

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

IDENTIFIKASI BAKTERI *Aeromonas hydrophila* MENGGUNAKAN KIT API 20 E DI LABORATORIUM MIKROBIOLOGI BRPI SUKAMANDI

Diah Artati dan Moh. Oman

Balai Riset Pemuliaan Ikan

Jl. Raya 2 Sukamandi, Patok Beusi, Subang, Jawa Barat 41263

E-mail: pt.bppi@gmail.com

ABSTRAK

Metode identifikasi bakteri dapat dilakukan berdasarkan morfologi sel, uji aktivitas biokimia, analisis DNA, dan uji serologis. Identifikasi bakteri melalui pengamatan aktivitas biokimia saat ini bisa lebih mudah dengan menggunakan kit API (*Analytical Profile Index*). API 20E berguna untuk mengidentifikasi spesies dan subspecies *Enterobacteriaceae* dan identifikasi kelompok serta spesies mikroorganisme non fermentatif. Kegiatan identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan sampel ATCC 35654 menggunakan kit API 20E dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Riset Pemuliaan Ikan, Sukamandi dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan KIT API 20 E dalam mengidentifikasi ATCC 35654 yang akan digunakan sebagai jaminan mutu pengujian dalam kegiatan identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Tahap-tahap pengujian yang dikerjakan meliputi uji oksidase, preparasi strip kit API 20E, preparasi inokulum dan proses inokulasi pada strip, pembacaan strip, penambahan reagen, dan proses pengisian data menggunakan *Software*. Kit API 20 E mampu mengidentifikasi ATCC 35654 sebagai bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan %ID sebesar 91,5 dan ATCC 35654 dapat digunakan sebagai jaminan mutu pengujian dalam kegiatan identifikasi *Aeromonas hydrophila*.

KATA KUNCI: *Aeromonas hydrophila*; Kit API 20 E; identifikasi

PENDAHULUAN

Bakteri merupakan mikroorganisme yang memiliki struktur sederhana yaitu bersel tunggal, tidak memiliki membran inti sel dan memiliki ukuran yang mikroskopis. Ada beberapa dasar dalam pengelompokan bakteri, yaitu berdasarkan bentuk, jumlah dan letak flagel, kebutuhan terhadap oksigen, karakteristik dinding sel dan cara mendapatkan makanan. Serangan penyakit bakterial pada budidaya ikan sering menimbulkan kerugian ekonomi yang tidak sedikit. Jenis bakteri patogen yang umum ditemukan pada ekosistem perairan dan mempunyai peranan sebagai mikroflora bagi organisme air yaitu bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri patogen penyebab penyakit *Motile Aeromonads Septicemia* (MAS), terutama untuk spesies ikan air tawar di perairan tropis (Rahmaningsih, 2012). Selain itu bakteri *Aeromonas hydrophila* memiliki kemampuan osmoregulasi yang tinggi di mana mampu bertahan hidup pada perairan tawar, perairan payau, dan laut yang memiliki kadar garam tinggi dengan penyebaran melalui air, kotoran burung, saluran pencernaan hewan

darat dan hewan amfibi serta reptil (Mangunwardoyo *et al.*, 2010). *A. hydrophila* merupakan jenis bakteri oportunistik yaitu bakteri yang dapat menyebabkan penyakit pada organisme lain jika terjadi penurunan sistem pertahanan tubuh pada organisme tersebut. Faktor virulensi pada *A. hydrophila* disebabkan karena adanya haemolisin, aerolisin, protease, lipase, DNAses yang penting dalam patogenesis penyakit manusia dan ikan (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003; Cagatay & Sen, 2014).

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan berbagai metode yaitu berdasarkan morfologi sel, uji aktivitas biokimia, analisis DNA, dan uji serologis. Identifikasi berdasarkan morfologi sel biasa dilakukan melalui pemeriksaan mikroskopis untuk mengetahui bentuk, ukuran, kelompok bakteri (uji Gram dan uji tahan asam) serta melihat struktur yang mencakup ada tidaknya flagela, kapsul, spora, granula, dan nukleus. Identifikasi bakteri melalui pengamatan aktivitas biokimia saat ini bisa lebih mudah dengan menggunakan Kit API (*Analytical Profile Index*). Menurut Carson (2001), identifikasi yang dilakukan dengan uji API merupakan cara yang paling mudah dan dapat memberikan hasil identifikasi yang akurat.

Ada beberapa jenis kit API yang dapat digunakan dan tergantung dari jenis pengujian yang dibutuhkan. Feltham (1984) menyatakan, API 20E berguna untuk mengidentifikasi spesies dan subspecies *Enterobacteriaceae*, identifikasi kelompok serta spesies mikroorganisme non fermentatif. Selain API 20E, terdapat juga beberapa jenis produk seperti API 20NE yang berfungsi untuk identifikasi bakteri Gram negatif yang merupakan non-*Enterobacteriaceae*. API Rapid 20E yang berguna untuk identifikasi *Enterobacteriaceae*. API NH yang berfungsi untuk identifikasi *Branhamella catarrhalis* dan *Neisseria haemophilus*. RAPIDEC Staph yang berguna untuk identifikasi *staphylococci*. API 20 Strep untuk identifikasi *streptococci* dan *enterococcus*. API Staph digunakan untuk identifikasi *staphylococci* dan *micrococci*. API Coryne untuk identifikasi *Corynebacteria* dan organisme *coryne*. API 20A yang berguna untuk identifikasi bakteri anaerob.

Kegiatan Identifikasi bakteri *A. hydrophila* menggunakan kit API 20 E dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Riset Pemuliaan Ikan dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan KIT API 20 E dalam mengidentifikasi ATCC 35654 yang akan digunakan sebagai jaminan mutu pengujian dalam kegiatan identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

BAHAN DAN METODE

Kegiatan identifikasi bakteri ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Riset Pemuliaan Ikan, Sukamandi. Bakteri uji yang digunakan adalah ATCC 35654 yang telah ditumbuhkan pada media TSA dengan suhu inkubasi 28°C dan digunakan untuk pengujian pada umur 18-24 jam. Metode yang digunakan adalah metode kit API 20 E.

Metode Kit API 20 E

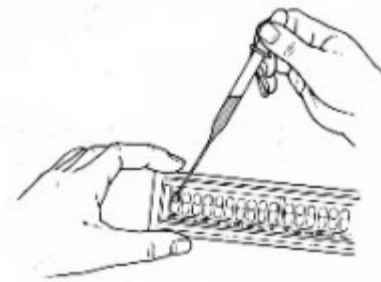
Preparasi Strip KIT API 20 E

Kit API 20 E telah dilengkapi dengan boks inkubasi yang terdiri atas wadah dan penutup berbahan plastik transparan untuk inkubasi strip selama pengujian berlangsung. Wadah yang akan digunakan sebelumnya telah diberikan kode sampel terlebih dahulu kemudian tiap sumurannya diisi dengan akuades. Strip yang akan digunakan kemudian ditempatkan pada boks inkubasi tersebut secara hati-hati. Strip terdiri atas sumur-sumur yang telah berisi reagen dalam bentuk kering dengan dilengkapi kode-kode jenis pengujian (keterangan masing-masing kode uji terdapat pada Tabel 1).

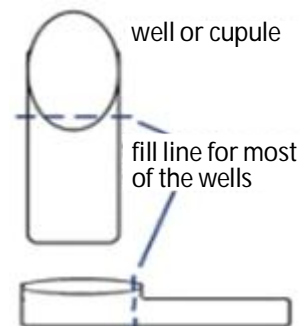
Preparasi Inokulum dan Proses Inokulasi pada Strip

Inokulum yang digunakan untuk pengujian ini adalah inokulum yang berumur 18-24 jam yang ditumbuhkan

pada media TSA. Inokulum tersebut diambil 2-3 ose dan dilarutkan dalam 5 mL PBS kemudian dihomogenkan. Suspensi bakteri yang telah dibuat kemudian didistribusikan ke masing-masing sumur pada strip secara hati-hati agar tidak terbentuk gelembung udara yang akan memengaruhi pengujian. Volume suspensi bakteri pada sumur terbagi menjadi dua, yaitu untuk uji dengan kode CIT, VP, dan GEL maka sumur diisi penuh sedangkan untuk uji lainnya hanya diisi sebagian yaitu hanya sampai pada batas penutup sumur (Gambar 2). Penambahan *mineral oil* dilakukan pada uji ADH, LDC, ODC, H₂S, dan URE untuk membuat kondisi menjadi anaerob. Setelah distribusi sampel selesai kemudian kotak inkubasi ditutup dan sampel diinkubasi pada suhu 36°C ± 2°C selama 18-24 jam



Gambar 1. Suspensi bakteri dimasukkan kedalam sumur yang berisi reagen kering.



Gambar 2. Suspensi bakteri dimasukkan hanya sebatas bagian sumur yang tertutup.

Pembacaan Strip

Setelah periode inkubasi selesai kemudian strip dibaca berdasarkan *Reading Table* yang telah tersedia pada Kit API 20 E. Jika terdapat 3 atau lebih hasil pengujian yang dinyatakan positif (tidak termasuk hasil uji GLU) maka dapat dilanjutkan ke tahap pengujian selanjutnya dengan terlebih dahulu mencatat hasil pengujian sementara pada lembar hasil yang telah disediakan. Jika hasil uji (termasuk uji GLU) didapatkan hasil kurang dari 3 yang menunjukkan hasil positif, maka dilakukan inkubasi kembali selama 24 jam ± 2 jam sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut.

Tabel 1. Reading Table Kit API 20 E

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.223	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-βD-Galactopyranosidase)	colorless	yellow (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	yellow	red / orange (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
<u>QDC</u>	L-ornithine	1.9	Ornithine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
[<u>CIT</u>]	trisodium citrate	0.756	CITrate utilization	pale green / yellow	blue-green / blue (3)
<u>H₂S</u>	sodium thiosulfate	0.075	H ₂ S production	colorless / greyish	black deposit / thin line
<u>URE</u>	urea	0.76	UREase	yellow	red / orange (2)
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DeAminase	<u>TDA / immediate</u>	
				yellow	reddish brown
IND	L-tryptophane	0.19	INDole production	<u>JAMES / immediate</u>	
				colorless pale green / yellow	pink
[<u>VP</u>]	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				colorless	pink / red (5)
[<u>GEL</u>]	Gelatin (bovine origin)	0.6	GElatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1.9	fermentation / oxidation (GLUcose) (4)	blue / blue-green	yellow / greyish yellow
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation / oxidation (MANnitol) (4)	blue / blue-green	yellow
INO	inositol	1.9	fermentation / oxidation (INOsitol) (4)	blue / blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation / oxidation (SORbitol) (4)	blue / blue-green	yellow
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation / oxidation (RHAmmose) (4)	blue / blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	1.9	fermentation / oxidation (SACcharose) (4)	blue / blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation / oxidation (MELibiose) (4)	blue / blue-green	yellow
AMY	amygdalin	0.57	fermentation / oxidation (AMYgdalin) (4)	blue / blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation / oxidation (ARABinose) (4)	blue / blue-green	yellow
OX	(see oxidase test package insert)		cytochrome-OXidase	(see oxidase test package insert)	

Penambahan Reagen

Penambahan reagen dilakukan setelah pembacaan strip menunjukkan hasil yang telah sesuai dengan kriteria pengujian. Jenis uji yang membutuhkan penambahan reagen adalah uji TDA, IND, dan VP. Uji TDA dilakukan dengan cara menambahkan 1 tetes reagen TDA pada tube strip dengan kode TDA. Jika terbentuk warna coklat kemerahan maka mengindikasikan bahwa terjadi reaksi positif pada uji tersebut. Penambahan reagen JAMES dilakukan pada uji IND yaitu dengan cara menambahkan 1 tetes reagen JAMES pada tube strip dengan kode IND kemudian

amati ada tidaknya warna pink yang terbentuk pada bagian atas tabung (*cupule*) yang menunjukkan reaksi positif. Sedangkan pada uji VP, ditambahkan reagen VP 1 dan VP 2 masing-masing sebanyak 1 tetes kemudian tunggu selama 10 menit. Jika muncul warna pink atau merah maka menunjukkan reaksi positif. Jika setelah 10 menit muncul sedikit warna pink maka dapat dikategorikan hasil reaksinya negatif.

Proses Pengisian Data Menggunakan Software

Proses identifikasi diperoleh berdasarkan *numerical profile*. Penentuan nilai *numerical profile* pada lembar

hasil dibagi dalam 3 kelompok nilai yaitu nilai 1, 2, dan 4 untuk tiap-tiap jenis uji yang akan mengindikasikan hasil tertentu. Penilaian masing-masing kelompok berdasarkan reaksi positif yang ditunjukkan selama pengujian akan memperoleh 7 digit nomor profil untuk 20 jenis pengujian pada strip API 20 E. Reaksi oksidase merupakan pengujian ke 21 dan memiliki nilai 4 jika positif. Hasil identifikasi dapat diketahui dengan menggunakan **apiweb™ identification software**.

HASIL DAN BAHASAN

Kit API 20 E memiliki kemampuan dalam mengidentifikasi spesies dan subspecies *Enterobacteriaceae* dan identifikasi kelompok serta spesies mikroorganisme non fermentatif. Bakteri kelompok *Enterobacteriaceae* merupakan kelompok bakteri Gram negatif yang berbentuk batang, bersifat anaerob fakultatif, dan bisa bergerak menggunakan alat bantu gerak yang disebut flagella peritrik yaitu flagella yang secara merata tersebar di seluruh permukaan sel (Pelczar & Chan, 1986). Bakteri ini terdiri atas bakteri non patogen dan patogen yang bisa ditemukan di tanah, hewan, tanaman, dan manusia. Spesies dari bakteri ini banyak ditemukan hidup di sistem pencernaan dan merupakan penyebab sebagian besar penyakit. Sebagian spesies bersifat motil dan mampu menempel pada inang (*host*) serta menghasilkan enterotoksin.

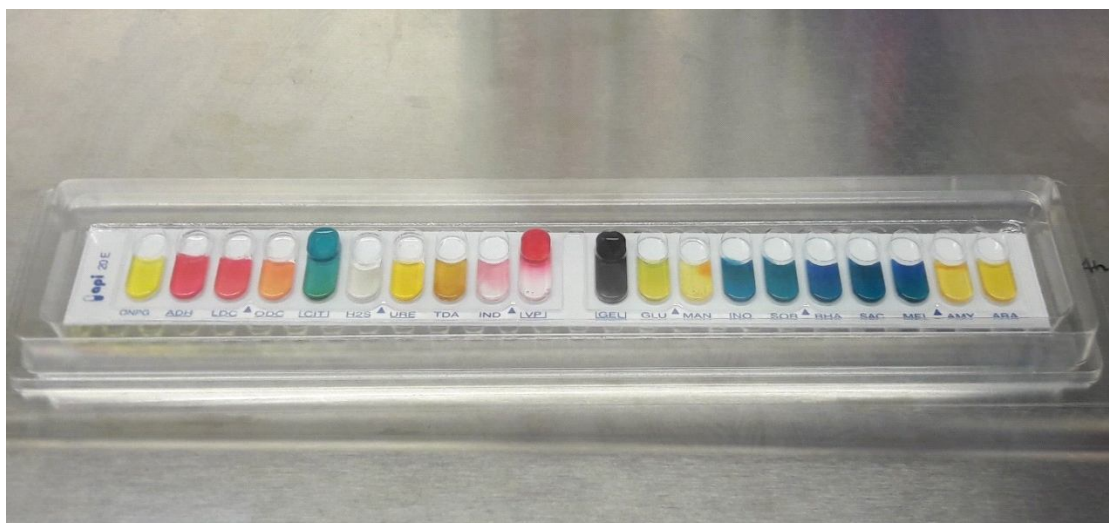
Data hasil pengujian yang dilakukan pada sampel ATCC 35654 menggunakan kit API 20 E terlihat pada Gambar 3. Penentuan hasil didasarkan pada *Reading Table* dan acuan hasil uji positif dan negatif berdasarkan warna (Gambar 4). Sampel dengan kode ATCC 35654 menunjukkan hasil positif (+) pada uji ONPG, ADH,

LDC, ODC, CIT, IND, VP, GEL, GLU, MAN, AMY, ARA, dan OX. Sedangkan pada uji H₂S, URE, TDA, INO, SOR, RHA, SAC, dan MEL memperoleh hasil negatif.

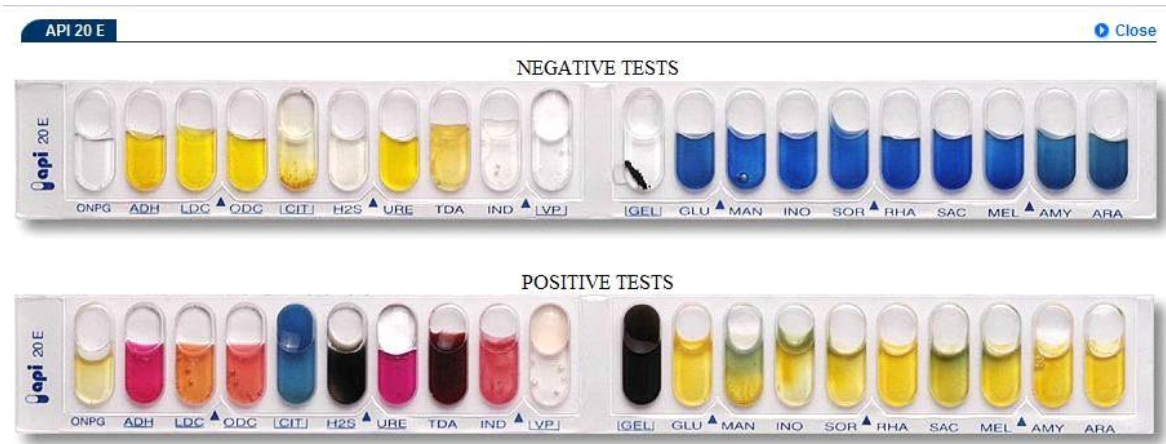
Data hasil pengujian tersebut telah dimasukkan ke dalam lembar hasil uji sementara dan selanjutnya dimasukkan dalam *software* API 20 E seperti pada Gambar 5. Gambar 5 merupakan data numerik hasil uji sampel dan data jenis bakteri yang berhasil diidentifikasi pada sampel. Hasil identifikasi bakteri pada sampel dengan kode ATCC 35654 menunjukkan bakteri yang diuji memiliki kemungkinan terdeteksi sebagai *Aeromonas hydrophila/caviae/sobria* 2 dengan %ID sebesar 91,5 dan masuk dalam kategori hasil pengujian "*Good Identification*" yang berarti data tersebut dapat diterima. ATCC 35654 yang digunakan sebagai sampel uji merupakan salah satu referensi standar mikroorganisme jenis *A. hydrophila* sehingga dapat disimpulkan jika hasil identifikasi menggunakan Kit API 20 E merupakan jenis *A. hydrophila*.

Hasil pengujian menggunakan Kit API 20 E memiliki beberapa kategori penilaian hasil di antaranya *Excellent Identification*, *Very Good Identification*, *Good Identification*, *Acceptable Identification*, *Doubtful Identification*, *Unacceptable Identification*, dan lain-lain di mana keterangan tersebut dapat dilihat pada tabel hasil. Syarat keberterimaan untuk uji ini adalah perolehan %ID > 80 dengan kategori *Acceptable*. Keterangan T pada tabel memiliki arti *Typical Index* di mana jika hasilnya mendekati 1 berarti data yang dihasilkan lebih akurat.

Penggunaan ATCC (*American Type Culture Collection*) sebagai media kontrol dalam jaminan mutu pengujian bidang mikrobiologi didasarkan karena ATCC merupakan organisasi yang mengumpulkan,

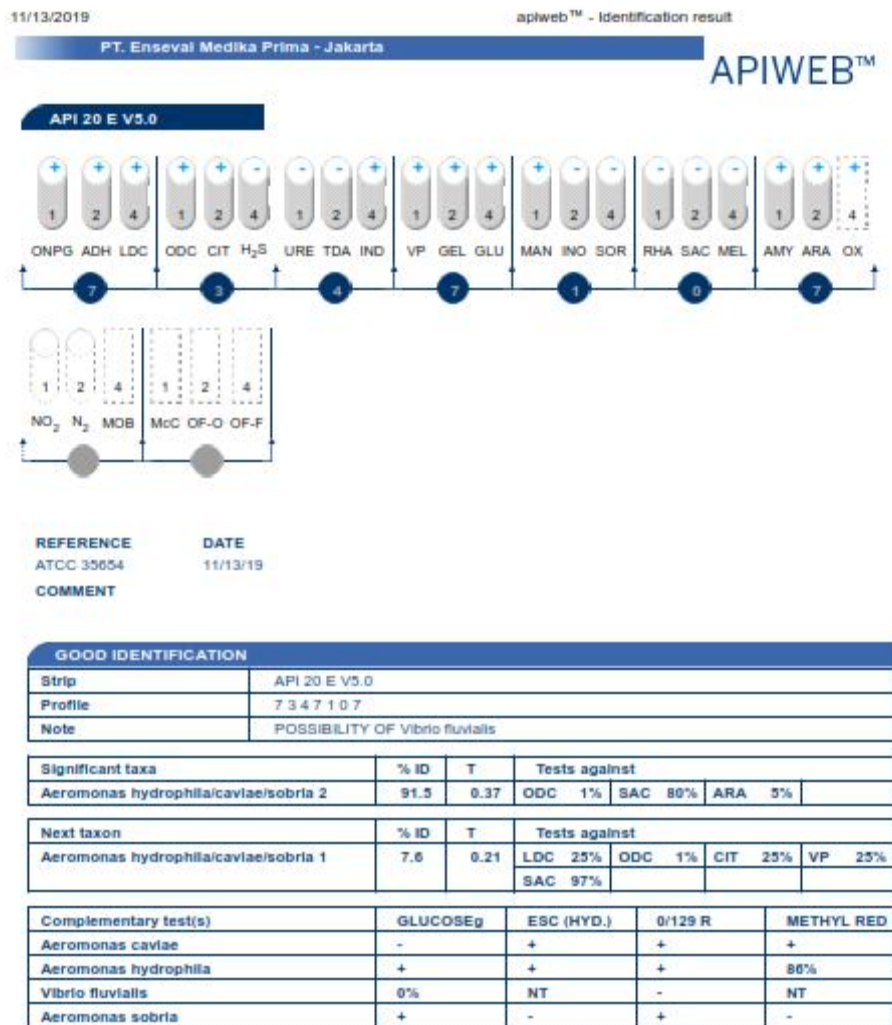


Gambar 3. Hasil uji sampel ATCC 35654 pada strip kit API 20 E.



The above examples are not intended to replace the reading table in the package insert.

Gambar 4. Acuan hasil uji negatif dan uji positif API 20 E berdasarkan warna.



Gambar 5. Data numerik dan hasil identifikasi sampel ATCC 35654 menggunakan software API 20 E.

menyimpan dan mendistribusikan referensi standar mikroorganisme, *cell lines*, dan bahan lainnya yang dibutuhkan dalam kegiatan riset. ATCC juga berfungsi untuk menetapkan standar untuk reagen biologis dan kualitas pengujian. ATCC menetapkan suatu mekanisme untuk memastikan identitas, kelangsungan hidup, dan kemurnian mikroba yang terdapat dalam produk mikrobiologi komersil yang dijual oleh para anggotanya. Para profesional pengawasan mutu dan juga konsumen diyakinkan bahwa produk yang berlambang *Licensed Derivative* ATCC berisi mikroorganisme yang diuji oleh ATCC guna menjamin organisme tersebut terus hidup, murni, dan teridentifikasi secara akurat (ATCC, 2019).

KESIMPULAN

Kit API 20 E mampu mengidentifikasi ATCC 35654 sebagai bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan %ID sebesar 91,5 dan ATCC 35654 dapat digunakan sebagai jaminan mutu pengujian dalam kegiatan identifikasi *Aeromonas hydrophila*.

DAFTAR PUSTAKA

ATCC. (2019). <https://www.atcc.org/About> di akses pada tanggal 25 November 2019 Pukul 15.30 WIB.

Cagatay, I.T. & Sen, E.B. (2014). Detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16, 435-438

Carson, J., Wagner, T., Wilson, T., & Donachie, L. (2001). Miniaturized tests for computer assisted identification of motile *Aeromonas* species with an improved probability matrix. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 190-200.

Castro-Escarpulli, G., Figueras, M.J., Aguilera-Arreola, G., Soler, L.E., Fernandez-Rendon, G., Aparicio, O., Guarro, J., & Chacon, M.R. (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 41-49.

Feltham, R.K.A, Wood, P.A., & Sneath, P.H.A. (1984). A general-purpose system for characterizing medically important bacteria to genus level. *Journal of Applied Bacteriology*, 57, 279-290.

Mangunwardoyo, W.,R., Ismayasari, E., & Riani. (2010). Uji Patogenisitas dan Virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) melalui Postulat Koch. *Jurnal Riset Akuakultur*, 5, 245-255.

Pelczar, M.J. & Chan E.C.S. (1986). *Dasar-Dasar Mikrobiologi Volume 2*. Universitas Indonesia Press. Jakarta, 949 hlm.

Rahmaningsih, S. (2012). Pengaruh Ekstrak Sidawayah dengan Konsentrasi yang Berbeda untuk Mengatasi Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumberdaya Perairan*.