

**Pengembangan Deteksi *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Nila
(*Oreochromis niloticus*) dengan Metoda Agar Gel Presipitasi di Yogyakarta**

**Development of *Aeromonas hydrophila* Detection from Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*)
by Agar Gel Precipitation (AGP) Method in Yogyakarta**

Surya Amanu, Tri Untari, Michael Haryadi Wibowo, Sidna Artanto

Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
Email : surya@ugm.ac.id

Abstract

Aeromonas hydrophila has been identified as an etiological agent of infectious disease for Tilapia fish. The bacteria also has been demonstrated to be pathogenic for humans, mainly gastroenteritis, although it hasn't reported the infection of *A. hydrophila* to human in Yogyakarta. Detection by biochemical characteristic test can lead to inaccurate result. Therefore, there is a necessity to develop a more specific and accurate method, such as Agar Gel Precipitation (AGP) method. Two samples were collected from Tilapia fish farm located in Yogyakarta showing clinical signs of *A. hydrophila* infected with more than 50% mortality rate. Heat stable soluble antigen was prepared from 4 pure cultures isolated from sample for AGP test. Antiserum used for test wells was antiserum of *A. hydrophila* (ATCC 35654) that have been produced by inoculating whole-cell antigen (heat-stable) and flagellar antigen (formalin-killed) in rabbit. For positive control, soluble antigen prepared from *A. hydrophila* (ATCC 35654), and negative control from *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) ATCC 15947 and *Aeromonas salmonicida* (*A. salmonicida*). Both antisera were able to show positive reaction when applied to AGP test either with pure culture from sample and positive control. The positive reaction showed by the formation of specific precipitin lines between antiserum and antigen wells, and for negative control there was no precipitin. This result demonstrates that AGP method is a one of reliable technique to identify *A. hydrophila*. Both *A. hydrophila* ATCC 35654 and *A. hydrophila* isolate from fish origin in Yogyakarta produced same reaction to antiserum of *A. hydrophila* in AGP test.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, antiserum, soluble antigen, agar gel precipitation.

Abstrak

Aeromonas hydrophila telah diidentifikasi sebagai agen penyebab penyakit pada ikan Nila. Mikroorganisme ini diketahui patogen terhadap manusia terutama sebagai penyebab gastroenteritis, meskipun demikian, belum dilaporkan adanya infeksi pada manusia di Yogyakarta. Uji karakteristik biokimiawi dapat mengarahkan pada diagnosa yang kurang akurat, oleh karena itu terdapat kebutuhan untuk mengembangkan metode yang lebih spesifik dan akurat, yaitu dengan metode agar gel presipitasi (AGP). Dua sampel yang dikoleksi berasal dari lokasi budidaya ikan Nila di Yogyakarta yang terjadi outbreak *A. hydrophila* dengan mortalitas lebih dari 50%. Antigen terlarut yang tahan terhadap panas dipersiapkan dari 4 kultur isolat murni yang diperoleh untuk uji AGP. Antiserum yang digunakan untuk uji pada sumuran adalah antiserum *A. hydrophila* (ATCC 35654) yang diproduksi dengan menginokulasikan *whole-cell* antigen (*heat-stable*) dan antigen flagellar (*formalin-killed*) pada kelinci. Kontrol positif yang digunakan untuk uji ini berasal dari *A. hydrophila* (ATCC 35654), dan kontrol negatif berasal dari *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) ATCC 15947 dan *Aeromonas salmonicida* (*A. salmonicida*). Antiserum yang digunakan terhadap kultur isolat murni dan juga kontrol positif menunjukkan adanya reaksi positif saat diujikan menggunakan metode AGP. Hasil reaksi positif adalah dengan adanya pembentukan garis presipitasi diantara sumuran antiserum dan antigen, sedangkan hasil negatif tidak menunjukkan adanya garis presipitasi tersebut. Hasil dari uji ini menunjukkan bahwa AGP dapat dianggap sebagai metode yang dapat digunakan dan diandalkan (*reliable*) untuk mengidentifikasi *A. hydrophila*. Hasil yang sama ditunjukkan melalui uji AGP terhadap antiserum pada isolat *A. hydrophila* yang berasal dari isolat sampel ikan Nila dari Yogyakarta serta *A. hydrophila* sebagai kontrol positif (ATCC 35654).

Kata kunci : *Aeromonas hydrophila*, antiserum, antigen terlarut, agar gel presipitasi

Pendahuluan

Kejadian penyakit yang disebabkan oleh mikrobia terutama bakteri menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi budidaya ikan air tawar. Ikan Nila merupakan salah satu ikan konsumsi yang banyak dikembangkan di Indonesia, karena dapat dibudidayakan dengan cepat dan mudah (Zulfahrudin, 2011).

Penyakit bakterial yang kerap kali terjadi dan menjadi kendala pada pembudidaya ikan Nila antara lain disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*). Habitat dari bakteri tersebut banyak terdapat di air tawar, tanaman air serta tubuh ikan. Hal ini berpeluang besar untuk terjadinya infeksi pada ikan ketika system pertahanan tubuh ikan mengalami penurunan akibat stress dan kondisi lingkungan yang kurang baik (Swann dan White, 1989).

Penyakit pada ikan merupakan kondisi yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara

langsung maupun tidak langsung (Sachlan, 1972 in Afrianto, 1999) dan dapat menyebabkan kerugian ekonomis karena penyakit pada ikan ini dapat menyebabkan lambatnya pertumbuhan, waktu pemeliharaan yang lebih lama, tingginya konversi pakan, rendahnya tingkat padat tebar dan dapat menimbulkan kematian (Kordi, 2004). Identifikasi *A. hydrophila* secara konvensional dengan sifat karakteristik biokimianya seringkali menunjukkan sifat-sifat biokimiawi yang bervariasi sehingga dapat menghasilkan identifikasi yang tidak akurat.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengaplikasikan metode agar gel presipitasi (AGP) untuk deteksi dan identifikasi *A. hydrophila* yang selama ini belum pernah dilakukan, khususnya di Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan UGM sebagian besar bergantung pada karakter dari hasil

uji biokimiawi yang sangat menyita waktu, tenaga dan memiliki tingkat ketidakakuratan yang tinggi pada beberapa fase, seperti pembuatan media, teknik inokulasi, adanya kontaminasi dan perbedaan karakteristik dari bakteri tersebut. Hal tersebut dapat mengarahkan pada hasil positif atau negatif palsu sehingga hasil diagnosa tidak sesuai dengan yang diharapkan.

Berdasarkan permasalahan tersebut, kami ingin mengaplikasikan metode yang dapat menggambarkan hasil diagnosa yang lebih spesifik melalui interaksi antigen dan antibodi pada agar gel presipitasi (AGP). Metode ini juga diketahui sebagai tes imunodifusi atau tes reaksi presipitasi yang dikenal secara luas sebagai metode untuk mendeteksi agen-agen patogen pada ikan seperti yang telah dilaporkan oleh Chen *et al.* (1974) dan Bullock *et al.* (1974). Metode ini diaplikasikan dengan mendeteksi antigen terlarut (*soluble antigen*) yang akan berdifusi dengan antibodi pada titik temu dalam media agar. Oleh karena itu akan tampak reaksi pada permukaan media agar. Pada penelitian ini, kami menggunakan metode AGP untuk mendeteksi dan mengidentifikasi bakteri *A. hydrophila* secara lebih cepat, tepat dan akurat yang selama ini belum pernah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Materi dan Metode

Materi

Antiserum

Antibodi terhadap bakteri *A. hydrophila* diperoleh dan dipersiapkan dari kelinci menurut Garvey, *et al.* (1977). Isolat *A. hydrophila* (ATCC 35654) yang digunakan untuk memperoleh antibodi berupa antigen somatic (AgO) dengan cara

pemanasan (dimasak) pada suhu 100°C selama 2,5 jam dan Antigen flagella (AgH) dengan cara pemberian formalin (*Formaline Killed*). Antigen O dan H masing-masing disuntikkan pada kelinci dan antibodi dipanen setelah menunjukkan titer antibodi terhadap AgO mencapai 1 : 640 dan AgH mencapai 1 : 5120. Antibodi tersebut siap digunakan dalam uji AGP.

Agar gel

Dalam uji AGP digunakan Purified agar 1% yang dituangkan ke dalam cawan petri atau object glass yang ditambahkan 0,1% phenol sebagai pengawet, dan agar dibiarkan mengeras. Pada agar dibuat sumuran dengan diameter kira-kira 4-5 mm dan ditambahkan beberapa tetes agar cair ke dalam lubang untuk menutup bagian dasar agar tidak merembes ke dasar atau bocor.

Antigen terlarut (*Soluble-Ag*)

Antigen yang digunakan dalam uji AGP terdiri atas 3 isolat yaitu 1 isolat *A. hydrophila* dari ATCC 35654 (sebagai kontrol positif) dan 2 isolat *A. hydrophila* yang diuji diisolasi dari ikan Nila sampel dari Yogyakarta, serta sebagai kontrol negatif digunakan isolat *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) (ATCC 15947).

Semua isolat masing-masing ditanam pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA), dipanen setelah inkubasi 24 jam, kultur dicuci 3 kali dengan PBS, kemudian dipanaskan 100°C 2,5 jam, disentrifus dan masing-masing supernatan dipindahkan ke dalam tabung steril untuk digunakan sebagai antigen terlarut pada uji AGP.

Metode

Uji AGP Positif Uji AGP dilakukan dengan cara

memasukkan antibodi O atau H pada *A. hydrophila* pada satu sumuran dan sumuran sekitarnya diisi dengan antigen terlarut dari isolat yang akan diuji dan juga antigen terlarut dari isolat *A. hydrophila* ATCC 35654 sebagai kontrol positif dan isolat *E. tarda* ATCC 15947 sebagai kontrol negatif. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 5°C dan diamati setiap 6 jam. Hasil positif ditunjukkan oleh adanya garis presipitasi yang tampak di antara antibodi dengan antigen.

Hasil dan Pembahasan

Antiserum *A. hydrophila* dapat menunjukkan reaksi positif ketika diuji dengan metode AGP baik dengan kultur murni dari sampel dan kontrol positif, seperti tampak dalam gambar dibawah (Gambar 1, 2). Sumuran tengah/pusat diisi antiserum flagellar *A. hydrophila* dan 4 sumuran di sekitarnya diisi antigen terlarut dari sampel, kontrol positif dan kontrol negatif. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya garis presipitasi diantara sumuran antiserum dan antigen.

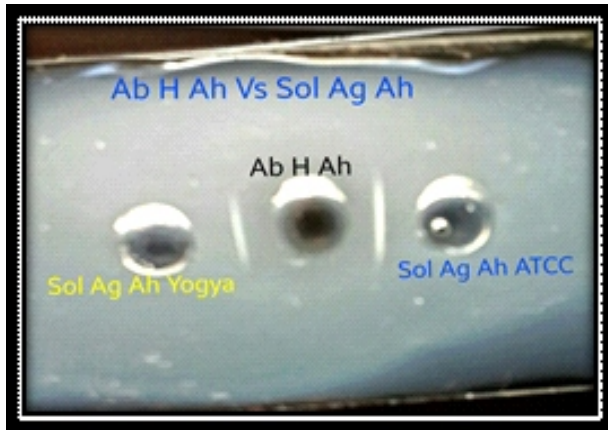
Garis presipitasi mulai terbentuk dengan kontrol positif setelah 12 jam pengamatan, dan setelah 4 hari inkubasi tidak ada reaksi presipitasi pada kontrol negatif. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tidak ada *cross* reaksi (*false +*) atau *false -*) pada tes AGP menggunakan antiserum *A. hydrophila*. Ketika diuji sendiri, kedua antiserum juga memberikan hasil yang sama seperti tampak dalam gambar di bawah (Gambar 3, 4).



Gambar 1. Uji AGP menunjukkan reaksi positif dan negatif : Ab O *A. hydrophila* Vs *A. hydrophila* (positif), *A. hydrophila* ATCC 35654 (kontrol positif), *A. salmonicida* (negatif) tidak adanya garis presipitasi, *E. tarda* ATCC 15947 (kontrol negatif).



Gambar 2. Uji AGP menunjukkan reaksi positif dan negati : Ab H *A. hydrophila* Vs Sol Ag *A. hydrophila* (positif), *A. hydrophila* ATCC 35654 (kontrol positif), *A. salmonicida* (negatif) tidak adanya garis presipitasi, *E. tarda* ATCC 15947 (kontrol negatif)



Gambar 3. Uji AGP : Ab O A. *hydrophila* Vs Sol Ag A. *hydrophila* isolat Yogya, A. *hydrophila* ATCC 35654 (kontrol positif) hasil positif ditunjukkan dengan adanya garis presipitasi.



Gambar 4. Uji AGP : Ab H A. *hydrophila* Vs Sol Ag A. *hydrophila* isolat Yogya, A. *hidrophila* ATCC 35654 (kontrol positif) hasil positif ditunjukkan dengan adanya garis presipitasi.

Uji AGP spesifik dan sensitif untuk mendeteksi antigen terlarut *A. hydrophila*. Disamping lebih baik jika dibandingkan dengan uji biokemis, uji AGP mempunyai beberapa keunggulan lain pada identifikasi pada penyakit ikan yang pathogen. Hanya dengan menggunakan satu plate agar, multiple Ag dapat diuji secara bersamaan (simultan), hal ini dikatakan oleh Garvey (1977). Metode ini juga dapat mengeliminasi cross reaksi, auto-aglutinasi, yang biasanya terjadi pada *rapid slide agglutination*.

Toranzo dkk. (1987) menemukan cross reaksi pada slide aglutinasi tes antara antiserum flagellar *A.*

hydrophila ketika dites bersama strain *A. salmonicida*. Dia menduga bahwa beberapa anggota dari 2 kelompok spesies menunjukkan *thermo-labile* Ag yang tidak dapat dieliminasi dengan metode *formaline-killed* pada preparasi Ag.

Pada semua hasil uji kami, tidak ditemukan cross reaksi antara antiserum *A. hydrophila* dan isolat *A. salmonicida*. Hal ini terjadi karena fungsi ICC dan EPC pada antigen terlarut (*soluble Ag*) dengan antiserum. Hal ini dipaparkan oleh Suprpto dkk. (1996). Dia menyebutkan bahwa ICC dan EPC *A. hydrophila* sangat spesifik pada spesies bakteri. Kami menduga bahwa hal ini merupakan aspek perbedaan yang utama dari *rapid slide agglutination* dimana reaksi antara membran protein bagian luar dari dinding/flagella bakteri adalah sama.

Keunggulan lain dari diskusi awal oleh Bullock (1974) adalah fungsi AGP untuk identifikasi bakteri Gram positif patogen pada ikan yang sulit ditunjukkan dengan slide aglutinasi. Metode AGP ini merupakan satu dari teknik yang mungkin dapat dilakukan untuk identifikasi *A. hydrophila*. Kedua isolat *A. hydrophila* ATCC (kontrol positif) dan isolat *A. hydrophila* yang berasal dari isolat ikan Nila yang berasal dari Yogyakarta menghasilkan reaksi yang sama untuk antiserum *A. hydrophila* pada uji AGP. Dikemudian hari, diharapkan dapat mengaplikasikan metode ini untuk mendeteksi bakteri patogen Gram negatif ataupun positif lainnya pada ikan di Yogyakarta.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat kami simpulkan bahwa metode Agar Gel Presipitasi merupakan salah satu teknik yang dapat dilakukan untuk identifikasi *A. hydrophila*. Kedua isolat *A.*

hydrophila (ATCC) sebagai kontrol positif maupun isolat *A. hydrophila* yang berasal dari isolat ikan Nila yang berasal dari Yogyakarta menghasilkan reaksi yang sama terhadap antiserum *A. hydrophila* (ATCC) pada uji Agar Gel Presipitasi. Metode ini diharapkan di kemudian hari dapat diaplikasikan untuk mendeteksi bakteri patogen Gram negatif ataupun positif.

Daftar Pustaka

- Afrianto, E. dan Lianawati, E. (1972). Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan, Cetakan I, Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Angka, S.L. (2001). Studi Karakterisasi dan Patologi *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). Makalah Falsafah Sains. Bogor: Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor. 12.
- Austin, B and Austin, D.A. (1987). *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*. Ellis, Horwood Ltd., Chichester, John Wiley and Sons. New York.
- Bullock, G.I., Stuckey, H.M. and Chen, P.K. (1974). Corynebacterial kidney disease of salmonids: Growth and serological studies on the causative bacterium. *Applied Microbiology* 28, 811-814.
- Chen, P.K., Bullock, G.I., Stuckey, H.M. and Bullock, A.C. (1974). Serological diagnosis of corynebacterial kidney disease of salmonids. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 31, 1939-1940.
- Cipriano, R.C. (2001). *Aeromonas hydrophila and motile Aeromonad Septicemia of fish*. Fish and Wildlife Service Division of Fishery Research, Washington, D.C.
- Garvey, J.S., Cremer, N.E., Sussdorf, D.H., (1977). *Methods in Immunology, A Laboratory test for Instruction and Research*, 3rd Ed. W.A. Benjamin, Inc. Reading, Massachusetts 01867, USA.
- Kordi, M.G., (2004). *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan*. PT. Rineka Cipta Bina Adiaksara, Jakarta. Pp 116; 122-124; 135-136.
- Roberts, J.R., (1989). *Fish Pathology*, Second edition. London, Philadelphia, Sydney, Tokyo, Toronto. hal. 260-306
- Roberts, R.J., (2001). The Bacteriology of Teleosts dalam *Fish Pathology*, Third Edition. Roberts, R.J. (ed). WB Saunders. Edinburgh. pp 315-321.
- Swann, L., and White, M.R. (1989). *Diagnosis and treatment of "Aeromonas hydrophila" infection of Fish*. Aqua Culture Extension, Illinois-Indiana Sea Grant Program.
- Toranzo, A.E., Baya, A.M., Roberson, B.S., Barja, J.L., Grimes, D.J., Hetrick, F.M. (1987). Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 61, Issue 2, 81-97.
- Yunus, M. Handjatno, D., dkk., (2010). Bahan Ajar Ilmu Penyakit Satwa Akuatik S1, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Zulfahrudin. (2011). Efektifitas Ikan Nila dan Manipulasi Lingkungan untuk Menurunkan Kepadatan Jentik Nyamuk *Anopheles sp.* Di Laguna Kecamatan Tanjung Lombok Utara. Tesis Universitas Gadjah Mada.