

Toksisitas Produk Ekstraseluler dan Intraseluler Bakteri *Pseudomonas* sp. pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

(TOXICITY OF EXTRACELLULAR AND INTRACELLULAR PRODUCT
OF PSEUDOMONAS SP IN TILAPIA (OREOCHROMIS NILOTICUS))

Esti Handayani Hardi, Catur Agus Pebrianto, Gina Saptiani

Laboratorium Mikrobiologi Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Universitas Mulawarman, Jln. Gunung Tabur Kampus Gunung Kelua
Samarinda, Kalimantan Timur, email : estie_hardie@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui toksisitas ekstraseluler product (ECP) dan intraseluler product (ICP) *Pseudomonas* sp. pada ikan nila. Uji dilakukan dengan menginjeksi ECP dan ICP yang diperoleh dari biakan bakteri *Pseudomonas* sp. pada dua media dan waktu inkubasi berbeda. Sebanyak 40 ekor ikan nila berukuran 15 g digunakan dalam penelitian ini. Produk *Pseudomonas* sp. diperoleh dari bakteri yang ditanam pada *Trypticase Soya Agar* (TSA) dan *Trypticase Soy Broth* (TSB), bakteri diinkubasi selama 24, 48 dan 72 jam. *Slurry* berupa suspensi bakteri kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000 g, selama 30 menit pada suhu 4°C untuk memperoleh ECP dan pada suhu ruang untuk mendapatkan ICP. Supernatan disaring dengan *filter paper* 0,45 µm. Hasil yang diperoleh, berupa kematian ikan yang diinjeksi ICP 72 jam terjadi pada enam jam pascainjeksi dan mencapai 100%, sedangkan ECP menyebabkan kematian pada jam ke 12 pascainjeksi dengan kematian 60%. Ikan menunjukkan gejala berenang *whirling* pada jam ke 24 ditemukan pada ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dari media TSA 48 jam, dan tidak terjadi pada ikan diinjeksi dengan ECP maupun ICP jenis lain. Perubahan pada mata berupa keruh kornea (*opacity*) dan eksophtalmia terjadi pada jam ke 48 pascainjeksi dengan ECP maupun ICP dari kedua media. Ikan yang diinjeksi dengan ICP tampak lebih cepat mengalami perubahan pada organ dalam, hati dan ginjal tampak berwarna pucat. Bahan ECP dan ICP merupakan faktor virulensi dari *Pseudomonas* sp. Namun, ICP menyebabkan kematian lebih cepat dibandingkan dengan ECP. Kedua media tumbuh berpengaruh terhadap ECP dan ICP yang dihasilkan. Produk ECP dan ICP dengan waktu inkubasi 24-48 jam pada suhu 30°C lebih bersifat toksik dibandingkan yang diinkubasi 72 jam.

Kata-kata kunci : ECP, ICP, *Pseudomonas* sp., *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT

The aim of the research was to investigate the toxicity of extracellular product (ECP) and intracellular product (ICP) of *Pseudomonas* sp. on tilapia. A total of 40 tilapias weighing 15 grams were injected with ECP and ICP. The ECP and ICP were harvested from *Pseudomonas* sp. culture on two kinds of culture media and different time of incubation. The *Pseudomonas* was cultured on trypticase soy agar (TSA) and trypticase soy broth (TSB) and incubated at 24, 48 and 72 hours. The slurry of the bacteria was centrifuged at 10000 g, for 30 minutes on 4°C to get ECP and in room temperature to get ICP. The supernatant was filtered with 0.45 µm paper mesh. A hundred percent mortality was found in tilapia six hours post injection with ICP (72 hours) whereas tilapias were injected with ECP caused 60% mortality in 12 hours. The tilapia showed whirling at 24 hour post injected with ECP of *Pseudomonas* sp which was cultured in TSA for 48 hours incubated. Opacity of the cornea and exophtalmia were occurred at 48 hours post injection of ECP and ICP which were harvested from both media. Injection of ICP caused pathology changes on internal organ of fish i.e. pale appearance of spleen and liver. In conclusion, the ECP and ICP were a virulence factors of *Pseudomonas* sp. and the ICP seem more pathogenic and caused mortality than ECP. Both culture media and time of incubation influence of ECP and ICP production. The ECP and ICP which were harvested from *Pseudomonas* sp incubate for 24-48 hour more virulent than 72 hour.

Keywords : ECP, ICP, *Pseudomonas* sp., *Oreochromis niloticus*

PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) banyak dibudidayakan masyarakat Kabupaten Kutai Kartanegara, Kalimantan Timur dengan memanfaatkan aliran Sungai Mahakam. Produksi budidaya ikan nila dari daerah ini mampu memenuhi konsumsi ikan nila untuk daerah Kutai Kartanegara, Samarinda, Balikpapan bahkan kota lain di Kalimantan Timur. Serangan penyakit ikan sering terjadi pada sistem budidaya Karamba Jaring Apung (KJA) karena sistem budidaya ini benar-benar memanfaatkan sumber air tanpa melakukan pengolahan air terlebih dahulu. Penyakit yang ditemukan menginfeksi ikan nila tahun 2011-2013 adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas* dan *Pseudomonas*. Kedua bakteri ini ditemukan bersamaan pada ikan nila dengan tingkat patogenisitas yang cukup tinggi. Awal tahun 2011, ikan nila yang dibudidayakan dalam KJA di Loa Kulu, Kutai Kartanegara, Kalimantan Timur mengalami kematian melebihi 60%, dengan gejala eksophtalmia, warna tubuh menjadi pucat, sirip gripis dan ditemukan adanya luka pada daerah terinfeksi (Hardi dan Pebrianto, 2012). Hasil pengujian tingkat patogenisitas *Pseudomonas* sp. diketahui bahwa kematian ikan nila uji yang diinjeksi dengan bakteri *Pseudomonas* sp kepadatan 10^{10} cfu/mL mencapai 80% (Hardi, 2012).

Patogenisitas dari bakteri *Aeromonas* dan *Pseudomonas* dapat disebabkan oleh banyak faktor. Produk ekstraseluler dari kedua bakteri diduga sebagai salah satu faktor virulensi yang mengandung beberapa enzim dan hemolisin yang menyebabkan sitotoksik, sitolitik, hemolitik dan enterotoksik pada ikan terinfeksi (Sahu *et al.*, 2011). Menurut Allan dan Stevenson (1981), fraksinasi dari ECP *Aeromonas hydrophila* mengandung toksin yang memiliki aktivitas hemolitik, sedangkan Kanai dan Wakabayasi (1984) menjabarkan bahwa protease berperan lebih besar dalam aktivitas toksik bakteri yang sama. Hasil pengamatan pada karakteristik bakteri *Pseudomonas* sp. asal Loa Kulu Kutai Kartanegara menunjukkan karakteristik yang hampir sama dengan *A. hydrophila* diduga faktor virulensi kedua bakteri ini tidak berbeda. Dugaan adanya bahan toksin dalam ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. perlu dilakukan untuk mengetahui mekanisme infeksi pada ikan nila.

METODE PENELITIAN

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan adalah ikan nila (*O. niloticus*) berukuran 15 g yang berasal dari Loa Kulu, Kutai Kartanegara. Ikan berasal dari satu sumber dan diadaptasi serta dikarantina dalam akuarium uji selama tujuh hari sebelum digunakan, untuk memastikan tidak ada gejala penyakit aeromonosis dan pseudomonosis.

Bakteri *Pseudomonas* sp.

Isolat bakteri *Pseudomonas* sp. berasal dari ikan nila asal Loa Kulu, Kutai Kartanegara, yang mengalami eksophtalmia, luka pada permukaan tubuh, sirip gripis, dan berenang lemah, yang telah diidentifikasi, uji karakteristik dan postulat Koch di laboratorium Mikrobiologi Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Mulawarman (Hardi dan Pebrianto, 2012).

Isolasi Produk Ekstraseluler (ECP) dan Produk Intraseluler (ICP)

Isolasi ECP mengikuti prosedur Sirirat *et al.*, (1999) yang dimodifikasi, dengan urutan kerja : bakteri dikultur dalam media cair *Trypticase Soya Broth* (TSB) dan *Trypticase Soy Agar* (TSA). Kultur bakteri diinkubasi selama 24, 48, dan 72 jam pada suhu 30°C. Bakteri yang tumbuh pada media TSB dan bakteri yang tumbuh dalam media TSA (terlebih dahulu ditambahkan *Phospat Buffer Saline*/PBS sebanyak 5 mL) kemudian dipanen. *Slurry* berupa suspensi bakteri kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan disaring dengan *filter paper* 0,45 µm dan selanjutnya hasil filtrasi digunakan untuk pengujian toksisitas ECP terhadap ikan nila.

Isolasi ICP, diawali dengan prosedur yang sama dengan isolasi ECP, hanya saja kultur bakteri (TSB) dan *slurry* (TSA) disentrifus pada kecepatan 10000 g selama 30 menit pada suhu ruang. Supernatan yang dihasilkan juga disaring dengan *filter paper* 0,45 µm dan selanjutnya hasil filtrasi digunakan untuk pengujian toksisitas ICP terhadap ikan nila.

Pengujian Toksisitas Total ECP dan ICP terhadap Ikan Nila

Untuk membuktikan adanya kandungan bahan toksin dalam ECP dan ICP *Pseudomonas*

sp. yang menyebabkan perubahan gejala klinis dan kematian ikan nila dilakukan uji toksisitas. Uji ini juga bertujuan untuk mengetahui biakan bakteri pada media dan lama kultur yang menghasilkan ECP dan ICP yang bersifat toksik terhadap ikan nila.

Produk ECP dan ICP yang digunakan merupakan hasil isolasi sebelumnya dan diinjeksikan secara *intraperitoneal* (IP) ke 10 ekor ikan sebanyak 0,2 mL/ekor. Ikan dipelihara dalam akuarium selama tujuh hari dan masing-masing akuarium berisi 30 L air. Terhadap ikan uji dilakukan pengamatan kematian ikan, perubahan pola renang, perubahan nafsu makan dan patologi anatomi organ luar dan organ dalam serta pengamatan histopatologi organ mata, otak dan ginjal ikan pada jam ke 6, 12, 24, 48, 72, 96 hingga hari ke tujuh.

Parameter yang Diukur

Pengamatan yang dilakukan adalah tingkah laku berenang pada kolom air, respons terhadap pakan yang diberikan, perubahan anatomi organ luar dan organ dalam, histopatologi dan kematian ikan. Tingkah laku berenang yang diamati berupa perubahan gerakan pada kolom air, tingkah laku makan yaitu mengamati respons ikan terhadap pakan yang diberikan. Pengamatan terhadap perubahan anatomi organ luar yaitu mengamati kondisi mata, warna tubuh, ada tidaknya luka dan pendarahan, sedangkan perubahan anatomi organ dalam yang diamati berupa perubahan warna, bentuk dan konsistensi organ. Pengamatan histopatologi dilakukan pada organ mata, otak dan ginjal ikan nila pascainjeksi dengan ECP dan ICP. Kematian diamati dengan menghitung jumlah ikan yang mati tiap jamnya.

Analisis Data

Percobaan ini dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Data berupa perubahan tingkah laku berenang, perubahan pola makan dan perubahan patologi anatomi (makroskopis dan mikroskopis) dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

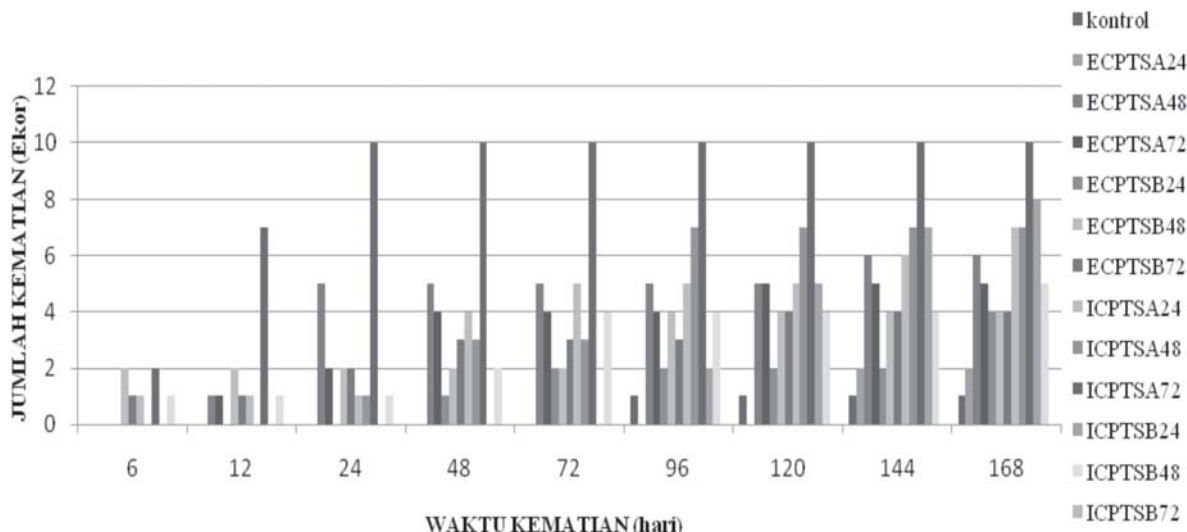
Kematian Ikan Nila

Jumlah kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP disajikan pada Gambar 1. Kematian ikan yang diinjeksi

dengan ICP lebih tinggi (50-100%) dibandingkan dengan ECP (20-60%). Perbedaan media tumbuh dan waktu inkubasi juga berpengaruh terhadap tingkat kematian. Bakteri *Pseudomonas* sp. yang diinkubasi pada media padat dengan waktu inkubasi 72 jam menghasilkan ICP yang dapat menyebabkan kematian 100% ikan uji. Hal ini dapat disebabkan karena kandungan bahan toksin dalam intraselular produk lebih banyak jumlahnya, juga protein dalam ICP diduga merupakan salah satu faktor virulensi *Pseudomonas* sp. Menurut Hardi *et al.*, (2011) protein di dalam ECP bakteri *Streptococcus agalactiae* yang ditumbuhkan dalam media padat *Brain Heart infusion Agar* (BHIA), konsentrasinya lebih tinggi begitu pula jenis proteinnya, inilah yang menjadi penyebab kematian ikan yang diinjeksi ECP BHIA lebih cepat, dibandingkan dengan yang ditumbuhkan di media cair *Brain Heart infusion* (BHI).

Kematian ikan yang diinjeksi ECP bakteri *Pseudomonas* sp. umumnya mulai terjadi 12 jam pascainjeksi dan kematian terus terjadi hingga hari ke 7 pemeliharaan yang mencapai 60%, sedangkan yang diinjeksi dengan ICP, ternyata kematian sudah terjadi pada 6 jam pascainjeksi dengan kematian mencapai 100% (Gambar 1).

Kematian yang terjadi secara cepat dan banyak, yaitu dalam waktu 6 jam dan kematian mencapai 100% pada 24 jam pascainjeksi dengan ICP, hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya beberapa enzim seperti hemolisin, lipase, elastase, gelatinase, chitinase (Austin dan Austin, 2007). Karunakaran (1994), mengemukakan bahwa enzim hemolitik dihasilkan oleh bakteri *Aeromonas caviae* pada fase stasioner. Jika dilihat dari data kematian yang diinjeksi dengan ICP diketahui bahwa jam ke 6–24 merupakan fase eksponensial dan stasioner bakteri *Pseudomonas* sp. Sahu *et al.*, (2011) begitu pula Khalil dan Mansour, (1997) melaporkan bahwa aktivitas hemolitik bakteri *A. hydrophila* tertinggi pada bakteri yang diinkubasi pada suhu 35°C selama 30 jam dan aktivitas terendah pada suhu 25°C. Produk hemolisin dihasilkan bakteri ke dalam media tumbuh selama fase eksponensial dan menurun produksinya pada fase stasioner. Sementara itu Pridgeon *et al.*, (2013) melaporkan bahwa ada sekitar 30 jenis fraksi dalam ECP bakteri *A. hydrophila* dan sembilan fraksi dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan insang. Kesembilan fraksi ECP tersebut mengandung



Gambar 1. Kematian kumulatif ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas sp.*

Keterangan :

- ECPTSA24 : produk ekstraselluler bakteri yang diinkubasi pada media TSA waktu inkubasi 24 jam
- ICPTSA24 : produk intraselluler bakteri yang diinkubasi pada media TSA waktu inkubasi 24 jam
- ECPTSA48 : produk ekstraselluler bakteri yang diinkubasi pada media TSA waktu inkubasi 48 jam
- ICPTSA48 : produk intraselluler bakteri yang diinkubasi pada media TSA waktu inkubasi 48 jam
- ECPTSA72 : produk ekstraselluler bakteri yang diinkubasi pada media TSA waktu inkubasi 72 jam
- ICPTSA72 : produk intraselluler bakteri yang diinkubasi pada media TSA waktu inkubasi 72 jam
- ECPTSB24 : produk ekstraselluler bakteri yang diinkubasi pada media TSB waktu inkubasi 24 jam
- ICPTSB24 : produk intraselluler bakteri yang diinkubasi pada media TSB waktu inkubasi 24 jam
- ECPTSB48 : produk ekstraselluler bakteri yang diinkubasi pada media TSB waktu inkubasi 48 jam
- ICPTSB48 : produk intraselluler bakteri yang diinkubasi pada media TSB waktu inkubasi 48 jam
- ECPTSB72 : produk ekstraselluler bakteri yang diinkubasi pada media TSB waktu inkubasi 72 jam
- ICPTSB72 : produk intraselluler bakteri yang diinkubasi pada media TSB waktu inkubasi 72 jam

228 protein diantaranya adalah *hemolysin*, *aerolysin*, *elastase (metalloprotease)*, *nuclease*, dan *50-nucleotidase*. Protein tersebut merupakan faktor penyebab ikan lele sakit dan mati. Penginjeksian dengan *P. anguilliseptica* dan *P. fluorescens* menyebabkan kematian pada ikan *Labeo rohita* dan *Caprinus carpio* sebesar 100% dengan kepadatan 2×10^6 CFU/ml.

Perubahan Pola Renang

Pola renang ikan nila yang diinjeksi dengan ECP menunjukkan adanya abnormalitas (Tabel 1), perubahan pola renang yang muncul sama dengan pola renang saat diinjeksi dengan bakteri sel utuh (Hardi, 2012). Penginjeksian ECP bakteri *Pseudomonas sp.* menyebabkan ikan berenang *whirling* (miring) pada jam ke-24 pascainjeksi (TSA waktu inkubasi 48 dan 72 jam). Gejala umum yang muncul saat penginjeksian dengan ICP adalah ikan berenang lemah, diam di dasar akuarium, dan mengalami gangguan pernafasan sehingga ikan

berenang dengan posisi mulut berada di bawah permukaan air (*gaspng*) yang dimulai pada jam ke-12 baik yang ditumbuhkan di media padat maupun cair. Umumnya perubahan pola renang baru terjadi pada jam ke 24 pascainjeksi dengan gejala awal ikan berenang *gaspng*, lemah dan bukaan operkulum lemah. Berenang *whirling* hanya tampak pada ikan yang diinjeksi dengan ECP yang diinkubasi pada 48 jam, hal ini menunjukkan bahwa bahan ECP menyebabkan kerusakan pada otak ikan sehingga keseimbangan berenang ikan terganggu. Menurut Hardi *et al.* (2011) ikan yang menunjukkan pola berenang *whirling* disebabkan karena adanya kerusakan pada bagian otak bagian tengah (*metencephalon*). Bagian terpenting dari metacephalon adalah *cerebellum* yang fungsi utamanya mengatur keseimbangan tubuh dalam air. Pada otak ikan nila yang diinjeksi dengan ECP bakteri *S. agalactiae* mengalami nekrosis dan hiperemi, kedua kerusakan inilah yang menyebabkan

Tabel 1 Perubahan pola renang ikan nila pada uji toksisitas ekstrasellular dan intrasellular produk bakteri *Pseudomonas* sp. yang ditumbuhkan pada media dan waktu inkubasi yang berbeda

Perlakuan	Waktu Pengamatan (Jam ke)									
	3	6	12	24	48	72	96	120	144	168
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Extracellular Product</i>										
TSA 24	-	-	-	-	E,D	B	-	C	-	-
TSA 48	-	-	-	A,B,D	-	-	-	-	-	-
TSA 72	-	-	-	C,D,F	C	-	B	B	B,D,F	-
TSB 24	-	-	-	-	B,D	C	-	-	-	-
TSB 48	-	-	-	C	D	-	-	-	-	-
TSB 72	-	-	-	C,D,F	C	C	-	B	C,D,F	-
<i>Intracellular Product</i>										
TSA 24	-	-	-	B,C,E	D	-	-	-	-	-
TSA 48	-	-	-	-	-	C	D	-	-	-
TSA 72	-	-	-	C,D,F	-	-	-	-	-	-
TSB 24	-	-	-	C,E	D	B	-	-	-	-
TSB 48	-	-	-	B	D	-	-	-	-	-
TSB 72	-	-	-	D,F	-	-	-	-	D,F	-

Keterangan:

TSB = *Trypticase Soya Broth* (TSB); TSA= *Trypticase Soy Agar*;

A = Berenang berputar (*whirling*); B=Mengambil udara tepat di bawah permukaan air (*gasping*); C. Diam di dasar;

D = Reflek lambat; E= Berenang lemah; F=Bukaan operkulum lambat

ikan mengalami abnormalitas dalam berenang yaitu ikan berenang miring bahkan *whirling*. Yardimci dan Aydin (2011) melaporkan bahwa ikan nila yang diinjeksi secara intraperitoneal dengan *A. hydrophila* menunjukkan gejala berenang lemah, megap-megap, dan berenang di permukaan. Umumnya ikan yang terinfeksi bakteri patogen menunjukkan gejala yang sama.

Perubahan pola makan terjadi hampir pada seluruh ikan yang diinjeksi dengan ECP. Ikan berkurang nafsu makannya sejak 24 jam pertama pascainjeksi. Hal ini disebabkan oleh ECP yang masuk dalam otak ikan yang merusak *hipotalamus* sehingga mengganggu keseimbangan rasa lapar ikan.

Perubahan Anatomi Organ Ikan Nila

Pada pengujian patogenisitas ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. tampak adanya perubahan pada patologi anatomi ikan nila. Secara makroskopis, organ mata ikan nila yang

diinjeksi dengan ECP maupun ICP waktu inkubasi 48 jam tampak mengalami eksoptalmia atau mengalami purulens yang terjadi pada jam ke 48 pascainjeksi, lebih cepat dibandingkan dengan penginjeksian ECP waktu inkubasi 24 jam, perubahan baru terjadi pada jam ke-120 pascainjeksi. Secara keseluruhan, ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dengan waktu inkubasi yang berbeda mengalami patologi anatomi organ luar lebih cepat dibandingkan dengan penginjeksian dengan ICP, abnormalitas yang muncul juga lebih banyak pada ikan yang diinjeksi dengan ECP (Tabel 2).

Ikan *Labeo rohita* dan *Cyprinus carpio* yang diinjeksi dengan *Pseudomonas* sp. menunjukkan gejala seperti sirip gripis, pendarahan pada kulit dan luka pada permukaan tubuh, sisik lepas, produksi mucus berlebih dan pada infeksi yang parah tampak adanya luka dalam atau tukak (ulkus). Beberapa bakteri *Pseudomonas* sp. yang patogen terhadap ikan budidaya antara

Tabel 2 Patologi anatomi organ luar ikan nila pada uji toksisitas ekstrasellular dan intrasellular produk bakteri *Pseudomonas* sp. yang ditumbuhkan pada media dan waktu inkubasi yang berbeda

Perlakuan	Waktu pengamatan (jam ke-)									
	3	6	12	24	48	72	96	120	144	168
Kontrol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Extracellular Product</i>										
TSA 24	-	-	7	-	4,6	-	-	3,5	-	-
TSA 48	-	-	-	7,9	2	3,10	-	-	6,8	-
TSA 72	-	-	-	7,8,9	2,6,7	3	3,7	3,7	7,9	-
TSB 24	-	6	7	9	3	5	-	2,4	-	-
TSB 48	-	-	-	-	-	10	3,7,9	-	6,8	-
TSB 72	-	-	-	7	6,7,10	8	7	7,10	-	-
<i>Intracellular Product</i>										
TSA 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSA 48	-	-	8,9	-	3,6,10	-	-	-	-	-
TSA 72	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-
TSB 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSB 48	-	-	-	-	2,3,9	-	-	6	-	-
TSB 72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan. :

TSB = *Trypticase Soya Broth* (TSB); TSA= *Trypticase Soy Agar*;

1. Normal, 2. Eksoptalmia, 3. Opacity, 4. Abses pada perut, 5. Mulut putih dan luka, 6. Garis vertikal tubuh menghitam, 7. Pendarahan, luka pada tubuh, 8. *Clear operculum*, 9. Sisik lepas, 10. sirip gripis.

lain *Pseudomonas anguilliseptica*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, dan *Pseudomonas* sp.

Penyuntikan ICP yang berasal dari media TSA tampak lebih cepat menyebabkan perubahan anatomi organ luar secara makroskopis dibandingkan dengan media TSB (Tabel 2). Ikan yang diinjeksi dengan ICP dari media TSA lebih cepat mengalami *clear operculum*, yaitu pada jam ke-12 pascainjeksi dan gejala tersebut tidak ditemukan pada ikan nila yang diinjeksi dengan ICP dari media TSB. Hal ini menunjukkan bahwa media tumbuh bakteri berpengaruh terhadap ICP yang dihasilkan, untuk mengetahui lebih lanjut mengenai jumlah dan jenis ICP dan ECP yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas* sp. perlu dilakukan fraksinasi lebih lanjut.

Penginjeksian dengan ECP menyebabkan perubahan yang lebih cepat dan abnormalitas yang muncul lebih banyak dibandingkan dengan penginjeksian ICP, ini menandakan bahwa penginjeksian dengan ECP menyebabkan kerusakan sel lebih cepat dibandingkan dengan penginjeksian ICP. Hal ini diduga karena ECP mengandung lebih banyak bahan toksin

dibandingkan dengan ICP. Beberapa patologi anatomi organ luar ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP disajikan pada Gambar 2.

Eksoptalmia yang terjadi pada ikan terkadang disertai dengan kekeruhan pada mata (opasitas). Menurut Hardi (2012) gejala yang muncul pada mata ikan yang terinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. adalah eksoptalmia dan opasitas. Eksotoksin dan endotoksin bakteri *Pseudomonas* sp. diduga menyebar pada mata khususnya pada bagian *choroid* mata yang menyebabkan adanya hipertropi, inilah yang menyebabkan ikan mengalami eksoptalmia dan perubahan lainnya. Hal ini menandakan bahwa ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. sebagai penyebab timbulnya perubahan pada mata. Ikan yang diinjeksi dengan *P. anguilliseptica*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, dan *Pseudomonas* sp. menunjukkan gejala pendarahan, kulit rusak, sisik lepas dan adanya memar dan luka serta produksi lendir berlebih (Mastan, 2013).

Perubahan pada organ dalam juga terjadi pada ikan nila yang diinjeksi dengan ECP maupun ICP, secara terperinci dijabarkan pada Tabel 3.

Tabel 3 Patologi anatomi organ dalam ikan nila pada uji toksisitas ekstrasellular dan intrasellular produk bakteri *Pseudomonas* sp. yang ditumbuhkan pada media dan waktu inkubasi yang berbeda

Perlakuan	Waktu pengamatan									
	3	6	12	24	48	72	96	120	144	168
Kontrol	a	a	a	a	a	a	A	a	a	a
<i>Extracellular Product</i>										
TSA 24	-	-	-	b,d	c	e	-	-	-	-
TSA 48	-	-	-	b,d	-	-	-	-	-	-
TSA 72	-	-	-	-	b	c	-	-	-	-
TSB 24	-	-	-	-	b	c,d	-	-	e	-
TSB 48	-	-	-	-	-	-	-	-	b	-
TSB 72	-	-	-	-	-	b	-	c	-	-
<i>Intracellular Product</i>										
TSA 24	-	-	-	-	-	-	-	b,d	-	c,e
TSA 48	-	-	-	-	b	-	-	-	-	-
TSA 72	-	-	-	B	-	-	-	-	-	-
TSB 24	-	-	-	-	-	-	-	b,c	-	d,e
TSB 48	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-
TSB 72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan. :

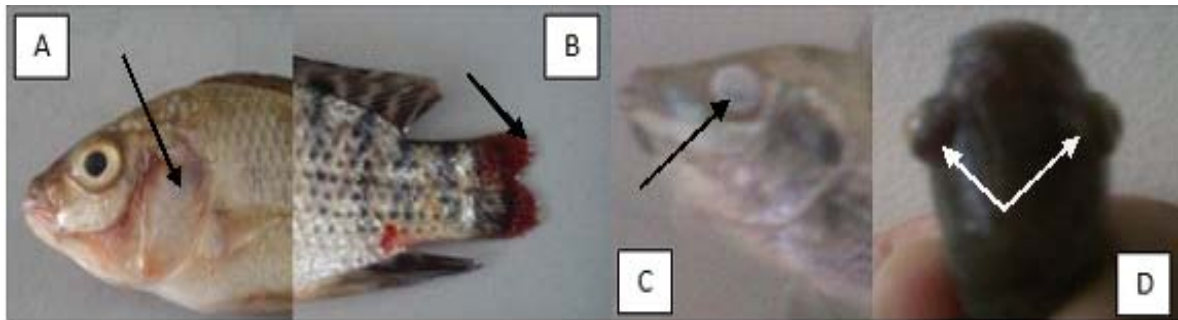
TSB = *Trypticase Soya Broth* (TSB); TSA= *Trypticase Soy Agar*;

a. Normal, b. organ hati pucat, c. organ hati berwarna kehijauan dan ukurannya mengecil, d. bentuk ginjal tidak beraturan, e. Warna ginjal merah kehitaman.

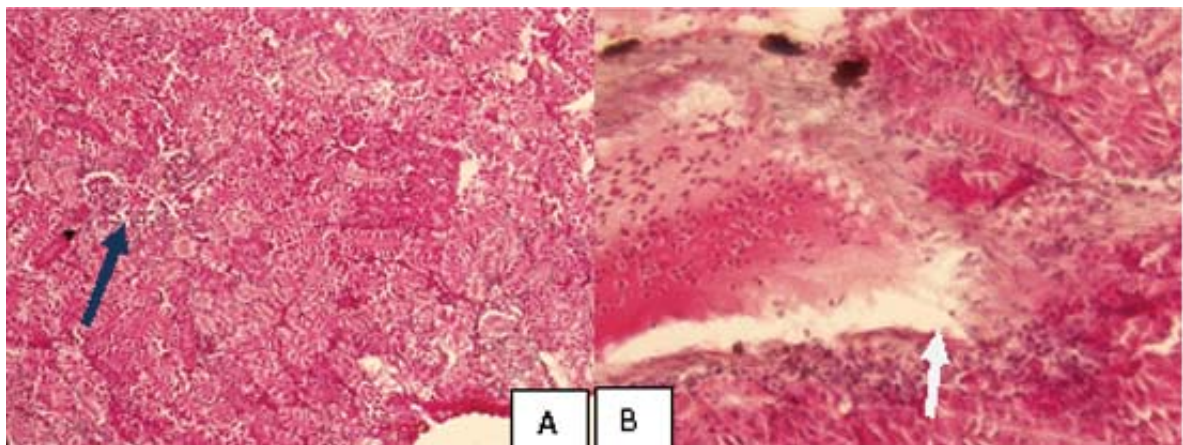
Ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp., pada organ dalamnya menunjukkan adanya abnormalitas. Organ hati pucat terjadi sejak 24 jam pascainjeksi dengan ECP yang dihasilkan dari media TSA dengan waktu inkubasi 24 dan 48 jam, sedangkan yang diinjeksi dengan ICP yang dihasilkan bakteri pada media TSA waktu inkubasi 72 jam. Baik ECP maupun ICP bakteri *Pseudomonas* sp. menyebabkan abnormalitas pada organ dalam ikan nila. Namun, penginjeksian dengan ECP menyebabkan perubahan lebih cepat dibandingkan dengan ICP pada waktu inkubasi 24-48 jam, kemungkinan karena mengandung bahan yang lebih toksik dibandingkan dengan yang diinkubasi lebih waktu. Abnormalitas ikan yang diinjeksi dengan ECP dan ICP sama dengan ikan nila yang diinjeksi dengan sel utuh *Pseudomonas* sp. yaitu organ dalam ikan berair dan terjadinya perubahan warna pada hati dan ginjal menjadi pucat (Hardi, 2012). Bakteri *P. anguilliseptica*

merupakan bakteri yang sangat patogen pada ikan budidaya (Wakabayashi dan Egusa, 1972; Austin dan Austin, 2007). Bakteri *P. fluorescens* lebih dominan menginfeksi ikan air tawar (Allen *et al.*, 1993) dan *P. fluorescens* merupakan agen penyebab septicemia dan munculnya ulkus pada beberapa ikan. Menurut Mastan (2013) organ ikan mas yang terinfeksi *P. anguilliseptica* dan *P. fluorescens* mengalami perdarahan pada organ hati, ginjal dan usus Alicia *et al.*, (2005), Khalil *et al.*, (2003) dan Saleh *et al.*, (2008).

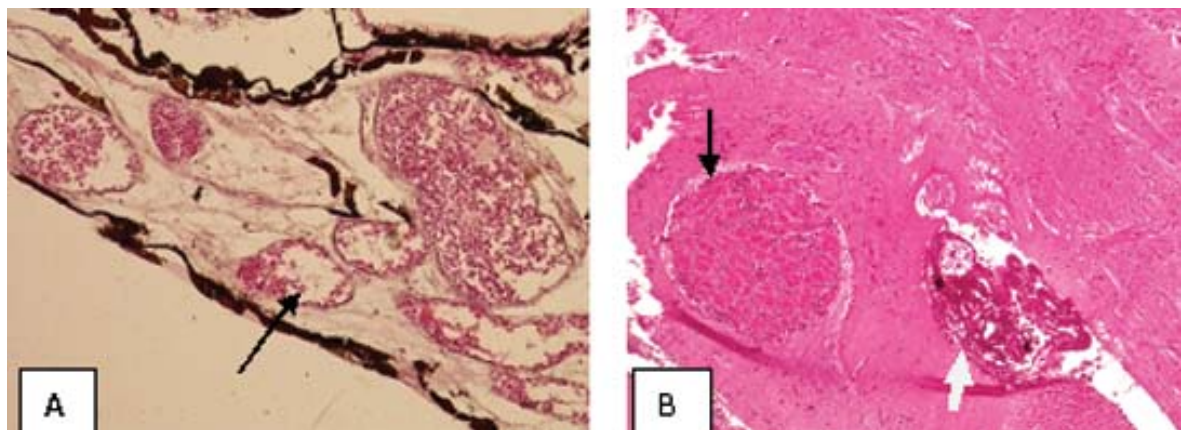
Gejala ikan yang diinjeksi dengan ECP maupun ICP bakteri *Pseudomonas* sp. umumnya menunjukkan gejala yang sama, hanya waktu munculnya gejala yang berbeda. Patologi anatomi organ luar lebih banyak muncul saat ikan nila diinjeksi dengan ECP dibandingkan dengan ICP. gejala tersebut hampir sama dengan ikan yang terinfeksi *A. hydrophila*, *Vibrio anguillarum* dan *P. anguilliseptica* dan *Edwardsia tarda* (Nishibuchi *et al.*, 1980; Park *et al.*, 2012).



Gambar 2 Beberapa perubahan pada patologi anatomi organ luar ikan nila pascainjeksi dengan ECP dan ICP *Pseudomonas* sp. (dari kiri-kanan). A: *clear operkulum*. B: sirip ekor gripis. C: *opacity* (kekeruhan mata). D: bilateral eksoptalmia.



Gambar 3. Perubahan pada ginjal ikan. A. tubulus ginjal pada perbesaran 40x, panah biru hipertropi dan B. tubulus ginjal pada perbesaran 100x, panah putih nekrosis pada tubulus ginjal



Gambar 4. A. Bagian *Choroid body* mata ikan panah hitam menunjukkan hipertropi pada perbesaran 100x. B. Otak ikan mengalami hiperplasi (panah hitam) dan nekrosis (panah putih) pada perbesaran 100x.

Histopatologi Ikan Nila

Ginjal ikan nila yang diinjeksi dengan ECP *Pseudomonas* sp. menunjukkan adanya kerusakan struktural, seperti hipertropi dan nekrosis (Gambar 3A dan 3B). Hipertropi disebabkan karena ECP dan ICP masuk ke dalam ginjal bersama aliran darah dan menuju tubulus ginjal. Ikan yang diinjeksi dengan ECP mengalami degenerasi dan nekrosis lebih cepat pada tubulus ginjal dibandingkan dengan penginjeksian dengan ICP. Kerusakan pada tubulus ginjal dapat berpengaruh pada struktur dan fungsi ginjal, mengakibatkan terganggunya proses-proses fisiologi di dalam tubuh ikan, bahkan dapat menyebabkan kematian. Sama halnya dengan ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang terinfeksi bakteri *V. alginolyticus* pada organ ginjalnya ditemukan adanya nekrosis dan hemoragi, yang diduga akibat toksin yang dikeluarkan bakteri (Murdjani, 2002).

Ikan nila yang diinjeksi ECP yang berasal dari media TSA dengan waktu inkubasi 48 jam menunjukkan berenang *whirling*, organ otak secara histopatologi tampak mengalami nekrosis pada bagian cranial (Gambar 4B). Hal ini biasanya yang menyebabkan meningitis dan encephalitis pada infeksi *Edwardsiella ictaluri* pada *channel catfish* dan infeksi *Streptococcus iniae* pada ikan *yellowtails* (Ferguson, 1989). Ikan yang diinjeksi dengan *A. hydrophila* mengalami kerusakan jaringan seperti nekrosis, ulkus, dan hemoragi septicemia (Hazen *et al.*, 1978; Karunasagar *et al.*, 1986; Angka, 1990; Aguilar *et al.*, 1997; Azad *et al.*, 2001).

Organ mata ikan mengalami hipertropi (Gambar 4A), kelainan ini tampak pada ikan yang mengalami eksoptalmia baik lateral maupun bilateral. Bahan ECP dan ICP yang diinjeksikan merusak bagian *choroid* mata sehingga menyebabkan mata mengalami perubahan tersebut.

Kerusakan jaringan yang terjadi pada organ ikan disebabkan karena bahan toksik yang ada dalam ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. Penginjeksian protein peptide dengan bobot molekul 38 kDa *metallopeptidase* yang dihasilkan oleh bakteri *Moritella viscosa* pada fase eksponensial bersifat letal pada ikan salmon, menyebabkan kerusakan jaringan seperti nekrosis dan hemorrhages pada organ terinfeksi (Bjornsdottir *et al.*, 2009).

SIMPULAN

Simpulan dari penelitian ini adalah ECP dan ICP merupakan faktor virulensi pada bakteri *Pseudomonas* sp, karena menyebabkan ikan nila mengalami perubahan pada pola renang, patologi anatomi organ luar dan organ dalam secara makroskopis dan mikroskopis. Kematian ikan yang diinjeksi ICP lebih cepat dibandingkan dengan ECP dan media tumbuh bakteri serta waktu inkubasi berpengaruh terhadap toksisitas kandungan ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. bakteri yang diinkubasi 24-48 jam pada media TSA menghasilkan ECP dan ICP yang lebih toksik dibandingkan dengan saat diinkubasi lebih waktu (72 jam). Media tumbuh juga berpengaruh terhadap kandungan bahan toksik di dalam ECP dan ICP.

SARAN

Untuk mengetahui jenis bahan toksik yang terdapat di dalam masing-masing ECP dan ICP perlu dilakukan penelitian fraksinasi salah satunya dengan menggunakan SDS-PAGE.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jendral Perguruan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberikan bantuan berupa dana penelitian melalui penelitian desentralisasi (Fundamental) tahun anggaran 2013/2014. Juga kepada Dinas Kelautan dan Perikanan Kabupaten Kutai Kartanegara yang telah mendampingi selama di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aguilar A, Merino S, Rubires X, Tomas JM. 1997. Influence of osmolarity on lipopolysaccharides and virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O:34 strains grown at 37°C. *Infection and Immunity* 65 : 1245-1250.
- Alicia E, Toranzo A, Magarinos B, Jesus L, Romalde R. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture Systems. *Aquacult* 246 : 37-46.

- Allan BJ, Stevenson RMW. 1981. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infection. *Can J Microbiol* 27 : 1114–1122
- Allen D, Austin B, Collen RR. 1993. Numerical taxonomy of bacterial isolate associated with a fresh water fishery. *J General Microbiol* 129 : 2043-2062.
- Anderson DP, Siwicki AK. 1995. Basic hematology and serology for fish health programs. Paper presented in second symposium on diseases in Asian Aquaculture “Aquatic Animal Health and the Environment”. Phuket, Thailand. 25 – 29th October 1993.
- Angka SL. 1990. The pathology of the walking catfish, *Clarias batrachus* (L.), infected intraperitoneally with *Aeromonas hydrophila*. *Asian Fisheries Science* 3 : 343-351.
- Austin B, Austin D. 2007. *Bacterial fish pathogens, Diseases in Farmed and wild fish*. United Kingdom. Springer-Praxis Pub. Pp 195-199.
- Azad IS, Rajendran KV, Rajan JJS, Vijayan KK, Santiago TC. 2001. Virulence and histopathology of *Aeromonas hydrophila* (Sah 93) in experimentally infected tilapia, *Oreochromis mossambicus* (L). *Journal of Aquaculture in the Tropics* 16 : 265-275.
- Bjornsdottir B, Fridjonsson OH, Magnusdottir S, Andresdottir V, Gudmundur OH, Bjarnheidur K, Gudmundsdottir. 2009. Characterisation of an extracellular vibriolysin of the fish pathogen *Moritella viscosa*. *Vet Microbiol* 136 : 326–334.
- Blaxhall PC, Daisley KW. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 5 : 577-581
- Ferguson HW. 1989. *Systemic pathology of fish*. Ames. Iowa State University Press. P 263.
- Hardi EH. 2012. Bacteria Levels Difference Pathogenecity *Aeromonas* sp and *Pseudomonas* sp. on Tilapia. *Proceeding The international Symposium on Human Development and Sustainable Utilization on Natural reseources in asian countries* (ISBN : 978-602-98400-1-8) Balikpapan, 9-12 Juli 2012.
- Hardi EH, Pebrianto CA. 2012. Isolasi dan Uji Postulat Koch *Aeromonas* sp dan *Pseudomonas* sp pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Sentra Budidaya Loa Kulu Kabupaten Kutai Kartanegara. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis* 16(2) : 35-39.
- Hardi EH, Sukenda, Harris E, Lusiastuti AM. 2011. Toksisitas Produk Ekstraselular (ECP) *Streptococcus agalactiae* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Natur Indonesia* 13(3) : 187-199.
- Hazen TC, Raker ML, Esch GW, Fliermans CB. 1978. Ultrastructure of red-sore lesions on largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Association of the ciliate *Epistylis* sp. and the bacterium *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Protozoology* 25 : 351-355.
- Kanai K, Wakabayashi H. 1984. Purification and some properties of proteases from *Aeromonas hydrophila*. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 50 : 1367–1374.
- Karunakaran T, Devi BG. 1994. Characterisation of haemolytic activity from *Aeromonas caviae*. *Epidemiol Infect* 112 : 291-298.
- Karunasagar I, Rosalind GM, Karunasagar I, Rao GK. 1986 Ulcerative form of *Aeromonas hydrophila* infection of *Catla catla*. *Current Science* 55 : 1194.
- Khalil AH, Mansour EH. 1997. Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* in tilapia, *Tilapia nilotica*. *Microbiology* 25 : 269-273.
- Romalkle LS, Maganilos B, Nulez S, Toranzo AE, Romakle JI. 2003. Phenotypic and genetic characterization of *Pseudomonas anguilliseptica* strain isolated from fish. *J Aqua Animal Health* 15 : 39-47.
- Mastan SA. 2013. *Pseudomonas* septicemia in *Labeo rohita* (ham.) and *Cyprinus carpio* (linn.) in Andhra Pradesh–natural occurrence and artificial challenge. *Int J Pharm Pharm Sci* 5(2) : 564-568
- Murdjani M. 2002. Identifikasi dan patologi bakteri *Vibrio alginolyticus* pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Desertasi. Malang : Universitas Brawijaya.

- Nishibuchi M, Muroga K, Jo Y. Pathogenic vibrio isolated from cultured eel. VI. Diagnostic tests for the disease due to the present bacterium. *Fish Pathol* 14 : 124–132.
- Park SB, Aoki T, Jung TS. 2012. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. *Vet Res* 43(1) : 67.
- Pridgeon JW, Klesius PH, Song L, Zhang D, Kojima K, Mobley JA. 2013. Identification, virulence, and mass spectrometry of toxic ECP fractions of West Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila* obtained from 2010 disease outbreak. *Vet Microbiol* 164 : 336–343.
- Sahu I, Das BK, Marhual N, Samanta M, Mishra BK, Eknath AE. 2011. Toxicity of Crude Extracellular Products of *Aeromonas hydrophila* on Rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Indian J Microbiol* 51(4) : 515–520
- Saleh FM, Azza MM, El-Rahman A. 2008. Contribution on *Pseudomonas septicemia* caused by *Pseudomonas anguilliseptica* cultured *Oreochromus niloticus*. 8th *International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008*.
- Sirirat T, Intuseth J, Chanphong J, Thompson K, Chinabut S, Adams A. 1999. Characterization of *Aeromonas hydrophila* extracellular products with reference to toxicity, virulence, protein profiles and antigenicity. *Asian Fish Sci* 12 : 371–379.
- Wakabayashi H, Egusa S. 1972. Characterization of *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond cultured eel bull (*Anguilla japonica*). *Japan Soc Fish* 38 : 577-587.
- Wedemeyer GA, Yasutake WT. 1977. Clinical methods for the assessment of the effect on environmental stress on fish health. Technical Papers of the US Fish and Wildlife Service. US depert. Of the Interior. *Fish and Wildlife Service* 89 : 1–17.
- Williams ML, Azadi P, Lawrence ML. 2003. Comparison of cellular and extracellular products expressed by virulent and attenuated strains of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* 15 : 264 – 273.