

TEKNIK ISOLASI, KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI *Mycobacterium* spp. PENYEBAB FISH-TB PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy* Lac)

Ahmad Wahyudi, Bambang Priadi, Mikdarullah, dan Edy Farid W.

Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar

ABSTRAK

Kegiatan ini bertujuan untuk mendapatkan informasi mengenai penyebab *Fish-TB* (Tuberculosis) pada ikan gurame (*Osphronemus gouramy* Lac.). Teknik isolasi, karakterisasi, dan identifikasi merupakan salah satu cara untuk menentukan jenis bakteri yang menginfeksi. Isolasi dilakukan dari ikan yang secara visual menunjukkan gejala *Mycobacteriosis*. Tahap karakterisasi dilakukan dengan metode konvensional yang terdiri atas 7 (tujuh) parameter uji biokimia, sedangkan tahap identifikasi terdiri atas 14 (empat belas) uji biokimia. *Postulat Koch* (PK) dilakukan untuk membuktikan bahwa bakteri tersebut bersifat patogen. Hasil yang diperoleh dari kegiatan ini menunjukkan bahwa penyebab *Fish-TB* pada ikan gurame adalah bakteri *Mycobacterium fortuitum*.

KATA KUNCI: *fish-TB*, identifikasi, ikan gurame (*Osphronemus gouramy* Lac)

PENDAHULUAN

Gurame (*Osphronemus gouramy*) merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang telah lama dikembangkan sebagai komoditas budidaya. Keuntungan biologis ikan gurame bagi para pembudidaya antara lain; dapat dipijahkan secara alami, mudah dipelihara, dan hidup optimal pada perairan/kolam dengan kadar oksigen minimum (Sigantang & Sarwono, 2005).

Permintaan akan ikan gurame setiap tahunnya terus mengalami peningkatan, khususnya di daerah Jawa Barat dan DKI Jakarta. Cita rasa dan aroma yang khas serta tekstur daging yang kompak menjadikan ikan gurame banyak digemari masyarakat. Harga ikan gurame di pasaran mempunyai nilai ekonomi relatif lebih tinggi dibanding komoditas ikan air tawar lain sehingga banyak petani ikan yang tertarik untuk membudidayakannya (Susanto, 1999).

Program ekstensifikasi dan intensifikasi budidaya ikan saat ini menyebabkan peningkatan kapasitas hasil produksi. Budidaya secara intensif dicirikan dengan padat tebar yang tinggi serta suplai pakan yang optimum.

Faktor tersebut memicu terjadinya penurunan perairan kolam akibat sisa pakan dan metabolisme ikan sehingga mengganggu jalannya keseimbangan biologis perairan kolam budidaya. Kondisi lingkungan seperti ini menjadi faktor penyebar (*spreading factor*) timbulnya gangguan penyakit infeksius yang akan menurunkan kualitas dan kuantitas hasil produksi budidaya. Penyakit infeksius pada umumnya disebabkan oleh golongan parasitik, jamur, bakteri, dan virus (Zawet *et al.*, 1995).

Fish-TB (Tuberculosis) merupakan penyakit bakterial yang sering muncul pada proses budidaya ikan gurame. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium* sp., menyerang pada semua stadia ikan gurame dengan kisaran prevalensi hingga 50% dan bersifat kronis (Supriyadi *et al.*, 2003). Diagnosa penyakit mulai dari isolasi, karakterisasi, dan identifikasi perlu dilakukan secara komprehensif sehingga akan memudahkan dalam proses pencegahan, pengendalian, dan penanggulangan penyakit ini mengingat kerugian yang ditimbulkannya relatif tinggi.

Kegiatan ini bertujuan untuk mengetahui teknik isolasi, karakterisasi, dan identifikasi bakteri *Mycobacterium* spp. penyebab *Fish-*

TB (Tuberculosis) pada ikan gurame. Kegiatan ini dilakukan pada Maret-Juli 2011, bertempat di Laboratorium Kesehatan Ikan, Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar (BPPBAT) Bogor.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan antara lain; ikan uji (gurame) "sakit" (secara visual menunjukkan gejala *Mycobacteriosis*) dan "SPF" (*Spesifik Pathogen Free*), media selektif *Shouten* agar, media selektif *Shouten* cair, media *Mac Conkcey* agar, media selektif *Lowenstein-Jensen*, media *Shouten* agar + 5% NaCl, pewarna *Ziehl-Neelsen*, media *sulphide-indole-motility* (SIM), media *motility indole ornithin* (MIO), media nitrat *broth*, media oksidatif/fermentatif (O/F), pereaksi oksidase, media *tween-80*, media *tripple sugar iron* agar (TSIA), pereaksi niasin, akuadest, NaCl 0,85%; alkohol 70% dan 96%.

Alat yang digunakan terdiri atas: alat bedah, *bunsen*, jarum ose, kapas/*tissue*, pinset, timbangan analitik, *laminar flow*, inkubator, *autoclave*, tabung reaksi, cawan petri, *syringe* 1 mL, *parafilm*, dan bak akuarium volume 60 L.

Metode

Isolasi Bakteri

Ada beberapa organ target isolasi pada badan ikan yang umum dilakukan untuk penyakit bakterial yang bersifat sistemik (penyebaran infeksi melalui sistem peredaran darah). Organ-organ tersebut antara lain; otot, mata, hati, limfa, ginjal, dan darah.

Ikan gurame yang menunjukkan gejala *Mycobacteriosis* diisolasi pada bagian luka.

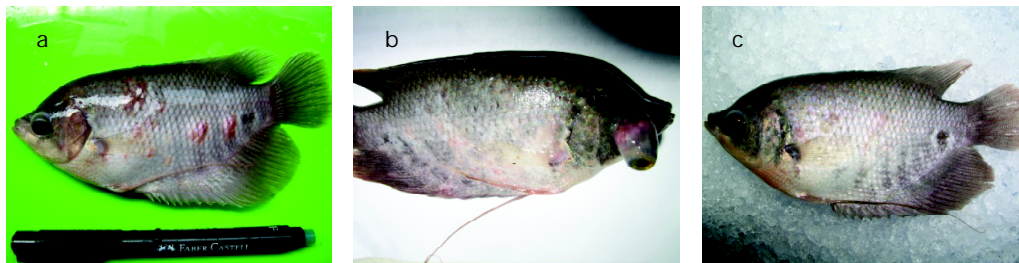
Langkah pertama, organ sisik pada bagian permukaan otot yang mengalami luka/borok dilepaskan dengan menggunakan pinset, selanjutnya permukaan otot dibersihkan dengan kertas *tissue* yang sebelumnya telah dibasahi alkohol 70%. Langkah kedua, permukaan otot disayat dengan menggunakan pisau bedah steril, lalu tusukkan jarum ose steril pada permukaan hasil sayatan. Langkah ketiga, goreskan jarum ose tersebut pada media *Shouten* agar dan inkubasi selama 3-7 hari pada suhu 28°C. Koloni yang tumbuh terpisah pada jalur hasil goresan ditanam kembali pada media baru, selanjutnya dilakukan uji karakterisasi (Gambar 1).

Karakterisasi Bakteri

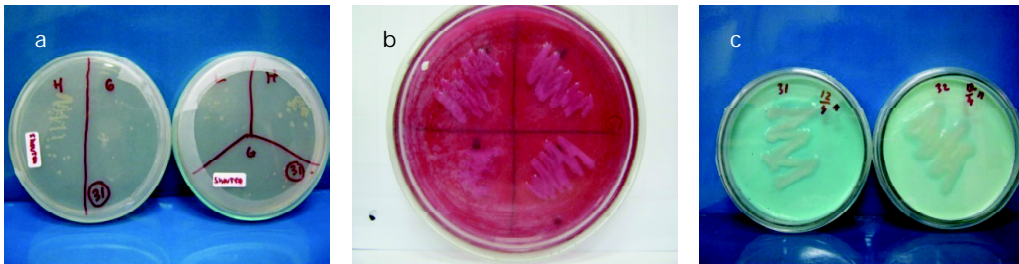
Karakterisasi merupakan tahapan awal yang dilakukan dalam proses identifikasi bakteri. Tahap ini biasanya dapat menentukan jenis bakteri sampai tingkat genus. Koloni bakteri hasil isolasi pada media *shouten* agar diinokulasikan sebanyak dua ose pada media *shouten* cair dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 36-48 jam. Inokulan tersebut selanjutnya digunakan untuk uji karakterisasi. Uji uji tersebut terdiri atas pewarnaan Gram, pewarnaan *Ziehl-Neelsen*, penanaman dalam media *Shouten* agar, penanaman dalam media *Mac Conkey* agar, tes oksidase, oksidatif-fermentatif (O/F) dan inkubasi pada suhu 37°C (Gambar 2).

Identifikasi Bakteri

Tahap identifikasi pada umumnya dapat menentukan jenis bakteri hingga tingkat subspesies dan spesies. Koloni bakteri hasil isolasi pada media *Shouten* agar diinokulasikan sebanyak dua ose ke dalam media *Shouten* cair dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 36-48 jam. Inokulan tersebut selanjutnya



Gambar 1. Gejala ikan yang terinfeksi *Mycobacterium* sp., a. bercak merah pada sisik, b. *Exophthalmia* pada mata, dan c. Ikan gurame sehat (SPF)



Gambar 2. Isolasi bakteri *Mycobacterium* sp. dari jaringan ikan gurame pada media, a. *Shouten* agar, b. *Blood* agar, dan c. *Lowenstein-Jensen*

digunakan untuk uji identifikasi. Identifikasi bakteri dilakukan dengan menggunakan metode konvensional yang merujuk pada SNI 7545.2:2009. Uji-uji tersebut antara lain: penumbuhan pada media *Shouten* agar, penumbuhan pada media *Lowenstein-Jensen*, penumbuhan pada media *Mac Conkcey* agar, penumbuhan pada media *Shouten* agar + 5% NaCl, pewarnaan *Ziehl Neelsen*, motilitas, sitokrom oksidase, oksidatif-fermentatif (O/F), inkubasi pada suhu 25°C, inkubasi pada suhu 33°C, inkubasi pada 37°C, uji reduksi nitrat, uji sukrosa, dan uji produksi niasin.

Postulat Koch

Isolat bakteri hasil karakterisasi dan identifikasi yang mengarah pada *Mycobacterium* sp. ditumbuhkan pada media *Shouten* cair dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 36-48 jam, selanjutnya inokulan tersebut diinfeksi pada 5 ekor ikan gurame sehat (SPF) ukuran 25-30 g/ekor dengan metode injeksi sebanyak 2 mL/ekor. *Postulat Koch* dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan bahwa isolat yang diperoleh merupakan bakteri patogen. Reisolasi dilakukan pada ikan yang

telah menunjukkan gejala klinis mirip dengan gejala *Mycobacteriosis*, selanjutnya dilakukan rekarakterisasi sederhana yang meliputi: penanaman pada media *Shouten* agar, penanaman dalam media *Mac Conkey* agar, tes oksidase, oksidatif-fermentatif (O/F), dan inkubasi pada suhu 37°C.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil

Pada Tabel 1, 2, dan 3 merupakan data hasil uji karakterisasi, identifikasi, dan *Postulat Koch* bakteri yang diisolasi dari ikan gurame (*O. gouramy*).

Bahasan

Hasil uji karakterisasi dan identifikasi pada Tabel 1 dan 2 menunjukkan bahwa bakteri yang diisolasi dari ikan gurame mengarah pada bakteri *Mycobacterium fortuitum*, hal ini dibuktikan oleh hasil uji yang dilakukan secara komprehensif dengan metode konvensional, mulai dari penumbuhan pada media selektif *Shouten* agar hingga uji produksi Niasin. Hasil test karakterisasi mengarah pada genus

Tabel 1. Hasil uji karakterisasi bakteri yang diisolasi dari organ ikan gurame "sakit"

Parameter	Karakteristik
Pewarnaan Gram	Gram positif
Pewarnaan <i>Ziehl Neelsen</i>	Berwarna merah
<i>Shouten</i> agar	Tumbuh baik dalam waktu 3-7 hari
<i>Mac Conkey</i> agar	Tumbuh
Sitokrom oksidase	Negatif
Oksidatif/Fermentatif (O/F)	Fermentatif
Inkubasi pada suhu 37°C	Tumbuh

Tabel 2. Hasil uji identifikasi bakteri yang diisolasi dari organ ikan gurame "sakit"

Parameter	Karakteristik
<i>Shouten</i> agar	Tumbuh baik dalam waktu 3-7 hari
<i>Lowenstein-Jensen</i> agar	Tumbuh baik dalam waktu 3-7 hari
<i>Mac Conkey</i> agar	Tumbuh
<i>Souten</i> agar + 5% NaCl	Tumbuh
Pewarnaan <i>Ziehl Neelsen</i>	Positif (warna merah)
Motilitas	Non motil
Sitokrom oksidase	Negatif
Oksidatif/Fermentatif (O/F)	Fermentatif
Inkubasi pada suhu 25°C	Tumbuh
Inkubasi pada suhu 33°C	Tumbuh
Inkubasi pada suhu 37°C	Tumbuh
Reduksi nitrat	Positif
Sukrosa	Positif
Produksi niasin	Negatif

Tabel 3. Hasil uji re-karakterisasi bakteri yang diisolasi dari organ ikan gurame "sakit" pasca "*Postulat Koch*"

Parameter	Karakteristik
<i>Shouten</i> agar	Tumbuh baik dalam waktu 3-7 hari
<i>Mac Conkey</i> agar	Tumbuh
Sitokrom oksidase	Negatif
Oksidatif/Fermentatif (O/F)	Fermentatif
Inkubasi pada suhu 37°C	Tumbuh

Mycobacterium sp., kemudian dilanjutkan pada uji identifikasi yang mengarah pada spesies *Mycobacterium fortuitum*.

Postulat Koch dilakukan untuk membuktikan bahwa isolat bakteri tersebut bersifat infeksi pada ikan. Gejala klinis mulai muncul pada hari ke-14 pasca infeksi yang ditandai dengan penurunan nafsu makan, perubahan warna sisik (*melanosis*) dan bercak merah pada kulit. Pada hari ke-21, dicirikan dengan hilangnya nafsu makan, bercak merah membesar menjadi luka/borok, terjadi benjolan pada organ mata (*exophthalmia*) dan timbulnya *nodule* atau bintik putih pada organ hati dan limfa. Gejala klinis di atas mirip dengan ciri-ciri yang dideskripsikan oleh Tappin (2007) dan Irianto (2005), yakni warna sisik menjadi gelap (*melanosis*), bercak merah pada sisik/kulit,

mata menonjol (*exophthalmia*, *popping eye*) dan timbul benjolan/bintik (*granuloma*) pada organ hati, limfa, dan ginjal. Berdasarkan hasil uji rekarakterisasi pada Tabel 3 di atas, menunjukkan bahwa bakteri yang menginfeksi merupakan isolat yang sama dengan bakteri yang diinfeksi.

Hingga kini belum ada metode pengobatan yang efektif untuk penanggulangan penyakit tersebut. Metode pengobatan dengan menggunakan bahan kimia kurang efektif karena bakteri ini memiliki dinding sel yang tebal sehingga tidak mudah ditembus oleh antibiotik. Bakteri yang telah terpapar oleh antibiotik dengan dosis tertentu yang tidak mengalami kematian, akan mengakibatkan resistensi apabila dipapar dengan dosis yang sama pada periode berikutnya.

Metode pencegahan berbasis biologis merupakan cara paling prospektif, efektif, efisien, dan aman untuk dikembangkan saat ini karena tidak menyebabkan resistensi terhadap patogen, tidak meninggalkan residu pada badan ikan (*food safety*) dan ramah lingkungan. Metode tersebut dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain; (1) peningkatan kekebalan tubuh spesifik (vaksinasi) dan non-spesifik (imunostimulan), (2) penggunaan herbal, dan (3) perbaikan kondisi lingkungan budidaya dengan pemberian bakteri probiotik (Taukhid & Supriyadi, 2008).

KESIMPULAN

Mycobacterium fortuitum merupakan bakteri penyebab *Fish-TB* (Tuberculosis) pada ikan gurame (*O. gouramy*), hal ini dibuktikan dari hasil isolasi, karakterisasi, dan identifikasi yang dilakukan terhadap ikan gurame yang secara visual menunjukkan gejala *Mycobacteriosis*.

DAFTAR ACUAN

- Irianto, A. 2005. Patologi Ikan Teleostei. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 256 hlm.
- Sigantang, M. & Sarwono, B. 2005. Budidaya Gurame. Penebar Swadaya. Jakarta, 72 hlm.
- Supriyadi, H., Taufik, P., & Taukhid. 2003. Karakterisasi Patogen, Inang Spesifik, dan Sebaran *Mycobacteriosis*. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 9(2): 39-45.
- Susanto, H. 1999. Budidaya Ikan Gurame. Kanisius, Yogyakarta, 115 hlm.
- Tappin, R.A. 2007. *Mycobacteriosis and Rainbowfish*, (<http://PetClubUK-Mycobacteriosis.inRainbowfish.htm>), diakses 10 Januari 2012).
- Taukhid & Supriyadi, H. 2008. Sistem Kekebalan (Imunitas) Pada Ikan. Pusat Pelatihan Kelautan dan Perikanan, Departemen Kelautan dan Perikanan, 26 hlm.
- Zawetz, E., Melnick, J.L., & Adelberg, E.A. 1995. *Medical Microbiology*. Penerjemah: Nugroho, E. & Maulany, R.F. Mikrobiologi Kedokteran. EGC, 753 hlm.