



AQUAWARMAN

JURNAL SAINS DAN TEKNOLOGI AKUAKULTUR

Alamat : Jl. Gn. Tabur. Kampus Gn. Kelua. Jurusan Ilmu Akuakultur Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman

Fraksi Protein dan Komponen *Pseudomonas* sp. Sebagai Antibakterial Terhadap *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Protein fractions and components of Pseudomonas sp. antibacterial against Aeromonas hydrophila in tilapia (Oreochromis niloticus)

Jumardi¹⁾, Esti Handayani Hardi²⁾, Gina Saptiani²⁾

¹⁾ Mahasiswa Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman

^{2), 3)} Staf Pengajar Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman

Abstract

This study aims to determine the antibacterial activity of protein fractions and components of Pseudomonas sp. use as an antibacterial to Aeromonas hydrophila. The fish used in the experiment is tilapia with the amount of 270 tilapias and 15-20 grams in weight. There are three stages of the research. The first stage is characterization tests include the tests of motility and oxidative/fermentative. The second stage is antibacterial activity assay using a protein fraction and Pseudomonas sp. bacterial component that is the fraction of 73, 84, 10, 35, 37, 40, 57 and component HK, ICP and ECP each diluted to dilution 10⁹. The last stage is the prevention of trials using protein fractions and components of Pseudomonas sp. The parameters were observed in the stage-1 is characteristic of A. hydrophila bacteria and Pseudomonas sp. Parameter Phase 2 is observed inhibition zone diameter of each fraction and the protein components of the bacteria Pseudomonas sp. starting at the 18th till the 36th. Parameter phase 3 is observed survival rate and relative percent survival (RPS). The conclusion from this study is the protein fraction and components Pseudomonas sp. is antibacterial against A. hydrophila bacteria in vitro, it is best to protein fractions Pseudomonas sp. 10 dilution of 1 and 4, 57 dilution of 5 and 9, 73 dilutions 2 and 3 with inhibition zone of 11-14 mm and component 2 HK dilution of Pseudomonas sp. is the best antibacterial against A. hydrophila in vivo.

Keywords: A. hydrophila, Antibacterial, Protein fraction, Component Bacteria, Pseudomonas sp.

I. PENDAHULUAN

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 sampai 2013 adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas* dan *Pseudomonas*. Kedua bakteri ini ditemukan menginfeksi secara bersamaan pada ikan nila dengan tingkat patogenisitas yang cukup tinggi. Awal tahun 2011, ikan nila yang dibudidayakan dalam KJA di Kecamatan Loa Kulu, Kabupaten Kutai Kartanegara, Provinsi Kalimantan Timur mengalami kematian melebihi 60%, dengan gejala eksoptalmia, 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 dan Pebrianto, 2012). Patogenisitas dari bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. 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 Ekstracelluler product (ECP) *Aeromonas hydrophila* mengandung toksin yang memiliki aktivitas hemolitik, sedangkan Kanai dan Wakabayasi (1984) menjabarkan bahwa protease dalam ECP bakteri *A. hydrophila* berperan lebih besar dalam aktivitas toksik bakteri yang sama. Berdasarkan data tersebut, maka perlu dilakukan penelitian terkait dengan pencarian konsentrasi efektif fraksi protein dan komponen bakteri *Pseudomonas* sp. untuk mencegah bakteri *A. hydrophila* yang

menginfeksi ikan nila. Tujuan dari penelitian ini adalah mencari fraksi protein dan komponen bakteri *Pseudomonas* sp. yang paling baik sebagai antibakterial secara in vitro dan in vivo

II. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan bulan November 2015 sampai dengan Februari 2016. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Perairan, Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Mulawarman Samarinda.

Persiapan Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp.

Bakteri yang digunakan adalah bakteri *A. hydrophila* (EA-01) dan *Pseudomonas* sp. (EP-01) yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Mulawarman. Sebelum digunakan bakteri diuji karakteristik terlebih dahulu untuk memastikan bahwa kedua jenis bakteri yang digunakan merupakan bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. dan tidak terkontaminasi dengan bakteri lain selama penyimpanan. Isolat bakteri diambil pada media miring (stock) dengan menggunakan jarum ose, kemudian ditumbuhkan di media GSP agar dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Pengamatan pada media agar GSP untuk bakteri *A. hydrophila* dapat merubah warna media GSP dari merah menjadi warna kuning sedangkan bakteri *Pseudomonas* sp. tidak merubah warna media GSP agar.

Rekarakterisasi

Rekarakterisasi dilakukan untuk meyakinkan bahwa bakteri yang digunakan adalah bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp., pengujian meliputi uji oksidatif-fermentatif (O/F), dan uji mortilitas (Austin dan Austin, 1999).

Uji Oksidatif Fermentatif (O/F)

Menyiapkan dua tabung berisi media OF sebanyak 3,5 ml. kemudian bakteri *A.*

hydrophila dan *Pseudomonas* sp. ditanam pada media O/F dengan cara ditancap dengan menggunakan jarum ose. Uji oksidatif permukaan atas medium tidak ditutup dengan paraffin cair, sedangkan untuk uji fermentatif permukaan atas medium ditutup dengan paraffin cair. Pertumbuhan bakteri dalam tabung dapat diamati dari perubahan warna yang terjadi setelah diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Reaksi fermentatif ditandai adanya perubahan warna media tabung yang ditutup paraffin cair dari hijau menjadi kuning, sedangkan reaksi oksidatif ditandai adanya perubahan warna media pada tabung yang ditutup paraffin cair dan tanpa paraffin cair dari hijau menjadi berwarna kuning.

Uji Motilitas

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan tersebut motil atau non motil. Tabung berisi media motil sebanyak 3.5 ml disiapkan, lalu isolat bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose lurus steril dan diinkubasi ke dalam tabung yang berisi media motil dengan cara ditusukkan. Kemudian diinkubasi dengan pada suhu 30°C selama 24 jam dan diamati perubahan yang terjadi. Apabila ada perubahan bentuk (berakar), maka bakteri tersebut termasuk positif motil, sedangkan bakteri yang tidak mengalami perubahan tersebut, termasuk non motil.

Persiapan Fraksi Protein dan Komponen Bakteri *Pseudomonas* sp. Terhadap Bakteri *A. hydrophila*

Fraksi protein ekstraselluler bakteri *Pseudomonas* sp. yang digunakan adalah fraksi 73, 84, 10, 35, 37, 40, dan 57 yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Perairan, FPIK, Universitas Mulawarman. Masing-masing fraksi diencerkan dengan pengenceran 10^1 sampai 10^9 . Sedangkan komponen bakteri *Pseudomonas* sp. terdiri dari Ekstraselluler Product (ECP), Intracellular Product (ICP), dan Heat wiled

cell Product (HK) prosedur pemisahan komponen bakteri dilakukann menurut (Kumar, 2005). Untuk mendapatkan 3 komponen terbaik, bakteri *Pseudomonas* sp ditumbuhkan pada media BHIB yang diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Masing-masing komponen dilakukan pemisahan sebagai berikut :

HK/Produk Sel Utuh dengan Metode Pemanasan

Suspensi bakteri *Pseudomonas* sp. disentrifuse dengan kecepatan 8000 g untuk memisahkan antara pellet dan supernatan. Pellet dicuci dengan larutan PBS sebanyak 2 kali lalu direbus pada suhu 60°C selama 1 jam, kemudian langsung digunakan atau di simpan pada suhu 20°C.

ICP/Produk Intraseluler

Suspensi bakteri *Pseudomonas* sp. disentrifuse dengan kecepatan 8000 g untuk memisahkan antara pellet dan supernatant. Pellet disonikasi pada 50 Hz selama 5 menit dan disaring dengan filter paper 0.45 μ m, kemudian dicuci dengan PBS 0.45 sebanyak 2 kali, selanjutnya langsung digunakan atau disimpan pada suhu 20°C

ECP/Ekstraselluler Product

Suspensi bakteri *Pseudomonas* sp. disentrifuse dengan kecepatan 10.000 g pada suhu 4° C selama 30 menit untuk memisahkan antara pellet dengan supernatan, setelah itu disaring dengan filterpaper 0.45 μ m dan produk bisa digunakan untuk uji lanjut.

Penelitian Uji Antibakterial secara in vitro

Uji Antibakterial Protein Ekstraselluler Produk dan Komponen Bakteri *Pseudomonas* sp.

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimal dari fraksi protein 73, 84, 10, 35, 37, 40 dan 57, ECP, ICP dan HK secara in vitro. Komponen bakteri yang memiliki kemampuan antibakterial terbaik terhadap bakteri *Pseudomonas* sp. Pengujian ini dilakukan menggunakan metode kertas cakram mengikuti prosedur (Dulger dan Gonuz,

2004; Saptiani *et al.*, 2012). Beberapa tahap pemeriksaan dijabarkan sebagai berikut : mengkultur bakteri *A. hydrophila* pada media BHIA sebanyak 0,5 ml dalam petridish dengan metode sebar, dengan menggunakan L glass, selanjutnya didiamkan selama 30 menit. Kertas cakram Whitman steril ditetesi 25 µl dengan masing-masing protein fraksi dan komponen bakteri *Pseudomonas* sp. yang akan diuji, selanjutnya dimasukkan dalam biakan bakteri yang ditumbuhkan pada media BHIA yang diatur sedemikian rupa. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28-30°C dan pengamatan dilakukan pada jam ke-18, ke-24, ke-30 dan ke-36. Pengamatan dilakukan dengan mengukur zona hambat yang terbentuk di sekeliling diameter kertas cakram yang tidak ditumbuhi bakteri (bening). Setiap perlakuan diulang sebanyak 2 kali.

Uji Antibakterial Fraksi Protein dan Komponen Bakteri *Pseudomonas* sp. terhadap Bakteri *A. hydrophila*. pada Ikan Nila secara in vivo

Perlakuan pada uji in vivo, berdasarkan hasil uji in vitro, yaitu 3 fraksi protein dan 1 komponen terbaik dengan zona hambat 11-14 mm. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan antibakterial dari fraksi protein dan komponen bakteri *Pseudomonas* sp. untuk mencegah bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila. Perlakuan diberikan ke ikan secara intraperitoneal sebanyak 0,1 ml/ekor. Ikan nila yang digunakan berukuran 15-20 gram sebanyak 270 ekor yang berasal dari Kecamatan Loa Kulu, Kabupaten Kutai Kartanegara, Provinsi Kalimantan Timur.

Perlakuan uji in vivo terdiri dari fraksi protein 10 pengenceran 1, 10 pengenceran 4, fraksi protein 57 pengenceran 5, 57 pengenceran 9, fraksi protein 73 pengenceran 2, 73 pengenceran 3, Komponen HK pengenceran 2, HK pengenceran 4 dan NaCl Fisiologis.

Perlakuan ini diulang 2 kali. Pada hari ke 4 pasca injeksi perlakuan, ikan diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* secara intramuscular sebanyak 0,1 ml/ekor dengan kepadatan bakteri 10^{10} CFU/mL. Selanjutnya ikan diamati setiap 24 jam hingga jam ke 264 pasca uji tantang.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji karakterisasi yang telah dilakukan terhadap bakteri *A. hydrophila* adalah bersifat motil dan fermentatif dan *Pseudomonas* sp. bersifat motil dengan satu flagel oksidatif positif dan fermentatif negatif. Sesuai dengan pernyataan Frerich dan Roberts (1978) dan Madigan *et al.*, (2000). Berdasarkan hasil pengamatan uji in vitro pada fraksi protein dan komponen bakteri *Pseudomonas* sp. maka dipilihlah komponen bakteri yang memiliki zona hambat (> 8 mm). Hasil uji in vitro ada 3 fraksi dan 1 komponen yang memiliki daya hambat 9 sampai 13 mm pada setiap pengenceran, yaitu fraksi protein 10, 57, 73 dan komponen HK yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Hal itu dapat dilihat dari zona hambat yang terbentuk. Kemampuan antibakterial tersebut diduga karena bakteri *Pseudomonas* sp. menghasilkan siderophores yang bersifat bakteriostatic (Guennot, 1994). Menurut Vijayan (2005) bakteri *Pseudomonas* PS-102 memproduksi siderophore dan vikosianin dalam jumlah besar yang bersifat menekan pertumbuhan bakteri vibrio.

Berdasarkan hal tersebut maka fraksi 10 pada pengenceran ke-1 dan ke-4, fraksi 57 pada pengenceran ke-5 dan ke-9, fraksi 73 pada pengenceran ke-2 dan ke-3 dan komponen HK yang memiliki zona hambat 8 sampai 11 mm pada setiap waktu pengamatan, dipilih untuk uji in vivo.

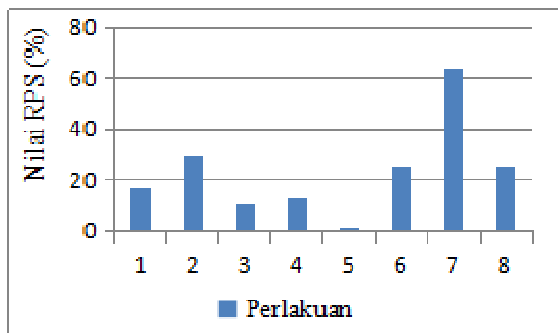
Kelangsungan Hidup (Survival Rate/ SR)

Tabel 1. Kelangsungan Hidup Ikan Nila Setelah diberi dengan fraksi protein dan komponen *Pseudomonas* sp.

Perlakuan	Rata-rata jumlah ikan (ekor)								
	Ulangan			Setelah pemberian fraksi dan komponen	Ulangan			Setelah uji tangang	SR (%)
	1	2	3		1	2	3		
Fraksi 10 pengenceran 1	9	10	9	9.34	4	8	7	6.34	67.9
Fraksi 10 pengenceran 4	10	9	10	9.67	9	5	7	7.07	73.1
Fraksi 57 pengenceran 5	9	10	10	9.67	5	7	7	6.37	65.9
Fraksi 57 pengenceran 9	9	9	9	9	6	7	5	6	66.7
Fraksi 73 pengenceran 2	9	10	9	9.34	2	5	7	4.74	50.7
Fraksi 73 pengenceran 3	10	9	8	9	4	8	7	6.4	71.1
Komponen HK pengenceran 2	10	8	10	9.34	6	8	10	8.04	86.1
Komponen HK pengenceran 4	9	10	8	9	6	9	4	6.4	71.1
Kontrol NaCl Fisiologis	10	9	9	9.34	7	4	6	5.74	61.5

Berdasarkan data SR yang telah diperoleh dapat diketahui bahwa komponen bakteri *Pseudomonas* sp. yang paling aman digunakan terdapat pada perlakuan komponen HK pengenceran 2 yang menghasilkan tingkat kelangsungan hidup ikan nila tertinggi, yaitu 86.1%.

1. RPS (*Relative Percent Survival*)



Gambar 1. RPS (*Relative Percent Survival*)

Berdasarkan nilai RPS yang diperoleh dapat diketahui bahwa antibakterial fraksi dan komponen tertinggi terdapat pada perlakuan 3 dan 4 yang sama-sama menghasilkan RPS sebesar 53%, setelah ujiantang bakteri *A. hydrophila*. diperkirakan bahwa fraksi protein kurang efektif mencegah infeksi *A. hydrophila*, karena RPS yang dihasilkan di akhir penelitian tidak sampai mencapai 60%. Komponen HK pengenceran 2 RPSnya 64%.

IV. KESIMPULAN

Fraksi protein dan komponen bakteri *Pseudomonas* sp. dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* secara in vitro dan in vivo. Antibakterial secara in vitro yang terbaik adalah fraksi protein 10 pengenceran 1 dan 4, 57 pengenceran 5 dan 9, 73 pengenceran 2 dan 3 dengan zona hambat sebesar 11-14 mm, Komponen HK pengenceran 2 bakteri *Pseudomonas* sp. bersifat antibakterial terbaik terhadap *A. hydrophila* secara in vivo.

Saran dari penelitian ini adalah perlu dilakukan pengujian untuk pengobatan serta pengujian lebih lanjut mengenai metode pemberian yang lebih baik agar mudah aplikasinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Austin, B. and D. A. Austin. 1991. Bacterial Fish Pathogens : Diseases of Farmed and Wild Fish. Praxis Publishing. Chisester .
- Austin, B. and D. A. Austin. 1999. Bacterial fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Praxis Publishing Ltd UK.
- Dulger, B and A. Gonuz, 2004. Antimicrobial Activity of Some Endemic *Verbascum*, *Salvia* and *Stachys* Species. Pharm. Biol. 42: 301-304.
- Grisez, L. and Z. Tan. 2005. Vaccine Development for Asian Aquaculture. Disease In Asian.Aquaculture. 5 : P. 483-439.
- Hardi, E.H., C.A. Pebrianto. 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, 16 (2): 35-39.
- Kanai K and Wakabayashi H. 1984. Purification and some properties of proteases from *Aeromonas hydrophila*. Bull Jpn Soc Sci Fish 50 : 1367– 1374.
- Madigan, M. T., J.M. Martinko and J. Parker. 2000. Brock Biology Mikroorganisms. Prentice Hall. International Edition., New Jersey.
- 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 Journal Microbiology 51(4) : 515–520

- Saptiani, G., S.B. Prayitno dan S. Anggoro, 2012. Aktifitas Antibakterial Ekstrak Jeruju (*Acanthus ilicifolius*) terhadap Pertumbuhan *Vibrio harveyi* Secara in Vitro. *Jurnal Veteriner* 13 (3): 257-262.
- Vijayan, K.K, I.S. Bringht Singh, N.S. Jayaprakash, A.S. Somnath Pai, R. Preetha, J.J.S. Rajan, and T.C. Santiago. 2005. A Breckkiswaater isolate of *Pseudomonas* Ps-102, Potential Antagonistic Bacterium Against *Pathogenic Vibrios In* Penaeid and Non-Penaeid Rearing System. ELSEVIER *Aquaculture*. 2006.