

IDENTIFIKASI DAN HISTOPATOLOGI *Flavobacterium columnare* PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

IDENTIFICATION AND HISTOPATHOLOGY *Flavobacterium columnare* ON TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

Andi Jumria^{1*}, Novia Christi Prihartini¹, dan Alfiyah¹

¹Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya I

Alamat e-mail: riateza@yahoo.co.id

(Diterima Agustus 2017 /Disetujui September 2017)

ABSTRAK

Flavobacterium columnare telah diisolasi dari tempat budidaya ikan Nila. Secara klinis, infeksi bakteri ini ditandai dengan terjadinya perubahan warna abu-abu keputihan pada beberapa bagian kepala, sekitar mulut, insang, sirip atau badan. Penyakit ini sering berakhir dengan kematian, yang menyebabkan kerugian ekonomi yang besar dalam industri perikanan budidaya. Dari 15 sampel yang diambil, hanya 5 sampel yang menunjukkan klinis yang bersifat kronis. Setelah diuji dengan metode konvensional, hanya 3 sampel yang menunjukkan karakteristik *F.columnare* dengan karakteristik koloni isolat bakteri berwarna kuning kehijauan pucat dengan tepi rizoid, berukuran kecil, berbentuk batang panjang, gram negative dan bersifat motil. Hasil pengujian histopatologi pada organ otot, ginjal sirip dan insang, menunjukkan adanya koloni bakteri yang diduga *F.columnare* pada otot daging dan juga ada beberapa titik nekrosis. Pada ginjal banyak terdapat makrofag dan infiltrasi sel radang, sedangkan pada sirip terlihat adanya kongesti dan sel radang. Kerusakan insang yang ditemukan adalah hiperplasia yang berkembang menjadi fusi, kongesti dan nekrosis.

Kata kunci : Columnaris, *Flavobacterium columnare*, Nila (*Oreochromis niloticus*), histopatologi

ABSTRACT

Flavobacterium columnare has been isolated from the cultivation of tilapia. Clinically, this bacterial infection is characterized by the occurrence of whitish gray changes in some parts of the head, around the mouth, gills, fins or body. The disease often ends in death, which causes great economic losses in the aquaculture industry. Of the 15 samples taken, only 5 samples showed clinical characteristics that were chronic. After tested by conventional method, only 3 samples showed *F.columnare* characteristic with bacterial colonies of pale yellow bacteria isolate with rhizoid edges, small size, long stem, gram negative and motile. The results of histopathologic testing of muscle organs, fins and gills, showed the presence of bacterial colonies suspected of *F. colloid* in muscle and also some necrosis points. In the kidney there are many macrophages and infiltration of inflammatory cells, while on the fins seen the existence of congestion and inflammatory cells. The gill damage found was hyperplasia that developed into fusion, congestion and necrosis.

Keyword: Columnaris disease, *Flavobacterium columnare*, Tilapia (*Oreochromis niloticus*), histopathology

PENDAHULUAN

Ikan Nila merupakan salah satu komoditas perikanan budidaya yang banyak dikembangkan saat ini. Beberapa keunggulan yang dimiliki ikan Nila yaitu toleran terhadap berbagai kondisi lingkungan, memiliki kemampuan tumbuh yang baik serta dapat dibudidayakan di air tawar maupun payau. Namun keberhasilan dalam sistem budidaya ikan biasanya terkait dengan

pengelolaan lingkungan maupun system imun (daya tahan) ikan itu sendiri. Jika kondisi lingkungan kurang menunjang atau daya tahan ikan menurun, maka ikan akan mengalami stres yang dapat menyebabkan turunnya kemampuan dalam melawan serangan penyakit (Afrianto dan Liviawaty, 1992). Irianto dkk. (2006) menyatakan bahwa perubahan yang terjadi antara ikan dan lingkungan sampai batas tertentu, dapat berakibat pada tingginya tingkat stress pada ikan, dan dapat berpotensi terinfeksi bakteri.

Flavobacterium columnare merupakan bakteri penyebab penyakit Columnaris, yang masuk dalam Family Flavobacteriaceae (Bernardet and Bowman, 2006) dan merupakan salah satu penyakit bakteri terpenting dari spesies ikan air tawar (Durborow *et al.*, 1998). Bakteri ini bisa berada di semua lingkungan perairan, yang dapat berpengaruh ke ikan yang ada di alam dan budidaya serta ikan hias di akuarium (Austin and Austin, 1999). Timbul penyakit Columnaris ditandai dengan infeksi eksternal di permukaan tubuh ikan, insang, atau sirip. Jeney dan Jeney (1995) menambahkan, infeksi bakteri ini ditandai dengan terjadinya perubahan warna abu-abu keputihan pada beberapa bagian kepala, sekitar mulut, insang, sirip atau badan. Penyakit ini sering berakhir dengan kematian, yang menyebabkan kerugian ekonomi yang besar dalam industri perikanan budidaya. Penyakit Columnaris, pertama dijelaskan oleh Herbert Spencer Davis pada tahun 1922, bakteri penyebabnya disebut dengan nama yang berbeda diantaranya *Bacillus columnaris*, *Flexibacter columnaris*, *Cytophagacolumnis*, dan terbaru *Flavobacterium columnare*.

Metode yang biasa digunakan dalam mengidentifikasi ikan yang terinfeksi bakteri dengan metode konvensional dengan melihat karakteristik morfologi dan biokimia, yaitu pertumbuhannya aerobik, gram negative, bentuk batang panjang dengan ukuran 4-10 μm dan lebar 0,3 -0,5 μm , ada yang berkapsul atau tidak (tergantung pewarnaan yang digunakan), memproduksi H_2S , tidak dapat mendegradasi *crystalline cellulose*, namun dapat mendegradasi polisakarida asam kompleks jaringan ikat (Bernardet and Bowman, 2006). *F. columnaris* tumbuh pada media bernutrien rendah, dengan koloni berwarna kuning dengan tepi rhizoid yang tidak beraturan. Tumbuh optimum pada suhu 20-25°C, namun dilaporkan *F. columnaris* dapat tumbuh pada suhu antara 4 dan 37°C. Bakteri ini bersifat non-halophilic dan tumbuh hanya di bawah kondisi aerobik. *F. columnare* menghasilkan sitokrom oksidase dan katalase positif; tidak menghasilkan asam dari karbohidrat; mengurangi nitrat menjadi nitrit; menghasilkan hidrogen sulfida; tidak menghidrolisis selulosa, kitin, pati, esculin pada, dan; Menghidrolisis agar kasein, dan tirosin; tidak dekarboksilat arginin, lisin, atau ornitin; dan menghasilkan pigmen khusus tipe flexirubin. Reichenbach dan Dworkin (1981) menggunakan metode kalium hidroksida (20%) untuk menunjukkan produksi pigmen *flexirubin*.

Ikan yang terinfeksi bakteri secara tidak langsung menyebabkan terjadinya kerusakan pada jaringan yang dapat berakibat ikan sakit. Perubahan yang terjadi dapat terlihat secara eksternal maupun internal. Menurut Kvitt dan Colorni (2004) gejala klinis maupun lesio patologi akan berbeda-beda untuk setiap spesies pathogen. Hal ini sangat berkaitan dengan kemampuan agen pathogen dalam memproduksi enzim, toksin, dan juga kemampuan dalam mengatasi system imun inang (Russo *et al.*, 2006). Berdasarkan uraian diatas, perlu diketahui perkembangan lesio patologi ikan Nila yang terinfeksi *Flavobacterium columnare*.

Tujuan penelitian adalah untuk mendeteksi adanya bakteri *F. columnare* di ikan Nila dan mempelajari gambaran perubahan patologi jaringan secara mikroskopis ikan Nila yang terinfeksi bakteri *F. columnare*, sebagai upaya untuk mengontrol penyakit ikan di lingkungan budidaya.

MATERI DAN METODE

Ikan Nila yang dijadikan sampel berjumlah 15 ekor dengan ukuran 6-7 cm. Sampel diambil secara acak dari 3 lokasi budidaya yang berbeda di Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur pada bulan Maret 2017. Semua sampel dilakukan pengamatan gejala klinis. Sampel insang, ginjal, otot daging, dan sirip dibagi dua, untuk pengujian bakteri dan histopatologi. Pada pengujian bakteri, selama uji utama dilakukan pengujian adanya *F. columnare* pada jaringan ikan sampel. Jaringan selanjutnya dilakukan isolasi dan dikultur pada media TSA kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh terpisah akan diuji lanjut, baik morfologi maupun biokimianya. Pemeriksaan histopatologi setelah difiksasi dengan NBF 10%, dilakukan dehidrasi menggunakan larutan ethanol secara bertingkat, kemudian di clearing menggunakan xylene dan diembeding menggunakan parafin. Selanjutnya sampel dipotong dengan ketebalan 5 μm dan diwarnai menggunakan *haematoxylin* dan *eosin* (H&E). Metode yang digunakan metode deskriptif.

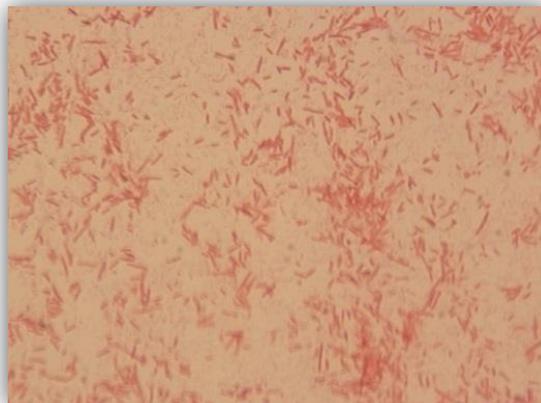
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel Ikan Nila yang digunakan dalam penelitian tidak menunjukkan gejala klinis penyakit columnaris seperti adanya zona kemerahan di area yang terluka (Jeney and Jeney, 1995), namun terdapat perubahan warna abu-abu putih di beberapa bagian badan, insang busuk dan sirip ekor yang geripis. Hal ini dimungkinkan ikan Nila yang diambil masih dalam fase kronis (Gambar 1), ditandai hanya terdapat sedikit area putih pada lengkung insang pertama (panah). Apabila infeksi *F. columnare* telah menyebar dengan cepat di selurung lamella insang, dapat menyebabkan kematian ikan dalam waktu singkat. Menurut Pacha and Ordal (1967), dalam kasus-kasus kronis, diperlukan waktu lebih lama sebelum nampak kerusakan yang parah pada insang dan munculnya lesi pada kulit.



Gambar 1. Ikan Nila yang terinfeksi *F. columnare*, menunjukkan klinis berupa insang busuk, sirip ekor geripis, dan bercak putih keabu-abuan pada kulit.

Penyakit ini umumnya dimulai sebagai infeksi eksternal pada sirip, permukaan tubuh, atau insang. Lesi pada sirip bisa menjadi nekrotik, sedangkan lesi kulit memiliki bahan mucoid kekuning-kuningan. Lesi dapat berkembang secara eksklusif pada insang, yang biasanya mengakibatkan penyakit subakut dan mortalitas. Dalam beberapa kasus, Columnaris menjadi sistemik dengan sedikit atau tidak terlihat tanda patologis. Infeksi *flavobacterium* dapat terjadi menjadi kronis dan menyebabkan berlama-lama, berangsur-angsur berakselerasi Kematian pada saluran ikan patin tapi lebih sering, penyakitnya muncul tiba-tiba dan mempercepat kematian sub akut dalam beberapa hari (Austin dan Austin 1999). Lebih lanjut ditambahkan, umur ikan berpengaruh juga terhadap tingkat keparahan gejala klinis. Pada ikan yang lebih muda, penyakit ini berkembang secara akut dan kebanyakan merusak insang. Sedangkan pada ikan dewasa, penyakit ini dapat mengadopsi akut dan kronis (Bernardet and Bowman, 2006).



Gambar 2. Hasil pewarnaan gram koloni bakteri yang terdeteksi *F. columnaris* dengan pembesaran 100x

Dari 15 sampel yang diambil, hanya 3 sampel yang menunjukkan karakteristik *F. columnare*. Berdasarkan karakteristik hasil identifikasi menggunakan metode konvensional dan morfologi secara mikroskopis, Hasil analisis bakteri yang diambil dari organ insang, bercak abu-abu pada permukaan kulit serta sirip ekor ikan Nila yang diinkubasi selama \pm 48 jam menunjukkan koloni isolat bakteri berwarna kuning kehijauan pucat dengan tepi rizoid, berukuran kecil, dimana isolat

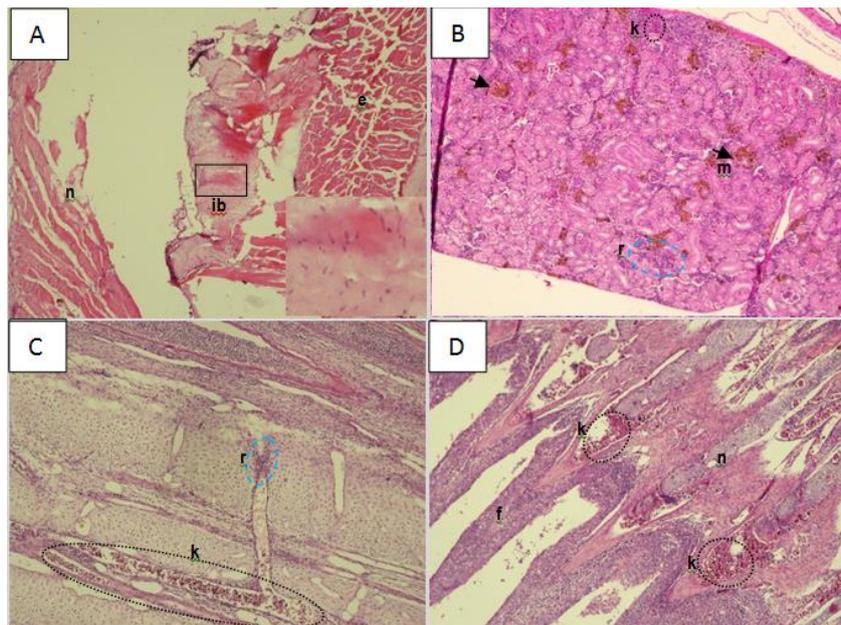
tersebut berbentuk batang panjang (Gambar 2.), gram negative dan bersifat motil (Shamsudin and Plumb, 1996). Selanjutnya, isolat diidentifikasi menggunakan kriteria seperti yang dijelaskan oleh Bernardet dan Grimont (1989). Karakteristik biokimia diberikan dalam Tabel 1, dimana hasil Oxidase, katalase, pigmen *flexirubin*, produksi H₂S, pengurangan nitrat, penyerapan congo red dan hidrolisis tes gelatin dengan hasil positif.

Tabel 1. Karakteristik biokimia dari *Flavobacterium columnare* diisolasi dari ikan Nila.

Karakteristik	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 3	Acuan
Motilitas	+	+	+	+
koloni berpigmen kuning pucat	+	+	+	+
L tryptophane	+	+	+	+
glukosa fermentasi	+	+	+	+
Rafinosa	-	-	-	-
pemanfaatan sitrat	+	+	+	+
sitokrom oksidase	+	+	+	+
Flexirubin-jenis pigmen	+	+	+	+
tes Congo Red	+	+	+	+
DNA	+	+	+	+
reduksi nitrat	+	+	+	+
produksi H ₂ S	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+
produksi indole	-	-	-	-
lisin dekarboksilase	-	-	-	-
dekarboksilase ornithine	-	-	-	-
hidrolisis pati	-	-	-	-
kasein hidrolisis	+	+	+	+
gelatin hidrolisis	+	+	+	+
urea hidrolisis	+	+	+	+

(+) Positif; (-) negatif

Hasil identifikasi uji Biokimia pada tabel diatas menurut Bernardet dan Grimont (1989). Sejalan dengan lima langkah identifikasi menurut Durborow (1998), yaitu: kemampuan tumbuh pada medium mengandung neomycin dan polymyxin B; Produksi pigmen kuning koloni rhizoid (mirip dengan akar); Dapat mendegradasi enzim *gelatinase*, Koloni dapat mengikat warna merah menggunakan Congo-red, produksi chondroitinenzim pereduksi sulfat. Selain itu juga hasil morfologi dan karakteristik biokimia strain terisolasi dari sampel ikan Nila diidentifikasi sebagai *Flavobacterium columnaris* semuanya sama, menurut Holt dkk. (1994), Decostere *et al.*, (1997), Plumb (1999), Austin dan Astin (1999) dan Thomas-Jinu dan Goodwin (2004a).



Gambar 3. Gambaran histopatologi ikan nila yang terinfeksi *F. columnare* pada otot (A), ginjal (B), sirip ekor (C), dan insang (D). n= nekrosis, ib= investasi bakteri, k= kongesti, m= makrofag, f= fusi, r= radang. Pewarnaan HE, perbesaran 100x. Inset, perbesaran 400x.

F. columnare merupakan bakteri yang dapat muncul pada saat kondisi ikan stress dan menyebabkan penyakit columnaris pada ikan. Kondisi stress ini dapat diakibatkan karena menurunnya kadar oksigen, meningkatnya kadar karbondioksida, kadar ammonia maupun kadar nitrit dalam airserta perubahan suhu air yang ekstrem. Penanganan ikan yang salah juga menjadi penyebab ikan stress yang mengakibatkan luka pada tubuh ikan sebagai salah satu pemicu tersebarnya penyakit melalui gesekan yang dapat menyebabkan tingkat kematian yang tinggi. (Durborow, 1998). Sehingga dapat disimpulkan bahwa sampel ikan Nila yang berukuran 6 - 7 cm yang berasal dari Pasuruan positif terdeteksi *F. columnaris*.

Hasil pengamatan histopatologi otot ikan Nila yang terinfeksi *F. columnare* ditemukan beberapa titik nekrosis dan juga terlihat investasi bakteri yang diduga adalah koloni *F. columnare* yang berbentuk batang panjang (inset gambar 3A). Hal ini sesuai yang diungkapkan Ferguson (2006), bahwa sel-sel bakteri yang khas panjang dan ramping dapat mudah dikenali dengan penampakan warna biru keunguan dengan pewarnaan *Hematoxylin* dan *Eosin* atau Giemsa. Lebih lanjut dijelaskan, ketika perubahan ini terjadi dengan cepat, dapat menyebabkan nekrosis parah dan menyebabkan pengelupasan epidermis. Kerusakan sisik atau kulit meskipun tidak banyak, dapat membantu proses invasi inang oleh patogen.

Pada organ ginjal banyak ditemukan makrofag dan infiltrasi sel radang (Gambar 3B). Adanya makrofag dan sel radang mengindikasikan telah terjadinya proses infeksi di organ. Menurut Munasir (2001), salah satu mekanisme awal pertahanan seluler yang berupa peradangan akibat adanya infeksi bakteri yaitu mekanisme fagositosis oleh makrofag. Organ sirip menunjukkan telah terjadi kongesti dan infiltrasi sel radang (Gambar 3C). Menurut Dalsgaard (1993), kulit, insang atau sirip perlu mengalami erosi/terkelupas, supaya bakteri dapat masuk ke aliran darah dan menyebabkan infeksi sistemik pada ikan.

Kerusakan jaringan berupa hiperplasia yang berkembang ke fusi, kongesti dan nekrosis ditemukan pada lamela insang (Gambar 3D). Foscarini (1989) menjelaskan bahwa perubahan patologis pada struktur insang yang disebabkan oleh penyakit Columnaris berhubungan dengan jantung, dimana setelah terjadi infeksi hari pertama akan terbentuk lesi hiperplasia insang dan selanjutnya akan terjadi proses degeneratif pada lamela yang berakibat terjadinya kerusakan di jantung. Selain itu fusi (*clubbing*) pada setiap lamela insang akhirnya dapat menyebabkan kegagalan sirkulasi dan pendarahan yang ekstensif, sehingga apabila proses ini terus berkelanjutan dapat menyebabkan kematian ikan.

KESIMPULAN

Pemeriksaan penyakit Columnaris yang menginfeksi ikan Nila dengan menggunakan metode konvensional dan histopatologi telah dilakukan. Tiga dari lima belas sampel ikan Nila yang diuji bakterinya menunjukkan hasil positif teridentifikasi *F. columnare*. Hasil histopatologi terhadap jaringan otot, ginjal, sirip dan insang ikan Nila yang terinfeksi menunjukkan telah terjadi kerusakan dimasing-masing organ meskipun belum terlalu parah. Tindakan pencegahan dan kontroling di lingkungan budidaya perlu dilakukan untuk menghindari meluasnya penyakit Columnaris ke tempat budidaya lainnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih Kepala dan Staf Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya I, yang telah membantu dan menyediakan fasilitasnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E dan E. Liviawaty. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Kanisius. Yogyakarta. Hal 20-21.
- Austin B. and Austin D. A. 1999. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*, Heriot-Watt University, Edinburgh, UK.
- Eissa, A.E., Zaki M.M and Aziz, A.A.' 2010. *Flavobacterium columnare/Myxobolus tilapiae* Concurrent Infection in the Earthen Pond Reared Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) during the Early Summer. *Interdisc.Bio.Centr*, 2 (5) : 1-10.

- Bernardet J.F, Bowman J.P: The genus *Flavobacterium*. 2006. In *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Volume 7: Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria*. Edited by Dworkin M, Falkow S. New York: Springer Science+Business Media, LLC. p.481–531.
- Bernardet, J.F. and Grimont, PAD., 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. ver., and *Flexibacter maritimus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 (3): 346-354.
- Dalsgaard I. 1993. Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish. *Ann Rev Fish Dis* 3:127–144.
- Decostere, A., Haesebrouck, F. and Devriese, L.A. 1997. Shieh Medium Supplemented with Tobramycin for Selective Isolation of *Flavobacterium columnare*(*Flexibacter columnaris*) from Diseased Fish. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 322-324.
- Decostere A, Haesebrouck F, Devriese LA. 1998. Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish. *Vet Microbiol.* 62:35–45.
- Decostere A. 2002. *Flavobacterium columnare* infections in fish: the agent and its adhesion to the gill tissue. *Verhandelingen - KAGB* 64:421–430.
- Durborow, R. M., Thune R. L., Hawke J. P., and Camus A. C. 1998. Columnaris disease: a bacterial infection caused by *Flavobacterium columnare*. Publication 479, Aquaculture Center, Stoneville, Mich, USA.
- Ferguson ,H.W. 2006. *Systemic Pathology of Fish*. 2nd edition. London: Scottian Press.
- Foscarini R. 1989. Induction and development of bacterial gill disease in the eel (*Anguilla japonica*) experimentally infected with *Flexibacter columnaris*: pathological changes in the gill vascular structure and in cardiac performance. *Aquaculture* 78:1–20.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, 787 pp.
- Irianto, A. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta. 243 hal.
- Jeney, Z. and Jeney, G., 1995. Recent achievements in studies on diseases of Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 129 (1-4): 397-420.
- Munasir, Z. 2001. Respon Imun terhadap Infeksi Bakteri. Tinjauan Pustaka. *Jurnal Sari Pediatri* Vol. 2 (4): 193-197.
- Pacha R.E, Ordal E.J. 1967. Histopathology of experimental columnaris disease in young salmon. *J Comp Path.* 77:419–423.
- Plumb, J. 1999. *Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes*. Iowa State University, Iowa, 328 pp.
- Shamsudin, MN. and Plumb, JA., 1996. Morphological, biochemical and physiological characterization of *Flexibacter columnaris* isolates from four species of fish. *J. Aquat. Anim. Health*, 8 (4): 335-339.
- Thomas-Jinu, S. and Goodwin, A.E. 2004. Morphological and genetic characteristics of *Flavobacterium columnare* isolates: correlations with virulence in fish. *Journal of Fish Disease*, 27: 29-35.