

Identifikasi Penyakit Aeromonad pada Budi Daya Ikan Air Tawar di Bali

(IDENTIFICATION OF AEROMONAD DISEASE IN FRESH WATER AQUACULTURE IN DENPASAR, BALI)

Surya Amanu¹, Kurniasih², Soedarmanto Indaryulianto³

¹Bagian Mikrobiologi, ²Bagian Patologi, ³Bagian Penyakit Dalam,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
Jalan Fauna No. 2 Yogyakarta
email: kurniasih_1951@yahoo.co.id

Abstrak

Budi daya ikan air tawar di daerah Bali banyak dirugikan oleh adanya wabah penyakit yang mematikan, salah satu penyakit tersebut adalah disebabkan oleh infeksi bakteri *Aeromonas* sp. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui agen penyebab penyakit *Aeromonad* terutama pada budi daya ikan air tawar di Bali berdasarkan isolasi dan identifikasi secara konvensional dan molekuler, mengetahui kekerabatan atau variasi genetik spesies *Aeromonas* sp., dan mengetahui antibiotik yang efektif. Pengambilan sampel ikan sakit berasal dari lima lokasi budi daya ikan air tawar yang mengalami wabah penyakit di Bali antara lain Meliling, Tabanan; Danau Batur, Bangli; Karangasem; Gianyar; Klungkung. Ikan dari berbagai jenis dipilih yang menunjukkan gejala klinis lesi kulit dan *exophthalmus* mata. Ikan diisolasi dan diidentifikasi terhadap *Aeromonas hydrophyla* dan *A. salmonicida*, selanjutnya diperiksa secara molekuler meliputi ekstraksi DNA, amplifikasi DNA di gen 16S rRNA, purifikasi dan *sequencing*. Hasil sekuensing dari kedua spesies *Aeromonas* sp. yang berasal dari lokasi berbeda dianalisis *phylogenetic tree* dengan metode *Maximum Parsimony* dan *Neighbor Joining*. Semua species *Aeromonas* sp. diuji sensitivitasnya terhadap lima macam antibiotik. Hasil isolasi dan identifikasi penyakit *Aeromonad* hanya ditemukan pada tiga kabupaten di Bali, sebanyak 10 isolat *A. salmonicida* dan 11 isolat *A. hydrophyla*. Secara histopatologi terlihat adanya dermatitis, epikarditis, retinitis, kongesti hati, dan ginjal. Ada dua klaster *A. salmonicida* yaitu subspecies *smithia* dan subspecies *achromogenes*. Bakteri *A. hydrophyla* erat hubungannya dengan *A. veronii*. Bakteri *A. salmonicida* subspecies *salmonicida* tidak ditemukan di Bali. Antibiotik *enrofloxacin* dan *gentamycin* merupakan antibiotik yang terbaik untuk pengobatan penyakit *Aeromonad*.

Kata-kata kunci : *Aeromonas hydrophyla*, *A. salmonicida*, *phylogenetic tree*, histopatologi

Abstract

Fresh water and marine fish horticulture in Bali is often harmed by the outbreak of diseases such as those caused by *Aeromonas* sp (aeromonad disease). Aims of study were 1) to find out the primary agent of the aeromonad disease in the fresh water aquaculture in Bali based on conventional and molecular identification, 2) to find out the genetic variability of *Aeromonas* species, 3) to determine the effective antibiotic against the agent. Samples of fishes were collected from 5 different locations of fresh water aquaculture that had high number of morbidity and mortality. Many different fishes which showed clinical sign such as skin lesion and *exophthalmus* were collected. *Aeromonas hydrophyla* and *A. salmonicida* were isolated and identified from fishes, they were then identified molecularly with DNA extraction, DNA amplification in 16S rRNA gene, purification and sequencing. Sequences of both *Aeromonas* species from different location were analysed to create the phylogenetic tree with *Maximum Parsimony* and *Neighbor Joining* method. Sensitivity of 5 antibiotics to both species of *Aeromonas* were done to determine the best antibiotic against the disease. Aeromonad disease were found only in 3 regions in Bali. As many as 10 isolates of *A. salmonicida* and 11 isolates of *A. hydrophyla* were examined. The histopathological examination showed dermatitis, epicarditis, retinitis, liver and kidney congestion in fish. There were two clusters of *A. salmonicida*, subspecies *smithia* and subspecies *achromogenes*. *Aeromonas hydrophyla* had a close relation with *A. veronii*. *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* has not been found in Bali. *Enrofloxacin* and *gentamycin* was the best antibiotic for treating the Aeromonad disease which were more effective as compared to 3 other antibiotics (Ampicillin, Doxycycline, and Eritromycin).

Key words : *Aeromonas hydrophyla*, *A. salmonicida*, *phylogenetic tree*, histopathology

PENDAHULUAN

Penyakit bakteriawi pada ikan khususnya yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* mulai dikenal di Indonesia sekitar tahun 1980. Bakteri tersebut menyebabkan wabah penyakit pada ikan karper di Jawa Barat dan berakibat kematian yang tinggi. Spesies lain dalam genus *Aeromonas* yang menginfeksi ikan adalah *A. salmonicida*, bakteri yang menyerang ikan salmon menyebabkan penyakit *furunculosis* atau *ulcerative furunculosis* (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2013). Bakteri *A. salmonicida* sangat patogen dan berbahaya pada budidaya ikan jenis *salmonid* (Austin dan Austin, 2007). Penyakit yang disebabkan *A. salmonicida* dapat bersifat *carrier* pada ikan yang terinfeksi, sehingga sebagai faktor penyebab penyakit yang sulit untuk diberantas (Grim *et al.*, 2013).

Wabah penyakit *furunculosis* dan *motile aeromonas septicemia* (MAS) telah dilaporkan terjadi di Pulau Jawa, Sumatera, dan Kalimantan (BKIPM, 2013). Perbedaan daya tahan tubuh ikan terhadap infeksi *A. hydrophila* berbeda, ikan bawal air tawar mempunyai daya tahan paling tinggi, diikuti lele dumbo, nila merah, gurami, dan ikan karper (Syakuri *et al.*, 2003). Hubungan antara kedua agen penyakit tersebut belum diketahui dengan jelas secara genotipe terutama pada budi daya ikan air tawar di Bali.

Semua Unit Pelaksana Teknis Karantina Ikan di Indonesia selalu melaksanakan pemantauan dan melaporkan wabah penyakit yang sering terjadi di daerahnya dilakukan dua kali dalam setahun. Hal yang menarik adalah wabah penyakit yang sering ditemukan disebabkan oleh *A. hydrophila* dibanding *A. salmonicida* pada budi daya ikan air tawar.

Bakteri *A. salmonicida* adalah bakteri Gram negatif, *non-motile*, menghasilkan reaksi positif pada uji oksidase, mengasamkan glukosa, dan beberapa isolat menghasilkan pigmen coklat (Kimura, 1969; Elliot dan Shotts, 1980; Teska *et al.*, 1992). Bakteri *A. salmonicida* dilaporkan mempunyai sifat patogenisitas yang luas dipandang dari sudut inang maupun wilayah geografik (Paterson *et al.*, 1980), dan dipercaya sebagai penghambat perkembangan populasi ikan-ikan jenis *salmonid* yang kemudian menyebarkan dan menyebabkan penyakit pada ikan-ikan yang hidup di perairan payau dan laut (Austin dan Austin, 2007). *Furunculosis* tersebut menyebabkan peradangan pada bagian kulit ikan yang terinfeksi secara kronis (Teska

et al., 1992). Ciri khas ikan yang terinfeksi *A. salmonicida* adanya leukopenia, hemoragi, nekrosis pada jaringan dan degenerasi pada bagian otot (Fuller *et al.*, 1977).

Kasus penyakit pada ikan *brown trout* (*Salmo trutta*), 80% ikan dalam satu populasi bersifat *carrier A. salmonicida*. Ikan yang bersifat *carrier* tidak menunjukkan gejala klinis. Namun, mempunyai kemampuan untuk menyebarkan organisme tersebut. Apabila ikan-ikan yang bersifat *carrier A. salmonicida* mengalami kondisi stres, maka akan muncul *furunculosis* akut yang dapat menyebabkan kematian ikan (Gustafson *et al.*, 1992). Kematian ikan yang disebabkan oleh *A. salmonicida* terjadi apabila infeksi pada kisaran 10^5 - 10^8 CFU/ikan/jam (Robert, 2001) dan patogen tersebut dapat disebarkan ke hewan non-budidaya (Gustafson *et al.*, 1992).

Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi *A. salmonicida* pada ikan terinfeksi mempunyai tingkat kesulitan yang tinggi dalam membedakan *A. salmonicida* dari jenis bakteri lainnya karena variasi profil biokimia yang luas dan belum adanya media kultur selektif yang efisien. Hal ini sebagai pendorong terjadinya pembaruan teknik diagnosis dan mulai diaplikasikan teknik *polimerase chain reaction* (PCR) dan *sequencing* DNA (Gustafson *et al.*, 1992; Hiney *et al.*, 1992; Miyata *et al.*, 1996).

Menurut Holt *et al.*, (1994), terdapat empat sub-spesies *A. salmonicida* yaitu *salmonicida*, *achromogenes*, *massoucida*, dan *smithia*. Strain *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* merupakan tipikal dari *furunculosis* penyebab septisemia akut yang akhirnya menimbulkan kematian pada ikan-ikan yang hidup diperairan dingin. Pada kondisi kronis, terjadi *furuncle* dengan ditunjukkan adanya penetrasi yang dalam pada organ otot ikan.

Strain *A. salmonicida* sub-spesies *achromogenes* merupakan atipikal yang dapat menyerang jenis ikan salmon dan bukan salmon. Sub-spesies ini selain mengandung gen pembentuk sub-spesies *achromogenes* juga mengandung gen pembentuk sub-spesies *masoucida* penyebab *ulcer disease* (Wiklund dan Dalsgaard, 1998). Secara histopatologi menyebabkan hemoragi dan nekrosis pada organ kulit dan ginjal, degenerasi pada organ kulit dan otot hati serta terjadinya fusi pada lamela kedua dari insang ikan, strain ini kini diakui sebagai strain atipikal (Austin dan Austin, 2007).

Perubahan patologi yang menciri antara

lain : nekrosis jaringan otot, pembengkakan subkutan, dan bukan *furuncle* sejati. Pada bentuk akut terdapat pendarahan dari luka jaringan pada pangkal sirip dada dan sirip perut (Austin dan Austin, 2007; Robert, 2001). Ikan akan menjadi lemah, berwarna gelap, *ulcer*, dan *exophthalmus* serta dapat diikuti infeksi sekunder oleh jamur atau bakteri lainnya (Fijan, 1972).

Bakteri patogen oportunistik *A. hydrophila* hampir selalu ada di air terutama pada spesies ikan air tawar (Robert, 2001). Serangan bakteri ini dapat mengakibatkan gejala penyakit hemoragi septisemia atau *motile aeromonas septicemia* yang mempunyai ciri antara lain luka di permukaan tubuh, luka di insang, *ulcer*, abses, *exophthalmia*, dan perut asites (Austin dan Austin, 2007).

Bakteri tersebut menyebabkan tingkat kematian tinggi (80-100%) dalam waktu singkat (1-2 minggu) dan pengendalian bakteri ini sangat sulit dilakukan karena hampir selalu ada di air dan dapat menjadi resisten terhadap obat antibiotik (Robert, 2001). Pengendalian *A. hydrophila* dapat dilakukan dengan antibiotik melalui penyuntikan, perendaman, atau dicampur dengan pakan (Rukyani, 1993).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui agen penyebab penyakit *Aeromonad* terutama pada budi daya ikan air tawar di Bali berdasarkan isolasi dan identifikasi secara konvensional dan molekuler, mengetahui kekerabatan atau variasi genetik spesies *Aeromonas* sp., dan mengetahui antibiotik yang efektif.

METODE PENELITIAN

Pengambilan sampel ikan sakit di lima lokasi budidaya ikan air tawar (Meliling, Tabanan; Danau Batur, Bangli; Karangasem; Gianyar; Klungkung) yang dilakukan pada musim kemarau (Juli-September) dan musim hujan (Maret-Mei). Pengambilan sampel dilakukan bersama-sama dengan tim peneliti dari Balai Karantina Ikan Ngurah Rai.

Primer 16S rDNA yang digunakan adalah 1A(5'-CGTTGGATATGGCTCTTCCT-3') dan 16S rDNA 2A (5'-CTCAAACGGCTGCGTACCA-3') (Hiney *et al.*, 1992). Isolat *A. salmonicida*; Kit DN easy mini column Qiagen, chloroform, etanol 95%, pewarna ethidium bromide (ETB), Tris Acetic Acid EDTA (TAE) electrophoresis

buffer, ethylene diamine tetra acetic (EDTA), loading buffer (0,25 bromophenol blue, 0,25 xylene cyanol FF, dan 30% glycerol).

Isolasi bakteri berasal dari ikan yang menunjukkan gejala klinis *exophthalmus* dan lesi berupa hemoragi, nekrosis, dan *ulcer* kulit. Identifikasi dan purifikasi koloni bakteri dilakukan dengan melihat morfologi sifat Gram, motilitas, dan sifat-sifat biakan/kultural lainnya seperti kemampuan fermentasi, uji *Indol*, *Methyl Red*, *Voges-Proskauer*, dan *Citric* (IMViC) dan uji biokimia. Pengujian biokimia dilakukan pada semua isolat secara konvensional terhadap *motility*, *katalase*, uji media *triple sugar iron agar* (TSIA), oksidase, *oksidative/fermentative* (O/F), Agar 2% NaCl, Agar 4% NaCl, gelatin, enzim *deoxyribonucleic acid* (DNAse), pertumbuhan di 28°C-37°C, *glukosa*, *laktosa*, *sukrosa*, *raffinosa*, *sorbitol*, *maltose*, *arabinosa*, *dulcitol*, *ornithin decarboxilase*. Beberapa isolat *A. salmonicida* atau *A. hydrophiladigunakan* untuk uji molekuler.

Ekstraksi DNA menggunakan DNA easy mini column (Qiagen, Jerman). Amplifikasi menggunakan PCR kit *Kappa* dengan primer 16S rDNA 1A dan 16S rDNA2A (Hiney *et al.*, 1992). Program reaksi dilakukan sebagai berikut : Predenaturasi (suhu 94°C selama dua menit); 26 siklus PCR yang meliputi: *denaturasi* (suhu 94°C selama satu menit), *annealing* (suhu 51°C selama satu menit), *extension* (suhu 72°C selama 30 detik), dan *final extension* (suhu 72°C selama lima menit), suhu akhir diturunkan sampai dengan suhu 4°C (Gustafson *et al.*, 1992).

Hasil PCR dianalisis pada gel 1,5% agarose dalam *Tris-acetat-EDTA* (TAE) elektroforesis buffer (4 mM *Tris-acetate* dan 1 mM *disodium EDTA* pada pH 8,0). Proses elektroforesis dapat dilakukan pada sekitar 60 mA (100-120 v) selama 30-45 menit dibaca dengan *UV Transilluminator*.

Hasil PCR dari isolate *A. hydrophila* dan *A. salmonicida* kemudian dikirim ke PT.Genetika Science, Jakarta untuk dilakukan *sequencing* DNA pada *region* 16S rRNA. Hasil *sequencing* dari kedua species *Aeromonas* dilakukan BLAST terlebih dahulu untuk mengetahui kebenaran hasil diagnosis, selanjutnya dianalisis hubungan kekerabatannya dengan *phylogenetic tree* menggunakan metode *Maximum Parsimony* dan *Neighbour Joining* dengan 1000 kali *bootstrap resampling*.

Pemeriksaan Sensitivitas Terhadap Antibiotik

Uji sensitivitas *A. hydrophilla* dan *A. salmon ocida* dilakukan dengan metode *Kirby-Bauer* (Carter, 1986). Biakan murni bakteri ditanam menggunakan *cotton swab* secara merata pada permukaan media *mueller hinton agar* (MHA). *Disk* antibiotik yang digunakan adalah *ampicillin*, *erythromycin*, *enrofloxacin*, *doxycycline*, dan *gentamycin* diposisikan dengan menggunakan *dropper* pada permukaan biakan bakteri, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

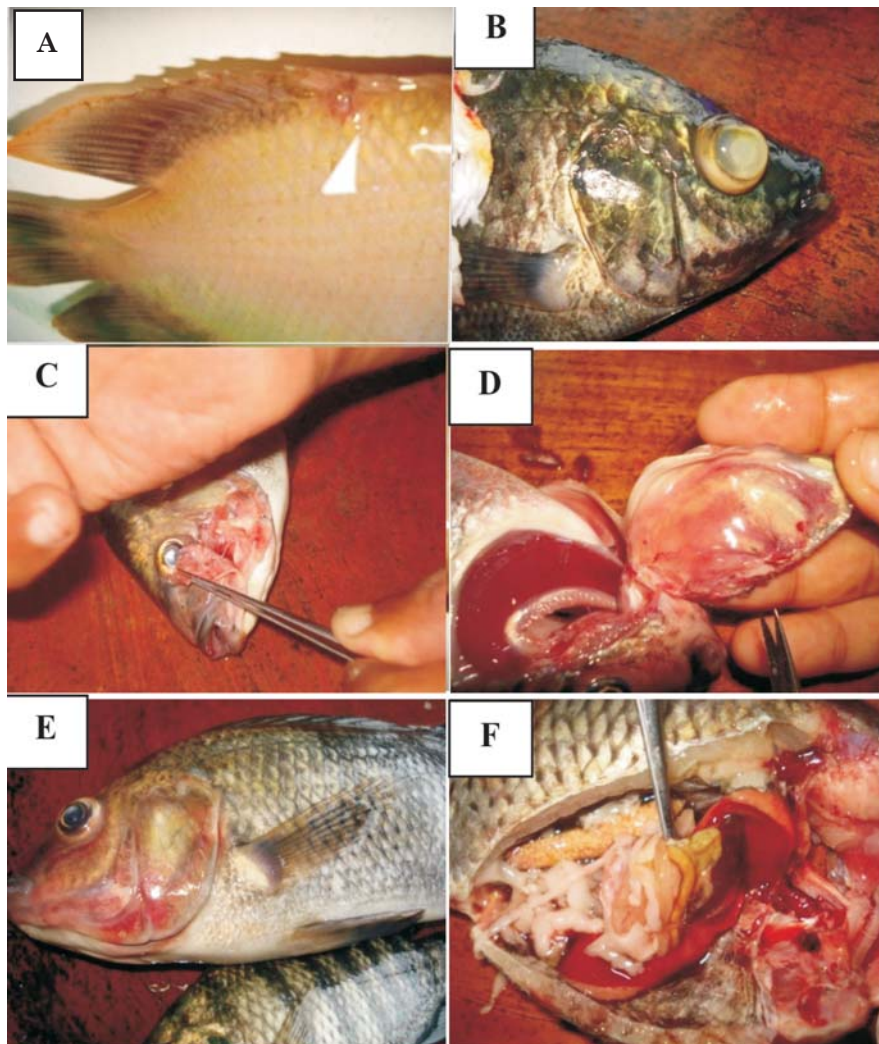
Pengukuran zona terang disekeliling *disk* antibiotik diukur dengan penggaris. Kriteria penilaian adalah sensitif, intermediet, dan resisten, yang ditentukan dengan membandingkan hasil pengukuran dengan tabel standar diameter zona inhibisi *Kirby-Bauer* (Carter, 1986).

Hasil identifikasi bakteri dari lima Kabupaten di Bali dianalisis secara deskriptif. Hasil uji sensitivitas terhadap antibiotik dibandingkan dengan metode *Kirby-Bauer* kemudian dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ikan yang diambil untuk penelitian adalah ikan nila dengan gejala adanya lesi pada kulit dan *exophthalmus* (Gambar 1A dan B), Hasil isolasi dan identifikasi menunjukkan bakteri *A. salmonicida*. Secara makroskopik tampak hemoragi subkutan (Gambar 1 C dan D), kongesti hati dan ginjal (Gambar 1F).

Hasil histopatologi dengan pewarnaan Hematoxilin dan Eosin menunjukkan adanya kongesti hati dan ginjal (Gambar 2 A dan B),

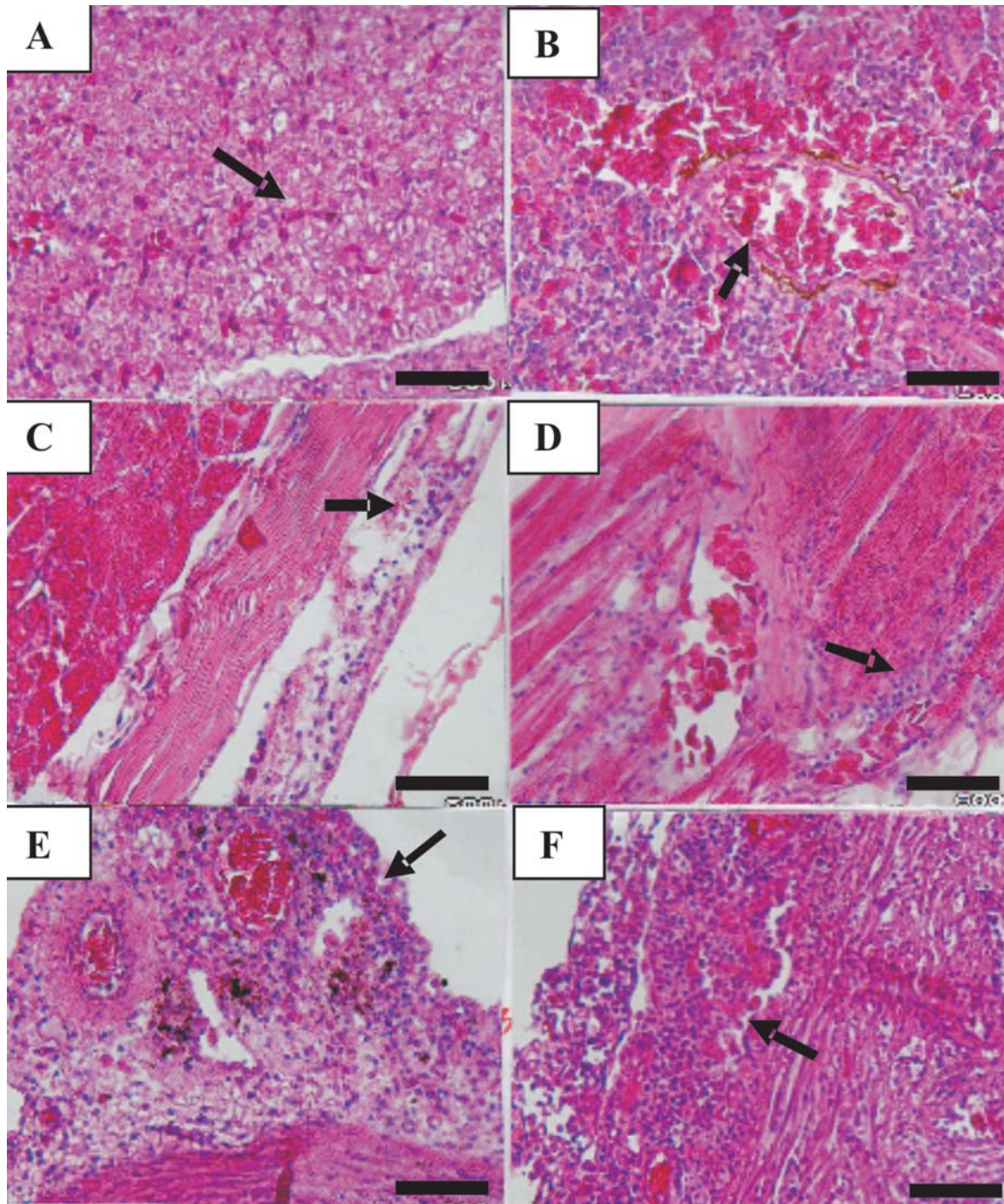


Gambar 1. Lesi di kulit (A) dan *exophthalmus* (B) dari ikan nila, hemoragi pada ventral mata (C) dari ikan nila, hemoragi operculum (D), lesi kulit dan mata (E), dan kongesti hati dan ginjal (F) dari ikan Nila.

radang kulit mulai epidermis hingga lapisan otot (Gambar 2 C dan D), serta adanya epidermatitis baik pada atrium dan ventrikel jantung (Gambar 2 E dan F).

Isolasi awal bakteri pada plat agar darah dilanjutkan ke TSIA, kemudian dilakukan pemurnian untuk dilakukan uji katalase,

oksidase, motilitas, pewarnaan Gram, dan uji biokimia. Berdasarkan uji biokimia diperoleh 21 jenis *Aeromonas* sp. Contoh hasil uji biokimia dari dua jenis bakteri yang berasal dari ikan gurami dan sisanya dari ikan nila disajikan pada Tabel 1. Hasil uji biokimia untuk sampel nomor 9 sampai 25 tidak disertakan.



Gambar 2. Histopatologi dari ikan nila yang didiagnosis furunculosis akibat infeksi *A. salmonicida* tampak kongesti hati (A) dan ginjal (B), radang kulit (C dan D), radang epikardium atrium dan ventrikel jantung (E dan F).Skala bar 50 μ m.

Tabel 1. Hasil isolasi dan identifikasi bakteri yang ditemukan pada ikan nila dan ikan gurami dari Bali, pengambilan sampel tahap pertama.

	Kode sampel							
	K01 α	K01 β	S α	G α	G β	K02 β	ATCC	
	1	2	3	4	5	6	* 7	** 8
Hemolysis	α	β	β	α	β	β	β	β
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI	<i>Butt</i> As	As	As	As	As	As	As	As
	<i>Slant</i> Alk	Alk	Alk	Alk	Alk	Alk	Alk	Alk
	H2S	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	-	-	+	-	-	-
MR	+	+	-	-	+	-	-	-
Vp	-	-	-	+	-	-	+	+
Citrat	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-
OF	F	F	F	F	F	F	F	F
Gelatin	-	-	+	+	-	+	+	+
DNase	+	+	+	+	+	+	+	+
4% NaCl	-	+	-	+	+	-	-	-
6% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	-	-	+	-	-	-	-
Motylity	+	+	-	+	+	-	-	-
Gas dr Glucose	-	+	+	-	+	+	+	+
Acid Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukrose	-	+	+	-	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-

Hasil identifikasi bakteri sebanyak 21 isolat yang berasal dari tiga Kabupaten di Bali yaitu kabupaten Tabanan, Bangli, dan Karangasem menunjukkan adanya 11 isolat *A. hydrophilla* dan 10 isolat *A. salmonicida* yang mempunyai dua macam subspecies yaitu *achromogenes* dan *smithia*. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa dua isolat adalah *Pseudomonas anguilliseptica* dan *Pleisiomonas* sp. berasal dari Danau Batur, Bangli (Tabel 2).

Perbedaan dasar antara *A. hydrophilla* dan *A. salmonicida* adalah pada uji indol, motilitas, NaCl 4%, dan pertumbuhannya pada 37°C adalah negatif pada *A. salmonicida*, sedangkan hasil positif pada *A. hydrophilla*.

Sampel bakteri yang ditemukan pada ikan gurami dan ikan nila, setelah dilakukan uji biokimia termasuk ke dalam golongan *Aeromonas* sp. Menciri dengan hasil uji biokimia oksidase (+), fermentase, dan inositol (-). Hal ini sesuai dengan pendapat Holt *et al.*, (1994) yang

menyatakan bahwa bakteri golongan *Aeromonas* sp. mempunyai karakteristik antara lain termasuk bakteri Gram negatif, berbentuk batang pendek, mempunyai pigmen berwarna kuning, oksidase (+), fermentatif, dan inositol (-). Bila uji motilitas positif termasuk, bakteri tersebut termasuk golongan *motile Aeromonas* dan bila motilitas negatif termasuk golongan *A. salmonicida*.

Sampel 1 (K01 α) dan 2 (K01 β) merupakan isolat yang dapat digolongkan kedalam *motile Aeromonas* dicirikan dengan hasil uji biokimia inositol negatif dan motilitas positif. Setelah dibandingkan dengan kunci identifikasi, bakteri tersebut mengarah ke *A. eucrenophila* maupun ke *A. caviae* dengan hasil meliputi uji motilitas (+); *Voges-Proskauer* (-); *methyl red* (+); *indole* (+); *citric* (-), gas (-); urea (-); *DNase* (+), sukrose (+) (Holt *et al.*, 1994). Bakteri tersebut sering ditemukan pada ikan-ikan air tawar (Ciapini *et al.*, 2002). Sementara itu sampel 3 (S α),

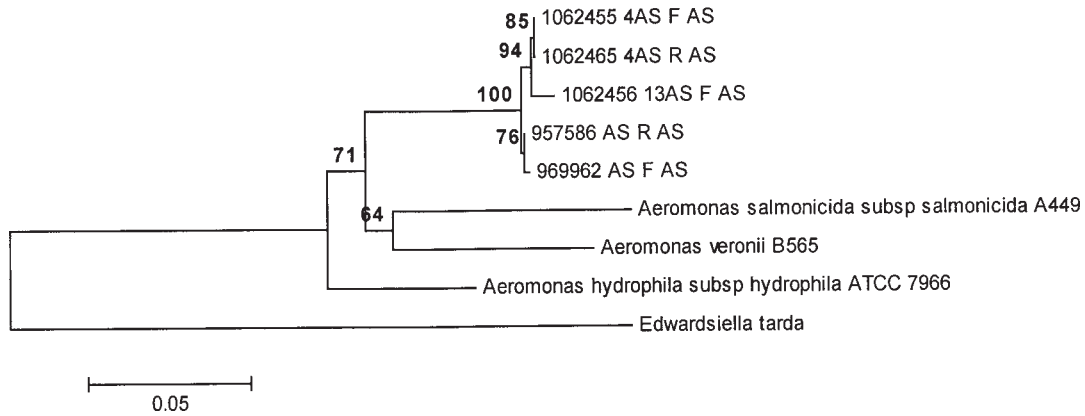
Tabel 2. Hasil identifikasi bakteri yang berasal dari tiga kabupaten di Bali .

No.	Spesies	Asal
1.	<i>A. hydrophilla</i>	Meliling, Kab. Tabanan
2.	<i>A. salmonicida achromogenes</i>	Meliling, Kab. Tabanan
3.	<i>A. salmonicida smithia</i>	Meliling, Kab. Tabanan
4.	<i>A. hydrophilla</i>	Meliling, Kab. Tabanan
5.	<i>A. salmonicida achromogenes</i>	Meliling, Kab. Tabanan
6.	<i>A. salmonicida smithia</i>	Meliling, Kab. Tabanan
7.	<i>A. salmonicida smithia</i>	Meliling, Kab. Tabanan
8.	<i>A. salmonicida smithia</i>	Meliling, Kab. Tabanan
9.	<i>A. salmonicida smithia</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
10.	<i>A. salmonicida smithia</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
11.	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
12.	<i>A. hydrophilla</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
13.	<i>A. salmonicida smithia</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
14.	<i>A. hydrophilla</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
15.	<i>A. hydrophilla</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
16.	<i>A. hydrophilla</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
17.	<i>A. hydrophilla</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
18.	<i>A. hydrophilla</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
19.	<i>A. hydrophilla</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
20.	<i>A. salmonicida smithia</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
21.	<i>Plesiomonas</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
22.	<i>A. hydrophilla</i>	Danau Batur, Kab. Bangli
23.	<i>A. salmonicida smithia</i>	Karangasem
24.	<i>A. salmonicida smithia</i>	Karangasem
25.	<i>A. hydrophilla</i>	Karangasem

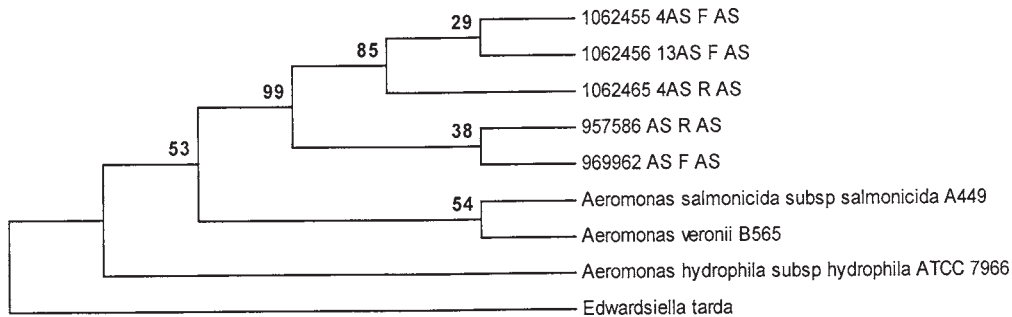
6(K02â), dan 7 (ATCC *) mengarah kedalam *A. salmonicida*, ditunjukkan dengan hasil uji biokimia antara lain termasuk bakteri Gram (-); berbentuk batang pendek; berwarna kuning kecoklatan; fermentatif; inositol (-); motilitas (-) (Holt *et al.*, 1994). Setelah dibandingkan dengan kunci identifikasi, hasil uji biokimia sampel bakteri tersebut mengarah ke *A. salmonicida* subspecies *smithia* dengan ciri motilitas (-); *Voges-Proskauer* (-); *methyl red* (-); *indole* (-); *citric* (-), gas (+); *rrea* (-); *DNAse* (+); gelatin (+) (Holt *et al.*, 1994).

Terhadap isolat *A. hydrophilla* dan *A. salmonicida* sebanyak 10 isolat dilakukan ekstraksi, dan menunjukkan hasil yang baik. Hasil amplifikasi terhadap sembilan isolat *A.*

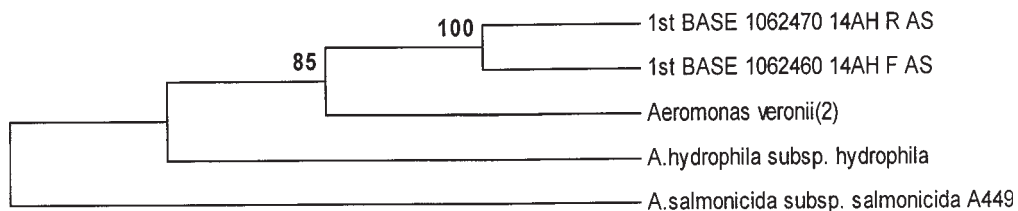
salmonicida diperoleh sebanyak 950 bp, dan 11 isolat *A. hydrophilla* diperoleh sebanyak 500 bp. Hasil *sequencing* terhadap 20 isolat, hanya lima isolat *A. salmonicida* dan dua *A. hydrophilla* yang memperoleh hasil *sequen* yang baik. Hasil *sequencing* *A. salmonicida* subspecies *achromogenes* dan *smithia* berada dalam satu klaster (100%) secara *Neighbor joining* dan 99% secara *Maximum Parsimony*. Bakteri *A. salmonicida* subspecies *salmonicida* erat hubungannya dengan *A. veronii* (berasal dari *Genbank*) walaupun validitasnya sangat rendah (64%). Kekkerabatan antara *A. salmonicida* subspecies *smithia* dan *achromogenes* agak jauh dengan subspecies *salmonicida* (Gambar 3 dan 4).



Gambar 3. Filogeni *A. salmonicida* secara metode *Neighbor joining*



Gambar 4. Filogeni *A. salmonicida* secara metode *Maximum parsimony*



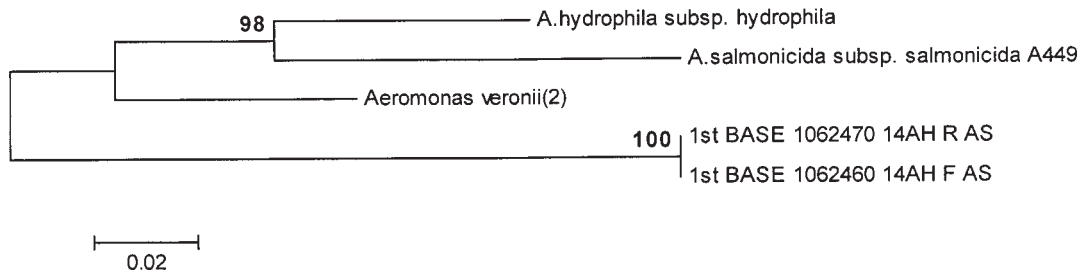
Gambar 5. Dua isolate *A. hydrophilla* adalah sama (100%) dan erat hubungannya dengan *A. veronii* (85%) dibandingkan dengan *A. hydrophilla* subspecies *hydrophilla* atau *A. salmonicida* subspecies *salmonicida* secara metode *Neighbor joining*.

Isolat *A. hydrophilla* berasal dari Danau Batur, Bangli dan dari Karangasem tampak sama (100%) dan satu klaster dengan *A. veronii* berasal dari *Genbank* (85%) dengan metode *Neighbor Joining* (Gambar 5).

Secara *Maximum Parsimony* (Gambar 6) menunjukkan bahwa *A. hydrophilla* subspecies *hydrophilla* dan *A. salmonicida* subspecies *salmonicida* yang berasal dari *Genbank* sangat

erat kekerabatannya (98%). Isolat *A. hydrophilla* berasal dari Danau Batur dan dari Kabupaten Tabanan adalah sama (100%).

Ali *et al.*, (1996) menunjukkan molekul DNA sebesar 71 % lebih tinggi daripada *A. salmonicida* (HG3) dan bahkan lebih tinggi (78 %) dibandingkan dengan *A. hydrophilla* (HG1), hal ini menunjukkan sebagai jenis yang berbeda dari *A. salmonicida* subsp. *bestarium*.



Gambar 6. Dua isolat *A. hydrophilla* adalah sama (100%). *Aeromonas hydrophilla* subspecies *hydrophilla* erat kekerabatannya dengan *A. salmonicida* subspecies *salmonicida* (98%) secara metode *Maximum parsimony*

Menurut Amann *et al.*, (1995), bakteri dengan gen 16S rRNA mempunyai panjang 1500 nukleotida sedangkan molekul 23S rRNA terdiri dari 3000 nukleotida dan 5S rRNA terdiri dari 120 nukleotida. Sebagai pembandingan, *sequencing* gen 16S rRNA strain jenis *A. bestiarum* adalah sama dengan strain *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* dan *A. salmonicida* subsp. *masoucida* serta hanya menunjukkan perbedaan dua nukleotida dari *A. salmonicida* subspecies *salmonicida* (Martinez-Murcia *et al.*, 1992).

Hasil Uji Sensitivitas Terhadap Antibiotik

Penetapan kepekaan bakteri patogen terhadap antimikrob penting dilakukan untuk menentukan antibiotik yang tepat untuk mengobati penyakit. Antibiotik yang digunakan adalah *ampicillin*, *gentamycin*, *doxycycline*, *enrofloxacin*, dan *erythromycin*. Setelah dilakukan uji sensitivitas/kepekaan antibiotik, dari ke lima jenis antibiotic, yang tidak peka terhadap sampel bakteri adalah *ampicillin*, sedangkan yang kepekaannya paling tinggi adalah *enrofloxacin*. *Ampicillin* hanya peka terhadap sampel bakteri 1 (K01áAH) dengan menghasilkan diameter zona hambatan sebesar 13 mm, sedangkan untuk sampel bakteri yang lain tidak sensitif. Antibiotik *gentamycin*, *doxycycline*, *enrofloxacin* dan *erythromycin* menunjukkan zona hambatan yang bervariasi (Tabel 3).

Penggunaan antibiotik untuk pengobatan penyakit harus dengan dosis yang tepat dan tidak membahayakan inangnya. Untuk

antibiotik *ampicilin* diameter zona hambatan yang timbul sekitar 13 mm, hal ini menunjukkan antibiotik tersebut berada di zona intermediet. Antibiotik dikatakan sensitif bila menunjukkan diameter zona hambatan di atas 14 mm dengan kadar 0,01 mg. *Gentamicin* dikatakan sensitif jika menunjukkan daerah zona hambatan di atas 13 mm dengan kadar 0,01 mg, erythromycin dengan kadar 0,015 mg dinyatakan sensitif jika menunjukkan diameter zona hambatan di atas 18 mm (Harmita dan Radji, 2004).

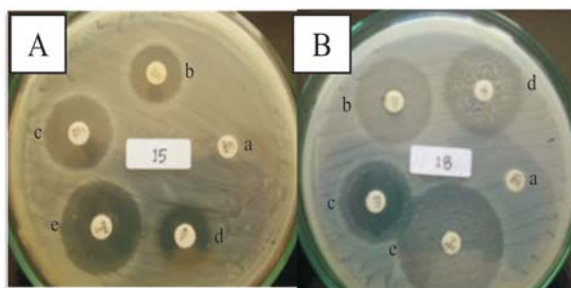
Pada Tabel 3 disajikan bahwa *gentamycin* menunjukkan antibiotik yang sensitif terhadap semua sampel bakteri dari ikan. Hal ini menunjukkan bahwa antibiotik tersebut mengandung zat aktif yang dapat membunuh bakteri relatif tinggi. Pertumbuhan bakteri tersebut terhambat disebabkan oleh konsentrasi zat toksik. Mekanisme pertumbuhan bakteri terhambat, bila terjadi kerusakan dinding sel, terjadi perubahan permeabilitas sel, perubahan molekul protein, dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2013).

Pada umumnya antibiotik memiliki efek sebagai bakterisida atau bakteriostatik pada organisme yang peka dengan menghambat sintesis dinding sel, merusak membran sitoplasma, menghambat biosintesis protein, atau menghambat sintesis asam nukleat. Perbedaan diameter zona hambatan dari berbagai jenis antibiotik karena kandungan zat aktif masing-masing antibiotik berbeda.

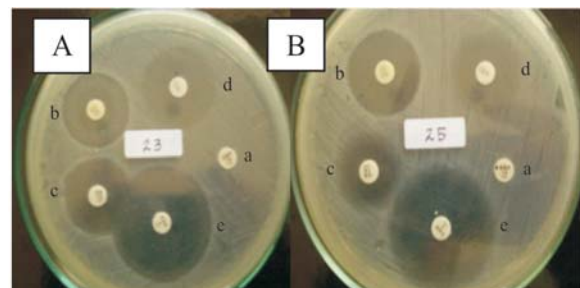
Tabel 3 : Uji kepekaan antibiotik terhadap *Aeromonassp.*

No	Kode sampel	Uji sensitivitas terhadap (mm)				
		<i>Ampicillin</i>	<i>Gentamycin</i>	<i>Doxycycline</i>	<i>Enrofloxacin</i>	<i>Erythromycin</i>
1.	<i>A. hydrophilla</i>	13/resisten	22/sensitif	28/ensitif	38/sensitif	18/sensitif
2.	<i>A. salmonicida achromogenes</i>	0	22/sensitif	21/sensitive	28/sensitif	2/resisten
3.	<i>A. salmonicida smithia</i>	0	22/sensitif	32/sensitive	42/sensitif	23/sensitif
4.	<i>A. hydrophilla</i>	0	20/sensitif	34/sensitive	26/sensitif	18/sensitif
5.	<i>A. salmonicida achromogenes</i>	0	19	29/sensitive	38/sensitif	21/sensitif
6.	<i>A. salmonicida smithia</i>	0	24/sensitif	29/sensitive	40/sensitif	19/sensitif
7.	<i>A. salmonicida*</i>	0	23/sensitif	33/sensitive	31/sensitif	23/sensitif
8.	<i>A. salmonicida**</i>	0	22/sensitif	32/sensitive	31/sensitif	22/sensitif
9.	<i>A. salmonicida</i>	6/resisten	17/resisten	18/resisten	31/ sensitif	17/sensitif
10.	<i>A. salmonicida</i>	6/resisten	20/sensitif	22/resisten	34/ sensitif	18/sensitif
12.	<i>A. hydrophilla</i>	17/sensitif	20/sensitif	20/sensitive	31/ sensitif	18/sensitif
13.	<i>A. salmonicida</i>	15/resisten	18/sensitif	16/resisten	26/ sensitif	22/sensitif
14.	<i>A. hydrophilla</i>	6/resisten	14/resisten	14/resisten	22/sensitif	19/sensitif
15.	<i>A. hydrophilla</i>	6/resisten	16/resisten	15/resisten	22/ sensitif	18/sensitif
16.	<i>A. hydrophilla</i>	10/resisten	20/sensitif	20/sensitif	26/ sensitif	20/sensitif
17.	<i>A. hydrophilla</i>	6/resisten	6/resisten	6/resisten	6/resisten	17/sensitif
18.	<i>A. hydrophilla</i>	6/resisten	25/sensitif	23/sensitif	33/ sensitif	22/sensitive
19.	<i>A. hydrophilla</i>	6/resisten	17/resisten	24/sensitif	35/ sensitif	20/sensitive
20.	<i>A. salmonicida</i>	6/resisten	25/sensitif	23/sensitif	35/ sensitif	22/sensitive
21.	<i>Plesiomonas</i>	20/sensitif	19/sensitif	14/resisten	6/resisten	21/sensitive
22.	<i>A. hydrophilla</i>	6/resisten	17/resisten	24/sensitif	36/ sensitif	18/sensitive
23.	<i>A. salmonicida</i>	6/resisten	24/sensitif	22/sensitif	33/ sensitif	21/sensitive
24.	<i>A. salmonicida</i>	6/resisten	26/sensitif	25/sensitif	38/ sensitif	21/sensitive
25.	<i>A. hydrophilla</i>	6/resisten	18/sensitif	22/sensitif	33/ sensitif	18/sensitive

Keterangan: * dan ** adalah isolat *A. salmonicida* ATCC



Gambar 7. Uji sensitivitas antibiotik terhadap *A. hydrophilla* (A dan B) dua isolat dari Danau Batur. a. *ampicillin*, b. *doxycycline* c. *gentamycin*, d. *erythromycin*, e. *enrofloxacin*



Gambar 8. Uji sensitivitas antibiotik terhadap *A. salmonicidasubspesies smithia* (A) dan *A. hydrophilla* (B) isolat dari Karangasem. a. *ampicillin*, b. *doxycycline* c. *gentamycin*, d. *erythromycin*, e. *enrofloxacin*

Hasil uji sensitivitas antibiotik terhadap dua isolat *A. hydrophilla* yang berbeda, yang berasal dari Danau Batur menunjukkan hasil kepekaan terhadap antibiotik yang berbeda. Isolat nomor 15 peka terhadap antibiotik *enrofloxacin* dan *gentamycin* (Gambar 7A), sedangkan isolat nomor 18 peka terhadap antibiotik *enrofloxacin*, *erythromycin*, *gentamycin*, *doxycycline* (Gambar 7B). Bakteri *A. hydrophilla* yang berasal dari Karangasem juga peka terhadap antibiotik *enrofloxacin*, *erythromycin*, *gentamycin*, *doxycycline* (Gambar 8B). Bakteri *A. salmonicida* subspecies *smithia* peka terhadap antibiotik *enrofloxacin*, *erythromycin*, *gentamycin*, *doxycycline* (Gambar 8A). Antibiotik *enrofloxacin* dan *gentamycin* dapat digunakan untuk mengobati kedua spesies *Aeromonas*.

Metode pengobatan terhadap infeksi atypical *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas, koki dan *platty* umumnya efektif terhadap *A. salmonicida* strain atypical. *A. salmonicida* sub spesies *salmonicida* dan sub spesies *atypical* juga memiliki *A-layer* namun memberikan mekanisme virulensi yang berbeda (Wiklund dan Dalsgaard, 1998).

Sensitivitas *A. salmonicida* subspecies *salmonicida* terhadap antibiotik sangat bervariasi dan dipengaruhi oleh faktor virulensi yang terletak pada permukaan yaitu *S-layer* (Garduno *et al.*, 2000) yang didukung juga oleh *A-layer* yang berada dalam dinding sel (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2013).

Bakteri *A. hydrophilla* menunjukkan sifat fenotip yang sama, namun sensitivitasnya terhadap antibiotik dan secara genetik sangat bervariasi. Dua isolat *A. hydrophilla* yang menunjukkan fenotip sama menunjukkan perbedaan dengan *A. hydrophilla* strain ATCC berdasarkan *full-genome sequencing* (Grim *et al.*, 2013). Genus *Aeromonas* dilaporkan mempunyai diversitas variasi genetik yang tinggi di antara spesies (Nagar *et al.*, 2013). Kejadian resistensi *A. hydrophilla* terhadap beberapa antibiotik sangat tinggi pada ikan air tawar di China (Ye *et al.*, 2013).

Pengobatan dengan antibiotik tidak hanya memperhatikan sensitivitas terhadap bakteri tertentu, namun juga harus dilakukan penelitian tentang dosis terapeutik yang tepat terhadap ikan, dan cara pemberiannya.

SIMPULAN

Bakteri *A. salmonicida* (10 isolat) dan *A. hydrophilla* (11 isolat) diperoleh secara fenotip dari tiga kabupaten (Tabanan, Karangasem, dan Bangli) di Bali. Ikan menunjukkan lesi kulit dan *exophthalmus*. Secara histopatologi menyebabkan epikarditis, retinitis, dermatitis, kongesti hati, dan ginjal.

Isolat *A. salmonicida* terdiri atas dua klaster yaitu *subspesies smithia* dan *subspesies achromogenes* berasal dari Danau Batur. *Aeromonas hydrophilla* di Bali erat hubungannya dengan *A. veronii*. Antibiotik *enrofloxacin* dan *gentamycin* dapat digunakan untuk mengobati kedua spesies *Aeromonas* yang ditemukan di Bali.

SARAN

Wabah penyakit akibat infeksi bakteri pada ikan air tawar sebaiknya dilakukan pengobatan antibiotik yang sensitif secara benar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek LPPM-GM/1399/LIT/2013. Diucapkan terima kasih kepada staf Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BKIPM) Ngurah Rai, Bali yang telah membantu pengambilan sampel ikan sakit.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali A, Carnahan AM, Altwegg M, Lüthy-Hottenstein J, Joseph SW. 1996. *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genomospecies DNA group 2 *A. hydrophilla*), A New Species Isolated From Non-Human Sources. *Med Microbiol Lett* 5 : 156–165.
- Amann RI, Zarda B, Stahl DA, Schleifer KH. 1992. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169.

- Austin B, Austin DA. 2007. *Aeromonadaceae* representatives (*Aeromonas salmonicida*). In: *Bacterial Fish Pathogens: Diseases in Farmed and Wild Fish*, 4th Ed. Chichester, UK. Praxis Publishing. Pp: 24-314.
- Carter GR. 1986. Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. 3rd. Illinois, USA. Charles C Thomas Publisher. Pp. 351-362.
- Ciapini A, Dei R, Sacco C, Ventura S, Viti C, Giovanneti L. 2002. *Journal of Microbiology* 52: 339-352.
- Dallaire-Dufresne S, Tanaka KH, Trudel MV, Lafaille A, Charette S J. 2013. Virulence, Genomic Features and Plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, The Causative Agent of Fish Furunculosis. *Veterinary Microbiology* 1-7.
- Elliot DG, Shotts EB. 1980. Aetiology of Ulcerative Disease in Goldfish, *Carrassius auratus* : Microbiological Examination of Diseased Fish from Seven Locations. *Journal of Fish Diseases* 3 : 133-143.
- Fijan NN. 1972. Infectious Dropsy of Carp : A Disease Complex. *Proceeding of The Symposia of Zoological Society of London* 30 : 39-57.
- Fuller DW, Pilcher KS, Fryer JL. 1977. A Leukocytolytic Factors Isolated from Cultures of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34 : 1118-1125.
- Garduno RA, Moore AR, Olivier G, Lizama AL, Garduno E, Kay WW. 2000. Host Cell Invasion and Intracellular Residence by *Aeromonas salmonicida*: Role of The S-layer. *Can J Microbiol* 46 : 660-668.
- Grim CJ, Kozlova EV, Sha J, Fitts EC, Van Lier CJ, Kirtley ML, Joseph SJ, Read TD, Burd EM, Tall BD, Joseph SW, Horneman AJ, Chopra AK, Joshua RS. 2013. Characterization of *Aeromonas hydrophilla* Wound Pathotypes by Comparative Genomic and Functional Analyses of Virulence Genes. *Research Article* 4: 1-13.
- Gustafson CE, Thomas CJ, Trevor J. 1992. Detection of *Aeromonas salmonicid* from Fish by Using Polymerase Chain Reaction Amplification of The Virulence Array Protein Gene. *App Environ Microbiol* 58 (12) : 3816-3825.
- Hayasaka SS, Sullivan J. 1981. Furunculosis in Cultured American Eel *Anguilla rostrata* (Le Sueur). *Journal of Fish Biology* 18 (6) : 655
- Harmita, Radji. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 1(3): 117-135.
- Hiney M, Dawson MT, Heery DM, Smith PR, Gannon F, Powell R. 1992. DNA probe for *Aeromonas salmonicida*. *Appl Environ Microbiol* 58(3): 1039-1042
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed. Baltimore, Maryland. Williams and Wilkins. Pp. 787.
- Kimura T. 1969. A New Subspecies of *Aeromonas salmonicida* as an Etiological Agent of Furunculosis on Sakuramasu (*Oncorhynchus masou*) and Pink Salmon (*O. gorbuscha*) Rearing for Maturity. Part I. On Morphological and Phycological Properties. *Fish Pathology* 27 (3) : 34-44.
- Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. 1992. Phylogenetic Interralationships of Members of The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as Determined by 16S Ribosomal DNA Sequencing : Lack of Congruence with Result of DNA-DNA Hybridizations. *Int J Syst Microbiol* 42 : 412-421.
- Martinez-Murcia AJ, Antón AI, Ridriguez-Valera F. 1999. Patterns Of Sequence Variation In Two Regions of The 16S rRNA Multigene Family of *Escherichia coli*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 : 601-610.
- Miyata M, Inglis V, Aoki T. 1996. Rapid identification of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* by the polymerase chain reaction. *Aquaculture* 141: 13-24.

- Nagar V, Shashidhar R, Bandekar JR. 2013. Characterization of *Aeromonas* strain isolated from Indian Foods Using rpoD Gene Sequencing and Whole Cell Protein Analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(4): 745-752.
- Paterson WD, Douey D, Sesautels D. 1980. Relationship Between Selected Strains of Typical and Atypical *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* and *Hemophilus piscium*. *Canadian Journal of Microbiology* 26 : 566-598.
- Robert JR. 2001. *Fish Pathology*. 3rd Ed. Cadar, England. Baillere Tynndall Pp. 305-306.
- Rukyani A. 1993. *Penanggulangan Penyakit Udang Windu Penaeus monodon*. Jakarta. Pusat Penelitian dan Pengembangan.
- Syakuri H, Triyanto, Nitimulyo KH. 2003. Perbedaan daya tahan non spesifik klima species ikan air tawar terhadap infeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada* 5(2): 1-10.
- Teska JD, Cipriano RC, William B. 1992. Molecular and Genetic Characterization of Cytochrome Oxydase-Negative *Aeromonas salmonicida* Isolated from Coho Salmon (*Onchorhynchus kisutch*). *Journal of Wildlife Diseases* 28 (4) : 515-520.
- Van Duijn C. 1981. Tuberculosis in Fishes. *Journal of Small Animal Practice* 22 : 391-441
- Wedemeyer GA, Barton BA, McLeay DJ. 1990. Stress and acclimation. In Schreck CB, Moyle PB (Eds.). *Methods for fish biology*. Bethesda, Maryland. American Fisheries Society. Pp. 451-489.
- Weeks-Parkins BA, Ellis AE. 1995. Chemotactic Responses of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Macrophages to Virulent and Attenuated Strains of *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology* 5: 313-323.
- Wiklund T, Dalsgaard I. 1998. Occurrence and Significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in Non-salmonid and Salmonid Fish Species: A Review. *Disease of Aquatic Organism* 32 : 49-96.
- Ye YW, Fan TF, Li H, Lu JF, Jiang H, Hu W, Jiang QH. 2013. Characterization of *Aeromonas hydrophila* from Hemorrhagic Diseased Freshwater Fishes in Anhui Province, China. *International Food Research Journal* 20(3): 1449-1452.