

PATOGENESIS KO-INFEKSI PENYAKIT FISH TUBERCULOSIS DAN MOTILE AEROMONAS SEPTICEMIA PADA IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)

Uni Purwaningsih^{*)#}, Agustin Indrawati^{*)}, dan Angela Mariana Lusiasuti^{*)}

^{*)} Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar

^{*)} Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

(Diterima publikasi: 2 April 2014; Revisi final: 16 Februari 2015; Disetujui publikasi: 11 Maret 2015)

ABSTRAK

Penyakit *fish tuberculosis* dan *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) merupakan penyakit potensial pada budidaya ikan gurame. Infeksi kedua penyakit tersebut dimungkinkan terjadi dalam waktu yang bersamaan walaupun etiologi kedua jenis penyakit tersebut memiliki karakteristik yang berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perjalanan kedua penyakit tersebut dalam waktu yang bersamaan ketika menginfeksi gurame uji dengan melihat perubahan parameter hematologi, pola kematian, dan histopatologi. Gurame uji yang digunakan berukuran 25-30 g dengan dosis infeksi berdasarkan dosis LD₅₀ bakteri *A. hydrophila* 10⁸ cfu dan LD₅₀ *M. fortuitum* 10⁷ cfu. Gejala klinis akibat infeksi *M. fortuitum* mulai terlihat pada hari ke-14 ditandai dengan penurunan nafsu makan dan hari ke-18 mulai terlihat nodul dalam ukuran 0,1-0,2 mm pada permukaan tubuh. Sedangkan infeksi *A. hydrophila* menunjukkan gejala klinis luka pada bekas injeksi dan terlihat pembengkakan pada rongga perut mulai 24-48 jam pascainfeksi. Respons fisiologis tubuh ikan gurame terhadap adanya ko-infeksi ditunjukkan dengan nilai hemoglobin, hematokrit, persentase komponen sel darah putih yang berbeda ($P < 0,05$) dengan kontrol. Perubahan histopatologi pada perlakuan ko-infeksi menunjukkan adanya kongesti, peradangan, nekrosis, *melano macrofag center*, dan gramuloma yang bersifat *multifocal* pada organ hati, ginjal, dan limpa.

KATA KUNCI: *M. fortuitum*, *A. hydrophila*, ko-infeksi, gurame (*Osphronemus gouramy*)

ABSTRACT: *Co-infection pathogenesis of fish tuberculosis and Motile Aeromonas Septicemia in gouramy (Osphronemus gouramy).* By: Uni Purwaningsih, Agustin Indrawati, and Angela Mariana Lusiasuti

*Fish tuberculosis and Motile Aeromonas Septicemia (MAS) is potential diseases in gouramy farming. The infection of two diseases was possible occur to the same time, although the etiology shows different characteristics. The aim of this reseach was to know the patogenesis of two diseases when infected at the same time in gouramy to determine the changes in hematological parameters, pattern of mortality, and histopathology. The gouramy size of 20-30 g and LD₅₀ dose based on LD₅₀ of *A. hydrophila* 10⁸ cfu and LD₅₀ of *M. fortuitum* 10⁷ cfu. The clinical symptoms of *M. fortuitum* began to appear at 14 days postinfection and was signed by anorexia and 18 days postinfection showed small nodules 0,1-0,2 mm in size on the surface of the body. The MAS infection caused injury of the injection site and swelling of the abdominal cavity begin 24-48 hours postinfection. The physiological response against co-infection was indicated by hemoglobin, hematocrite, white blood cell component percentages were different ($P < 0.05$) from the control. The histopathological changes revealed congestion, inflammation, necrosis, melano macrofag center (MMC), and multifocal gramuloma in the liver, kidney, and spleen of co-infection gouramy.*

KEYWORDS: *M. fortuitum*, *A. hydrophila*, *co-infection*, *gouramy (Osphronemus gouramy)*

PENDAHULUAN

Penyakit *fish tuberculosis* merupakan infeksi kronik dengan gejala khas pada ikan gurame. Penyebab penyakit tersebut adalah bakteri *Mycobacterim* spp.

yang memiliki karakteristik berbentuk batang dengan ukuran 0,2-0,6 x 1,0-10,0 µm; bersifat tahan asam, tidak bergerak, tidak membentuk spora atau kapsul, dan bersifat aerob. Bakteri ini banyak dijumpai di perairan tawar dan laut maupun tanah dengan suhu optimal pertumbuhannya 25°C-30°C. Ada dua jenis *Mycobacterium* yang umumnya dijumpai pada air tawar yaitu *M. fortuitum* dan *M. chelonae*. Gurame yang terinfeksi penyakit ini menunjukkan gejala klinis an-

Korespondensi: Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar. Jl. Raya Sempur No. 1, Bogor 16154, Indonesia. Tel.: + (0251) 8313200
E-mail: uni_fish@yahoo.com; lusiasuti61@yahoo.co.id

tara lain ikan lemah, pembengkakan pada kulit, mata menonjol (*exophthalmia*) lesi, dan borok pada tubuh (Purwaningsih *et al.*, 2009).

Menurut Kamiso *et al.* (1993), *A. hydrophila* merupakan salah satu bakteri patogen penyebab kematian pada ikan gurame. Gejala klinis dari ikan gurame yang terinfeksi *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) ditandai dengan adanya septisemia, luka, cacat tulang, eksoptalmi, dan nekrosis otot. Pada kondisi posmortem ditemukan adanya luka fokal pada organ hati, limpa, dan ginjal, serta terdapat cairan yang mengisi rongga abdominal. Hasil isolasi dan identifikasi didapat jenis bakteri *A. hydrophila* dari bagian organ intestinal ikan yang sakit maupun ikan yang sudah sehat, hal ini dapat terjadi pada kondisi invasi penyakit ataupun kondisi MAS yang akut dengan adanya lokalisasi koloni bakteri *A. hydrophila* yang teridentifikasi dari jaringan hematopoetik (Ibrahim *et al.*, 2008).

Bakteri *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* memiliki perbedaan karakteristik, di mana *M. fortuitum* menyebabkan infeksi secara kronis sedangkan *A. hydrophila* menyebabkan infeksi yang bersifat akut. Kedua jenis bakteri tersebut memiliki sejumlah faktor virulensi yang dapat menyebabkan ikan menjadi sakit jika terpapar. Infeksi kedua jenis penyakit tersebut dimungkinkan dapat menyerang ikan gurame pada saat bersamaan. Pengaruh ko-infeksi kedua jenis penyakit tersebut secara *in vivo* dapat dilakukan dengan melihat perubahan pada parameter patologi klinik darah, gambaran darah, pola kematian, dan histopatologi. Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk mengetahui proses terjadinya ko-infeksi dan reaksi tubuh terhadap kedua agen infeksi yang masuk ke dalam tubuh.

BAHAN DAN METODE

Uji Patogenitas

Uji patogenitas menggunakan dua jenis isolat bakteri yaitu: *M. fortuitum* kode 31 dan *A. hydrophila* AHL 0905-2. Ko-infeksi *M. fortuitum* 10⁸ cfu dan *A.*

hydrophila 10⁷ cfu dengan perbandingan volume masing-masing isolat bakteri seperti pada Tabel 1. Ikan gurame diinjeksi secara intraperitoneal menggunakan dosis LD₅₀ masing-masing isolat yang telah diperoleh. Ikan gurame diinjeksi dengan bakteri *M. fortuitum* terlebih dahulu, baru kemudian hari ke-21 diinjeksi dengan bakteri *A. hydrophila*. Pengamatan dilakukan selama 28 hari untuk melihat pengaruh infeksi pada ikan gurame. Kultur bakteri *A. hydrophila* menggunakan media *Typtic Soy Agar* (TSA) inkubasi 24 jam pada suhu 28°C sedangkan *M. fortuitum* menggunakan media *Sauton Agar* inkubasi 72 jam pada suhu 37°C.

Analisa Hematologi

Pengambilan sampel darah dari setiap perlakuan dilakukan pada minggu ke-1, 2, 3, dan 4 pascainfeksi. Darah diambil secara *intra muscular* dari vena *caudal* ikan menggunakan spuit yang telah diberi anti-koagulan. Pemeriksaan dilakukan dengan mengukur kadar hematokrit menurut metode Anderson & Siwicki (1995), kadar hemoglobin menurut metode Sahli dengan salinometer (Wedenmeyer & Yasutake, 1977) dan diferensial leukosit menurut metode Blaxhall & Daisley (1973).

Histopatologi

Pengamatan gambaran histopatologi dilakukan untuk mengetahui efek patologis dari penyakit mikobakteriosis (infeksi *M. fortuitum*) MAS dan (infeksi *A. hydrophila*) terhadap ikan gurame. Organ yang diambil untuk pembuatan preparat histologi adalah: hati, ginjal, dan limpa. Pengambilan sampel dilakukan setiap minggu selama waktu pengamatan ko-infeksi. Proses pembuatan preparat histologi dilakukan berdasarkan Wolf & Smith (1999). Proses histologi terdiri atas enam proses yaitu: fiksasi, *clearing*, *embedding*, *blocking*, *cutting*, dan *staining*. Sampel organ yang diambil difiksasi dengan menggunakan larutan fiksatif *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10%. Organ yang telah difiksasi sekurang-kurangnya 72 jam, selanjutnya jaringan tersebut dimasukkan dalam etanol bertingkat.

Tabel 1. Dosis LD₅₀ perlakuan ko-infeksi
Table 1. The lethal dose 50 of co-infection treatment

Perlakuan <i>Treatments</i>	Tipe bakteri <i>Type of bacteria</i>	Perbandingan volume bakteri <i>Volume ratio of bacteria</i>	Kode <i>Code</i>
1	Mf : Ah	75 : 25	A
2	Mf : Ah	50 : 50	B
3	Mf : Ah	25 : 75	C
4	PBS	-	D

Keterangan (Notes):
Mf = *M. fortuitum*; Ah = *A. hydrophila*; PBS = Phospat Buffer Saline (pH 7,2)

Kemudian jaringan dimasukkan dalam xylene lalu parafin untuk dilakukan proses *blocking*. Jaringan dipotong dengan mikrotom *rotary* pada ketebalan 3-5 μm diletakkan pada gelas objek. Setelah proses tersebut di atas, tahap selanjutnya dilakukan proses pewarnaan dengan menggunakan Hematoksin-Eosin. Selanjutnya preparat diamati di bawah mikroskop untuk mengamati perubahan jaringan yang terjadi.

HASIL DAN BAHASAN

Secara *in vitro*, bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Mycobacterium fortuitum* menunjukkan kemampuan tumbuh bersama dalam satu media kultur. Pertumbuhan kedua jenis bakteri tersebut pada media *Typic Soy Agar*, *Brilliant Heart Infusion Agar*, dan *Shauton Agar* terlihat sinergis dari masing-masing bakteri tersebut tanpa terjadinya hambatan satu sama lain, hal tersebut dapat dilihat pada Gambar 1. Apabila terjadi hambatan akan ditandai oleh terbentuknya zona bening di antara koloni kedua bakteri tersebut. Pada Gambar 1, terlihat kedua bakteri dapat tumbuh bersamaan tanpa saling menghambat.

Sinergisme kedua jenis bakteri secara *in vitro* merupakan faktor penentu yang memungkinkan kedua jenis bakteri tersebut secara *in vivo* dapat melakukan ko-infeksi pada ikan gurame, seperti diketahui bahwa gurame sangat rentan terhadap kedua jenis bakteri tersebut. Uji *in vivo* melalui ko-infeksi secara *artificial* dilakukan menggunakan kedua jenis bakteri tersebut dengan melakukan pengamatan terhadap parameter hematologis, pemeriksaan patologi-anatomi, dan histopatologis untuk mengetahui perubahan respons imun dan mekanisme infeksi kedua bakteri tersebut dalam tubuh ikan gurame.

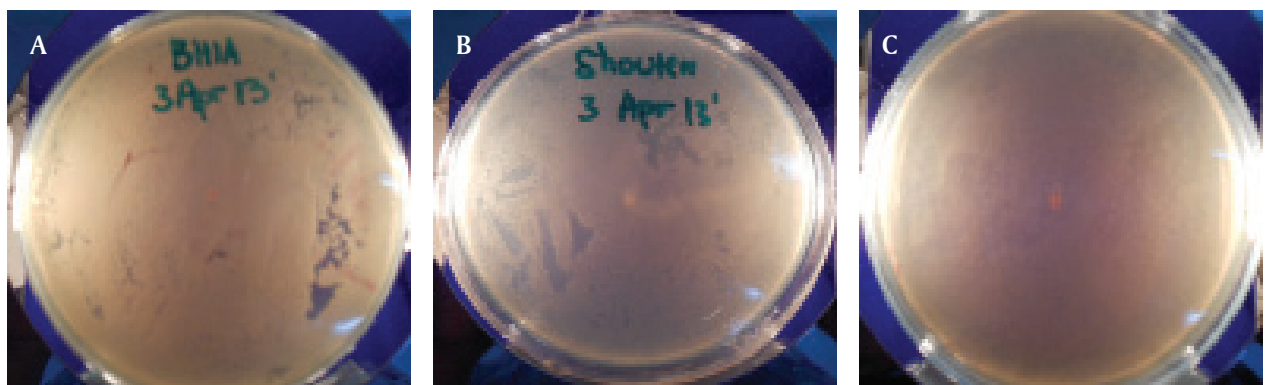
Darah merupakan cairan tubuh yang berfungsi sebagai alat transportasi oksigen nutrisi dan menjaga keseimbangan tubuh. Infeksi suatu penyakit akan

mengakibatkan darah mengalami perubahan, terutama kandungan hematokrit, hemoglobin, jumlah sel darah merah, dan jumlah sel darah putih (Lagler *et al.*, 1977). Menurut Jawad *et al.* (2004), parameter hematologis dapat digunakan untuk memonitor status kesehatan dan respons fisiologis ikan terhadap stres lingkungan.

Kadar hematokrit pada perlakuan ikan gurame yang diinfeksi dengan ko-infeksi bakteri *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* mengalami penurunan berkisar 21%-23%, hal ini didukung oleh Randal (1970) dalam Dopongtonung (2008) yang menjelaskan bahwa bila nilai hematokrit ikan di bawah 22% menunjukkan bahwa ikan mengalami anemia dan kemungkinan mengalami infeksi penyakit bakteri. Hematokrit berpengaruh terhadap pengukuran eritrosit (Hasser *et al.*, 1960) dan merupakan persentase volume eritrosit dalam darah (Sastradipradja *et al.*, 1989).

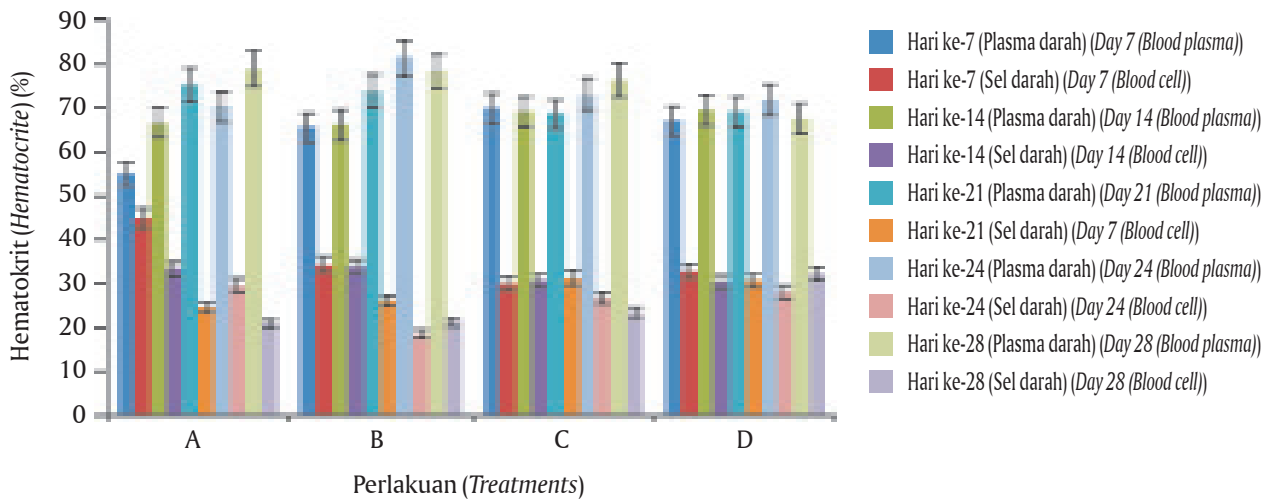
Nilai hematokrit perlakuan ko-infeksi A, B, dan C mengalami penurunan setiap minggunya pascainfeksi, hal tersebut ditunjukkan pada Gambar 2. Nilai hematokrit perlakuan ko-infeksi pada hari ke-7 berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan nilai ko-infeksi hari ke-28 pascainfeksi. Ko-infeksi bakteri *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* secara fisiologis akan menyebabkan penurunan nafsu makan sehingga berpengaruh terhadap penurunan nilai hematokrit darah.

Rata-rata kadar hemoglobin pada perlakuan ikan gurame yang diinfeksi ko-infeksi *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* mengalami penurunan dengan nilai berkisar 3-4 $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ dibanding kelompok kontrol (Gambar 3). Kadar hemoglobin pada perlakuan A, B, dan C mengalami penurunan satu minggu pascainfeksi dan mulai meningkat kembali pada minggu ke-2 dan ke-3 pascainfeksi hal ini diduga disebabkan tubuh mulai berespons adaptif terhadap invasi patogen yang masuk ke dalam tubuh, namun kadar hemoglobin kem-



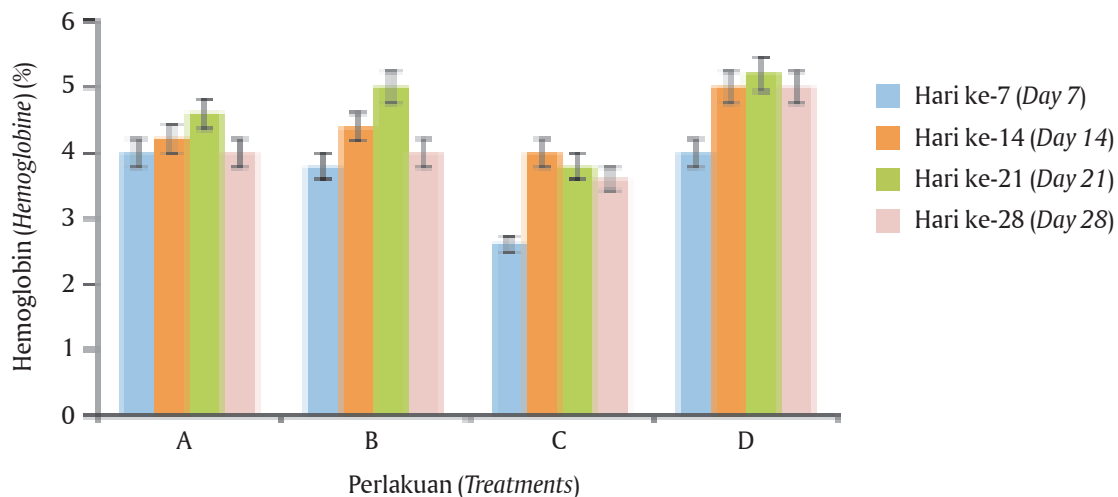
Gambar 1. Kultur bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Mycobacterium fortuitum* pada media kultur BHIA (A), Shauton Agar (B), TSA (C)

Figure 1. Culture bacteria of *Aeromonas hydrophila* and *Mycobacterium fortuitum* in culture media of BHIA (A), Shauton Agar (B), TSA (C)



Gambar 2. Kadar hematokrit ikan gurame hasil ko-infeksi *M. fortuitum* (Mf) dan *A. hydrophila* (Ah). A = Tipe bakteri 75Mf:25Ah, B = Tipe bakteri 50Mf:50Ah, C = Tipe bakteri 25Mf:75Ah, dan D = Kontrol

Figure 2. Hematocrite levels in gouramy that was co-infected by *M. fortuitum* (Mf) and *A. hydrophila* (Ah). A = Type bacteria 75Mf:25Ah, B = Type bacteria 50Mf:50Ah, C = Type bacteria 25Mf:75Ah, and D = Control



Gambar 3. Kadar hemoglobin ikan gurame hasil ko-infeksi *M. fortuitum* (Mf) dan *A. hydrophila* (Ah). A = Tipe bakteri 75Mf:25Ah, B = Tipe bakteri 50Mf:50Ah, C = Tipe bakteri 25Mf:75Ah, dan D = Kontrol

Figure 3. Hemoglobine content in gouramy that was co-infected by *M. fortuitum* (Mf) and *A. hydrophila* (Ah). A = Type bacteria 75Mf:25Ah, B = Type bacteria 50Mf:50Ah, C = Type bacteria 25Mf:75Ah, and D = Control

balinya menurun pada minggu ke-4 pascainfeksi setelah diinfeksi dengan *A. hydrophila*. Menurunnya nilai hemoglobin dalam darah berkaitan dengan rendahnya nilai eritrosit yang diduga karena darah ikan mengalami lisis. Lisis disebabkan oleh pecahnya sel darah merah karena adanya toksin bakteri di dalam darah yang disebut haemolisin. Toksin ini akan melisis hemoglobin dan melepaskan hemoglobin (Angka, 1990). Kadar hemoglobin yang rendah dapat menjadi salah satu indikasi pada ikan atas terjadinya infeksi dalam hal ini yang disebabkan bakteri (Lucky, 1977).

Respons imun alamiah ikan terhadap serangan infeksi bakteri akan terbentuk dengan melibatkan peran sel darah putih (leukosit) sebagai *barrier* pertaha-

nan tubuh. Komponen sel darah putih terdiri atas: limfosit, monosit, neutrofil, eosinofil, dan basofil. Respons imun alami akan bertahan dan berfungsi dengan baik dalam waktu beberapa hari sampai minggu setelah invasi bakteri ke dalam tubuh.

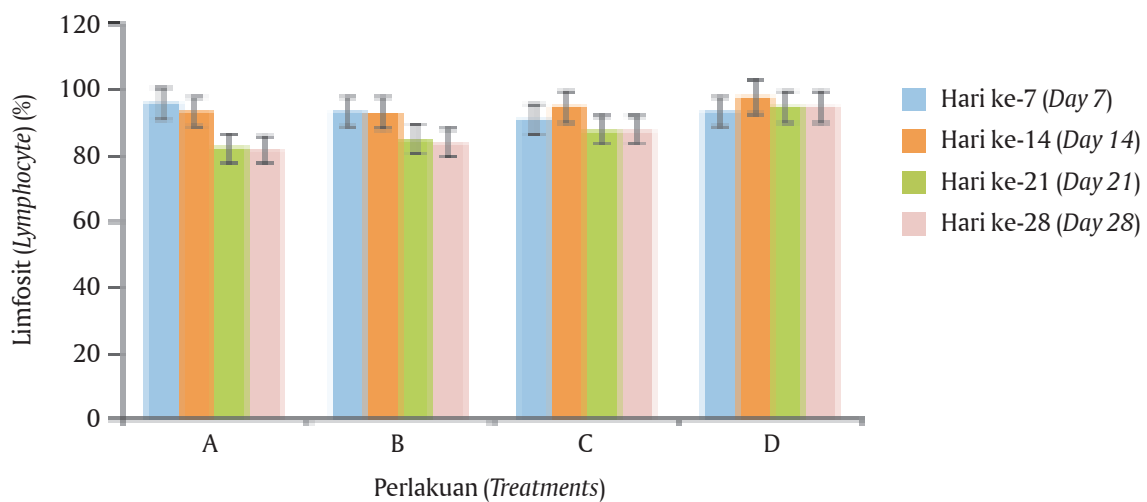
Hasil perlakuan ko-infeksi pada ikan gurame dengan komposisi bakteri *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* yang berbeda menunjukkan penurunan persentase jumlah limfosit dan sebaliknya terjadi peningkatan persentase jumlah monosit dan neutrofil (Gambar 4, 5, dan 6). Persentase limfosit perlakuan A, B, dan C pada minggu ke-3 dan ke-4 pascainfeksi berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan D (kontrol). Proporsi limfosit mengalami penurunan setiap minggunya setelah in-

feksi, di mana penurunan yang tajam terjadi pada minggu ke-3 pascainfeksi *M. fortuitum* dan minggu ke-4 pascainfeksi *A. hydrophila*, hal ini dapat dilihat pada Gambar 4.

Neutrofil dan monosit merupakan fagosit kuat yang akan mengeliminasi patogen yang masuk ke dalam jaringan tubuh. Peningkatan signifikan neutrofil mulai terjadi pada minggu ke-3 dan ke-4 pascainfeksi, hal ini dikaitkan dengan aktivitas multiplikasi dan faktor virulensi bakteri *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* yang meningkat. Ikan gurame mengalami infeksi *A. hydrophila* setelah 21 hari diinfeksi dengan *M. fortuitum*. Proporsi neutrofil pada perlakuan A, B, dan C berbeda nyata ($P < 0,05$) dibanding D (kontrol), hal

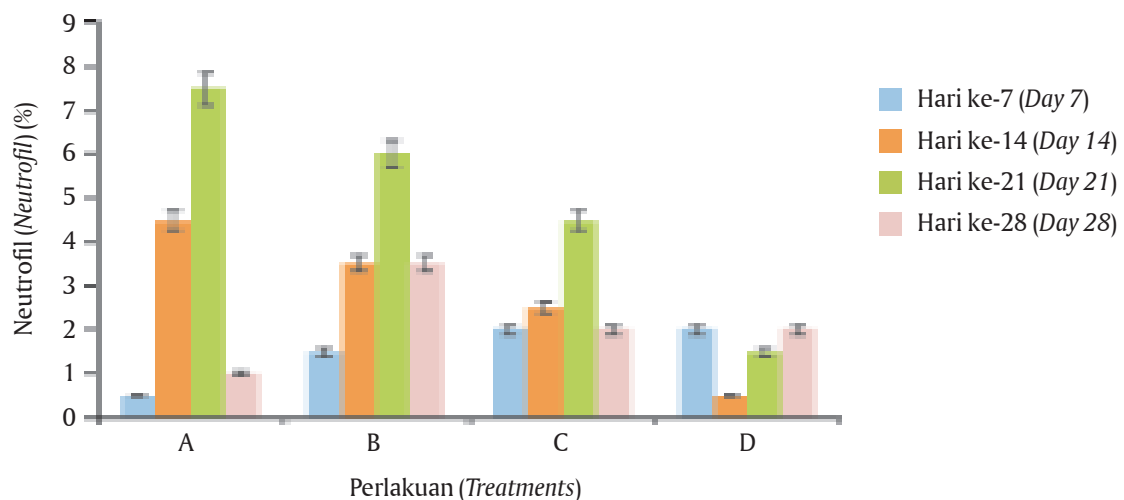
ini dapat dilihat pada Gambar 5. Fulton *et al.* (2002) menyatakan bahwa komponen lipoarabinomannan yang merupakan komponen dinding sel bakteri akan mengaktifasi sel granulosit darah sebagai respons imun awal terhadap infeksi *Mycobacterium*. Infeksi *A. hydrophila* menyebabkan septicemia yang ditandai dengan terjadinya pendarahan pada organ ginjal dan limpa sehingga sel granulosit keluar dari pembuluh darah bergerak aktif ke daerah yang mengalami radang untuk memfagosit patogen yang masuk sehingga hal ini menyebabkan proporsi jumlah sel granulosit yaitu neutrofil di dalam darah cenderung menurun.

Persentase jumlah monosit pada perlakuan ko-infeksi dengan perbandingan bakteri *M. fortuitum* dan



Gambar 4. Total limfosit ikan gurame hasil ko-infeksi *M. fortuitum* (Mf) dan *A. hydrophila* (Ah). A = Tipe bakteri 75Mf:25Ah, B = Tipe bakteri 50Mf:50Ah, C = Tipe bakteri 25Mf:75Ah, dan D = Kontrol

Figure 4. Total of lymphocyte in gouramy that was co-infected by *M. fortuitum* (Mf) and *A. hydrophila* (Ah). A = Type bacteria 75Mf:25Ah, B = Type bacteria 50Mf:50Ah, C = Type bacteria 25Mf:75Ah, and D = Control



Gambar 5. Total neutrofil ikan gurame hasil ko-infeksi *M. fortuitum* (Mf) dan *A. hydrophila* (Ah). A = Tipe bakteri 75Mf:25Ah, B = Tipe bakteri 50Mf:50Ah, C = Tipe bakteri 25Mf:75Ah, dan D = Kontrol

Figure 5. Total of neutrofil in gouramy that was co-infected by *M. fortuitum* (Mf) and *A. hydrophila* (Ah). A = Type bacteria 75Mf:25Ah, B = Type bacteria 50Mf:50Ah, C = Type bacteria 25Mf:75Ah, and D = Control

A. hydrophila yang berbeda mengalami peningkatan yang signifikan pada minggu ke-3 dan ke-4 pasca-infeksi. Proporsi monosit pada perlakuan A, B, dan C berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap D (kontrol) (Gambar 6).

Jumlah monosit perlakuan A pada minggu ke-4 pascainfeksi mengalami peningkatan yang lebih besar dari perlakuan lain, hal ini disebabkan perlakuan A diinfeksi dengan bakteri *M. fortuitum* dengan persentasenya lebih besar dari perlakuan lain, hal tersebut akan menstimulasi tubuh mengaktifasi respons pertahanan dengan meningkatkan jumlah monosit untuk menfagosit bakteri *M. fortuitum* yang masuk ke dalam tubuh, belum selesai tubuh mengeliminasi *M. fortuitum*, tubuh kembali diinfeksi dengan *A. hydrophila* yang akhirnya menyebabkan monosit meningkat kembali karena tubuh harus mengeliminasi dua agen patogen pada saat yang bersamaan. Jumlah persentase monosit semakin meningkat pada minggu ke-4 pada perlakuan A, B, dan C ketika ikan gurame diinfeksi kembali dengan bakteri *A. hydrophila*. Monosit adalah perkursor dari makrofag yang berasal dari jaringan limfoid ikan, meninggalkan sirkulasi, dan memulai tugas fagosit di jaringan untuk menghadang invasi patogen.

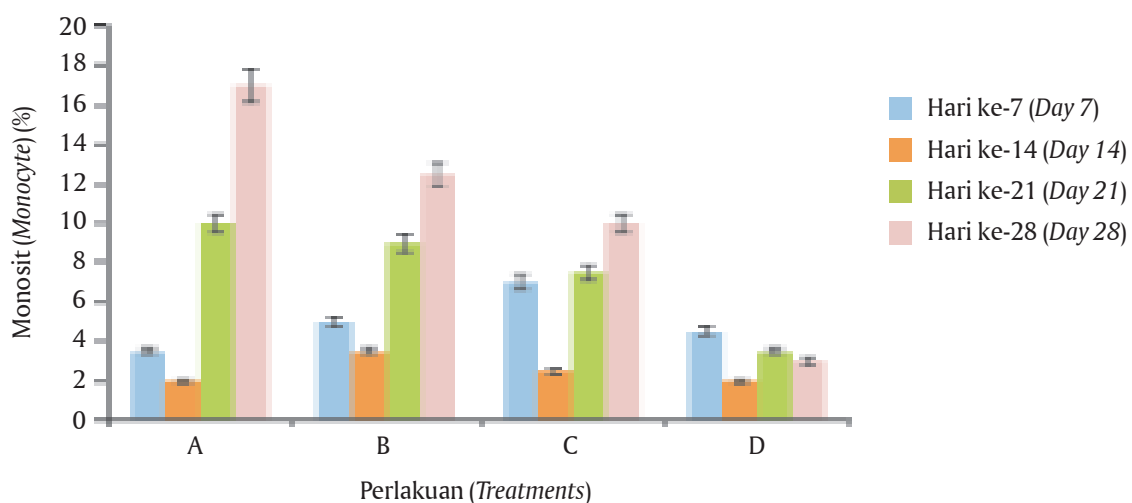
Pola kematian akibat ko-infeksi bakteri *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* merupakan hasil gabungan karakter dari kedua jenis bakteri tersebut. Infeksi kronis terjadi selama 28 hari masa pengamatan dan infeksi akut terjadi setelah 48 jam pascainjeksi dengan *A. hydrophila*. Kematian akibat infeksi *M. fortuitum* terjadi mulai hari ke-18 pascainfeksi, sedangkan kematian akibat infeksi akut *A. hydrophila* dan *M. fortuitum* terjadi pada hari ke-23-25 pascainfeksi

(Gambar 7). Gejala klinis akibat infeksi *M. fortuitum* mulai terlihat pada hari ke-14 ditandai dengan penurunan nafsu makan dan hari ke-18 mulai terlihat nodul dalam ukuran 0,1-0,2 mm pada permukaan tubuh. Sedangkan infeksi *A. hydrophila* menunjukkan gejala klinis luka pada bekas injeksi dan terlihat pembengkakan pada rongga perut mulai 24-48 jam pascainjeksi.

Jumlah ikan yang mengalami kematian setiap perlakuan berbeda-beda, hal ini terkait dengan perbedaan tingkat virulensi dari komposisi bakteri ko-infeksi yang berbeda. Talaat *et al.* (1999) menginokulasikan *M. fortuitum* ATCC 10^9 cfu secara intraperitoneal menyebabkan kematian 100% dalam jangka waktu kurang dari delapan hari dan pada dosis 10^8 cfu menyebabkan kematian 21% pada ikan *Goldfish* (*Carassius auratus*). Penelitian yang dilakukan oleh Vivas *et al.* (2004) menggunakan *A. hydrophila* pada dosis $LD_{50} 10^8$ cfu selama 14 hari pada ikan *rainbow trout*.

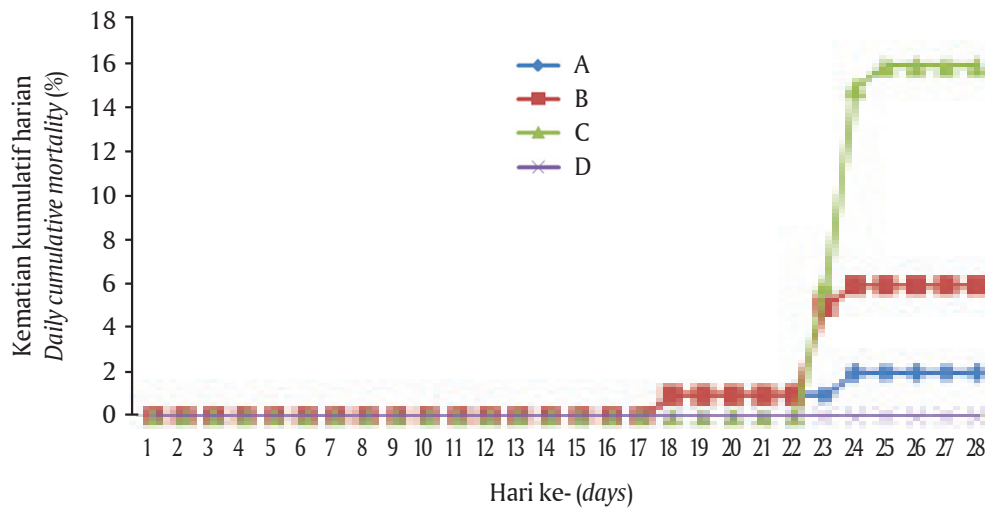
Pengujian ko-infeksi pada ikan gurame menggunakan *M. fortuitum* 10^7 cfu dan *A. hydrophila* 10^8 cfu. Perlakuan ko-infeksi 75Mf:25Ah dan 50Mf:50Ah menunjukkan kematian yang rendah yaitu 10%-20% sedangkan pada ko-infeksi 25Mf:75Ah jumlah kematian ikan gurame mencapai 50%.

Patologi anatomi menunjukkan granuloma pada peritoneum, hati, dan limpa mulai terbentuk pada hari ke-21 *post*-infeksi bakteri *M. fortuitum*. Menurut Talaat *et al.* (1999), infeksi *M. fortuitum* 10^8 cfu pada ikan *Goldfish* menyebabkan lesi granulomatous pada berbagai organ internal yaitu peritoneum, pankreas, hati, limpa, dan ginjal. Asites dalam rongga perut dan pendarahan pada organ ginjal dan limpa pada ko-in-



Gambar 6. Total monosit ikan gurame hasil ko-infeksi *M. fortuitum* (Mf) dan *A. hydrophila* (Ah). A = Tipe bakteri 75Mf:25Ah, B = Tipe bakteri 50Mf:50Ah, C = Tipe bakteri 25Mf:75Ah, dan D = Kontrol

Figure 6. Total of monocyte in gouramy that was co-infected by *M. fortuitum* (Mf) and *A. hydrophila* (Ah). A = Type bacteria 75Mf:25Ah, B = Type bacteria 50Mf:50Ah, C = Type bacteria 25Mf:75Ah, and D = Control



Gambar 7. Kematian kumulatif harian ikan gurame perlakuan ko-infeksi *M. fortuitum* (Mf) dan *A. hydrophila* (Ah). A = Tipe bakteri 75Mf:25Ah, B = Tipe bakteri 50Mf:50Ah, C = Tipe bakteri 25Mf:75Ah, dan D = Kontrol

Figure 7. Daily cumulative mortality of gouramy that was co-infected by *M. fortuitum* (Mf) dan *A. hydrophila* (Ah). A = Type bacteria 75Mf:25Ah, B = Type bacteria 50Mf:50Ah, C = Type bacteria 25Mf:75Ah, and D = Control

feksi terjadi mulai 24-48 jam *post*-infeksi *A. hydrophila*. Perubahan histopatologi hari ke-28 pascainfeksi menunjukkan tingkat kerusakan yang signifikan dibanding 21 hari pascainfeksi, hal ini disebabkan dua agen patogen yaitu *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* telah bersinergis bersama-sama menimbulkan kerusakan jaringan. Menurut Alagappan *et al.* (2009), bahwa infeksi *A. hydrophila* menyebabkan *melano macrofag center* (MMC) pada ginjal dan limpa dan kerusakan pada sel dan nekrosis pada hati dan ginjal, hal yang sama juga terjadi pada ikan gurame perlakuan infeksi 28 hari pascainfeksi menunjukkan nekrosis pada sel hati dan sel ginjal, hemoragik dan inflamasi pada ginjal, dan MMC pada ginjal. Kerusakan yang terjadi akibat ko-infeksi *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* pada ikan gurame disebabkan adanya toksin mematikan dari produk ekstraseluler yang bersifat virulen yang dihasilkan kedua bakteri tersebut.

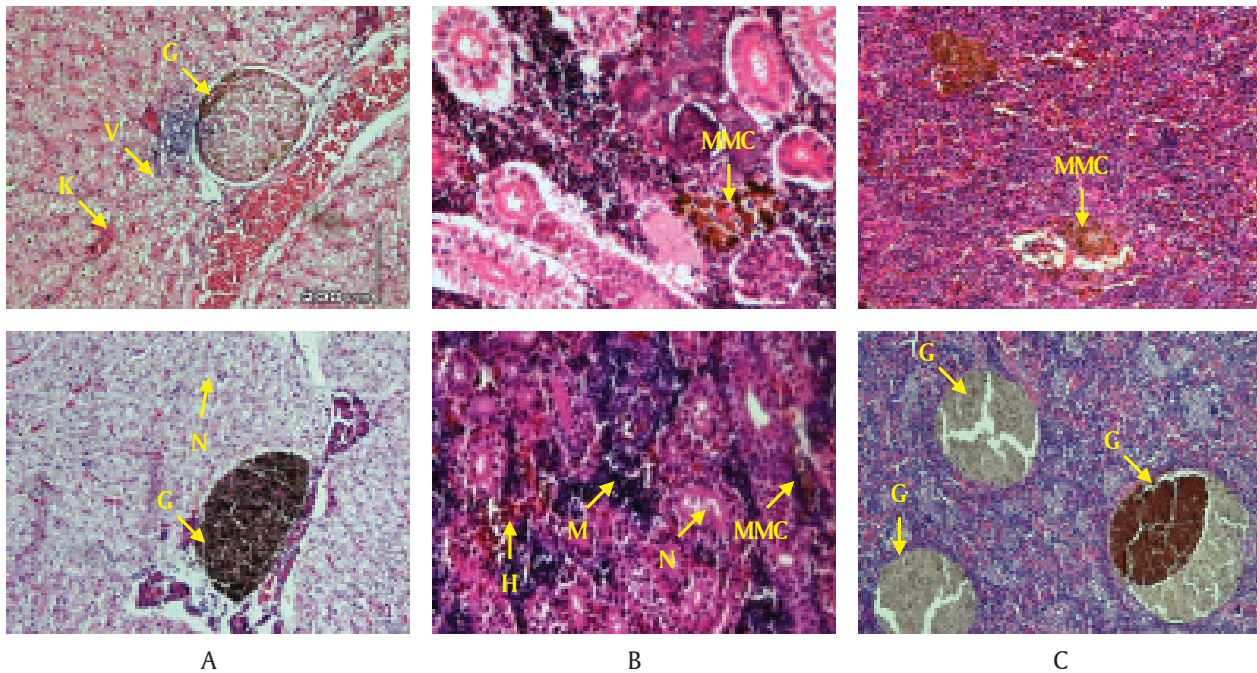
Perubahan histopatologi dari organ hati, ginjal, dan limpa ikan gurame hasil ko-infeksi 21 hari dan 28 hari pascainfeksi menunjukkan kongesti, granuloma multifokal pada hati dan limpa, nekrosis pada sel hati dan sel ginjal, *melano macrofag center* (MMC) pada limpa dan ginjal, serta peradangan dan hemoragik juga ditemukan pada organ ginjal (Gambar 8).

Mikobakteria kaya akan lipid, mencakup asam mikolat (asam lemak rantai panjang C78-C90), lilin, dan fosfatida. Dalam sel, lipid sebagian besar terikat pada protein dan polisakarida (Jawetz *et al.*, 1996). Granuloma merupakan kerusakan jaringan yang terjadi akibat dipeptida muramil yang merupakan salah satu jenis protein yang dimiliki oleh jaringan terikat

kompleks dengan asam mikolat yang dihasilkan oleh bakteri *Mycobacterium* spp. Granuloma terlihat sebagai kumpulan sel-sel epiteloid yang berasal dari histiosit. Nekrosis ditemukan di daerah sentral granuloma. Di dalam granuloma juga ditemukan jaringan ikat fibrosit dan sejumlah limfosit.

Melano macrofag center (MMC) adalah agregat makrofag merupakan kumpulan sel yang mengandung pigmen pada jaringan. MMC ditemukan pada organ ginjal dan limpa ikan gurame perlakuan ko-infeksi. Melanomakrofag atau endapan coklat akibat ko-infeksi *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* pada ikan gurame terjadi karena adanya eksudasi kuman di jaringan. Infiltrasi sel radang yang ditemukan pada jaringan organ ikan gurame ko-infeksi mengindikasikan terjadinya peradangan pada jaringan tersebut. Toksin yang dihasilkan oleh bakteri *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* menstimulasi bekerjanya respons imun non-spesifik ikan gurame, hal ini ditandai dengan aktivitas sel granulosit yang keluar dari pembuluh darah bergerak aktif ke daerah yang mengalami kerusakan, serta makrofag untuk mengeliminasi invasi patogen. Proses peradangan secara normal akan diikuti oleh peningkatan jumlah sel limfosit, makrofag maupun neutrofil. Menurut Darwis (2000), infeksi menyebabkan peradangan pada tubulus maupun glomerulus ginjal yang dapat berlanjut menjadi nekrosis multifokal dan memengaruhi proses metabolisme tubuh.

Infeksi *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* pada ikan gurame secara mikroskopik menyebabkan kongesti pada hati dan ginjal. Kongesti merupakan keadaan yang



Gambar 8. Histopatologi organ hati (A), ginjal (B), dan limpa (C) ikan gurame ko-infeksi *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* menunjukkan kongesti (K), granuloma (G), vakuolisasi (V), melano macrofag center (MMC), hemorrhagic (H), inflamasi (M), necrosis (N). (Perbesaran 100-200x, pewarnaan Hematoxylin-Eosin). Gambar atas adalah hasil ko-infeksi 21 hari pascainfeksi. Gambar bawah adalah hasil ko-infeksi 28 hari pascainfeksi

Figure 8. Histopathology of liver (A), kidney (B), and spleen (C) in gouramy that was co-infected by *M. fortuitum* and *A. hydrophila* showed congestion (K), granuloma (G), vakuolization (V), melano macrofag center (MMC), hemorrhagic (H), inflamasion (M), necrosis (N). (Magnify 100-200x, staining by Hematoxylin-Eosin). Upper pictures are the result of 21 days co-infection. Lower pictures are the result of 28 days co-infection

menunjukkan peningkatan volume darah karena pelebaran pembuluh darah kecil (Robbins & Kumar, 1995). Menurut Smith & Jones (1961), kongesti terjadi akibat reaksi peradangan dan kerusakan bagian organ. Kongesti merupakan proses pasif yang disebabkan oleh menurunnya aliran darah venous. Kongesti akan menunjukkan perubahan warna merah, bergantung derajat oksigenasi darah. Kongesti juga merupakan gejala patologis pertama dari kerusakan jaringan dan terjadi peningkatan jumlah darah di dalam pembuluh darah sehingga akan tampak kapiler darah melebar dan sinusoid-sinusoid di hati terisi banyak eritrosit (Thomson, 1978). Kongesti dapat dikaitkan dengan aktivitas multiplikasi bakteri dan endotoksin atau eksotoksin dihasilkan oleh bakteri gram negatif (Brook *et al.*, 1989).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa artifisial ko-infeksi 25Mf:75Ah menyebabkan kematian ikan gurame mencapai 50% dalam waktu 28 hari pascainfeksi, ko-infeksi menye-

babkan perubahan pada gambaran darah dan patologi klinik darah yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dibanding kontrol, dan perubahan histopatologi akibat koinfeksi menyebabkan kongesti, granuloma multifokal pada hati dan limpa, melano macrofag center (MMC) pada limpa dan ginjal dan peradangan juga ditemukan pada organ ginjal.

Saran

Ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) memiliki kerentanan terhadap infeksi bakteri *M. fortuitum* dan *A. hydrophila*; oleh karena itu, perlu diterapkan manajemen budidaya dan sistem biosekuriti yang baik guna menghindari infeksi kedua jenis penyakit tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana dengan baik berkat dukungan Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar, Bogor. Penghargaan yang tinggi penulis sampaikan kepada Dr. Desy Sugiani, M.Si., Ahmad Wahyudi, dan Edy Farid Wadjdy yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Alagappan, K.M., Deivasigamani, B., Kumaran, S., & Sakthivel, M. (2009). Histopathological alterations in estuarine catfish (*Arius maculatus*) due to *Aeromonas hydrophila*. *World J. Fish Mar. Sci.*, 1 (2009), p. 185-189.
- Anderson, D.P., & Siwicki, A.K. (1995). Basic hematology and serology for fish health programs. Dalam Shariff, M., Arthur, J.R., Subasinghe, R.P. (Eds.), *Fish Health Section*. Asia Fisheries Society (Eds.), Disease in Asian Aquaculture II, Manila. Philippines, p. 185-202.
- Angka, S.L. (1990). The pathology of the walking catfish, *Clarias batrachus* (L) infected intraperitoneally with *Aeromonas hydrophila*. *Asian Fish Sci.*, 3, 343-351.
- Blaxhall, P.C., & Daisley, K.W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of fish biology* vol 5 issue 6, p. 771-781.
- Brook, G.F., Bufel, J.S., & Ornston, L.N. (1989). Medical microbiology. 19th Edition, A Large Medical Book, San Matters, California, USA.
- Darwis, A. (2000). Jurnal of aquatic animal health: pathology of experimental edwardsiella tarda infection in channel catfish *Ictalurus Punctatus*. Agricultural Research Service, USDA.
- Dopongtonung, A. (2008). *Gambaran darah ikan lele (Clarias spp.) yang berasal dari daerah Laladon-Bogor*. Skripsi. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor, hlm. 20.
- Fulton, S.A., Reba, S.M., Martin, T.D., & Boom, W.H. (2002). Neutrophil-mediated mycobacteriocidal immunity in the lung during *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57BL/6 mice. *Infect. Immun.*, 70(9), 5322-5327.
- Hasser, E.F. (1960). Methods for routine fish hematology. *Progressive Fish Culturist*, (22), 164-170.
- Ibrahem, M., Mostafa, M., Arab, R.M.H., & Rezk, M.A. (2008). Prevalence of *Aeromonas hydrophila* infection in wild cultured tilapia nilotica (*O. niloticus*) in Egypt. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008. p. 1257-1271.
- Jawad, L.A., Al-Mukhtar, M.A., & Ahmed, H.K. (2004). The relationship between haematocrit and some biological parameters of Indian Shad, *Tenualosa ilisha* (Family Clupeidae). *Animal Biodiversity Conservation*, 27(2), 47-52.
- Jawetz, E., Melnick, L.J., & Adelberg, A.E. (1996). Mikrobiologi kedokteran. Edisi-20, alih bahasa Edi Nugroho, R.F. Maulany, CV. EGC. Jakarta, hlm. 236-237.
- Kamiso, H.N., Saron, A., Yusuf, I.B.L., Haryono, E.B.S., Widodo, Triyanto, Nurirwan, T., Haryanto S., Kusuma, U.W., Novianti, W., Wardani, S., & Setianingtyas. (1993). Deskripsi hama dan penyakit ikan karantina golongan bakteri. Pusat Karantina Perikanan. Jakarta.
- Lagler, K.F., Bardach, J.E., Miller, R.R., & Passino, D.R.M. (1977). Ichthyology. John Willey and Sons. Inc. London, 56 pp.
- Lucky, Z. (1977). Methods for the diagnosis of fish disease. Hoffenana, G.L. Amerind Publisih Co. Put. Ltd. New Delhi.
- Purwaningsih, U., Lusiatuti, A.M., & Tauhid. (2009). Studi patologi-anatomi penyakit mycobacteriosis pada ikan gurami (*Osphronemus gouramy*). *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*, hlm. 1139-1142.
- Robbins, L.S., & Kumar, V. (1995). Buku ajar patologi. Edisi-4, alih bahasa: Staff Pengajar Laboratorium Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Airlangga, C.V EGC. Jakarta, 69 hlm.
- Sastradipraja, D., Sikar, S.H.S., Widjajakusuma, R., Ungerer, T., Maad, A., Nasution, H., Suriawinata, R., & Hamzah, R. (1989). Penuntun praktikum fisiologi veteriner. Depdikbud. Dirjen pendidikan Tinggi. PAU. Ilmu Hayati. IPB. Bogor, 329 hlm.
- Smith, H.A., & Jones, T.C. (1961). Veterinary pathology. Lea and Febinger. Philadelphia, 884 pp.
- Talaat, A.M., Trucksis, M., Kane, A.S., & Reimshuessel, R. (1999). Pathogenicity of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis* to goldfish, *Carrasius auratus*. *Journal of Veterinary Microbiologi*, 66, 151-164.
- Thomson, R.G. (1978). General Veterinary Pathology. W.B Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 102 pp.
- Vivas, J., Riano, J., Carracedo, B., Razquin, B.E., Fierro, P.L., Naharri, G., & Villena, A.J. (2004). The auxotrophic aroA mutant of *Aeromonas hydrophila* as a live attenuated vaccine against *A. salmonicida* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish and Shellfish Immunology*, 16, 193-206.
- Wedenmeyer, G.A., & Yasutake, W.T. (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.
- Wolf, J.C., & Smith, S.A. (1999). Comparative severity of experimentally induced mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis* and hybrid tilapia *Oreochromis* spp. *Journal Diseases of Aquatic Organisms*, 38, 191-200.