

## BAB I PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang Masalah

*Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang tersebar luas di lingkungan, terutama di air tawar dan memiliki sifat patogen pada manusia serta dapat menyebabkan penyakit pada hewan (Martin-Carnahan & Joseph, 2005; EPA, 2006). *A. hydrophila* umum dijumpai pada ekosistem perairan dan mempunyai peranan sebagai *microbial flora* bagi organisme air pada kondisi lingkungan yang stabil (Mangunwardoyo *et al.*, 2010). Bakteri ini juga secara normal berada pada intestin ikan sebagai *microbial flora* (Trush *et al.*, 1974; Illanchezian *et al.*, 2010). *A. hydrophila* dikenal sebagai bakteri yang bersifat oportunistis, yaitu jarang menyerang pada ikan yang sehat tetapi dapat menginfeksi pada saat sistem pertahanan tubuh ikan sedang menurun akibat stress. Gejala ikan yang terinfeksi oleh bakteri ini bervariasi, namun umumnya ditandai dengan adanya hemoragik pada kulit, insang, rongga mulut, dan borok pada kulit (Gardenia *et al.*, 2010).

*Aeromonas* memiliki taksonomi yang kompleks dengan karakter yang berbeda-beda bahkan di level intraspecies (Soler *et al.*, 2004; Ottaviani *et al.*, 2011). Hal ini menjadikan pengidentifikasian bakteri *A. hydrophila* dirasa penting mengingat akan besarnya pengaruh bakteri tersebut terhadap budidaya ikan. Pada umumnya identifikasi dan analisis atau pengkarakterisasian suatu bakteri dilakukan secara konvensional melalui studi morfologi dan biokimia. Pengkarakterisasian bakteri meliputi pengamatan mikroskopis dan pewarnaan bakteri yang bertujuan untuk mengetahui penampakan mikroskopik bakteri dan membedakan golongan-golongan mikroorganisme, sedangkan pengkarakterisasian menggunakan uji-uji biokimia dapat mencerminkan aktivitas metabolisme enzimatik mikroorganisme. Namun, metode identifikasi konvensional ini memiliki kemungkinan bakteri lain yang memiliki fenotip yang sama teridentifikasi menjadi spesies yang sama, padahal keduanya belum tentu secara genetik memiliki kesamaan. Sehingga untuk mengidentifikasi bakteri

Maesaroh, 2013

Analisis Filogenetika Isolat Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Dari Ikan Sehat Menggunakan Gen 16S rRNA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

secara pasti pada tingkatan spesies diperlukan identifikasi lebih lanjut menggunakan analisis secara molekuler. Teknik identifikasi menggunakan biologi molekuler telah berhasil mengidentifikasi kelompok mikroorganisme dari lingkungan secara spesifik (Gonzales *et al.*, 2001).

Teknik yang saat ini populer untuk mengidentifikasi dan menganalisis suatu bakteri yaitu dengan menggunakan teknologi analisis sekuens suatu gen. Gen yang sering digunakan dalam mengidentifikasi bakteri adalah gen 16S rRNA. Gen ini merupakan gen yang mengkode RNA ribosomal pada sub unit kecil ribosom dan memiliki urutan nukleotida yang khas dan berbeda pada setiap bakteri (Gonzales & Saiz, 2005). Selain itu, 16S rRNA ini lebih stabil dan tepat digunakan sebagai penanda molekuler spesifik untuk identifikasi bakteri (Singh *et al.*, 2012). 16S rRNA juga bersifat ubikuitus (keberadaannya selalu dipertahankan dalam kondisi apapun) dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme (Pangastuti, 2006). Oleh sebab itu, penggunaan 16S rRNA sangat tepat dalam mengidentifikasi dan menganalisis suatu spesies dalam taraf molekuler.

Pendeteksian bakteri *A. hydrophila* pada ikan sakit telah banyak dilakukan untuk mengetahui karakteristik setiap jenis *A. hydrophila* yang menginfeksi ikan tersebut, hal ini sangat penting dalam mendiagnosis penyakit pada ikan (Swaminathan *et al.*, 2004). Namun, pendeteksian *A. hydrophila* pada ikan sehat masih sangat jarang dilakukan, padahal hal ini penting mengingat akan keberadaan *A. hydrophila* sebagai *microbial flora* pada ikan sehat yang dapat berubah menjadi patogen pada ikan tersebut bila kondisi sistem pertahanan ikan sedang menurun. Sehingga pendeteksian *A. hydrophila* pada ikan sehat penting dilakukan sebagai landasan awal dalam memantau perkembangan jangkitan penyakit pada ikan. Dalam mendeteksi *A. hydrophila* secara cepat, Cascon *et al.* (1996) merancang primer suatu gen untuk *A. hydrophila*, gen tersebut adalah gen lipase yang menghasilkan amplifikasi (amplikon) pada ukuran 760 pb. Saat ini gen *lip* tersebut telah banyak digunakan untuk mendeteksi *A. hydrophila*, seperti yang telah dilakukan oleh Lee *et al.* (2000) yang menggunakan gen *lip* hasil desain Cascon *et al.* (1996) untuk mendeteksi delapan isolat *A. hydrophila* yang diisolasi dari ikan sakit, selain itu Swaminathan *et al.* (2004) mendeteksi sembilan

isolat bakteri yang diisolasi dari ikan dan air menggunakan gen *lip* dan hasil amplifikasi yang berukuran 760 pb ditunjukkan oleh empat spesies yang merupakan *A. hydrophila*. Metode ini dapat dengan cepat dan spesifik dalam mengidentifikasi *A. hydrophila* yang diisolasi dari lingkungan perairan.

Pendeteksian faktor virulen pada *A. hydrophila* merupakan komponen penting dalam mendeterminasi potensi patogen karena faktor-faktor ini bertindak secara multifungsi dan multifaktor (Nam & Joh, 2007). Keragaman genotip yang dimiliki *A. hydrophila* menyebabkan timbulnya potensi patogen yang bervariasi (Carvalho-Castro *et al.*, 2010). Kelompok gen virulen tertentu dengan kehadiran dan ketidakhadiran gen virulen tertentu akan mempengaruhi tingkat virulensi suatu bakteri *A. hydrophila* (Li *et al.*, 2011). Wulandari (2012) dan Syadza (2012) menyebutkan bahwa isolat *A. hydrophila* ATCC 7966 memiliki karakter gen virulen  $aerA^+$ ,  $act^+$ ,  $alt^+$ ,  $ast^+$ ,  $ascV^-$ ,  $aopB^-$ , dan  $aexT^-$ . Sedangkan isolat A2 yang diisolasi dari ikan Botia sakit memiliki karakteristik genetik  $aerA^+$ ,  $ascV^+$ ,  $aopB^+$ , dan  $aexT^{++}$  (Syadza, 2012) dan isolat AKS yang diisolasi dari air kolam Sukabumi memiliki karakteristik genetik  $aerA^+$ ,  $act^+$ ,  $alt^+$ ,  $ast^-$  (Wulandari, 2012). Dari uji patogenitas isolat A2 dan AKS terhadap ikan gurame varietas tutug oncom menunjukkan tingkat patogenitas yang berbeda, tingkat patogenitas isolat A2 dengan nilai  $LD_{50} = 10^{6,91}$  termasuk kedalam kelompok virulen sedang, sedangkan isolat AKS memiliki nilai  $LD_{50} > 10^8$  yang termasuk kedalam kelompok avirulen. Melihat dari hasil penelitian Wulandari dan Syadza (2012), maka perlu kiranya dilakukan pendeteksian ketujuh gen virulen tersebut terhadap isolat *A. hydrophila* yang di dapat dari ikan sehat untuk mengetahui keberadaan gen-gen virulen yang diharapkan dapat menggambarkan potensi patogen dari setiap isolat bakteri yang didapat.

Dari latar belakang tersebut dibutuhkan analisis filogenetika bakteri *A. hydrophila* dari isolat ikan sehat dengan menggunakan gen penanda 16S rRNA untuk melihat keragaman dan kekerabatan bakteri *A. hydrophila* dari ikan sehat. Pengkarakterisasian bakteri *A. hydrophila* secara morfologi dan biokimia dirasa penting dilakukan dalam penelitian ini guna untuk menyeleksi tahap awal bakteri *A. hydrophila* dari intestin ikan sehat dan pada akhirnya hasil dari uji ini dapat

menggambarkan karakteristik dari setiap isolat bakteri *A. hydrophila* yang terpilih dalam penelitian ini. Selain itu, dibutuhkan pula pendeteksian gen-gen virulen terhadap semua isolat *A. hydrophila* yang didapat untuk mengetahui keberadaan gen-gen virulen yang diharapkan dapat menggambarkan potensi patogen dari setiap bakteri.

#### **B. Rumusan Masalah**

Bagaimanakah hubungan filogenetika bakteri *A. hydrophila* dari isolat beberapa ikan sehat dengan gen penanda 16S rRNA?

#### **C. Pertanyaan Penelitian**

1. Bagaimanakah karakteristik *A. hydrophila* yang terdapat pada intestin ikan sehat secara biokimia dan morfologi?
2. Bagaimanakah hubungan kekerabatan *A. hydrophila* yang didapat dari beberapa ikan sehat berdasarkan sikuen gen 16S rRNA?
3. Bagaimanakah keberadaan gen-gen virulen pada setiap *A. hydrophila* yang didapat dari ikan sehat?

#### **D. Tujuan**

1. Untuk mengetahui karakteristik *A. hydrophila* yang hidup di ikan sehat secara biokimia dan morfologi.
2. Untuk mengetahui hubungan kekerabatan *A. hydrophila* yang didapat dari beberapa ikan sehat berdasarkan sikuen gen 16S rRNA.
3. Untuk mengetahui keberadaan gen-gen virulen dari setiap isolat bakteri *A. hydrophila* yang didapat dari ikan sehat.

#### **E. Manfaat Penelitian**

1. Memberikan informasi mengenai karakteristik bakteri *A. hydrophila* dari ikan sehat.
2. Memberi gambaran mengenai hubungan kekerabatan bakteri *A. hydrophila* yang diisolasi dari beberapa ikan sehat.

Maesaroh, 2013

Analisis Filogenetika Isolat Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Dari Ikan Sehat Menggunakan Gen 16S rRNA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3. Dapat menggambarkan potensi patogen dari setiap bakteri *A. hydrophila* dilihat dari kelimpahan gen-gen virulen yang dimilikinya.
4. Dapat dijadikan sebagai landasan awal dalam pengontrolan perkembangan jangkitan penyakit pada ikan yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*.
5. Sebagai tambahan ilmu khususnya bidang mikrobiologi dan biologi molekuler.

#### **F. Batasan Penelitian**

1. Ikan sehat yang digunakan merupakan ikan air tawar yaitu ikan tawes, ikan mas, ikan lele, ikan gurame, dan ikan nila.
2. Organ yang digunakan dalam mengisolasi bakteri *A. hydrophila* yaitu intestin.
3. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA adalah primer forward 27F dan primer reverse 1492R (Lane, 1991; Hill *et al.*, 2003).
4. Isolat bakteri *A. hydrophila* yang digunakan merupakan bakteri yang didapat dari beda jenis ikan atau ikan yang sejenis namun beda individu.