menit, dicuci dengan akuades 20 detik, diulang 3 kali. Kemudian dicelupkan ke dalam larutan silver nitrat (0.4 g  $\text{AgNO}_3$  dicampurkan dengan 70  $\mu$ m formaldehid dalam 200 ml akuades) selama 30 menit. Langkah berikutnya adalah dibilas dengan akuades sebanyak 2 kali selama 20 detik dan dicelupkan ke dalam larutan (15 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 120  $\mu$ l formaldehid). Maka akan terlihat band hitam, saat itulah reaksi dengan larutan fiksasi dihentikan. Hasil elektroforesis kemudian dianalisis untuk mengetahui berat molekul masing-masing fraksi protein dengan cara setiap band yang terbentuk dibandingkan dengan protein marker.

### **3. Protein frasi dari ECP bakteri *Pseudomonas* sp.**

Hasil fraksinasi protein melalui SDS-PAGE diperoleh protein dengan berbagai berat molekul dari Bakteri *Pseudomonas* yang diinkubasi pada suhu 30°C dan 40°C pada media cair TSB. Protein yang terkandung di dalam ECP bakteri *Pseudomonas* berkisar antara 15,21 – 113,10 kDa. Hasil elektroforesis ECP melalui SDS PAGE dengan pewarnaan *silver stain* dapat dilihat pada Gambar 2.8.



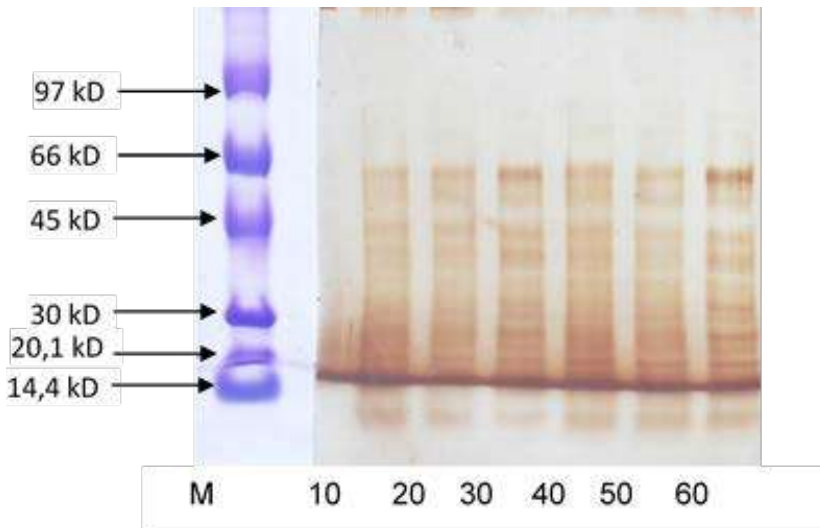
**Gambar 2.8** Hasil elektroforesis ECP *Pseudomonas* sp. yang ditumbuhkan di media cair melalui SDS PAGE dengan pewarnaan silver stain. Marker : BS. Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 2.10. kolom kode.

Bakteri yang diinkubasi pada suhu 30°C lebih dari 24 jam memiliki protein lebih banyak dibandingkan dengan bakteri yang diinkubasi selama 24 jam, namun jenis protein yang dihasilkan memiliki berat molekul hampir sama walaupun ada yang berbeda (secara terperinci dapat dilihat pada Tabel 2.10). Berbeda dengan saat bakteri diinkubasi pada suhu 40°C, masa inkubasi 48 jam menghasilkan protein yang lebih banyak dibandingkan dengan masa inkubasi 24 dan 72 jam (Tabel 2.10).

**Tabel 2.10** Ekstrasellular bakteri *Pseudomonas* sp. yang ditumbuhkan di media TSB diinkubasi pada suhu 30°C dengan lama inkubasi yang berbeda

Bakteri Diinkubasi Suhu 30°C			Bakteri Diinkubasi Suhu 40°C		
Waktu Inkubasi			Waktu Inkubasi		
24 Jam (1)	48 Jam (2)	72 Jam (3)	24 Jam (4)	48 Jam (5)	72 Jam (6)
113,10	113,10	113,10	113,10	113,10	113,10
96,53	86,86	91,57	96,53	96,53	91,57
86,86	78,15	78,15	86,86	86,86	66,71
66,71	66,71	66,71	66,71	66,71	60,02
52,60	56,93	60,02	56,93	60,02	54,00
48,59	52,60	54,00	48,59	56,93	48,59
43,72	48,59	46,09	41,47	47,33	39,34
40,39	43,72	40,39	35,40	40,39	36,34
37,32	39,34	36,34	32,70	35,40	32,70
33,58	35,40	33,58	27,18	32,70	27,91
27,18	32,70	30,21	23,20	27,18	24,46
23,82	25,79	25,79	21,44	23,20	22,01
20,88	22,60	20,88	17,82	21,44	17,82
17,82	20,88	19,80	15,21	17,82	15,21
15,21	17,82	17,82		15,21	
	15,21	15,21			
15 band	16 band	16 band	14 band	15 band	14 band

Penentuan kadar protein hasil elektroelusi yang di baca berdasarkan standar protein BSA (Bovine Serum Albumin) seperti disajikan pada Tabel 2.10. Dengan melihat ketebalan band pada Gambar 2.8 ini diduga bahwa band yang tebal memiliki peranan yang penting dalam aspek patogenitas ikan yang diinjeksi dengan bakteri *Pseudomonas* sp. Sebagai sumbu X adalah variable kadar BSA dan sumbu Y adalah hasil bacaan *Optical Density* (OD), diperoleh persamaan  $Y = 0.022X + 0.007$ , persamaan tersebut digunakan untuk menghitung kadar protein hasil elektroelusi disajikan pada Tabel 2.9. Banyaknya jenis protein dalam ECP menjadi salah satu faktor yang menyebabkan patogenisitas bakteri lebih tinggi.



**Gambar 2.9** Hasil elektroforesis ECP *Pseudomonas* yang ditumbuhkan di media padat melalui SDS PAGE dengan pewarnaan silver stain. Marker: BS. Keterangan pengkodean merujuk pada Tabel 2.10. kolom kode.

Sama halnya dengan bakteri yang ditumbuhkan pada media cair, bakteri yang ditumbuhkan pada media padat juga menghasilkan berbagai protein dengan berat molekul tertentu. Berat molekul bakteri yang diinkubasi pada suhu 40°C umumnya berkisar antara 15,21 – 63,27 kDa. protein dengan BM 25,79 dan 24,46 kDa adalah protein yang hanya dihasilkan bakteri pada saat diinkubasi selama kurang dari 72 jam, dan protein 23,20 kDa tidak dihasilkan oleh bakteri lama inkubasi 48 jam. Ini menunjukkan bahwa waktu inkubasi sangat berpengaruh terhadap jenis protein yang dihasilkan. Bakteri *A. hydrophilla* lebih banyak menghasilkan protein pada saat ditumbuhkan di media cair TSB dibandingkan dengan media padat TSA, hasil ini bertolak belakang dengan hasil penelitian Hardi et al. (2011) dan Murdjani (2002) menunjukkan bahwa bakteri *Streptococcus agalactiae* dan *Vibrio anguillarum* menghasilkan banyak jenis protein saat ditumbuhkan pada media padat dibandingkan pada

media cair. Perbedaan jenis bakteri dan suhu inkubasi diduga mempengaruhi perbedaan jenis dan jumlah protein yang dihasilkan.

Bakteri yang diinkubasi pada suhu 30° C menghasilkan protein dengan BM 15,21–63,27 kDa. Protein 25,79 kDa tidak dihasilkan oleh bakteri yang diinkubasi lebih dari 24 jam, dan protein dengan BM 23,20 dan 28,66 kDa hanya dihasilkan oleh bakteri yang diinkubasi lebih dari 24 jam. Hal ini menunjukkan bahwa lama waktu inkubasi sangat berpengaruh terhadap protein yang terkandung di dalam ECP bakteri *Pseudomonas* sp.

**Tabel 2.11** Ekstraseluler bakteri *Pseudomonas* sp. yang ditumbuhkan di media TSA diinkubasi pada suhu 30°C dengan lama inkubasi yang berbeda

Bakteri Diinkubasi Suhu 30°C			Bakteri Diinkubasi Suhu 40°C		
24 Jam (10)	48 Jam (20)	72 Jam (30)	24 Jam (40)	48 Jam (50)	72 Jam (60)
63,27	63,27	63,27	63,27	63,27	63,27
54,00	54,00	54,00	56,93	56,93	56,93
46,09	46,09	46,09	54,00	54,00	54,00
39,34	39,34	39,34	46,09	46,09	46,09
35,40	35,40	35,40	39,34	39,34	39,34
32,70	32,70	32,70	35,40	35,40	35,40
27,18	28,66	28,66	32,70	32,70	32,70
25,79	27,18	27,18	28,66	28,66	28,66
24,46	24,46	25,79	27,18	27,18	27,18
22,01	23,20	23,20	25,79	25,79	23,20
20,88	22,01	22,01	24,46	24,46	22,01
18,78	20,88	20,88	23,20	22,01	19,80
15,21	18,78	18,78	22,01	19,80	17,82
	15,21	15,21	19,80	17,82	15,21
			17,82	15,21	
			15,21		
13 band	14 band	14 band	16 band	15 band	14 band

Sama halnya dengan ECP yang dihasilkan oleh *A. hydrophila*, ECP yang dihasilkan bakteri *Pseudomonas* sp. juga berbeda pada saat bakteri ditumbuhkan pada media TSA dan TSB. Bakteri yang ditumbuhkan di media

TSB dengan suhu dan lama inkubasi yang sama cenderung menghasilkan jenis protein lebih banyak dibandingkan dengan yang ditumbuhkan pada media TSA. Lama inkubasi 48 jam merupakan waktu optimum bakteri untuk memproduksi ECP, dan suhu inkubasi 40 °C berpengaruh terhadap penurunan produksi ECP.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Zhang et al. (2009) menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas fluorescens* strain menghasilkan protein (47 kDa) yang merupakan extracellular protein yang bersifat imunogenik (diduga dapat memicu pembentukan antibodi). Pada bakteri-bakteri yang bersifat patogen, protease disekresikan selama infeksi, protein inilah yang bertanggungjawab menyebabkan ikan sakit dan atau mati. Protease dihasilkan oleh patogen *Vibrio vulnificus* dan *Vibrio anguillarum*, berupa metalloproteases yang dimanfaatkan untuk kolonisasi dan interaksi pada lapisan mukosa inang (Denkin dan Nelson, 2004; Norqvist et al., 1990.; Valiente et al., 2008).

Produk ekstraseluler sebagai penyebab infeksi penyakit dan kematian yang diproduksi oleh bakteri telah dikaji oleh beberapa peneliti terdahulu. Diantaranya adalah ECP yang dihasilkan oleh *Aeromonas hydrophila* (Kawahara dan Nomura, 1990), *Edwardsiella tarda* (Suprpto et al., 1995), *Flavobacterium* sp. (Ototake dan Wakabayashi, 1985), *Mycobacterium* sp. (Chen et al., 1997), *Vibrio anguillarum* (Lamas et al., 1994; Murdjani, 2002). Peranan masing-masing protein belum diketahui sehingga masih perlu dilakukan penelitian selanjutnya untuk mengetahui peranan masing-masing protein pada ikan nila.



## **G. Aktivitas Antagonistik Ekstraselular Produk Bakteri *Pseudomonas* sp. Terhadap Bakteri Patogen *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Nila**

### **1. Pendahuluan**

Infeksi bakteri *A. hydrophila* selalu dibarengi dengan infeksi dari bakteri *Pseudomonas* sp. kedua bakteri ini hampir selalu ditemukan pada ikan nila sehat maupun sakit dengan tingkat patogenisitas yang berbeda. Menurut Hardi dan Pebrianto (2012), Rauhun (2014) ikan yang terinfeksi bakteri *A. hydrophilla* menunjukkan perubahan pada organ luar lebih banyak dan cepat muncul dibandingkan dengan infeksi dari *Pseudomonas* sp. Hal ini menandakan bahwa *A. hydrophila* lebih patogen. Keberadaan bakteri *Pseudomonas* sp. di dalam tubuh ikan diharapkan mampu menjadi biokontrol untuk *A. hydrophila*. Namun masih perlu dilakukan penelitian terkait dengan sifat antagonistik dari sel utuh maupun produk ekstraselular yang dihasilkan selama hidup dalam tubuh inang.

Sebenarnya, penanggulangan bakteri ini sudah banyak dilakukan mulai dari penggunaan bahan-bahan fitofarmaka, vaksin, hingga penanggulangan melalui perbaikan lingkungan dengan hasil yang bervariasi. Penggunaan bahan protein yang diproduksi oleh bakteri untuk menekan pertumbuhan patogen sudah banyak dilakukan dengan hasil yang cukup baik. Pemilihan produk bakteri untuk menanggulangi bakteri patogen dianggap lebih aman dan efektif karena tidak menyebabkan masalah resistensi pada ikan yang dibudidayakan. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Vijayan et al. (2006), menunjukkan bahwa supernatant dari bakteri *Pseudomonas* sp. PS-102 bersifat antagonistik terhadap bakteri vibrio sebesar 73%, dan aman bagi udang ukuran PL-9. Nour dan El-Ghiet (2011) menguji secara in vitro adanya aktivitas antibakterial *P. fluorescens* terhadap *A. hydrophila*.

Bakteri *Pseudomonas* sp. (EP-01) dan *A. hydrophila* (A-01) berhasil diisolasi dari ikan nila yang mengalami sakit di Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur. Dari hasil uji patogenisitas, diketahui bahwa *A. hydrophila* merupakan bakteri yang menyebabkan ikan nila mengalami perubahan pada organ luar lebih dominan, dan bakteri ini menyebabkan kematian lebih cepat dibandingkan dengan bakteri *Pseudomonas* sp. Jika *Pseudomonas* menyebabkan kematian pada jam ke 72, bakteri *A. hydrophila* pada jam ke 48 pasca injeksi (Hardi dan Pebrianto, 2012). Hasil pengamatan yang dilakukan oleh Hardi et al., (2014), bakteri *Pseudomonas* sp. (EP-01) menghasilkan 103 fraksi protein dengan berat molekul sekitar 15.21 – 113.10 kDa. Namun jumlah dan jenis protein dalam ECPs sangat bergantung dengan media tumbuh bakteri dan lamanya waktu inkubasi.

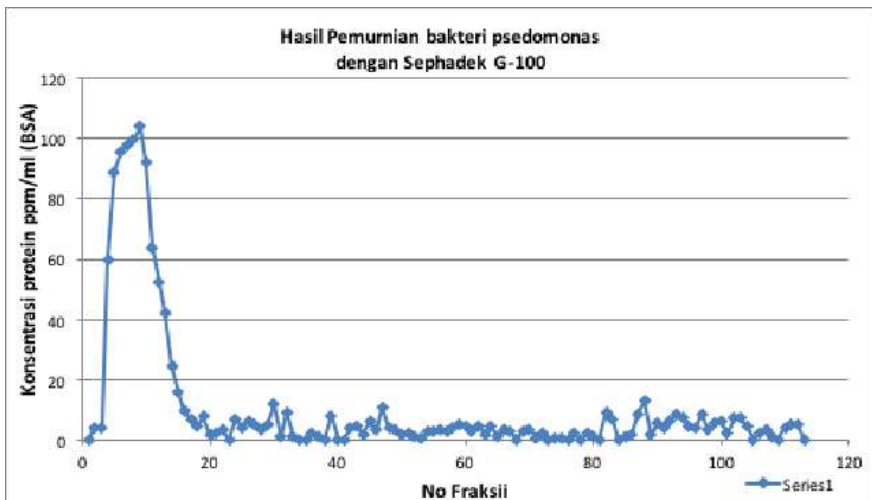
Beberapa jenis *Pseudomonas* sp. bersifat antagonistik terhadap beberapa bakteri patogen pada budidaya ikan dan udang (Vijayan et al., 2006; Mohideen et al., 2010, Rattanachuy et al., 2010). Pada penelitian ini akan dibahas mengenai kemampuan antibakterial secara in vitro dari 103 fraksi protein ECPs bakteri *Pseudomonas* sp. terhadap bakteri patogen *A. hydrophila*.

## 2. Aktivitas Antagonistik

Bakteri *Pseudomonas* sp. (EP-01) ditumbuhkan pada media TSB selama 24 jam pada suhu 30°C dan disentrifuse pada 10.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C dan disaring menggunakan filter paper ukuran 0.45 µm. Supernatant selanjutnya difraksinasi menggunakan SDS page untuk mengetahui berat molekul dari masing-masing fraksi protein. Untuk uji antagonistik, bakteri *A. hydrophila* ditumbuhkan dengan cara disebar pada media BHIA, kemudian masing-masing kertas peper ukuran diameter 6 mm ditetesi dengan fraksi protein dari bakteri *Pseudomonas* sp. dan diletakkan

di atas media BHIA yang telah ditumbuhi oleh bakteri *A. hydrophila*, dan diinkubasi selama 24 dan 48 jam pada suhu 30 °C. Zona hambat yang terbentuk diukur dan dianalisis secara diskriptif dengan membandingkan zona hambat yang terbentuk dengan zona hambat dari bakteri utuh *Pseudomonas* sp.

Bakteri *Pseudomonas* sp. (EP-01) yang ditumbuhkan pada media cair BHI dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C menghasilkan 113 fraksi dengan volume yang bervariasi secara terperinci, banyaknya hasil masing-masing fraksi dapat dilihat pada gambar 2.9 berikut :



**Gambar 2.10** Hasil pemurnian bakteri *Pseudomonas* sp.dengan sephadex G-100.

Fraksi ke 9 mengandung 103.98 ppm/ml supernatant. Hanya 11 fraksi yang volumenya lebih dari 20 ppm, sisanya hanya berkisar antara 0 – 15.80 ppm/ml supernatant. Secara keseluruhan, ECP yang diproduksi oleh bakteri *Pseudomonas* sp. mencapai 43 ppm. Hasil fraksinasi dengan menggunakan SDS Page menunjukkan bahwa berat molekul yang dihasilkan oleh *Pseudomonas* sp. pada media cair TSB dengan lama inkubasi 24 jam pada suhu 30 °C berkisar antara 15.21 – 113.10 kDa dan

ada 15 band protein yang terditeksi (Hardi et al., 2014). Hanya beberapa fraksi saja yang diketahui berat molekul protein yang terkandung yaitu fraksi ke 19 dan 30 serta fraksi ke 32 dan 39. Masing-masing berat molekul terlihat pada Tabel 2.12. berikut:

**Tabel 2.12** Hubungan antara berat molekul protein standar dengan migrasi relatif (R<sub>m</sub>) dari ECP

Sample	Run	Band	Rf	a	b	BM	BM Kd
9	4.4	1.8	0.409091	1.009	5.214	63274.29	63.27
	4.4	2.1	0.477273	1.009	5.214	54004.73	54.00
	4.4	2.4	0.545455	1.009	5.214	46093.15	46.09
	4.4	3.5	0.795455	1.009	5.214	25786.14	25.79
	4.4	3.9	0.886364	1.009	5.214	20876.57	20.88
	4.4	4.1	0.931818	1.009	5.214	18784.32	18.78
	4.4	4.5	1.022727	1.009	5.214	15207.86	15.21
19 dan 30	4.4	1.8	0.409091	1.009	5.214	63274.29	63.27
	4.4	2.1	0.477273	1.009	5.214	54004.73	54.00
32 dan 39	4.4	2.1	0.477273	1.009	5.214	54004.73	54.00

Pengujian kemampuan antagonistik ECP bakteri *Pseudomonas* sp. terhadap *A. hydrophila* dilakukan menggunakan kertas cakram dengan masa inkubasi 24 dan 48 jam, hasilnya menunjukkan bahwa ada 10 fraksi ECP yang mampu menekan pertumbuhan *A. hydrophila* dengan zona hambat lebih dari 12 mm yaitu fraksi ECP ke 10, 35, 37, 40, 57, 62, 71, 73, 84, 101. Sebanyak 5 fraksi memiliki zona hambat >14 mm dan 4 fraksi >15 mm. Hanya 2 fraksi ECP yang memiliki zona hambat >16 mm. Beberapa fraksi protein ECP dari bakteri *Pseudomonas* sp. berpeluang sebagai kandidat biokontrol untuk *A. hydrophila*. secara terperinci dan lebih jelas, hasil diameter zona hambat dapat dilihat pada Tabel 2.13.

**Tabel 2.13** Hasil uji in vitro fraksi ECPs bakteri *Pseudomonas* sp. terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* pada inkubasi 24 dan 48 jam

Fraksi Protein ke-	Diameter (mm)		Fraksi Protein ke-	Diameter (mm)	
	24 jam	48 jam		24 jam	48 jam
1	10	8	63	11	11
2	11	10	64	10	10
3	12	12	65	10	10
4	11	10	66	11	11
5	7	8	67	10	10
6	10	10	68	10	9
7	10	10	69	8	10
8	10	10	70	10	11
9	9	10	71	13	12
10	14	11	72	11	12
14	9	10	73	17	9
20	12	11	74	12	11
21	9	8	75	12	11
22	12	10	76	9	10
23	9	9	77	9	10
24	10	10	78	10	9
25	11	11	79	10	11
26	8	10	80	8	8
27	9	9	81	10	11
28	9	10	82	11	11
29	9	10	83	12	10
30	11	9	84	16	9
31	12	11	85	8	10
33	10	11	86	12	10
34	8	9	87	10	10
35	10	15	88	10	10
36	13	12	89	9	10
37	16	13	90	8	10
38	10	11	91	11	11
40	17	10	92	7	10
41	12	10	93	11	10
42	7	8	94	9	8
43	10	10	95	8	10
44	11	11	96	11	10
45	10	9	97	9	8
46	12	11	98	10	10
47	10	10	99	11	11
48	7	10	100	11	12
49	10	10	101	12	13
50	9	9	102	8	9
51	8	10	103	10	10
52	9	10	104	11	10
53	12	10	105	11	11
54	10	8	106	10	10
55	8	7	107	8	7
56	7	10	108	11	11
57	14	13	109	12	11
58	9	11	110	12	11
59	9	9	111	8	10
60	12	11	112	12	11
61	8	9	113	9	9
62	13	12	sel utuh	10.75	10.75

*Pseudomonas*

Zona hambat yang terbentuk sangat bervariasi, namun umumnya masing-masing fraksi protein membentuk zona hambat pada pertumbuhan *A. hydrophila* strain EA-01. Sebanyak 48 fraksi dari 103 fraksi atau 46.6% memiliki zona hambat lebih dari 10 mm dan hanya 27 fraksi atau 26.2% yang memiliki zona hambat lebih dari 10.75 mm, atau lebih dari zona hambat yang dibentuk oleh sel utuh bakteri *Pseudomonas* sp. terhadap *A. hydrophila*. Hal ini menunjukkan bahwa sebenarnya keberadaan bakteri *Pseudomonas* sp. sendiri merupakan faktor pembatas bagi pertumbuhan *A. hydrophila* di alam atau dalam tubuh inang. Sel utuh bakteri *Pseudomonas* sp. mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan membentuk zona hambat sebesar 10.75 mm.

**Tabel 2.14** Perbedaan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. pada beberapa media tumbuh yang berbeda

Media Tumbuh	Pertumbuhan Bakteri (CFU/ml) Pada Beberapa Media				
	TSA	TSB	BHI	BHIA	GSP
<b><i>A. hydrophila</i> (10<sup>10</sup> CFU/ml)</b>					
24	30.05	21.92	28.05		
48	33.00	130	231		
72	25.25	22.22	25.00		
<b><i>Pseudomonas</i> sp. (10<sup>10</sup> CFU/ml)</b>					
24	29.37	39.9	5.3		
48	33.33	179	181		
72	27.23	27.27	22.22		
<b>Kultur bersama</b>					
<b><i>A. hydrophila</i>(10<sup>10</sup> CFU/ml)</b>					
24					0.47
48					0.48
72					0.46
<b><i>Pseudomonas</i> sp. (10<sup>10</sup> CFU/ml)</b>					
24					0
48					0
72					0

Pada saat kultur bersama dalam beberapa media yang berbeda, pertumbuhan *A. hydrophila* mengalami penurunan jika dikultur bersama dengan bakteri *Pseudomonas* sp. dibandingkan dengan menumbuhkan bakteri secara tunggal. Zona hambat terluas dihasilkan oleh fraksi ke 40 dan 73 dari bakteri *Pseudomonas* sp., yaitu 17 mm pada jam ke 24. Sel utuh

dan Heat killed whole cell product dari beberapa strain bakteri *Pseudomonas* sp. mampu menekan pertumbuhan beberapa strain bakteri *A. hydrophila* (Das et al., 2006).

Kemampuan menekan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* ini disebabkan karena di dalam fraksi protein ECP bakteri *Pseudomonas* sp. mengandung antibiotik, bakteriokin, siderophor (Gram and Melchiorson, 1996), lysozym dan protease lainnya (Sugita et al., 1998). Sel utuh bakteri *Pseudomonas* sp. (W3) memproduksi alkaline protease didalam ekstraselular produk yang mampu menekan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit berendarang vibriosis pada udang. Komponen yang digunakan adalah supernatant dari larutan bakteri dengan dosis 0.45 µm dan 0.22 µm. Kemampuan itu disebabkan karena *Pseudomonas* sp. W3 menghasilkan enzyme proteolitik dan lysozyme (N-acetylmuramidase) dan lytic enzyme. (Rattanachuy et al., 2010). Supernatant dari bakteri *Pseudomonas* sp. I-2 mengandung bahan antibakterial berupa proteolitik, lipolytic dan amylolytic enzyme yang menekan pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* (Vijayan et al., 2006).

## H. Kesimpulan

Pembahasan terkait bakteri *Pseudomonas* sp. pada ikan nila menghasilkan beberapa kesimpulan :

1. Bakteri *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri septicemia yang menyebabkan kematian tinggi pada ikan budidaya air tawar. Gejala klinis ikan yang terinfeksi *Pseudomonas* sp. menunjukkan adanya eksophtalmia, luka dengan pendarahan berenang lemah, organ dalam berair dan tubuh berwarna kehitaman.

2. Jumlah kepadatan bakteri (intensitas) *Pseudomonas* sp. yang menyebabkan ikan nila yang berasal dari Loa Kulu Kutai Kartanegara sakit dan atau mati adalah  $10^{10}$  CFU/ml.
3. Uji patogenisitas yang dilakukan menghasilkan kesimpulan bahwa *Aeromonas* sp. menyebabkan patologi anatomi pada organ luar ikan nila seperti eksoptalmia, sirip gripis, warna tubuh pucat dan luka pada daerah infeksi, sedangkan *Pseudomonas* sp. menyebabkan patologi anatomi organ dalam lebih cepat sehingga kematian ikan juga terjadi lebih banyak dibandingkan dengan *Aeromonas* sp.
4. ECP dan ICP merupakan faktor virulensi pada bakteri *Pseudomonas* sp., karena gejala yang muncul pada ikan nila saat diinjeksi dengan ECP dan ICP sama dengan gejala yang ditemukan pada ikan nila yang diinjeksi dengan sel utuh bakteri *Pseudomonas* sp., yaitu adanya perubahan pada mata (*opacity* dan eksoptalmia baik lateral maupun bilateral), perubahan pada ikan. Perubahan pola berenang juga ditemukan yaitu ikan cenderung berenang di dasar akuarium dan nafsu makan menurun bahkan ikan tidak mau makan setelah 24 jam pasca injeksi.
5. Ikan yang diinjeksi ECP lama inkubasi 48 jam pada media TSA menunjukkan berenang whirling pada jam ke 24 pasca injeksi dan tidak terjadi pada penginjeksian dengan yang lain. Waktu terjadinya kematian antara ECP dan ICP tampak berbeda, ikan yang diinjeksi dengan ICP cenderung lebih cepat dibandingkan dengan ECP. Media tumbuh bakteri dan lama inkubasi berpengaruh terhadap toksisitas kandungan ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. bakteri yang diinkubasi 24-48 jam pada media TSA menghasilkan ECP dan ICP yang lebih toksik dibandingkan dengan saat diinkubasi lebih lama (72 jam) atau diinkubasi pada media cair.



6. Bakteri *Pseudomonas* sp. yang ditumbuhkan di media TSB lebih banyak menghasilkan protein dalam ECP dibandingkan dengan saat ditumbuhkan pada media TSA masa inkubasi 30°C merupakan suhu optimum untuk bakteri memproduksi ECP.

## I. LATIHAN SOAL

Kerjakan soal dibawah ini dengan benar dan tepat.

1. Mengapa ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. dikatakan sebagai faktor virulensi pada ikan nila ?
2. Jelaskan gejala umum yang ditimbulkan akibat infeksi bakteri *Pseudomans* sp. pada ikan nila?
3. Jelaskan perbedaan antara ekstrasellular produk dan intraselular produk bakteri?
4. Mengapa ECP bakteri *Pseudomonas* sp. lebih banyak tumbuh di media TSA ?
5. Sebutkan dan tuliskan berapa banyak jenis bakteri *Pseudomonas* sp. yang telah ditemukan ?

## J. DAFTAR PUSTAKA

- Allan, B.J., Stevenson, R.M., 1981. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. Can. J. Microbiol. 27, 1114–1122.
- Allen D, Austin B, Collen RR. 1993. Numerical taxonomy of bacterial isolate associated with a fresh water fishery. J General Microbiol 129 : 2043-2062.
- Altinok, I., S. Kayis and E. Capkin, 2006. *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. Aquaculture, 261: 850-855.

- Anderson DP, AK Siwicki. 1995. Basic hematology and serology for fish health programs. Paper presented in second symposium on diseases in Asian Aquaculture "Aquatic Animal Health and the Environment". Phuket, Thailand. 25 – 29<sup>th</sup> October 1993. 17 hal.
- Austin B, DA Austin. 2007. Bacterial fish pathogens. Fourth Edition. New York: Praxis Publishing Ltd.
- Das BK, Surya Kanta Samal, Biswa Ranjan Samantaray, Satyanarayana Sethi, Phalguni Pattnaik, Bibhudendu Kumar Mishra. 2006. Antagonistic activity of cellular components of *Pseudomonas* species against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 253:17– 24
- Denkin, S.M., Nelson, D.R., 2004. Regulation of *Vibrio anguillarum* empA metalloprotease expression and its role in virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4193–4204.
- Domenech, A., J.F. Garayzgal, P. Lawson, J.A. Garcia, M.T. Cutuli, M. Blanco, A. Gibe11o, M.A. Moreno, M.D. Collins and L. Dominguez, 1997. Winter disease outbreak in sea-bream (*sparus aurata*) associated with *Pseudomonas anguilliseptica* infection. *Aquac.*, 156: 317-326.
- Eissa Nour and E.N. Abou El-Ghiet. 2011. Efficacy of *Pseudomonas fluorescens* as Biological Control Agent against *Aeromonas hydrophila* Infection in *Oreochromis niloticus*. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 3 (6): 564-569.
- Gram, L., Melchiorsen, J., 1996. Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 589– 595.
- Hardi EH, 2012. Bacteria Levels Difference Pathogenecity *Aeromonas sp* and *Pseudomonas sp*. On Tilapia. *Proceeding The international Symposium on Human Development and Sustainable Utilization on Natural reseources*.
- Hardi EH, Pebrianto CA. 2012. Isolasi dan Uji Postulat Koch *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Sentra Budidaya Loa Kulu Kabupaten Kutai Kartanegara. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis*. Vol.16, 2:35-39.
- Hardi EH, Septiani Gina, dan Lusiastuti AM, 2014. Characteristizin of Extracelluler protein Produced by *Aeromonas hydrophila* Cultur at Different Condition. *International Conference Of Aquaculture Indonesia* 2014. ISSN 2356-0800. Hal 81-85

- Hardi EH, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2011. Toksisitas Produk Ekstraselular (ECP) *Streptococcus agalactiae* pada Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*). *Jurnal Natur Indonesia*.13.3:187-199.
- Hardi, E.H. 2012. Bacteria Levels Difference Pathogenecity *Aeromonas sp* and *Pseudomonas sp*. On Tilapia. *Proceeding The international Symposium on Human Development and Sustainable Utilization on Natural reseources in asian countries* (ISBN : 978-602-98400-1-8) Balikpapan, 9-12 Juli 2012.
- Hardi, E.H., Sukenda, Harris, E., Lusiastuti, A.M. 2011. Toksisitas Produk Ekstraselular (ECP) *Streptococcus agalactiae* pada Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*). *Jurnal Natur Indonesia*.13.3:187-199
- Harikrishnan, R., Rani, M.N., Balasundaram, C., 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221, 41–50.
- Izumi S, Yamamoto M, Suzuki K, Shimizu A, Aranishi F. 2007. Identification and detection of *Pseudomonas plecoglossicida* isolates with PCR primers targeting the *gyrB* region. *J Fish Dis*. 30(7):391-7.
- Kaper, J.B., Lockman, H., Colwell, R.R. and Joseph, S.W. 1981. *Aeromonas hydrophila*. Ecology and toxigenicity of isolates from an estuary. *Journal of Applied Bacteriology* 50:359-377
- Karunakaran, T. and B.G. Devi. 1994. Characterisation of haemolytic activity from *Aeromonas caviae*. *Epidemiol Infect.* 112:291-298.
- Kawahara, E. and S. Nomura. 1990. Lethality and immunogenicity of *Aeromonas salmonicida* extracellular products to salmonids p. 671-674 in R. Hirano and I.Hanyu (*Eds*), *Proc. Of The Second Asian Fisheries Forum*, Tokyo Japan, 17-22 April 1989.
- Khalil AH, Mansour EH. 1997. Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* in tilapia, *Tilapia nilotica*. *Microbiology* 25 : 269-273.
- Len, P.P. 1987. Mesophilic spoilage of marine fish: bay trout (*Arripis trutta*), bream (*Acanthopagrus butcheri*) and mullet (*Aldrichetta forsteri*). *Food Technology in Australia* 39:277-282.
- Marahiel, M. A., T. Stachelhaus, and H. D. Mootz. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* 97:2651–2674.

- Mastan SA. 2013. *Pseudomonas* septicemia in *Labeo rohita* (ham.) and *Cyprinus carpio* (linn.) in Andhra Pradesh—natural occurrence and artificial challenge. *Int J Pharm Pharm Sci* 5(2) : 564-568
- Mastan, S.A., Qureshi, T.A., 2001. Role of bacteria in the epizootic ulcerative syndrome (EUS) of fishes. *J. Environ. Biol.* 22, 187–192. Pridgeon, J.W., Klesius, P.H., 2011a. Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in West Alabama in 2009. *Dis. Aquat. Organ.* 94, 249–253.
- Mohideena M. M. Abdul Kader, T.Selva Mohanb, K.R. Fathima Mashroora, K.Kiruthika Lakshmic and M.I.Zahir Hussain. 2010. *Pseudomonas fluorescens* is an Effective Probiotic against Fish-Pathogenic *Vibrio* sp. *International Journal of Biological Technology* (2010):1(2):118-123.
- Murdjani, M. 2002. Identifikasi dan patologi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) [Desertasi]. Malang: Program Pasca Sarjana, Universitas Brawijaya.
- Murdjani, M. 2002. Identifikasi dan patologi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) [Desertasi]. Malang: Program Pasca Sarjana, Universitas Brawijaya.
- Nishimori E, K. Kita-Tsukamoto, H. Wakabayashi. 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 83–89.
- Noor El-Deen AE, Atta NS, Abd El-Aziz MA. 2010. Oral vaccination of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) against motile *Aeromonas septicemia*. *Nat Sci* 8 (2): 21-25.
- Norqvist, A., Norrman, B., Wolf-Watz, H., 1990. Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* 58, 3731–3736.
- Park SC, Shimamura I, Fukunaga M, Koh-Ichiro Mori, Nakai T. 2000. Isolation of Bacteriophages Specific to a Fish Pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a Candidate for Disease Control Applied And Environmental Microbiology 66, 4 :2000 1416–1422.
- Pridgeon, J.W., Klesius, P.H., 2011a. Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in West Alabama in 2009. *Dis. Aquat. Organ.* 94, 249–253.

- Pridgeon, J.W., Klesius, P.H., 2011b. Virulence of *Aeromonas hydrophila* in the presence or absence of extracellular products to channel catfish fingerlings. *Dis. Aquat. Organ.* 95, 209–215.
- Rattanachuy P., Kantachote D.,Tantirungkji M., Nitoda T.,Kanzaki H,. 2009. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by exstraceluller compounds from a proteolytic bacterium *Pseudomonas* sp W3. Vol.13 No.01, Issue January 15, 2009.
- Rattanachuy Pattamarat, Duangporn Kantachote, Manee Tantirungkij, Teruhiko Nitoda, Hiroshi Kanzaki. 2010. Inhibition of shrimp patogenic vibrios by extracellular compounds from a proteolytic bacterium *Pseudomonas* sp. W3. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.13 No.1.
- Saleh FM, Azza MM, El-Rahman A. 2008. Contribution on Pseudomonas septicemia caused by Pseudomonas anguilliseptica cultured Oreochromus niloticus. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaclture 2008.
- Sekar T, Santiago TC, Vijayan KK, Alavandi SV, Stalin Raj V, Rajan JJS, Sanjuktha M, Kalaimani N. 2008. Involvement of *Enterobacter cloacae* in the mortality of the fish, *Mugil capito*. *Lett Appl Microbiol* 46: 667-672.
- Sirirat T, Intuseth J, Chanphong J, Thompson K, Chinabut S, Adams A. 1999. Characterization of Aeromonas hydrophila extracellular products with reference to toxicity, virulence, protein profiles and antigenicity. *Asian Fish Sci* 12 : 371–379.
- SNI. 2009. Standar Nasional Indonesia: Metode identifikasi bakteri pada ikan secara konvensional bagian 3: *Streptococcus iniae* dan *Streptococcus agalactiae*. Badan Standardisasi Nasional 7545 (3): 16. [Indonesian]
- Stachelhaus, T., H. D. Mootz, and M. A. Marahiel. 1999. The specificity- conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide syntheta- ses. *Chem. Biol.* 6:493–505.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., Deguchi, Y., 1998. Production of the antibakterial substance by Bacillus sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 165, 269– 280.
- Suprpto H, T Nakai, K Muroga. 1995. Toxicity of Extracellular Product and Intracellular Components of *Edwardsiella tarda* in Japanese Eel and Flounder. *J. Aquat. Anim. Health*, 7 (4): 292-297.
- Valiente, E., Lee, C.T., Hor, L.I., Fouz, B., Amaro, C., 2008. Role of the metalloprotease Vvp and the virulence plasmid pR99 of *Vibrio vulnificus*

serovar E in surface colonization and fish virulence. *Environ. Microbiol.* 10, 328–338.

- Vallet-Gely I, Novikov A, Augusto L, Liehl P, Gerard Bolbach, P'echy-Tarr M, Cosson P, Keel C, Caroff M, Lemaitre B. 2010. Association of Hemolytic Activity of *Pseudomonas entomophila*, a Versatile Soil Bacterium, with Cyclic Lipopeptide Production. *Applied and Environmental Microbiology* 76,3: 910–921
- Vijayan, K.K., I.S. Bright Singh, N.S. Jayaprakash, S.V. Alavandi, S. Somnath Pai, R. Preetha, J.J.S. Rajan, T.C. Santiago. 2006. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. *Aquaculture* 251 : 192–200.
- Wakabayashi H, Egusa S. 1972. Characterization of *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond cultured eel bull (*Anguilla japonica*). *Japan Soc Fish* 38 : 577-587.
- Wei-wei Zhang, Yong-hua Hua, Hua-lei Wang, Li Sun. 2009. Identification and characterization of a virulence-associated protease from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. *Veterinary Microbiology*, 139:183–188.
- Yu, H.B., Kaur, R., Lim, S., Wang, H.X., Leung, K.Y., 2006. Characterization of extracellular proteins of *Aeromonas hydrophila*-AH-1. *Proteom. Clin. Appl.* 7, 436–449.



Dr. Esti Handayani Hardi, S.Pi, M.Si, dilahirkan di Lampung 4 Januari 1980 merupakan staff dosen di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman Samarinda Kalimantan Timur. Penulis aktif melakukan penelitian di bidang kesehatan ikan khususnya ikan-ikan budidaya, selain menghasilkan beberapa publikasi yang telah diterbitkan di Jurnal Internasional, penulis juga telah menghasilkan produk antibakterial & imunostimulan untuk ikan air tawar (BIOIMUN, 3 in 1 BIOIMUN) yang efektif untuk ikan budidaya. Ini merupakan buku ke3 yang telah ditulis, berisi tentang diskripsi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas fluorescent* yang menginfeksi ikan nila. Dalam buku ini dikupas tuntas mulai dari karakteristik, patogenisitas, faktor virulensi, mekanisme infeksi kedua bakteri pada inang, serta bagaimana upaya pengendaliannya. Buku ini merupakan buku pertama di Indonesia yang membahas secara detail tentang kedua bakteri. Informasi yang disajikan berasal dari hasil penelitian penulis yang terbaru sehingga sangat bermanfaat untuk para penggiat akuakultur di Indonesia.

Buku ini secara lengkap membahas secara tuntas identifikasi dan karakteristik bakteri *Aeromonas hydrophila* yang bersumber dari penelitian penulis maupun review jurnal internasional. Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri oportunistis yang selalu dijumpai di media perairan di Indonesia dan mempunyai kemampuan berkomunikasi antar bakteri melalui sistem quorum sensing sehingga sulit dikendalikan. Karakteristik dan sifat virulensinya perlu diketahui agar dapat menyusun langkah penanggulangan yang tepat. Buku ini sangat direkomendasikan untuk mahasiswa, peneliti, pengambil kebijakan untuk dapat memahami potensi sekaligus kelemahan *A. hydrophila*.

*Dr. Angela Mariana*



Penerbit  
Mulawarman University PRESS  
Gedung LPPM Universitas Mulawarman  
Kampus Gunung Kelua, Jl. Krayan, Samarinda  
Provinsi Kalimantan Timur, INDONESIA 75123  
Telp/Fax: (0541) 747432, EMAIL: [mup@lppm.unmul.ac.id](mailto:mup@lppm.unmul.ac.id)

ISBN 978-602-6634-57-7

