

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/btla>

## KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER *Aeromonas hydrophila* HASIL POSTULAT KOCH PADA IKAN NILA *Oreochromis niloticus*

Setiadi dan Edi Farid Wadjdy

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan

Jl. Sempur No. 1, Bogor 16129

E-mail: [pelnisbpbpat@yahoo.com](mailto:pelnisbpbpat@yahoo.com)

### ABSTRAK

Penyakit *motil aeromonas septicemia* (MAS) disebabkan oleh infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Penyakit MAS bersifat akut, menginfeksi semua umur jenis ikan air tawar, dapat mengakibatkan kematian hingga 100%, dan sering menimbulkan kerugian yang signifikan. Karakterisasi dan identifikasi merupakan salah satu cara untuk menentukan jenis bakteri yang menginfeksi. Pendeteksian menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi penyakit virus maupun bakteri. Tujuan dari kegiatan ini adalah karakterisasi dan identifikasi molekuler bakteri *Aeromonas hydrophila* hasil postulat koch. Hasil yang diperoleh adalah teridentifikasinya bakteri *Aeromonas hydrophila* yang mempunyai empat gen virulen yaitu *aerolysin*, *serolysin*, *nuclease*, dan *lipase*.

**KATA KUNCI:** postulat koch; *Aeromonas hydrophila*; identifikasi molekuler

### PENDAHULUAN

Keberhasilan budidaya ikan terkait dengan pemeliharaan kesehatan lingkungan dan penyakit ikan yang disebabkan oleh bakteri. Salah satu bakteri yang umum dijumpai dalam ekosistem perairan dan berperan sebagai *microbial flora* bagi hewan air pada kondisi lingkungan stabil, adalah bakteri *Aeromonas hydrophila*. Ikan yang terinfeksi oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* pada umumnya mengalami pendarahan yang meluas pada permukaan kulit (*Haemorrhagic septicemia*), yang diikuti timbulnya luka terbuka (*ulcer*) pada permukaan tubuh atau hingga ke dalam jaringan. *Motile aeromonas septicemia* (MAS) disebabkan oleh infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*, merupakan penyakit bakterial yang bersifat akut, menginfeksi semua umur dan jenis ikan air tawar, dapat mengakibatkan kematian hingga 100%, dan sering menimbulkan kerugian yang signifikan (Kamelia & Laila, 2009 dalam Setiadi & Wadjdy, 2018). Postulat koch dilakukan untuk membuktikan bahwa isolat bakteri tersebut masih patogen pada ikan. Jawetz *et al.* (1996) dalam Mangunwardoyo *et al.* (2010) menyatakan bahwa untuk mengetahui penyebab utama suatu penyakit perlu dilakukan pengujian postulat koch, ikan uji harus menunjukkan gejala klinis yang sama dengan ikan yang sakit. Kegiatan deteksi penyakit pada ikan saat ini dengan *polymerase chain reaction* (PCR) telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi penyakit virus maupun bakteri. Teknik ini lebih cepat dan akurat dibandingkan metode

konvensional seperti uji karakteristik biokimia. Sebelum dilakukan uji PCR ada beberapa tahapan yang harus dilakukan seperti: persiapan sampel, ekstraksi DNA, pengukuran konsentrasi DNA, pencampuran *master mix*, dan amplifikasi PCR. Proses ekstraksi pada dasarnya adalah untuk membebaskan DNA dari masa sel dan komponen-komponen lain di dalam sel, umumnya ekstraksi untuk mengisolasi DNA (Gardena & Koesharyani, 2011). Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk karakterisasi dan identifikasi molekuler bakteri *Aeromonas hydrophila* hasil postulat koch menggunakan metode PCR.

### BAHAN DAN METODE

#### Waktu dan Tempat

Kegiatan ini dilakukan di Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan, Depok yang berada di bawah Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan Bogor.

#### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan antara lain: bakteri *Aeromonas hydrophila* isolat AHL0905-2, ikan nila, media *tryptic soy agar* (TSA), *tryptic soy broth* (TSB), *phosphat buffer saline* (PBS), *primer 16S rDNA*, *aerolysin*, *serolysin*, *nuclease*, *lipase*, *master mix*, *RNAse free water*, ddH<sub>2</sub>O, *agarose*, TAE buffer 1x, DNA marker (DNA *ladder*) 100 bp, *ethidium bromide*, akuades, *ethanol* 70%, mikrotube (1,5 mL dan 0,2 mL),

mikrotips (10 µL, 100 µL, dan 1.000 µL), *gloves*, dan masker. Sedangkan alat yang digunakan terdiri atas *laminar flow*, *incubator*, bak plastik, aerator, *dissecting set*, *centrifuge*, *thermomixer*, *microcentrifuge*, *micropipet*, *nano drop*, *thermal cycler*, *electrophoresis*, *gel doc*, *refrigerator*, dan *freezer*.

## Metode

### Penyiapan Isolat Bakteri

Bakteri yang digunakan untuk uji postulat koch adalah *Aeromonas hydrophila* isolat AHL0905-2, bakteri tersebut merupakan koleksi BPPBAT Bogor. Bakteri diambil sebanyak 0,1 mL dari stok penyimpanan media cair + gliserol yang disimpan di *refrigerator* -20°C untuk selanjutnya dikultur pada media TSB 10 mL dan diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 28°C. Proses Penyiapan isolasi bakteri tersaji pada Gambar 1. Inokulan yang telah tumbuh diambil 1 mL ditanam kembali pada media TSB 9 mL diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam, setelah inkubasi 24 jam bakteri tersebut selanjutnya disuntikkan pada ikan nila sebagai uji postulat koch.

### Postulat Koch

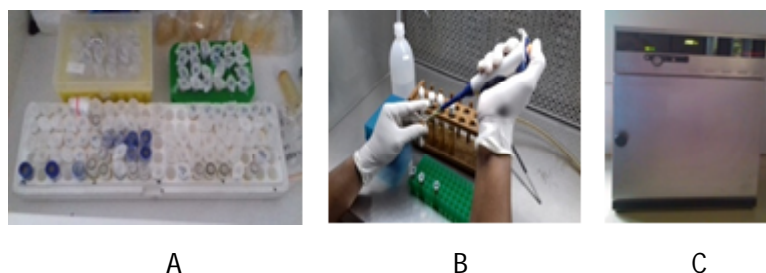
Postulat koch dilakukan dengan cara menyuntikkan 0,1 mL inokulan pada ikan uji, selanjutnya ikan tersebut dipelihara pada bak pemeliharaan dan dilakukan pengamatan sampai terdapat gejala klinis (Gambar 2). Reisolasi dilakukan terhadap individu ikan uji yang menunjukkan gejala klinis untuk diambil bakterinya. Beberapa organ target isolasi bakteri di antaranya mata, hati, ginjal, otot, dan otak. Pada kegiatan ini bakteri *Aeromonas hydrophila* diisolasi pada bagian otot, setelah dilakukan isolasi dan didapatkan bakterinya, selanjutnya isolat bakteri tersebut dilakukan pemurnian yaitu dengan cara melihat bentuk, ukuran, dan warna koloni; dari yang tumbuh pada hasil goresan, ditanam kembali pada media TSA yang baru, diinkubasi kembali dalam inkubator selama sekitar 24 jam pada suhu 28°C, dan

dilakukan karakterisasi. Karakterisasi merupakan tahapan awal yang dilakukan dalam proses identifikasi bakteri, tahap ini biasanya dapat menentukan jenis bakteri sampai tingkat genus (Wahyudi *et al.*, 2012).

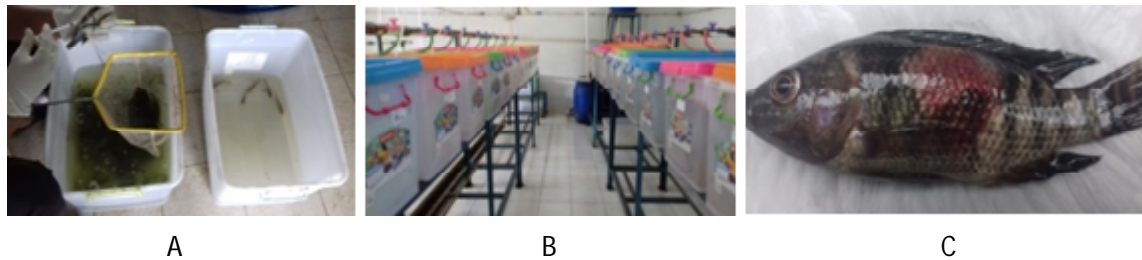
### Karakterisasi Bakteri

Karakterisasi bakteri meliputi pengujian pewarnaan Gram, motilitas, oksidase, katalase, oksidatif-fermentatif, dan uji RS. Pembuatan preparat pewarnaan Gram dilakukan dengan cara meletakkan isolat bakteri pada gelas objek yang sudah ditetesi dengan PBS steril kemudian diulas merata pada permukaannya dan dikeringanginkan. Setelah kering dilakukan pewarnaan Gram, dengan meneteskan empat reagen yang berbeda. Pertama ditetaskan larutan kristal violet pada preparat sampai merata, didiamkan selama satu menit, lalu dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Pewarnaan kedua, ditetaskan larutan lugol pada preparat sampai merata, didiamkan selama satu menit, lalu dibilas menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian yang ketiga, ditetaskan larutan alkohol aseton pada preparat sampai merata dan didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas preparat menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian yang keempat, ditetaskan larutan safranin pada preparat sampai merata, didiamkan selama dua menit, lalu dibilas preparat menggunakan air mengalir dan dikeringkan (Gambar 3). Hasil karekterisasi selanjutnya diamati di bawah mikroskop untuk mengetahui jenis Gram dan morfologi bentuk sel dari bakteri.

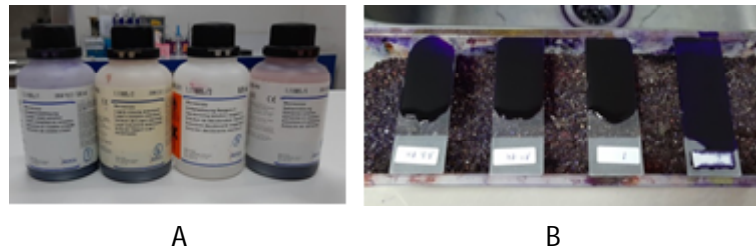
Uji selanjutnya adalah melakukan pengujian katalase dan oksidase, uji oksidase dilakukan dengan menggunakan kertas oksidase strips dengan cara mengambil koloni bakteri menggunakan jarum ose steril lalu diletakkan di atas kertas oksidase strips dan diamati perubahannya. Jika bakteri di atas kertas oksidase strips berubah warna menjadi biru maka hasilnya (+), jika bakteri tidak berubah warna maka hasilnya (-). Uji katalase dilakukan menggunakan larutan H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> yang ditetaskan di atas gelas objek,



Gambar 1. Proses penyiapan bakteri; (A) stok bakteri pada penyimpanan media TSB + glicerol, (B) proses kultur bakteri, (C) proses inkubasi.



Gambar 2. Tahapan postulat koch; (A) proses penyuntikan ikan uji, (B) bak pemeliharaan ikan uji, (C) ikan terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.



Gambar 3. Proses karakterisasi bakteri; (A) reagen pewarnaan Gram, (B) proses pewarnaan Gram.

kemudian koloni bakteri diambil menggunakan jarum ose dan diletakkan dalam tetesan larutan  $H_2O_3$  lalu diamati. Apabila dalam tetesan tersebut terdapat gelembung, maka hasil uji katalase (+), jika dalam tetesan tersebut tidak ada gelembung maka hasilnya (-).

Selanjutnya dilakukan penanaman pada media RS, O/F, dan SIM. Penanaman bakteri pada media RS menggunakan jarum ose steril dengan mengambil isolat bakteri lalu ditanamkan pada media RS dan diberi label ditutup menggunakan parafilm. Penanaman pada media uji O/F ditanam pada dua media, yaitu media tanpa parafin dan media yang diberi parafin, tujuannya untuk mencegah oksigen masuk ke dalam tabung. Penanaman pada media SIM dilakukan dengan menggunakan jarum ose lurus dengan cara mengambil isolat kemudian ditusukkan pada media tersebut. Setelah selesai penanaman ujung tabung reaksi ditutup dengan parafilm supaya tidak ada bakteri kontaminan yang masuk, kemudian diberi label, diinkubasi dalam inkubator selama sekitar 24 jam pada suhu  $28^{\circ}C$ , kemudian pengamatan hasil identifikasi pada uji RS dilakukan dengan membaca hasil isolat bakteri yang tumbuh di media RS jika berwarna kuning maka hasilnya positif (+) merupakan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Jika isolat bakteri yang tumbuh tidak berwarna kuning maka hasilnya negatif (-) bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Hasil uji O/F yaitu dengan melihat perubahan warna pada media. Apabila media O/F yang tidak diberi parafin berubah warna menjadi kuning dan bagian

permukaannya menjadi biru keunguan maka oksidatif positif (+), apabila media tidak berubah warna maka oksidatif negatif (-). Sedangkan apabila pada media O/F yang diberi parafin juga mengalami perubahan warna menjadi kuning maka hasilnya fermentatif positif (+), dan apabila media tidak berubah warna maka hasilnya fermentatif negatif (-).

#### Ekstraksi DNA Bakteri

Ekstraksi DNA bakteri dilakukan dengan cara metode pemanasan, yaitu sebagai berikut: mengambil isolat bakteri sebanyak 2 ose lalu dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 mL; kemudian ditambahkan 400  $\mu$ L RNA *sefree water steril*. Lalu dipanaskan pada suhu  $98^{\circ}C$  selama 10 menit sambil di-*shaker* pada kecepatan 300 rpm, dengan menggunakan alat *thermomixer* (Gambar 4).



Gambar 4. Proses pemanasan bakteri.

Selama pemanasan berlangsung, setiap tiga menit mikrotube di-*vortex* untuk membantu menghancurkan dinding sel bakteri. Setelah proses pemanasan selesai kemudian mikrotube disentrifus pada 12.000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan supernatan DNA

bakteri, supernatan dipindahkan ke mikrotube baru (Gambar 5).



Gambar 5. Proses sentrifugasi bakteri.

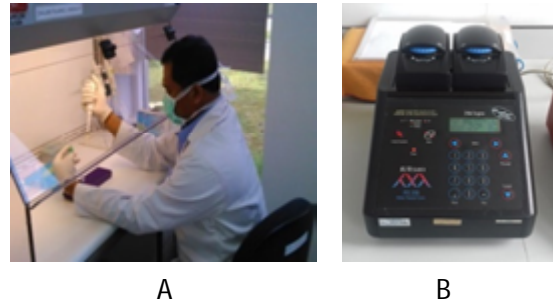
Setelah proses ekstraksi selesai selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dengan menggunakan nano drop (Gambar 6). *Software* dibuka, kemudian dipilih *nucleid acid*, sebelum dilakukan pengukuran dilakukan kalibrasi menggunakan blanko yaitu ddH<sub>2</sub>O sebanyak 1 µL dimasukkan ke alat nano drop, ditutup klik *blank* lalu klik *measure*. Selanjutnya sampel DNA sebanyak 1 µL dimasukkan dan ditutup lalu klik *measure*, konsentrasi, dan kemurnian DNA dilihat pada perangkat komputer, DNA diukur dengan menggunakan absorbansi pada rasio 260 nm dan 280 nm.



Gambar 6. Proses pengukuran konsentrasi DNA.

### Amplifikasi DNA

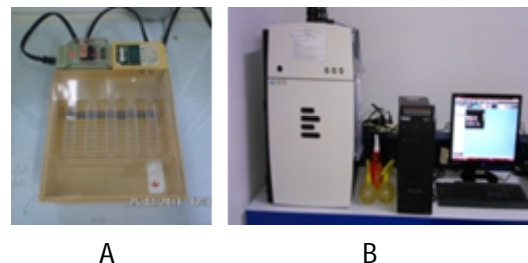
DNA dari isolat *Aeromonas hydrophila* setelah diekstraksi dan diketahui konsentrasinya, dilakukan pengujian menggunakan PCR. Komposisi reaksi PCR menggunakan *GoTaq-Green Master Mix 2x*, 12,5 µL; primer *forward* dan *reverse* 10 pMol 1 µL, *nuclease free water* 8,5 µL; dan *DNA template* 2 µL; master mix PCR dan *DNA template* digabung dalam tube 0,2 mL; selanjutnya dilakukan uji PCR pada mesin *Thermocycler* (Gambar 7). Program PCR untuk amplifikasi DNA sebagai berikut denaturasi awal suhu 94°C selama dua menit, kemudian dilakukan denaturasi 95°C selama satu menit, *annealing* pada suhu 55°C selama satu menit dan ekstensi pada suhu 72°C selama satu menit, sebanyak 29 siklus, ekstensi akhir 72°C selama lima menit, suhu akhir 4°C.



Gambar 7. Proses amplifikasi DNA; A) pencampuran mastermix, B) amplifikasi mesin PCR.

### Elektroforesis dan Dokumentasi

Produk hasil PCR selanjutnya dilakukan elektroforesis pada gel agarose 1,5% adapun cara pembuatan gel agarose adalah sebagai berikut: agarose 1,5 g dilarutkan ke dalam TAE buffer 1x 100 mL, dipanaskan dalam *microwave*. Agarose kemudian dituang ke dalam cetakan elektroforesis yang telah dipasang *comb*. Setelah agarose mengeras, kemudian gel dimasukkan ke dalam elektroforesis yang telah diisi dengan TAE 1x sebagai *buffer* elektroforesis. Sumur-1 diisi dengan 3 µL penanda molekuler (marker) 1 kb, sumur-2, 3, dan seterusnya dimasukkan 10 iL produk PCR. Elektroforesis dijalankan dengan voltase 110 volt selama 25 menit. Pewarnaan DNA dengan melakukan perendaman gel agarose ke dalam larutan *ethidium bromide* selama 15 menit dan hasilnya didokumentasikan dengan *gel doc* (Gambar 8).



Gambar 8. Proses elektroforesis; (A) running gel agarose, (B) dokumentasi hasil *running* gel agarose.

### HASIL DAN BAHASAN

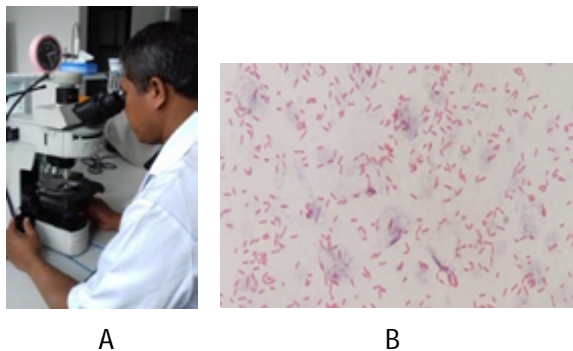
Identifikasi bakteri merupakan serangkaian proses uji yang dilakukan dengan metode membandingkan hasil uji dengan karakteristik dan sifat jenis tertentu. Beberapa uji yang dilakukan untuk identifikasi isolat bakteri yaitu mengamati morfologi koloni bakteri, pewarnaan Gram, uji motilitas, oksidatif/fermentatif test, uji katalase, dan uji oksidase. Identifikasi bakteri dilakukan pada bakteri hasil reisolasi yang berasal dari ikan yang mengalami gejala setelah diinjeksikan dengan isolat bakteri dan reisolasi sendiri dilakukan

bertujuan untuk mengonfirmasi bakteri yang diinjeksikan. Hasil karakterisasi uji biokimia isolat bakteri dari ikan hasil uji postulat koch tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil karakterisasi uji-biokimia isolat bakteri *Aeromonas hydrophila*

Uji	Karakter
Pewarnaan Gram	Negatif
Oksidase	Positif
Katalase	Positif
RS	Kuning
SIM	Motil
O/F	Fermentatif

Pengujian warna Gram dan karakterisasi biokimia isolat bakteri uji dilakukan dengan mengetahui respons bakteri terhadap larutan pewarna yang diberikan dan beberapa uji biokimia yang dilakukan. Pengamatan secara mikroskopis pada pewarnaan menunjukkan morfologi bakteri berbentuk batang dan berwarna merah yang merupakan ciri bakteri Gram negatif (Gambar 9). Menurut Wahjuningrum *et al.* (2013), bahwa morfologi koloni dari *Aeromonas hydrophila* yaitu berwarna krem, elevasi cembung, dan tepiannya haus, sedangkan morfologi selnya berbentuk batang dan bersifat Gram negatif.



Gambar 9. Hasil karakterisasi; (A) proses pengamatan dengan mikroskop, (B) bakteri Gram negatif yang teramati.

Pengujian media spesifik *rimler-shotts* (RS) menunjukkan bakteri yang tumbuh di media RS merupakan tipikal koloni bakteri *Aeromonas hydrophila* yaitu berwarna kuning. Hasil penelitian Tulung *et al.* (2014) menyatakan terdapat pertumbuhan bakteri dengan ciri koloni warna kuning yang menyatakan positif *A. hydrophila* terutama pada goresan yang dilakukan pada pengujian media RS.

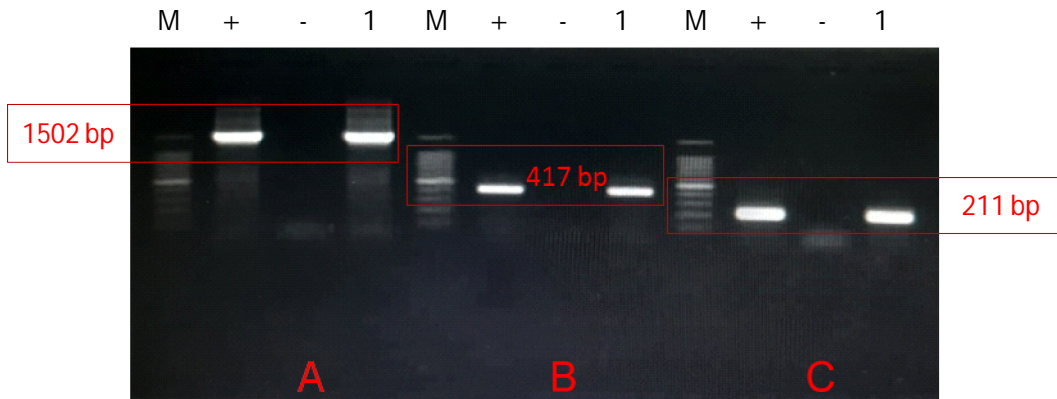
Pada uji oksidase dan katalase berturut-turut menunjukkan hasil positif, sedangkan pengujian motilitas yang ditanam pada media SIM menunjukkan hasil motil. Hasil uji oksidatif/fermentatif dengan parafin menunjukkan terdapat perubahan warna pada media dari warna hijau menjadi warna kuning. Hal ini berarti bakteri mampu memanfaatkan karbohidrat pada kondisi anaerob melalui proses fermentasi menjadi oksidasi dan fermentatif (SNI 2015).

Berdasarkan hasil identifikasi bakteri yang berasal dari reisolasi dari bagian otot memiliki karakteristik bakteri *Aeromonas hydrophila*. Hasil ini sesuai dengan penelitian Muslikha *et al.* (2016) bahwa salah satu bakteri *Aeromonas hydrophila* memiliki sifat Gram negatif, fermentatif, berbentuk basil, motilitas positif, katalase, dan oksidase positif setelah hasil karakterisasi bakteri dilakukan dan hasilnya mengarah pada bakteri *Aeromonas hydrophila*, maka untuk memastikan bakteri tersebut adalah bakteri *Aeromonas hydrophila* dilakukan uji PCR dengan beberapa primer spesifik *Aeromonas hydrophila* (Tabel 2).

Tabel 2. Urutan primer dan basa sekuens PCR gen target

Primer	Sekuens (5'---> 3')	Ukuran bp
16S-rDNA-F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	1.502
16S-rDNA-R	GGTTACCTTGTTACGACTT	
Aero-F	GAGCGAGAAGGTGACCACCAAGAAC	417
Aero-R	TTCCAGTCCCACCACTTCACTTCAC	
Ser-F	ACGGAGTGCCTTCTTCTACTCCAG	211
Ser-R	CCGTTTCATCACACCGTTGTAGTCG	
Nuc-F	CAGGATCTGAACCGCCTCTATCAGG	504
Nuc-R	GTCCAAGCTTCGAACAGTTTACGC	
Lip-F	GACCCCTACCTGAACCTGAGCTAC	155
Lip-R	AGTGACCCAGGAAGTGAC CTTGAG	

Amplifikasi DNA gen *16S rDNA*, *aerolysin*, dan *serolysin* membuktikan isolat bakteri yang direisolasi merupakan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Hal ini dapat dilihat dengan terdeteksinya gen *16S-rDNA*, *aerolysin*, dan *serolysin* pada isolat bakteri tersebut (Gambar 10). Proses visualisasi dilakukan pada elektroforesis agarosa 1,5% dengan menggunakan penanda DNA ladder 1 kb. Isolat bakteri yang terdeteksi memiliki gen *16S-rDNA*, *aerolysin*, dan *serolysin* ditunjukkan dengan pita amplikon yang jelas dan tebal dengan panjang amplikon 1.502, 417, dan 211 bp.

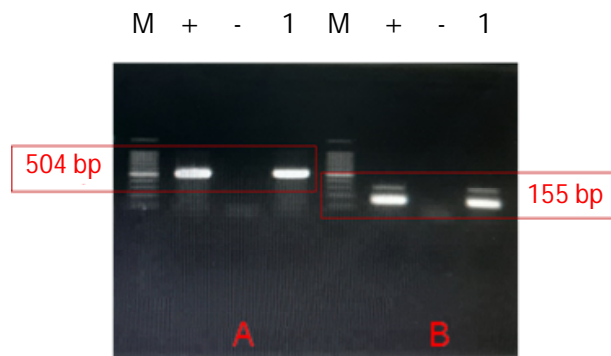


Gambar 10. Visualisasi hasil amplifikasi gen virulen *Aeromonas hydrophila*; (A) primer 16S rDNA, (B) primer *aerolysin*, (C) primer *serolysin*. M = marker, (+) kontrol positif, (-) kontrol negatif, (1) sampel isolat bakteri.

Gen 16S rDNA merupakan gen *conserved* dari semua bakteri, yaitu gen yang berperan penting untuk kelangsungan hidup bakteri dalam sintesis protein (Clarridge, 2004). Gen *aerolysin* merupakan gen virulensi yang dimiliki bakteri *Aeromonas hydrophila* yang bertanggung jawab dalam memproduksi toksin *aerolysin* penyebab *motile aeromonas septicemia* (MAS). Kehadiran gen *aerolysin* ini merupakan indikasi kuat virulensi patogen dari *Aeromonas hydrophila* (Heuzenroeder *et al.*, 1999). Sama halnya dengan gen *aerolysin*, keberadaan gen *serolysin* juga mengidentifikasi bahwa isolat tersebut merupakan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Selain gen virulen *aerolysin* dan *serolysin*, bakteri *Aeromonas hydrophila* juga mengandung eksoenzim yang dikode oleh gen *lipase*, *nuclease*, dan *serin protease*. Menurut Nam & Joh (2007), bahwa bakteri *Aeromonas hydrophila* memiliki gen virulen lainnya yaitu *nuclease*, *aerolysin*, *serin protease*, dan *lipase*. Visualisasi hasil amplifikasi DNA gen *nuclease* dan *lipase* dari isolat bakteri yang diuji menunjukkan bahwa isolat tersebut positif bakteri *Aeromonas hydrophila* ditandai dengan munculnya pita DNA pada panjang amplicon 504 bp dan 155 bp (Gambar 11).

*Nuclease* belum dikonfirmasi dalam hal hubungannya dengan patogenitas, tetapi beberapa laporan menunjukkan bahwa *nuclease* berperan dalam pengembangan infeksi inang, sedangkan *lipase* diproduksi oleh berbagai bakteri patogen dan fosfolipase C adalah penentu utama patogenitas pada banyak bakteri Gram negatif (Pomberton *et al.*, 1997). Berdasarkan hasil identifikasi secara molekuler menunjukkan bahwa isolat bakteri hasil postulat Koch adalah bakteri *Aeromonas hydrophila* yang mempunyai empat gen virulen yaitu *aerolysin*, *serolysin*, *nuclease*, dan *lipase*.



Gambar 11. Visualisasi hasil amplifikasi gen virulen *Aeromonas hydrophila*; (A) primer *nuclease*, (B) primer *lipase*. M = marker, (+) kontrol positif, (-) kontrol negatif, (1) sampel isolat bakteri.

## KESIMPULAN

Isolat bakteri hasil postulat Koch teridentifikasi sebagai bakteri *Aeromonas hydrophila* dan mempunyai karakter berupa empat buah gen virulen yaitu *aerolysin*, *serolysin*, *nuclease*, dan *lipase*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Septyan Andriyanto, M.Si. selaku kepala Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan Depok, Ibu Dr. drh. Angela Mariana Lusiastuti, M.Si. sebagai ketua peneliti, serta teman-teman teknisi yang telah memberikan dukungan dalam penulisan ini.

## DAFTAR ACUAN

Clarridge, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *J. Clin. Microbiol.*, 17(4), 840-62.

- Gardenia, L. & Koesharyani, I. (2011). Metode isolasi *deoxyribo nucleic acid* bakteri dari organ ikan nila (*Oreochromis niloticus*) untuk diagnosa *Streptococciosis* dengan teknik *polymerase chain reaction*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 6(3), 469-477.
- Heuzenroeder, Murray, M.W., Dalcin, C.J., & Barton, R.M.M. (1999). Molecular basis of benign colonisation of *Salmonella sofia* in chickens. Barton (UK): Rural Industries Research and Development Corporation.
- Mangunwardoyo, W., Ismayasari, R., & Riani, E. (2010). Uji patogenitas dan virulensi *Aeromonas hydrophila* Stainer pada ikan nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) melalui postulat koch. *Jurnal Riset Akuakultur*, 5(2), 245-255.
- Nam, I.-Y. & Joh, K. (2007). Rapid detection of virulence factor of I isolate from a trout farm by hexaplex-PCR. *Journal of Microbiology*, 45(4), 297-304.
- Pomberton, J.M., Kidd, S.P., & Schmidt, R.R. (1997). Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Letters*, 152, 1-10.
- Setiadi & Wadjdy, E.F. (2018). Teknik preparasi vaksin *Aeromonas hydrophila* dan *Streptococcus agalactiae* melalui metode kering beku (freeze dry). *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 16(1):51-56.
- Standar Nasional Indonesia [SNI]. (2015). Metode identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* secara biokimia. Kepala Badan Standarisasi Nasional 7303.1. Jakarta (ID): SNI.
- Wahyudi, A., Priadi, B., Mikdarullah, & Wadjdy, E.F. (2012). Teknik isolasi karakterisasi, dan identifikasi bakteri *Mycobacterium* spp. Penyebab *fish-tb* pada ikan gurame (*Osphoronemus gourami* Lac). *Bulletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 10(1), 49-53.
- Wahjuningrum, D., Retno, A., & Mia, S. (2013). Pencegahan infeksi *Aeromonas hydrophila* pada benih ikan lele *Clarias* spp. yang berumur 11 hari menggunakan bawang putih *Allium sativum* dan meniran *Phyllanthus niruri*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 12(1), 94-104.