

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Dalam suatu kegiatan budidaya ikan, banyak permasalahan yang dihadapi oleh para pembudidaya ikan. Permasalahan tersebut diantaranya adalah mahalnya pakan, susah nya ketersediaan benih yang berkualitas, biaya pembuatan kolam yang besar, pengontrolan yang wajib dilakukan setiap saat, susah nya ikan beradaptasi dengan lingkungan, dan juga permasalahan penyakit. Ada banyak penyakit yang terjadi pada ikan dan kebanyakan dari penyakit ini disebabkan oleh bakteri. Salah satu bakteri yang menjadi perhatian adalah bakteri *Aeromonas*. Salah satu penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas* adalah penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS). MAS merupakan penyakit serius yang menyerang semua jenis ikan air tawar di daerah tropis. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* yang dapat ditemukan di berbagai ekosistem perairan, seperti danau dan sungai. Bakteri ini tidak hanya menginfeksi ikan, namun juga patogen terhadap udang dan amfibi (Austin *et al.*, 2007). Mikroorganisme ini, telah diidentifikasi sebagai patogen utama penyebab diare akut pada manusia yang imunokompeten dari segala usia (Wang *et al.*, 2003)

Penyakit MAS ini seringkali mewabah di Asia Tenggara dan merupakan salah satu penyakit yang dapat mematikan ikan secara total. *Aeromonas hydrophila* merupakan patogen oportunistik yang menyerang ikan yang mengalami stress. Penyebab utama dari penyakit ini adalah suhu air yang tinggi, kadar amonia dan nitrit yang tinggi, perubahan pH pada air, kadar oksigen terlarut yang rendah, infeksi parasit, kepadatan yang tinggi, serta penanganan dan transportasi yang kasar (Camus A. C. *et al.*, 1998). Gejala yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* ini adalah gejala klinis berupa luka di bagian tubuh ikan di mana hampir seluruh komoditas perikanan di Indonesia terutama di Jawa Barat penyakit ini sempat menjadi wabah yang sangat mematikan dan menyebabkan kerugian yang sangat besar (Haryani *et al.*, 2012).

Aeromonas hydrophila adalah bakteri Gram negatif, berbentuk batang/kokus, Oksidase-positif, bakteri *anaerob* fakultatif yang termasuk kedalam keluarga Aeromonadaceae. Bakteri ini ditemukan secara global di lingkungan perairan, termasuk air tanah, air permukaan, muara dan air laut, air minum, dan air limbah

dan memiliki 17 kelompok hibridisasi, 24 spesies yang diakui, 12 subspecies, dan 2 biovar (Du *et al.*, 2021).

Taksonomi yang kompleks disertai dengan karakter yang berbeda-beda dimiliki oleh *Aeromonas* bahkan hingga level intraspecies, menjadikan pengidentifikasian bakteri *A. hydrophilla* ini membuka sebuah peluang yang baik dan penting dikarenakan pengaruh bakteri ini cukup besar, bukan hanya terhadap budidaya ikan, namun juga bisa menyerang manusia. Identifikasi dan analisis umumnya dilakukan secara konvensional dengan studi morfologi dan biokimia. Namun kedua metode ini membutuhkan waktu yang cukup lama untuk dapat mendeteksi mikro organisme, selain itu bahan yang digunakan pun lebih banyak untuk mendeteksi bakteri virulen melalui faktor virulensi di tingkat spesies.

Faktor virulensi yang paling kuat pada genus *Aeromonas* adalah *Exotoxins* di mana di dalamnya terdapat *cytotoxic heat-labile enterotoxin (Act)* yang dikenali juga sebagai Aerolysin/hemolysin; *a cytotoxic heat-labile enterotoxin (Alt)* yang dikenal juga sebagai lipase, lipase ekstraseluler, atau fosfolipase; dan *cytotoxic heat-stable enterotoxin (Ast)*. Racun-racun ini dikodekan dengan gen *act*, *alt*, dan *ast* (Hussain *et al.*, 2013). Menurut penelitian Xiong (2019), ada tujuh gen virulen yang paling penting yang menandakan gen virulen *Aeromonas spp.* pada ikan, gen tersebut di antaranya adalah aerolisin (*aer*), hemolisin (*hly*), *cytotoxic heat-labile enterotoxin (alt)*, *stable temperature cytotoxic (ast)*, *cytotoxic heat-labile enterotoxin (act)*, *Temperature-sensitive protease (epr)*, dan *extracellular serine protease (ahp)*.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Triani (2020) *Aeromonas hydrophilla* yang diuji memiliki pola distribusi gen virulen dengan karakteristik seperti berikut, gen *alt* dan gen *pla/lip* ditemukan 100% pada *Aeromonas hydrophilla* diikuti oleh gen *AerA*, *hlyA* dan *ahyB* yang merupakan gen hemolisin ditemukan ketiganya sebanyak 75%, gen *act* dan *ast* 50%. Karakteristik pola distribusi ini tidak jauh berbeda bahkan lebih baik dibandingkan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Xiong (2019) di mana didapatkan empat hingga tujuh gen virulen pada *Aeromonas hydrophilla* dengan pola distribusi gen *epr* (72 %) dan *alt* (70 %), diikuti oleh *hlyA* (62 %), *ast* (60 %), *aerA* (52 %), *ahpA* (52 %), dan *act* (24 %). Hal ini mendasari dikembangkannya penanda genetik *Aeromonas hydrophilla*

yang patogen.

Pendeteksian gen *Aeromonas hydrophila* dilakukan dengan menggunakan metode deteksi molekuler *multiplex* PCR (mPCR) yang merupakan metode yang populer digunakan saat ini karena dapat mendeteksi dengan waktu yang singkat secara efisien dan murah dibandingkan dengan metode biasa (Hussain *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2019). Pendeteksian secara spesifik virulen dari *Aeromonas* ini telah dilakukan oleh Xiong (2019) di mana gen yang digunakan cukup beragam dan hingga saat ini belum ada penelitian lebih lanjut untuk pendekteksian bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* dengan menggunakan penanda gen virulen yang spesifik di tingkat spesies dengan metode mPCR.

Penelitian ini merupakan pengembangan dari penelitian yang sebelumnya dilakukan oleh Triani (2020), di mana ditemukan beberapa primer yang efektif digunakan untuk mendeteksi *Aeromonas hydrophila*. Primer yang digunakan pada penelitian tersebut ada dua, kit *multiplex* primer yang masing-masing terdiri dari tiga pasang gen virulen. Namun urutan DNA dari primer tersebut berasal dari studi pustaka Kusumawaty (2016) dan Xiong (2019). Berdasarkan hal tersebut pada penelitian ini akan dicoba mendesain urutan *multiplex* primer berdasarkan gen virulen *A. hydrophila* yang terdiri dari 5-6 kombinasi gen virulen.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu “Bagaimana urutan DNA primer *multiplex Aeromonas hydrophila* berdasarkan gen virulen yang dapat menghasilkan amplikon yang dapat terbedakan pada proses elektroforesis gel agarose?”.

1.3. Pertanyaan Penelitian

Rumusan di atas dapat dikembangkan kembali menjadi beberapa pertanyaan, sebagai berikut.

1. Apakah primer yang dirancang berhasil menyatu dengan DNA yang diuji secara *in vitro*?
2. Adakah gen virulen pada isolat DNA yang diujikan?
3. Adakah perbedaan gen virulen yang terdapat pada spesies *Aeromonas* yang lain dengan *Aeromonas hydrophila*?

1.4. Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Isolat bakteri yang digunakan sebanyak lima isolat bakteri, empat bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan strain yang berbeda dan satu bakteri *Aeromonas taiwanensis*.
2. Isolat bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas taiwanensis* didapatkan dari *Indonesian Culture Collection* (InaCC) dan Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung (SITH ITB), selain itu digunakan juga isolat *Aeromonas hydrophila* IBN dan *Aeromonas hydrophila* M3 yang tersimpan secara *cryopreservasi* pada *freezer* Laboratorium Riset Bioteknologi, FPMIPA B, UPI, Bandung, Jawa Barat.
3. Penelitian dilakukan secara *in vitro* di mana digunakan 10 Primer yang didesain secara mandiri berdasarkan pustaka primer gen virulen *A. hydrophila* penelitian Kusumawaty (2016) dan Xiong (2019).
4. Parameter yang digunakan untuk melihat keberhasilan pendeteksian *Aeromonas hydrophila* menggunakan primer mPCR yang di desain pada penelitian ini adalah dengan terdeteksinya gen virulen spesifik pada strain *Aeromonas hydrophila*.

1.5. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu mendesain urutan primer yang dapat mendeteksi bakteri *Aeromonas* terutama *Aeromonas hydrophila* yang patogen dan amplicon yang dapat dibedakan pada elektroforesis gel agarose.

1.6. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Memberi referensi baru untuk melanjutkan penelitian mengenai penanda genetik pada *Aeromonas hydrophila*.
2. Mendapatkan primer mPCR berdasarkan gen virulen untuk dijadikan sebagai penanda *Aeromonas hydrophila* yang patogen.
3. Mempercepat pendeteksian *Aeromonas hydrophila* dengan menggunakan penanda genetik.

1.7. Struktur Organisasi

Secara keseluruhan, isi dari skripsi ini meliputi lima bab. Seluruh bab yang

terdapat dalam skripsi ini saling berkaitan dan melengkapi satu dan yang lainnya. Di antaranya adalah Bab I Pendahuluan, Bab II Kajian Pustaka, Bab III Metode Penelitian, Bab IV Temuan dan Pembahasan, serta Bab V yang berisi Kesimpulan, Implikasi, Rekomendasi, dan Hambatan Penelitian.

Bab I menjelaskan mengenai pendahuluan yang terdiri atas latar belakang penelitian, rumusan masalah, pertanyaan penelitian, batasan masalah, tujuan dari penelitian, serta manfaat dari penelitian yang dilakukan. Latar belakang penelitian ini membahas mengenai penyakit MAS di mana penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* dan merugikan banyak pihak bahkan banyak negara namun sampai saat ini belum ada yang menemukan penanda genetik yang secara spesifik mampu mendeteksi bahwa bakteri yang didapatkan merupakan *Aeromonas hydrophila* patogen atau bukan. Selanjutnya Bab II memaparkan mengenai kajian pustaka yang berkaitan dengan penelitian. Kajian tersebut meliputi bakteri yang digunakan (Klasifikasi, Habitat dan penyebaran *Aeromonas hydrophila*, Patogenitas *Aeromonas hydrophila*), Faktor Virulensi (Struktural dan Enzim Ekstraseluler), PCR, *Multiplex* PCR (mPCR), Perancangan primer, Penanda Genetik, dan Elektroforesis. Pada Bab III merode mengenai penelitian yang dilakukan diuraikan, di antaranya adalah jenis penelitian, waktu dan tempat dilaksanakan penelitian, dan prosedur penelitian yang didalamnya membahas mengenai tahap persiapan (persiapan alat dan perancangan primer secara *in silico*), tahap penelitian (Pengujian kualitatif DNA, Pengujian *Single* PCR, Pengujian *Multiplex* PCR, dan analisis data). Bab IV memaparkan temuan serta pembahasannya. Pembahasan tersebut didukung dengan teori dari penelitian sebelumnya yang berkaitan dengan penelitian yang dilakukan. Terakhir adalah Bab V di mana dijelaskan kesimpulan, impilkasi, rekomendasi, dan hambatan penelitian guna memberikan gambaran terhadap penelitian yang dilakukan agar penelitian ini dapat dikembangkan dan disempurnakan.