

Efek penginjeksian produk intraseluler (icp) dan ekstraseluler (ecp) bakteri *Pseudomonas* sp. terhadap gambaran darah ikan nila (*Oreochromis niloticus*) (Effect of ECP and ICP *Pseudomonas* sp. injected to haematology of Nile tilapia)

Dosim, Esti Handayani Hardi, Agustina

Jurusan Budidaya Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman
 Jl. Gunung Tabur No. 1. Kampus Gn. Kelua Samarinda 76123
 E-mail: dosim@rocketmail.com

ARTICLE INFO

Article history:
 Received March 7, 2022
 Received in revised form April 15, 2022
 Accepted August 5, 2022

Keywords: haematology, ECP, ICP, *Oreochromis niloticus*, *Pseudomonas* sp.



ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of *Pseudomonas* ECP and ICP injection incubated on TSA and TSB media with incubation period of 72 hours on the Nile tilapia (*O. niloticus*) haematology. Parameters observed were hemoglobin, hematocrit, erythrocyte total and of leukocyte total. The ECP or ICP were injected into intraperitoneal Nile tilapia as much as 0.2 ml/fish. Observations were made on 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 hour after injection. Extracellular products were obtained by centrifuging *Pseudomonas* suspension grown on TSA and TSB media (incubation time 72 h ± 30°C) using a 10.000 g centrifuge for 30 min at 4°C. Supernatant was filtered using filter paper 0.45 µm. To get the ICP, supernatant was centrifuged in room temperature. The results revealed that ICP injection caused the decrease of haematology faster than ECP injection. This indicates that the ICP *Pseudomonas* more virulent than ECP.

PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) adalah ikan air tawar yang berasal dari sungai Nil dan danau-danau di sekitarnya. Bibit ikan didatangkan ke Indonesia secara resmi oleh Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi pada tahun 1969. Setelah melalui masa penelitian dan adaptasi, barulah ikan ini disebarluaskan kepada petani di seluruh Indonesia, salah satunya adalah di Kalimantan Timur. Ikan nila dikembangkan di daerah Loa Kulu Kabupaten Kutai Kartanegara dengan budidaya di Karamba Jaring Apung (KJA) dan kolam tanah.

Menurut Hardi dan Pebrianto (2012) bakteri yang dominan ditemukan menginfeksi ikan nila di Loa Kulu Kutai Kartanegara adalah bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. Bakteri *Pseudomonas* sp. ditemukan menginfeksi organ mata, otak, hati dan ginjal ikan dengan gejala ikan nila yang terinfeksi berupa eksoptalmia, adanya memar merah atau luka pada permukaan tubuh atau sirip bahkan terkadang juga ditemukan ikan mengalami pendarahan.

Untuk mengoptimalkan upaya pencegahan dan pengobatan infeksi *Pseudomonas* sp. maka perlu diketahui terlebih dahulu mengenai mekanisme patogenesitas bakteri tersebut pada ikan nila. Faktor virulensi bakteri *Pseudomonas* sp. pada ikan sampai sekarang belum diketahui secara jelas sehingga diperlukan penelitian lebih mendalam. Untuk memahami kemampuan *Pseudomonas* sp. menyebabkan sakit pada ikan maka perlu diketahui bagian dari *Pseudomonas* sp. yang bersifat virulen. Kajian produk ekstraseluler (ECP) dan intraseluler (ICP) dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri menghasilkan eksotoksin serta melihat mekanisme infeksi pada ikan nila. Menurut Soedigdo (1988), berdasarkan tempat bekerjanya, enzim dapat dibedakan dalam 2 golongan, yaitu endoenzim dan eksoenzim. Endoenzim disebut juga enzim intraseluler, dihasilkan di dalam sel yaitu pada bagian membran sitoplasma dan

melakukan metabolisme di dalam sel. Eksoenzim (enzim ekstraseluler) merupakan enzim yang dihasilkan sel kemudian dikeluarkan melalui dinding sel sehingga terdapat bebas dalam media yang mengelilingi sel dan bereaksi memecah bahan organik tanpa tergantung pada sel yang melepaskannya.

Penelitian ini meliputi isolasi ekstraseluler (ECP) dan intraseluler (ICP), efek atau pengaruh produk ekstraseluler (ECP) dan intraseluler (ICP) terhadap ikan nila, dengan melihat gambaran darah atau parameter hematologi ikan nila (*O. niloticus*).

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai Maret 2013 di Laboratorium Mikrobiologi Perairan Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman Samarinda.

Ikan dan Bakteri Uji

Ikan yang digunakan adalah ikan nila berukuran 15 g yang berasal dari Loa Kulu Kutai Kartanegara. Sebelum digunakan, ikan terlebih dahulu ikan dikohabitasi pada akuarium uji selama 7 hari sekaligus memantau ada tidaknya gejala penyakit yang disebabkan oleh *Pseudomonas* sp. Bakteri yang digunakan adalah bakteri *Pseudomonas* yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman.

Isolasi Produk Ekstraseluler (ECP) dan Produk Intraseluler (ICP)

Isolasi ekstraseluler dan intraseluler *Pseudomonas* sp. mengikuti prosedur Suprpto *et al.* (1997). Bakteri dikultur dalam media TSA dan media TSB. Kultur bakteri diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30°C. Bakteri yang tumbuh pada media TSA dan media TSB kemudian dipanen dengan menambahkan larutan PBS sebanyak 5 ml untuk media TSA. Produk ekstraseluler (ECP) diperoleh dengan cara; suspensi bakteri dari media TSA dan TSB disentrifuse dengan kecepatan 10.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. *Slurry* berupa bakteri yang dihasilkan kemudian disaring dengan filter paper dengan ukuran 0,45 µm. Untuk mendapatkan ICP suspensi bakteri dari media TSA dan TSB disentrifuse pada kecepatan 10.000 g selama 30 menit pada suhu 28-30°C. *Slurry* yang dihasilkan kemudian disaring dengan filter paper dengan ukuran 0,45 µm.

Uji Toksisitas Bakteri *Pseudomonas* sp. pada Ikan Nila

Produk ekstraseluler dan intraseluler diinjeksi melalui intra *peritoneal* pada 10 ekor ikan nila pada setiap satu akuarium dengan tiga ulangan sebanyak 0,2 ml/ ekor. Untuk mengetahui pengaruh fisiologis terhadap ikan nila, maka ikan tersebut selanjutnya dipelihara selama 7 hari. Parameter yang diamati adalah haematologi, kadar hemoglobin, kadar hematokrit, total eritrosit, dan leukosit. Pengamatan dilakukan setiap 6,12,24,48,72,96,120,144 dan 168 jam pasca injeksi.

Perlakuan tersebut terdiri dari :

1. Perlakuan ECP dari media TSA inkubasi 72 jam
2. Perlakuan ECP dari media TSB inkubasi 72 jam
3. Perlakuan ICP dari media TSA inkubasi 72 jam
4. Perlakuan ICP dari media TSB inkubasi 72 jam
5. Kontrol, diberi media TSB murni inkubasi 72 jam

Pengamatan Gambaran Darah (Haematologi) Ikan Nila

Pengamatan haematologi diamati pada jam ke- 6 (hari ke- 1) sampai jam ke-168 (hari ke- 7) pasca injeksi dengan ECP dan ICP serta kontrol. Darah diambil dari vena caudalis dekat ekor dengan menggunakan spuit yang telah diisi antikoagulan dengan perbandingan 1 : 2. Darah yang sudah diambil

dimasukkan ke dalam tabung micro cube. Gambaran darah selanjutnya diuji atau diperiksa. Parameter yang diamati dalam uji hematologi antara lain :

1. Kadar Hemoglobin

Menurut Wedemeyer dan Yasutake (1977), menyatakan kadar hemoglobin diukur dengan cara; tabung sahnometer diisi dengan larutan HCl 0,1 N sampai angka 10 (garis skala paling bawah pada tabung sahnometer), kemudian tabung tersebut ditempatkan di antara 2 tabung dengan warna standar, lalu darah ikan diambil dari tabung micro tube dengan pipet sahli sebanyak 0,02 ml dan dimasukkan ke tabung sahli dan didiamkan 3 menit, sebelumnya ujung pipet dibersihkan terlebih dahulu. Kemudian ditambahkan akuades dengan pipet tetes sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan gelas pengaduk sampai warnanya tepat sama dengan warna standar. Kadar hemoglobin dinyatakan dalam g%

2. Kadar Hematokrit

Sampel darah dimasukkan dalam tabung mikro hematokrit sampai kira-kira 4/5 bagian tabung, sumbat ujungnya (bertanda merah) dengan kretoseal kemudian sentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Setelah itu diukur presentase dari nilai hematokrit. Kadar hematokrit dinyatakan sebagai % volume padatan sel darah (Anderson dan Siwicki, 1993).

3. Total Eritrosit

Menurut Blaxhall dan Daisley (1973), metode pengukuran total eritrosit yaitu sampel darah dihisap dengan pipet skala 0,5 dilanjutkan dengan menghisap larutan Hayem sampai skala 101, kemudian dihomogenkan dengan cara menggoyang-goyangkan membentuk angka delapan. Tetesan pertama dibuang dan tetesan berikutnya dimasukkan kedalam hemasitometer dan ditutup dengan cover glass. Penghitungan dilakukan pada 5 kotak kecil hemasitometer dan jumlahnya dihitung dengan rumus:

$$\text{Jumlah eritrosit} = \text{jumlah sel eritrosit terhitung} \times 10^4 \text{ sel/mm}^3$$

4. Total Leukosit

Menurut Blaxhall dan Daisley (1973), metode pengukuran total leukosit yaitu sampel darah dihisap dengan pipet skala 0,5 (pipet yang digunakan adalah pipet khusus pengukuran leukosit), dilanjutkan dengan menghisap larutan turk's sampai skala 11, kemudian dihomogenkan dengan cara menggoyang-goyangkan membentuk angka 8. Tetesan pertama dibuang dan tetesan berikutnya dimasukkan ke dalam hemasitometer dan ditutup dengan cover glass. Penghitungan dilakukan pada 4 kotak besar hemasitometer dan jumlahnya dihitung:

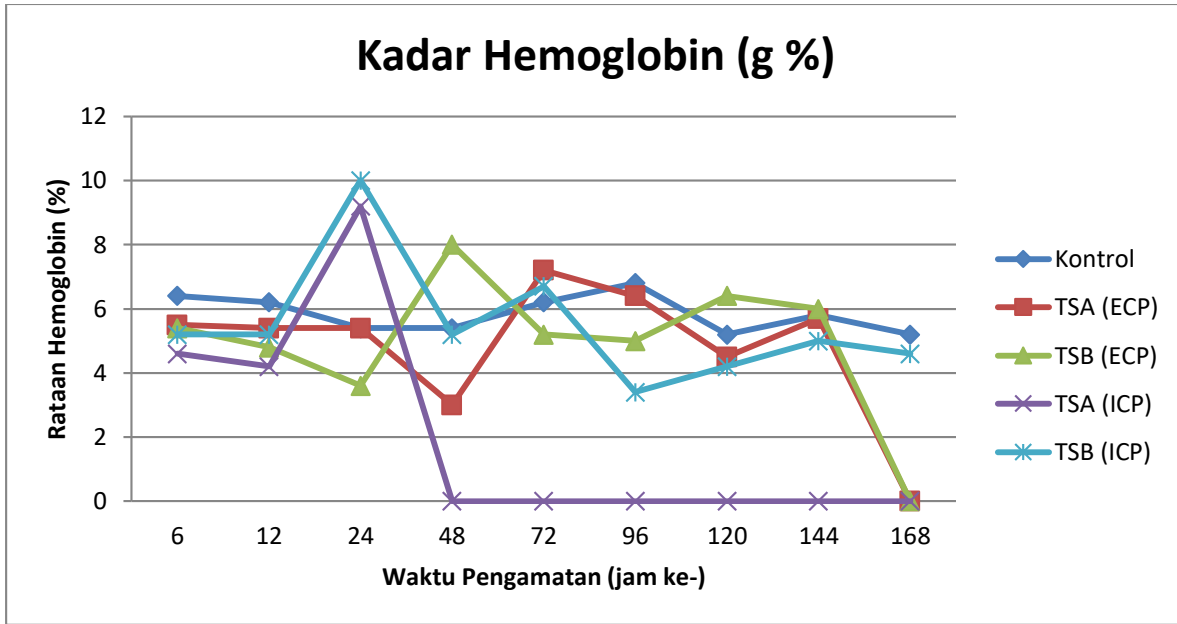
$$\text{Jumlah leukosit} = \text{jumlah sel leukosit terhitung} \times 50 \text{ sel/mm}^3$$

Data yang diperoleh berupa parameter hematologi yaitu: kadar hemoglobin, kadar hematokrit, total eritrosit, dan total leukosit, dianalisis secara deskriptif dalam bentuk grafik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Hemoglobin (g%)

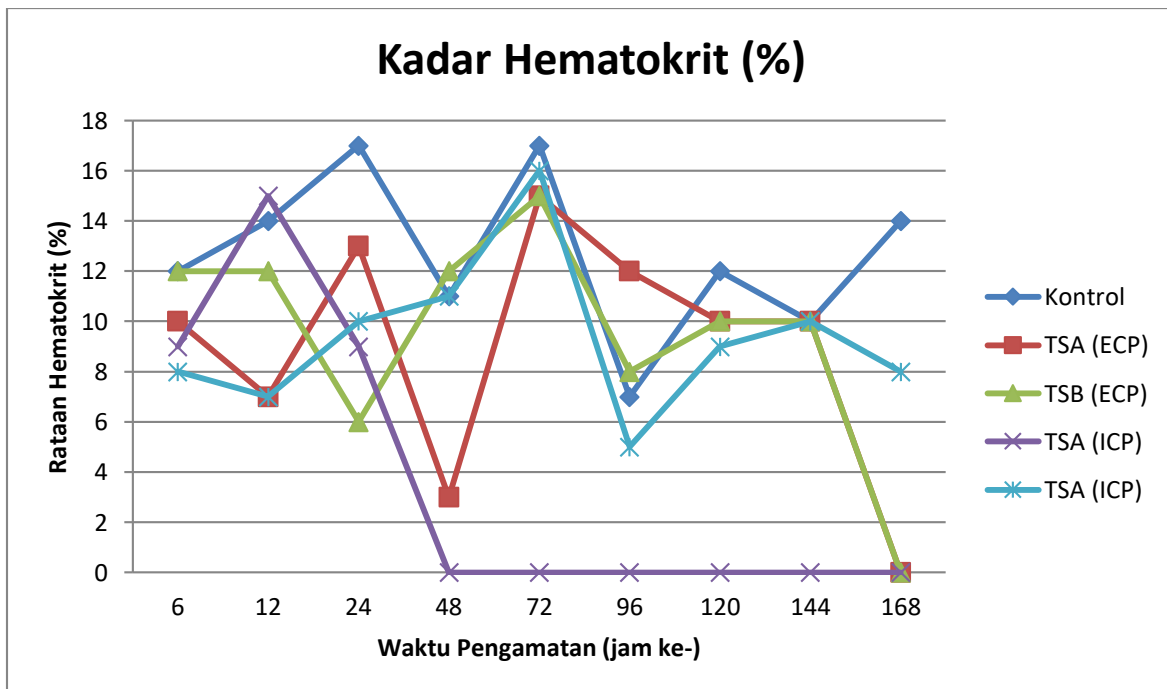
Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. mengalami penurunan nilai hemoglobin mulai jam ke-24 hingga jam ke-168. Kadar hemoglobin darah ikan nila yang diinjeksi ECP dari media TSA mengalami penurunan mencapai 3 g% pada jam ke- 48. Sedangkan ikan nila yang diinjeksi dengan ICP dari media TSA penurunan yang sama baru terjadi pada jam ke- 96. Penurunan hemoglobin disebabkan karena adanya bahan toksin (hemolisin) yang dalam ECP dan ICP. Hemolisin masuk ke dalam darah mengganggu keseimbangan hemoglobin dan sel darah merah. Bastiawan *et al.* (2001) menyatakan rendahnya kadar Hb menyebabkan laju metabolisme menurun dan energi yang dihasilkan menjadi rendah. Hal ini membuat ikan menjadi lemah dan tidak memiliki nafsu makan serta terlihat diam didasar atau menggantung dibawah permukaan air. Pernyataan tersebut sesuai dengan hasil pengamatan gejala klinis dan perubahan tingkah laku makan pada ikan nila yang diinjeksi ECP dan ICP dari bakteri *Pseudomonas* sp. Kadar hemoglobin dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Rataan hemoglobin ikan nila (*O. niloticus*) yang diinjeksi ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp

Kadar Hematokrit

Hematokrit adalah angka yang menunjukkan persentase zat padat dalam darah terhadap cairan darah. Hematokrit digunakan mengukur perbandingan antara eritrosit dengan plasma, sehingga hematokrit memberikan rasio total eritrosit dengan total volume darah dalam tubuh. Nilai hematokrit dipengaruhi oleh ukuran dan jumlah eritrosit (Ganong, 1995). Nilai hematokrit ikan nila selama penelitian pasca diinjeksi ECP dan ICP dari bakteri *Pseudomonas* sp dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Rataan kadar hematokrit ikan nila (*O. niloticus*) yang diinjeksi dengan ECP dan ICP

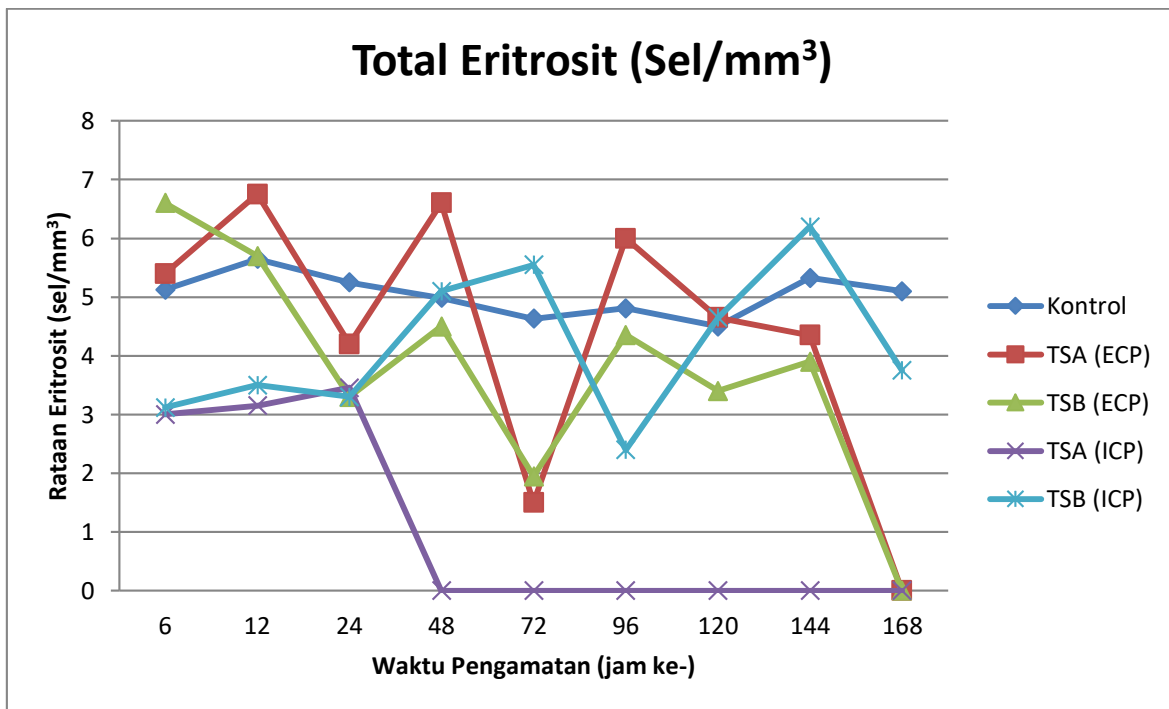
bakteri *Pseudomonas* sp

Hasil pengamatan kadar hematokrit menunjukan adanya perubahan berupa penurunan hematokrit pasca injeksi dengan ECP dari media TSA yaitu 3% pada jam ke- 48, dan dari media TSB penurunan terjadi pada jam ke- 24 sebesar 6%. Penginjeksian dengan ICP dari mdia TSB menyebabkan penurunan hematokrit sebesar 5 % pada jam ke- 96.

Rendahnya nilai hematokrit ikan nila disebabkan karena bahan toksik yang masuk kedalam tubuh ikan, mengganggu fisiologis tubuh yang mengakibatkan ikan kehilangan nafsu makan. Selain itu cairan toksin yang menyebar ke pembuluh darah ikan menyebabkan pembuluh darah pecah sehingga secara makroskopis tampak ada pendarahan di tubuh, sirip dan beberapa organ lainnya. Pengamatan ini diperkuat oleh hasil penelitian Dellman dan Brown (1989) yang menyatakan bahwa apabila ikan terkena infeksi, nafsu makannya akan menurun yang mengakibatkan nilai hematokrit darah akan menurun.

Total Eritrosit

Jumlah sel darah merah bervariasi, bergantung dengan stadia hidup, kebiasaan hidup, kondisi lingkungan dan kondisi ikan tersebut. Total eritrosit selama penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.



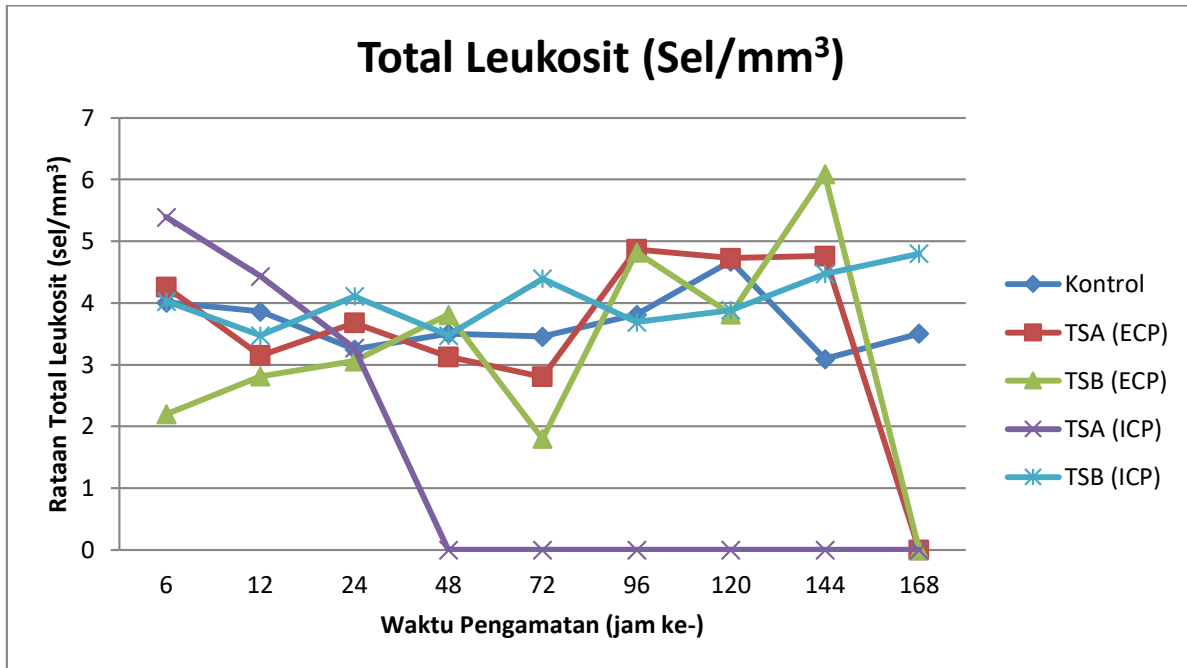
Gambar 3. Rataan eritrosit ikan nila (*O. niloticus*) yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp.

Hasil pengamatan total eritrosit pasca injeksi dengan ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp. menunjukkan bahwa penginjeksian dengan ECP dari media TSA dan TSB menyebabkan penurunan berkisar $(1,5 - 1,9) \times 10^5$ sel/mm³ dan yang terjadi pada jam ke-72. Ikan yang diinjeksi dengan ICP dari media TSA mengalami penurunan sebesar $2,4 \times 10^5$ sel/mm³ pada jam ke-96. Penurunan total eritrosit ikan nila yang diinjeksi dengan ICP lebih cepat terjadi dibandingkan dengan yang diinjeksi dengan ECP. Hal ini disebabkan karena hemolisin di dalam ICP lebih banyak dibandingkan di dalam ECP. Hemolisin adalah enzim yang menyebabkan lisisnya sel darah merah. Penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Angka (2005), ikan lele yang diinjeksi dengan eksotoksin dan endotoksin, total eritrositnya lebih cepat mengalami penurunan. Selain itu, jika dikaitkan dengan data hematokrit hasilnya sejalan yaitu

akibat pakan yang dimakan ikan berkurang (nafsu makan menurun) menyebabkan ikan mengalami anemia (Nabib dan Pasaribu, 1989).

Total Leukosit

Pengamatan total leukosit dilakukan untuk melihat kondisi kesehatan ikan nila pasca penginjeksian, meningkatnya total leukosit mengindikasikan adanya infeksi dari pathogen. Hal ini sejalan dengan penelitian Balxhall (1972), yang menyatakan bahwa total leukosit dan jenis leukosit dapat dijadikan indikator adanya penyakit infeksi tertentu yang terjadi pada ikan. Total leukosit ikan nila dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Rataan leukosit ikan nila (*O. niloticus*) yang diinjeksi dengan ECP dan ICP bakteri *Pseudomonas* sp.

Peningkatan total leukosit terjadi pada ikan nila yang diinjeksi dengan ECP dari media TSA mencapai $4,8 \times 10^4$ sel/ mm³ pada jam ke- 96 dan yang dari media TSB mencapai $6,0 \times 10^4$ sel/ mm³ pada jam ke- 144. Penginjeksian dengan ICP dari media TSA menyebabkan ikan nila mengalami peningkatan total leukosit $5,3 \times 10^4$ sel/ mm³ pada jam ke- 24 dan dari media TSB $4,8$ sel/ mm³ pada jam ke 168. Peningkatan total leukosit ini merupakan upaya ikan nila untuk mencegah menyebarnya ECP dan ICP di dalam tubuh, seperti diketahui bahwa leukosit merupakan sel pertahanan terhadap benda asing. Peningkatan total leukosit disebabkan oleh adanya infeksi. Sejalan dengan penelitian Anderson (1992), leukosit merupakan salah satu komponen sel darah yang berfungsi sebagai pertahanan non spesifik yang akan melokalisasi dan mengeliminasi pathogen, selain itu juga perubahan populasi leukosit disebabkan karena adanya infeksi dari ECP dan ICP dari *Pseudomonas* sp. menyebabkan ikan mengirimkan sel leukosit lebih banyak ke areal infeksi sebagai upaya pertahanan.

KESIMPULAN

Ikan nila yang diinjeksi dengan ICP lebih cepat mengalami perubahan pada gambaran darah seperti penurunan hemoglobin, hematokrit dan total eritrosit sedangkan total leukosit lebih cepat mengalami peningkatan dibandingkan dengan penginjeksian ECP.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Laboratorium Mikrobiologi Perairan Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman Samarinda yang telah membantu dan memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, D.P; A.K. Siwicki. 1993. Basic Haematology and Serology for Fish Health Programs. Paper Presented in Second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture "Aquatic Animal Health and The Environment". Phuket, Thailand. 25 – 29th October 1993. P185 – 202.
- Anderson, D.P. 1992. Immunostimulants, Adjuvants And Vaccine Carriers In Fish: Application To Aquaculture. Annual Rev. Of Fish Diseases. 2:281-307
- Angka, S.L. 2005. Kajian penyakit motile aeromonad septicaemia(MAS) pada ikan lele dumbo *Clariasp.*: patologi, pencegahan dan pengobatannya dengan fitofarmaka. [Disertasi]. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Bastiawan, D; A. Wahid; M. Alifudin; Agustiawan. 2001. Gambaran Darah Lele Dombo (*Clarias spp.*) yang Diinfeksi Candawan *Aphanomyces sp* pada pH yang Berbeda. *Jurnal penelitian Indonesia* 7 (3): 44-47.
- Blaxhall, P.C. 1972. The Haemathological Assessment of The Health of Fres Water Fish. A Review of Selected Literature. *Journal of Fish Biology* 4 :593-604.
- Blaxhall, P.C; K.W. Daisley. 1973. Routine haematological methodes for use withfish health. *J of Fish Biology* 5:577-581.
- Dellman, H.D; E.M. Brown. 1989. Buku teks histologi veteriner 1. Hartono (Penerjemah). UI Press, Jakarta.
- Hardi, E.H; C.A. Perbianto. 2012 Isolasi dan Uji PostulatnKoch *Aeromonas sp.* Dan *Pseudomonas sp.* Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Sentra Budidaya Lou Kulu Kabupaten Kutai Kartanegara. *Jurnal Ilmu Perikanan*, Vol.16. 2:35-39
- Ganong, W.F. 1995. Buku Ajar fisiologi Kedokteran (Review of Medical Physiologi). Ed ke-4. Terjemahan P Adianto. EGC, Jakarta.
- Nabib, R; F.H. Pasaribu. 1989. Patalogi dan Penyakit Ikan. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Septiani, G. 2006. Pengaruh Vaksin Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio L*) Terhadap Gambaran Kekebalan Non Spesifik. Universitas Mulawarman Samarinda. *Frontir* 32: 23-32.
- Soedigdo, 1988. Studi Aktivitas Enzim Lipase dari *Aspergillus niger* sebagai Biokatalis pada Proses Gliserolisis untuk Menghasilkan Monoasilgliserol. http://eprints.undip.ac.id/36573/4/BAB_II_Rosi.pdf. Rabu 12 maret 2013 jam 10.39 wita
- Suprpto, H; T. Nakai; K. Muroga. 1997. Toxicity of extracellular product and intracellular components of *Edwardsiella tarda* in Japanese ell and flounder. *Journal of aquatic Animal Health* 7((4). P: 292-297.
- Wedemeyer G.A; W.T. Yasutake.1977. Clinical methods for the assesement of the effect environmental stress on fish health. *Technical Papaers Of The U.S. Fish and Wildfield Service*. US.Depart. Of the Interior Fish and Wildlife Service.89:1-17.