

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/btla>

DETEKSI GEN HAEMOLISIN PADA *Aeromonas hydrophila* MENGGUNAKAN METODE PCR (Polymerase Chain Reaction) DI LABORATORIUM UJI BRPI, SUKAMANDI

Diah Artati dan Dini Sahfitri Lubis

Balai Riset Pemuliaan Ikan

Jl. Raya 2 Sukamandi, Patok Beusi, Subang, Jawa Barat 41263

E-mail: pt.bppi@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit pada ikan merupakan salah satu kendala yang sering terjadi dan ikut berperan menurunkan angka keberhasilan para pembudidaya ikan. Salah satu jenis penyakit yang sering dijumpai pada organisme budidaya adalah penyakit bakterial yang disebabkan oleh serangan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Berkembangnya metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifitas yang tinggi diharapkan mampu meminimalisir kerugian yang ditimbulkan. Kegiatan ini dilakukan menggunakan metode PCR dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan primer AHH1 dan primer A16S dalam mendeteksi keberadaan gen haemolisin pada bakteri *A. hydrophila* serta mengkonfirmasi penggunaan ATCC 35654 sebagai referensi jaminan mutu pengujian pada kegiatan identifikasi bakteri *A. hydrophila* di Laboratorium Mikrobiologi BRPI, Sukamandi. Haemolisin merupakan lipid dan protein yang dapat menyebabkan lisis pada sel darah merah dengan cara menghancurkan membran sel. Gen 16S rRNA merupakan asam ribonukleat pengkode ribosom 16S. Gen tersebut memiliki sejumlah basa yang disebut sebagai *hypervariable region* yang merupakan ciri khas yang mampu membedakan tiap organisme. ATCC 35654 yang diamplifikasi menggunakan primer AHH1 dan A16S positif terdeteksi sebagai *A. hydrophila* yang membawa gen haemolisin.

KATA KUNCI: *Aeromonas hydrophila*; identifikasi bakteri; gen haemolisin

PENDAHULUAN

Pemeliharaan lingkungan dan daya tahan organisme budidaya terhadap serangan bakteri patogen menjadi hal yang sangat penting dalam menentukan keberhasilan budidaya. Penyakit pada ikan merupakan salah satu kendala yang sering terjadi dan turut andil menurunkan angka keberhasilan para pembudidaya ikan. Serangan penyakit pada ikan menimbulkan kerugian ekonomi yang tidak sedikit. Salah satu jenis penyakit yang sering ditemukan pada organisme budidaya adalah penyakit bakterial yang disebabkan oleh serangan bakteri patogen. Jenis bakteri yang umum ditemukan pada ekosistem perairan dan mempunyai peranan sebagai mikroflora bagi organisme air yaitu bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri patogen penyebab penyakit “*Motile Aeromonads Septicemia*” (MAS), terutama untuk spesies ikan air tawar di perairan tropis (Rahmaningsih, 2012). Selain itu, bakteri *Aeromonas hydrophila* memiliki kemampuan osmoregulasi yang tinggi di mana mampu bertahan hidup pada perairan tawar, perairan payau dan laut yang memiliki kadar garam tinggi dengan

penyebaran melalui air, kotoran burung, saluran pencernaan hewan darat dan hewan amfibi serta reptil (Mangunwardoyo *et al.*, 2010).

A. hydrophila merupakan jenis bakteri oportunistik yaitu bakteri yang dapat pada organisme tersebut. Faktor virulensi pada *A. hydrophila* disebabkan karena adanya haemolysin, aerolysin, protease, lipase, DNAses yang penting dalam patogenesis penyakit manusia dan ikan (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003; Catagay & Sen, 2014).

Identifikasi mikroorganisme penyebab infeksi pada bidang mikrobiologi memiliki peranan yang sangat penting. Identifikasi yang dilakukan secara konvensional dengan melakukan pemeriksaan karakteristik dan biokimia membutuhkan waktu yang lama dan terkendala terjadinya kontaminasi. Berkembangnya metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifitas yang tinggi diharapkan mampu meminimalisir kerugian yang ditimbulkan.

Kegiatan ini dilakukan berdasarkan metode analisis DNA dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan primer AHH1 dan primer A16S dalam mendeteksi

keberadaan gen haemolisin pada bakteri *A. hydrophila* serta mengkonfirmasi penggunaan ATCC 35654 sebagai referensi jaminan mutu pengujian pada kegiatan identifikasi bakteri *A. hydrophila* di Laboratorium Mikrobiologi BRPI, Sukamandi.

BAHAN DAN METODE

Kegiatan deteksi gen haemolisin *A. hydrophila* menggunakan metode PCR ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi dan Genetika BRPI, Sukamandi. Bakteri uji yang digunakan adalah ATCC 35654 yang telah ditumbuhkan pada media TSA dengan suhu inkubasi 28°C dan digunakan untuk pengujian pada umur 18-24 jam. Kegiatan inokulasi bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi BRPI, Sukamandi.

Metode PCR (Wang *et al.*, 2003)

Proses Ekstraksi

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan sampel suspensi bakteri yang mengandung 2×10^9 sel bakteri yang telah ditempatkan dalam *microcentrifuge tube* 1,5 mL kemudian disentrifus dengan kecepatan 5000xg selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang dan ditambahkan 180 μ L *Digestion Solution*. *Proteinase-k* sebanyak 20 μ L dicampurkan ke dalam larutan kemudian di-vortex. Sampel diinkubasi pada suhu 56°C selama 30 menit atau sampai dengan lisis. Setelah lisis ditambahkan *RNAse A solution* sebanyak 20 μ L, dihomogenkan dengan cara di-vortex kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. *Lysis solution* sebanyak 200 μ L ditambahkan ke dalam larutan kemudian di-vortex selama 15 detik. Alkohol 50% sebanyak 400 μ L dicampurkan ke dalam larutan kemudian di-vortex. Larutan dipindahkan ke *spin column* kemudian disentrifuse dengan kecepatan 6.000xg selama 1 menit. Cairan yang tertampung pada *collection tube* dibuang, sedangkan *column* yang sudah berisi DNA dipindahkan ke *collection tube* baru. *Wash buffer I* sebanyak 500 μ L ditambahkan ke dalam *spin column* kemudian disentrifuse dengan kecepatan 8.000xg selama 1 menit. Cairan yang tertampung pada *collection tube* dibuang, kemudian *column* di cuci kembali dengan menambahkan *wash buffer II* sebanyak 500 μ L dan di sentrifuse dengan kecepatan 12.000xg selama 3 menit. Cairan yang tertampung pada *collection tube* dibuang, sedangkan *spin column* yang sudah berisi DNA dipindahkan ke dalam tube 1,5 mL baru. DNA yang terbentuk dilarutkan dengan menambahkan *Elution Buffer* sebanyak 200 μ L. Sampel diinkubasi terlebih dahulu pada suhu ruang selama 2 menit kemudian disentrifuse dengan kecepatan 8.000xg selama 1 menit.

Proses PCR

Amplifikasi DNA dilakukan dengan 2 macam primer yaitu primer AHH1 (F:5'GCC GAG CGC CCA GAA GGT GAG TT-3 dan R:5'GAG CGG CTG GAT GCG GTT GT-3) dan primer A16S (F:5'GGG AGT GCC TTC GGG AAT CAG A-3 dan R:5'TCA CCG CAA CAT TCT GAT TTG'3) (Wang *et al.*,2003) dalam volume 25 μ L yang masing-masing berisi PCR *Master Mix* sebanyak 12,5 μ L, 8,5 μ L H₂O, 1 μ L Primer Forward, 1 μ L Primer Reverse dan 2 μ L DNA *template* dengan produk amplikon pada primer AHH 130 bp dan primer A16S 356 bp. Tahap amplifikasi meliputi proses *initial PCR activation step* pada suhu 94°C selama 3 menit. Tahapan selanjutnya untuk setiap siklus terdiri atas denaturasi selama 1 menit pada suhu 94°C, *annealing* pada suhu 64°C selama 30 detik dan *extension* pada suhu 72°C selama 45 detik. Jumlah siklus yang diperlukan adalah 30 siklus. *Extended extension* selama 7 menit pada suhu 72°C merupakan tahap akhir dari proses PCR.

Proses Elektroforesis

Pemeriksaan hasil PCR dilakukan dengan cara memasukkan 6 μ L amplikon ke dalam sumur-sumur *agarose gel* 2% yang telah diwarnai dengan *peq green*. Sebagai penanda (*marker*) digunakan Vivantis VC 100 bp DNA Ladder Plus, RTU, 50 μ g sebanyak 2 μ L. Setelah itu dilakukan elektroforesis 60 volt, 400 mA selama 60 menit kemudian gel divisualisasikan menggunakan alat UV transilluminator.

HASIL DAN BAHASAN

Penggunaan ATCC (*American Type Culture Collection*) sebagai media kontrol dalam jaminan mutu pengujian bidang mikrobiologi didasarkan karena ATCC merupakan organisasi yang mengumpulkan, menyimpan dan mendistribusikan referensi standar mikroorganisme, *cell lines* dan bahan lainnya yang dibutuhkan dalam kegiatan penelitian dan pengembangan. ATCC juga berfungsi untuk menetapkan standar untuk reagen biologis dan kualitas pengujian. ATCC menetapkan suatu mekanisme untuk memastikan identitas, kelangsungan hidup, dan kemurnian mikroba yang terdapat dalam produk mikrobiologi komersil yang dijual oleh para anggotanya. Para profesional pengawasan mutu dan juga konsumen diyakinkan bahwa produk yang berlambang *Licensed Derivative* ATCC berisi mikroorganisme yang diuji oleh ATCC guna menjamin organisme tersebut terus hidup, murni, dan teridentifikasi secara akurat (ATCC, 2019).

Deteksi keberadaan gen haemolisin pada bakteri *A. hydrophila* dengan sampel ATCC 35654 menggunakan primer AHH1 (F:5'GCC GAG CGC CCA GAA GGT GAG TT-3 dan R:5'GAG CGG CTG GAT GCG

GTT GT-'3) dan A16S (F:5'GGG AGT GCC TTC GGG AAT CAG A-'3 dan R:5'TCA CCG CAA CAT TCT GAT TTG'3) menunjukkan bahwa sampel tersebut positif *A. hydrophila* dan membawa gen haemolisin (Gambar 1). Hasil amplifikasi menggunakan primer AHH1 dapat dilihat dengan munculnya *band* dengan kode F33 pada ukuran 130 bp. Primer AHH1 merupakan primer yang telah didesain spesifik untuk dapat mendeteksi keberadaan gen haemolisin pada *A. hydrophila*. Sedangkan hasil amplifikasi sampel F33 menggunakan primer A16S menunjukkan hasil amplifikasi muncul pada ukuran 356 bp di mana ukuran tersebut merupakan *product size* untuk 16S rRNA *A. hydrophila*.

Haemolisin merupakan lipid dan protein yang dapat menyebabkan lisis pada sel darah merah dengan cara menghancurkan membran sel. Keberadaannya mampu menyebabkan infeksi parah sehingga dianggap sebagai faktor virulensi potensial yang dihasilkan oleh mikroorganisme. *A. hydrophila* termasuk ke dalam bakteri jenis α -hemolitik, yaitu bakteri yang mampu melisis sel darah merah dan haemoglobin secara lengkap. Akibat dari adanya aktivitas hemolitik ini menyebabkan bakteri mampu mengekspresikan zona bening di sekitar koloni pada media agar darah.

Gen 16S rRNA merupakan asam ribonukleat pengkode ribosom 16S (*16S ribosomal Ribonucleic acid*). S pada 16S memiliki arti *Svedberg* yang merupakan satuan ukuran ribosom. Gen pengkode RNA ribosomal (rRNA) disebut sebagai gen paling lestari (*conserved*) yang terdapat pada tiap organisme. Berdasarkan struktur yang lestari tersebut maka gen 16S dapat digunakan pada PCR dan analisis sekuensing. Kelebihan yang terdapat pada struktur tersebut yaitu adanya sejumlah basa yang disebut sebagai *hypervariable region* yang merupakan ciri khas yang mampu membedakan tiap organisme (Amman *et al.*,

1995; Clarridge *et al.*, 2004). Identifikasi *A. hydrophila* berdasarkan metode PCR melalui gen 16S diharapkan mampu melengkapi beberapa kelemahan yang terdapat pada metode identifikasi secara konvensional.

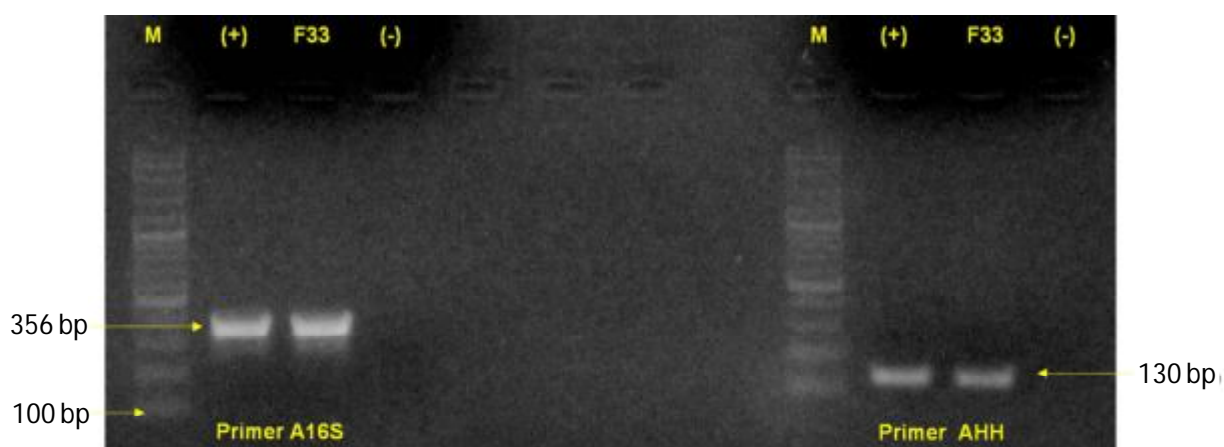
Penyakit infeksi yang disebabkan adanya serangan bakteri *A. hydrophila* sering terjadi pada budidaya ikan air tawar. Hal ini terjadi karena ketidakseimbangan antara lingkungan, ikan, dan mikroorganisme patogen yang tumbuh di dalamnya. Penanganan pada ikan budidaya yang kurang baik dapat memicu ikan mengalami stres sehingga berpengaruh pada menurunnya daya tahan tubuh sehingga mudah terserang penyakit. Identifikasi serangan penyakit bakterial perlu dilakukan segera agar dapat dilakukan penanganan dalam waktu cepat sehingga kerugian dapat diminimalisir. Kemampuan primer AHH1 dalam mendeteksi keberadaan gen haemolisin diharapkan mampu membantu meminimalisir penyebaran penyakit yang disebabkan infeksi akibat serangan *A. hydrophila* serta penggunaan ATCC 35654 dapat dijadikan sebagai referensi kontrol positif yang bermanfaat sebagai acuan dalam kegiatan identifikasi bakteri *A. hydrophila*.

KESIMPULAN

Primer AHH1 dan A16S mampu mendeteksi keberadaan gen haemolisin pada sampel ATCC 35654 dan positif terdeteksi sebagai *A. hydrophila*.

DAFTAR ACUAN

- Amman, R.I., Ludwig, W., & Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiology Reviews*, 59(1), 143-69.
- ATCC (2019). <https://www.atcc.org/About> di akses pada tanggal 25 November 2019 Pukul 15.30 WIB.



Gambar 1. Hasil amplifikasi menggunakan primer A16S dan AHH1, M= Marker; (+)= Kontrol positif; (F33)= sampel uji (ATCC 35654); (-)= Kontrol negatif.

- Cagatay, I.T. & Sen, E.B. (2014). Detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16, 435-438.
- Castro-Escarpulli, G., Figueras, M.J., Aguilera-Arreola, G., Soler, L., Fernandez-Rendon, E., Aparicio, G.O.J., Guarro, & Chacon, M.R. (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 41-49.
- Clarridge, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840-62.
- Mangunwardoyo, W., Ismayasari, R., & Riani, E. (2010). Uji Patogenisitas dan Virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) melalui Postulat Koch. *Jurnal Riset Akuakultur*, 5, 245-255.
- Rahmaningsih, S. (2012). Pengaruh Ekstrak Sidawayah dengan Konsentrasi yang Berbeda untuk Mengatasi Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumberdaya Perairan*.
- Wang, G., Clark, C.G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C.K., Kruk, T.M.A.C., Caldeira, R., Woodward, D.L., & Rodgers, F.G. (2003). Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(3), 1048-1054.