

ISOLASI, KARAKTERISASI *Aeromonas hydrophila* DAN DETEKSI GEN PENYEBAB PENYAKIT MOTILE AEROMONAS SEPTICEMIA (MAS) DENGAN 16S rRNA DAN AEROLYSIN PADA IKAN LELE (*Clarias* sp.)

Muslikha¹, Sri Pujiyanto¹, Siti Nur Jannah¹, Hesy Novita²

¹Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang

²Instalasi Penelitian Pengembangan dan Pengendalian Penyakit Ikan, Depok

email : muslikhaabbas@gmail.com

Abstrak- *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri Gram negatif yang banyak ditemukan di perairan dan dapat menyerang ikan. Selain itu, *A. hydrophila* menyebabkan penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) yang menyerang beberapa organ dalam seperti hati, limpa dan ginjal. Isolat bakteri diisolasi dari ikan lele (*Clarias* sp.) yang berasal dari berbagai daerah seperti, Ciganjur, Sukamandi dan Citayam. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, karakterisasi dan deteksi gen patogen bakteri *A. hydrophila* penyebab penyakit MAS pada ikan lele. Beberapa pengujian yang dilakukan pada penelitian ini yaitu uji biokimia (pewarnaan Gram, uji oksidatif-fermentatif, uji katalase, uji oksidase, uji d-mannitol, uji TSA skim milk, uji Mac Conkey, dan uji novobiosin), uji deteksi gen patogen dilakukan secara molekuler dengan menggunakan primer 16S rRNA dan *aerolysin*. Berdasarkan hasil pengujian biokimia, *A. hydrophila* merupakan Gram negatif dengan sel berbentuk basil pendek, bersifat motil, positif menghasilkan enzim oksidase, enzim katalase dan positif oksidatif dan fermentatif, positif fermentasi laktosa. Hasil deteksi gen patogen menunjukkan isolat AH2 dan B9 memiliki gen faktor virulen yaitu, *aerolysin*. Isolat AH2 dan B9 menghasilkan gen *aerolysin* kembali pada deteksi gen hasil reisolasi dari postulat Koch.

Kata kunci : Ikan Lele (*Clarias* sp.), *Aeromonas hydrophila*, Gen Faktor Virulen, *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS).

Abstract- *Aeromonas hydrophila* is a Gram-negative bacterium that is commonly found in water and can attack the fish. In addition, *A. hydrophila* causes disease *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) that attacks multiple organs such as the liver, spleen and kidneys. Bacterial isolates isolated from catfish (*Clarias* sp.) originating from various regions such as Ciganjur, Sukamandi and Citayam. This study aims to isolate, characterize and detection of pathogenic bacteria *A. hydrophila* gene causes disease in catfish MAS. Some of the tests performed in this study that biochemical test (Gram stain, test the oxidative-fermentative, catalase test, test oxidase, test d-mannitol, test TSA skim milk, test Mac Conkey, and test novobiocin), test detection of genes of pathogens carried molecular using a primer 16S rRNA gene and *aerolysin*. Based on the results of biochemical testing, *A. hydrophila* Gram-negative short bacillus cell shaped, motile, produces oxidase positive, catalase enzymes, oxidative, fermentative positive, and positive lactose fermentation. Results of detection of pathogen genes showed isolates AH2 and B9 gene virulence factors, namely, *aerolysin*. Isolates AH2 and B9 produced *aerolysin* genes back on the detection of the gene results reisolasi of Koch's postulates

Keywords: Catfish (*Clarias* sp.), *Aeromonas hydrophila*, Gen virulent factor, *Motile Aeromonas Septicemia*.

PENDAHULUAN

Ikan lele (*Clarias* sp.) merupakan salah satu ikan air tawar yang paling banyak dibudidayakan dan menduduki urutan ketiga setelah ikan mas dan ikan nila (Kordi, 2010). Hal ini tentu memerlukan manajemen yang baik untuk

menghasilkan komoditas yang berkualitas. Salah satu kendala dalam menghasilkan komoditas yang berkualitas adalah penyakit yang berimplikasi negative terhadap produktifitas hasil budidaya. Munculnya penyakit disebabkan oleh interaksi yang tidak serasi antara inang, pathogen dan

lingkungan (Afrianto dan Liviawaty, 1992). Salah satu jenis penyakit yang sering dijumpai pada budidaya baik pembenihan maupun pembesaran adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Sebagian besar bakteri patogen, seperti *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Edwardsiella ictaluri*, *Streptococcus*, *Pasteurella*, *Yersinia ruckeri*, dan *Cytophaga* adalah bakteri Gram negatif. Bakteri ini menyebabkan penyakit bakterial, seperti *ulcers*, busuk sirip, *acute septicemia* (Afrianto *et al.*, 2015). *Aeromonas hydrophila* adalah bakteri oportunistik, Gram negatif, dapat menyebabkan kematian ikan dalam waktu yang sangat singkat hingga mencapai 80-100 % (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012). Bakteri ini merupakan patogen, baik pada manusia atau hewan khususnya ikan (Manik *et al.*, 2014). *Aeromonas hydrophila* dikenal juga sebagai bakteri oportunistik dan patogen serius pada ikan lele (Sarkar and Rashid, 2012) Beberapa bakteri golongan Gram negative tidak mengeluarkan cairan racun, tetapi membuat endotoksin yang dilepaskan apabila sel mati atau pecah. Endotoksin merupakan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri. Bakteri juga menghasilkan enzim ekstraseluler yang dapat menyerang ikan sehat (Afrianto *et al.*, 2015). Isolasi dan karakterisasi bakteri *A. hydrophila* perlu dilakukan untuk mengetahui karakteristik bakteri *A. hydrophila* penyebab penyakit MAS pada ikan lele. Deteksi gen patogen diteliti dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penelitian ini bertujuan untuk isolasi, karakterisasi dan deteksi gen patogen bakteri *A. hydrophila* yang menyebabkan penyakit MAS pada ikan lele. Primer yang digunakan yaitu *16S rRNA* dan *aerolysin*.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Mikrobiologi Molekuler Laboratorium Kesehatan Instansi Penelitian Pengembangan dan Pengendalian Penyakit Ikan

(IP4I), Depok. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2016.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri, pisau bedah, *cutter*, gunting, pinset, tabung reaksi, Erlenmeyer 500 mL, 100 mL, 200 mL, rak tabung, inkubator, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), jarum ose, penangas air, gelas beker, gelas ukur, pipet tetes, vortex, *blue tips*, *yellow tips*, *white tips* penggaris, bunsen, mikropipet, mikroskop olympus, eppendorf, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Bio-Red), elektroforator (Thermo Scientific), gel documentation (Uvitech), nanodrop 2000, *cutter*, batang pangaduk, sendok, ose L, timbangan analitik, centrifuge, freezer, micro centrifuge (Lab Gene Scanspeed 1730r), *spindown*, *thermo mixer*, tabung eppendorf kecil, ukuran 1,5 mL, bak kontainer, jaring, syring 1 mL, aerator.

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu ikan lele (lihat Tabel 1), sampel isolat *A. hydrophila* (AH1, AH2, AH3 dan AH4) dari Balai (IP4I) Depok, akuades, *Tryptic Soy Agar* (TSA), *paper disc* 8 mm (Advantec), *crystal violet* 3% H₂O₂, glukosa, *bacto-agar*, fenol red, ddH₂O, 23 kaca objek, gelas penutup, parafin, lugoliodin, kertas saring, peptone, NaCl, K₂HPO₄, bromtimol biru, *aqua solution*, *Sulphied Indole Motility* (SIM), ethanol, *ammonium oxalate*, *skim milk*, D-mannitol, kapas. Primer Nucleus-F,R, Aerolysin-F,R, Serin protease-F, R, dan Lipase-F,R, agarosa 1,5 %, safranin, alkohol, kapas, spirtus, tisu, aluminium foil, buffer TAE 1x, mastermix *Thermo scientific*, nuclease-free water 1,25 mL, *ladder marker* 1 kb, 100 bp, Etidium bromida (ETBR), *Milky water*, ikan Lele 80ekor.

Cara Kerja

1. Isolasi Bakteri *Aeromonas hydrophila* dari ikan lele

Sampel ikan lele diambil dari beberapa daerah (Tabel. 1). Isolasi bakteri dilakukan untuk mendapatkan isolate bakteri yang mengarah pada ciri-ciri *A. hydrophila*.

Tabel 1. Jumlah dan sumber sampel Ikan Lele

No.	Sumber Ikan Sampel	Jumlah yang diperiksa
1	Petani Ikan Subang	4 ekor
2	BBI Ciganjur	4 ekor
3	Petani Ikan Bogor	4 ekor

2. Uji Biokimia

Beberapa uji biokimia diujikan untuk mengkarakterisasi bakteri dan mendapatkan spesies *A. hydrophila*. Pengujian tersebut antara lain perwarnaan Gram, oksidatif-fermentatif (O/F), motilitas, D-mannitol, oksidase, katalase, media selektif *mac conkey*, TSA *skim milk*, sensitifitas terhadap antibiotic novobiosin, dan menghitung koloni bakteri dengan *total plate count* (TPC).

3. Deteksi Gen Penyebab Penyakit MAS

Isolasi DNA

Beberapa koloni bakteri diambil dan disimpan dalam mikrotube 1 mL yang berisi ddH₂O. Pelet disuspensi dengan 400 µL *RNAse free water* dan dipanaskan pada suhu 98 °C selama 10 menit dalam *thermomixer* sambil sesekali diaduk menggunakan *mini mixer* (vortex). DNA bakteri diperoleh dengan sentrifugasi pada 8.000 xg selama 10 menit dan supernata berisi DNA dipindahkan sebanyak 200 µL kedalam mikrotube baru dan disimpan pada suhu -20 °C sampai akan digunakan sebagai template DNA (Supriyadi, Gardenia, 2010).

Amplifikasi

Primer yang digunakan adalah dua set primer (*aero* dan *16S rDNA*). Sampel yang digunakan berjumlah 10 dan kontrol negatif 1. Masing-masing primer yang sudah dicampurkan forward dan reverse sebanyak 22 µl, mastermix *thermo scientific* sebanyak 137,5 µl dan nuclelease-free water 93,5 µl dimasukkan dalam mikrotube. Campuran dari mastermix tersebut dimasukkan dalam tabung eppendorf kecil masing-masing sebanyak 23 µl dan DNA template 2 µl (Nam, Joh, 2007). Program PCR untuk amplifikasi DNA sebagai berikut: denaturasi awal suhu 94 °C selama 2 menit, kemudian dilakukan denaturasi 94

°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 56 °C selama 30 detik dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 45 detik, selama 30 siklus, ekstensi akhir 72 °C selama 5 menit suhu akhir 4 °C.

Elektroforesis

Hasil PCR dari berbagai perlakuan dielektroforesis pada gel agarose 1,5 % agarose (1,5 g dilarutkan kedalam TAE buffer 1x 100 ml) dididihkan di *microwave*, setelah hangat agarose. Agaros kemudian dituangkan kedalam cetakan elektroforesis yang telah dipasang *comb*. Setelah agarose mengeras, 10 µl produk PCR dimasukkan kesumur 2, 3, 4 dan seterusnya. Sumur pertama diisi dengan 0,5 µl penanda molekuler (marker) 1 kb untuk primer 16S rDNA *Aeromonas* spp. dan 100 bp untuk primer spesifik. Elektroforesis dijalankan dengan voltase 110 volt selama 17 menit. Setelah itu gel diangkat diamati di atas uv transilluminator, kemudian didokumentasikan.

4. Postulat Koch

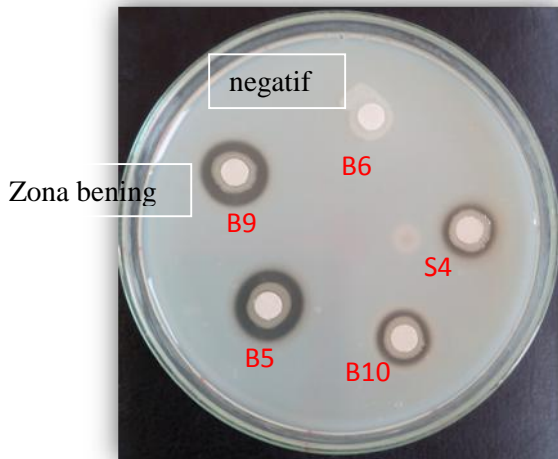
Uji postulat *Koch* bertujuan untuk melihat sifat patogenitas terhadap ikan. Uji dilakukan dengan menggunakan sampel yang terdeteksi memiliki gen *aerolysin*. Sampel tersebut yaitu sampel isolat AH2 yang berasal dari balai dan isolate B9 dari ikan lele. Isolat yang telah diinkubasi selama 24 jam dalam media TSB diinjeksikan sebanyak 0,1 mL pada ikan lele 10 ekor tiap bak dan 3x pengulangan serta 1 bak sebagai kontrol, kemudian diamati perkembangannya setiap 6 jam sehingga 4x pengamatan dalam 24 jam. Ikan yang mengalami perubahan baik fisik dan gerak, dilakukan pengambilan organ hati, limpa, ginjal untuk diisolasi dan identifikasi molekuler.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Bakteri

Isolasi bakteri dari ikan lele menghasilkan 20 isolat. 12 isolat diantaranya memiliki ciri morfologi koloni berwarna krem, sirkular, cembung dan termasuk Gram negatif. Menurut Wahjuningrum, *et al*, (2013) bahwa morfologi koloni dari *A. hydrophila* yaitu berwarna krem, elevasi cembung, dan tepiannya halus, sedangkan morfologi selnya berbentuk batang dan bersifat

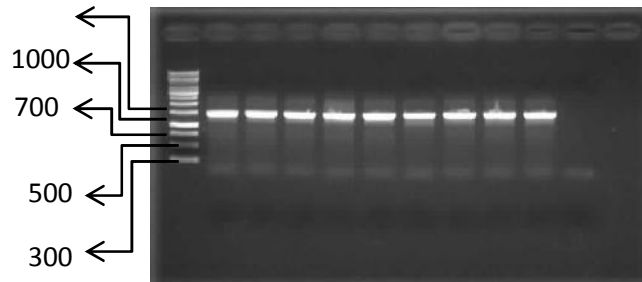
Gram negatif. Uji biokimia menghasilkan lima isolat *Aeromonas hydrophila* dengan ciri menghasilkan enzim katalase, oksidatif, fermentatif, fermentasi laktosa, motil dan positif D-mannitol. Lima isolat resisten terhadap antibiotik novobiosin 30 µg. Menurut Andrea & Josh (2006) dalam penelitiannya sampel ATCC7966 *A. hydrophila* menunjukkan resisten terhadap antibiotik novobiosin 30 µg. *A. hydrophila* mempunyai enzim protease yang dibuktikan dengan adanya zona bening pada media TSA skim milk (Gambar 1.1).



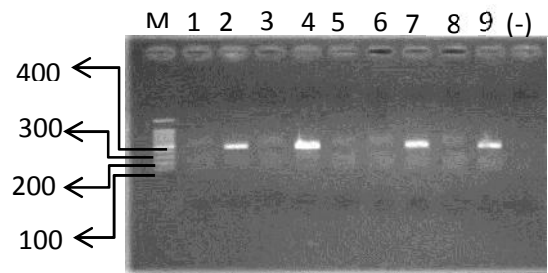
Gambar 1.1 Aktifitas protease dar bakteri *A. hydrophila* pada media TSA skim milk 24 jam.

Deteksi Gen *A. hydrophila*

Lima isolat terpilih dilakukan deteksi gen penyebab penyakit MAS ditambah dengan isolat AH1, AH2, AH3, dan AH4 dari Balai IP4I Depok. Deteksi gen *16S rRNA* membuktikan semua isolat tersebut *Aeromonas* (Gambar 1.2). Empat isolat terdeteksi memiliki gen tanda virulen yaitu gen *aerolysin* (417 bp).



Gambar 1.2 Visualisasi hasil amplifikasi gen *16S rDNA* M=marker promega 1 kb, 1.J3, 2. B5 3.B10 4.B9, 5.S4, 6.AH1, 7.AH2, 8. AH3, 9.AH4 10. Negatif kontrol (-).



Gambar 1.3. Visualisasi hasil amplifikasi gen *aerolysin* (*aer*) 417 bp M=marker promega 100 bp, 1.J3, 2. B5, 3.B10 4.B9, 5.S4, 6. AH1, 7. AH2, 8. AH3, 9. AH4 10. Negatif kontrol.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 (-)

Bakteri *Aeromonas hydrophila* mengandung eksoenzim yang dikode oleh gen *lipase*, *nuclease*, dan *serin protease* serta mengandung eksotoksin berupa *aerolysin*. Menurut In-young Nam & Kiseong Joh (2007), menyatakan bahwa spesies *A. hydrophila* memiliki empat gen virulen yaitu *nuclease*, *aerolysin*, *serin protease* dan *lipase*. *A. hydrophila* teridentifikasi memiliki gen haemolysin dan aerolysin (Aldeen *et al.*, 2014).

Postulat Koch

Uji *postulat Koch* dilakukan untuk melihat patogenitas bakteri pada ikan lele. Uji ini dilakukan dengan menyiapkan ikan lele sehat sebanyak 80 ekor dengan ukuran 8-9 cm. Contoh

isolat yang digunakan untuk uji yaitu AH2 dan B9. Bakteri kultur 24 jam dalam *Tryptic Soy Broth* (TSB) diinjeksikan pada bagian sirip punggung ikan sebanyak 0,1 mL. Pengamatan dilakukan setiap 6 jam sekali selama 24 jam (Tabel 2). Berdasarkan hasil pengamatan, pada 6 jam pertama, kondisi ikan mulai terlihat lambat dalam bergerak, warna kulit disekitar bekas injeksi berubah warna menjadi keputihan (Gambar 1.7).

Pada bekas luka injeksi berubah menjadi borok, perut mengembung dan warna kulit memudar dari berwarna abu menjadi pucat. Hal ini sesuai dengan pernyataan Swann dan White (1984), Ikan yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila* memiliki banyak gejala yang berbeda. Ini berkisar dari kematian mendadak pada ikan sehat kurangnya nafsu makan, berenang kelainan, insang pucat, kembang penampilan, dan kulit ulserasi. Borok kulit bisa terjadi di bagian manapun pada ikan dan sering dikelilingi oleh jaringan merah. Organ lain yang sering terkena penyakit ini yaitu insang, ginjal, hati, limpa, pankreas, dan skeletal otot.

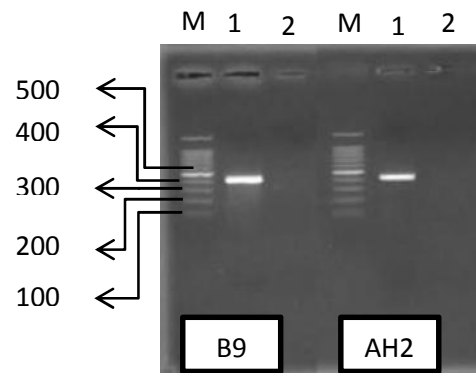
Tabel 4.7 Gejala penyakit MAS setelah diinjeksi dengan *A. hydrophila*

No.	Jam ke-	B9	AH2
1	6	gerak lambat bekas luka merah, perut kembang	gerak lambat bekas luka merah dan perubahan warna pada kulit, perut kembang kulit berubah putih, luka menjadi borok, kematian
2	12	luka berubah warna pucat dan lebar	luka berubah menjadi borok
3	18	luka berubah menjadi borok	
4	24	dan kulit pucat	kematian



Gambar 1.7 Ikan terinfeksi *Aeromonas hydrophila* pada bekas injeksi.

Ikan yang mengalami gejala dilakukan reisolasi kembali yang bertujuan untuk mengkonfirmasi bakteri yang diinjeksikan. Isolasi dilakukan dengan metode gores pada organ hati, limpa dan ginjal. Berdasarkan hasil isolasi, diketahui isolat memiliki warna koloni, bentuk morfologi sel sama dengan ciri-ciri *Aeromonas hydrophila*. Hasil reisolasi kemudian dilakukan deteksi gen secara molekuler dengan menggunakan primer *aerolysin* (Gambar 1.8).



Gambar 1.8. Visualisasi hasil amplifikasi DNA isolat reisolasi sampel B9 dan AH2 M=marker promega 100 bp, 1. *gen aerolysin (aer)* 417 bp 2. Negatif kontrol.

Deteksi gen penyebab penyakit MAS pada isolat hasil reisolasi menghasilkan gen yang muncul sama pada isolat bakteri *A. hydrophila* yaitu *gen aerolysin*.

SIMPULAN

Isolasi bakteri dari ikan Lele diperoleh empat isolat merupakan *Aeromonas hydrophila* dengan ciri bentuk batang pendek Gram negatif, fermentatif, motil, mengandung enzim katalase, protease dan oksidatif. Isolat AH2, AH4, B5, dan B9 merupakan isolat terpilih yang memiliki gen tanda virulen yaitu, *aerolysin (aer)*.

DAFTAR PUSTAKA

- Afianto, E. dan Liviawaty, E. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Kanisius. Yogyakarta.
- Afianto, E., Liviawaty, E., Jamaris, dan Z., Hendi. 2015. Penyakit Ikan. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Aoki, T. 1999. Motile *Aeromonas (Aeromonas hydrophila)*. *Journal Laboratory of genetic and Biochemistry*. (11) : 427-435.
- Aldeen, W. R. T., Abeer, F. A., Oruba, and K. H., Al-bermani, N. S.N. 2014. PCR Detection of Putative Hemolysin and Aerolysin Genes in An *Aeromonas hydrophila* Isolates from Diarrhea in Babylon Province. *Journal of Natural Sciences Research*. 11 (4): 41-47.
- Andrea, B.C., and Josh, E. P.C. 2006. Antibiotic Resistance Of *Aeromonas hydrophila* Isolated From *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) And *Oreochromis Niloticus* (Linnaeus, 1758). UFAM Centro de Apoio Multidisciplinar. Divisão de Biotecnologia, Av. Rodrigo Otávio Manaus, ESALQ, Depto. de Zootecnia. Brasil. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*. 63(3): 281-284.
- Irianto, A. 2005. Patologi Ikan Teleostei. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Janda, J. M, and Abbott, S. L., 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*. (23): 35-73.
- Kordi, G. H. 2010. Budidaya Ikan Patin di Kolam Terpal. Lily Publisher. Yogyakarta.
- Krieg, N. R., and J. G. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edisi ke-1. United States of America Baltimore: Williams & Wilkins Company.
- Manik. V. T, Hidayat. dan T. Kusumawaty. D. 2014. Identifikasi dan Filogenetika Bakteri *Aeromonas spp.* Isolate Air Kolam Beberapa Kota Berdasarkan Pada Sikuen Gen *16S rRNA*. Program Studi Biologi Jurusan Pendidikan Biologi UPI. Bandung. *Formica Online*. 1(1): 10-19.
- Nam, In-Young and Joh Kiseong. 2007. Rapid Dtection of Virulence Factor of *Aeromonas* Isolate from a Trout Farm by Hexaplex-PCR. Departements of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies, Young-In, Republic of Korea. *The Jurnal of Microbiology*. 4 (45) : 297-304.
- Sarkar, M. J. A., and M. M. Rashid. 2012. Pathogenicity of the bacterial isolate *Aeromonas hydrophila* to catfishes, carps and perch. *J. Bangladesh Agril.* 10 (1): 157-161.
- Supriyadi, H., dan G, Lila. 2010. *Streptococcosis* Pada Ikan Nila (*Oreochomis niloticus*) Budidaya di Danau Maninjau. Pusat Riset Perikanan Budidaya. Jakarta. *Prosding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. (1): 905-910.
- Swann, L., M. and Randy, W. D.V.M. 1989. Diagnosis and Treatment of "*Aeromonas hydrophila*" Infection of Fish. *Aquaculture Extension*, India. (4): 91-92.
- Yogananth, N. R. Bhagyaraj. A, Chanthuru. T, Anbalagan. and K, Mulai Nila. 2009. Detection of Viulence Gene in *Aeromonas hydrophila* Isolated from Fish Samples Using PCR Technique. P.G and Research Departement of Microbiology, J.J Collage of Arts and Science, Pudukkottai, Tamil Nudu, India. Indian Institute of Corp Processing Technology, Thanjavur, Tamilnadu. India. *Global Jurnal of Biotechnology & Biochemistry. IDOSI Publication*. 4 (1): 51-53.
- Wahjuningrum, D., Retno, A., Mia, S. 2013. Pencegahan Infeksi *Aeromonas hydrophila*

Pada Benih Ikan Lele *Clarias* spp. Yang Berumur 11 Hari Menggunakan Bawang Putih *Allium sativum* Dan Meniran *Phyllanthus niruri*. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. *Jurnal akuakultur indonesia* 12 (1): 94-104.