

IDENTIFIKASI MARKA MOLEKULER DAYA TAHAN INFEKSI *Aeromonas hydrophila* PADA LELE DUMBO *Clarias gariepinus* DENGAN METODE RAPD-PCR

IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS IN FISH RESISTANCY *Aeromonas hydrophila* INFECTION ON DUMBO CATFISH *Clarias gariepinus* USING RAPD-PCR METHODS

Ika Safitri¹⁾, Hasan Nasrullah¹⁾, Yanti Inneke Nababan¹⁾, Dinar Tri Soelistyawati¹⁾, dan Alimuddin Alimuddin¹⁾

¹⁾Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, 16680
ikasafitri0998@gmail.com

ABSTRAK

Pencegahan penyakit *motile aeromonas septicemia* (MAS) pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) dapat dilakukan melalui seleksi ikan berbasis marka molekuler menggunakan teknik *random amplified polymorphic DNA* PCR (RAPD-PCR) untuk mengidentifikasi keberadaan fragmen pita yang kemungkinan terkait dengan daya tahan terhadap penyakit MAS. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandidat marka molekuler daya tahan penyakit pada ikan lele dumbo setelah diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Penelitian ini menggunakan 4 jenis primer RAPD dengan sekuen berbeda sebagai tahap optimasi kerja. Sampel DNA yang diamati berasal dari ikan yang tahan (*resistant*) dan rentan (*susceptible*) pascainfeksi masing-masing sebanyak 8 sampel. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandidat marka molekuler terkait daya tahan terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada lele dumbo bertahan hidup pasca penyuntikan bakteri *A. hydrophila* 10^7 CFU ml⁻¹ memiliki pita DNA berukuran sekitar 1700 bp dengan peluang populasi resistan sebesar 87.5%.

KATA KUNCI: DNA, lele dumbo, primer, RAPD

ABSTRACT

Prevention of motile aeromonas septicemia (MAS) disease on dumbo catfish (Clarias gariepinus) can be done by selecting fish based on the molecular markers using random amplified polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR) method to identify the existence of band fragment that possibly has a connection with fish' resistancy against the MAS disease. This research aimed to identify molecular markers candidate in Dumbo Catfish immune system after being infected by Aeromonas hydrophilla. This research used 4 types of RAPD primer with different sequences as as work optimization stage. The DNA samples observed were from resistant fish and susceptible fish post-infection each 8 samples. Results of this research showed that the candidate molecular markers related to resistance to Aeromonas hydrophilla bacterial infection in dumbo catfish survived after the injection of the bacterium A. hydrophila 10^7 CFU ml⁻¹ had a DNA band measuring around 1700 bp with a resistan population chance of 87.5%.

KEY WORDS : DNA, dumbo catfish, primer, RAPD

PENDAHULUAN

Ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) dapat dibudidayakan dengan padat tebar yang tinggi di lahan dengan sumber air terbatas. Namun demikian, risiko dalam budidaya ikan lele dumbo dengan padat tebar tinggi adalah berpeluang tinggi terjadi penyebaran penyakit. Menurut Asniatih, *et al.* (2013), agen penyebab penyakit pada ikan lele dumbo salah satunya adalah penyakit bercak merah atau *motile aeromonas septicemia* (MAS) yang diakibatkan oleh adanya infeksi atau paparan dari bakteri Gram negatif *Aeromonas hydrophila*. Gejala serangan penyakit yang tampak secara eksternal yaitu abses di rongga perut, mata mengalami *exophthalmia*, luka dan kemerahan pada kulit, pendarahan pada insang dan ginjal, serta nekrosis pada ginjal dan hati. Akibat serangan penyakit tersebut dalam waktu singkat menyebabkan angka kematian tinggi hingga mencapai 100% (Triyaningsih, *et al.* 2014).

Pencegahan penyakit MAS yang banyak dilakukan yaitu memperbaiki imunitas ikan dari eksternal dengan pemberian fitofarmaka. Alternatif lainnya yaitu melakukan perbaikan kualitas genetik melalui seleksi ikan berbasis marka molekuler. Salah satu keunggulan menerapkan seleksi berbasis marka molekuler yaitu proses seleksi ikan memiliki akurasi lebih tinggi daripada menggunakan seleksi morfologi (Mulyasari, 2007). Berbagai contoh seleksi dengan bantuan marka molekuler untuk gen daya tahan ikan terhadap penyakit MAS adalah menggunakan marka *major histocompatibility complex* (MHC) yang telah diteliti pada ikan patin siam (Kusbiyanto *et al.* 2017) dan ikan lele (Suprpto, 2017).

Langkah awal yang perlu dilakukan dalam penerapan seleksi berbasis marka molekuler yaitu mengidentifikasi keberadaan fragmen pita yang kemungkinan terkait dengan daya tahan terhadap penyakit MAS. Teknik *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) merupakan teknik yang cepat dan efisien untuk mengidentifikasi sejumlah besar polimorfisme DNA pada genom. Mekanisme kerjanya melibatkan teknik amplifikasi DNA menggunakan primer RAPD dengan *polymerase chain reaction* (Maqsood dan Ahmad, 2017). Primer RAPD merupakan primer tunggal, tidak spesifik untuk gen tertentu, mengikat DNA komplemennya, serta urutan basa yang acak sehingga dapat menghasilkan kopi segmen DNA yang banyak (Anggereini 2008). Teknik tersebut dapat digunakan untuk identifikasi ikan tahan terhadap penyakit (Kusminies, *et al.* 2011). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandidat marka molekuler daya tahan penyakit pada ikan lele dumbo setelah diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari-April 2019. Lokasi penelitian bertempat di Laboratorium Reproduksi dan Genetika Organisme Akuatik, Departemen Budidaya Perairan, Institut Pertanian Bogor.

Tahap pengumpulan data meliputi:

Persiapan ikan uji.

Benih ikan lele dumbo yang digunakan dalam penelitian ini memiliki bobot rata-rata 5-7 gram sebanyak 260 ekor. Benih ikan lele dumbo berasal dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi, Jawa Barat. Ikan dipelihara dalam akuarium berukuran 60×50×40 cm³ yang digunakan untuk ujiantang. Akuarium di desinfeksi menggunakan klorin 30 ppm selama 24 jam. Ikan diadaptasikan pada akuarium dengan volume air 40 L dan diberi aerasi.

Penentuan *Lethal Dose 50% (LD₅₀)* dan Infeksi *A. Hydrophila*

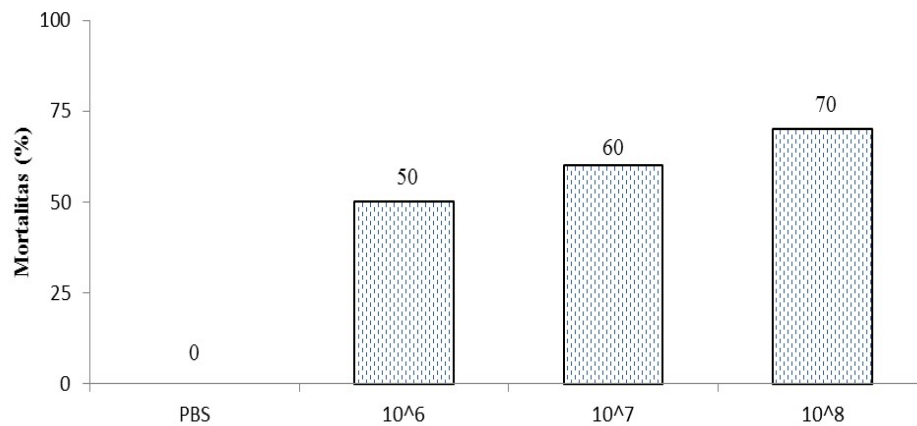
Pengujian LD₅₀ dilakukan untuk mengetahui kepadatan bakteri yang dapat mematikan setengah dari populasi ikan uji. Penentuan LD₅₀ menggunakan bakteri kepadatan 10⁶ – 10⁸ CFU ml⁻¹. Ikan lele (n=20) disuntik dengan masing-masing dosis secara intramuskuler. Tingkat kelangsungan hidup ikan diamati setelah 24 jam. Setelah dilakukan penentuan LD, ikan lele (n=200) diinjeksi dengan bakteri *A. hydrophila* pada dosis 10⁷ CFU ml⁻¹, kontrol (n=60) diinjeksi dengan larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS). Pemeliharaan dilakukan selama 24 jam dan diberi aerasi. Tingkat kelangsungan hidup, mortalitas dan gejala klinis diamati setelah 24 jam pemeliharaan.

Tahap selanjutnya yaitu isolasi jaringan dan ekstraksi DNA, amplifikasi *polymerase chain reaction* (PCR) RAPD dan visualisasi produk hasil PCR. Data gejala klinis serta visualisasi produk PCR dianalisis secara kualitatif dan ditampilkan dalam bentuk gambar.

HASIL DAN BAHASAN

Penentuan *Lethal Dose 50% (LD₅₀)*

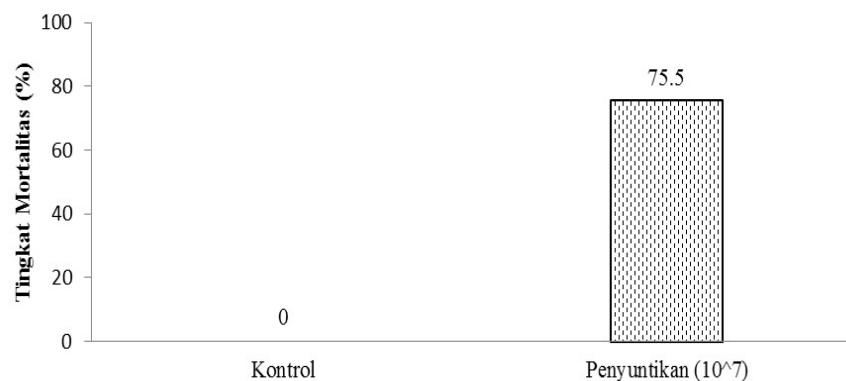
Berdasarkan hasil penentuan LD₅₀ menggunakan konsentrasi yang berbeda menunjukkan bahwa bakteri *A. hydrophila* dengan konsentrasi 10^6 dapat mematikan 50% populasi. Namun, konsentrasi 10^7 yang digunakan dalam penyuntikan ikan lele dumbo.



Gambar 1 Penentuan LD₅₀ ikan lele dumbo pasca infeksi *A. hydrophila*

Tingkat Mortalitas

Tingkat mortalitas pasca infeksi *A. hydrophila* dengan dosis 10^7 CFU ml⁻¹ yang diamati setelah 24 jam tersaji pada Gambar 2. Data menunjukkan bahwa tingkat mortalitas ikan lele yang diinfeksi bakteri AH mencapai 75.5%, dibandingkan dengan kontrol yang tidak ditemukan kematian. Hal tersebut menandakan bahwa sekitar 75.5% ikan lele dumbo rentan terhadap infeksi *A. hydrophila*, sedangkan sekitar 24.5% ikan lele tahan terhadap infeksi *A. hydrophila*.

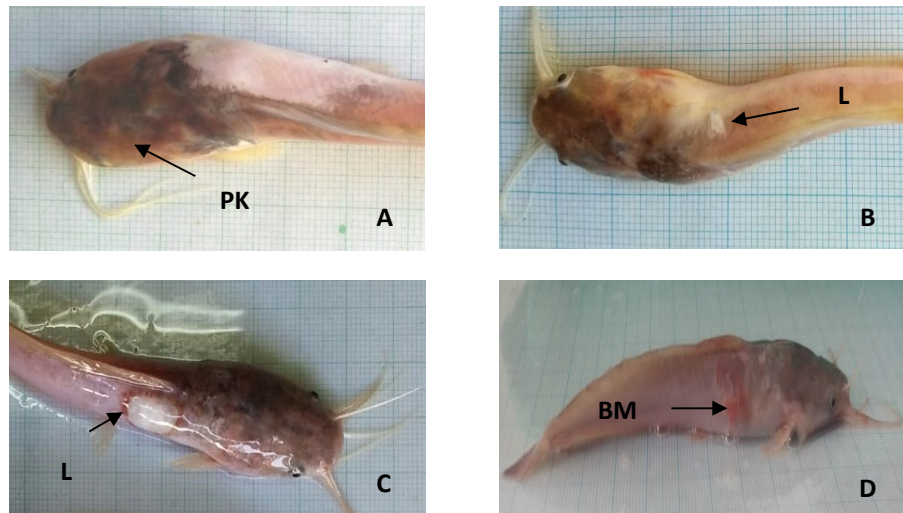


Gambar 2 Tingkat mortalitas (%) ikan lele dumbo pasca infeksi *A. hydrophila* dengan dosis 10^7 CFU ml⁻¹

Gejala Klinis

Pengamatan gejala klinis dilakukan pada ikan lele yang diduga rentan dan tahan terhadap infeksi *A. hydrophila*. Gejala yang ditunjukkan pada ikan lele dumbo yang rentan AH yaitu warna pucat kemerahan pada bagian kepala dan lesi pada punggung. Gejala yang ditunjukkan pada ikan lele dumbo yang tahan AH

yaitu terdapat bercak merah pada permukaan tubuh dan lesi pada punggung. Namun ikan lele yang rentan mengalami kematian pada saat jam ke-24, sedangkan ikan yang tahan tidak mengalami kematian hingga jam ke-24. Gejala klinis ikan lele dumbo diamati setelah 24 jam pasca penyuntikan.



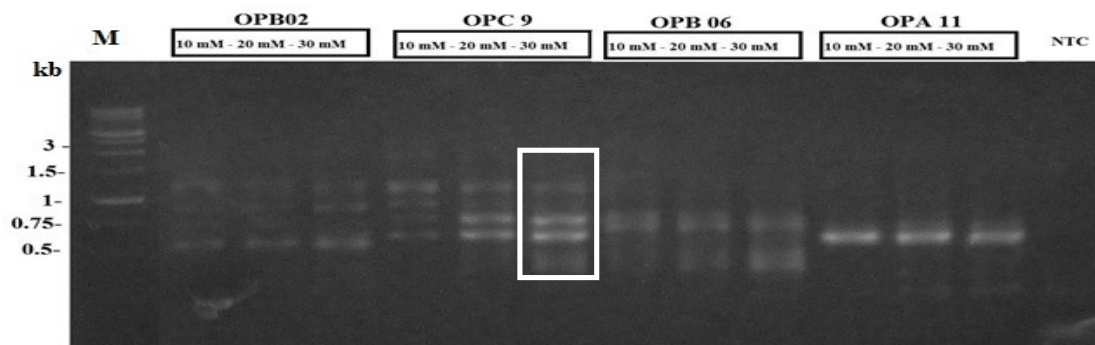
Keterangan: PK (Pucat Kemerahan); L (Lesi); BM (Bercak Merah)

Gambar 3 Gejala klinis permukaan tubuh ikan lele dumbo (*C. gariepinus*) yang rentan (*susceptible*) (A dan B), dan tahan (*resistant*) (C dan D) pasca infeksi *A. hydrophila*.

Berdasarkan Gambar 3, setelah 24 jam infeksi *A. hydrophila* menunjukkan adanya perubahan gejala klinis. Gejala klinis yang tampak yaitu terdapat bercak merah dan lesi pada bagian punggung, berwarna pucat kemerahan pada bagian kepala dan kemerahan pada kulit. Hal ini sesuai dengan pernyataan Triyaningsih, *et al.* (2014) bahwa gejala klinis eksternal yang ditunjukkan ikan yang terserang penyakit MAS salah satunya yaitu kemerahan pada kulit. Adanya paparan dari bakteri Gram negatif *A. hydrophila* dapat menyebabkan penyakit *motile aeromonas septicemia* (MAS) pada ikan lele dumbo seperti bercak merah dan lesi pada punggung (Anyanwu, *et al.* 2015). Lesi pada punggung terlihat pada bekas luka penyuntikan (Asniatih, *et al.* 2013).

Visualisasi Produk RAPD-PCR

Amplifikasi DNA ikan lele dumbo dilakukan menggunakan empat primer (OPB02, OPC9, OPB06, dan OPA11) dengan konsentrasi template yang berbeda untuk sebagai tahap optimasi. Tahap optimasi berfungsi untuk memilih satu primer yang akan digunakan pada identifikasi marka molekuler terkait daya tahan penyakit MAS. Hasil amplifikasi DNA disajikan pada Gambar 4.

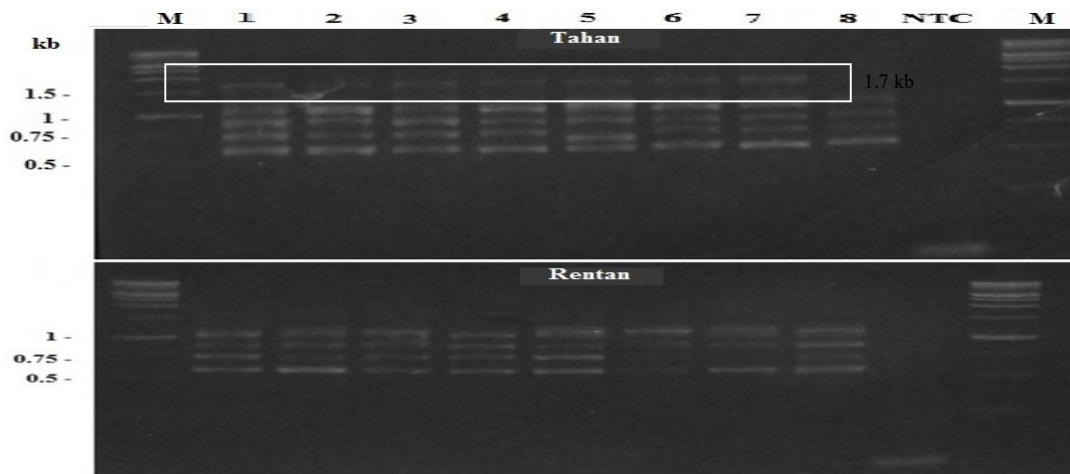


Gambar 4 Amplifikasi DNA ikan lele dumbo dengan primer OPB02, OPC9, OPB06, dan OPA11. 1 kb: DNA ladder, NTC: kontrol negatif tanpa templat DNA.

Tabel 1 Deskripsi jumlah pita dan ukuran fragmen DNA dari primer berbeda

Primer	Σ Pita	Ukuran Fragmen (bp)
OPB02	3	500-1300
OPC 9	4	600-1300
OPB 06	1	750
OPA 11	1	600

Gambar 4 menunjukkan hasil optimasi PCR dengan primer yang berbeda menggunakan 30 siklus. Program PCR yang digunakan dalam kondisi yang sama. Hasil amplifikasi DNA menunjukkan bahwa semua primer dapat menghasilkan pita DNA. Jumlah pita DNA menggunakan primer OPC9 yang dihasilkan lebih banyak yaitu 4 pita dengan ukuran fragmen 600-1300 bp, sehingga dipilih pada riset tahap berikutnya (Tabel 1). Produk PCR berbeda menunjukkan situs penempelan setiap primer berbeda sehingga mempengaruhi jumlah dan ukuran pasang basa setiap fragmen DNA (Buwono, *et al.* 2018)



Gambar 5 Amplifikasi DNA ikan lele dumbo rentan (*susceptible*) dan tahan (*resistant*) menggunakan primer OPC9. 1 kb: DNA ladder, NTC: kontrol negatif tanpa templat DNA.

Gambar 5 menunjukkan hasil amplifikasi DNA ikan lele dumbo rentan (*susceptible*) dan tahan (*resistant*) menggunakan primer OPC9. Jumlah dan kisaran ukuran pita DNA yang dihasilkan berbeda. Jumlah pita DNA ikan lele dumbo rentan (*susceptible*) yang teramplifikasi yaitu 4 pita DNA dengan ukuran fragmen 500-1000 bp. Sedangkan jumlah pita DNA ikan lele dumbo tahan (*resistant*) yang teramplifikasi yaitu 5 pita DNA dengan ukuran fragmen 500-1700 bp (Tabel 2).

Tabel 2 Deskripsi jumlah polimorfisme dan ukuran fragmen DNA ikan lele dumbo rentan (*susceptible*) dan resistan

Sampel	Σ Pita	Ukuran Fragmen (bp)
Rentan (<i>susceptible</i>)	4	500-1000
tahan (<i>resistant</i>)	5	500-1700

Menurut Arifin *et al.* (2007), setiap primer memiliki hasil amplifikasi yang berbeda baik dari segi jumlah polimorfisme, ukuran fragmen dan jumlah lokus yang berbeda. Lokus adalah urutan-urutan nukleotida yang dikenali oleh primer atau disebut sebagai situs pelekatan primer (Anggereini 2008). Terdapat dua kelompok fragmen DNA dalam analisis RAPD yaitu monomorfik dan polimorfik. Lokus

dikatakan monomorfik apabila memiliki ukuran fragmen sama dan terdapat diseluruh sampel dan lokus dikatakan polimorfik apabila terdapat variasi alel dan fragmen muncul pada ukuran tertentu dan ukuran tersebut tidak terdapat di sampel yang lain (Lathifah, *et al.* 2016).

Mulyasari, (2007) menjelaskan bahwa seleksi berbasis marka molekuler dilakukan dengan berdasarkan pola pita DNA yang dapat menunjukkan keberadaan bagian alel yang diinginkan atau kromosom pembawa gen. Hal ini dapat menjadi pertimbangan untuk mengidentifikasi marka molekuler yang dapat membedakan ikan lele yang tahan dan yang rentan terhadap infeksi penyakit MAS. Deteksi marka molekuler yang membedakan ikan lele yang rentan dan yang tahan terhadap infeksi *A. hydrophila* disajikan pada Gambar 5. Alel yang diduga membawa gen terkait daya tahan terhadap infeksi *A. hydrophila* dimiliki oleh ikan resistan dengan pita DNA khas yang berukuran sekitar 1700 bp, dan persentase ikan hidup yang mempunyai pita DNA tersebut sebesar 87,5% (7/8).

KESIMPULAN

Kandidat marka molekuler untuk daya tahan terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada lele dumbo memiliki pita DNA berukuran seragam yaitu sekitar 1700 bp dan peluang munculnya pita sebesar 87.5%

SARAN

Perlu dilakukan sekuensing DNA agar ukuran DNA yang teramplifikasi lebih akurat dibandingkan menggunakan ukuran marker manual.

DAFTAR PUSTAKA (12 pt)

- Anggereini E. (2008). *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*, suatu metode analisis DNA dalam menjelaskan berbagai fenomena biologi. *Biospecies*. 1:2, pp. 73-76.
- Anyanwu MU, Chah KF, Shoyinka VS. (2015). Evaluation of phatogeneticity of motile *Aeromonas* species in African catfish. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 2:3, pp. 93-98.
- Arifin OZ, Nugroho E, Gustiano R. (2007). Keragaman genetik populasi ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dalam program seleksi berdasarkan RAPD. *Berita Biologi*. 8:6, pp. 465-471.
- Asniatih, Idris M, Sabilu K. (2013). Studi histopatologi pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Mina Laut Indonesia*. 3:12, 13-21.
- Buwono ID, Lathifah AU, Subhan U. (2018). Deteksi keragaman genotip hibrid ikan lele sangkuriang, mutiara transgenik dan non transgenik pada keturunan pertama. *Jurnal Biologi Indonesia*. 14:1, pp. 133-141.
- Kusminies II, Gustiano R, Mulyasari. (2011). Karakterisasi genetik ikan kelabau (*Osteochillus kelabau*) dari berbagai lokasi dikalimantan barat menggunakan metode RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). *Berita Biologi*. 10:4, pp. 449-454.
- Lathifah AU, Buwono ID, Subhan U. (2016). Deteksi keragaman genotip hibrid ikan lele sangkuriang, mutiara transgenik, dan mutiara non transgenik pada keturunan pertama. *Jurnal Perikanan Kelautan*. 6:2, pp. 111-120.
- Maqsood HM dan Ahmad SM. (2017). Advances in molecular markers and their applications in aquaculture and fisheries. *Genetics of Aquatic Organisms*. 1, pp. 27-41.
- Mulyasari. (2007). Beberapa teknik penentuan variasi genetik pada ikan untuk proses pemuliaan. *Media Akuakultur*. 2:1, pp. 177-182.
- Triyaningsih, Sarjiti, Prayitno SB. (2014). Patogenitas *Aeromonas hydrophila* yang diisolasi dari lele dumbo dumbo (*Clarias gariepinus*) yang berasal dari Boyolali. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3:2, pp.11-17.

