

**PENGARUH ENZIM EKSTRASELULER TERHADAP VIRULENSI BAKTERI
Aeromonas hydrophila PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh:

PUTRI DWI AGUSTIN

NIM. 125080501111040



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2016

**PENGARUH ENZIM EKSTRASELULER TERHADAP VIRULENSI BAKTERI
Aeromonas hydrophila PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana di Fakultas
Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh :

**PUTRI DWI AGUSTIN
NIM. 125080501111040**



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

SKRIPSI

**PENGARUH ENZIM EKSTRASELULER TERHADAP VIRULENSI BAKTERI
Aeromonas hydrophila PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

Oleh:
Putri Dwi Agustin
NIM. 125080501111040

Telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 28 Juni 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Penguji 1

Prof. Ir. Marsoedi, Ph.D

NIP. 19460320 197303 1 001

Tanggal : 12 JUL 2016

Dosen Penguji 2

M. Fakhri, S.Pi., MP., M.Sc

NIP. 19860717 201504 1 001

Tanggal : 12 JUL 2016

Dosen Pembimbing 1

Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc

NIP. 19621014 198701 1 001

Tanggal : 12 JUL 2016

Dosen Pembimbing 2

Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua

NIP. 19750604 199903 2 002

Tanggal : 12 JUL 2016

Mengetahui,

Ketua Jurusan-MSP

Dr. Ir. Arning W. Ekawati., MS

NIP. 19620805 198603 2 001

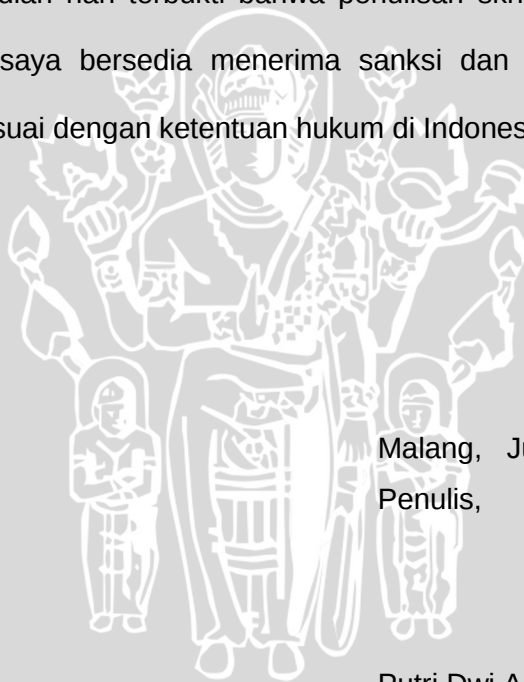
Tanggal : 12 JUL 2016



PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam penulisan Skripsi ini benar-benar hasil karya dan pemikiran saya sendiri. Se jauh sepengetahuan saya mengenai topik penelitian skripsi ini tidak pernah ditemukan tulisan, pendapat atau karya orang lain yang pernah dipublikasikan kecuali yang telah tertulis dan dicantumkan dalam daftar pustaka. Penelitian ini merupakan penelitian pribadi oleh penulis dengan bantuan pihak-pihak terkait dalam terlaksananya penelitian ini.

Apabila di kemudian hari terbukti bahwa penulisan skripsi ini merupakan hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi dan konsekuensi atas perbuatan tersebut sesuai dengan ketentuan hukum di Indonesia.



Malang, Juni 2016

Penulis,

Putri Dwi Agustin
NIM. 125080501111040

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillahirobbil'alamin, puji syukur kehadiran Allah SWT dengan selesainya Skripsi ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Buchori dan Ibu Maifuroh, kakak tercinta Muhammad Fahmy Akbar serta adik-adikku tersayang Miranda Nuril Imania dan Naufal Achmad Widigdo karena atas dukungannya secara moral dan materil serta doa yang tak hentinya untuk penulis mulai dari awal hingga akhir penelitian dan pengerjaan laporan ini.
2. Bapak Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc, dan Ibu Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua. sebagai dosen pembimbing 1 dan 2 penulis yang telah memberikan bimbingan dan arahan selama dilakukannya penelitian dan penulisan serta perbaikan laporan ini.
3. Seluruh dosen Program Studi Budidaya Perairan Universitas Brawijaya atas ilmu pengetahuan dan pengalaman yang diberikan selama masa perkuliahan.
4. Ibu Titin sebagai laboran Penyakit dan Kesehatan Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan yang telah membantu selama penelitian ini berlangsung.
5. Seluruh mahasiswa program studi Budidaya Perairan angkatan 2012 (Aquasean), dan kakak tingkat BP angkatan 2009-2011 serta adik tingkat 2013-2015.
6. Sahabat seperjuangan dari masa MABA hingga MALA Riska Rinaldi, Ika Khairatun Nisyak dan Siti Nursiyami, yang senantiasa menemani dan membantu penulis dalam keadaan apapun.
7. Sahabat suka duka Riarno Eko Nur Rohman, Gilang Ramadhan, Zahrotul Laily, Sholihin Ramadhan, Santo Setiadi dan mbak Mega yang senantiasa

memberikan dukungan moral kepada penulis dalam menyelesaikan penelitian dan pengerjaan laporan.

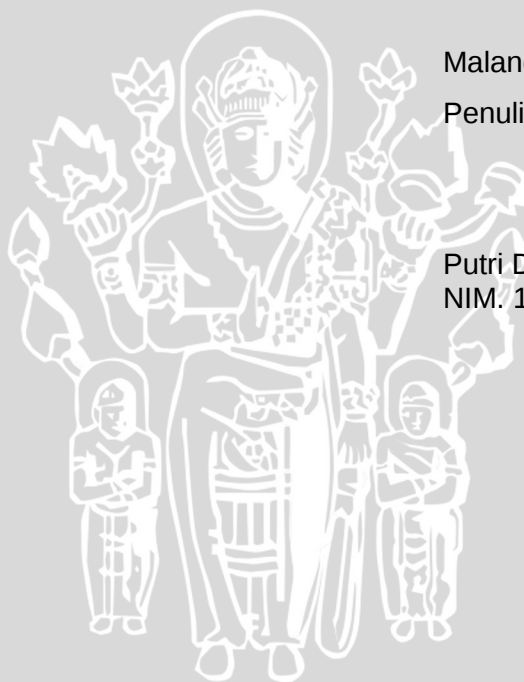
8. Sahabat 215E Mbak Dewi, Mbak Ingrid, Arlin, Uul, Yulita, Sela, Mira, Mbak Hilmi, Dini, Vivi, serta kakak dan adik-adik lainnya yang senantiasa membantu penulis selama menjalani kehidupan di Malang.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terima kasih telah membantu penulis dalam penelitian maupun pengerjaan laporan ini.

Semoga skripsi ini bermanfaat bagi para pembaca.

Malang, Juni 2016

Penulis,

Putri Dwi Agustin
NIM. 125080501111040



RINGKASAN

PUTRI DWI AGUSTIN. Pengaruh Enzim Ekstraseluler Terhadap Virulensi Bakteri *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*) (dibawah bimbingan **Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc** dan **Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua**)

Ikan nila merupakan ikan yang memiliki nilai ekonomis yang sangat tinggi. Produksi ikan nila dari tahun 2010-2014 mengalami peningkatan yang cukup signifikan, namun target produksi yang ingin dicapai belum bisa terpenuhi. Salah satu hal yang menyebabkan belum tercapainya target yang diinginkan karena adanya penyakit *Motil Aeromonas Septicaemia* (MAS). Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*. *A. hydrophila* termasuk bakteri patogen yang memiliki tingkat virulensi tinggi. Tingkat virulensi tersebut dapat ditentukan oleh kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim dan toksin tertentu yang berperan dalam proses invasi dan infeksi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui produksi enzim ekstraseluler, *lethal concentration* 50 dan resistensi beberapa antibiotik dari *A. hydrophila* Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Peikanan (BKIPM) Kelas I Surabaya I dan Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara.

Isolat bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari BKIPM Kelas I Surabaya I dan BBPBAP Jepara. Metode yang digunakan adalah membandingkan aktivitas enzim ekstraseluler yang dihasilkan dengan menggunakan media spesifik yaitu aktivitas protease dengan menggunakan *skim milk agar*, aktivitas phopolipase dengan menggunakan media yang diperkaya *egg yolk emulsion*, aktivitas lipase dengan menggunakan media yang diperkaya *olive oil* dan aktivitas hemolisis dengan menggunakan *blood agar*. Kemudian dilakukan uji LC₅₀ 96 jam pada ikan nila uji. Setelah itu dilakukan uji probit dengan menggunakan spss untuk mengetahui nilai LC₅₀ 96 jam dari setiap bakteri yang digunakan. Nilai LC₅₀ 96 jam ini berhubungan dengan tingkat virulensi dari bakteri *A. hydrophila*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari - April 2016 di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Hasil uji biokimia menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri termasuk gram negatif dengan species *A. hydrophila*. Kedua bakteri memiliki aktivitas enzim ekstraseluler yaitu protease, lipase, phospolipase dan toksin hemolisin. Aktivitas proteolitik ditandai dengan adanya zona bening pada media *Skim Milk Agar*. Aktivitas lipolitik ditandai dengan adanya zona putih keruh pada media Hasil LC₅₀ untuk *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I yaitu 10⁷ dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara 10⁶. Hasil LC₅₀ berbanding lurus dengan hasil aktivitas enzim ekstraseluler. Hal ini terbukti ketika nilai zona bening aktivitas enzim ekstraseluler *A. hydrophila* Jepara lebih tinggi dari *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I maka tingkat kematian ikan nila yang dihasilkan juga tinggi. Pada uji antibiogram jenis antibiotik yang masih bisa digunakan dan tidak bersifat resisten yaitu Oxytetracycline, Kanamysin dan Neomysin. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa enzim ekstraseluler dan toksin hemolisin yang dihasilkan bakteri dimungkinkan bisa dijadikan indikator virulensi. Semakin tinggi aktivitas enzim ekstraseluler semakin tinggi pula tingkat virulensi yang dihasilkan.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'alamin, puji syukur kehadiran Allah SWT atas berkah dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul "Pengaruh Enzim Ekstraseluler Terhadap Virulensi Bakteri *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)". Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Kekurangan dan keterbatasan dalam penulisan laporan ini sangat disadari oleh penulis. Oleh karena itu, dengan kerendahan hati penulis mengharapkan saran yang membangun terhadap penulisan ini agar kedepannya dapat bermanfaat bagi para pembaca. Besar harapan penulis agar penulisan laporan Skripsi ini memberikan wawasan dan ilmu di bidang perikanan dan kelautan khususnya tentang penyakit ikan.

Malang, Juni 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN PENGESAHAN.....	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
RINGKASAN.....	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Kegunaan Penelitian.....	4
1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Biologi Ikan Nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran Ikan Nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	6
2.1.3 Kebiasaan Makan	7
2.2 Bakteri <i>A. hydrophila</i>	7
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	7
2.2.2 Penyakit Bakteri <i>A. hydrophila</i>	9
2.2.3 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan <i>A. hydrophila</i>	10
2.2.4 Mekanisme Penyerangan <i>A. hydrophila</i>	11
2.2.5 Infeksi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	11
2.3 Virulensi Bakteri	12
2.4 Enzim Ekstraseluler.....	13
2.5 Antibiotik	14

3. METODE PENELITIAN	16
3.1 Materi Penelitian	16
3.1.1 Alat Penelitian.....	16
3.1.2 Bahan Penelitian.....	16
3.2 Metode Penelitian.....	16
3.3 Prosedur Penelitian	17
3.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan	17
3.3.2 Sterilisasi Ruangan.....	18
3.3.3 Pembuatan Media <i>Tryptic Soy Agar</i> (TSA)	18
3.3.4 Pembuatan Media <i>Tryptic Soy Agar</i> (TSB)	18
3.3.5 Peremajaan Bakteri	19
3.3.6 Kultur Bakteri <i>A. hydrophila</i>	20
3.3.7 Pembuatan Media <i>Muller Hinton Agar</i> (MHA)	20
3.3.8 Pembuatan Media <i>Plate Count Agar</i> (PCA)	21
3.3.9 Pembuatan Media <i>Skim Milk Agar</i> (SMA) 10%	21
3.3.10 Pengujian Parameter	22
3.4 Analisa Data.....	26
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1. Identifikasi Bakteri	27
4.1.1. Pewarnaan Gram.....	27
4.1.2. Uji Biokimia.....	28
4.2 Ekstraseluler Enzim	29
4.2.1 Protease	30
4.2.2 Lipase	32
4.2.3 Phospolipase	34
4.3 Toksin Hemolisin	36
4.4 Pengujian Lethal Concentration (LC ₅₀)	37
4.5 Antibiotogram	41
5. KESIMPULAN DAN SARAN	44
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA.....	45

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik Biokimia Spesies <i>A. hydrophila</i> (Erdem <i>et al.</i> , 2011)	9
2. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>A. hydrophila</i> Dari BKIPM Kelas I Surabaya I Dan BBPBAPJepara.....	29
3. Zona Rerata Aktivitas Enzim Ekstraseluler Protease <i>A. hydrophila</i>	30
4. Zona Rerata Aktivitas Enzim Ekstraseluler Lipase <i>A. hydrophila</i>	33
5. Zona Rerata Aktivitas Enzim Ekstraseluler Phospolipase <i>A. hydrophila</i>	34
6. Zona Rerata Aktivitas Toksin Hemolisin <i>A. hydrophila</i>	36
7. Kematian Ikan Nila Setelah Uji Virulensi <i>A. hydrophila</i> BKIPM Kelas I Surabaya I dan <i>A. hydrophila</i> BBPBAP Jepara Selama 96 jam.....	40
8. Antibiotogram <i>A. hydrophila</i>	41



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Nila (Sumiati dan Aryati, 2010).....	6
2. <i>Aeromonas hydrophila</i>	8
3. Pengenceran Bertingkat <i>Plate Count Agar</i>	24
4. Pengenceran Bertingkat <i>Turbidity</i>	25
5. Isolat Bakteri BKIPM Kelas I Surabaya I dan BBPBAP Jepara Perbesaran 1000x.....	28
6. Zona Aktivitas Proteolitik bakteri <i>A. hydrophila</i> BKIPM Kelas I Surabaya I dan BBPBAP Jepara ..	30
7. Zona Aktivitas Lipolitik bakteri <i>A. hydrophila</i> BKIPM Kelas I Surabaya I dan BBPBAP Jepara.....	32
8. Zona Aktivitas Phospolitik bakteri <i>A. hydrophila</i> BKIPM Kelas I Surabaya I dan BBPBAP Jepara.....	34
9. Zona Aktivitas Hemolitik bakteri <i>A. hydrophila</i> BKIPM Kelas I Surabaya I dan BBPBAP Jepara.....	36
10. Patologi Eksternal Ikan Nila (<i>O. niloticus</i>)	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat-Alat Penelitian.....	49
2. Bahan-Bahan Penelitian.....	51
3. Laporan Hasil Uji <i>A. hydrophila</i>	53
4. Uji <i>Independent T</i> Aktivitas Enzim Ekstraseluler Protease <i>A. hydrophila</i>	55
5. Uji <i>Independent T</i> Aktivitas Enzim Ekstraseluler Lipase <i>A. hydrophila</i>	56
6. Uji <i>Independent T</i> Aktivitas Enzim Ekstraseluler Phospolipase <i>A. hydrophila</i>	57
7. Uji <i>Independent T</i> Aktivitas Toksin Hemolisin <i>A. hyhydrophila</i>	58
8. Uji SPSS Metode Probit LC_{50}	59
9. Zona Hambat Antibiotogram <i>A. hydrophila</i>	61



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Produksi ikan nila dari tahun 2010-2014 mengalami peningkatan yang cukup *significant* dengan capaian volume produksi 464.191; 567.078; 695.063; 914.778 sehingga rata-rata kenaikan 19,03%. Target produksi yang ingin dicapai pada tahun 2014 yaitu 1.100.000. sedangkan hasil yang dicapai sebesar 912.613. Dilihat dari nilai capaian produksi terhadap target tahunan menunjukkan bahwa angka produksi nila sementara pada tahun 2014 belum dapat dicapai yaitu dengan capaian masih 82,96% (Dirjen Perikanan Budidaya, 2014). Salah satu hal yang menyebabkan belum tercapainya target yang diinginkan karena adanya penyakit. Menurut Diani (1991), sejalan dengan perkembangan usaha budidaya, terdapat beberapa masalah yang mengganggu seperti hama dan penyakit. Masalah penyakit biasanya merupakan kendala utama karena dapat merugikan usaha budidaya seperti kematian total, penurunan produksi, dan penurunan kualitas air.

Keberhasilan budidaya ikan nila terkait dengan pemeliharaan kesehatan lingkungan dan penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Salah satu jenis bakteri yang umum dijumpai di dalam ekosistem perairan pada kondisi lingkungan stabil yaitu *Aeromonas hydrophila*. Bakteri tersebut memiliki kemampuan osmoregulasi yang tinggi, karena dapat hidup pada lingkungan perairan tawar, payau atau laut yang memiliki kadar garam tinggi dengan penyebaran melalui air, kotoran burung, saluran pencernaan hewan darat, amfibi dan reptilia (Swann dan White, 1991). Penyakit yang disebabkan oleh *A. hydrophila* dapat menyebabkan kematian diatas 80% dalam waktu singkat (Kamiso, 1993).

Kemampuan *A. hydrophila* dalam menginfeksi ikan terkait dengan kemampuan bakteri dalam menghasilkan zat yang dapat merugikan inang.

Menurut Chopra *et al.* (2000), *A. hydrophila* termasuk dalam kelompok bakteri patogen yang memiliki tingkat virulensi tinggi. Tingkat virulensi tersebut dapat ditentukan oleh kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim dan toksin tertentu yang berperan dalam proses invasi dan infeksi. Beberapa faktor penyebab virulensi diantaranya yaitu sitotoksin, enterotoksin, protease, lipase, phospholipase dan endotoksin. Menurut McMahon (2000), *A. hydrophila* menyebabkan luka atau pendarahan pada kulit di bawah sisik (*Motile Aeromonas Septicemia* atau *Haemorrhagic Septicemia*) pada ikan air tawar. Adanya kemampuan menghasilkan enzim proteolitik dan hemolitik menyebabkan kelompok *Aeromonas* mampu menghasilkan luka atau pendarahan di bagian dalam kulit ikan yang diserang.

Patogenitas dari bakteri *Aeromonas* dapat disebabkan oleh banyak faktor. Produk ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri diduga menjadi salah satu faktor virulensi yang mengandung beberapa enzim dan hemolisin yang dapat menyebabkan sitotoksik, sitolitik, hemolitik dan enterotoksik pada ikan terinfeksi (Sahu *et al.*, 2011).

Untuk memahami kemampuan *A. hydrophila* menyebabkan sakit pada ikan perlu diketahui bagian dari *A. hydrophila* yang bersifat virulen. Pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri *A. hydrophila* pada setiap daerah tentunya berbeda, sehingga memungkinkan terjadinya tingkat virulensi yang berbeda pula. Penelitian mengenai penyebab virulensi bakteri *A. hydrophila* dari daerah yang berbeda sangat diperlukan sehingga dapat diketahui dan dipastikan faktor apakah yang dapat dijadikan sebagai indikator virulensi bakteri. Aktivitas enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri diduga menjadi faktor virulensi. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah aktivitas enzim ekstraseluler yang diproduksi oleh bakteri *A. hydrophila* dapat menyebabkan virulensi bakteri yang diinfeksi pada ikan nila.

1.2 Rumusan Masalah

Salah satu permasalahan yang dihadapi dalam usaha budidaya ikan nila (*O. niloticus*) adalah penyakit bercak merah yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*. Penyerangan bakteri ini mengakibatkan kematian masal pada ikan dalam waktu beberapa hari, sehingga menurunkan produktivitas usaha budidaya. Bakteri *A. hydrophila* termasuk dalam kelompok bakteri patogen dengan tingkat virulensi yang tinggi. Tingkat virulensi tersebut dapat ditentukan oleh kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim dan toksin tertentu yang berperan dalam proses invasi dan infeksi. Oleh karena itu, rumusan masalah dari penelitian ini, yaitu :

- Bagaimana aktivitas enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara?
- Bagaimana nilai *Lethal Concentration* (LC_{50}) dari *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara?
- Bagaimana resistensi antibiotik dari *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

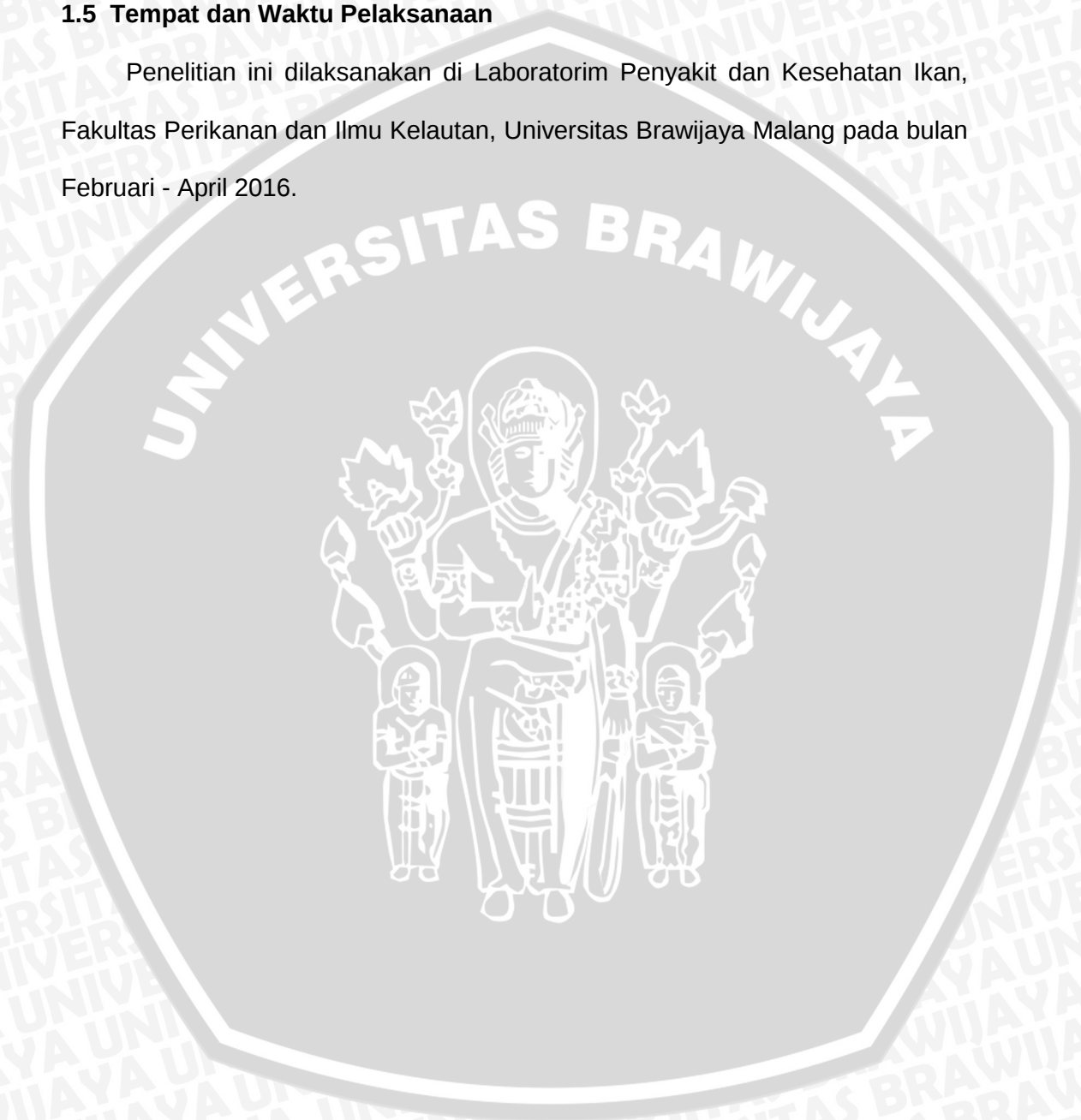
- Mengetahui aktivitas enzim ekstraseluler dari *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara.
- Mengetahui *Lethal Concentration* (LC_{50}) dari *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara.
- Mengetahui resistensi antibiotik dari *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai indikator yang dapat menyebabkan virulensi bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila.

1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorim Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari - April 2016.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Ikan Nila (*O. niloticus*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Nila (*O. niloticus*)

Klasifikasi ikan nila (*Oreochromis* sp.) menurut Saanin (1984) adalah sebagai berikut :

Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Pisces
Subkelas	: Acanthopterigii
Suku	: Cichlidae
Marga	: <i>Oreochromis</i>
Species	: <i>Oreochromis</i> sp.

Menurut Amri dan Khairuman (2003), bentuk tubuh ikan nila panjang dan ramping dengan sisik berukuran besar. Matanya besar, menonjol dan bagian tepinya berwarna putih. Jumlah sisik pada gurat sisi berjumlah 34 buah. Sirip punggung, sirip perut dan sirip dubur memiliki jari-jari lemah tetapi keras dan tajam. Sirip punggung dan dadanya berwarna hitam. Perbandingan ukuran tubuh ikan nila adalah 3:1, selain itu terlihat adanya pola garis-garis vertikal yang sangat jelas pada sirip ekor dan sirip punggung ikan nila. Jumlah garis vertikal pada sirip ekor berjumlah enam buah dan pada sirip punggung berjumlah delapan buah. Terdapat sepasang sirip dada dan sirip perut yang berukuran kecil. Sirip anus hanya satu buah dan berbentuk agak panjang. Sirip ekor berbentuk bulat yang berjumlah satu buah. Bentuk hidung dan rahang belakang ikan nila jantan melebar dan berwarna biru muda, sedangkan pada ikan betina agak lancip dan berwarna kuning terang. Morfologi ikan nila dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 2. Ikan Nila (Sumiati dan Aryati, 2010)

2.1.2 Habitat dan Penyebaran Ikan Nila (*O. niloticus*)

Menurut Amri dan Khairuman (2003), nila pertama kali didatangkan dari Taiwan ke Balai Penelitian Perikanan Air Tawar Bogor pada tahun 1969. Secara alami, ikan ini melakukan migrasi dari habitat aslinya di sungai Nil di Uganda (bagian hulu sungai Nil) ke arah selatan melewati danau Raft dan Tanganyika hingga ke Mesir. Berkat campur tangan manusia, saat ini nila telah menyebar ke seluruh dunia. Ikan nila memiliki toleransi yang tinggi terhadap lingkungan hidupnya. Habitat ikan nila cukup beragam, mulai dari rawa, waduk, danau, kolam hingga tambak. Ikan nila dapat hidup secara normal pada kisaran suhu 14-38°C dan dapat memijah secara alami pada suhu 22-37°C. Ikan nila akan mengalami kematian pada suhu 6°C atau 42°C.

Ikan nila umumnya hidup diperairan tawar, seperti sungai, danau, waduk, sawah, rawa dan saluran irigasi, tetapi memiliki toleransi yang luas terhadap salinitas sehingga ikan nila dapat hidup dan berkembang biak pada perairan payau dengan salinitas yang disukai antara 0-35 ‰. Ikan nila gift air tawar dapat dipindahkan ke air payau, dengan proses adaptasi yang bertahap ikan nila yang masih kecil 2-5 cm, lebih cepat beradaptasi dengan perubahan lingkungan dari pada ikan yang sudah besar. Pemindahan ikan secara mendadak dapat menyebabkan ikan tersebut stress bahkan bisa mati (Kordi, 2000).

2.1.3 Kebiasaan Makan

Ikan nila tergolong ikan omnivora sehingga mengkonsumsi makanan berupa hewan atau tumbuhan. Karena itulah, ikan ini sangat mudah dibudidayakan. Ketika masih benih, makanan yang disukai ikan nila adalah zooplankton, seperti *Rotifera* sp., *Moina* sp. dan *Daphnia* sp. Selain itu, juga memangsa alga atau lumut. Jika telah mencapai ukuran dewasa, ikan nila diberi berbagai makanan tambahan, misalnya pelet (Amri dan Khairuman, 2003). Ikan nila diperaikan alami memakan plankton, perifiton atau tumbuhan air yang lunak, bahkan juga memakan cacing (Susanto, 1996).

Menurut Rukmana (2003), ikan nila tergolong ikan pemakan segala (omnivora), sehingga bisa mengkonsumsi makanan berupa hewan dan tumbuhan. Makanan larva ikan nila adalah zooplankton serta alga yang menempel pada benda-benda di habitat hidupnya. Apabila telah dewasa ikan nila dapat diberi makanan tambahan berupa dedak halus, bungkil kelapa, pellet, ampas tahu, dan lain-lain.

2.2 Bakteri *A. hydrophila*

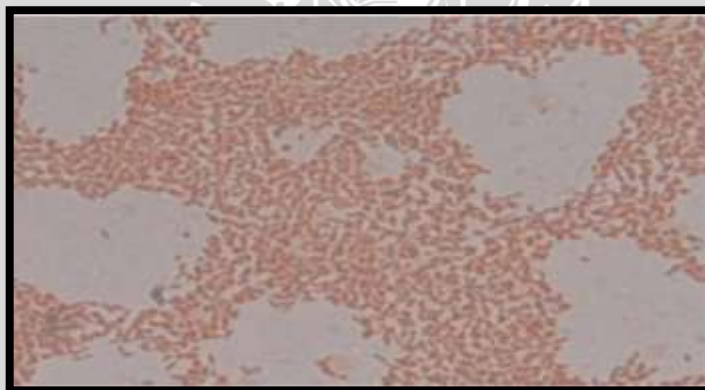
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri *A. hydrophila*

Genus *Aeromonas* secara historis telah ditempatkan di famili Vibrionaceae. Bakteri Aeromonads memiliki karakteristik yang hampir sama secara biokimia dengan anggota Enterobacteriaceae, dimana mereka dibedakan dengan oksidase-positif. Genus setidaknya memiliki 13 genospecies, di antaranya mesofilik *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, dan *A. schubertii*, serta *A. salmonicida* (Sartory, 2003). Namun, genus *Aeromonas* telah mengalami sejumlah revisi taksonomi dan nomenklatur selama 20 tahun terakhir. Bakteri *Aeromonas* termasuk kedalam famili Aeromonadaceae yang memiliki jumlah spesies yang diakui meningkat menjadi 4-16 (Erdem *et al.*, 2011).

Menurut Okafor (2011), *Aeromonas* secara keseluruhan mempunyai 17 spesies diantaranya adalah spesies psychrophilic (*A. salmonicida*) dan spesies mesofilik (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, dan *A. schubertii*).

Klasifikasi *A. hydrophila* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bakteri
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Orde	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Spesies	: <i>A. hydrophila</i>



Gambar 3. *A. hydrophila* Perbesaran 1000x (Herupradoto dan Yuliani, 2010)

Genus *Aeromonas* berbentuk batang dengan ujung bulat berukuran 0,3-1,0 x 1,0-3,5 Fm (dapat dilihat pada Gambar 2). Sering terlihat tunggal, berpasangan, dan jarang sebagai rantai pendek. *Aeromonas* spp. menghasilkan berbagai macam enzim hidrolitik ekstraselular. *Aeromonas* spp. tumbuh optimal dalam rentang temperatur antara 22-35°C, namun pertumbuhan terjadi pada kisaran suhu 0 – 45°C untuk beberapa spesies. Mereka mentolerir kisaran pH 4,5 – 9,0, tetapi pH optimum bakteri ini adalah 5,5 – 9,0, dan rentang konsentrasi optimum natrium klorida adalah 0-4 % (EPA Office Water, 2006). *A. hydrophila*

merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang umumnya penghuni normal pada saluran pencernaan. Istilah "patogen oportunistik" mengindikasikan bahwa *A. hydrophila* selalu mampu menghasilkan penyakit jika diberi kesempatan. Namun, bakteri ini juga dianggap sebagai "patogen" yang menyebabkan penyakit terlepas dari faktor-faktor lain (Swann dan Randy, 1989).

Spesies *Aeromonas* tersebar luas di lingkungan air dan sering diisolasi dari berbagai produk makanan seperti ikan, daging mentah, sayuran, dan susu mentah. Anggota kelompok ini tidak membentuk spora, oksidase dan katalase positif, motil dengan bagian kutubnya terdapat flagellum, mesofilik dan fakultatif anaerob (Erdem *et al.*, 2011). Karakteristik biokimia *A. hydrophila* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 3. Karakteristik Biokimia Spesies *A. hydrophila* (Erdem *et al.*, 2011).

Karakteristik	<i>A. hydrophila</i> (n = 12)
Motilitas	+
Katalase	+
Gas dari glukosa*	+
Methyl red	+
Voges-proskauer*	+
Lisin dekarboksilase*	+
Ornitin dekarboksilase*	-
Indole*	+
Urease	-
Nitrat	+
Congo red	+
H ₂ S dari L-cysteine*	+

2.2.2 Penyakit Bakteri *A. hydrophila*

A. hydrophila menyebabkan penyakit pada ikan yang dikenal sebagai "Motile Aeromonas Septicemia" (MAS), "Dengue Septicemia," "Penyakit Maag," atau "Penyakit Red-Sore." Ikan yang terinfeksi *A. hydrophila* memiliki banyak gejala yang berbeda. Salah satu tandanya yaitu kematian mendadak pada ikan sehat, kurangnya nafsu makan, kelainan renang, insang pucat, penampilan bengkak, dan ulserasi kulit. Pada kulit dapat terjadi ulkus sering dikelilingi oleh

rim terang jaringan merah. Organ lain yang sering terkena penyakit ini meliputi insang, ginjal, hati, limpa, pankreas, dan otot rangka. Gejala bervariasi karena mereka bergantung pada sejumlah faktor, termasuk virulensi organisme, ketahanan ikan terhadap infeksi, ada atau tidak adanya faktor bakteri atau septicemia dan stres yang berhubungan dengan ikan. Karena variabilitas gejala ini, diagnosis penyakit ini hanya didasarkan pada gejala sangat tidak dapat diandalkan. Umumnya *A. hydrophila* berhubungan erat dengan kondisi stress ikan (Swann dan Randy, 1989).

A. hydrophila merupakan agen etiologi utama penyakit sakit merah. Ditinjau secara histopatologi, ikan mungkin menunjukkan hiperplasia epitel dalam foregut, kemacetan leptomeningeal di otak, serta trombosis dan peradangan di wilayah perisclerotic dan epitel kornea mata. Secara internal, hati dapat menjadi pucat atau memiliki warna kehijauan sedangkan ginjal dapat menjadi bengkak dan rapuh. Bakteri fagosit terbagi atas intraseluler dan ekstraseluler dalam menghancurkan sel-sel endotel dan reticular dari ellipsoids. Infeksi kronis dapat dilihat dengan bisul, di mana lesi kulit dengan pendarahan dan peradangan yang jelas. Kedua dermis dan epidermis yang terkikis dan otot-otot yang mendasari menjadi sangat nekrotik. Sel-sel inflamasi biasanya kurang dalam otot nekrotik, sedangkan epidermis yang berdekatan mengalami hiperplasia yang mengakibatkan margin dibesarkan (Cipriano, 2001).

2.2.3 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan *A. hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri fakultatif aerob, yaitu bakteri yang dapat berkembang dalam keadaan dengan atau tanpa oksigen, meskipun perkembangbiakannya lebih cepat pada lingkungan yang mengandung oksigen. Bakteri fakultatif anaerob akan tersebar diseluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair, bersifat heterotrofik yaitu mampu mengoksidasi bermacam-macam persenyawaan organik sebagai sumber karbon (Prajitno, 2007).

Bakteri *A. hydrophila* termasuk kelompok bakteri gram negatif. Bakteri tersebut dapat maksimal hidup pada kisaran suhu 36-41°C. Suhu minimal untuk pertumbuhannya yaitu 0-5°C dengan kisaran pH 5,5-5,9 (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

2.2.4 Mekanisme Penyerangan *A. hydrophila*

Meskipun patogenesis infeksi *Aeromonas* masih kurang dipahami, *Aeromonas spp.* dapat mengekspresikan berbagai faktor virulensi, termasuk mekanisme dan produksi sejumlah racun. Bakteri strain *A. hydrophila* menghasilkan lektin dan adhesin yang memungkinkan berpengaruh terhadap permukaan epitel mukosa dan usus. *Aeromonas* mampu menghasilkan sejumlah toksin ekstraseluler dan enzim. Hemolisin adalah racun utama yang dihasilkan dengan aerolysin yang signifikan, ditemukan oleh banyak strain *A. hydrophila*. Hemolisin β , membentuk pori sitolisin sehingga masuk ke dalam sel membran bilayer menyebabkan kebocoran isi sitoplasma. Selain itu, setidaknya satu enterotoksin sitotonik dengan aktivitas mirip dengan toksin kolera telah dibuktikan. *Aeromonas* juga memproduksi protease yang mungkin meningkatkan virulensi jika disekresikan (Sartory, 2003).

A. hydrophila memiliki karakteristik aglutinasi perekat yang memfasilitasi keterikatan pada sel eukariotik. Pada pengamatan mikroskop elektron ditunjukkan bahwa aeromonads motil memproduksi fimbriae (pili) yang memfasilitasi adhesi. *A. hydrophila* menghasilkan enterotoksin, faktor dermonekrotik, dan hemolisin yang dapat merugikan sel inang (Cipriano, 2001).

2.2.5 Infeksi Bakteri *A. hydrophila*

Infeksi oleh bakteri *A. hydrophila* bisa terjadi melalui permukaan tubuh yang luka, saluran pencernaan makanan atau bisa melalui insang, kemudian masuk dalam pembuluh darah dan menyebar pada organ dalam lainnya yang menyebabkan pendarahan yang disertai *haemorrhagic septicemia* (keracunan

darah karena darah keluar dari pembuluh darah melalui pori-pori) (Kabata, 1985). Penularan penyakit dapat melalui air, kontak badan, kontak dengan peralatan yang tercemar atau dengan pemindahan ikan yang telah terserang *A. hydrophila* dari satu tempat ke tempat lain (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Tanda-tanda yang terlihat pada ikan yang terserang *A. hydrophylla* yaitu adanya radang (inflamasi) dengan ciri terjadi pembengkakan pada bekas suntikan. Setelah terjadi radang kemudian berlanjut dengan adanya *haemorrhagic* (pendarahan) yang terlihat dari keluarnya darah pada kulit dan nekrosis yang merupakan gejala yang ditandai dengan terlihatnya daging rusak dan membusuk. Pada beberapa jenis ikan air tawar sering ditemukan tanda klinis seperti pembengkakan pada perut yang berisi cairan dan diikuti dengan kematian (Dianti *et al.*, 2013).

Menurut Prajitno (2007), bakteri *A. hydrophila* menimbulkan bercak merah pada permukaan tubuh, kulit beradang yang akhirnya terjadi ulkus-ulkus seperti bisul, pendarahan pada hati, pendarahan sirip, pendarahan otot, lendir berdarah pada rektum dan pembentukan cairan-cairan berdarah. Ikan yang terserang *A. hydrophila* biasanya dapat mati dalam waktu satu minggu dan sangat patogenik pada ikan air tawar.

2.3 Virulensi Bakteri

Virulensi merupakan derajat kemampuan suatu patogen untuk menyebabkan penyakit. Menurut Kusnadi (2012), tingkat virulensi berbanding lurus dengan kemampuan organisme menyebabkan penyakit. Tingkat virulensi dipengaruhi oleh jumlah bakteri, jalur masuk ke tubuh inang, mekanisme pertahanan inang, dan faktor virulensi bakteri. Secara eksperimental virulensi diukur dengan menentukan jumlah bakteri yang menyebabkan kematian, sakit, atau lesi dalam waktu yang ditentukan setelah introduksi. Faktor virulensi bakteri

patogen meliputi kemampuan untuk berkolonisasi, perlengkapan bakteri, resistensi terhadap komplemen, ekstraseluler enzim. Mekanisme suatu patogen untuk menyebabkan penyakit infeksi ialah melalui tahapan sebagai berikut:

- a. harus menginfeksi inang (suatu patogen primer harus memasuki inang).
- b. harus melakukan metabolisme dan memperbanyak diri dalam jaringan inang.
- c. harus melawan pertahanan inang untuk sementara.
- d. harus merusak inang.

Bakteri dapat menyebabkan sakit melalui kemampuannya berkembangbiak dan menyebar secara luas dalam jaringan dan pembentukan berbagai zat ekstraseluler. Beberapa zat ini adalah enzim, sedangkan yang lain diduga berupa toksin (Jawetz *et al.*, 1996). Faktor virulensi *A. hydrophila* digolongkan menjadi 2 kelompok:

1. Komponen permukaan sel, berupa pili, S-layer dan lipopolisakarida.
2. Faktor ekstraseluler berupa enterotoksin, hemolisin, lipase dan protease (Swift *et al.*, 1997).

2.4 Enzim Ekstraseluler

Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang disekresikan ke luar sel dan berdifusi ke dalam media. Sebagian besar enzim ekstraseluler bersifat hidrolitik yang berarti bahwa enzim ekstraseluler menguraikan molekul kompleks menjadi molekul-molekul lebih sederhana. Molekul-molekul yang lebih kecil ini kemudian dapat memasuki sel dan digunakan untuk kepentingan sel. Menurut Sahu *et al.*, (2011), produk ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri diduga menjadi salah satu faktor virulensi yang mengandung beberapa enzim dan hemolisin yang dapat menyebabkan sitotoksik, sitolitik, hemolitik dan enterotoksik pada ikan terinfeksi. Protease merupakan salah satu jenis enzim ekstraseluler yang

berperan dalam virulensi utama toksisitas ikan.

Menurut Cascon *et al.* (2000), *A. hydrophila* menghasilkan enzim eksoprotease. Protease yang bersifat proteolitik mampu mengambil persediaan nutrisi dan melawan pertahanan tubuh inang, sehingga berfungsi untuk berkembangnya penyakit pada inang. Enzim protease pada suatu bakteri berperan memecah ikatan peptida protein sehingga dihasilkan komponen asam amino dalam bentuk bebas yang merupakan sumber nutrisi bagi bakteri.

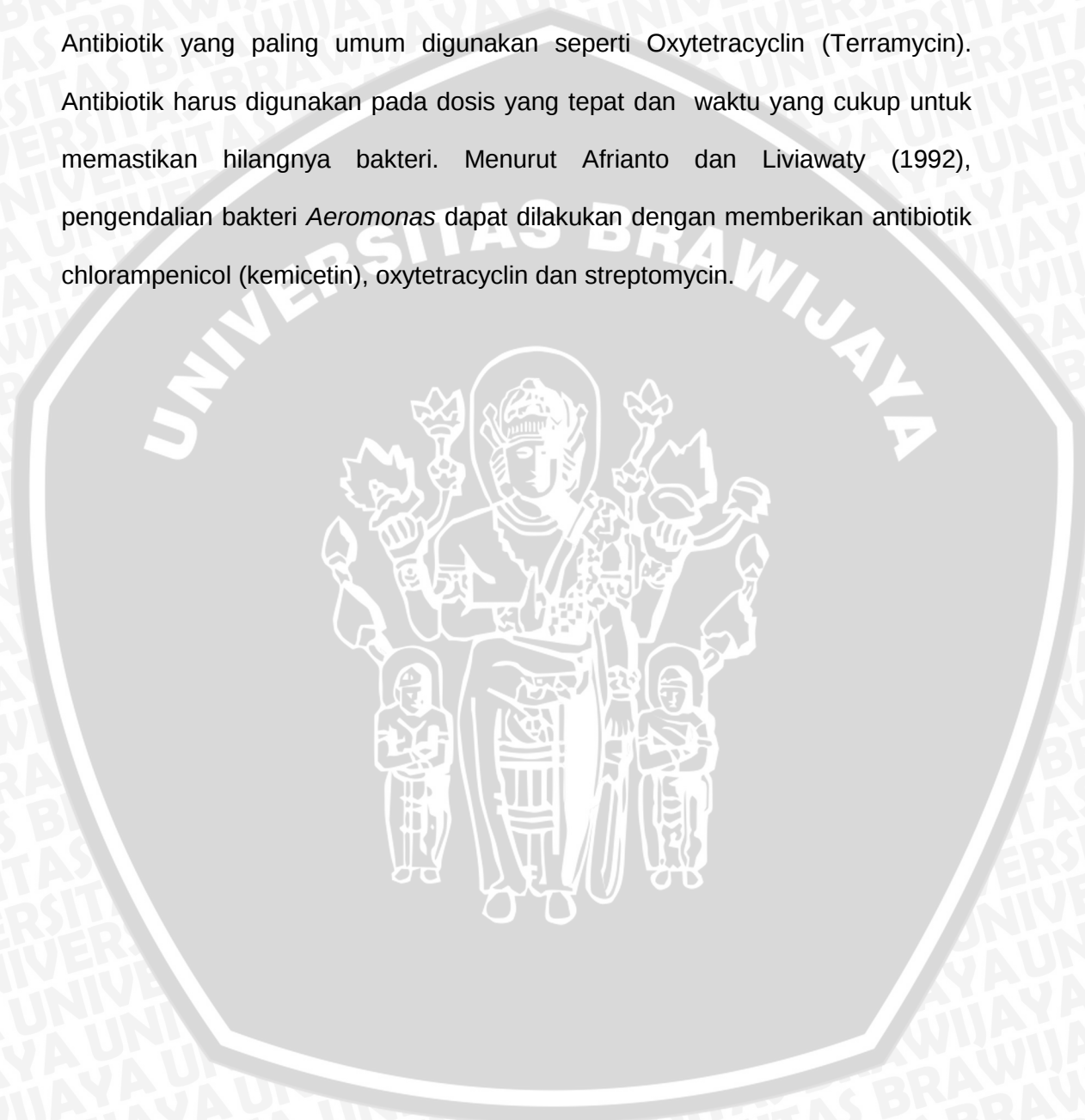
Adanya kemampuan menghasilkan enzim proteolitik dan hemolitik menyebabkan *A. hydrophila* mampu menghasilkan luka atau pendarahan dibagian kulit yang diserang (McMahon, 2000). Menurut Mangunwardoyo (2010), virulensi bakteri dibuktikan dengan terjadinya *hiperaemia* pada permukaan tubuh, hemoragik lokal pada pangkal sirip atau operkulum dan reaksi hemolisis pada agar darah. Hemolisin yang dihasilkan oleh bakteri bekerja memecah dan melisis sel-sel darah merah sehingga menimbulkan luka atau pendarahan pada inang.

2.5 Antibiotik

Menurut Harmita dan Radji (2008), antibiotik mewakili kelompok terbesar dari zat antimikroba. Antibiotik adalah zat biokimia yang diproduksi oleh mikroorganisme, yang dalam jumlah kecil dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme lain. Sesuai sifatnya, antibiotik harus memiliki toksisitas selektif karena kelompok obat ini diproduksi oleh satu organisme dan memiliki derajat toksisitas yang berbeda terhadap mikroorganisme lain.

Menurut Komarudin dan Slembrouck (2005), antibiotik diberikan kepada ikan untuk mengontrol penyakit yang disebabkan bakteri melalui injeksi, perendaman atau pencampuran obat dengan pakan. Penting untuk diketahui bahwa bakteri bersifat peka terhadap antibiotik, bakteri menjadi resisten terhadap

obat apabila terapi antibiotik tidak diberikan dengan takaran yang tepat dan waktu yang semestinya. Upaya yang paling baik yang dapat dilakukan yaitu pertama-tama mengidentifikasi spesies bakteri dan kemudian lakukan *test* kepekaan pada antibiotik sebelum menentukan dan menggunakan obat. Antibiotik yang paling umum digunakan seperti Oxytetracyclin (Terramycin). Antibiotik harus digunakan pada dosis yang tepat dan waktu yang cukup untuk memastikan hilangnya bakteri. Menurut Afrianto dan Liviawaty (1992), pengendalian bakteri *Aeromonas* dapat dilakukan dengan memberikan antibiotik chloramphenicol (kemicetin), oxytetracyclin dan streptomycin.



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi akuarium ukuran 30x30x30 cm, aerator set, *heater* akuarium, seser, autoklaf, *Laminary Air Flow* (LAF), inkubator, kulkas, timbangan digital, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, *sentrifuge*, erlenmeyer, pipet volume, bola hisap, rak tabung reaksi, nampan, spatula, botol *spray*, gelas ukur, gunting, jangka sorong digital, *tube*, *vortex mixer*, *beaker glass*, *hot plate* dan gunting.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi dua bakteri *A. hydrophila* yang berasal dari BKIPM Kelas I Surabaya I dan BBPBAP Jepara, Ikan Nila, Akuadest, Alkohol 70%, spirtus, media *Skim Milk Agar* (SMA), *Tryptone Soy Agar* (TSA), *Tryptone Soy Broth* (TSB), *Blood Agar*, *Muller Hinton Agar* (MHA), *Plate Count Agar* (PCA), *Blood Agar*, Tween 80, Olive oil, egg yolk, *neutral red solution*, benang kasur, plastik warp, tisu, *alumunium foil*, kapas, benang kasur, kertas sterilisasi, korek api dan 7 antibiotik (Oxytetracyclin, Neomycin, Streptomycin, Kanamycin, Erythromycin, Penicilin dan Ampicilin).

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif untuk identifikasi bakteri, uji enzim ekstraseluler, toksin hemolisin dan Antibigram. Menurut Iskandar (2007), metode deskriptif adalah metode yang berupa data atau informasi yang diperoleh secara langsung dari seorang pakar maupun buku-buku yang berhubungan dengan kasus yang diteliti. Metode deskriptif memecahkan masalah dengan mendekriptifkan fakta dan studi

hubungan yang membandingkan hasil penelitian yang telah dilakukan. Pada uji *in vivo* LC_{50} menggunakan metode eksperimen. Menurut Suhaemi (2011), eksperimen adalah suatu penelitian yang dilakukan dengan sengaja memberikan suatu perlakuan terhadap objek penelitian kemudian diteliti bagaimana akibat dari perlakuan yang diberikan.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Kegiatan sterilisasi alat dapat dilakukan dengan menggunakan *autoclave* dengan cara sebagai berikut :

- Alat – alat yang akan digunakan dicuci menggunakan sabun cuci, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas bekas dan diikat menggunakan benang sedangkan untuk tabung reaksi, erlenmeyer bagian atas ditutup dengan kapas.
- Air secukupnya dituang ke dalam *autoclave*, kemudian alat yang telah dibungkus dengan kertas bekas dimasukkan ke dalam keranjang *autoclave* dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris. Klep uap (*safety falve*) dipastikan pada posisi tegak.
- Tombol ON dinyalakan dan temperatur diputar pada posisi maksimal. Ditunggu hingga keluar uap air kemudian klep uap ditutup, kemudian ditunggu hingga mencapai suhu $121^{\circ}C$ dan tekanan menunjukkan 1 atm. Selanjutnya suhu diturunkan sampai lampu pada *autoclave* berwarna kuning keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit. Setelah alarm berbunyi maka tanda sterilisasi selesai dan suhu pada *autoclave* diturunkan pada suhu minimal.
- Tombol OFF ditekan, ditunggu hingga suhu menunjukkan angka 0 (nol), buka kran uap lalu buka penutup *autoclave* dengan cara simetris kemudian alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil.

- Alat yang telah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

3.3.2 Sterilisasi Ruangan

Selain alat dan bahan, tempat dan laboran juga harus steril guna menghindari kontaminan dengan bakteri yang berada diluar tempat penelitian. Tangan laboran yang bersinggungan, meja dan sekitar tempat perlakuan harus dalam kondisi steril. Sterilisasi tempat dapat dilakukan secara kimiawi yaitu dengan menggunakan alkohol 70% maupun secara fisika yaitu dengan pembakaran langsung maupun dengan penyinaran dengan sinar UV. Pada kegiatan penelitian ini sterilisasi tempat dilakukan dengan menggunakan sinar UV yang terdapat pada *laminar air flow* (LAF).

3.3.3 Pembuatan Media *Tryptic Soy Agar* (TSA)

- Media TSA ditimbang menggunakan timbangan digital.

$$TSA = \frac{40}{1000} \times \sum \text{cawan petri} / \sum \text{tabung} \times \text{volume cawan petri} / \text{tabung (ml)}$$

- Akuades diukur ml= $\sum \text{cawan petri} / \text{tabung} \times \text{volume cawan petri} / \text{tabung}$ dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian TSA yang telah ditimbang dimasukkan dan dihomogenkan.
- Ujung erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas yang dilapisi alumunium foil lalu diikat pada bagian leher erlenmeyer dengan benang kasur, kemudian erlenmeyer dimasukkan ke dalam autoklaf. Setelah disterilisasi, media (dalam keadaan hangat-hangat kuku) dituang kedalam cawan petri atau tabung reaksi (kegiatan ini dilakukan secara steril).

3.3.4 Pembuatan Media *Tryptic Soy Agar* (TSB)

Adapun lagkah – langkah untuk pembuatan media TSB adalah sebagai berikut :

- Media TSB ditimbang dengan menggunakan timbangan digital dengan rumus
$$= \frac{30}{1000} \times \sum \text{tabung} \times \text{volume tabung reaksi (ml)}$$
- Akuades dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian TSB dimasukkan dan dihomogenkan. TSB dituang sesuai kebutuhan pada tabung reaksi, kemudian diletakkan pada beaker glass.
- Ujung erlenmeyer ditutup dengan kapas dan alumunium foil lalu diikat dengan benang kasur, kemudian disterilisasi dalam *autoklaf* pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- Media yang akan digunakan didekatkan pada bunsen agar tidak terkontaminasi.

3.3.5 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri *A. hydrophila* dilakukan guna untuk bakteri yang digunakan dapat bertahan lebih lama dibandingkan dengan bakteri biakan murninya. Bakteri yang sudah diremajakan dapat bertahan 3 bulan, hal ini dikarenakan bertambahnya nutrisi dari media yang diberikan sehingga bertahan lebih lama. Agar Miring ini merupakan media untuk peremajaan bakteri. Tahapan peremajaan bakteri *A. hydrophila* adalah sebagai berikut :

- Media TSA ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- TSA dilarutkan dengan akuades dan dihomogenkan dengan *hot plate*.
- Media yang telah homogen dimasukkan ke tabung reaksi dengan volume masing-masing 7 ml.
- Ujung tabung reaksi ditutup dengan kapas dan alumunium foil lalu dimasukkan pada beaker glass. Pada bagian ujung beaker glass ditutup alumunium foil dan diikat dengan benang kasur, kemudian disterilisasi pada *autoclave* dengan suhu 121°C dilakukan selama 15 menit.

- Media TSA dimiringkan agar posisi media menjadi miring dan ditunggu hingga menjadi padat.
- Bakteri *A. hydrophila* digoreskan dengan menggunakan ose secara zigzag dan merata pada media agar miring.
- Bakteri yang telah ditanam pada media agar miring diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam.

3.3.6 Kultur Bakteri *A. hydrophila*

Adapun prosedur kultur bakteri *A. hydrophila* adalah sebagai berikut :

- Bakteri yang telah diremajakan pada media agar miring diambil dengan menggunakan jarum ose sebanyak 1 gores.
- Ose yang sudah terdapat bakteri dicelupkan pada media TSB yang sudah dipersiapkan. Media disimpan pada inkubator pada suhu 32°C selama 24 jam.
- Semua kegiatan pengukuran dilakukan secara steril.
- Setelah 24 jam media TSB akan berubah menjadi keruh yang menandakan bahwa bakteri telah tumbuh. Bakteri ini kemudian dilihat kepadatannya dengan mengukur *optical density* (OD).

3.3.7 Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

Adapun langkah – langkah untuk pembuatan media MHA adalah sebagai berikut :

- Media MHA ditimbang dengan timbangan digital.

$$\text{MHA} = \frac{38}{1000} \times \sum \text{cawan petri} \times \text{volume cawan petri (ml)}$$

- Akuades dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian MHA yang telah ditimbang dimasukan erlenmeyer dan dihomogenkan.
- Ujung erlenmeyer ditutup dengan kapas yang dilapisi alumunium foil lalu diikat dengan benang kasur pada bagian leher erlenmeyer kemudian erlenmeyer

dimasukkan ke dalam autoklaf. Setelah disterilisasi, media (dalam keadaan hangat-hangat kuku) dituang kedalam cawan petri.

3.3.8 Pembuatan Media *Plate Count Agar* (PCA)

Adapun langkah – langkah untuk pembuatan media PCA sebagai berikut :

- PCA ditimbang dengan menggunakan timbangan digital

$$= \frac{17,5}{1000} \times \sum \text{cawan petri} \times \text{volume cawan petri (ml)}$$

- Akuades dimasukkan kedalam erlenmeyer kemudian PCA di masukkan dan dihomogenkan.
- Ujung erlenmeyer ditutup dengan kapas yang dilapisi alumunium foil lalu diikat pada bagian leher erlenmeyer, kemudian dimasukkan kedalam autoklaf.
- Setelah disterilisasi, media (dalam keadaan hangat-hangat kuku) dituang kedalam cawan petri.

3.3.9 Pembuatan Media *Skim Milk Agar* (SMA) 10%

Adapun langkah – langkah untuk pembuatan media SMA 10% adalah sebagai berikut :

- Skim Milk ditimbang = $\frac{10}{100} \times \sum \text{cawan petri} \times \text{volume cawan petri (ml)}$ dan Agar = $\frac{2}{100} \times \sum \text{cawan petri} \times \text{volume cawan petri (ml)}$ menggunakan timbangan digital.
- Akuades dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian SMA dimasukkan dan dihomogenkan.
- Ujung erlenmeyer ditutup dengan kapas yang dilapisi alumunium foil lalu diikat pada bagian leher erlenmeyer ,kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf.
- Setelah disterilisasi, media (dalam keadaan hangat-hangat kuku) dituang kedalam cawan petri.

3.3.10 Pengujian Parameter

a. Identifikasi Bakteri

Uji biokimia dan pewarnaan gram dilakukan untuk identifikasi bakteri. Uji biokimia meliputi uji katalase, uji oksidase, uji sukrosa, uji glukosa, uji motilitas, uji H₂S, uji indol. Bakteri ditumbuhkan dalam medium tumbuh untuk mengetahui jenis bakteri. Bakteri selanjutnya diidentifikasi melalui serangkaian uji biokimiawi dan pewarnaan gram.

b. Uji Enzim ekstraseluler

Adapun uji aktivitas enzim ekstraseluler yang dilakukan pada penelitian ini terdiri dari uji aktivitas protease, lipase dan phospholipase.

- Uji aktivitas enzim protease dilakukan dengan prosedur Bairagi *et al.* (2002) yang telah dimodifikasi. Kultur cair isolat-isolat yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan ke *paper disk blank* yang telah diletakkan pada media *skim milk* (10%) dan agar (2%), inkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Aktivitas proteolitik ditunjukkan oleh terbentuknya zona jernih disekitar *paper disk* dengan latar belakang putih.
- Uji aktivitas enzim lipase dilakukan dengan prosedur menurut Willwerding *et al.* (2011) yang dimodifikasi. Kultur cair isolat-isolat yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan ke *paper disk blank* yang telah diletakkan pada media TSA yang diperkaya dengan olive oil (2%), tween 80 (1%) dan ditetesi dengan *neutral red solution*. Inkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Aktivitas lipase ditunjukkan oleh terbentuknya endapan asam lemak yang berwarna putih keruh disekitar *paper disk*.
- Uji aktivitas enzim phospholipase dilakukan dengan prosedur Sachin *et al.* (2012) yang telah dimodifikasi. Kultur cair isolat-isolat yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan ke *paper disk blank* yang telah diletakkan pada media TSA yang telah steril yang diperkaya dengan 1% Tween80 kemudian

ditambah 10% supernatan *egg yolk*. Inkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Aktivitas phospholipase ditunjukkan oleh terbentuknya zona jernih disekitar *paper disk* dengan latar belakang putih.

c. Uji Aktivitas Toksin Hemolisin

Uji aktivitas hemolitik dilakukan dengan cara kultur cair isolat-isolat yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan ke *paper blank disk* yang telah diletakkan pada media *blood agar*. Inkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Aktivitas hemolitik ditunjukkan oleh terbentuknya zona jernih disekitar *paper disk* dengan latar belakang putih.

d. Uji Kepadatan bakteri

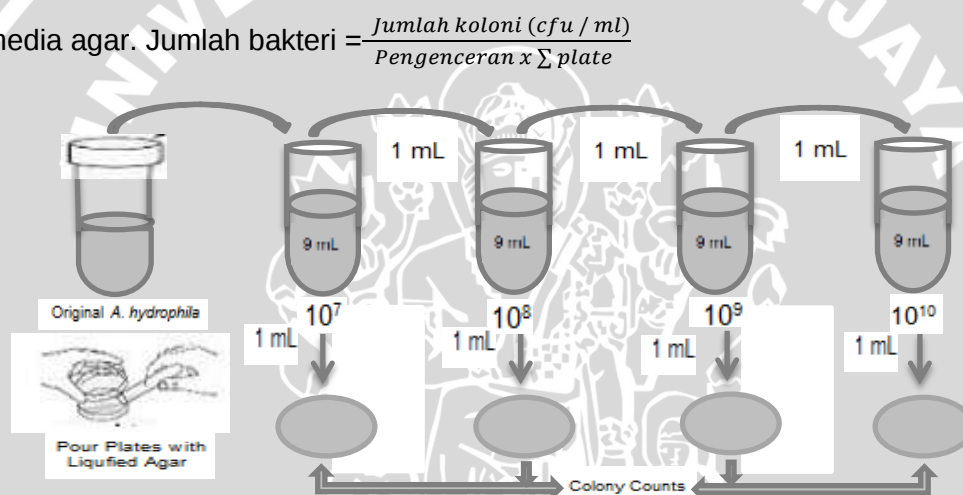
Dalam menentukan kepadatan bakteri yang disuntikkan pada ikan nila menggunakan metode menurut Reynold (2011) yaitu metode *total plate count* dan *spectrophotometric (turbidimetric) analysis*.

a. Plate Count Method

- Empat buah cawan petri diberi label. Empat tabung reaksi yang berisi masing-masing 9 ml natrium fisiologis diberi label 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} . Semua kegiatan dilakukan secara aseptis.
- Bakteri dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah berisi natrium broth (NB) digunakan sebagai stok bakteri. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat dengan cara diambil 1 ml bakteri dari stok lalu dimasukkan pada tabung reaksi 10^{-1} dan divortex. Setelah itu diambil 1 ml bakteri dari 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10^{-2} kemudian divortex. Kegiatan tersebut dilakukan hingga pengenceran 10^{-10} .
- Pada pengenceran 10^{-7} diambil 1 ml bakteri dimasukkan kedalam cawan petri. Lakukan hal yang sama hingga pengenceran 10^{-10} (Gambar 3). Pada masing-masing cawan petri yang berisi bakteri dituangkan agar (*Plate Count Agar*) dan dihomogenkan dengan cara menggerakkan cawan membentuk angka 8.

Ditunggu hingga agar mengeras dan dibalik pada saat memasukkan ke inkubator pada suhu 32°C selama 24 jam.

- Pada akhir masa inkubasi, cawan petri dipilih yang berisi bakteri antara 30-300 koloni. Kisaran yang berisi lebih dari 300 koloni tidak dapat dihitung karena *too many to count* (TMTC) dan kisaran yang berisi kurang dari 30 koloni terlalu sedikit untuk dihitung *too few to count* (TFTC). Perhitungan bakteri menggunakan *colony counter*.
- Perhitungan jumlah bakteri CFU/ml dilakukan dengan cara membagi jumlah koloni oleh faktor pengenceran dikali jumlah specimen yang ditumbuhkan pada media agar. Jumlah bakteri = $\frac{\text{Jumlah koloni (cfu / ml)}}{\text{Pengenceran} \times \sum \text{plate}}$

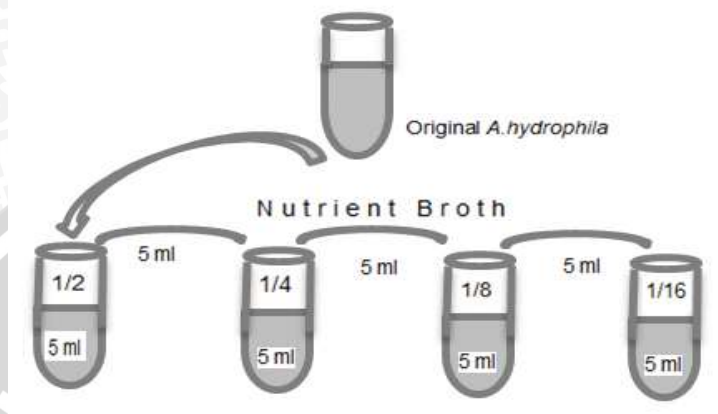


Gambar 3. Pengenceran Bertingkat Plate Count Agar

b. *Spectrophotometric (Turbidimetric) Analysis Method*

- Tabung original *A. hydrophila* dan empat tabung dari NB steril ditempatkan pada rak tabung. Setiap tabung NB berisi 5ml. Empat tabung ini (tabung 2 sampai 5) digunakan untuk pengenceran bertingkat. Dapat dilihat pada Gambar 4.
- *A. hydrophila* dimasukkan 5 ml pada tabung NB yang pertama dan divortex. Kemudian 5 ml *A. hydrophila* diambil dari tabung pertama dan dimasukkan pada tabung kedua dan seterusnya hingga tabung keempat ditambah kedalamnya. Tabung ini akan menjadi 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.

- Tingkat *turbidity* dihitung dengan spektrofotometer (spectroquant pharo 300®) sehingga didapatkan nilai absorbansinya.
- Kemudian dibuat grafik hubungan antara nilai kepadatan bakteri dengan nilai absorbansi, sehingga diketahui jumlah bakteri dan NB yang digunakan.



Gambar 4. Pengenceran Bertingkat *Turbidity*

e. Lethal Concentration (LC₅₀)

Uji LC₅₀ dilakukan untuk mengetahui kepadatan konsentrasi bakteri yang dapat mematikan 50% ikan uji. Empat kepadatan bakteri *A. hydrophila* digunakan untuk mencari LC₅₀ yaitu: 10⁴, 10⁵, 10⁶ dan 10⁷ CFU/ml. Perhitungan koloni bakteri dilakukan menggunakan *Plate Count Agar* (PCA), dengan teknik perhitungan *Total Plate Count* (TPC). Akuarium yang digunakan sebanyak 18 buah yang terbagi atas 2 kelompok yaitu 1 kelompok untuk *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan 1 kelompok untuk *A. hydrophila* BBPBAP Jepara. Masing-masing kelompok terdiri atas 9 akuarium. Setiap akuarium berisi 6 ekor ikan. Pada masing-masing kelompok diberikan perlakuan penyuntikan *A. hydrophila* melalui *intramuscular* dengan kepadatan bakteri 10⁴ CFU/mL, 10⁵ CFU/mL, 10⁶ CFU/mL dan 10⁷ CFU/mL secara duplo kecuali pada 1 akuarium sebagai kontrol. Pada akuarium kontrol diberikan perlakuan dengan penyuntikan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Volume suspensi bakteri yang disuntikkan pada

setiap ikan adalah 0,1 mL. Perubahan tingkah laku secara makroskopis dan kematian ikan diamati selama 96 jam.

f. Uji Antibiogram

Tujuan dilakukan uji antibiogram adalah mengetahui jenis antibiotik yang dapat digunakan untuk pengobatan ikan yang terserang penyakit khususnya bakteri. Adapun langkah-langkah yang dilakukan pada uji antibiogram yaitu:

- Biakan bakteri yang sudah ditanam dalam media TSB dipersiapkan.
- Secara aseptis, diambil biakan dari medium cair TSB dengan *cotton sweep*, lalu digoreskan kedalam cawan petri yang telah berisi media MHA .
- Dengan menggunakan pinset steril, *paper disk* antibiotik diambil dan dimasukkan ke dalam media MHA yang telah berisi bakteri kemudian ditempatkan diatas lempeng agar. Dalam hal ini antibiotik yang digunakan sebanyak 7 macam antibiotik. Inkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam.
- Zona hambat yang terbentuk diukur dengan jangka sorong digital.

3.4 Analisa Data

Analisis data yang digunakan pada identifikasi bakteri dilakukan secara deskriptif, uji enzim ekstraseluler dan toksin hemolisin menggunakan *Independent T* dengan selang kepercayaan 95%, uji resistensi antibiotik menggunakan *BBL Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test* dan uji LC_{50} menggunakan SPSS metode probit.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

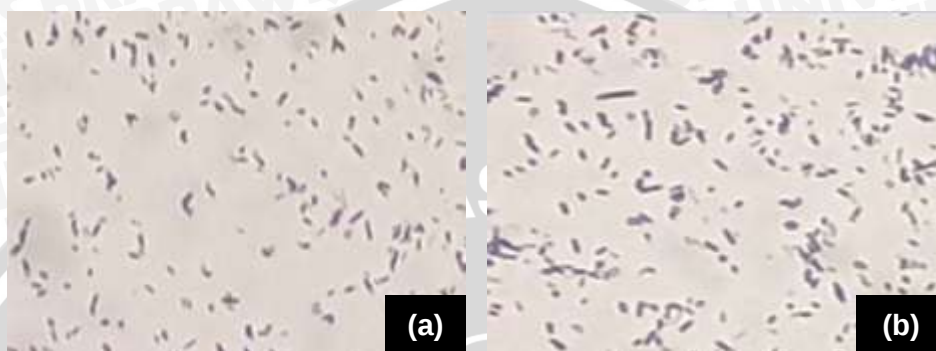
4.1. Identifikasi Bakteri

4.1.1. Pewarnaan Gram

Berdasarkan hasil pengamatan kedua isolat bakteri yang berasal dari BKIPM Kelas I Surabaya I dan BBPBAP Jepara diperoleh hasil bahwa kedua isolat bakteri tersebut bersifat negatif dengan bentuk batang, hal ini ditandai dengan warna merah muda pada struktur dinding sel yang diamati secara mikroskopis dengan perbesaran 700x (Gambar 5). Bakteri gram negatif adalah bakteri yang tidak dapat mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan gram sehingga akan berwarna merah ketika diamati di bawah mikroskop. Zat warna kristal violet akan larut ketika pemberian lugol, kemudian mengambil zat warna kedua (safranin) yang berwarna merah. Hal ini dikarenakan bakteri gram negatif mempunyai lapisan peptidoglikan yang lebih tipis bila dibandingkan dengan bakteri gram positif, susunan dinding sel tidak kompak, permeabilitas dinding sel lebih besar sehingga masih memungkinkan terlepasnya kompleks ungu kristal iodium.

Hal tersebut sesuai dengan pendapat Campbell *et al.* (2003), untuk membedakan antara bakteri gram positif dan bakteri gram negatif dapat dilakukan dengan membedakan antara dua jenis dinding sel bakteri yang berbeda. Bakteri diwarnai dengan suatu zat warna violet dan yodium, dibilas dengan alkohol kemudian diwarnai dengan zat warna merah (safranin). Struktur dinding sel akan menentukan respons dalam pewarnaan. Bakteri gram negatif memiliki sedikit peptidoglikan sehingga ketika diberi zat warna violet gram negatif tidak mampu mempertahankan warna tersebut, kemudian diwarnai dengan zat warna safranin sel bakteri dapat menahan zat warna tersebut sehingga ketika diamati dibawah mikroskop terlihat berwarna merah. Bakteri gram negatif

umumnya lebih bersifat patogen bila dibandingkan dengan bakteri gram positif, hal ini dikarenakan adanya lipopolisakarida yang terdapat pada dinding sel bakteri yang bersifat toksin (racun). Umumnya bakteri gram negatif lebih resisten terhadap antibiotik karena membran bagian luar bakteri menghalangi masuknya obat-obatan.



Gambar 5. Isolat dari BKIPM Kelas I Surabaya I (a); Isolat dari BBPBAP Jepara dengan perbesaran 1000x

Menurut Afrianto dan Iviawaty (1992), ciri utama bakteri *Aeromonas* adalah bentuknya seperti batang (basil), berukuran $1-4,4 \times 0,4-1$ mikron, termasuk bakteri gram negatif, fakultatif aerobik (dapat hidup dengan atau tanpa oksigen), tidak memiliki spora, bersifat motil karena mempunyai satu flagel (*monotrichous flagella*) yang keluar dari salah satu kutubnya, senang hidup pada lingkungan dengan suhu $20-35^{\circ}\text{C}$.

4.1.2. Uji Biokimia

Pada uji biokimia untuk kedua isolat bakteri didapatkan hasil untuk uji oksidase menunjukkan hasil positif, hal ini ditandai ketika diberi reagens dimetil-p-fenillendiamin oksalat maka warna bentuk koloni berubah menjadi biru atau ungu dalam beberapa menit. Pada uji katalase menunjukkan hasil positif terlihat dengan adanya pembentukan gelembung udara. Uji indol menunjukkan hasil positif ditandai dengan warna merah menyerupai cincin pada permukaan media apabila ditambah reagen kovac. Uji Motil menunjukkan hasil positif, hal ini ditandai dengan terjadi pertumbuhan bakteri yang menyebar. Uji glukosa

menunjukkan hasil positif, hal ini ditandai dengan terjadinya perubahan warna kuning pada media. Pada uji O/F setelah diinkubasi selama 24 jam media O/F yang ditambah glukosa dimana salah satu tabung ditutup dengan paraffin cair media berubah warna dari hijau menjadi kuning, hal ini menandakan bahwa bakteri mampu memanfaatkan karbohidrat pada saat kondisi anaerob melalui proses fermentasi sehingga bakteri dikatakan bersifat fermentatif. Pada uji sukrosa menunjukkan hasil positif, hal ini ditandai dengan adanya perubahan warna kuning pada media. Secara morfologi kedua bakteri berwarna krem dengan elevasi cembung. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada Tabel 2. Laporan hasil uji biokimia bakteri *A. hydrophila* dari BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* dari Jepara dapat dilihat pada Lampiran 3.

Tabel 2. Hasil Uji Biokimia Bakteri *A. hydrophila*

Uji Biokimia	<i>A. hydrophila</i> Jepara	<i>A. hydrophila</i> BKIPM Kelas I Surabaya I
Oksidase	+	+
Katalase	+	+
Indol	+	+
Motil	+	+
Glukosa	+	+
Sukrosa	+	+
O/F	Fermentatif	Fermentatif

Dari hasil uji biokimia dapat dibuktikan bahwa kedua isolat bakteri tersebut termasuk bakteri *A. hydrophila*. Menurut Baroon dan Fellham (2003), bakteri *Aeromonas hydrophila* termasuk ke dalam Gram negatif, dengan warna koloni krem, tepian koloni rata dan elevasi cembung, berbentuk batang, bersifat motil, oksidase dan katalase positif bersifat fermentatif, indol positif.

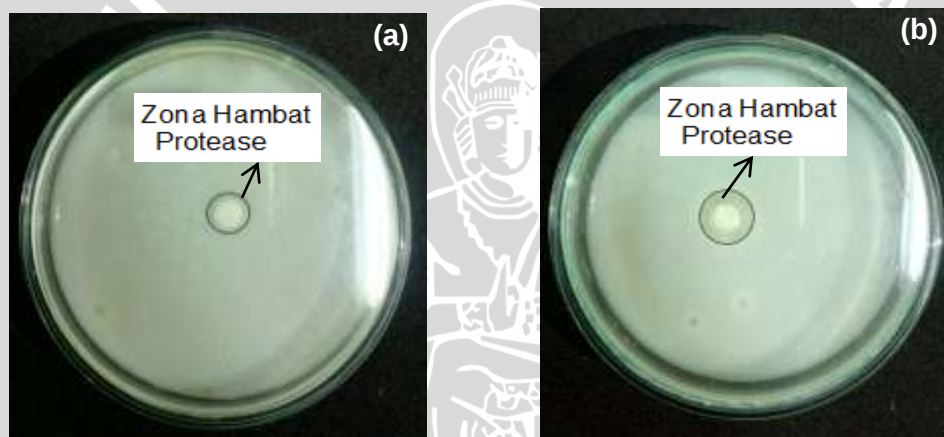
4.2 Enzim Ekstraseluler

Proses invasi bakteri patogen dalam tubuh diawali dengan melekatnya bakteri pada permukaan kulit, dengan memanfaatkan pili, flagel dan kait untuk

bergerak dan melekat kuat pada lapisan terluar tubuh ikan (sisik). Selama proses invasi bakteri *A. hydrophila* menghasilkan beberapa enzim ekstraseluler yaitu:

4.2.1 Protease

Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hidrolitik diketahui bahwa bakteri *A. hydrophila* yang berasal dari BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* dari BBPBAP Jepara mempunyai aktivitas proteolitik. Aktivitas proteolitik ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih di sekitar *paper disc* dengan latar belakang putih (Gambar 6). Hasil zona rerata protease yang terbentuk pada *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara dapat dilihat pada (Tabel 3).



Gambar 6. Zona Aktivitas Proteolitik *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I (a); Proteolitik *A. hydrophila* BBPBAP Jepara (b)

Tabel 3. Zona Rerata Aktivitas Enzim Ekstraseluler Protease *A. hydrophila*

Bakteri	Ulangan			Rerata±Standart Deviasi (mm)
	I (mm)	II (mm)	III (mm)	
a	3,02	3,25	3,05	3,11±0,12 ^a
b	4,95	5,25	5,55	5,25±0,3 ^b

Keterangan: a = *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I

b = *A. hydrophila* BBPBAP Jepara

Dari hasil Uji T (Lampiran 4) dapat diketahui bahwa nilai *significant* enzim ekstraseluler protease kurang dari 0,05 atau enzim ekstraseluler protease *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I yang dihasilkan berbeda dengan enzim ekstraseluler protease yang dihasilkan oleh *A. hydrophila* BBPBAP Jepara.

Bakteri proteolitik mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim protease yang disekresikan ke lingkungannya. Enzim proteolitik ini selanjutnya bekerja menghidrolisis senyawa-senyawa bersifat protein menjadi oligopeptida, peptida rantai pendek dan asam amino. Diameter zona hambat yang terbentuk pada media *Skim Milk Agar* dapat menunjukkan secara kualitatif tingginya kemampuan proteolitik enzim protease yang dihasilkan bakteri atau tingginya jumlah enzim yang diproduksi dan dilepas keluar oleh bakteri ke lingkungannya. Keberadaan enzim protease ekstraseluler ini akan merombak senyawa-senyawa protein menjadi senyawa sederhana yang dapat digunakan oleh bakteri sebagai komponen nutrisinya untuk pertumbuhan. Menurut Secades dan Guijarro (1999), enzim proteolitik dapat mendegradasi jaringan otot, sehingga merusak jaringan tubuh inang dan menimbulkan infeksi pada jaringan inang tersebut.

Protease adalah enzim proteolitik yang berfungsi untuk melawan pertahanan tubuh inang untuk berkembangnya penyakit dan mengambil persediaan nutrisi inang untuk berkembangbiak juga dapat memanfaatkan albumin, kasein, fibrinogen dan gelatin sebagai substrat protein. Dengan demikian bakteri bersifat proteolitik (Cipriano *et al.*, 2001). Menurut Cascon *et al.* (2000), *A. hydrophila* mempunyai enzim eksoprotease. Protease yang bersifat proteolitik mampu mengambil persediaan nutrisi dan melawan pertahanan tubuh inang. Adanya kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim proteolitik dan hemolitik menyebabkan *A. hydrophila* mampu menghasilkan luka atau pendarahan dibagian kulit yang diserang. Enzim protease ekstraseluler yang disekresikan oleh bakteri berperan penting dalam proses penetrasi dan migrasi jaringan inang.

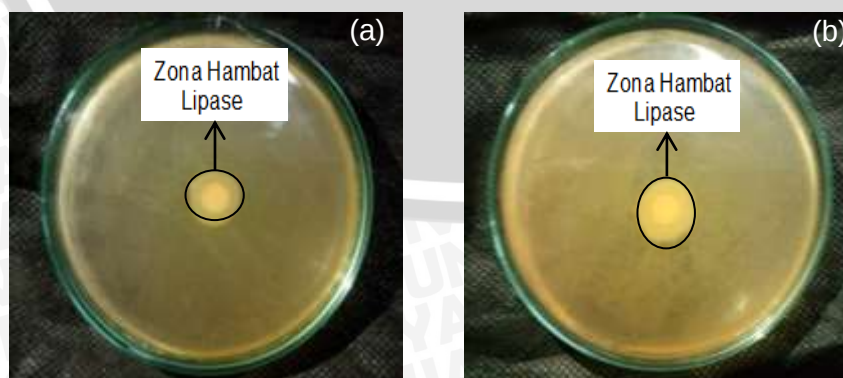
Hoge *et al.* (2010) menjelaskan bahwa enzim protease berperan dalam memecah fibrinogen pada inangnya. Ketika fibrinogen mengalami kegagalan fungsi untuk menutup luka, maka akan terjadi pendarahan pada jaringan. Hal ini

dikarenakan fibrinogen tidak bisa dirubah menjadi benang-benang fibrin yang berfungsi untuk menutup luka. Menurut Erdem (2011), protease dan hemolisin digunakan sebagai indikator potensi patogenitas, baik produksi kuantitatif dan kualitatif protease penting dalam membangun virulensi dari strain bakteri tertentu. Aktivitas proteolitik dari *A. hydrophila* telah berkorelasi dengan kemampuannya untuk menginduksi patologi ikan. Protease diperkirakan berkontribusi menyebabkan virulensi *Aeromonas* untuk ikan.

Sahu *et al.* (2011) menjelaskan bahwa protease merupakan salah satu jenis enzim ekstraseluler yang dapat berperan dalam virulensi utama toksisitas ikan. Sehingga dari hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa salah satu penyebab virulensi bakteri *A. hydrophila* dimungkinkan karena adanya aktivitas enzim protease yang dihasilkan bakteri.

4.2.2 Lipase

Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hidrolitik diketahui bahwa bakteri *A. hydrophila* yang berasal dari BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* dari BBPBAP Jepara mempunyai aktivitas lipolitik. Aktivitas lipolitik ini ditunjukkan dengan terbentuknya endapan asam lemak yang berwarna putih keruh disekitar *paper disc* (Gambar 7) pada media agar. Hasil zona rerata lipase yang terbentuk pada *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara dapat dilihat pada (Tabel 4).



Gambar 7. Zona Aktivitas Lipolitik *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I (a); Lipolitik *A. hydrophila* BBPBAP Jepara (b)

Tabel 4. Zona Rerata Aktivitas Enzim Ekstraseluler Lipase *A. hydrophila*

Bakteri	Ulangan			Rerata±Standart Deviasi (mm)
	I (mm)	II (mm)	III (mm)	
a	4,11	4,95	5,53	4,80±0,63 ^a
b	6,57	7,41	7,23	7,07±0,44 ^b

Keterangan: a = *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I

b = *A. hydrophila* BBPBAP Jepara

Dari hasil Uji T (Lampiran 5) dapat diketahui bahwa nilai *significant* enzim ekstraseluler lipase kurang dari 0,05 atau enzim ekstraseluler lipase *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I yang dihasilkan berbeda dengan enzim ekstraseluler lipase yang dihasilkan oleh *A. hydrophila* BBPBAP Jepara.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas hidrolitik terhadap lipid ditandai dengan terbentuknya endapan asam lemak yang menunjukkan bahwa bakteri *A. hydrophila* yang berasal dari BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara mempunyai kemampuan menghasilkan enzim lipase (lipolitik). Enzim ini dapat merombak lipid menjadi lipid rantai pendek dan asam lemak yang selanjutnya akan digunakan oleh bakteri untuk pertumbuhannya.

Salah satu faktor virulensi bakteri ialah adanya aktivitas lipolitik yang dihasilkan oleh bakteri. Lipase merupakan salah satu nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri untuk kelangsungan hidupnya. Lipase dapat berinteraksi dengan leukosit yang dapat mempengaruhi sistem kekebalan tubuh inang. Lipase berkontribusi secara aktif dalam perubahan membran inang dengan demikian dapat meningkatkan keparahan infeksi (John, 2014). Lipase berinteraksi dengan leukosit dengan mempengaruhi beberapa fungsi sistem kekebalan tubuh melalui asam lemak bebas yang dihasilkan oleh aktivitas lipolitik (Tomas, 2010).

Aktivitas lipolitik menghasilkan asam lemak bebas. Hal ini akan membantu proses adhesi bakteri. Adhesi sendiri sering dianggap sebagai tahap awal infeksi. Adhesi akan membantuk kolonisasi bakteri yang dapat menyebabkan infeksi bakteri. Asam lemak berdampak pada penghambatan proliferasi sel T yang

mengakibatkan terhambatnya proses fagositosis. Apabila hal ini terjadi maka dapat mengakibatkan menurunnya sistem imun pada inang. Efek ini akan semakin meningkat apabila terjadi kombinasi antara lipase dan phospholipase (Stehr *et al.*, 2003). Hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa salah satu penyebab virulensi bakteri *A. hydrophila* dimungkinkan karena adanya aktifitas enzim lipase yang dihasilkan oleh bakteri.

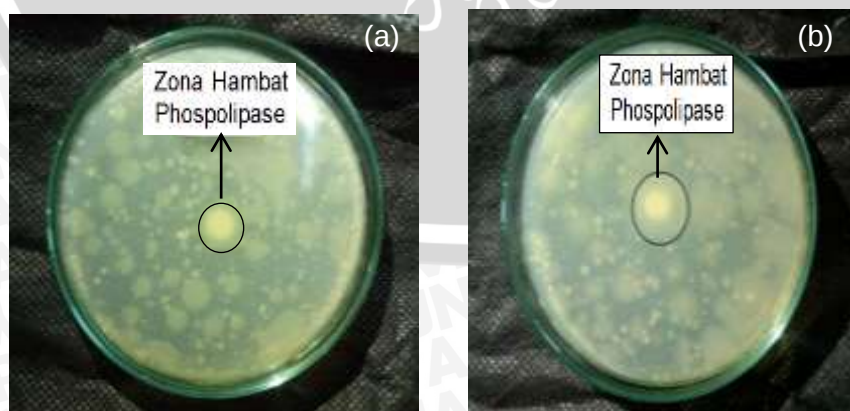
4.2.3 Phospolipase

Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hidrolitik diketahui bahwa bakteri *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* dari BBPBAP Jepara mempunyai aktivitas phospolitik. Aktivitas phospolitik ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona yang berwarna putih keruh disekitar paper disc (Gambar 8). Hasil zona rerata phospolipase yang terbentuk pada *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara dapat dilihat pada (Tabel 5).

Tabel 5. Zona Rerata Aktivitas Enzim Ekstraseluler Phospolipase *A. hydrophila*

Bakteri	Ulangan			Rerata±Standart Deviasi (mm)
	I (mm)	II (mm)	I (mm)	
A	3,08	3,15	3,35	3,19±0,14 ^a
B	6,13	6,08	7,05	6,42±0,55 ^b

Keterangan: a= *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I
b= *A. hydrophila* BBPBAP Jepara



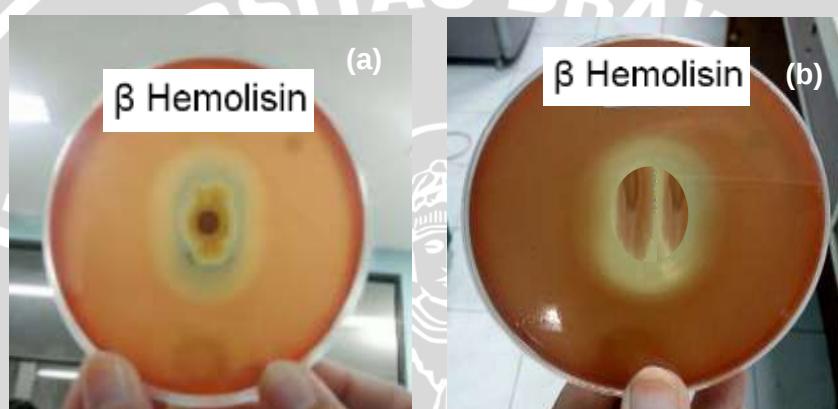
Gambar 8. Zona Aktivitas Phospolitik *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I (a); Phospolitik *A. hydrophila* BBPBAP Jepara (b)

Dari hasil Uji T (Lampiran 6) dapat diketahui bahwa nilai *significant* enzim ekstraseluler fosfolipase kurang dari 0,05 atau enzim ekstraseluler fosfolipase *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I yang dihasilkan berbeda dengan enzim ekstraseluler fosfolipase yang dihasilkan oleh *A. hydrophila* BBPBAP Jepara.

Menurut Istivan (2006), fosfolipase merupakan kelompok enzim lipolitik yang mempunyai kemampuan menghidrolisis satu atau lebih hubungan ester . Invasi sel inang oleh sebagian besar patogen memerlukan penetrasi dan kerusakan membran sel yang dimediasi oleh salah satu sarana fisik atau enzimatik atau kombinasi dari keduanya. Fosfolipid dan protein merupakan kandungan kimia utama dari sel inang. Oleh karena itu fosfolipase kemungkinan akan terlibat dalam proses gangguan membran yang sering terjadi selama proses invasi sel inang. Proses invasi berkaitan dengan kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim dan toksin yang akan mempengaruhi tingkat virulensi dari bakteri tersebut. Fosfolipase telah dikaitkan dengan patogenitas bakteri yang menyebabkan sindrome penyakit yang berbeda seperti kerusakan jaringan. Toksisitas fosfolipase telah dikaitkan dengan aktivitas sitolitik yang dihasilkan dari akumulasi produk membran dalam mendestabilisasi yang menyebabkan kehancuran yang luas membran fosfolipid. Sitolitik dapat disebabkan langsung oleh fosfolipase bakteri. Sifat sitolitik fosfolipase bergantung kepada kemampuan untuk berinteraksi langsung dengan fosfolipid dalam menghidrolisis membran. Biasanya aktifitas litik diukur sebagai hemolisis, terlepas dari kemungkinan patogen tertentu yang menyebabkan infeksi sistemik atau fosfolipase bakteri memasuki aliran darah. Pada hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa salah satu penyebab virulensi bakteri *A. hydrophila* dimungkinkan karena adanya aktifitas enzim fosfolitik yang dihasilkan bakteri.

4.3 Toksin Hemolisin

Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hemolitik diketahui bahwa bakteri *A. hydrophila* yang berasal dari BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* yang berasal dari BBPBAP Jepara mempunyai aktivitas β - hemolitik, hal ini ditandai dengan adanya zona bening pada media agar darah. β - hemolitik mampu melisiskan eritrosit secara sempurna (Gambar 9). Hasil zona rerata hemolisisn yang terbentuk pada *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara dapat dilihat pada (Tabel 6).



Gambar 9. Zona Aktivitas Hemolitik *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I (a); Hemolitik *A. hydrophila* BBPBAP Jepara (b)

Tabel 6. Zona Rerata Aktivitas Toksin Hemolisin *A. hydrophila*

Bakteri	Ulangan			Rerata±Standart Deviasi (mm)
	I (mm)	II (mm)	I (mm)	
A	12,49	12,59	12,34	12,47±0,14 ^a
B	14,83	14,34	14,10	14,42±0,55 ^b

Keterangan: a= *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I

b= *A. hydrophila* BBPBAP Jepara

Dari hasil Uji T (Lampiran 7) dapat diketahui bahwa nilai *significant* enzim ekstraseluler hemolisin kurang dari 0,05 atau enzim ekstraseluler phospolipase *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I yang dihasilkan berbeda dengan enzim ekstraseluler phospolipase yang dihasilkan oleh *A. hydrophila* BBPBAP Jepara.

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *A. hydrophila* dari kedua strain bakteri positif memiliki aktifitas hemolitik, hal ini dikarenakan zona hemolitik yang dihasilkan lebih dari 2 mm. Pengujian pada media agar darah memperlihatkan terjadinya zona bening yang merupakan aktivitas β -hemolisin disekeliling koloni, yang menunjukkan terjadinya proses lisis secara sempurna oleh *A. hydrophila*. Hal ini sesuai dengan Erdem (2011), zona hemolitik beta 2mm atau lebih dianggap sebagai tanda aktivitas hemolitik positif. Aktivitas hemolisin untuk *Aeromonas* spp. dapat dikategorikan menjadi alpha hemolisin, beta hemolisin dan gamma hemolisin.

Luka dan hemoragik yang terjadi pada tubuh ikan diduga disebabkan oleh adanya toksin hemolisin yang bekerja bersinergi merusak jaringan tubuh. Hemolisin yang dihasilkan oleh bakteri tersebut bekerja memecah dan melisiskan eritrosit. Hal tersebut terlihat dengan adanya luka dan pendarahan pada tubuh ikan nila. Menurut McMahon (2000), adanya kemampuan menghasilkan hemolitik menyebabkan *A. hydrophila* mampu menghasilkan luka atau pendarahan dibagian kulit yang diserang.

Menurut Erdem (2011), produksi toksin hemolitik telah dianggap sebagai bukti kuat dari potensi patogen *Aeromonas*. Hemolisin beta telah dilaporkan sebagai faktor virulensi motil aeromonas. Hemolisin dapat menjadi salah satu dari beberapa faktor yang menentukan patogenitas, tetapi tidak bisa digunakan untuk virulensi pada semua spesies *Aeromonas*. Pada hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa salah satu penyebab virulensi bakteri *A. hydrophila* dimungkinkan karena adanya aktifitas toksin ekstraseluler β -hemolisin.

4.4 Pengujian Lethal Concentration (LC₅₀)

Pada perhitungan LC₅₀ menunjukkan bahwa presentase kematian ikan nila setelah penyuntikan dengan kepadatan bakteri yang berbeda mengalami

peningkatan kematian sejalan dengan meningkatnya kepadatan bakteri. Semakin tinggi tingkat kepadatan bakteri yang diinfeksi pada ikan uji, semakin tinggi pula tingkat kematian ikan uji. Pada uji SPSS metode probit (Lampiran 8) menghasilkan $2,62 \times 10^7$ CFU/mL sebagai kepadatan bakteri *A. hydrophila* yang berasal dari BKIPM Kelas I Surabaya I yang dapat mematikan 50% dari ikan uji, sedangkan $9,28 \times 10^6$ CFU/mL sebagai kepadatan bakteri *A. hydrophila* yang berasal dari BBPBAP Jepara yang dapat mematikan 50% dari ikan uji.

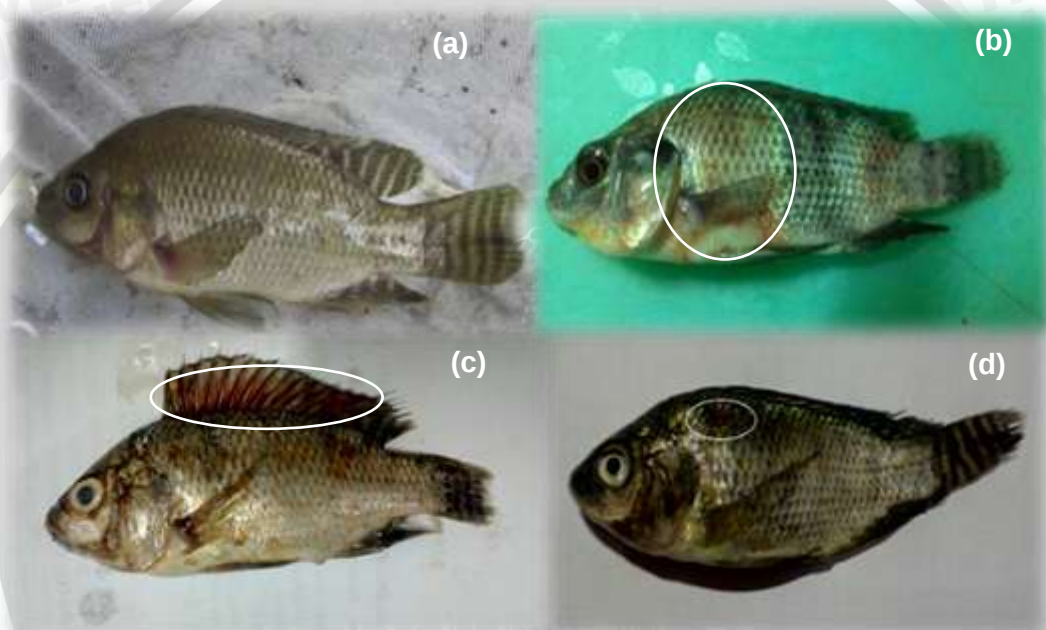
Pada uji LC_{50} terjadinya kematian pada ikan nila yang terinfeksi *A. hydrophila* membuktikan bahwa bakteri tersebut bersifat patogen dan virulen pada ikan uji. Menurut Jawetz *et al.* (1996), bakteri termasuk organisme patogen apabila memiliki kemampuan untuk melakukan transmisi, perlekatan dengan sel inang, menyebabkan infeksi pada sel inang yang diikuti dengan kematian. Hasil pengujian tersebut sama dengan pengujian yang dilakukan oleh Mangunwardoyo *et al.* (2010) yang menghasilkan 10^6 CFU/mL sebagai LC_{50} pada ikan nila (*O. niloticus*). Hasil pengujian tersebut berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Supriyadi (1990), pada uji LC_{50} menghasilkan 10^5 CFU/mL pada ikan lele (*Clarias batrachus*). Perbedaan LC_{50} tersebut diduga akibat sumber asal bakteri dan ikan host yang digunakan. Ikan nila memiliki sisik tubuh rapat dan memiliki kemampuan adaptasi lingkungan yang cukup tinggi, sedangkan ikan lele tidak memiliki sisik sehingga lebih rentan terhadap infeksi bakteri. Menurut Mangunwardoyo *et al.* (2010), *A. hydrophila* bersifat opportunistik sehingga memberikan respons imun yang cukup besar bagi ikan nila, hal ini menyebabkan pada kepadatan dibawah 10^6 CFU/mL belum mampu mematikan 50% populasi ikan nila. Perbedaan hasil LC_{50} pada ikan lele dan ikan nila dikarenakan pertahanan ikan yang berbeda dan virulensi bakteri yang berbeda. Semakin besar zona bening yang dihasilkan oleh setiap enzim

ekstraseluler dan toksin hemolisin semakin tinggi pula virulensi yang dihasilkan. Hal ini terbukti pada bakteri *A. hydrophila* BBPBAP Jepara memiliki zona bening enzim ekstraseluler yang lebih besar dan tingkat kematian lebih tinggi daripada *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I.

Hasil uji virulensi (Tabel 6) memperlihatkan adanya peningkatan terhadap presentase kematian ikan. Ikan uji mengalami perubahan patologi eksternal selama perlakuan. Perubahan patologi eksternal pada ikan uji seperti terdapat pendarahan lokal, tubuh menjadi lemah dan tidak responsif terjadi pada perlakuan infeksi bakteri 10^7 yang berasal dari BKIPM Kelas I Surabaya I dan 10^6 yang berasal dari BBPBAP Jepara. Umumnya respon ikan pascainjeksi *A. hydrophila* terlihat lemah bahkan tidak mau makan, terdapat ulcer disertai dengan pendarahan, tubuh ikan semakin pucat, pola renang ikan yang tidak beraturan dan cenderung *gasping* yaitu mengambil udara tepat dibawah permukaan air, sedangkan ikan kontrol menunjukkan pola renang yang berkelompok dan teratur. Perubahan patologi eksternal telah terjadi pada hari kedua setelah penyuntikan dan semakin nyata pada hari keempat. Uji virulensi *A. hydrophila* melalui penyuntikan intraperitoneal dalam waktu 96 jam menimbulkan gejala klinis berupa perubahan tingkah laku ikan, tidak aktif dan tidak responsif, haemorrhagik lokal pada sirip dorsal yang diikuti oleh kematian ikan. Kematian mulai terjadi pada hari kedua hingga hari keempat. Virulensi bakteri semakin bertambah seiring dengan semakin meningkatnya kepadatan bakteri dengan tanda-tanda perlukaan yang meluas hingga terjadinya *ulcer*. Patologi eksternal dapat dilihat pada Gambar 10.

Menurut Mangunwardoyo *et al.* (2010) mengatakan bahwa daya kerja toksin bakteri berkaitan dengan sel reseptor spesifik. Adanya interaksi antara sel reseptor dalam tubuh dengan hemolisin dapat menimbulkan efek perlukaan pada tubuh *host*. Haemorrhagik yang terjadi pada pangkal sirip punggung, pangkal sirip

ekor dan operkulum dikarenakan adanya toksin hemolisin dari bakteri yang dapat melisiskan eritrosit sehingga sel darah merah keluar dari pembuluh darah dan menimbulkan warna kemerahan pada permukaan kulit. Terjadinya ulcer dikarenakan tingginya kepadatan bakteri pada lokasi penginfeksi, sehingga volume dan intensitas toksin yang dikeluarkan pada proses infeksi juga lebih tinggi pada bagian tersebut, sementara sebagian lainnya masuk mengikuti aliran darah.



Gambar 10. Patologi eksternal Ikan sehat (a); ulcer (b); haemorragik pada sirip dorsal (c); haemorragik pada daerah penyuntikan (d)

Tabel 7. Kematian Ikan Nila Setelah Uji Virulensi *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara Selama 96 jam

Kepadatan Bakteri (CFU/ml)	Banyak Ikan Uji Tiap Bakteri	Jumlah Ikan Uji	Kematian Ikan Uji	
			<i>A. hydrophila</i> BKIPM Kelas I Surabaya I	<i>A. hydrophila</i> BBPBAP Jepara
10^4	12	24	3	3
10^5	12	24	3	4
10^6	12	24	4	5
10^7	12	24	6	6

4.5 Antibiotogram

Antibiogram merupakan suatu gambaran untuk menunjukkan bakteri tersebut *resistant* atau *susceptible* terhadap antibiotik. Salah satu cara yang sering dilakukan oleh para pembudidaya ikan untuk mengatasi masalah penyakit khususnya bakteri yaitu dengan pemberian antibiotik, hal ini dikarenakan ada beberapa jenis antibiotik yang masih diperbolehkan untuk digunakan dalam kegiatan budidaya. Dari hasil antibiogram pada 7 macam antibiotik yang diujikan terhadap bakteri *A. hydrophila* BKIPM kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara (Lampiran 9) didapatkan hasil sebagai berikut (Tabel 8).

Tabel 8. Hasil Uji Antibiotogram *A. hydrophila*

Antibiotik (μg)	Susceptible (mm)	Intermediate (mm)	Resistant (mm)	Hasil (a)	Hasil (b)
Oxytetracycline (30)	≥19	15-18	≤14	25,71(S)	24,88(S)
Penicillin (10)	≥15	-	≤14	6,39 (R)	6,78(R)
Kanamycin (30)	≥18	14-17	≤13	19,29(S)	20,74(S)
Streptomycin (10)	≥15	12-14	≤11	10,51(R)	10,05(R)
Neomycin (30)	≥17	13-16	≤12	17,51(S)	17,09(S)
Ampicillin (10)	≥17	14-16	≤13	9,26(R)	6,95(R)
Erythromycin (15)	≥23	14-22	≤13	10,92(R)	10,30(R)

Keterangan: (a) = *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I
 (b) = *A. hydrophila* BBPBAP Jepara
 (S) = *Susceptible*
 (R) = *Resistant*

(Sumber: BD BBL Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Disc, 2011)

Dari hasil antibiogram *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* BBPBAP Jepara dapat diketahui bahwa untuk antibiotik oxytetracyclin, kanamycin dan neomycin termasuk dalam kategori *susceptible* artinya kepekaan antibiotik yang masih baik untuk memberikan daya hambat terhadap mikroba, sedangkan untuk penicilin, streptomycin, ampicilin dan erythromycin termasuk dalam kategori *resistant* artinya suatu keadaan dimana mikroba sudah tidak peka

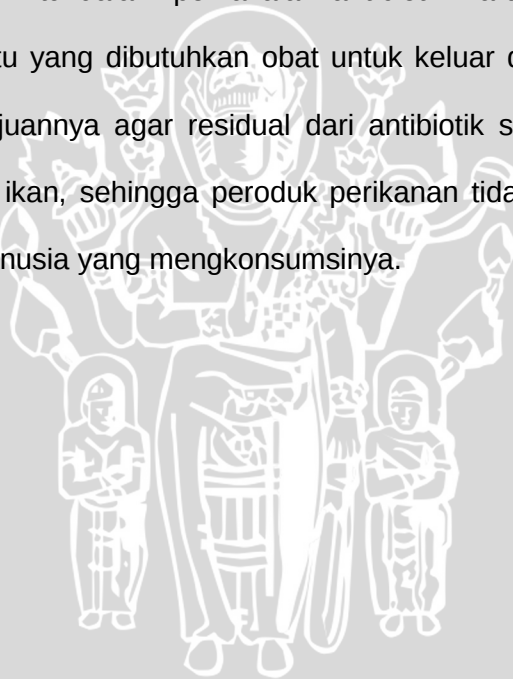
terhadap antibiotik. Antibiotik dikatakan *intermediate* artinya suatu keadaan dimana mikroorganisme mengalami pergeseran sifat dari sensitif menjadi resisten, tetapi masih belum sepenuhnya menjadi resisten.

Menurut Monica *et al.* (2013), jenis antibiotik yang sering digunakan di lapang dalam kegiatan budidaya adalah streptomycin, gentamicin, penicillin, vancomycin dan chloramphenicol. Adanya resistensi terhadap streptomycin dan penicillin dikarenakan antibiotik tersebut terlalu sering digunakan untuk kegiatan budidaya sehingga tidak efektif lagi dalam pengobatan penyakit.

Oxytetracycline termasuk jenis antibiotik yang masih bisa digunakan dalam kegiatan budidaya. Menurut Kepmen No.52 tahun 2014 menyatakan bahwa jenis antibiotik yang diperbolehkan yaitu Klortetrasiklina, Oksitetrasiklina, tetrasiklina, Eritromisina, Enrofloksasina. Beberapa jenis antibiotik yang dilarang digunakan yaitu Thiamfenikol, Chloramfenikol, Fluorfenikol. Meskipun Eritromisia diperbolehkan oleh pemerintah dalam pengobatan, namun pada hasil penelitian ini antibiotik tersebut telah bersifat resisten. Hal ini diduga disebabkan karena penggunaan antibiotik ini dilakukan secara berlebih dan cara penggunaannya tidak sesuai dengan dosis yang dianjurkan.

Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Akinbowale (2006) yang menyatakan bahwa beberapa jenis antibiotik yang resisten terhadap bakteri *Aeromonas* spp. diantaranya yaitu ampicilin, amoxillin, eritromycin, chloramphenicol, trimetropin. Namun, tidak ditemukan resisten pada kanamysin dan cefoperazone. Adanya resistensi pada beberapa antibiotik ini bisa disebabkan karena penggunaan antibiotik yang terlalu sering dan tidak sesuai dengan dosis yang dianjurkan atau bisa juga dikarenakan bakteri menularkan resistensinya melalui plasmid. Sehingga Kanamysin masih bisa digunakan dalam pengobatan namun dalam penggunaannya harus sesuai dosis yang dianjurkan.

Sebaiknya penggunaan antibiotik digunakan hanya untuk pengendalian penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri atau mikroba yang sensitif saja. Penggunaannya akan berdampak positif apabila dilakukan secara rasional sesuai dosis, sesuai sasaran dan sesuai waktu luruh. Sesuai dosis artinya dalam pemberiannya harus sesuai dosis yang dianjurkan dan waktu yang disarankan karena efek samping dari penggunaan antibiotik yang berbahaya yaitu terjadinya resistensi terhadap mikroba patogen. Tepat sasaran artinya pemilihan antibiotik pada ikan harus spesifik terhadap mikroba patogen yang menyerang, agar pengobatannya efektif, hal ini dikarenakan antibiotik bersifat selektif terhadap mikroba tertentu. Selain itu dalam pemakaian antibiotik harus memperhatikan waktu luruh yakni waktu yang dibutuhkan obat untuk keluar dari tubuh individu setelah dikonsumsi, tujuannya agar residual dari antibiotik sepenuhnya sudah dibersihkan dari tubuh ikan, sehingga peroduk perikanan tidak berbahaya bagi lingkungan maupun manusia yang mengkonsumsinya.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini yaitu:

- Dari kedua bakteri *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I dan *A. hydrophila* Jepara diketahui bahwa keduanya memiliki aktivitas protease, lipase, phospolipase dan toksin β -hemolisin. Hal ini ditandai dengan adanya zona hidrolitik yang terbentuk pada masing-masing media yang digunakan. Enzim ekstraseluler yang dihasilkan kedua bakteri dimungkinkan bisa digunakan sebagai indikator virulensi bakteri.
- Semakin tinggi kepadatan bakteri yang diinfeksi pada ikan maka nilai LC_{50} juga semakin tinggi. LC_{50} pada *A. hydrophila* BBPBAP Jepara yaitu 10^6 CFU/ml dan *A. hydrophila* BKIPM Kelas I Surabaya I yaitu 10^7 CFU/ml.
- Hasil antibiogram menunjukkan bahwa oxytetracyclin, kanamycin dan neomycin termasuk dalam kategori *susceptible*, sedangkan untuk penicillin, streptomycin, ampicillin dan erythromycin termasuk dalam kategori *resistant* untuk kedua bakteri tersebut.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini yaitu deteksi faktor virulensi seperti protease, lipase, phospolipase, dan hemolisin akan membantu untuk menyediakan data yang cukup dalam pembentukan hubungan antara infeksi dan virulensi bakteri *A. hydrophila*. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai besarnya aktivitas enzim ekstraseluler yang bisa menyebabkan virulensi dan pemanfaatan enzim ekstraseluler sebagai vaksin untuk mencegah infeksi *A. hydrophila*.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E dan E. Liviawaty. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Kanisius. Yogyakarta: 20 hlm.
- Akinbowale, O.L., Peng, H and Barton, M.D. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*:1364-5072 pp.
- Amri, K dan Khairuman. 2003. Budidaya Ikan Nila (*O. niloticus*) secara Intensif. Agromedia Pustaka. Depok: 75 hlm.
- Bairagi, A., K. Ghost, S. Kumarsen and A.K. Ray. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*. 10: 109-121.
- Baroon and R.K.A, Fellham. 2003. Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria. 2nd Ed. Cambridge University Press. Cambridge.
- BD BBL Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Disc. 2011. Disques Sensi-Disc BBL pour Antibiotogramme. Zone Diameter Interpretive:1-8.
- Campbell, A., J.B. Reece and L.G. Mitchell. 2003. Biologi. Prokariota dan Asal Mula Keanekaragaman Metabolisme. Edisi Kelima Jilid 2. Erlangga. Jakarta: 109 hlm.
- Cascon, A., J. Yugueros., A. Temprano., M. Sanchez., C. Hernanz., J.M. Luengo., and G. Maharro. 2000. A major secreted elastase is essential for eathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infect and Immunity*. 68 (5) : 3232- 3241.
- Chopra, A.K., Xu, X.I., Ribardo, D., Gonzales, M., Kuhl, K., Peterson, J.W dan Huston, C.W. 2000. The cytotoxic enterotoxin of *aeromonas hydrophila* induces proinflamantory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in machrophages. *Infection and Immunity* 68(5): 2808-2818.
- Cipriano, R. C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonad septicemias of Fish. Fish disease leaflet 68: Fish and Wildlife Service Division of Fishery Research Washington.
- Diani, S. 1991. Organisme Parasiter Ikan Laut dan Penyakit yang Disebabkannya. Makalah. Workshop Penetapan Hama dan Penyakit Ikan Karantina di Cipanas: 96 hlm.
- Direktorat Jendral Perikanan Budidaya. 2014. Laporan Kinerja (LKJ) Direktorat Produksi Tahun 2014. Jakarta: 1-74 hlm.
- EPA Office Water. 2006. *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. Washington D.C.: Office of Science .

- Erdem, B., Ergin K., Elif C., Kamil I. 2011. Biochemical identification and numerical taxonomy of *aeromonas* spp. isolated from food samples in Turkey. *Turk J Biol.*35 : 463-472.
- Gusrina. 2014. Genetika dan reproduksi ikan. Depublish. Yogyakarta: 234 hlm.
- Harmita dan M. Radji. 2008. Buku Ajar Analisis Hayati Edisi 3. Penerbit buku Kedokteran EGC. Jakarta:163 hlm.
- Herupradoto, B. A. dan G. A. Yuliani. 2010. Karakterisasi protein spesifik *aeromonas hydrophila* penyebab penyakit ulser pada ikan mas. *Veteriner*. 11(3): 158-162.
- Hoge, R., A. Pelzer, F. Rosenau, S. Wilhem.2010.Weapons of a Pathogen: Proteases and Their Role in Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Current research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.:383-395.
- Iskandar. 2007. Penyebaran Penyus Lekang di Jawa Timur. *Akuakultur* :1-10.
- Istivan, T.S. dan P.T. Coloe. 2006. Phospholipase A in Gram-negative Bacteria and its Role in Pathogenesis. *Microbiology*.152: 1263-1274 pp.
- Jawetz, E., Mwnick, J.L., Adelberg, E.A., Brooks, G.F., Butel, J.S and Ornston, L.N. 1996. Mikrobiologi Kedokteran. Ter. dari Medical Microbiology.20th Eds. Setiawan, I (ed). 1996. EGC, Jajakarta, xiii +753 hlm.
- John, N. 2014. Distribution, extracellular virulence factors and Antibigram of motile aeromonads in fresh water ornamental fishes and immune response of *Cyprinus carpio* against *Aeromonas hydrophila* infection. *Thesis*. Cochin University of Science and Technology.
- Kabata.1985. Parasites and diseases of fish cultured in the tropics. (1st edition).Taylor & Francis, London and Philadelphia:318.
- Kamiso, H.M dan Triyanto. 1993. Pembuatan Monovalen dan Polyvalen Vaksin untuk Mengatasi Serangan *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele (*Clarias*Sp.). Direktorat Pengabdian Pada Masyarakat Jakarta.
- Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia. 2014. Klasifikasi Obat Ikan.
- Komarudin O. dan J. Slembrouck. 2005. Manajemen Kesehatan Ikan. *IRD (Lembaga Penelitian Perancis untuk Pembangunan)*. Jakarta:1-15 hlm.
- Kordi, K.M.G. 2000. Budidaya Ikan Nila. Dahara Prize. Jakarta.72 hlm.
- Kordi, M.G.H. 2010. Budidaya Ikan Nila di Kolam Terpal Lily Publisher. Yogyakarta:20 hlm.

Kusnadi. 2012. Comtext mikrobiologi. <http://www.file.upi.edu/Direktori/FPMIPA/JUR. PEND. BIOLOGI/196805091994031>. Diakses tanggal 29 Maret 2016.

Mangunwardoyo, W. R. Ismayasari dan E. Riani. 2010. Uji patogenitas dan virulensi *aeromonas hydrophila* stainer pada ikan nila (*Oreochromis niloticus* lin.) melalui postulat koch. *J. Ris. Akuakultur*. 5(20): 245-255.

McMahon M.A.S. 2000. The Expression of proteinases and haemolysins by *Aeromonas hydrophila* under modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 89: 415-422.

Monica, W.S., H. Mahatmi, K. Besung. 2013. Pola resistensi *salmonella typhi* yang diisolasi dari ikan serigala (*Hoplias malabaricus*) terhadap antibiotik. *Jurnal Ilmu dan Kesehatan Hewan*. 1(2): 64-69.

Okafor, N. 2011. Environmental Microbiology of Aquatic and Waste System. Springer: New York. 324 hlm.

Pelczar J.M and Chan E.S.C. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi 1*. Jakarta: UI Press

Prajitno, A. 2007. Penyakit Ikan-Udang Bakteri. UM Press Malang:115 hlm.

Prasetya, B. 2015. Panduan Praktis Pakan Ikan Konsumsi. Penebar Swadaya. Jakarta Timur: 80 hlm.

Reynolds, S. 2011. BIOL 2421. Lab Procedures Manual. http://delrio.dcccd.edu/jreynolds/microbiology/2421/lab_manualcounts.pdf. Diakses tanggal 29 Maret 2016.

Rukmana, H. R. 1997. Ikan Nila (*O. niloticus*) Budidaya dan Prospek Agribisnis. Yogyakarta: 90 hlm.

Sachin, C.D., Ruchi K. and Santosh, S. 2012. *In vitro* evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. *International Journal of Medicine and Biomedical Research*. 1(2):153-157.

Sahu, I., Das BK., Marhual N., Samanta M, Mishara BK., Eknath AE. 2011. Toxicity of crude extraceluler products of *aeromonas hydrophila* on rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Indian J Mikrobiol* 51(4): 515-520.

Saanin, H. 1984. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan. Bina Cipta: Bandung.

Santos, J.A., Gonzalez, C.J., Otero, A., & Lopez, M.L.G. 1999. Hemolytic activity and sidephore production In different *h.romonas* spKies isolated fro fish. *Ameri- can society for microbiology*. Applied and environmental microbiology. 65(12): 5612-5614.

Sartory, D.P. 2003. Guidelines for drinking-water quality: *Aeromonas*. Quality and Environmental Services, Severn Trent Water, England. diakses

dari <http://www.who.int-water-sanitation-health/dwq/admicrob2/pdf> pada tanggal 16 November 2015.

- Secades, D. and J.A. Guijarro. 1999. Purification and Characterization of an Extracellular Proteases from Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* and Effect of Cultures Condition and Production. *Applied and Environmental Microbiol.* 65 (9): 3969-3975.
- Stehr, F., M. Kretschmar, C. Kroger, B. Hube, W. Schafer. 2003. Microbial lipases as virulence factors. Elsevier: 347-355.
- Suhaemi, Z. 2011. Metode Penelitian dan Rancangan Percobaan. Padang: Fakultas Pertanian, Universitas Taman Siswa.
- Sumiati, T. dan Y. Aryati. 2010. Penyakit parasitik pada ikan hias air tawar. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*: 963-967.
- Supriyadi, H. 1990. Characterization and virulence studies of *Motile Aeromonads* isolated from *Clarias batrachus* and *C. Gariepinus* and their immunization potential. *Thesis*. The Degree of Master Science. Universiti Pertanian Malaysia:112 pp.
- Susanto, H. 1996. Budidaya Ikan di Pekarangan. Penebar Swadaya. Jakarta: 152 hlm.
- Swann, Ladon and M.R, White. 1991. Diagnosis and treatment of *aeromonas hydrophila* infection on fish. *Aquaculture Extentions, Sea Grant*: 22 pp.
- Swann, Ladon dan M. R, White. 1989. Diagnosis and treatment of "*Aeromonas hydrophila*" infection of fish. university of arkansas cooperative extension service. *Fact Sheet Disease*: 2 hlm.
- Swift, S., A. V. Karlyshev., L. Fish, E. L. Durant, M. K. Winson, S. M. Chhabra, P. Williams., S. Macintyre and G. S A. B. Stewart. 1997. Quorum Sensing In *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas Salmonicida*: Identification Of The LuxI Homologs AhyI and AhyII and Their Cognate N-Acylhomoserine Lactone Signal Molecules. *Journal Of Bacteriology*. 179(17): 5271-5281.
- Tomas, J.M. 2010. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. International Scholarly Research Network:1-22.
- Willerding, A.L., L.A de Oliveira., F. W Moreira. M.G. Germano and A. S Chaggas. 2011. Lipase activity among bacteria isolated from Amazonian soils. *Enzyme Research*: 1-5.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat-Alat Penelitian



Inkubator



Laminary Air Flow



Hot Plate



Refrigerator



Oven



Autoklaf



Korek Api



Jarum Ose



Erlenmeyer



Beaker glass



Gelas Ukur



Sprayer



Rak Tabung



Spatula



Bunsen



Bola Isap



Pipet Volume



Gunting



Tabung Reaksi



Cawan Petri



Sentrifuge



Spektrofotometer



Colony counter



Tube



Vortex mixer



Timbangan digital



Nampan



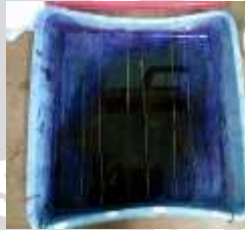
Sentrifuge dingin



Aerator set



Akuarium



Nampan pewarnaan



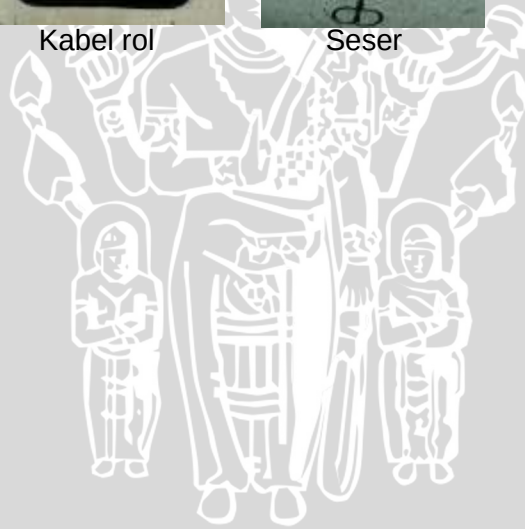
Jangka sorong



Kabel rol



Seser



Lampiran 2. Bahan- Bahan Penelitian



Alumunium foil



Plastik Wrap



Kapas



Benang Kasur



Kertas Label



Latex



Masker



Tisu



Plastik



Kertas



Kain lap



Spiritus



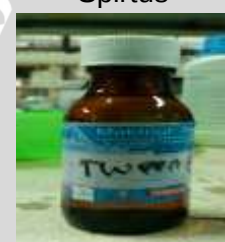
Alkohol 70%



Aquadest



Spiritus



Tween 80



Olive oil



Egg yolk



Kristal violet



Iodin



Media Blood Agar



Skim Milk Agar



Antibiotik



Safranin



Neutral Red
Solution



Phospat Buffer
Saline



Tryptic Soy Agar



Muller Hinton Agar



Plate Count Agar



Tryptic Soy Broth



Lampiran 3. Laporan Hasil Uji *A. hydrophila*

a. BKIPM Kelas I Surabaya I

**LAMPIRAN IDENTIFIKASI ISOLAT
PARAMETER Uji *Aeromonas hydrophila* (IKM/5.4.13/BKI-JS)
Tanggal : 15 - 18 Februari 2016**

Karakteristik	Acuan (IKM)	Isolat tube <i>Aeromonas hydrophila</i>
Morfologi		
Warna	Krem	Krem
Bentuk		
Tepi		
Elevasi		
Struktur dalam		
Uji gram, Morf. Sel	- Batang	- Batang
Oksidase	+	+
Katalase	+	+
Uji Biokimia		
O/F	F	F
TSA 37°C	+	+
TSA, Gas, H ₂ S	AsiAs, H ₂ S	AsiAs, H ₂ S
L I A	d	-
Motilitas	+	+
Gelatin (22°C)	+	+
Indole	+	+
Ornithine	-	-
MR	+	+
Vp	+	-
Arginin	+	+
Simmons Citrate	d	-
Urease	-	-
TCBS		
Mac Konkey	G	G
Muler Hilton / Novo	R	R
Uji Karbohidrat		
* Glukosa	+	+
* Laktosa	v	-
* Sukrosa	+	+
* Arabinosa	+	+
* Manitol	+	+
* Inositol	-	-
* Melitosa	+	+
RS-A	+	+



b. BBPBAP Jepara



**KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA
BALAI BESAR PENGEMBANGAN BUDIDAYA AIR PAYAU
LABORATORIUM PENGUJIAN MUTU
PERIKANAN BUDIDAYA**

Alamat surat: PO Box 1 Jepara, Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59418
Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724
Email : bbbapjpr@rad.net.id Website : udang-bbbap.com

HASIL UJI BIOKIMIA

Uji Bio Kimia	<i>Aeromonas hydrophilla</i>
Gram	—
Bentuk	Batang
Katalase	+
Oksidase	+
H ₂ S	—
Indol	+
Motil	+
OF medium	Fermentatif
VP	+
MR	—
Gelatin	+
Urea	—
Glukosa	+
Sukrosa	+



Lab Mikrobiologi BBPBAP Jepara

Penyelia

SP Murfi Astuti, SP.

NIP. 19651106 199103 2001

**Lampiran 4. Uji Independent T Test Aktivitas Enzim Ekstraseluler Protease A.
*hydrophila***

Tests of Normality							
	Jenis Bakteri	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekstraseluler dalam mm	Bakteri BKIPM	,341	3	.	,846	3	,230
	Bakteri JEPARA	,175	3	.	1,000	3	1,000

Group Statistics

	Jenis Bakteri	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ekstraseluler dalam mm	Bakteri BKIPM	3	3,1067	,12503	,07219
	Bakteri JEPARA	3	5,2500	,30000	,17321

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Ekstraseluler dalam mm	Equal variances assumed	1,025	,369	-11,422	4	,000	-2,14333	,18765	-2,66432	-1,62234
	Equal variances not assumed			-11,422	2,674	,002	-2,14333	,18765	-2,78381	-1,50286

Lampiran 5. Uji Independent T Test Aktivitas Enzim Ekstraseluler Lipase A. *hydrophila*

Tests of Normality							
	Jenis Bakteri	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekstraseluler dalam mm	Bakteri BKIPM	,258	3	.	,960	3	,614
	Bakteri IJEPARA	,308	3	.	,902	3	,391

Group Statistics					
	Jenis Bakteri	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ekstraseluler dalam mm	Bakteri BKIPM	3	4,8033	,63288	,36539
	Bakteri JEPARA	3	7,0700	,44227	,25534

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Ekstraseluler dalam mm	Equal variances assumed	,457	,536	-5,085	4	,007	-2,26667	,44577	-3,50432	-1,02901
	Equal variances not assumed			-5,085	3,577	,009	-2,26667	,44577	-3,56420	-,96914

Lampiran 6. Uji Independent T Test Aktivitas Enzim Ekstraseluler Phospolipase A. hydrophila

Tests of Normality							
	Jenis Bakteri	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekstraseluler dalam mm	Bakteri BKIPM	,288	3	.	,928	3	,482
	Bakteri JEPARA	,369	3	.	,789	3	,087

Group Statistics					
	Jenis Bakteri	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ekstraseluler dalam mm	Bakteri BKIPM	3	3,1933	,14012	,08090
	Bakteri JEPARA	3	6,4200	,54617	,31533

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
				F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
										Lower
Ekstraseluler dalam mm	Equal variances assumed	4,690	,096	-34,364	4	,000	-2,89333	,08420	-3,12710	-2,65957
	Equal variances not assumed			-34,364	2,330	,000	-2,89333	,08420	-3,21056	-2,57611

Lampiran 7. Uji Independent T Test Aktivitas Toksin Hemolisin *A. hydrophila*

Tests of Normality

	Jenis Bakteri	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekstraseluler dalam mm	Bakteri BKIPM	,219	3	.	,987	3	,780
	Bakteri JEPARA	,255	3	.	,962	3	,627

Group Statistics

	Jenis Bakteri	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ekstraseluler dalam mm	Bakteri BKIPM	3	12,4733	,12583	,07265
	BAKTERI JEPARA	3	14,4233	,37207	,21481

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Ekstraseluler dalam mm	Equal variances assumed	3,097	,153	-8,599	4	,001	-1,95000	,22676	-2,57960	-1,32040
	Equal variances not assumed			-8,599	2,452	,007	-1,95000	,22676	-2,77217	-1,12783

Lampiran 8. Uji SPSS Metode Probit LC₅₀

a. BKIPM Kelas I Surabaya I

Confidence Limits							
	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for log(Konsentrasi) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	,010	,002	.	.	-2,620	.	.
	,020	,036	.	.	-1,444	.	.
	,030	,201	.	.	-,698	.	.
	,040	,731	.	.	-,136	.	.
	,050	2,091	.	.	,320	.	.
	,060	5,119	.	.	,709	.	.
	,070	11,220	.	.	1,050	.	.
	,080	22,655	.	.	1,355	.	.
	,090	42,925	.	.	1,633	.	.
	,100	77,301	.	.	1,888	.	.
	,150	882,972	.	.	2,946	.	.
	,200	6118,158	.	.	3,787	.	.
	,250	32199,121	.	.	4,508	.	.
	,300	143062,192	.	.	5,156	.	.
	,350	569767,555	.	.	5,756	.	.
	,400	2114477,403	.	.	6,325	.	.
	,450	7519795,829	.	.	6,876	.	.
	500	26210367,220	.	.	7,418	.	.
	,550	91356649,234	.	.	7,961	.	.
	,600	324895101,261	.	.	8,512	.	.
	,650	1205725640,601	.	.	9,081	.	.
	,700	4801990934,852	.	.	9,681	.	.
	,750	21335469023,257	.	.	10,329	.	.
	,800	112285982784,010	.	.	11,050	.	.
	,850	778035553430,383	.	.	11,891	.	.
	,900	8887081628835,120	.	.	12,949	.	.
	,910	16004429579355,102	.	.	13,204	.	.
	,920	30323940657222,960	.	.	13,482	.	.
	,930	61229642194928,680	.	.	13,787	.	.
	,940	134213312962363,700	.	.	14,128	.	.
	,950	328487179193194,200	.	.	14,517	.	.
	,960	940194519065475,100	.	.	14,973	.	.
	,970	3425085667219932,000	.	.	15,535	.	.
	,980	19099691166109328,000	.	.	16,281	.	.
	,990	286664592436595200,000	.	.	17,457	.	.

b. BPBAP Jepara

Confidence Limits							
	Probabil ity	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for log(Konsentrasi) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
	,010	,000	.	.	-3,419	.	.
	,020	,006	.	.	-2,201	.	.
	,030	,037	.	.	-1,429	.	.
	,040	,142	.	.	-,848	.	.
	,050	,421	.	.	-,376	.	.
	,060	1,062	.	.	,026	.	.
	,070	2,392	.	.	,379	.	.
	,080	4,950	.	.	,695	.	.
	,090	9,588	.	.	,982	.	.
	,100	17,622	.	.	1,246	.	.
	,150	218,976	.	.	2,340	.	.
	,200	1622,378	.	.	3,210	.	.
	,250	9043,2521	.	.	3,956	.	.
	,300	42306,856	.	.	4,626	.	.
	,350	176744,292	.	.	5,247	.	.
	,400	686359,502	.	.	5,837	.	.
	,450	2550442,393	.	.	6,407	.	.
PROBIT	.500	9281993,064	.	.	6,968	.	.
	,550	33780569,000	.	.	7,529	.	.
	,600	125525173,071	.	.	8,099	.	.
	,650	487457864,437	.	.	8,688	.	.
	,700	2036440484,193	.	.	9,309	.	.
	,750	9527036495,679	.	.	9,979	.	.
	,800	53104397405,936	.	.	10,725	.	.
	,850	393446645811,536	.	.	11,595	.	.
	,900	4889187524734,485	.	.	12,689	.	.
	,910	8985776046219,650	.	.	12,954	.	.
	,920	17406127815539,607	.	.	13,241	.	.
	,930	36011003136181,180	.	.	13,556	.	.
	,940	81107230754763,700	.	.	13,909	.	.
	,950	204752637031551,750	.	.	14,311	.	.
	,960	607753419029835,900	.	.	14,784	.	.
	,970	2315280017915681,000	.	.	15,365	.	.
	,980	13701783885387720,000	.	.	16,137	.	.
	,990	225849047085951712,000	.	.	17,354	.	.

Lampiran 9. Zona Hambat Antibiotogram *A. hydrophila*

a. BKIPM Kelas I Surabaya I



Oxytetracycline



Kanamycin



Neomycin



Erythromycin



Streptomycin



Ampicilin



Penicilin

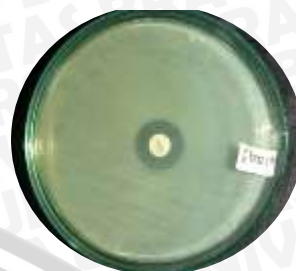
b. BPBAP Jepara



Oxythertracycline



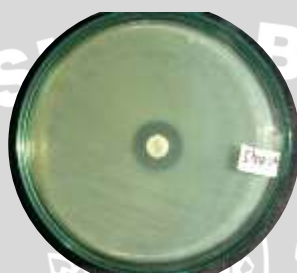
Kanymicin



Neomycin



Erythromycin



Streptomycin



Ampicilin



Penicilin