

Pelacakan Gen Aerolysin dari *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Mas yang Diberi Pakan Ekstrak Bawang Putih

DETECTION OF AEROLYSIN GEN FROM AEROMONAS HYDROPHILA IN COMMON CARP FED WITH GARLIC EXTRACT

Iesje Lukistyowati ¹⁾, Kurniasih²⁾

¹⁾Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau,
Kampus Bina Widya, km 12,5, Simpang Baru, Pekanbaru 28239, Telepon. 0761 - 63275

²⁾Bagian Patologi/Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Gajah Mada Yogyakarta

ABSTRAK

Aeromonas hydrophila adalah bakteri oportunistik, Gram negatif, dapat menyebabkan kematian ikan dalam waktu yang sangat singkat hingga mencapai 80-100 %. Salah satu faktor virulensi dari *A. hydrophila* yang dapat menyebabkan kematian ikan mas (*Cyprinus carpio* L) adalah *aerolysin*. Penelitian ini menggunakan primer oligonukleotida sintesis bertujuan untuk melacak gen *aerolysin* dari *A. hydrophila* pada ikan mas yang diberi pakan mengandung ekstrak bawang putih selama 30 hari kemudian diinfeksi dengan *A. hydrophila*. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat mendeteksi gen *aerolysin* dari *A. hydrophila*. Hasil elektroforesis menunjukkan gen *aerolysin* dari *A. hydrophila* isolat Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada (FKH-UGM) berasal dari biakan murni yang digunakan untuk menginfeksi ikan perlakuan teramplifikasi dengan bobot molekul 462 bp, sedang gen *aerolysin* yang terdapat pada ginjal ikan perlakuan teramplifikasi dengan bobot molekul 900 bp. Hasil DNA sequencing *A. hydrophila* isolat FKH – UGM yang digunakan homolog dengan isolat *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966, *complete genome* dengan score 55.4 (71%)

Kata kunci : *Aeromonas hydrophila*, *Cyprinus carpio* L, Ekstrak bawang putih, PCR, DNA Sequencing

ABSTRACT

Aeromonas hydrophila is a gram negative and opportunistic bacteria, which could cause fish mortality in a short time from 80%-100%. One virulent factor of *A. hydrophila* on common carp (*Cyprinus carpio* L) that could cause fish mortality is *aerolysin*. This research used a synthetic primers of oligonukleotide to detect *aerolysin*, a specific genomes of *A. hydrophila* on common carp (*Cyprinus carpio* L). The common carps have been feed a woff that contain garlic extract during 30 days before they challenged with *A. hydrophila*. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) was used to detect an *aerolysin* gen from *A. hydrophila*. The electrophoresis result showed *aerolysin* gene of *Aeromonas hydrophila* from Veterinary Faculty of Gajah Mada University (FKH-UGM) isolate was amplified with 462 bp of molecule weight. While the *aerolysin* gen was detected in the fish kidney with 900 bp of molecule weight. Further, DNA sequence analysis of the PCR product of *A. hydrophila* from FKH – UGM isolate showed homolog with isolate *A. hydrophila* subsp *hydrophila* ATCC 7966 complete genome with score 55.4 (71%).

Keywords : *Aeromonas hydrophila*, *Cyprinus carpio* L, Garlic extract, PCR, DNA Sequencing

PENDAHULUAN

Aeromonas hydrophila termasuk Gram-negatif, berbentuk batang pendek, bersifat aerob dan fakultatif anaerob, tidak berspora, motil mempunyai satu flagel, hidup pada kisaran suhu 25-30^o C (Post, 1983). Serangan bakteri ini dapat mengakibatkan gejala penyakit hemorhagi

septicaemia yang mempunyai ciri luka dipermukaan tubuh, insang, ulser, abses, eksothalmiadan perut gembung (Austin dan Austin, 1993), serta gastroenteristis, diare dan extra intestinal pada manusia (Porteen *et al.*, 2007).

Bakteri ini sangat berpengaruh dalam budidaya ikan air tawar dan sering menim-

bulkan wabah penyakit dengan tingkat kematian yang tinggi (80–100 %) dalam waktu yang singkat (1–2 minggu). Tingkat virulensi dari *A. hydrophila* yang dapat menyebabkan kematian ikan tergantung dari racun yang dihasilkan. Gen *Aero* dan *hlyA* yang bertanggung jawab memproduksi racun *aerolysin* dan hemolysin pada genus *Aeromonas* (Yousr *et al.*, 2007). *Aerolysin* merupakan protein ekstraseluler yang diproduksi oleh beberapa strain *A. hydrophila* yang bisa larut, merupakan protein hidrofilik mempunyai sifat hemolitik dan sitolitik. *Aerolysin* mengikat reseptor glikoprotein spesifik pada permukaan sel eukariot sebelum masuk ke dalam lapisan lemak dan membentuk lubang. Racun *aerolysin* yang membentuk lubang melintas masuk ke dalam membran bakteri sebagai suatu preprotoksin yang mengandung peptida. Racun tersebut dapat menyerang sel-sel epithelia dan menyebabkan gastroenteritis (Yousr *et al.*, 2007).

Primer oligonukleotida sintetis yang digunakan dalam PCR dapat mendeteksi gen *aerolysin* pada strain *A. hydrophila* dan untuk memeriksa gen-gen yang identik pada *A. caviae*, *A. sorbia* dan *A. veronii*. Primer-primer oligonukleotida sintetis yang digunakan dalam reaksi rantai polimerase (PCR) memiliki target 209 bp dari kerangka pembacaan terbuka terbesar dari urutan gen *aer* (Polallard *et al.*, 1990). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen *aerolysin* dari *A. hydrophila* yang diinfeksi pada ikan yang telah diberi ekstrak bawang putih selama 30 hari, kemudian setelah 14 hari pascainfeksi dilakukan pengamatan, dikarenakan ikan yang diberi perlakuan ekstrak bawang putih jumlah koloni bakteri berkurang (Salaby *et al.*, 2006; Lukistyowati dan Saberina, 2004).

METODE PENELITIAN

Ikan percobaan diberi pakan jenis 781-2 (Central Pangan Pertiwi) jenis 781-2 dicampur dengan ekstrak etanol bawang putih. Pembuatan ekstrak etanol bawang putih dilakukan dengan cara bawang putih dikupas, dicuci bersih dan dikering anginkan. Bawang putih *diblender* dengan ethanol 70 % dengan perbandingan 1 : 5 bahan pelarut (1 kg bawang putih ditambah 5 liter ethanol 70 %), disaring dengan kertas saring. Filtrat hasil penyaringan dicampur pada pakan pelet sesuai dengan dosis perlakuan hingga rata. Setelah filtrat terserap

oleh pelet diangin-anginkan, kemudian dioven 60°C selama 24 jam.

Ikan ukuran 10-15 cm dari sentra pembenihan Cangkringan Jogjakarta ditempatkan pada aquarium 30 x 15 x 26 cm, 1 ekor/aquarium, diadaptasi diberi pakan standar secara *ad libitum* selama tujuh hari. Setelah adaptasi, ikan diberi pakan mengandung berbagai konsentrasi ekstrak etanol bawang putih sesuai dengan bobot badannya sebanyak 3 %. Bakteri yang dipakai menginfeksi ikan adalah SA2. *A. hydrophila* isolat FKH-UGM. Perlakuan yang diberikan kepada ikan-ikan percobaan adalah :

- (1) Ikan kontrol positif / ikan diberi pakan standart kemudian diinfeksi dengan *A. hydrophila*
- (2) Ikan kontrol negatif / ikan diberi pakan standart tidak diinfeksi
- (3) Ikan yang diberi pakan mengandung ekstrak bawang putih 2,5 % /kg
- (4) Ikan yang diberi pakan mengandung ekstrak bawang putih 5 %/kg
- (5) Ikan yang diberi pakan mengandung ekstrak ekstrak bawang putih 10 %/kg

Masing-masing perlakuan ulangnya 10 ekor. Pemberian pakan dilakukan pada pagi hari dan sore hari selama 30 hari. Dilakukan penyifonan setiap hari pada siang hari. Setelah hari ke 30 ikan diinfeksi dengan *A. hydrophila* secara intramuskuler dengan bakteri 10⁶ sel/ml, dosis 0,1 ml/ekor. Pada hari ke-14 pascainfeksi ginjal ikan bagian anterior semua perlakuan diambil sebesar 25 mg guna diekstraksi DNAny.

Ekstraksi DNA *A. hydrophila* isolat FKH-UGM (Ekstraksi dengan kit Qiagen-Germany) .

Isolat *A. hydrophila* ditumbuhkan pada media *Tryptic Soya Broth* (TSB) setelah umur biakan 24 jam diambil sebanyak 10 ml dengan kepadatan 10⁸ sel/ml. Biakan tersebut dituangkan ke mikro tube sampai habis dan disentrifuse 3000 rpm selama tiga menit. Supernatannya dibuang hingga tersisa peletnya, kemudian ditambah dengan buffer ATL sebanyak 180 µl, 20 µl proteinase K, dan diinkubasi pada suhu 56°C di *water bath* selama 10 menit. Larutan divortex 15 detik dan ditambah buffer Al sebanyak 200 µl, divortex kembali, ditambah 200 µl etanol absolut dan divortex. Larutan tersebut kemudian dimasukkan ke *spin column* dan disentrifuse 8000 rpm selama 1 menit. Filter dipindahkan

ke *spin column* yang baru dan ditambah 500 µl buffer AW1 kemudian disentrifuse 8000 rpm selama 1 menit. Filter dipindahkan ke *spin column* baru ditambah 500 µl buffer AW2, disentrifuse 14.000 rpm selama 3 menit, dipindahkan ke mikro tube baru kemudian ditambah 200 µl buffer AE, diinkubasi selama 1 menit disuhu ruangan, disentrifuse 8000 rpm selama 1 menit. Hasil saringan disimpan pada suhu -70 °C dan setiap waktu dapat digunakan.

Ginjal ikan perlakuan yang telah diinfeksi *A. hydrophila* yang diawetkan dalam etanol absolut ditimbang sebanyak 25 mg kemudian dipotong-potong halus dan digerus dengan mortir steril hingga lumat dalam mikrotube, ditambahkan 180 µl buffer Al, ditambah 20 µl *proteinase K*, divortex dan diinkubasi pada 56 °C di *water bath* selama 2 jam, selama diinkubasi dilakukan vortex. Langkah selanjutnya sama dengan ekstraksi bakteri *A. hydrophila*.

Amplifikasi Gen *Aer* (menggunakan Master Mix Promega)

Larutan 6,5 µl dH₂O dan 12,5 µl Green mix dalam mikrotube, kemudian campur hingga homogen. Primer yang digunakan adalah oligonukleotida masing-masing 2 µl forward primer (5'-CCAAGGGGTCTGTGG-CGACA-3') dan reverse primer (5'-TTTCACCGGTA-ACAGGATTG-3') dengan konsentrasi akhir 0,1 µM (Pollard *et al.*, 1990) serta 2 µl template DNA. 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 55 °C selama 90 detik dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 2 menit, selama 30 siklus, ekstensi akhir 72 °C selama 5 menit suhu akhir 4 °C (Gustafson *et al.*, 1992).

Hasil PCR dari berbagai perlakuan dielektroforesis pada gel agarose 1,5 % agarose (0,75 g dilarutkan ke dalam TAE buffer 50 ml) dididihkan di *microwave*, setelah hangat agarose ditambah larutan EtBr sebanyak 2 µl dengan konsentrasi 10 mg/ml. Agarose kemudian dituangkan ke dalam cetakan elektroforesis yang telah dipasang *comb*. Setelah agarose mengeras 0,8 µl produk PCR dicampur dengan 0,2 µl *loading dye* dimasukkan ke sumur 2, 3, 4 dan seterusnya. Sumur pertama diisi dengan 0,5 µl penanda molekuler (marker). Elektroforesis dijalankan dengan voltase 100 volt selama 30 menit. Setelah itu gel diangkat diamati di atas uv transilluminator, kemudian didokumentasikan.

Purifikasi

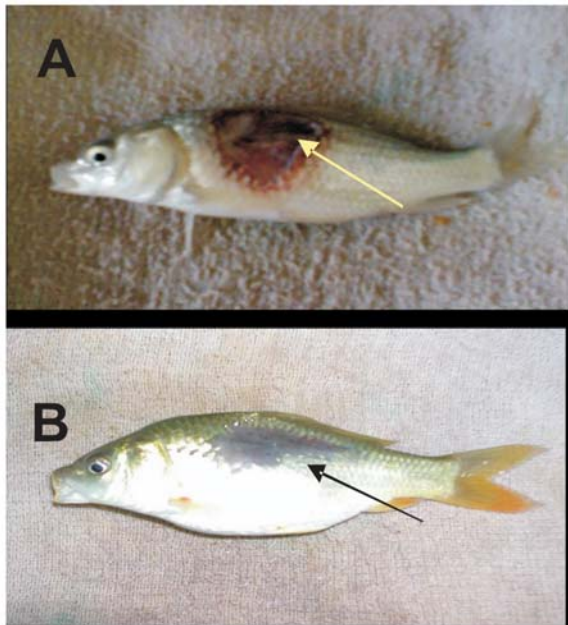
Purifikasi produk PCR sampel dilakukan dengan *microclean*. Produk PCR sebanyak 100 µl ditambah *microclean* 100 µl (1 : 1) kemudian dicampur hingga homogen dengan menggunakan pipet. Inkubasi selama 5 menit dilakukan pada suhu kamar, dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Larutan supernatan dibuang, divortex, buang supernatannya yang tersisa hingga benar benar bersih, kemudian pellet diresuspensi dengan TE sebanyak 30 µl, disimpan pada -20 °C. Purifikasi dan sekuensing DNA *A. hydrophila* dilakukan dengan *automatic sequencer* (Applied Biosystems Inst Model 310) di Universitas Islam Negeri Yogyakarta. Kemudian dilakukan pendekatan dengan program BLAST (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Analisis kemiripan dilakukan dengan program versi MEGA 4 (1993 – 2008).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ikan perlakuan yang beri pakan ekstrak bawang putih selama 30 hari kemudian diinfeksi dengan *A. hydrophila* menunjukkan gejala penyakit MAS. Gejala klinis ikan perlakuan yang terlihat antara lain luka borok yang melebar di bekas suntikan. Setelah dilakukan isolasi kembali ke media agar selektif (GSP), menunjukkan bakteri tersebut positif *A. hydrophila* dengan hasil uji biokimia menunjukkan karakteristik adanya kesamaan reaksi. Tes biokimia tersebut menunjukkan uji gram (-); uji oksidase (+); uji katalase (+); uji motilitas (+); uji indol (+); uji H₂S pada media TSA (+); uji Voges-proskaver (+); uji gas dari glukosa (+) dan uji Ornithin dekarboksilase (-).

A. hydrophila merupakan bakteri patogen oportunistik yang dapat menyebabkan kematian tinggi pada ikan-ikan budidaya, hal ini dimungkinkan oleh sifat virulen yang diakibatkan oleh produk ekstraseluler seperti endotoksin, sitotoksin, hemolisin, dan protease (Yusoff dan Subangsihe, 1995). Kematian ikan uji membuktikan bahwa ikan tersebut tidak terjadi stimulasi imunologik untuk merespon masuknya patogen

Ikan yang diberi perlakuan maupun sebagian ikan kontrol yang mempunyai sistem kekebalan yang tinggi bertahan hidup, ulser berangsur-angsur mulai membaik, dan luka bekas suntikan terlihat mengecil. Hal ini sesuai

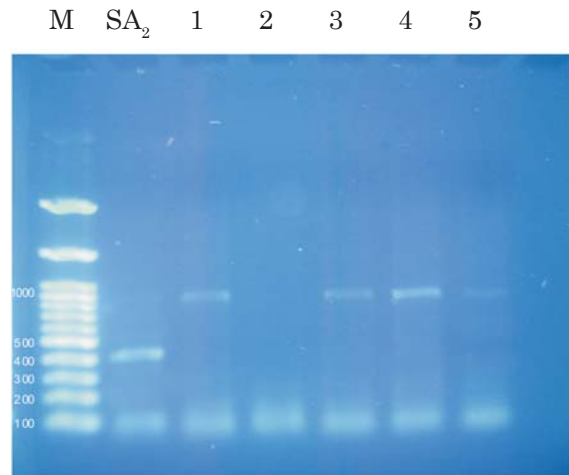


Gambar 1 : Gejala klinis ikan yang diinfeksi secara intramuscular dengan *A. hydrophila* (A) luka bekas suntikan yang melebar akibat *A. hydrophila* hingga tulang vertebranya terlihat dengan jelas, (B) luka bekas suntikan menutup setelah pascapenyuntikan 14 hari.

dengan pendapat Frandson (1992) yang menyatakan bahwa fibrinogen keluar dari pembuluh dan menyebabkan timbulnya koagulasi pada jaringan yang membantu dalam membuat barrier terhadap menyebarnya unsur-unsur infeksi sehingga membangun dinding untuk wilayah yang sedang mengalami kerusakan. Luka bekas penyuntikan mulai terlihat menutup dan sembuh setelah 14 hari pasca penyuntikan (Gambar 1 B).

Hasil PCR DNA dari isolat *A. hydrophila* biakan murni dan ginjal ikan perlakuan yang diinfeksi *A. hydrophila* dengan menggunakan primer oligonukleotida menunjukkan positif terdeteksi memiliki gen *aerolysin*. Gen *aerolysin* yang terdeteksi pada biakan murni *A. hydrophila* pita yang terbentuk menunjukkan bobot molekul 462 bp sedangkan pada ikan yang diberi perlakuan pakan yang mengandung ekstrak bawang putih 2,5 % , 5 % , dan 10 % menunjukkan hasil positif teramplifikasi (ditandai dengan munculnya pita/band), yang mengindikasikan bahwa ginjal ikan tersebut masih memiliki gen *aerolysin* ditandai dengan pita tebal mengarah ke tipis menunjukkan bobot molekul sekitar 900 bp (Gambar 2).

Gen *aerolysin* dari *A. hydrophila* yang berasal dari ginjal ikan yang diberi perlakuan



Gambar 2 : Hasil uji PCR sampel DNA *A. hydrophila* M).DNA ladder (1000 bp); SA₂). DNA dari *A. hydrophila* murni isolat FKH-UGM); (1). DNA ginjal ikan perlakuan kontrol positif ; (2). DNA ginjal ikan perlakuan kontrol negatif ; (3). DNA ginjal ikan perlakuan yang diberi pakan ekstrak bawang putih 2,5 % ; (4). DNA ginjal ikan perlakuan yang diberi pakan ekstrak bawang putih 5 % ; (5). DNA ikan perlakuan yang diberi pakan ekstrak bawang putih 10 %

bawang putih dengan konsentrasi 10 % kadar racunnya berkurang diduga akibat pemberian ekstrak bawang putih sehingga pada saat dilakukan deteksi dengan menggunakan PCR hasilnya sangat tipis.

Faktor yang berbahaya pada *A. hydrophila* adalah racun-racun yang dihasilkan. Hal tersebut telah dibuktikan oleh peneliti terdahulu yang melaporkan bahwa patogenisitas *A. hydrophila* tergantung dari racun yang dihasilkan oleh bakteri tersebut, dua racun haemolitik tersebut adalah *haemolysin* dan *aerolysin* (Yousr *et al.*, 2007 ; Yogananth dkk., 2009 ; Pollard *et al.*, 1990). *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan primer oligonukleotida dapat mengidentifikasi untaian-untaian yang memproduksi *aerolysin* dari *A. hydrophila* dan mungkin memiliki aplikasi sebagai tes khusus untuk spesies karena spesies *Aeromonas* hemolitik lainnya yang dites hasilnya menunjukkan negatif (Pollard *et al.*, 1990).

Hasil PCR ginjal ikan perlakuan 1; 3; 4 dan 5 terdeteksi positif terdapat adanya gen *aerolysin* menunjukkan bobot molekul sebesar 900 bp. Yousr *et al.*, (2007) juga mendeteksi gen *aerolysin* yang berbahaya dengan metode PCR berasal dari air tawar dan kerang di Malaysia,

SA2	TCT	CGG	AGG	AGC	GAT	GAA	GTA	CAT	CGT	CAC	[30]
1	...	TT.	CTT	.A.	AG.	CTC	T.T	TCC	GC.	TCG	[30]
5	---	---	---	---	---	ACA	..C	CA.	.T.	CAC	[30]
SA2	CGG	CGC	CGC	CGG	GTT	TTC	TCC	TTT	CTG	TGG	[60]
1	T.T	GCT	TT.	.CT	CCC	C..	...	TCA	G.C	..A	[60]
5	C.C	A..	C..	[60]
SA2	GGT	GGC	CGC	TCT	GTG	CCC	CCG	GCC	CCG	ATC	[90]
1	TT.	T.T	TTT	..C	CCA	-.A	GT.	..T	TTA	TT.	[90]
5	...	C..	T..	C..G	A..	[90]
SA2	CGT	GGT	GGG	GAC	GGC	TCC	CTC	GCC	GAC	TAC	[120]
1	A..	CTG	ATC	CGT	T.T	CT.	..T	C.T	TC.	GTT	[120]
5TC	G..	[120]
SA2	CAC	GCC	ATG	AGT	CTC	CGG	GCC	GCG	CTA	CTC	[150]
1	TC.	A..	C.C	.T.	G..	..A	CTG	TG.	GGG	A.A	[150]
5	C..	...	T..T.	...	[150]
SA2	GCG	CTG	GCC	ACG	CCT	CTG	CCC	GGC	TTA	CGC	[180]
1	AT:	GGT	TAG	.G.	A.A	A.A	AGG	CA.	.GC	T.T	[180]
5	G..	..T	C..	..TT.	.T.	...	[180]
S2	TTG	ATC	CGG	GAC	AG-	GCT	CGC	CTT	CTT	GAC	[210]
1	..C	CC.	T.A	ACA	.AT	A.C	TAT	A.A	..C	T.T	[210]
5A.A	C-	..T	...	G..	[210]
SA2	ACT	CAT	GGC	TTC	GCT	CGT	TGC	GAG	GTT	GTA	[240]
1	C..	TC.	.AT	GAG	T.A	GTA	.T.	AC.	CAA	.C.	[240]
5	CG.	[240]
SA2	TAT	CCC	CAC	GGC	CAG	ATG	GCT	GTC	GCC	ACA	[270]
1	A.G	ATG	AGA	T..	GTC	C.T	.GC	TCA	.AA	.TG	[270]
5	..T	CA.TT	.A.	[270]
SA2	G--	AGC	CTG	CGC	GCG	ATA	CTA	AAT	GGA	ATA	[300]
1	AGA	T..	.AT	.CT	..C	T.G	..T	--	TAT	T..	[300]
5	..-T.G	--	[300]
SA2	CAC	CTC	CGA	GTT	ACC	GAA	ACG	AGG	TAC	TTC	[330]
1	TCT	TGT	T.C	..A	C..	AT.	TT.	.CA	CT.	GCA	[330]
5	A-	..C	..A	..T	A..	CA.G.	[330]
SA2	ATC	GCT	CCT	CCT	GAT	GAG	CCA	GGC	TGT	CGC	[360]
1	CCT	.AG	TG.	GTG	TG.	.T.	TGT	.A.	AA.	.AG	[360]
5	.TG	.TGC.	...	[360]
SA2	ACA	AAA	CCC	CTT	TGT	AAT	TCA	CTT	CCA	TTG	[390]
1	.T.	TCT	AA.	TGA	..G	.CA	..G	TA.	TAT	.A.	[390]
5T	AT.	.T.	...	[390]
SA2	GAA	TAA	AAA	CAT	AAA	GCT	AAA	GCT	CGG	CTA	[420]
1	AC.	CC.	TGT	G..	C.G	T..	CG.	TAA	TC.	A..	[420]
5	T..	.G.	A..	[420]
SA2	CGA	GAA	AAA	ATG	ATT	AAA	AAA	GAT	TAT	TAA	[450]
1	AAC	AG.	TTC	GGA	C..	T.T	--	A.C	.CG	AGT	[450]
5	TG.	GA.	..-	.T.	...	G..	C-A	T.T	...	T..	[450]
SA2	GTG	CTA	TGG	CTT	TGC						[465]
1	C.A	.G.	CAT	.CG	.C.						[465]
5	..GT	...						

Keterangan :

SA2 DNA *Aeromonas hydrophila* isolat FKH

1 DNA ikan kontrol positif (Ikan yang diberi pakan standart dan diinfeksi *A.hydrophila*)

5 DNA ikan perlakuan P3 (Ikan yang diberi pakan yang mengandung ekstrak bawang putih 10 % kemudian diinfeksi *A.hydrophila*)

Gambar 3 : Hasil analisis sekuen produk PCR *A. hydrophila* murni isolat FKH-UGM dan ginjal ikan perlakuan yang diinfeksi *A. hydrophila*

setelah diisolasi dan dimurnikan dibiakkan pada media kaldu LB dengan umur biakan 18–24 jam kemudian diekstraksi DNA dan dilakukan PCR dengan menggunakan primer *Aero 1*, 5'-ATGCTGCAGAAATGATGAATAGAATAATTACCGC-3' dan *Aero 2*, 5'-ATGCAAGCTTGCCCCA-TAATCTCCCAGCGAT-3', positif terinfeksi *A. hydrophila* dengan munculnya pita untuk gen *aerolysin* (*Aer-A*) dengan bobot molekuler 690 bp. Deteksi *aerolysin* pada sampel ikan yang diambil dari pasar lokal India yang diisolasi dengan menggunakan agar SAA dan diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 37 °C, kemudian diekstraksi DNA nya kemudian di PCR dengan menggunakan primer *Aer 2 F* : 5'-AGCGGCAGAGCCCGTCTATCCA-3' dan *Aer 2R* : 5'-AGTTGGTGGCGGTGTCGTAGCG-3' positif terinfeksi *A. hydrophila* dengan munculnya pita untuk gen *aerolysin* (*Aer-A*) dengan bobot molekuler 416 bp.

Pada penelitian ini *A. hydrophila* (SA2) berasal dari biakan murni yang ditumbuhkan pada media TSB umur 24 jam, gen *aerolysin* terdeteksi dengan bobot molekuler lebih rendah yaitu (462 bp) sedang pada gen *Aer A. hydrophila* yang berasal dari ginjal ikan perlakuan (900 bp). Tingginya bobot molekuler dari hasil deteksi PCR pada DNA ginjal ikan penelitian ini (ikan perlakuan 1, 3, 4, dan 5) mungkin disebabkan karena pada ginjal ikan perlakuan yang diekstrak mengandung genom-genom bakteri lain selain *A. hydrophila* yang juga mengandung gen *aerolysin*. Tercampur genom-genom lain dalam jaringan ginjal dapat menyebabkan primer oligonukleotida yang digunakan selain menyandi gen *aerolysin* *A. hydrophila* juga menyandi genom-genom lain yang terdapat di ginjal ikan. Akan tetapi pada ikan kontrol negatif yang tidak diinfeksi *A. hydrophila* gen *aerolysin* tidak terdeteksi karena ikan tersebut tidak diinfeksi dengan *A. hydrophila*, hal tersebut mengindikasikan ikan perlakuan yang diinfeksi *A. hydrophila* jaringan ginjalnya mengandung gen *aerolysin* dan pada ikan perlakuan 5 (perlakuan bawang putih 10 %) kadar *aerolysin* berkurang dengan terbentuk pita yang tipis.

Hasil penelitian tersebut berbeda dengan yang dilakukan oleh Pollard *et al.*, (1990) dengan menggunakan sampel DNA *A. hydrophila* murni yang diisolasi dari pasien mengidap penyakit diare yang ditumbuhkan pada media agar Mueller–Hinton (Oxoid) diinkubasi 24 jam pada suhu 30°C setelah dilakukan PCR dengan menggunakan primer yang sama (oligonu-

kleotida sintetis) gen *aerolysin* (*Aer-A*) teramplifikasi dengan bobot molekuler 209 bp. Penelitian ini menggunakan isolat biakan murni koleksi laboratorium FKH-UGM (SA2) dengan menggunakan primer yang sama mengacu pada penelitian Pollard *et al.*, (1990), teramplifikasi dengan bobot molekuler 462 bp.

Tingginya hasil amplifikasi mungkin disebabkan karena primer yang digunakan pada penelitian ini tidak spesifik dengan isolat *A. hydrophila* FKH-UGM, karena *A. hydrophila* bersifat serotipe dan biotipe banyak, di samping itu jumlah enterotoksin yang potensial merupakan salah satu penyebab bervariasinya patogenitas, sehingga menunjukkan keragaman yang berbeda dari masing-masing strain *Aeromona*. Bakteri-bakteri tersebut patogen untuk berbagai spesies hewan yang hidup pada kondisi yang berbeda (dari ikan sampai manusia) (Yours *et al.*, 2007).

Sekuensing gen DNA *A. hydrophila*

Hasil sekuen produk PCR *A. hydrophila* (SA2) yang digunakan (isolat FKH-UGM) biakan murni, setelah dilakukan *blast* dan *alignments* menunjukkan total skor 55,4. Dari 144 nukleotida yang teridentifikasi 101 dan mempunyai kesamaan (homolog) sebesar 71 % dengan *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC7966, *complete genome*. Bila hasil sequen dari SA2 (biakan murni) digabung dengan hasil sekuen DNA dari ginjal ikan perlakuan (1 dan 5) terdapat adanya perbedaan, sedangkan bila hasil sekuen DNA ginjal ikan perlakuan 1 dan 5 digabung terdapat adanya kemiripan sebesar 82,6 % (dari 454 nukleotida 79 mengalami perbedaan). Hasil sequen DNA jaringan ginjal ikan yang mengandung gen *aerolysin* dari *A. hydrophila* setelah dilakukan *blast* tidak dapat ditemukan kemiripan dengan *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC7966, *complete genome* hal ini mungkin karena sampel *A. hydrophila* dari ginjal dianalisis langsung tanpa dimurnikan terlebih dahulu. Kemungkinan pada jaringan ginjal ikan tersebut sudah terdapat pengaruh pemberian bawang putih (merupakan bahan alami yang mengandung antimikroba) yang diberikan selama 30 hari, kemudian adanya uji tantang dengan *A. hydrophila*, dan juga adanya pengaruh sistem pertahanan tubuh yang terbentuk (tanggap kebal). Yuwono (2006) menyatakan bahwa PCR dengan menggunakan sampel DNA yang diekstrak dari jaringan yang diawetkan hasilnya tidak seefisien hasil PCR yang menggunakan

DNA yang sudah dimurnikan, akan tetapi PCR (dengan target DNA) dapat digunakan untuk deteksi gen asing dan deteksi perubahan gen. Gen asing yang dideteksi dapat berupa hasil infeksi oleh suatu jasad misalnya bakteri, jamur, maupun virus atau gen asing yang merupakan hasil introduksi. Teknik PCR dengan menggunakan jaringan mempunyai kelemahan, sering disebabkan oleh applifikasi DNA nonspesifik karena proses mispriming (Yuwono, 2006).

Aeromonas hydrophila isolat FKH-UGM yang digunakan belum pernah dilakukan uji molekuler, hal ini yang menyebabkan adanya perbedaan karena banyaknya strain *Aeromonas*, dan juga banyaknya kemiripan strain yang terdaftar di Gen Bank, sehingga pada saat dilakukan *blast* kecocokannya hanya 71 %. Pada kenyataannya *A. hydrophila*, yang terdiri dari banyak strain dan biotipe terdapat adanya perbedaan diskripsi dilihat dari fenotip, serologi dan genotipe sehingga menyebabkan rumitnya menentukan perumpunan status taksonomi dari *A. hydrophila* (Austin dan Austin, 1987).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa PCR dapat mendeteksi gen *aerolysin* dari *A. hydrophila*. Gen *aerolysin* dapat dideteksi tergantung dengan jenis primer yang digunakan, dengan menggunakan primer oligonukleotida gen *aerolysin* yang diekstrak dari ginjal ikan menunjukkan bobot molekul sekitar 900 bp, sedangkan gen *aerolysin* yang berasal dari biakan murni *A. hydrophila* isolat FKH-UGM teramplifikasi dengan berat molekul 462 bp. Setelah dilakukan analisa Blast pada isolat *A. hydrophila* FKH-UGM mempunyai kesamaan (homolog) sebesar 71 % dengan *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC7966

SARAN

Untuk pemeriksaan molekuler dengan PCR disarankan bakteri yang akan digunakan dimurnikan terlebih dahulu agar supaya tidak tercampur dengan genom-genom yang lain dan juga primer yang digunakan sebaiknya yang spesifik (dirancang terlebih dahulu) agar dapat mengamplifikasi gen yang diharapkan. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui keberadaan gen *Aer* dari *A. hydrophila* akibat pengaruh pemberian bawang putih.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada LPPM-UGM yang telah memberikan bantuan dana melalui anggaran DIPA UGM sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan lancar. Penulis juga mengucapkan terima kasih Kepada BPPS DIKTI yang telah memberikan beasiswa kepada penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Austin B, Austin DA. 1993. *Bacterial Fish Pathogens. Disease In Farmed and Wild Fish*. Second Edition New York.
- Frandsen RD. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Edisi ke 4, Alih Bahasa oleh Sigandono, B dan Praseno, K., (Judul Asli : *Anatomy and Physiology of Farm Animal*). Yogyakarta. Gadjah Mada University Press. Hal. 356,434 -436, 366, 507,525.
- Fulder, S., Blackwood, J dan Soestrisno, E. 2000. *Terapi Bawang Putih Obat Asli Alami*. Inovasi. Jakarta 115 hal.
- Gustafson CE, Thomas CJ, Trevor J. 1992. Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using Polymerase Chain Reaction Amplification of the virulence array protein. *App Environ Microbiol*, 58 (12): 3816 - 3825
- Lukistiyowati I, Saberina H, 2004. Pemanfaatan ekstrak bawang putih *Allium sativum* untuk Pengobatan Penyakit Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Laporan Penelitian*. Lembaga Penelitian Universitas Riau.
- Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Rozee KR. 1990. Detection of the Aerolysin Gene in *Aeromonas hydrophila* by the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. Nov. 2477 – 2481
- Porteen K, Agarwal RK, Bhilegaonkar KN. 2007. Detection of *Aeromonas* sp from Chicken and Fish Samples by Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Food Technology* 2 (1) : 30 – 37
- Post G. 1987. *Textbook of Fish Health*. New Jersey. TFH Publication Inc, Neptune. P. 288 pp
- Salaby AM, Khattab YA, Rahman AAM. 2006. Effects of Garlic (*Allium sativum*) and Chloramphenicol on Growth Performance, Physiological Parameters and Survival of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 12 (2) : 172 – 2001.

- Yagananth N, Bhakayaraj R, Chanthuru A, T. Anbalaga T, Nila KM. 2009. Detection of Virulence Gene in *Aeromonas hydrophila* Isolate from Fish Samples Using PCR Technique. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 4 (1) : 51 – 53
- Yousr AH, Napis S, Rusul GRA, Son R. 2007. Detection of Aerolysin and Hemolysin Genes in *Aeromonas* spp. Isolated from Enviromental and Shellfish Sources by Polymerase Chain Reaction. *Asean Food Journal* 14 (2) : 115 – 122
- Yusoff FM, Subangsihe RP. 1995. Histopatology *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius gonionotus* to different nitrit concentration. In : M. Sharif, J.R.Artur and R.P. Subangsihe (Eds). Diseases in Asian Aquaculture II. *Proceeding of second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 25- 29th October 1993. Asian Fisheries Society, Manila. P 275 – 284*
- Juwono T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Panduan Eksperimen PCR untuk memecahkan masalah biologi terkini*. Yogyakarta. Penerbit Andi.