

AKTIVITAS KITINASE, LESITINASE, DAN HEMOLISIN ISOLAT DARI BAKTERI IKAN NILA (*Oreochromis niloticus* Lin.) YANG DIKULTUR DALAM KERAMBA JARING APUNG WADUK JATILUHUR, PURWAKARTA

Wibowo Mangunwardoyo^{*)} Ratih Ismayasari^{**)}, dan Etty Riani^{***)}

^{*)}Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Alam
Universitas Indonesia, Depok 16424
E-mail: w_mangunwardoyo@hotmail.com

^{**)} Stasiun Karantina Ikan Klas I Tanjung Priok
Jl. Enggano Raya 16, Pelabuhan Tanjung Priok, Jakarta Utara

^{***)} Departemen Budidaya Perairan-FPIK, Institut Pertanian Bogor
Jl. Lingkar Kampus, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(Naskah diterima: 20 Agustus 2008; Disetujui publikasi: 18 Mei 2009)

ABSTRAK

Aeromonas hydrophila Lin. merupakan bakteri patogen oportunistik akuatik yang virulensinya dipengaruhi oleh adanya enzim kitinase, lesitinase, dan toksin haemolisin, merupakan penyebab kematian ikan nila yang tinggi. Penelitian bertujuan untuk mengamati aktivitas enzim kitinase, lesitinase, dan toksin hemolisin dari 30 ikan nila dari keramba jaring apung waduk Jatiluhur dengan metode tehnik agar. *A. hydrophila* menunjukkan positif virulen ditunjukkan adanya zona bening untuk lesitinase sebesar 7,9 mm; kitinase 8,0 mm; dan hemolisin 6,6 mm dibandingkan dengan isolat *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., dan *Vibrio* sp. Hal ini menunjukkan bahwa *A. hydrophila* bersifat patogen dan virulen terhadap ikan nila.

KATA KUNCI: *Aeromonas hydrophila*, kitinase, lesitinase, hemolisin

ABSTRACT: *The activity of chitinase, lechitinase, and hemolycine of isolated bacteria from Oreochromis niloticus Lin. cultured in floating net cage at Jatiluhur, Purwakarta. By: Wibowo Mangunwardoyo, Ratih Ismayasari, and Etty Riani*

Aeromonas hydrophila Lin. is one of opportunistic aquatic pathogen bacteria where its pathogenic behavior is influenced by chitinase, lechitinase, and toxin haemolycine, and causes high mortality in Nile tilapia culture. The purpose of the research was to observe the activities of two *A. hydrophila*'s enzymes i.e.: chitinase and lechitinase, and one extracellular toxin, haemolycine, isolated from 30 Nile tilapias cultured in floating net cage at Jatiluhur using quantitative plate assay technique. *A. hydrophila* was positive virulent marked with transparent zone of lechitinase of 7.9 mm, haemolycine of 6.6 mm, and chitinase of 8.0 mm compared to *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., and *Vibrio* sp. Therefore, *A. hydrophila* is determined as highly pathogenic bacterium and virulent for Nile tilapia.

KEYWORDS: *Aeromonas hydrophila*, chitinase, lechitinase, hemolycine

PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus* Lin.), telah banyak dibudidayakan di dalam keramba jaring apung (KJA) secara intensif dengan padat tebar yang tinggi. Salah satu budidaya berlokasi di Waduk Jatiluhur, Purwakarta-Jawa Barat. Budidaya ikan dengan padat tebar tinggi akan mempengaruhi kesehatan dan lingkungan. Kualitas air cenderung menurun, sehingga mempermudah terjadinya infeksi penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen (Supriyadi, 2004).

Salah satu bakteri patogen yang dapat menyebabkan penyakit pada ikan nila adalah *Aeromonas hydrophila*. Bakteri tersebut banyak menginfeksi ikan budidaya pada lingkungan perairan yang buruk dengan bahan organik tinggi, dan dapat dengan mudah menginfeksi ikan lainnya dalam sumber air yang sama (Bassler, 1997). Bakteri perairan seperti *Aeromonas* sp., *Alteromonas* sp., *Pseudomonas* sp., dan *Streptococcus* sp., ditemukan menginfeksi ikan nila yang dipelihara di Waduk Cirata yang lokasinya berdekatan dengan Waduk Jatiluhur (Supriyadi & Komarudin, 2003; Supriyadi *et al.*, 2005). Lokasi KJA yang berdekatan dan pemanfaatan Sungai Citarum sebagai sumber air utama, memungkinkan penyebaran bakteri termasuk *Aeromonas* sp. mencapai areal budidaya KJA Waduk Jatiluhur.

A. hydrophila diketahui memiliki sifat virulensi lebih tinggi, dibandingkan bakteri akuatik lainnya. Bakteri tersebut dapat menginfeksi ikan budidaya, juga ikan tangkapan, dengan penyakit yang disebut *Motil Aeromonas Septicemia* (MAS) (Noga, 2000). Ikan yang terinfeksi oleh bakteri tersebut, menunjukkan tanda-tanda pendarahan pada permukaan kulit (*haemorrhagic septicemia*), pendarahan pada pangkal sirip dada, nekrosis otot, luka borok (*ulcer*) pada permukaan tubuh, dan bagian perut membesar berisi cairan (*dropsi*). Selain permukaan tubuh, bakteri juga dapat menginfeksi insang, ginjal, hati, limpa, pankreas dan otot daging (Swann & White, 1991). Tanda klinis tersebut pada umumnya ditemukan pada ikan terinfeksi akut, subakut, dan kronis (Post, 1987).

A. hydrophila dan *Aeromonas* strain lainnya diketahui mampu menghasilkan enzim dan toksin ekstraselular yang sangat menentukan patogenisitas dan tingkat virulensi bakteri

tersebut pada ikan, antara lain enzim kitinase, dan lesitinase, serta toksin ekstraselular hemolisin (Hsu *et al.*, 1981; Santos *et al.*, 1999). Huys *et al.* (2002) menambahkan bahwa *A. hydrophila* menghasilkan lebih dari satu toksin hemolitik.

Kitinase dan lesitinase, merupakan enzim pendegradasi jaringan. Kitinase bekerja sebagai katalisator pada proses penguraian polimer kitin pada lapisan pelindung tubuh dan sisik ikan menjadi unit monomer yang lebih sederhana, dan lesitinase bekerja sebagai katalisator pada proses hidrolisis fosfolipid membran plasma sel-sel tubuh ikan (Raven & Johnson, 1986; Nugroho *et al.*, 2003). Hemolisin di produksi oleh *A. hydrophila* dan bekerja melisis sel-sel darah merah dan sel-sel darah putih, serta menyebabkan nekrosis jaringan (Higerd & Foulter, 1997).

Penelitian bertujuan untuk mengetahui aktivitas kitinase, lesitinase, dan hemolisin secara *in vitro* dengan teknik *quantitative plate assay* dan penentuan aktivitas dengan perhitungan zona rasio.

BAHAN DAN METODE

Ikan Sampel

Ikan nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) dari Karamba Jaring Apung (KJA) Waduk Jatiluhur, Purwakarta sebanyak 30 ekor dengan panjang 7-10 cm dan bobot tubuh 10-28 g.

Media

Kitinase-*chitin farm crab shells* (Nitimulyo, 1994), lesitinase *Willis and Hobbs* dan media agar darah (Colins *et al.*, 1995). Media uji identifikasi bakteri yang digunakan mengacu kepada Cowan & Steel (1985), Oxoid (1988), dan Holt *et al.* (1994). Pewarna gram, darah domba, alsever sitrat anti koagulan, antibiotik novobiosin 30 µg dan *vibriostatic agent* 0/129 150 µg dalam bentuk cakram.

Pengambilan Sampel Ikan

Sampel ikan nila (*Oreochromis niloticus*), berumur sekitar satu bulan, dengan ukuran panjang 7-10 cm dan bobot 10-28 g. Ikan diambil secara acak berdasarkan tingkat prevalensi 10% (Amos, 1985), dari tiga petak dengan jumlah total 30 ekor, menggunakan metode *stratified random sampling* (Supranto, 1993).

Isolasi dan Identifikasi Bakteri dari Ikan Nila

Seluruh permukaan tubuh ikan nila dibersihkan dengan larutan iodine 2%. Bakteri diambil dari lima bagian, yaitu luka pada permukaan tubuh (L), organ ginjal (G), hati (H) dan hati bengkak (HB), otak (OT), dan jantung (J) dengan menggunakan jarum ose steril. Jarum ose ditempelkan atau ditusukkan pada target organ dan kemudian diinokulasikan secara aseptik ke media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Selanjutnya setiap satu jenis koloni bakteri diinokulasikan ke media BHIA baru, dan diinkubasikan kembali pada suhu 30°C selama 24 jam.

Pengamatan warna dan bentuk koloni secara visual dilakukan pada setiap isolat bakteri. Bentuk dan pergerakan bakteri diamati dengan teknik tetes gantung menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400–1.000 X, dan morfologi bakteri diamati dengan menggunakan pewarna gram.

Pengujian dilanjutkan dengan rangkaian uji biokimia secara konvensional menggunakan media selektif dan fermentatif serta uji sensitifitas bakteri. Uji enzim katalase dilakukan dengan menggunakan larutan H₂O₂ 3% dan uji enzim oksidase menggunakan reagen oksidase. Uji biokimia dan fermentasi karbohidrat dilakukan dengan mengisolasi bakteri ke dalam setiap media uji, dan hasilnya diamati setelah masa inkubasi 24 jam pada suhu 30°C. Uji sensitivitas bakteri dilakukan dengan meletakkan antibiotik novobiosin 30 µg dan *vibriostatic agent* O/129 150 µg pada permukaan medium Mueller-Hinton yang telah diinokulasi bakteri. Zona bening yang terjadi di sekitar cakram menunjukkan sensitivitas bakteri terhadap antibiotik.

Uji Enzim dan Toksin Ekstraselular

Uji enzim dan toksin ekstraselular meliputi pengujian kitinase, lesitinase, dan hemolisin dilakukan pada seluruh isolat bakteri. Setiap isolat terlebih dahulu dikultur ke dalam media *Tryptone Soya Broth* (TSB) (24 jam), dan dihitung jumlah koloni bakteri pada medium *Plate Count Agar* (PCA) dengan teknik *total plate count*, untuk mendapatkan jumlah sel yang hampir sama (Maturin & Peeler, 1998).

Aktivitas kitinase, lesitinase, dan hemolisin diketahui melalui perhitungan zona rasio menggunakan teknik *quantitative plate assay*

(Hsu *et al.*, 1981). Setiap satu media (dalam satu cawan petri) dibagi menjadi tiga bagian dengan sumur di bagian tengah. Setiap diameter sumur berukuran sama yaitu 2 mm. Sebanyak 5 µL suspensi bakteri ($12,7 \times 10^8$ cfu/mL) diambil dari setiap stok cair isolat dengan kepadatan yang hampir sama (24 jam), dan dimasukkan ke dalam setiap sumur. Media uji kemudian diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30°C. Adanya aktivitas kitinase ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar sumur, sedangkan aktivitas lesitinase ditandai dengan terbentuknya zona buram di sekitar sumur (Collins *et al.*, 1995; Donderski & Trzebiatowska, 1999). Masing-masing pengujian dilakukan tiga kali ulangan. Aktivitas enzim dan toksin dinyatakan dengan perbandingan rasio, antara lebar diameter zona yang terbentuk dibagi dengan lebar diameter sumur. Bakteri dinyatakan positif virulen, apabila zona rasio yang terbentuk ≥ 3 mm, variabel atau lemah apabila nilai zona rasio antara 1–2,9 mm; dan negatif virulen apabila tidak terbentuk zona (Hsu *et al.*, 1981; Supriyadi, 1990).

HASIL DAN BAHASAN

Sampel Ikan Nila

Dua puluh delapan ekor sampel ikan nila tidak menunjukkan tanda-tanda klinis adanya luka maupun pendarahan. Kondisi ikan tidak terinfeksi oleh bakteri, atau bakteri yang menginvasi tubuh ikan nila hanya sedikit, sehingga belum menimbulkan infeksi pada ikan nila. Selain itu, kondisi lingkungan perairan kemungkinan cukup stabil dan masih dalam batas toleransi yang dapat diterima oleh ikan nila. Menurut Eissa *et al.* (1994) dan Cipriano (2001) terjadinya infeksi pada ikan budidaya, termasuk ikan nila terutama akibat buruknya kualitas air, sehingga ikan mengalami stres, dan mudah terinfeksi bakteri patogen.

Dua ekor ikan nila mengalami pendarahan pada operkulum dan pangkal sirip ekor serta pembengkakan pada organ hati dengan warna yang pucat. Ikan nila dengan kondisi tersebut diduga disebabkan adanya infeksi bakteri. Menurut Robert (1993) dan Cipriano (2001), terjadinya pendarahan (hemoragik) pada pangkal sirip ekor, dan operkulum merupakan salah satu tanda infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen, salah satunya *Aeromonas* sp. Pendarahan yang terjadi diduga disebabkan oleh hemolisin yang dihasilkan oleh *A. hydrophila*. Menurut Higerd & Fowler (1997)

Tabel 1. Rerata rasio hasil uji lesitinase, kitinase, dan hemolisin 11 isolat bakteri (72 jam) dari 3 kali pengulangan

Table 1. Average ratio of lechitinase, chitinase, and haemolysine tests of 11 bacteria isolates (72 hours) from three replications

Nomor isolat <i>Isolate code</i>	Target organ <i>Organ target</i>	Jenis bakteri <i>Types of bacteria</i>	Lesitinase <i>Lechitinase</i> (mm)	Kitinase <i>Chitinase</i> (mm)	Hemolisin <i>Hemolysine</i> (mm)
A1G	Ginjal (<i>Kidney</i>)	<i>Aeromonas</i> sp.	7.9	8.0	6.6
A2L	Luka (<i>Wound</i>)	<i>Vibrio</i> sp.	6.8	8.7	5.4
A2G	Ginjal (<i>Kidney</i>)	<i>Vibrio</i> sp.	5.6	7.6	0
B7G	Ginjal (<i>Kidney</i>)	<i>Aeromonas</i> sp.	6.0	7.8	4.4
B9G	Ginjal (<i>Kidney</i>)	<i>Aeromonas</i> sp.	6.0	0	1.4
B9J	Jantung (<i>Heart</i>)	<i>Aeromonas</i> sp.	4.9	0	1.4
B3H	Hati (<i>Liver</i>)	<i>Enterococcus</i> sp.	0	0	0
B3HB	Hati bengkak <i>Chirrosis liver</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	0	0	0
B3G	Ginjal (<i>Kidney</i>)	<i>Enterococcus</i> sp.	0	0	0
C4aOT	Otak (<i>Brain</i>)	<i>Vibrio</i> sp.	0	2.2	0
C8OT	Otak (<i>Brain</i>)	<i>Pseudomonas</i> sp.	0	3.2	0

dan Chopra *et al.* (2000), hemolisin mampu melarutkan sel-sel darah merah pada ikan dan merusak sel jaringan tubuh serta mampu merusak sel-sel darah putih. Di lokasi pendarahan tersebut, terjadi hubungan interaksi antara sel reseptor spesifik dengan toksin. Del Bene & Schmidt (1997) melaporkan besar tidaknya kerusakan sel yang ditimbulkan oleh toksin ditentukan oleh kemampuan toksin dalam mencapai sel reseptor spesifik di dalam darah maupun jaringan, dan daerah perlekatan antara reseptor dan toksin.

Isolasi bakteri dari organ hati yang mengalami pembengkakan, ditemukan *Enterobacter* sp. Bakteri tersebut menurut Koesharyani *et al.* (2001), bukan termasuk bakteri patogen pada ikan yang dapat menyebabkan kerusakan organ hati. Terjadinya kelainan organ tersebut dapat disebabkan oleh infeksi bakteri lainnya, atau kekurangan nutrisi (Mims, 1987).

Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Isolasi bakteri dari organ dari luka (L), ginjal (G), hati (H), hati yang mengalami pembengkakan (HB), Jantung (J), dan otak (OT) 30 ekor ikan, menghasilkan 22 isolat dengan rincian delapan isolat dari petak A, sepuluh isolat dari petak B, dan empat isolat dari petak C. Hasil identifikasi 22 isolat tersebut ditemukan delapan genus bakteri, terdiri atas

lima bakteri gram negatif dan tiga bakteri gram positif.

Delapan genus bakteri tersebut yaitu, *Aeromonas* (isolat A1G, A3J, A4G, A8J, B7G, B9G, B9J, dan C4bOT), *Vibrio* (isolat A2L, A2G, B4G, B4HB, B9aJ, dan C4aOT), *Staphylococcus* (isolat A7G), *Plesiomonas* (isolat A9J), *Enterococcus* (isolat B3H, B3HB, dan B3G), *Chromobacterium* (isolat B4H), *Corynebacterium* (isolat C5OT), dan *Pseudomonas* (isolat C8OT).

Hasil isolasi dan identifikasi 22 isolat bakteri, delapan isolat teridentifikasi, dan termasuk dalam genus *Aeromonas* yang merupakan bakteri dominan yang dijumpai pada tubuh ikan nila. Bakteri tersebut sebagian besar diisolasi dari organ ginjal. Menurut Mims (1987) dan Sanders (2004), bakteri dapat dengan mudah mencapai organ ginjal melalui peredaran darah. Apabila fungsi ginjal terganggu oleh invasi dan infeksi bakteri, maka ikan dapat mengalami kematian.

Menurut Euzeby (1998), genus *Aeromonas* termasuk bakteri gram negatif yang bersifat motil dengan polar flagela. Bakteri tersebut berbentuk batang, tidak menghasilkan spora, oksidase dan katalase positif, bersifat fakultatif anaerob, memfermentasi glukosa, dan resisten terhadap *vibriostatic agent* 0/129.

Bakteri tersebut ditemukan di banyak inang, antara lain: ikan-ikan air kelompok

Cyprinidae, tilapia, katak, aligator, siput, udang air tawar, dan moluska. Beberapa spesies yaitu *A. caviae*, *A. Hydrophila*, dan *A. veronii* diisolasi dari organ pencernaan manusia dan bersifat oportunistik patogen pada manusia (Janda & Abbott, 1998).

Pengujian Kitinase, Lesitinase, dan Hemolisin

Pengujian kitinase, lesitinase, dan hemolisin dilakukan terhadap empat genus bakteri dengan 11 isolat, yaitu *Aeromonas* (A1G, B7G, B9G, dan B9J), *Vibrio* (A2L, A2G, dan C4aOT), *Enterococcus* (B3H, B3HB, dan B3G) dan *Pseudomonas* (C8OT). Data hasil uji *in vitro* dengan teknik *quantitative plate assay* dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil uji kitinolitik pada media kitinase-*chitin farm crab shells*, selama 72 jam memperlihatkan rasio tertinggi di antara genus *Aeromonas*, *Pseudomonas*, dan *Vibrio*, isolat bakteri A2L (*Vibrio* sp.) menghasilkan rasio tertinggi yaitu 8,7 mm. Menurut Inbar & Chet (1991), Donderski & Trzebiatowska (1999), dan Nasran *et al.* (2003), *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., dan *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri yang mampu menghasilkan koloidal kitin yang mampu menginduksi kitinase kompleks seperti N-asetilglukosaminidase dan endokitinase melalui preparasi hidrolisis parsial dengan HCL 10 N, sedangkan pada media uji *chitin farm crab shells* terjadi zona bening antara 3-5 mm. Pengujian kitinase bakteri *Vibrio* sp. mencapai hasil optimal pada suhu optimum 30°C, pH 7 dengan masa inkubasi optimum 192 jam.

Menurut Raven & Johnson (1986) dan Nugroho *et al.* (2003), kitin merupakan modifikasi dari selulosa, dengan penambahan nitrogen pada gugus glukosa. Zat tersebut dibangun oleh unit-unit monomer N-asetilglukosamin yang tersusun linier dengan ikatan β -(1,4). Rantai kitin antara satu dengan lainnya berasosiasi dengan ikatan hidrogen yang mengikat N dan H dengan kuat, dan dengan gugus C=O dari rantai yang berdekatan. Reaksi kitinolitik pemutusan ikatan β -1-4-glikosidik yang terjadi pada media uji menimbulkan zona bening di sekitar koloni bakteri.

Zona rasio yang dihasilkan *Vibrio* sp. (A2L) pada uji kitinase, memperlihatkan bakteri tersebut memiliki aktivitas kitinolitik lebih tinggi dalam pemutusan ikatan β -1-4-glikosidik pada kitin di dalam media uji dengan produk

hidrolisis N-asetil-D-glukosamin yang merupakan oligomer pendek. Reaksi tersebut ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri, yang menunjukkan terdegradasinya ikatan senyawa kitin tersebut (Wijaya, 2002).

Menurut Nasran *et al.* (2003) dan Harini & Septariningrum (2006), bakteri *Vibrio harveyi* mampu menghasilkan kitinase cukup tinggi yaitu antara $6,98 \times 10^6$ - $11,75 \times 10^6$ u/mL pada pH 6-8, dan terbukti bahwa *Vibrio harveyi* dan *Vibrio alginolyticus* mampu memproduksi kitinase untuk mendegradasi kitin yang berasal dari kulit rajungan. Enzim tersebut berfungsi untuk mendegradasi lapisan kitin inang atau host yang ditumpanginya, sehingga dapat dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber nutrisi. Bakteri dengan isolat A2L (*Vibrio* sp.), terbukti juga memiliki aktivitas kitinase yang tinggi dengan rasio 8,7 mm.

Hasil pengujian lesitinase pada media *Willis and Hobbs* selama masa inkubasi 72 jam, menunjukkan bahwa empat isolat *Aeromonas* sp. dan dua isolat *Vibrio* sp. mempunyai aktivitas lesitinase dengan rasio lebih dari 3 mm. Mengacu kepada Hsu *et al.* (1981) dan Supriyadi (1990), zona rasio yang dihasilkan oleh enam bakteri tersebut memperlihatkan kemampuan bakteri dalam melakukan aktivitas lesitinolitik pada media uji. Menurut Del Bene & Schmidt (1997) dan Chopra *et al.* (2000), lesitinase sebagai salah satu faktor virulen ekstraselular bagi *Aeromonas* sp. dan *Vibrio* sp. berfungsi mendegradasi membran plasma sel-sel tubuh ikan, membantu dalam proses invasi dan infeksi bakteri dan berperan penting dalam menentukan sifat patogen bakteri. Aktivitas lesitinase pada media uji, terlihat pada kemampuan enzim tersebut dalam memecah lesitin (fosfolipid) pada *egg yolk* di dalam media uji. Hasil hidrolisis fosfolipid menjadi fosfokolin dan digliserida tidak terlarut terlihat pada terbentuknya zona buram di sekitar koloni bakteri (Singleton & Sainsbury, 1978; Raven & Johnson, 1986).

Di antara dua genus bakteri tersebut, *Aeromonas* memiliki rasio tertinggi, yaitu 7,9 mm. Nilai tersebut menunjukkan bakteri tersebut memiliki kemampuan memutus rantai karbon pada fosfolipid di dalam media uji lebih banyak dalam waktu 72 jam.

Isolat A1G (*Aeromonas* sp.) memiliki rasio tertinggi dibandingkan isolat bakteri lainnya pada pengujian hemolisin menggunakan media agar darah, yaitu 6,6 mm. Zona atau halo

Tabel 2. Hasil uji biokimia bakteri *Aeromonas hydrophila* (A1G) masa inkubasi 24 jam

Table 2. Biochemical test of *Aeromonas hydrophila* (A1G) after 24 hours incubation

Jenis pengujian <i>Types of treatment</i>	Hasil <i>Result</i>
Pengamatan morfologi koloni	Warna : kuning tua cembung, tepi rata
Pengecatan gram	-
Oxidase	+
Katalase	+
Pergerakan (<i>Motility</i>)	Motil
Oksidatif /Fermentatif	O/F
Reaksi Indol	+
Ornithin dekarboksilase	+
Fermentasi TSIA	A /A H2S
Lisin dekarboksilase (LIA)	+ H2S
Kolera medium/ TCBS	Koloni kuning
TSA 37 °C	Tumbuh
Brilian Green Agar	Kuning
Mc.Conkey Agar	Merah jambu
Urease	+
Simmon Citrat	+
Hidrolisis Gelatin	-
Phenil Alanin diaminase	+
<i>Aeromonas</i> Agar Base	Koloni hitam
Glucosa	+ asam
Voges-Proskauer	+
Sorbitol	+ asam
Arabinosa	+ asam
Dulcitol	-
Laktosa	+ asam
Manitol	+ asam
Inositol	-
Sucrosa	+ asam
O129 10 µg	R
Novobiocin 30 µg	R

Keterangan: R = resisten (*note: R=resistant*)

yang terbentuk pada media agar darah dari inokulasi bakteri *Aeromonas* sp. (A1G), (B7G) dan *Vibrio* sp. (A2L) pada masa inkubasi 72 jam adalah zona hijau (α -hemolisis), setelah mencapai 96 jam membentuk zona bening (β -hemolisis). Keadaan tersebut memperlihatkan kemungkinan proses hemolisis sempurna yang memerlukan waktu lebih lama. Inokulasi bakteri *Aeromonas* sp. (isolat B9G dan B9J) pada media agar darah selama 96 jam tetap memperlihatkan zona hijau atau α -hemolisis,

yang menunjukkan terjadi proses hemolisis tidak sempurna.

Nilai rasio tinggi, pada *Aeromonas* sp. (A1G) memperlihatkan aktivitas hemolisis bakteri sangat tinggi. Hal tersebut disebabkan oleh hemolisin yang mampu melisiskan sel-sel darah merah dalam waktu cepat, dan nekrotoksin yang dapat menyebabkan nekrosis pada jaringan. Hasil uji hemolisis *Aeromonas* sp. (A1G), sesuai dengan hasil penelitian Santos *et al.* (1999) bahwa *A. caviae*,

A. Eucrenophila, dan *A. hydrophila* menghasilkan β -hemolisis pada pengujian hemolitik.

Hemolisin, menurut Buckley & Howard (1999), adalah protein yang mampu merusak membran sel, dan melisiskan sel-sel darah merah. Hemolisin dan nekrotoksin bekerja bersinergi dan menyebar melalui sirkulasi peredaran darah (Mims, 1987). Kemampuan menghasilkan toksin ekstraselular berupa hemolisin, menjadi indikator dalam menentukan virulensi bakteri (Lallier *et al.*, 1981; Santos *et al.*, 1999).

Identifikasi Bakteri dari Isolat Nomor A1G

Hasil identifikasi bakteri secara konvensional dengan biokimia lengkap sampai tingkat spesies dari isolat nomor A1G, menunjukkan bakteri tersebut adalah *Aeromonas hydrophila*. Identifikasi bakteri berdasarkan *reference strain* pada ATCC (7966) (Nieto *et al.*, 1985; Holt *et al.*, 1994).

Bakteri menunjukkan warna koloni krem kekuningan (Staedler no.137) pada media BHIA, bentuk cembung dan tepi rata dengan diameter ± 2 mm. Bakteri berbentuk batang pendek, dengan pergerakan aktif. Bentuk dan warna koloni serta karakteristik *A. hydrophila* seperti tercantum pada Tabel 2.

Virulensi *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila memiliki aktivitas tertinggi dalam memproduksi enzim lesitinase dan hemolisin, tetapi berada di bawah rasio *Vibrio* sp. dalam menghasilkan kitinase. Rasio yang dihasilkan tetap berada di atas nilai batas virulen, yaitu > 3 mm, hal tersebut menunjukkan *A. hydrophila* tetap memiliki virulensi tertinggi, dibandingkan bakteri *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., dan *Vibrio* sp. Kemampuan *A. hydrophila* dalam menginvasi tubuh inang atau *host* nya, adalah melalui mekanisme kerja toksin yang dikeluarkan pada saat bakteri menempel di permukaan kulit ikan. Eissa *et al.* (1994) dan Angka *et al.* (1995), mengemukakan bahwa terjadinya wabah penyakit di dalam suatu kolam budidaya ikan, sebagai *primary pathogen* adalah *A. hydrophila*, yang diikuti oleh infeksi bakteri patogen jenis lainnya.

Kitinase, lesitinase, dan hemolisin merupakan suatu asosiasi yang bekerja bersinergi, dapat diproduksi pada saat

bersamaan atau terpisah. Del Coral *et al.* (1990) menyatakan faktor utama penentu tingginya patogenitas dari suatu penyakit, antara lain jenis mikroorganisme penyebab penyakit, daya tahan tubuh ikan yang lemah, dan kondisi lingkungan perairan yang buruk.

Menurut Swann & White (1991) dan Chopra *et al.* (2000), enzim kitinase, lesitinase, dan toksin ekstraselular hemolisin yang dikeluarkan oleh *A. hydrophila* dapat merusak kultur jaringan, dan menimbulkan kerusakan pada jaringan tubuh ikan. Ikan budidaya air tawar seperti ikan mas koki (*Carasius auratus*), ikan mas (*Cyprinus carpio*), ikan nila (*Oreochromis niloticus*), Catfish, *Rainbow trout*, dan air laut seperti *Lates calcalifer* dan *Epinephelus* sp. dapat terinfeksi oleh *A. hydrophila*, dan akan menunjukkan gejala berenang lemah, menggantung dipermukaan air, terjadi nekrosis pada jaringan, sel darah merah mengalami lisis, dan hemoragik di permukaan tubuh. Populasi ikan dengan kondisi demikian dapat mengalami kematian hingga 100% (Angka *et al.*, 1995; Cipriano, 2001).

KESIMPULAN

Delapan genus bakteri teridentifikasi dari 22 isolat yang diisolasi dari organ ginjal, hati, jantung, otak, dan luka 30 ekor sampel ikan nila yang berasal dari KJA Waduk Jatiluhur, yaitu: *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*., *Staphylococcus*, dan *Vibrio*. *Vibrio* sp. (A2L), menghasilkan zona rasio yang paling tinggi pada uji kitinase yaitu 8,7 mm. *Aeromonas* sp. (A1G), menghasilkan zona rasio pada uji kitinase 8,0 mm; uji lesitinase 7,9 mm; dan uji hemolisin 6,6 mm serta diidentifikasi secara konvensional sebagai *Aeromonas hydrophila* Lin.

DAFTAR ACUAN

- Angka, S.L., Lam, T.J., & Sin, Y.M. 1995. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking cat fish (*Clarius gariepinus*). *Aquaculture*, 130(2): 103-112.
- Amos, K.H. 1985. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. *Fish health section*. American fisheries society. Corvallis, Oregon, 114 pp.
- Bassler, G. 1997. *Colorguide of tropical fish diseases on fresh water*. Bessler Biofish, Belgium, 272 pp.

- Buckley, J.T. & Howard, S.P. 1999. The cytotoxin enterotoxin *Aeromonas hydrophila* is aerolysin. *Infection and Immunity*, 67(1): 466-467.
- Cipriano, R.C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and motile *Aeromonas septicemia* of fish. *Fish diseases leaflet* 68. United States Department of the Interior fish and wild life service division of fisheries research Washington DC, 25 pp.
- Collins, C.H., Lyne, P.M., & Grange, J.M. 1995. *Microbiological methods*. Butterworth-Heinemann Ltd, London, 493 pp.
- Chopra, A.K., Xu, X.J., Ribardo, D., Gonzales, M., Kuhl, K., Peterson, J.W., & Huston, C.W. 2000. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infection and immunity*, 68(5): 2,808-2,818.
- Cowan, S.T. & Steel, K.J. 1985. *Manual for identification of medical bacteria*. 2nd ed. 1985. Cambridge University Press, Cambridge, 238 pp.
- Del Bene, V. & Schmidt, M.G. 1997. Bacterial virulence factors. *Dalam: Virella, G. (Ed.). Microbiology and infectious disease*. 3rd ed. William & Wilkins, Baltimore, p. 65-70.
- Del Coral, F., Shotts, E.B., & Brown, J. 1990. Adherence haemagglutination and cell surface characteristics of *Motile Aeromonads* virulent for fish. *Journal of Fish Diseases*, 13: 255-268.
- Donderski, W. & Trzebiatowska, M. 1999. Influence of physical and chemical factors on the activity of chitinase produced by planktonic bacteria isolated from Jeziorak lake. *Polish journal of environment studies*, 9(2): 77-82.
- Eissa, I.M., Badran, A.F., Moustafa, M., & Fetaih, H. 1994. Contribution to *Motile Aeromonas* in some cultured and wild fresh fish. *Veterinary Medical journal Giza*, 42(1): 62-69.
- Euzeby, J.P. 1998. Necessary correction according to judicial opinions. *International journal systematic bacteriology*, 613 pp.
- Harini, N. & Septariningrum, D. 2006. Karakterisasi enzim chitinase hasil isolasi dari kultur murni bakteri *Vibrio alginolyticus*. *Prosiding seminar nasional tahunan III hasil penelitian perikanan dan kelautan*. Murwantoko, I. Yusuf, Djumanto, A. Inansetyo & S.B. Priyono (Eds.). Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, p. 557-565.
- Higerd, T.B. and S. Fouler. 1997. Gram positive cocci: *Staphylococci* and *Streptococci*. *Dalam: Virella, G. (Ed.). Microbiology and infectious disease*. 3rd ed. William & Wilkins, Baltimore, p. 101-112.
- Holt, J.G., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T., & Williams, S.T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 787 pp.
- Hsu, T.C., Walman, W.D., & Shotts, E.B. 1981. Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regard to virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Dalam: Karger, S. (Ed.). 1981. Serodiagnostics and vaccines. International Symposium on Fish Biologics*. National Fish Health Research Laboratory, Leetown USA, April 26-30, 1981. USA, p. 101-111.
- Huys, G., Kampfer, P., Albert, M.J., Kuhn, I., Denys, R., & Swings, J. 2002. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhoea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943 (Approved list 1980). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52: 705-712.
- Inbar, J. & Chet, I. 1991. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne plant pathogens by this bacterium. *Soil biological biochemical*, 23: 973-978.
- Janda, J.M. & Abbott, S. 1998. Evolving concepts regarding the Genus *Aeromonas* an expanding panorama of species, disease presentations and unanswered questions. *Clinical infection disease*, 27: 332-344.
- Koesharyani, I., Roza, D., Mahardika, K., Johnny, F., Zafran, & Yuasa, K. 2001. *Penuntun diagnosa penyakit ikan II. Penyakit ikan laut dan krustacea di Indonesia*. Balai Penelitian Perikanan Laut Gondol & JICA, 49 hlm.
- Lallier, R., Mittal, K.R., Leblance, D., Lalonde, G., & Olivier, G. 1981. Rapid methods for differentiation of virulent and non virulent *Aeromonas hydrophila* strains. *Dalam: Karger, S. (Ed.). 1981. Serodiagnostics and vaccines. International Symposium on Fish Biologics*. National Fish Health Research Laboratory, Leetown USA, April 26-30, 1981. USA, p. 119-123.

- Maturin, L.J. and Peeler, J.T. 1998. Aerobic plate count. *Dalam: 8th ed. FDA bacteriological analytical manual*. AOAC International, New York, p. 1-10.
- Mims, C.A. 1987. *The pathogenesis of infectious disease*. 3rd ed. Department of Microbiology Guys Hospital Medical School. Academic Press, London, 342 pp.
- Nasran, S., Ariyani, F., & Indriyati, N. 2003. Produksi kitinase dan kitin deasetilase dari *Vibrio harveyi*. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 9(5): 33-38.
- Nitimulyo, K.H. 1994. *Determinasi bakteri patogen pada ikan*. Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, 120 hlm.
- Nieto, T.P., Corcobado, M.J.R., Toranzo, A.E., & Barja, J.L. 1985. Relation of water temperature to infection of *Salmo gairdneri* with *Motil Aeromonas*. *Dalam: Fish pathology*. International Seminar on Fish Pathology, Tokyo, September 2 -3, 1985. Tokyo, Jepang, 20: 99-105.
- Noga, J.E. 2000. *Fish disease diagnosis and treatment*. Iowa State Press, USA, 366 pp.
- Nugroho, T.T., Ali, M., Ginting, C., Wahyuningsih, Dahliaty, A., Devi, S. & Sukmarisa, Y. 2003. Isolasi dan karakterisasi sebagian kitinase *Trichoderma viride* TNJ63. *Jurnal Natur Indonesia*, 5(2): 101-106.
- Oxoid. 1988. *The manual*. 8thed. Bridson, E.Y. (Ed.). Oxoid limited, Hampshire, England, 341 pp.
- Post, G. 1987. *Textbook of fish health*. T.F.H Publication, Inc. USA, 287 pp.
- Raven, P.H. & Johnson, G.B. 1986. The chemical building blocks of life. *Dalam: Biologi*. Times Mirror, St.Louis, p. 55-79.
- Roberts, R.J. 1993. *Motil Aeromonad septemia Dalam: English, V., Roberts, R.J., & Bromage, N.R. (Eds.). 1993. Bacterial diseases of fish* Institute of Aquaculture. Blackwell Science Ltd, London, p. 143-156.
- Sanders, M.A. 2004. *Patologi anatomi*. Raja Grafindo Perkasa, Jakarta, 211 pp.
- Santos, J.A., Gonzalez, C.J., Otero, A., & Lopez, M.L.G. 1999. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *American society for microbiology - Applied and environmental microbiology*, 65(12): 5,612-5,614.
- Singleton, P. & Sainsbury, D. *Dictionary of microbiology*. 1978. John Wiley & Sons, New York, 481 pp.
- Supranto, J. 1993. *Metode ramalan kuantitatif untuk perencanaan ekonomi dan bisnis*. Rineka Cipta, Jakarta, 220 hlm.
- Supriyadi, H. 1990. Characterization and virulence studies of *Motile Aeromonads* isolated from *Clarias batrachus* and *C. gariepinus* and their immunization potential. *Thesis*. The degree of master science. Universiti Pertanian Malaysia, 112 pp.
- Supriyadi, H. 2004. Manajemen kesehatan ikan pada usaha budidaya ikan dalam karamba jaring apung. *Dalam: Sudrajat, A, S.E. Wardoyo, Z.I. Anwar, H. Supriyadi (Eds.). 2004. Suatu upaya pemecahan masalah budidaya ikan dalam karamba jaring apung*. Prosiding Pengembangan Budidaya Perikanan di Perairan Waduk. Pusat Riset Perikanan Budidaya, Jakarta, hlm. 31-36.
- Supriyadi, H., Widiyati, A., Sunarto, A., & Prihadi, T.H. 2005. Keragaan penyakit bakterial ikan nila (*Oreochromis niloticus*) pada karamba jaring apung (KJA) di lokasi berbeda. *Jurnal Pen. Perik. Indonesia edisi Akuakultur*, 9(2): 35-41.
- Supriyadi, H. dan Komarudin, O. 2003. Kerusakan jaringan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang terinfeksi *streptococcus*. *Jurnal Pen. Perik. Indonesia*, 11(7): 35-38.
- Swann, L.D. and White, M.R. 1991. Diagnosis and treatment of *Aeromonas hydrophila* infection of fish. *Aquaculture extention*, Sea Grant, 2 pp.
- Wijaya, S. 2002. Isolasi kitinase dari *Scleroderma columnare* dan *Trichoderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Dasar Biologi*, 3(1): 30-35.