

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik Patogen dari Bagian Eksternal Ikan Nila GIFT *Oreochromis niloticus*

Isolation and Identification of Pathogenic Proteolytic Bacteria from External Body Part of GIFT Tilapia *Oreochromis niloticus*

D. Wahjuningrum¹, L. Mayasari¹ dan N.R. Mubarik²

¹Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

²Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor, 16144

ABSTRACT

The aims of this research were to isolate and identify pathogenic proteolytic bacteria from external body part of GIFT tilapia and to study the role of the selected bacteria. Twenty bacterial isolates that were incubated at room temperature (25-27°C) revealed proteolytic activity in nutrient agar containing 0.5% skimmed milk. *Staphylococcus* sp strain T.c2 and *Necromonas* sp.strain T.s2 isolates from infected tilapia were selected based on the proteolytic index. Postulat Koch test showed that *Necromonas* sp. strain T.s2. was pathogenic bacteria for tilapia and has a high value of proteolytic index.

Keywords: Tilapia, *Oreochromis niloticus*, proteolytic bacteria, pathogen.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri proteolitik patogen dari bagian eksternal ikan nila strain GIFT serta untuk mempelajari peranan dari bakteri proteolitik terpilih. Duapuluh isolat bakteri yang diinkubasi pada suhu ruang (25-27°C) menunjukkan aktivitas proteolitik dalam media agar yang mengandung 0,5% susu skim. Berdasarkan indeks proteolitik tertinggi, diidentifikasi dua isolat yaitu *Staphylococcus* sp. strain T.c2 dan *Necromonas* sp. strain T.s2 dari ikan nila yang terinfeksi. Uji Postulat Koch menunjukkan bahwa isolat *Necromonas* sp.strain T.s2 bersifat patogen bagi ikan nila dan memiliki indeks proteolitik yang tinggi.

Kata kunci: Ikan nila, *Oreochromis niloticus*, bakteri proteolitik, patogen.

PENDAHULUAN

Pada Program Intensifikasi Budidaya Ikan (Inbudkan, Kepmen 09/2002), ikan nila merupakan salah satu komoditas unggulan di samping udang, ikan kerapu, dan rumput laut yang banyak diminati pasar domestik maupun mancanegara. Ikan nila GIFT *Oreochromis niloticus* merupakan salah satu jenis ikan nila yang telah menjadi komoditas ekspor. Sejauh ini Indonesia telah menjadi salah satu negara pengekspor ikan nila GIFT terbesar (10 juta ton/tahun) (Suria, 2002).

Namun, dalam budidaya ikan nila masih ditemui kasus penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen. Bakteri patogen tersebut menghasilkan toksin dan enzim protease

yang merusak jaringan tubuh ikan (Snieszko & Axelrod, 1971). Meskipun mekanisme molekular peranan protease bakteri dalam patogenesis masih belum banyak terungkap, namun beberapa peneliti melaporkan bahwa protease berperan penting dalam kerusakan jaringan ikan, seperti protease yang dihasilkan oleh *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Flexibacter columnaris* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Rao *et al.*, 1988; Secades & Gujjarro, 1999).

Produksi enzim protease merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap aktivitas bakteri proteolitik dalam perannya sebagai patogen pada tubuh ikan. Sejauh ini penggalan galur-galur mikroorganisme penghasil protease dan telaah perannya

terhadap organisme terutama ikan-ikan air tawar belum banyak dilakukan di Indonesia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri patogen penghasil enzim protease yang berasal dari bagian eksternal yaitu lendir atau permukaan kulit dan insang dari ikan nila GIFT *Oreochromis niloticus* yang sakit dan mengetahui jenis hubungan simbiosis antara bakteri dan inang dengan dilakukannya uji Postulat Koch secara *in vivo* sehingga dapat diketahui perannya sebagai patogen.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel

Sampel ikan nila GIFT sakit diperoleh dalam keadaan hidup dari Loka Riset Perikanan Air Tawar (Loriskanwar) Sukamandi Subang, Jawa Barat. Isolasi dilakukan langsung di lokasi dengan cara mengambil organ sampel. Bagian insang diambil kemudian dimasukkan ke dalam media NB (*Nutrient Broth*) yang telah mengandung susu skim 0,5% dan diinkubasi selama 48 jam pada *shaker incubator*. Setelah itu digoreskan pada media NA yang mengandung susu skim 0,5%. Isolasi mikroba dari permukaan kulit dilakukan dengan menggoreskan ose pada lendir atau permukaan kulit ikan (metode *swab*) yang selanjutnya dimasukkan ke dalam media NB yang telah mengandung susu skim 0,5% dan diinkubasikan selama 48 jam pada *shaker incubator*. Setelah inkuibasi selama 48 jam, kemudian dilakukan pemurnian dengan cara menggores isolat berulang-ulang sampai diperoleh koloni tunggal.

Penapisan Isolat Proteolitik

Isolat yang menghasilkan protease ekstraseluler akan menghasilkan zona bening di sekeliling koloni bakteri. Isolat dari ikan sakit yang memiliki indeks proteolitik (nisbah diameter zona bening terhadap diameter koloni) tinggi ($IP \geq 2.00$) sebanyak 4 koloni bakteri berbeda, dipilih untuk diidentifikasi.

Identifikasi

Identifikasi dilakukan terhadap empat koloni bakteri berbeda dengan indeks

proteolitik yang tinggi dan bersifat stabil (Hartono, 1995). Identifikasi yang dilakukan meliputi pewarnaan gram, uji katalase, uji oksidase, uji oksidase fermentatif dan uji motilitas. Selanjutnya berdasarkan hasil uji terhadap bakteri penghasil enzim protease tersebut kemudian diidentifikasi menggunakan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1998).

Uji Postulat Koch

Selanjutnya dipilih 2 isolat yang telah diidentifikasi, untuk diujikan secara *in vivo* pada ikan nila sehat. Uji dilakukan terhadap ikan nila GIFT dengan ukuran yang sama dengan sampel awal sebanyak 3 ekor. Sejumlah 10^6 , 10^7 dan 10^8 CFU/ml masing-masing bakteri *Staphylococcus* sp. strain T.c2 dan *Necromonas* sp. strain T.s2 diinjeksikan pada tubuh ikan. Selanjutnya dilakukan pemeliharaan ikan selama 10 hari. Ikan uji dipelihara dalam akuarium berukuran 20 x 30 cm dengan diberi aerasi dan dilakukan penyiponan secara rutin.

Pengamatan dilakukan untuk melihat perubahan pada ikan secara morfologi dan tingkah laku serta gejala klinis apabila terjadi kasus sakit. Dari ikan yang sakit dilakukan isolasi bakteri dari lendir/permukaan kulit dan insang untuk mengetahui keberadaan bakteri yang telah diinjeksikan sehingga dapat dianalisis efek dari pemberian bakteri pada ikan. Apabila terjadi gejala klinis pada ikan uji yang sama dengan kasus sakit pada ikan sampel dan setelah diisolasi ditemukan dominasi bakteri yang sama dengan yang diinjeksikan maka dapat diketahui bahwa bakteri tersebut merupakan patogen yang menyebabkan sakit pada ikan.

Metode Analisa Data

Data yang telah dikumpulkan diolah dan dianalisis secara deskriptif. Analisis data bertujuan untuk menyederhanakan data dalam bentuk yang mudah dipahami.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Proteolitik

Sedikitnya diperoleh 20 bakteri hasil isolasi yang memiliki karakter morfologi berbeda, seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Sandi isolat dan nilai Indeks Preoteolitik (IP) serta karakterisasi beberapa sifat morfologi koloni bakteri hasil isolasi.

No	Organ	Sandi isolat	Indeks Proteolitik (IP)	Warna	Bentuk	Tepian
1	Kulit	T.a	1.58	PK ^{a)}	MY ^{f)}	Halus
2	Kulit	T.b	1.06	PT	MB	Halus
3	Kulit	T.c1	0.48	PT ^{b)}	MB ^{g)}	Halus
4	Kulit	T.c2	3.33	KK	MT	Karang
5	Kulit	T.d	0.90	KN ^{c)}	MY	Karang
6	Kulit	T.e1	1.22	PT	MY	Karang
7	Kulit	T.e2	0.83	PT	MB	Halus
8	Kulit	T.q	0.70	PK	MY	Halus
9	Kulit	T.r	1.11	PK	MY	Halus
10	Insang	T.f	1.37	PT ^r	MB	Karang
11	Insang	T.g	2.05	KN	MY	Karang
12	Insang	T.h	0.05	PT	MB	Halus
13	Insang	T.i1	2.45	KN	MT	Karang
14	Insang	T.i2	0.58	PK	MY	Karang
15	Insang	T.i3	0.49	PT	MB	Halus
16	Insang	T.j1	0.88	PT	MY	Karang
17	Insang	T.j2	3.42	KN	MB	Halus
18	Insang	T.s1	2.33	PK	MB	Halus
19	Insang	T.s2	4.25	KK	MY	Halus
20	Insang	T.t	0.55	PT	MB	Halus

Keterangan : a) PK=Putih Krem d) PT^r=Putih Transparan g) MB=Membulat
 b) PT=Putih e) KK=Kuning Krem h) MTr=Menyebar Tak rata
 c) KN=Kuning f) MY=Menyebar i) IP=Indeks Proteolitik

Tabel 2. Beberapa karakter morfologi, fisiologi dan biokimia dari isolat terpilih Keterangan : a) Bentuk *coccus* (bulat), b) Bentuk *Rod* (batang).

Sumber	Isolat	IP	Gram	Bentuk	Motilitas	O/F	Katalase	Oksidase	Genus
Kulit	T.c2	3,33	+	C	-	F	+	+	<i>Staphylococcus sp</i>
Insang	T.s2	4,25	-	R	-	F	+	+	<i>Necromonas sp</i>
Insang	T.j2	3,42	-	R	-	F	+	-	<i>Enterobacter sp</i>
Insang	T.i1	2,45	-	R	+	F	+	-	<i>Enterobacter sp</i>
Insang	T.s1	2,33	-	R	-	F	+	-	<i>Enterobacter sp</i>
Insang	T.g	2,04	-	R	-	F	+	-	<i>Enterobacter sp</i>

Tabel 3. Pengamatan ikan uji Postulat Koch secara umum

Bakteri uji	Kepadatan Inokulasi Bakteri (CFU/ml)	Hasil Pengamatan		
		Gerak	Respon Makan	Gejala klinis
<i>Staphylococcus sp.</i>	10 ⁶	(+)	(++)	Bercak merah pada kulit
	10 ⁷	(-)	(++)	Bercak merah pada kulit dan operkulum
	10 ⁸	(-)	(++)	Bercak merah pada kulit dan bibir
<i>Necromonas sp.</i>	10 ⁶	(+)	(+)	-
	10 ⁷	(-)	(+)	Sisik ada yang lepas, Rahang kemerahan
	10 ⁸	(-)	(+)	Rahang kemerahan

Keterangan :
 (-) pasif
 (+) cenderung pasif/respon makan rendah
 (++) cenderung aktif /respon makan sedang
 (+++) aktif/respon makan tinggi

Seleksi bakteri penghasil protease lebih dipilih yang mempunyai aktivitas proteolitik cukup tinggi secara kualitatif dengan mengukur lebar area bening disekeliling koloni ketika bakteri ditumbuhkan dalam medium yang mengandung kasein. Aktivitas pemecahan protein tersebut disebabkan oleh produksi enzim protease ekstraseluler oleh bakteri tersebut. Enzim protease ekstraseluler merupakan enzim yang diproduksi di dalam sel dan kemudian dikeluarkan ke dalam substrat di sekelilingnya. Perubahan di sekeliling koloni tersebut dapat dilihat misalnya dengan terbentuknya zona bening pada areal hidrolisis protein oleh enzim proteolitik.

Seleksi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik

Dari 20 isolat bakteri yang diperoleh, dipilih 6 bakteri yang mempunyai nilai $IP \geq 2,00$. Kemudian dilakukan uji beberapa sifat fisiologi dan biokimia, dengan hasil seperti yang tertera pada Tabel 2.

Isolat T.c2

Berdasarkan karakter tersebut, isolat T.c2 diidentifikasi sebagai *Staphylococcus* sp. Adapun karakter lainnya menurut Cowan (1974) ialah tidak berspora, bersifat aerobik dan anaerob fakultatif, pada umumnya pigmentasi menjadi perhatian lebih untuk mengkarakterisasi genus ini.

Menurut Greenwood *et al.*, (1995) diacu dalam Ramdani (2003), *Staphylococcus* sp. memiliki sebaran luas pada kulit manusia dan vertebrata lain dan bersifat patogen oportunistik. Pada katak lembu dan ikan yang mengalami bercak merah dapat ditemukan salah satu jenis bakteri *Staphylococcus* yakni *S. aureus* (Pramono *et al.*, 1982).

Hasil penelitian yang dilakukan Djannatun (2002) diacu dalam Sabana (2004) menyebutkan bahwa terdapat jenis yang cukup patogen yaitu spesies *S. aureus* yang bersifat *non host specific* dan dapat menyebabkan penyakit pada manusia maupun hewan. Spesies ini merupakan salah satu patogen dalam budidaya ikan dengan gejala menyebabkan bintik merah pada ikan. *S. aureus* menghasilkan berbagai macam eksoenzim yang beberapa di antaranya diketahui merupakan faktor virulensi. Di

antara enzim tersebut terdapat berbagai jenis protease seperti protease logam, protease tiol dan protease serin V8 dan exfoliative toksin A (ETA) dan exfoliative toksin B (ETB). Penelitian yang dilakukan oleh Tashiro *et al.*, (1997) diacu dalam Sabana, (2004) terhadap bakteri tersebut memperlihatkan bahwa *S. aureus* mensekresikan protease yang mengusahkan influenza pada virus influenza dalam tubuh tikus. Selain itu infeksi bakteri ini dalam menyebabkan pneumonia kombinasi virus-bakteri dilaporkan mempunyai tingkat kematian mencapai 42%.

Berbagai protease *Staphylococcus* dapat berfungsi sebagai faktor virulen dengan berbagai mekanisme, termasuk menginaktifkan peptida anti mikroba, memotong molekul immunoglobulin pada manusia dan diikuti diseminasi oleh kerusakan sel. Protease V8 yang dihasilkan oleh bakteri *S. aureus* dapat memotong dan menginaktifkan rantai berat dari semua kelas immunoglobulin manusia secara *in vitro* (Reed *et al.*, 2001 dalam Sabana, 2004).

Karakterisasi sebagian besar enzim protease dari *Staphylococcus* sp. berdasarkan Drapeau (1978) diacu dalam Holder (1985) termasuk dalam serinoprotease atau metaloprotease. Salah satu hasil karakterisasi protease *Staphylococcus* menyebutkan bahwa protease yang dihasilkan termasuk jenis metaloprotease dengan berat molekul 38.000, hidrolisis kasein optimum pada pH 7, terhambat oleh EDTA dan menghendaki ion Zn^{++} atau Co^{++} untuk aktivitasnya. Untuk mengetahui berapa banyak protease yang dieksekresikan, aktifitas dan karakter protease *Staphylococcus* sp. hasil isolasi tidak dapat diperkirakan mengacu pada data yang ada tersebut karena secara aktual perlu dilakukan peninjauan ilmiah yang lebih luas untuk mengidentifikasi enzim protease.

Isolat T.g, T.i1, T.j2.

Menurut Cowan (1974), karakter tersebut sesuai dengan genus *Enterobacter*. Karakter lainnya dari genus ini ialah bersifat aerobik dan anaerobik fakultatif, memproduksi gas dan ornithin dekarboksilase. Beberapa galur memproduksi pigmen berwarna kekuningan. *Enterobacter* sp dengan $IP \geq 2,00$ berhasil

diisolasi dari ikan nila gift yakni baik dari insang ikan sakit maupun sehat.

Isolat T.s2

Berdasarkan Cowan (1974), karakter tersebut sama dengan genus *Necromonas* sp. Apabila koloni ditumbuhkan pada agar akan terlihat pigmen kecoklatan pada permukaan media. Bersifat aerobik dan anaerobik fakultatif dan berpeluang menghasilkan gas.

Menurut Cowan (1974), nama genus ini diciptakan oleh Smith (1963) untuk bakteri yang menghasilkan furunculosis pada ikan. Gejala pada ikan yang terinfeksi mikroorganisme ini tidak termasuk dalam kasus *food poisoning*. Pengujian yang dilakukan oleh beberapa laboratorium kesehatan umum menyebutkan kemungkinan mikroorganisme tersebut dapat diisolasi dari ikan. *Necromonas* sp. dapat diidentifikasi berdasarkan kemampuannya untuk tumbuh pada suhu ruang (37° C) dan dari produksi pigmen kecoklatan yang didifusikan pada medium dimana mikroorganisme tumbuh.

Peran Bakteri Proteolitik Sebagai Agen Penyakit

Bakteri terpilih pada penelitian ini belum dapat diketahui sifat atau karakternya terhadap inang yakni ikan nila GIFT sebelum dilakukan pengujian, sehingga dapat diketahui efek infeksi bakteri terhadap ikan. Apabila efek infeksi bakteri hasil isolasi dari ikan sakit terhadap ikan sehat menyebabkan ikan sehat tersebut menjadi sakit dengan gejala seperti ikan sakit pada awalnya, maka telah dapat dibuktikan bahwa bakteri yang diisolasi merupakan bakteri penyebab penyakit.

Uji Postulat Koch dilakukan pada isolat T.c2 dan T.s2, yang memiliki indeks proteolitik paling tinggi dan memperlihatkan terjadinya gejala klinis pada ikan. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Pada ikan-ikan yang diinfeksi dengan isolat bakteri T.c2 yang diidentifikasi sebagai *Staphylococcus* sp. ditemukan gejala klinis yang serupa dengan sampel ikan sakit yang diisolasi pada penelitian. Gejala tersebut seperti bercak merah pada kulit, bibir dan operkulum. Setelah dilakukan isolasi dari

bagian-bagian tersebut ditemukan adanya dominasi bakteri yang diinfeksi. Dengan demikian penyebab sakit teridentifikasi sebagai bakteri yang sama dengan patogen sebelumnya.

Berdasarkan hasil pengujian adanya faktor virulensi bakteri T.c2 terhadap ikan dengan gejala sakit yang sama seperti saat diisolasi maka dapat diketahui terdapatnya peran protease yang tinggi terhadap efek virulensi tersebut. Dengan IP sebesar 3,33, secara kualitatif diketahui besarnya pengaruh protease dalam menyebabkan virulensi yakni dengan memecah senyawa kompleks sehingga mempermudah masuknya patogen dalam tubuh inang. Akan tetapi secara kuantitatif belum dapat diketahui secara pasti aktivitas proteolitik yakni komposisi dan mekanisme protease. Menurut penelitian Ciborowski dan Jeljaszewicz diacu dalam Holder (1985), terdapat kemungkinan interaksi antara aktivitas proteolitik *Staphylococcus* dengan peredaran darah dan sistem fibrinolitik. Tidak saja meliputi aktivitas pseudokoagulase namun juga komponen lainnya seperti interaksi dengan leukosit.

Berdasarkan hasil uji Postulat Koch dari isolat bakteri T.s2 yang diidentifikasi sebagai *Necromonas* sp. terdapat ikan uji yang mengalami kasus sakit seperti tampak dari gerakan ikan yang pasif, kurangnya respon terhadap pakan, adanya nekrosis pada sisik, dan warna rahang yang menjadi merah. Akan tetapi setelah diisolasi dari bagian-bagian tersebut tidak diperoleh adanya dominasi bakteri yang diinfeksi. Hal tersebut menimbulkan dugaan bahwa gejala sakit pada ikan bukan disebabkan oleh bakteri yang diinfeksi melainkan oleh faktor lain yang berkaitan dengan lingkungan dan kondisi ikan itu sendiri. Timbulnya kasus sakit juga diduga tidak disebabkan oleh infeksi tunggal bakteri tetapi disebabkan infeksi dari beberapa bakteri yang bekerja secara sinergis. Seperti halnya dikemukakan dalam Cowan (1974) bahwa pada beberapa pengujian diagnosa ikan oleh laboratorium kesehatan umum, bakteri *Necromonas* sp. dapat terisolasi.

KESIMPULAN

Dari lendir dan insang ikan nila sakit telah berhasil diisolasi sedikitnya 20 bakteri proteolitik patogen. Total isolat yang mampu diseleksi berdasarkan nilai indeks proteolitiknya (IP) adalah 6 isolat yakni 1 isolat dari kulit ikan sakit dan 5 isolat dari insang ikan sakit.

Berdasarkan hasil telaah morfologi dan fisiologi isolat-isolat terpilih, yaitu isolat T.c2 dan T.s2 yang ditemukan maka dapat diidentifikasi ke dalam 2 genus bakteri yakni *Staphylococcus* sp. dan *Necromonas* sp. Berdasarkan hasil uji Postulat Koch untuk pengujian terhadap ikan yang diinjeksi dengan bakteri *Staphylococcus* sp. memperlihatkan gejala sakit yang hampir sama dengan inang saat isolasi sehingga dapat disimpulkan bahwa bakteri tersebut merupakan patogen penyebab sakit pada inang dan sifat virulensinya diduga akibat peran protease yang dihasilkannya.

SARAN

Karakterisasi enzim protease dan telaah tingkat patogenisitas dari bakteri proteolitik patogen sebaiknya dilakukan untuk penelitian selanjutnya. Sehingga dapat dijadikan dasar untuk pengendalian kasus penyakit ikan nila yang disebabkan oleh bakteri pada umumnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Cowan, S.T. 1974. *Manual for the Identification of Medical Bacterial*. Second edition. Cambridge University. Cambridge. 238p.
- Hartono, N. 1995. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Protease dari Ikan. Skripsi. Departemen Teknologi Industri, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor. 2005.
- Holder, I. A., 1985. *Bacterial Enzymes and Virulence*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. William & Wilkins. Baltimore
- Rao, M.B., Tangsale, A.M., Ghasge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. *Molecular and Biotechnology Aspects of Microbial Protease*. *Microb Mol Biol Rev* 62, 597 – 635.
- Sabana, A., 2004. *Screening dan Karakterisasi Bakteri Laut Penghasil Inhibitor Protease Pada Sponge Dari Kepulauan Seribu, Jakarta*. [Skripsi]. Departemen Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Secades P, Guijarro. 1999. *Purification and Characterization of an Extracellular Protease from The Fish Pathogen Yersinia ruckeri and Effect of Culture Conditions on Production*. *Appl Environ Microbiol* 65, 3969 – 3975.
- Snieszko SF, Axelrod. 1971. *Disease of Fishes*. T.H.P. Publication. London.
- Suria, S. 2002. Nila Gift (Tilapias). <http://suharjawanaturia.tripod.com/ads.articles.htm>. [14 April 2003]