

## Identifikasi Gen *Aerolysin* dan Sensitivitas Antibiotik *Aeromonas Hydrophila* Penyebab Kematian Tukik (*Lepidochelys olivacea*) di Pulau Serangan, Bali

(IDENTIFICATION OF AEROLYSIN GENES AND ANTIBIOTIC SENSITIVITY  
OF AEROMONAS HYDROPHILA AS A CAUSE OF LEPIDOCHELYS OLIVACEA DEATH  
IN SERANGAN ISLAND, BALI)

Rima Ratnanggana Prasetya<sup>1</sup>,  
Emmanuel Djoko Poetranto<sup>2</sup>, Didik Handijatno<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Magister Veteriner, <sup>2</sup>Departemen Klinik Veteriner,

<sup>3</sup>Departemen Mikrobiologi Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Jalan Mulyorejo, Kampus C Unair Surabaya 60115;

Telp. (031) 5992785; E-mail: rimaratnanggana@yahoo.com

### ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah membuktikan adanya gen patogen (*Aerolysin*) pada *Aeromonas hydrophila* sebagai penyebab kematian tukik penyu abu-abu serta mengetahui kepekaan obat antibiotik yang sering digunakan sehingga dapat memberikan terapi yang tepat pada kasus di lapangan. Metode penelitian yang digunakan adalah uji identifikasi menggunakan kultur primer pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) dan *Mac Conkey Agar* (MCA), dilanjutkan uji pewarnaan Gram, uji oksidase, uji katalase, dan uji biokimiawi. Setelah itu dilakukan deteksi gen *aerolysin* menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), serta dilakukan uji sensitivitas antibiotik *oxytetracycline*, *chloramphenicol*, *streptomycin*, dan *kanamycin*. Dari lima sampel tukik abu-abu yang mati, secara patologi anatomi ditemukan adanya perdarahan pada hati dan usus. Hasil identifikasi bakteri ditemukan adanya *A. hydrophila* serta teridentifikasi adanya gen penyandi *aerolysin*. Pada uji sensitivitas antibiotik terhadap *A. hydrophila* yang ditemukan diketahui urutan sensitivitasnya adalah *oxytetracycline*, *chloramphenicol*, *kanamycin*, dan *streptomycin*. Penyebab utama kematian tukik penyu abu-abu di *Turtle Conservation and Education Centre*, Pulau Serangan, Bali adalah *A. hydrophila* yang mengandung gen *aerolysin* serta obat yang paling efektif adalah *oxytetracycline*.

Kata-kata kunci: *Aerolysin*; *Aeromonas hydrophila*; antibiotik; *Lepidochelys olivacea*

### ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the pathogene of *Aeromonas hydrophila* genes (*Aerolysin*) as the cause of *Lepidochelys olivacea* death and to perform the antibiotic sensitivity test for antibiotic that often used in order to provide the best antibiotic treatment in the field case. The method used was the identification test using primary cultures on *Tryptic Soy Agar* (TSA) and *Mac Conkey Agar* (MCA) medium, then followed by Gram staining, oxidase, catalase, and biochemical tests. Then, *aerolysin* genes detection was performed by using *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method, while *oxytetracycline*, *chloramphenicol*, *streptomycin*, and *kanamycin* were tested for their sensitivity. From five samples of dead *Lepidochelys olivacea*, bleeding on the liver and intestine were observed. The identification result of bacteria was found *A. hydrophila*, and identified the gene encoding *aerolysin*. The antibiotic sensitivity test showed a sensitive category of *A. hydrophila* with a sensitivity level were *oxytetracycline*, *chloramphenicol*, *kanamycin*, and *streptomycin*. The main cause of *Lepidochelys olivacea* death in *Turtle Conservation and Education Centre*, Serangan Island, Bali was *A. hydrophila* which contains *aerolysin* genes, in which *oxytetracycline* seems to be the most effective drug for the treatment.

Key words: *Aerolysin*; *Aeromonas hydrophila*; antibiotics; *Lepidochelys olivacea*

## PENDAHULUAN

Penyu merupakan bagian tidak terpisahkan dari ekosistem laut. Penyu terdaftar sebagai spesies yang terancam punah dan masuk dalam *International Union for Conservation of Nature (IUCN) red list* (Flint et al., 2009). Penyu hijau, penyu sisik, penyu belimbing, dan penyu abu-abu merupakan jenis penyu yang terdapat di perairan Indonesia dan masuk dalam daftar *Appendix I Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES)* (Direktorat Konservasi dan Taman Nasional Laut, 2009).

*Turtle Conservation and Education Centre (TCEC)* merupakan tempat penangkaran penyu di Pulau Serangan, Bali. Di TCEC dapat ditemukan tiga jenis penyu, salah satunya adalah penyu abu-abu (*Lepidochelys olivacea*) yang secara alami bertelur di perairan Bali.

Penangkaran penyu pada prinsipnya merupakan salah satu upaya untuk menyelamatkan populasi penyu agar tidak punah dengan meningkatkan daya tahan tubuh penyu dari berbagai gangguan, termasuk penyakit. Infeksi bakteri atau jamur pada penyu merupakan salah satu permasalahan yang sering timbul di penangkaran.

Glazebrook dan Campbell (1993) melaporkan bahwa bakteri penyebab kematian yang sering menyerang penyu abu-abu adalah *A. hydrophila*. Pasquale et al. (1993) melaporkan wabah *Aeromonas* dengan tingkat kematian 95% akibat infeksi *A. hydrophila* pada penyu pernah terjadi di Italia.

Bakteri *A. hydrophila* adalah mikroorganisme patogen oportunistik pada berbagai hewan air dan darat, termasuk manusia. Sinderman (1977) melaporkan bahwa *Aeromonas* spp. adalah bakteri yang umum ada pada lingkungan perairan dan dapat menjadi patogen terhadap hewan yang hidup di bawah kondisi stres lingkungan. Bakteri *A. hydrophila* dapat menyebabkan kematian, tergantung dari toksin yang dihasilkan. Toksin yang bersifat patogen pada *A. hydrophila* yaitu *aerolysin* yang merupakan protein ekstraseluler bakteri tersebut.

Pengobatan terhadap bakteri *A. hydrophila* sering kali dilakukan dengan pemberian antibiotik spektrum luas. Pemberian terapi tersebut perlu diketahui tingkat kepekaannya. Kasus resistensi antibiotik pernah dilaporkan oleh Glazebrook dan Campbell (1990), dan *A. hydrophila* sensitif terhadap *chlortetracycline*,

*oxytetracycline*, *penicillin*, dan *sulfathiazole*. Adanya isolat *A. hydrophila* yang resisten terhadap antibiotik mengindikasikan bahwa beberapa pemberian antibiotik tidak sesuai dengan prinsip-prinsip pengobatan antibiotik dalam mengatasi penyakit bakterial.

Berdasarkan latar belakang tersebut, dan belum banyak dilaporkan tentang penyebab kematian tukik penyu abu-abu, penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengungkap penyebab kematian tukik penyu abu-abu yang diduga akibat bakteri *A. hydrophila* dan membuktikan gen patogen (*Aerolysin*) terdapat pada bakteri tersebut serta kepekaannya terhadap beberapa antibiotik. Metode uji sensitivitas dilakukan untuk mengetahui tingkat hambatan pertumbuhan bakteri terhadap obat yang diberikan. Dengan pengobatan yang tepat, manfaat yang diperoleh adalah dapat menyelamatkan populasi penyu abu-abu.

## METODE PENELITIAN

Pengambilan sampel yang dilakukan di TCEC, Pulau Serangan, Bali diawali dengan melakukan nekropsi pada tukik penyu abu-abu yang mati sebanyak lima ekor pada hari tersebut sejak pukul 07.00–16.00 WITA. Setelah itu organ yang mengalami perubahan patologi anatomi dipisahkan dan digerus, kemudian isolasi bakteri dilakukan dengan teknik *swab* dari gerusan organ tersebut.

Teknik kultur bakteri *A. hydrophila* adalah digoreskan (*streak*) pada media *Tryptic Soy Agar (TSA)* menggunakan ose. Setelah itu, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya koloni bakteri ditumbuhkan pada media *Mac Conkey Agar (MCA)* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan mikroskopis yaitu pewarnaan Gram. Selanjutnya dilakukan uji oksidase dan uji katalase, kemudian dilakukan perbanyakan bakteri pada media TSA, dan dilanjutkan dengan uji biokimia, yaitu uji *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)*, uji *Sulfide Indol Motility (SIM)*, uji *Simons Citrate Agar (SCA)*, uji urease, dan uji gula-gula. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Uji sensitivitas bakteri terhadap antibiotik *oxytetracycline*, *chloramphenicol*, *streptomycin*, dan *kanamycin* dilakukan dengan metode *Kirby-Bauer*. Metode ini menggunakan cakram kertas yang berisi cairan antibiotik diletakan pada media agar yang telah ditanami *A. hydrophila*

Tabel 1. Primer yang digunakan dalam penelitian

Primer	Sequence	Posisi	Amplicon
Aero FdAero Rs	5'-CCTATGGCCTGAGCGAGAAG-3' 5'-CCAGTTCAGTCCCACCAC-3'	764 – 783 1176 - 1194	430 bp

Sumber : Howard *et al.* (1987).

yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Penentuan hambatan pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan adanya daerah jernih yang mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh antibiotik pada permukaan media agar (Pratiwi, 2008).

Identifikasi secara molekuler diawali dengan ekstraksi DNA bakteri menggunakan kit Qiagen. Selanjutnya deteksi gen *aerolysin* ini menggunakan metode PCR. Hasil PCR dideteksi dengan mengelektroforesis kemudian diamati di bawah sinar ultra violet (UV), dan didokumentasikan.

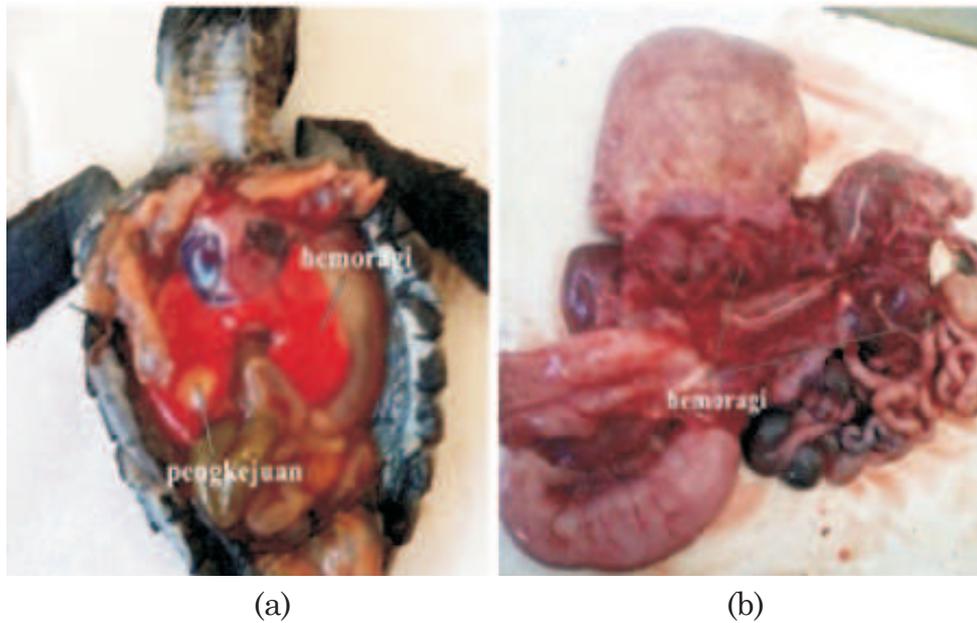
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi patologi anatomi lima ekor tukik penyu abu-abu yang mati dilakukan berdasarkan hasil pengamatan tukik yang diduga sakit dengan gejala tukik terlihat mengapung, kesulitan berenang (kurang lincah), terdapat luka pada permukaan tubuh, dan nafsu makan menurun. Hasil identifikasi patologi anatomi menunjukkan terjadi pembesaran pada bagian trakhea, terjadi inflamasi pada organ paru, organ hati tampak pucat, terjadi hemoragi dan perkejuan pada organ hati, abdomen berisi udara, terdapat mukus kuning pada usus bagian belakang, dan tampak distensi pada saluran pencernaan (Gambar 1). Perubahan pascamati tersebut sesuai dengan laporan sebelumnya yang dikemukakan oleh Glazebrook *et al.* (1990) yaitu lesi (*ulcer*) pada bagian dermis (*flipper*) dan oral, terjadi konjungtivitis, serta terdapat perkejuan pada organ pencernaan. Sementara itu Rajagopalan *et al.* (1984) melaporkan bahwa pada pemeriksaan pascamati penyu abu-abu (*L. olivacea*) terlihat distensi abdomen berisi udara, terjadi inflamasi pada organ paru, hemoragi pada organ hati, terdapat mukus kuning pada usus bagian belakang, dan infeksi pada kloaka. Kerusakan tersebut disebabkan toksin bakteri yang mampu mengakibatkan organ-organ tersebut kehilangan integritas strukturalnya.

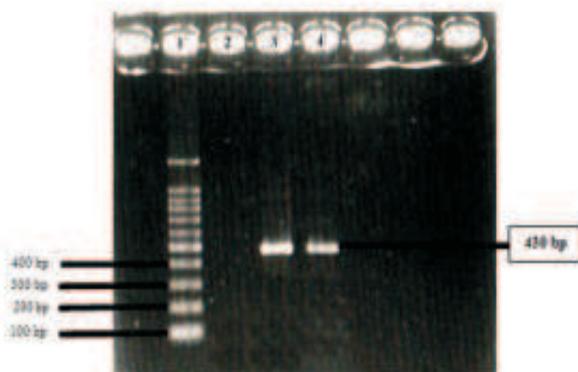
Menurut Chopra *et al.* (2000), *A. hydrophila* termasuk ke dalam kelompok bakteri patogen dengan virulensi yang tinggi. Tingkat virulensi bakteri tersebut ditentukan oleh kemampuan bakteri menghasilkan enzim dan toksin tertentu yang berperan dalam proses invasi dan infeksi. Sebagai faktor-faktor virulensi, kitinase, lesitinase, dan hemolisin yang dihasilkan oleh *A. hydrophila* bekerja dengan mendegradasi jaringan dan menimbulkan luka serta perdarahan pada organ dalam (del Coral *et al.*, 1990). Luka dan hemoragi yang terjadi diduga disebabkan oleh toksin ekstraselular yang bekerja bersinergi merusak jaringan pada tubuh tukik.

Bakteri *A. hydrophila* menghasilkan faktor-faktor virulen yang berbeda termasuk eksotoksin, endotoksin, sitotoksin, dan spektrum penyakit meliputi gastroenteritis, septisemia, dan infeksi pada satwa akuatik (Daskalov, 2005). Bakteri *A. hydrophila* dapat menyebabkan kematian tergantung dari toksin yang dihasilkan. Di dalam tubuh bakteri *A. hydrophila* terdapat Gen Aero dan hylA yang bertanggung jawab dalam memproduksi toksin *aerolysin* dan *hemolysin* dan *aerolysin* merupakan protein ekstraselular yang diproduksi oleh beberapa strain *A. hydrophila* yang bisa larut, bersifat hidrofilik, dan mempunyai sifat hemolitik serta sitolitik. Mekanisme toksin *aerolysin* pada bakteri *A. hydrophila* dalam menyerang dan menginfeksi toksin yaitu dengan mengikat reseptor glikoprotein spesifik pada permukaan sel eukariot sebelum masuk ke dalam lapisan lemak dan membentuk lubang. Toksin *aerolysin* yang membentuk lubang melintas masuk ke dalam membran bakteri sebagai suatu preprotoksin yang mengandung peptida. Toksin tersebut dapat menyerang sel-sel epitel dan menyebabkan gastroenteritis (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012).

Identifikasi morfologi bakteri dilakukan dengan kultur primer pada media TSA. Hasil yang didapatkan yaitu terbentuk koloni bulat, cembung, transparan serta berwarna putih hingga kuning tua. Bakteri *A. hydrophila*



Gambar 1. Perubahan patologi anatomi pada beberapa organ tukik penyu abu-abu (*Lepidochelys olivacea*) Keterangan : Organ hati mengalami hemoragi dan pengkejuan (a). Organ paru dan usus mengalami hemoragi (b).



Gambar 2. Gambaran elektroforesis hasil PCR gen *Aerolysin* dengan panjang amplicon 430 bp. Keterangan: DNA marker dengan ukuran kelipatan 100 bp (1). Kontrol negatif (2). Kontrol positif *Aeromonas hydrophila* (3). Sampel (4).

tumbuh baik pada MCA dan bakteri ini tidak memfermentasi laktosa. Koloni *A. hydrophila* tumbuh berwarna merah karena merupakan bakteri Gram negatif yang tidak mampu memfermentasi laktosa (Quinn *et al.*, 2004). Pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan Gram menunjukkan bakteri tersebut adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang. Identifikasi bakteri dilanjutkan dengan uji

oksidase dan katalase yang menunjukkan hasil positif. Setelah bakteri diidentifikasi secara morfologi, dilanjutkan pengujian biokimia dengan media TSIA, SIM, SCA, urea, dan gula-gula. Hasil untuk bakteri *A. hydrophila* pada bagian miring media TSIA berwarna kuning, pada bagian tegak berwarna merah, serta adanya endapan berwarna hitam yang berarti adanya gas, asam-alkalis, dan  $H_2S$ . Pada media SIM tampak motilitas bakteri, sedangkan pada media SCA dan urea menunjukkan hasil negatif. Pada uji gula-gula menunjukkan hasil positif untuk glukosa, maltosa, manitol, dan sukrosa.

Identifikasi bakteri penyebab kematian pada tukik abu-abu yang menunjukkan positif bakteri *A. hydrophila* dilanjutkan dengan deteksi gen *aerolysin* untuk mengetahui adanya gen patogen yang terdapat pada bakteri *A. hydrophila* tersebut. Pengukuran hasil DNA elektroforesis harus dibandingkan dengan DNA marker. Ukuran DNA marker yang digunakan adalah kelipatan 100 bp, kemudian dibandingkan dengan DNA elektroforesis dapat terlihat panjang ukuran pita DNA sampel yang terdeteksi adalah 430 bp (Tabel 1; Gambar 2).

Pada pengujian sensitivitas antibiotik didapatkan hasil bahwa dari keempat antibiotik semuanya sensitif terhadap bakteri *A. hydrophila*. Akan tetapi tingkat sensitivitasnya berbeda, dimulai dari yang paling sensitif dalam

menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* adalah *oxytetracycline*, *chloramphenicol*, *kanamycin*, dan *streptomycin*.

### SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa penyebab utama kematian tukik penyu abu-abu di TCEC, Pulau Serangan, Bali adalah bakteri *A. hydrophila* yang mengandung gen *aerolysin*. Urutan sensitivitas bakteri *A. hydrophila* terhadap antibiotik dari yang paling peka adalah *oxytetracycline*, *chloramphenicol*, *kanamycin*, dan *streptomycin*.

### SARAN

Kepada petugas penangkaran sebaiknya melakukan pencegahan pencemaran bakteri dengan cara menghindari kontak langsung antara petugas penangkaran dengan tukik penyu abu-abu, seperti dengan menggunakan sarung tangan ketika menyentuh atau memegang tukik penyu abu-abu. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai terapan pengobatan antibiotik terhadap bakteri *A. hydrophila* di lapangan.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada Prof. Dr. drh Pudji Srianto M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan atas kesempatan menempuh pendidikan Magister di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Pimpinan *Turtle Conservation and Education Centre*, Pulau Serangan – Bali, I Made Sukanta, beserta staf yang memberikan izin penelitian dan membantu dalam pengambilan sampel, dan seluruh tenaga pendidik Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi, Laboratorium Biologi Molekular, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, serta Institut Tropical Disease, Laboratorium Gastrointestinal dan Salmonellosis atas bantuan dalam proses penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Chopra AK, Xu XI, Ribardo D, Gonzales M, Kuhl K, Peterson JW, Huston CW. 2000. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infection and Immunity* 68(5): 2808-2818.
- Daskalov. 2005. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. Department of Food Hygiene, Technology and Control of Foods and Foodstuffs, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, 6000 Stara Zagora, Bulgaria. *Food Control* 17: 476-483.
- del Corral F, Shotts EB, Jr, Brown J. 1990. Adherence, haemagglutination and cell surface characteristics of motile aeromonads virulent for fish. *Journal of Fish Diseases*; 13: 255-268.
- Direktorat Konservasi dan Taman Nasional Laut, Direktorat Jenderal Kelautan, Pesisir dan Pulau-Pulau Kecil, Departemen Kelautan dan Perikanan RI. 2009. Jakarta. Pedoman Teknis Pengelolaan Konservasi Penyu..
- Flint M, Patterson-Kane JC, Limpus CJ, Work TM, Blair D, Milis PC. 2009. Postmortem diagnostic investigation of disease in free-ranging marine turtle populations: a review of common pathologic findings and protocols. *J Vet Diagn Invest* 21: 734.
- Glazebrook JS, Campbell RSF. 1990. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. I. *Farmed Turtles Org* 9: 83-95.
- Glazebrook JS., Campbell RSF. 1993. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. II. Oceanum-reared and wild turtles. *Dis Aquat Org* 9: 97-104.
- Howard SP, Garland WJ, Green MJ. 1987. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin *aerolysin* of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology* 169: 2869-2871.
- Lukistyowati I, Kurniasih. 2012. Pelacakan Gen *Aerolysin* dari *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Mas yang diberi Pakan Ekstrak Bawang Putih. *J Veteriner* 13(1): 43-50.

- Pasquale V, Baloda SB, Dumontet S, and Krovacek K. 1994. Outbreak of *Aeromonas hydrophila* Infection in Turtles (*Pseudemys scripta*). *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 60(5): 1678-1680.
- Pratiwi ST. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta. Erlangga.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. 2004. *Clinical Veterinary Microbiology*. London (GB): Mosby.
- Rajagopalan M, Vijayakumaran M, Fernando AF. 1984. Some Health Problems Observed in the Hatchlings and Juveniles of Sea Turtles in Captivity. CMPRI Bulletin. *Sea Turtle Research*.
- Sinderman CJ. 1977. *Aeromonas* disease of loggerhead turtles. Dalam Sinderman CJ. (Editor), *Disease, Diagnosis and Control Dalam: North American Marine Aquaculture*. New York. Elsevier Scientific Publishing Company. Hlm. 292-293.