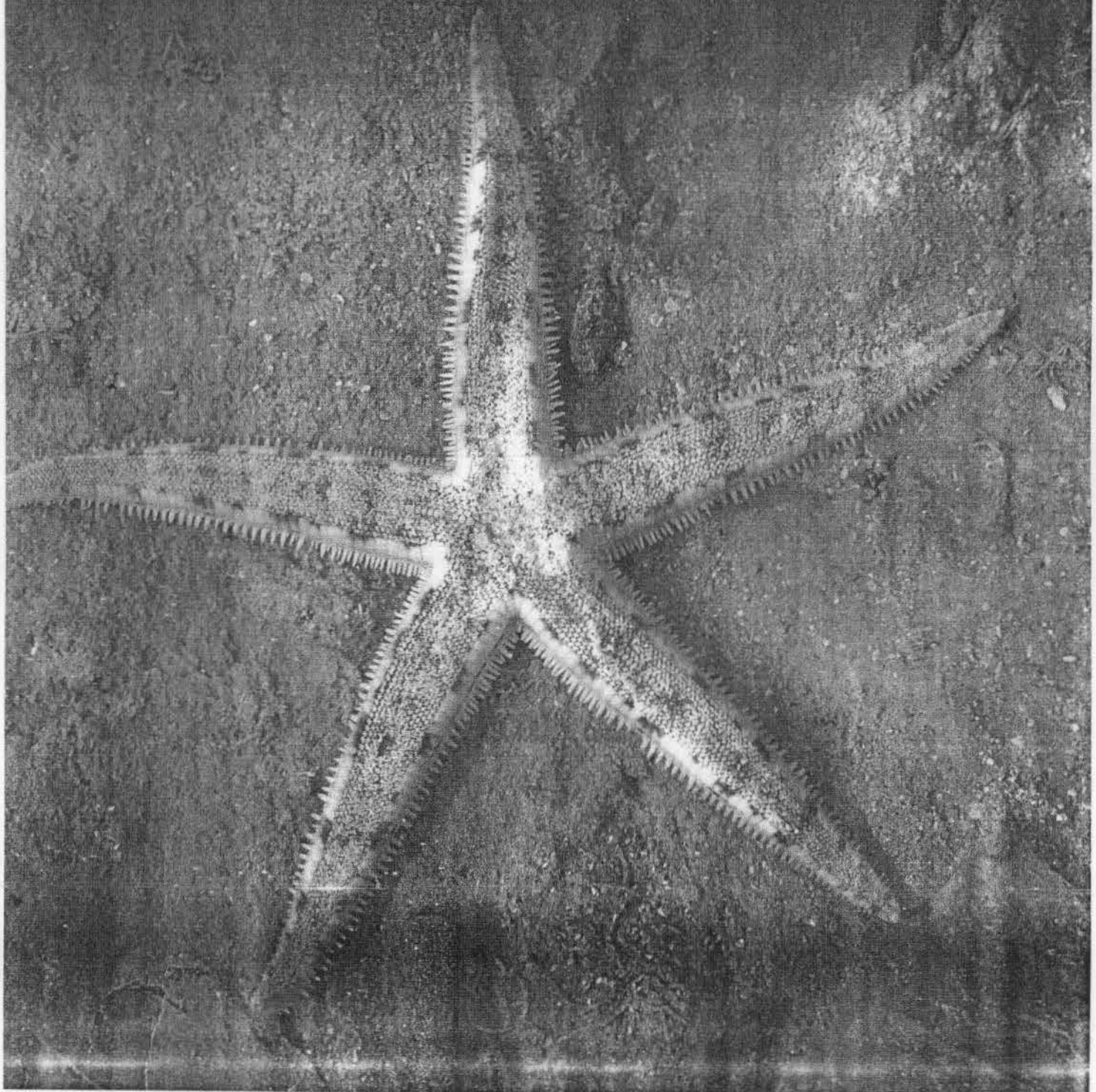


ISSN 0853-8670

Biota

Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Hayati

Volume 17, Nomor 3, Oktober 2012



BIOTA

Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Hayati

Penanggungjawab

L. Indah Murwani

Dewan Penyunting

Ketua:

Felicia Zahida

Anggota:

B. Boy Rahardjo Sidharta, D.E. Djoko Setyono, Ign. Pramana Yuda,
Maryani, Nisa Rachmania M., Rully Adi N.,
Sukarti Moeljopawiro, Suwarno Hadisusanto, Ari Indrianto,
Djong Hon Tjong, Tukirin Partomihardjo, V. Irene Meitiniarti,
Wartika Rosa Farida, Gratiana E. Wijayanti, P. Kianto Atmodjo

Penyunting Bahasa

R.A. Vita N.P.A.

R. Kunjana Rahardi

Penyunting Teknik

YR. Gunawan Sugiyanto

Bendahara

F. Sinung Pranata

Sekretaris

B. Septin

Distributor

A. Wisnu Trisno Widayat

Penerbit

Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta

Penerimaan Naskah

Redaksi menerima naskah dari staf pengajar, peneliti, mahasiswa maupun praktisi dengan ketentuan penulisan seperti tercantum pada halaman belakang. Naskah yang disetujui untuk dimuat dan diterbitkan akan dibebani kontribusi biaya sebesar Rp 150.000,- (*seratus lima puluh ribu rupiah*) per 4 halaman pertama, selebihnya ditambah Rp. 50.000,- (*lima puluh ribu rupiah*) per halaman. Biaya cetak untuk halaman berwarna sepenuhnya menjadi tanggung jawab penulis.

Langganan

Biota terbit tiga nomor dalam satu tahun (Februari, Juni, dan Oktober). Langganan untuk satu tahun (belum termasuk ongkos kirim), adalah sbb.:

1. Lembaga/institusi : Rp. 100.000,- (*seratus ribu rupiah*)
2. Individu/pribadi : Rp. 75.000,- (*tujuh puluh lima ribu rupiah*)

Pembayaran berlangganan dapat dilakukan dengan cara: a) pembayaran langsung, b) wesel, c) transfer ke **CIMB NIAGA, No. Rek. 990-01-00991-18-8**, a.n. **Wisnu Trisno Widayat, Cabang CIMB UAJY Babarsari Yogyakarta**. Salinan bukti pembayaran (b dan c) mohon dikirim ke redaksi. Mahasiswa harus melampirkan salinan kartu mahasiswa atau surat keterangan dari Perguruan Tinggi atau Institut.

Alamat Redaksi:

Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta

Jln. Babarsari 44 Yogyakarta 55281, Indonesia

Telp. 0274-487711 ext.2189; Fax: 0274-487748

Website: <http://uajy.ac.id/penelitian/jurnal/biota> atau <http://jurnal.uajy.ac.id/biota>

E-mail: biota@mail.uajy.ac.id

Cover: Bintang Laut *Archaster typicus*

Copy right: P. Kianto Atmodjo

Potensi Bakteri Proteolitik *Aeromonas caviae* NU-4 dan *Aeromonas* sp. NU-8 sebagai Pengendali Pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* BT-02 pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Potency of Proteolytic Bacteria *Aeromonas caviae* NU-4 and *Aeromonas* sp. NU-8 as a Biocontrol of *Microcystis aeruginosa* BT-02 in Carp (*Cyprinus carpio*)

Encah Ewi Mulyeti¹, Nisa Rachmania Mubarik^{2*}, dan Dinamella Wahjuningrum²

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Bogor Agricultural University, Jln. Agatis, Darmaga, Bogor 16628

²Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Marine Science, Bogor Agricultural University, Jln. Agatis, Darmaga, Bogor 16628

Email: nrachmania@ipb.ac.id *Penulis untuk korespondensi

Abstract

Cyanobacteria are a group of phytoplankton that are commonly found in bodies of fresh water in all over the world. Cyanobacteria produce toxins such as microcystin, which is produced by *Microcystis aeruginosa* which causes the death of fish. This study was conducted to know the potency of proteolytic bacteria, isolated from digestive tract of tilapia fish strain GIFT, which have an ability to inhibit the growth of *M. aeruginosa* BT-02. The isolates of proteolytic bacteria, which have the ability to inhibit the growth of *M. aeruginosa* BT-02, are i.e *Aeromonas caviae* NU-4 and *Aeromonas* sp. NU-8. The inhibition index that is produced by NU-4 (1.71) was higher than NU-8 (1.34). The inhibition mechanism is still unknown. Toxicity test revealed that there were not any carp fish which died during the experiment, but there were some histological changes observed in liver and intestinal of treated carp fish with *M. aeruginosa* cells.

Keywords: Proteolytic bacteria, *Aeromonas* sp., *Microcystis aeruginosa*, carp fish, toxicity test

Abstrak

Sianobakteri merupakan kelompok fitoplankton yang umum dijumpai di perairan tawar di seluruh dunia. Sianobakteri menghasilkan toksin mikrosistin yang dihasilkan oleh *Microcystis aeruginosa* yang menyebabkan kematian ikan. Penelitian ini bertujuan mengetahui potensi bakteri proteolitik yang berasal dari saluran pencernaan ikan nila GIFT dalam menghambat pertumbuhan *M. aeruginosa* BT-02. Isolat bakteri proteolitik asal saluran pencernaan ikan nila yang menghambat pertumbuhan *M. aeruginosa* BT-02, yaitu isolat i.e *Aeromonas caviae* NU-4 and *Aeromonas* sp. NU-8. Indeks penghambatan bakteri NU-4 (1,71) terhadap *M. aeruginosa* lebih besar daripada NU-8 (1,34). Mekanisme penghambatan belum diketahui. Aplikasi *Microcystis aeruginosa* BT-02 pada ikan mas tidak menyebabkan kematian ikan, tetapi menimbulkan beberapa perubahan histopatologi pada hati dan usus ikan mas.

Kata kunci: Bakteri proteolitik, *Aeromonas* sp., *Microcystis aeruginosa*, ikan mas, tes toksisitas

Diterima: 14 Januari 2012, disetujui: 12 Juli 2012

Pendahuluan

Salah satu permasalahan dalam budi daya perikanan yaitu pengendalian penyakit menggunakan obat-obatan kimia yang biasanya membutuhkan biaya lebih tinggi, kurang efektif, dan menyisakan residu bahan kimia pada produk perikanan. Penyakit ikan perlu ditanggulangi dengan metode yang cepat,

efektif, dan efisien. Penggunaan mikroba antagonis sebagai biokontrol mikroba patogen diharapkan mampu mengatasi permasalahan pada budi daya perikanan yang ramah lingkungan.

Sianobakteri atau alga hijau biru adalah kelompok organisme prokariot fotosintetik yang dapat tumbuh di perairan tawar dan laut. Kondisi perairan tawar eutrofik dapat

menyebabkan ledakan populasi sianobakteri (*blooming algae*). *Blooming* tidak hanya menurunkan kualitas air, tetapi juga meningkatkan risiko toksisitas pada hewan akuatik dan manusia. Sianobakteri seperti *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae*, dan *Oscillatoria* sp. memproduksi toksin. *Microcystis aeruginosa* merupakan jenis yang paling sering dijumpai di perairan tawar di seluruh dunia, jenis ini memproduksi mikrosistin dalam jumlah tinggi (Codd dkk., 1999). *Microcystis* sp. merupakan jenis sianobakteri toksik yang pernah ditemukan dalam keadaan berlimpah di waduk Saguling, Jawa Barat. Kepadatan sianobakteri di salah satu stasiun pengamatan pada bulan Desember 1986 mencapai 898.000 sel/L dari sampel air yang diambil dari kedalaman 20 cm dari permukaan air (Soemarwoto dkk., 1990).

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) adalah salah satu jenis ikan yang dibudidayakan dan banyak dikonsumsi. Ikan mas bersifat omnivora, *Microcystis* termasuk salah satu makanannya. Akumulasi toksin mikrosistin (MCYST) dalam jaringan dapat menyebabkan kematian ikan. Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) GIFT (*Genetic Improvement of Farmed Tilapias*) merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang mampu bertahan hidup pada kondisi *blooming algae*, tahan penyakit, kepadatan yang tinggi, dan kualitas air yang rendah. Konsentrasi *Microcystis* yang tinggi dapat meningkatkan pertumbuhan ikan nila di Waduk Saguling Jawa Barat karena sianobakteri ini merupakan pakan alamnya (Costa dan Hadikusumah, 1990). Sebanyak 31 isolat bakteri proteolitik telah berhasil diisolasi dari saluran pencernaan ikan nila GIFT (Mubarik dkk., 2006). Keberadaan bakteri proteolitik dalam saluran pencernaannya menjadi probiotik alami dalam tubuh ikan nila GIFT. Bakteri proteolitik tersebut diharapkan mampu menghambat pertumbuhan *Microcystis* sp. dan dapat diaplikasikan terhadap ikan air tawar lainnya. Beberapa penelitian mengenai toksisitas *M. aeruginosa* terhadap ikan air tawar telah banyak dilakukan, demikian pula dengan biokontrol mikrob terhadap pertumbuhan *M. aeruginosa*. Namun, aplikasi bakteri proteolitik (*Aeromonas* sp.) terhadap *M. aeruginosa* pada ikan air tawar belum banyak yang melakukan.

Penelitian ini bertujuan mengetahui potensi bakteri proteolitik asal saluran pencernaan ikan nila GIFT dalam menghambat pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* BT-02 dan perubahan histopatologik pada ikan mas akibat penyuntikan *M. aeruginosa* dan bakteri proteolitik secara intraperitoneal.

Metode Penelitian

Bahan

Kultur aksenik *M. aeruginosa* BT-02 koleksi Alan E. Wilson PhD berasal dari danau Swan, Michigan, USA (Rachmadi dkk., 2012). Isolat *Aeromonas caviae* NU-4 dan *Aeromonas* sp. NU-8 asal saluran pencernaan ikan nila GIFT, koleksi biakan Laboratorium Mikrobiologi, FMIPA, IPB. Ikan mas (*C. carpio*) dengan rata-rata berat badan 150 ± 5 g ($n=12$), yang berumur $\pm 1,5$ bulan diperoleh dari petani ikan di Kabupaten Sukabumi.

Peremajaan *Microcystis aeruginosa* BT-02

Pertumbuhan dan peremajaan *M. aeruginosa* dilakukan pada media BG-11 yang dimodifikasi (Vanderploeg dkk., 2001) dengan komposisi (per liter) asam sitrat 6 g, NaNO_3 170 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 73,94 g, K_2HPO_4 41 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36,76 g, Na_2CO_3 20 g, NaHCO_3 84 g, feri amonium sitrat 6 g, EDTA 1 g, *trace metal mix A5* 1 mL dengan komposisi per liter H_3BO_3 0,079 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,39 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,222 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,079 g, $\text{CO}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,049 g. Semua bahan dilarutkan dalam satu liter air destilata dan pHnya disesuaikan sampai 7,4 dengan 1 M NaHCO_3 (84 g/L) atau HCl 1 N sebelum disterilkan. Biakan sebanyak 1 mL ditumbuhkan dalam labu Erlenmeyer atau tabung kultur yang diisi BG-11 cair sebanyak sepertiga bagiannya dan diinkubasi pada suhu ruang ($\pm 27^\circ\text{C}$), intensitas cahaya ± 1.000 lux. Penghitungan sel *M. aeruginosa* menggunakan hemasitometer (Rachmadi dkk., 2012).

Pengujian dan peremajaan isolat proteolitik penghambat pertumbuhan *M. aeruginosa*

Pengujian dilakukan dengan metode difusi pada cawan agar-agar blok (Nedialkova dan Naidenova, 2005; Rachmadi dkk., 2012).

Isolat bakteri NU-4 dan NU-8 ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) yang ditambahkan 0,5% susu skim yang berumur 24 jam, dibor menggunakan *cope bor* berdiameter 6 mm dan dipindahkan ke dalam isolat *M. aeruginosa* pada media BG-11 agar-agar *bilayer* yang berumur 1 minggu (kepadatan 10^8 sel/mL) dan koloninya tersebar dengan baik. Aktivitas penghambatan diukur berdasarkan ukuran zona bening yang terbentuk (Mubarik dkk., 2006).

Pengukuran kurva tumbuh isolat proteolitik terpilih

Isolat proteolitik penghambat *M. aeruginosa* ditumbuhkan pada media NB (*Nutrient Broth*). Pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang 620 nm dilakukan setiap tiga jam selama 48 jam. Bakteri yang digunakan berada pada fase eksponensial (Mubarik dkk., 2006).

Uji daya hambat ekstrak enzim protease kasar

Isolat bakteri proteolitik ditumbuhkan pada media NB, digoyang pada suhu ruang (27°C). Suspensi bakteri disentrifugasi saat mencapai fase log dengan kecepatan 12.000 g selama 10 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikro, disimpan dalam lemari pendingin suhu 10°C . Pengujian dilakukan dengan menuangkan 20 μL ekstrak enzim protease kasar di atas kertas cakram berdiameter 6 mm yang diletakkan di atas koloni *M. aeruginosa* BT-02 pada media BG-11 agar-agar *bilayer* yang berumur 1 minggu. Aktivitas penghambatan diukur berdasarkan ukuran zona bening yang terbentuk (Mubarik dkk., 2006).

Pengujian toksisitas *M. aeruginosa* BT-02 pada ikan mas

Ikan dipelihara dalam empat buah akuarium berukuran $60 \times 30 \times 40 \text{ cm}^3$ selama dua bulan dengan kapasitas 3 ekor ikan untuk setiap akuarium menggunakan air deklorinasi sebanyak 10 L. Pakan diberikan 2 kali sehari sebanyak 3% total bobot ikan per akuarium selama percobaan. Kondisi air pada akuarium memiliki suhu antara $27\text{--}30^{\circ}\text{C}$ dan pH 6,0–7,0. Aklimatisasi dilakukan selama 1 minggu.

Penggantian air dan penyiponan dilakukan setiap dua minggu. *Aerator filter* digunakan untuk menjaga sirkulasi O_2 di dalam akuarium dan menyaring kotoran ikan. Uji toksisitas yang dilakukan berupa uji postulat Koch yang dimodifikasi (Wahjuningrum dkk., 2009) pada ikan mas. Perlakuan diberikan dengan cara penyuntikan intraperitoneal (di bawah rongga perut). Perlakuan pertama sebanyak 1 mL *M. aeruginosa* dengan konsentrasi 10^8 sel/mL. Perlakuan kedua 10^8 sel/mL bakteri NU-4 sebanyak 1 mL. Perlakuan ketiga campuran *M. aeruginosa* dan bakteri NU-4 dengan dosis perbandingan 1:1 masing-masing 1 mL. Ikan kontrol tidak dilakukan penyuntikan.

Analisis histopatologi hati dan usus ikan

Analisis histopatologi dilakukan dengan mikroteknik metode parafin (Kiernan, 2001). Organ hati dan usus difiksasi dengan larutan Bouin dan diwarnai dengan pewarna ganda hematoksilin dan eosin (H & E) kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya.

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan *M. aeruginosa* pada media BG-11 cair

Kultur *M. aeruginosa* dapat tumbuh optimal pada media BG-11 ditandai dengan tumbuhnya koloni hijau yang mengapung di permukaan media. Pengamatan morfologi menunjukkan sel *M. aeruginosa* berbentuk bulat oval dan berkoloni (Gambar 1a). Hasil pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif dengan selubung lendir yang membungkus sel (Gambar 1b).

Pengujian dan peremajaan isolat proteolitik penghambat pertumbuhan *M. aeruginosa*

Isolat NU-4 dan NU-8 mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan *M. aeruginosa* secara *in vitro*. Penghambatan ditandai dengan adanya zona bening di sekeliling koloni bakteri (Gambar 2a dan 2b). Warna koloni *M. aeruginosa* berubah menjadi kuning dan mati setelah berumur 48 jam. Diameter zona bakteri terbesar dihasilkan oleh isolat NU-4 dengan indeks penghambatan sebesar 1,71 sedangkan NU-8 memiliki indeks

penghambatan sebesar 1,34 (Tabel 1). Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa NU-4 dan NU-8 berbentuk batang dan Gram negatif.

Pengukuran kurva tumbuh

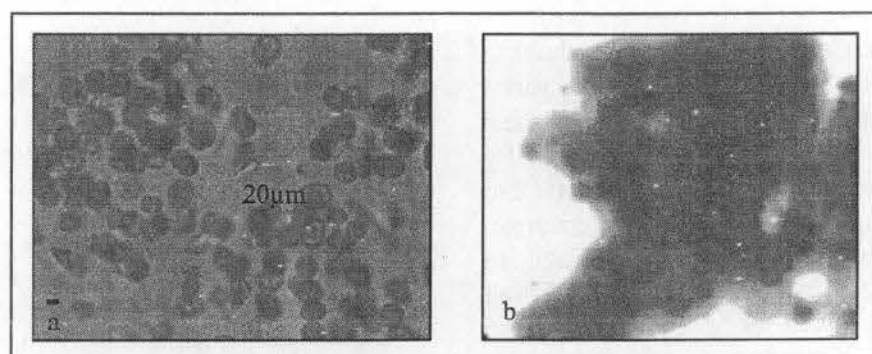
Isolat NU-4 mencapai pertumbuhan maksimal pada jam ke-9 dengan konsentrasi sel $9,3 \times 10^9$ sel/mL (Gambar 4), sedangkan isolat NU-8 mencapai pertumbuhan maksimal pada jam ke-15 dengan konsentrasi sel $2,3 \times 10^8$ sel/mL (Gambar 3). Bakteri proteolitik yang memiliki indeks penghambatan terbesar dan konsentrasi sel tertinggi yaitu isolat NU-4 (*A. caviae*) digunakan untuk uji *in vivo* pada ikan mas.

Uji toksisitas *M. aeruginosa* BT-02 pada ikan mas

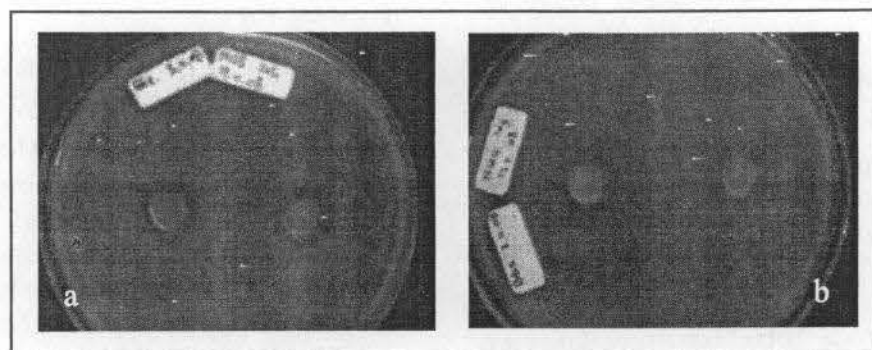
Selama pemeliharaan untuk setiap perlakuan tidak ada ikan yang mati. Perubahan histologik terlihat pada jaringan hati ikan yang disuntik suspensi *M. aeruginosa*. Perubahan ini ditandai dengan adanya sel nekrosis dan apoptosis (Gambar 4b). Perubahan yang lain ditandai dengan adanya lisis membran hepatosit yang diiringi apoptosis nukleus. Sel nekrosis dan apoptosis tidak dijumpai pada ikan dengan tiga perlakuan lainnya termasuk kontrol.

Tabel 1. Diameter zona bening dan indeks penghambatan *M. aeruginosa* oleh bakteri asal saluran pencernaan ikan nila GIFT.

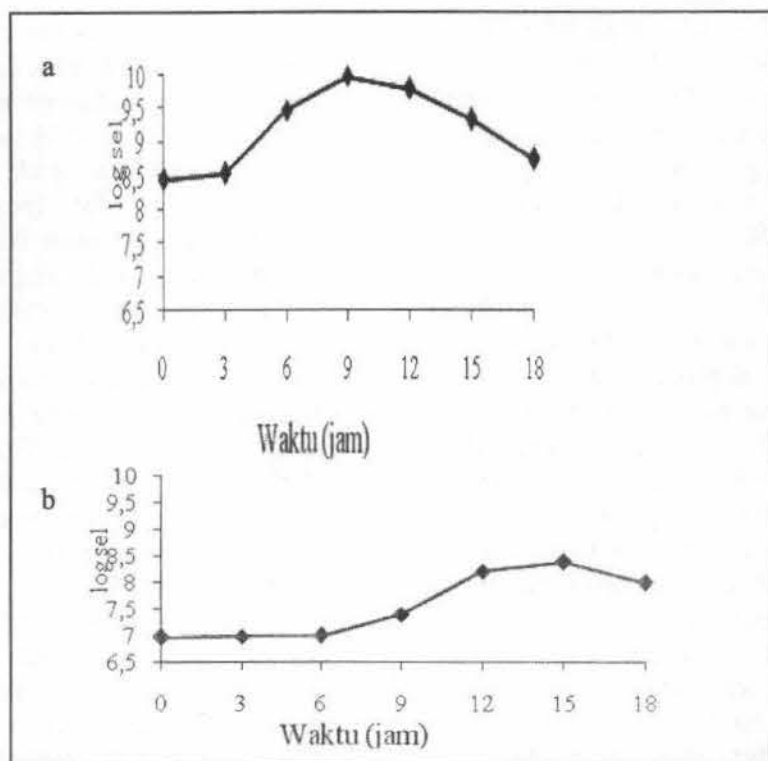
Isolat	Φ Koloni (mm)	Φ Zona Bening (mm)	Indeks Penghambatan
NU-8	6	14,00±2,91	1,34±0,49
NU-4	6	16,25±0,80	1,71±0,13



Gambar 1. (a) Morfologi sel *M. Aeruginosa* dan (b) pewarnaan Gram *M. aeruginosa*. Perbesaran mikroskop 10x100.

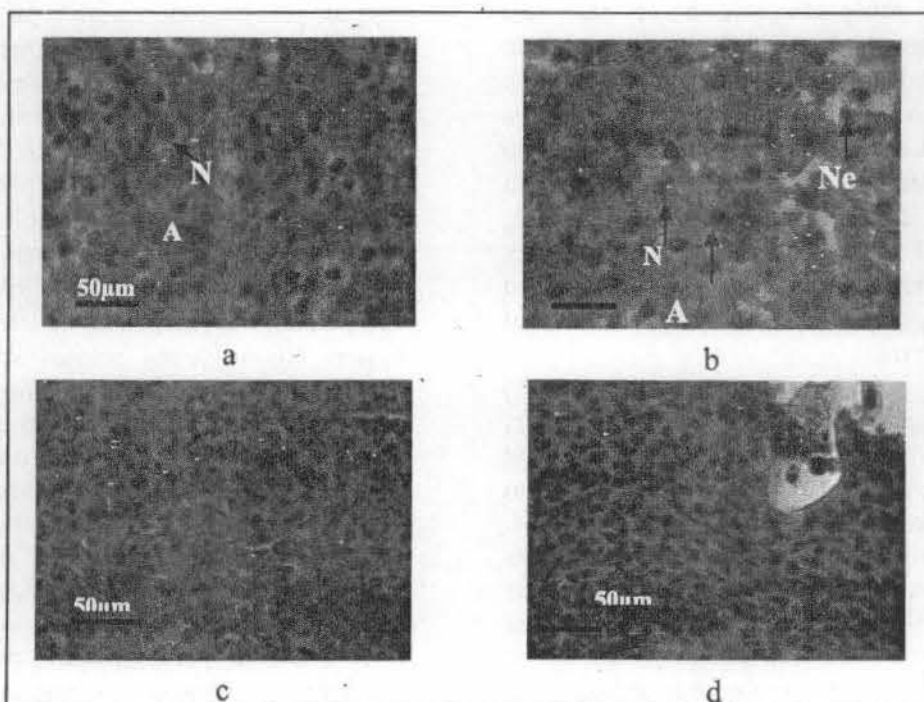


Gambar 2. Pembentukan zona hambat *M. aeruginosa* oleh isolat (a) NU-4 (b) NU-8.



Gambar 3. Kurva pertumbuhan isolat (a) NU-4 dan (b) NU-8 pada media Nutrient Broth.

A



Gambar 4. Sayatan hati ikan mas dengan pewarnaan H & E. (a) kontrol, (b) yang disuntik sel *M. aeruginosa*, (c) yang disuntik *M. aeruginosa* dan bakteri NU-4, dan (d) yang disuntik bakteri NU-4. Perbesaran 10x100. Keterangan: N (normal), A (apoptosis), Ne (nekrosis).

Perubahan histologik pada usus ditandai dengan sel nekrosis (nukleus piknotik) pada epitel usus (Gambar 5B). Disosiasi lamela terjadi pada usus ikan yang disuntik dengan *M. aeruginosa*, yang disuntik dengan *M. aeruginosa* dan bakteri NU-4, dan yang disuntik bakteri NU-4, sedangkan pada usus ikan kontrol tidak ditemukan.

Sianobakteri merupakan prokariot fotosintetik dan memiliki klorofil *a* yang berperan sebagai fitoplankton dalam perairan tawar maupun perairan laut. Isolat *Microcystis aeruginosa* BT-02 yang diisolasi dari danau Swan, Michigan, USA dapat ditumbuhkan dalam skala laboratorium pada media BG-11 yang mengandung mineral dan elemen mikro. Cahaya dengan intensitas 1.000 lux terus-menerus dipancarkan selama 24 jam pada tempat penyimpanan, sehingga pertumbuhan menjadi cepat. *Microcystis* tumbuh optimal pada intensitas cahaya < 3.600 lux ditandai pertumbuhan kultur yang berwarna hijau mencapai 28 hari. Peningkatan intensitas cahaya akan menyebabkan perubahan warna koloni yaitu menjadi kuning dan jingga. Peremajaan dilakukan setelah 21 hari saat koloni memenuhi media dan terjadi perubahan warna dari hijau menjadi hijau kekuningan.

Beberapa jenis sianobakteri, khususnya *M. aeruginosa*, mampu menghasilkan toksin yang termasuk kelompok hepatotoksin yaitu mikrosistin dalam jumlah tinggi (Codd dkk., 1999). Salah satu upaya yang dilakukan untuk mengendalikan pertumbuhan *M. aeruginosa* yaitu penggunaan mikrob antagonis sebagai agen biokontrol.

Hasil penelitian Rachmadi dkk., (2012) yang diujikan kembali menunjukkan dua isolat proteolitik yaitu NU-4 dan NU-8 termasuk genus *Aeromonas* mampu menghambat pertumbuhan *M. aeruginosa*. Isolat NU-4 (*A. caviae*) memiliki indeks penghambatan terbesar yaitu 1,71 sedangkan isolat NU-8 (*Aeromonas* sp.) 1,34 (Tabel 1). Zona bening yang terbentuk menunjukkan sifat bakterisida dan bakteriostatik bakteri proteolitik terhadap *M. aeruginosa*, karena terjadi perubahan warna koloni *M. aeruginosa* dari hijau menjadi kuning dan mati, tetapi mekanisme penghambatan masih belum diketahui.

Pengujian ekstrak kasar enzim protease dari bakteri NU-4 tidak menunjukkan adanya penghambatan, sehingga sel bakteri saja yang mampu menghambat *M. aeruginosa*. Selubung lendir glikokaliks pada dinding sel *M. aeruginosa* bersifat impermeabel terhadap enzim pencernaan pada ikan, sehingga ekstrak enzim protease tidak menghambat pertumbuhan sel *M. aeruginosa*. Penguraian mikrosistin oleh enzim protease alkalin yang berasal dari *Pseudomonas aeruginosa* telah dilaporkan oleh Takenaka dan Watanabe (1997), isolat tersebut menghasilkan piokelin, fikosianin, dan protease alkalin yang bersifat patogenik, sedangkan enzim protease kasar yang dihasilkan bakteri NU-4 dan NU-8 merupakan protease logam (Mubarik dkk., 2006).

Aeromonas merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang, motil, aerob fakultatif, dan positif oksidase (Holt dkk., 1994). Beberapa jenis seperti *Aeromonas hydrophila* HG1, *A. caviae* HG4, dan *A. veronii* biovar *sobria* HG8/10 merupakan patogen dalam gastrointestinal manusia (Kirov dkk., 2002). *A. hydrophila* dan *A. salmonicida* bersifat patogen oportunistik yang menyerang ikan air tawar, termasuk *Cyprinus* sp. dan lele yang ditandai dengan pendarahan lokal pada insang dan luka eksternal seperti luka bercak merah pada permukaan tubuh. Tidak semua galur yang diperoleh bersifat patogen. Faktor virulensi terutama ditentukan oleh endotoksin dan eksotoksin. Dua eksotoksin utama yaitu hemolisin dan enzim proteolitik (Rachmadi dkk., 2012). Penghambatan *M. aeruginosa* oleh bakteri NU-4 karena sekresi senyawa yang dapat menghancurkan dinding sel *M. aeruginosa* yang menyebabkan kematian sel atau kerusakan eksotoksin yang dihasilkannya.

Pemberian dosis sel *M. aeruginosa* 1 mL/ekor (10^8 sel/mL) menyebabkan beberapa perubahan histologik pada hati dan usus ikan mas. Perubahan ini ditandai dengan adanya sel hati yang mengalami nekrosis dan apoptosis, serta disosiasi (perenggangan) parenkim hati. Nekrosis merupakan kematian sel yang disebabkan oleh faktor luar yang ditandai dengan pembengkakan dan pelisisan membran sel, sedangkan apoptosis merupakan kematian sel yang diregulasi sel itu sendiri ditandai dengan penggumpalan kromatin, dan tidak

terjadi lisis sel (ukuran sel tetap). Ikan mas kontrol menunjukkan histologi hati yang normal yaitu sel hati dengan sitoplasma, nukleus, dan nukleolus yang jelas, serta tidak terjadi disosiasi parenkim hati. Fischer dan Dietrich (2000) melaporkan bahwa mikrosistin dapat menyebabkan perubahan histologi pada hepatopankreas dan ginjal ikan mas, meskipun tidak menyebabkan kematian ikan. Pengamatan ultrastruktural sel hati menunjukkan adanya vakuolisasi pada sistem endomembran sel hati yang menyebabkan nekrosis sel hati (Li dkk., 2004).

Lisis sel *M. aeruginosa* pada usus ikan setelah digesti melepaskan toksin mikrosistin intraseluler ke dalam lumen usus ikan, kemudian terjadi reabsorpsi oleh mukosa usus melalui darah dibawa ke dalam sel hati dan menghambat aktivitas serin/treonin protein fosfatase 1 dan 2A (Vasconcelos, 2001). Penghambatan ini mengganggu keseimbangan fosforilasi seluler dan menyebabkan hiperfosforilasi beberapa fungsi protein yang mendorong apoptosis dan nekrosis sel hati.

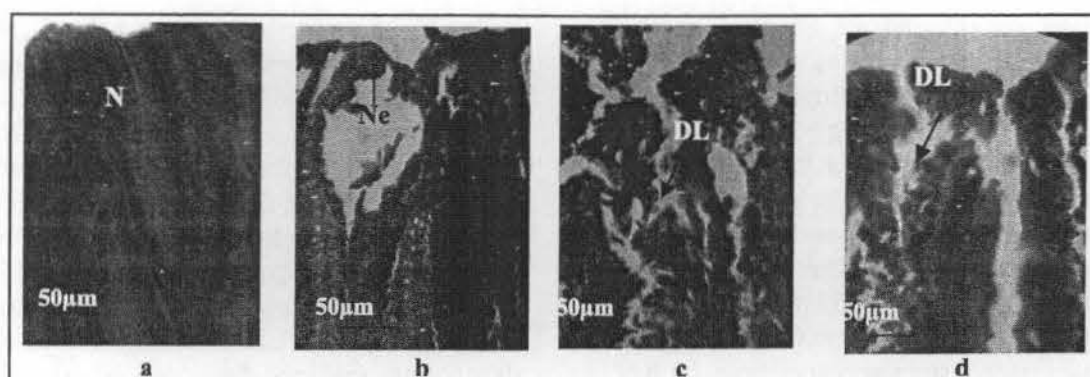
Pengamatan histologi hati ikan dengan penyuntikan *M. aeruginosa* dan NU-4 menunjukkan parenkim hati yang normal, tidak terjadi disosiasi parenkim, dan sel hati berwarna gelap. Keberadaan bakteri antagonis (NU-4) dalam usus ikan menghambat *M. aeruginosa* dan menguraikan toksin mikrosistin, tidak terjadi reabsorpsi mikrosistin oleh mukosa usus sehingga tidak menyebabkan kerusakan hati. Bakteri proteolitik berperan sebagai probiotik dalam tubuh ikan mas. Mekanisme kerja probiotik, yaitu menekan populasi mikrob melalui kompetisi dengan produksi senyawa antimikrob (antialgae) atau melalui kompetisi nutrisi dan tempat perlekatan di dinding intestinum, mengubah proses metabolisme mikrobial dengan meningkatkan atau menurunkan aktivitas enzim, dan menstimulasi imunitas melalui peningkatan kadar antibodi dan aktivitas makrofag (Niwane dan Selvine, 2009).

Perubahan histologi usus ikan mas akibat pemberian *M. aeruginosa* secara intraperitoneal, terjadi perenggangan lamela usus dan nekrosis sel epitel usus. Sel epitel usus pada ikan kontrol tidak menunjukkan adanya nekrosis. Sayatan usus ikan yang

disuntik *M. aeruginosa* dan bakteri NU-4 menunjukkan disosiasi lamela usus, tetapi hal ini belum dapat diketahui disebabkan oleh bakteri NU-4 (*A. caviae*) atau *M. aeruginosa*. *Microcystis aeruginosa* dapat menyebabkan iritasi pada mukosa usus ikan yang selanjutnya terjadi inflamasi dan peningkatan aktivitas gerak peristaltik usus (Carbis dkk., 1997). Sianobakteri juga mengandung endotoksin (lipopolisakarida) dalam dinding selnya yang dapat menyebabkan diare dan gastroenteritis pada mamalia (Vasconcelos, 2001).

Tidak ada ikan yang mati atau menampakkan gejala klinis akibat toksin selama percobaan, jumlah toksin yang diproduksi *M. aeruginosa* dalam tubuh ikan tidak menyebabkan kematian ikan, tetapi hanya menyebabkan perubahan histologi hati dan usus. Faktor-faktor yang mempengaruhi produksi mikrosistin antara lain suhu, intensitas cahaya, faktor kimia (Lukac dan Aegerter, 1993) dan adanya fenomena pembentukan kuorum dari sekumpulan sel sejenis untuk memproduksi toksin (*quorum sensing*). Dosis mikrosistin yang dapat mematikan ikan mas secara intraperitoneal yaitu 550 µg per kg berat badan setelah 24 jam pemaparan (Tencalla dkk., 1994), sedangkan dengan dosis yang sama secara oral tidak mematikan ikan dan hanya menyebabkan perubahan histologi hati berupa nekrosis (Tencalla dkk., 1994). Pengujian letal dosis sebesar 0,1 mL dan 0,5 mL tidak menyebabkan kematian ikan mas. Perkiraan kadar mikrosistin yang dihasilkan sel *M. aeruginosa* (Rachmadi dkk., 2012) yang disuntikkan pada ikan mas (1 mL/ekor) yaitu sebesar ±133 µg/Kg berat ikan. Dosis ini lebih rendah dari dosis yang dapat mematikan ikan mas secara penyuntikan intraperitoneal (550 µg/kg berat ikan), sehingga pada penelitian ini *M. aeruginosa* tidak mematikan ikan mas, tetapi menyebabkan beberapa perubahan histologi pada hati dan usus ikan mas.

Bioakumulasi mikrosistin pada manusia melalui konsumsi air dan ikan terkontaminasi beresiko mengganggu kesehatan manusia seperti diare dan gastroenteritis. Rekomendasi WHO untuk konsentrasi maksimum mikrosistin pada air minum sebesar 1 mg/L (WHO, 1998) dengan batas toleransi sebesar 0,04 µg/kg berat badan.



Gambar 5. Sayatan usus ikan mas dengan pewarnaan H & E. (a) kontrol, (b) yang disuntik sel *M. aeruginosa*, (c) yang disuntik *M. aeruginosa* dan bakteri NU-4, dan (d) yang disuntik bakteri NU-4. Perbesaran 10 x 100. Keterangan: N (normal), Ne (nekrosis), DL (disosiasi lamela).

Simpulan dan Saran

Simpulan

Bakteri NU-4 dan NU-8 yang termasuk genus *Aeromonas* mampu menghambat pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* BT-02 secara *in vitro*, tetapi mekanisme penghambatan belum diketahui. Zona hambat bakteri NU-4 terhadap *M. aeruginosa* lebih besar daripada NU-8. Toksisitas *Microcystis aeruginosa* pada ikan mas ditandai dengan perubahan histopatologik pada hati berupa nekrosis, apoptosis, disosiasi (perenggangan) parenkim hati, usus ikan mas nekrosis dan disosiasi lamela.

Saran

Analisis mekanisme penghambatan bakteri NU-4 dan NU-8 terhadap *M. aeruginosa* BT-02 perlu dilakukan.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Alan E. Wilson, Ph.D. yang memberikan biakan *Microcystis aeruginosa* BT-02 dalam penelitian ini dan Taruni Sri Prawasti, M.Si. atas saran dan diskusi dalam preparasi mikroteknik.

Daftar Pustaka

Carbis, C.R., Rawlin, G.T., Grant, P., Mitchell, G.F., Anderson, J.W. dan McCauley, I. 1997. A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan,

Australia, and possible implications for fish health. *Journal of Fish Diseases*, 20: 81-91.

Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 445-459.

Codd, G., Bell, S., Kaya, K., Ward, C., Beattie, K. dan Metcalf, J. 1999. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology*, 34: 405-415.

Costa-Pierce, B.A. dan Hadikusumah, H.Y. 1990. Research on cage aquaculture systems in the Saguling reservoir, West Java, Indonesia. Di dalam Costa-Pierce, B.A., Soemarwoto, O., editor. *Reservoir Fisheries and Aquaculture Development for Resettlement in Indonesia*. Manila: ICLARM Tech. Rep. 23. hlm. 18-111. <http://www.wordfishcenter.org/libinfo/pdf/pub%20TR4%2023.pdf>. 03 Januari 2009.

Falconer, I.R. 1993. Mechanism of toxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algae. In: Falconer, I.R. (Eds.). *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. London: Academic Pr. hlm 165-176.

Fischer, W.J. dan Dietrich, D.R. 2000. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164:73-81.

Holt, J.G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. dan Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed ke-9. New York: Williams & Wilkins. hlm 377-425.

Kiernan, J.A. 2001. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. Ed ke-3. London: Arnold. hlm 29-36.

Kirov, S.M., Tassell, B.C., Semmler, A.B.T., O'Donovan, L.A., Rabaab, A.A. dan Shaw, J.G. 2002. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *Journal of Bacteriology*, 184: 547-555.

- Li, X.Y., Chung, I.K., Kim, J.I. dan Lee, J.A. 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon*, 44: 821–827.
- Lukac, M. dan Aegerter, R. 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 31:293–305.
- Mubarik, N.R., Fatimah, I. dan Wahjuningrum, D. 2006. Isolation of proteolytic bacteria from digestive tract of tilapias strain GIFT (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus) Trewavas) and characterization of its extracellular protease. In: Proceeding of symposium enzyme I: industrial and medical prospect; 2006 Feb 6-7, pp. 1-6, Surabaya, Indonesia.
- Nedialkova, D. dan Naidenova, M. 2005. Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. *Journal of Culture Collection*, 4: 29–35.
- Niwane, A.S. dan Selvine, Y. 2009. Probiotic in shrimp aquaculture: avenues and challenge. *Critical Reviews in Microbiology*, 35: 43–66.
- Rachmadi, A.T., Mubarik, N.R. dan Prawasti, T.S. 2012. Screening of proteolytic bacteria isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) in inhibiting the growth of *Microcystis aeruginosa* BT-02. *Journal of International Environmental Application and Science*, 7: 273–277.
- Soemarwoto, O., Roem, C.M., Herawati, T. dan Costa-Pierce, B.A. 1990. Water quality sustainability of Saguling and Cirata reservoirs for development of floating net cage aquaculture. In: Costa-Pierce, B.A., Soemarwoto, O. (Eds.). *Reservoir Fisheries and Aquaculture Development for Resettlement in Indonesia*. Manila: ICLARM Tech. Rep. 23. hlm. 28-121. [terhubung berkala] <http://www.worldfishcenter.org/libinfo/pdf/pub%20TR4%2023.pdf>. 03 Januari 2009.
- Takenaka, S. dan Watanabe, M.F. 1997. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere*, 34: 749–757.
- Tencalla, F.G., Dietrich, D.R. dan Schlatter, C. 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 30: 215–224.
- Vanderploeg, H.A., Liebig, J.R., Carmichael, W.W., Agy, M.A., Johengen, T.H., Fahnenstiel, G.L. dan Nalepa, T.F. 2001. Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic *Microcystis* blooms in Saginaw Bay (Lake Huron) and Lake Eric. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*, 58: 1208–1221.
- Vasconcelos, V. 2001. Cyanobacteria toxins : diversity and ecological effects. *Limnetica*, 20: 45–58.
- [WHO] World Health Organization. 1998. *Antimicrobial Resistance*. Fact sheet No. 194, Geneva. [terhubung berkala] <http://www.who.int/inf-fs/en/fact194.html>. 11 Januari 2009.
- Wahjuningrum, D., Mayasari, L. dan Mubarik, N.R.. Isolasi dan identifikasi bakteri proteolitik patogen dari bagian eksternal ikan nila GIFT *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 8: 169–174.