

## Full Paper

**KASUS INFEKSI ALAMI: DIAGNOSA *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* DARI JARINGAN IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*) MENGGUNAKAN POLYMERASE CHAIN REACTION****NATURAL DISEASE OUTBREAK: DIAGNOSIS OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*'S INFECTION FROM TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) TISSUES USING POLYMERASE CHAIN REACTION**

Lila Gardenia\*, Isti Koesharyani dan Yani Aryati

Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan Budidaya  
Jl.Raya Ragunan No.20, Pasar Minggu, Jakarta Selatan 12540

\*Penulis untuk korespondensi, E-mail: lila\_abimanyu@yahoo.com

**Abstrak**

*Streptococcus agalactiae* merupakan salah satu bakteri penyebab streptococcosis pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Pada pertengahan tahun 2010, telah terjadi kasus kematian dengan tingkat mortalitas tinggi pada budidaya ikan nila di tambak bersalinitas rendah di Karawang-Jawa Barat. Diagnosa agen penyebab penyakit tersebut dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* dengan menggunakan pasangan primer spesifik Sdi252 dan Sdi61. Umumnya, identifikasi patogen (bakteri) dengan teknik PCR dilakukan dengan menggunakan koloni bakteri sebagai bahan ekstraksi. Namun pada penelitian ini dilakukan isolasi DNA langsung dari jaringan ikan yang menunjukkan gejala terinfeksi bakteri tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapat informasi berupa jenis organ target *S.agalactiae* yang dapat digunakan dalam proses ekstraksi DNA bakteri. Sampel ikan sebanyak 3 ekor diambil jaringannya (otak, hati, limfa, dan ginjal) untuk diekstraksi dengan metoda pemanasan. Pita positif pada 192 bp diperoleh dari otak (2/3), hati (2/3), limfa (3/3) dan ginjal (2/2). Sebagai kontrol digunakan isolat bakteri dari masing-masing otak ikan sampel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ke-4 organ dapat digunakan sebagai sumber DNA untuk identifikasi bakteri *S.agalactiae*, namun limfa yang menunjukkan hasil yang paling konsisten pada ke-3 ikan sampel.

**Kata kunci: diagnosa, PCR, primer spesifik, *Streptococcus agalactiae*****Abstract**

*Streptococcus agalactiae* is one of the agents that cause streptococcosis on tilapia (*Oreochromis niloticus*). In the middle of 2010, there was an outbreak with mass mortality in tilapia farm (low salinity ponds) in Karawang, West Java. Diagnosis of the disease-causing agents was done by polymerase chain reaction with specific primers (Sdi61-Sdi252). Usually, PCR for bacterial identification is performed by using bacterial isolates as material extraction, but in this study, we used direct DNA isolation from tissue infected fish that marked clinical signs of *Streptococcal* infection. The purpose of this study was to collect information about what kind of target organs that can be used for the bacterial DNA extraction. Tissue samples (brain, liver, spleen and kidneys) from 3 tilapias were extracted by heating method. Positive band at 192 bp were obtained from the brain (2/3), liver (2/3), spleen (3/3) and kidney (2/2). We used bacterial isolates from each sampel's brain as control. The results showed that all of tissue organs can be used as DNA sources for *S. agalactiae* identification, but only spleen that showed consistent results in all fish samples.

**Key words: diagnosis, PCR, specific primer, *Streptococcus agalactiae*****Pengantar**

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) atau *nile tilapia* merupakan salah satu jenis ikan budidaya yang banyak dikembangkan di Indonesia. Ikan Nila menjadi komoditas unggulan antara lain karena mudah berkembang biak dan pertumbuhan yang cepat (Wardoyo, 1997). Ikan nila juga memiliki kemampuan

beradaptasi yang tinggi yaitu dapat hidup pada rentang salinitas yang lebar. Dengan kemampuan beradaptasi tersebut, ikan nila dapat dibudidayakan dengan baik di air tawar, payau, dan laut (Wardoyo, 2007).

Salah satu hambatan dalam usaha budidaya khususnya ikan nila adalah serangan penyakit

(parasit, jamur dan bakteri). Streptococcosis merupakan penyakit bakterial yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Streptococcus*, *Lactococcus* dan *Vagococcus*. Penyakit ini menimbulkan banyak kerugian yang disebabkan tingginya tingkat kematian akibat serangan bakteri tersebut yaitu hingga 30-50% (Eldar *et al.*, 1995). Kerugian yang disebabkan streptococcosis dalam usaha budidaya diperkirakan lebih dari 150 juta US dolar per tahun (Klesius *et al.*, 2000).

Umumnya, penyakit menular pada ikan disebabkan oleh bakteri oportunistik. Adanya bakteri pada lingkungan dapat menimbulkan wabah penyakit. Stres merupakan faktor yang paling berperan dalam munculnya wabah penyakit pada budidaya ikan. Suhu air merupakan salah satu faktor pemicu munculnya streptococcosis. Selain itu padat tebar yang tinggi, penanganan ikan yang buruk dan kualitas air juga berpengaruh terhadap munculnya penyakit ini (Yanong & Francis-Floyd, 2002). Streptococcosis menyerang ikan pada berbagai ukuran dan umur. Oleh karena itu pencegahan harus dilakukan disemua tahapan produksi.

*Warm water streptococcosis* menimbulkan kematian pada ikan yang hidup pada temperatur diatas 15°C, dan agen penyakit yang paling berperan menimbulkan penyakit tersebut antara lain *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* dan *Lactococcus garviae*. Ikan yang terinfeksi oleh *Streptococcus sp.* mengalami gejala antara lain nafsu makan menurun, bergerak tidak beraturan, berenang ke permukaan, lesu, tubuh menghitam, sisik mudah lepas, luka, pendarahan pada operkulum dan anus, mata keruh dan menonjol keluar (Kusuda *et al.*, 1992 dan Eldar *et al.*, 1994). Namun gejala yang paling signifikan dari penyakit ini pada ikan adalah septikemia dan meningoencephalitis (Eldar *et al.*, 1995). Organ dalam yang sering terserang adalah limfa, hati dan otak, kemudian menyebar ke ginjal, usus dan jantung (Austin & Austin, 1999). Limfa tampak membesar dan rusak, hati terlihat pucat dan nekrosis di beberapa tempat. Usus mengandung cairan dan sebagian hemoragi. Sering dijumpai meningitis akut, dengan permukaan otak terlihat kekuningan dan mengandung banyak bakteri (Kitao, 1993; Austin & Austin, 1999).

Penanggulangan penyakit streptococcosis telah banyak dilakukan, baik dengan menggunakan antibiotik maupun cara pencegahan dengan vaksinasi. Namun diagnosa cepat untuk mendeteksi penyakit ini

perlu diterapkan agar segera dapat dilakukan tindakan pencegahan. Saat ini teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) telah banyak digunakan untuk mendiagnosa bakteri penyebab penyakit (Dorsch *et al.*, 1994). Primer untuk mengamplifikasi genom spesifik pada *S. agalactiae* telah dikembangkan dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri tersebut dari ikan yang terinfeksi (Mata *et al.*, 2004). Namun, teknik ini tidak terlalu sensitif apabila dilakukan dengan menggunakan DNA langsung dari jaringan ikan yang terinfeksi, sehingga dibutuhkan waktu untuk menumbuhkan bakteri pada media agar. Tujuan penelitian ini adalah untuk medapat informasi jenis organ target *S. agalactiae* pada kasus infeksi alami, yang dapat digunakan dalam proses ekstraksi DNA bakteri.

### Bahan dan Metode

Ikan nila sebanyak 3 ekor (150-200 gram) diperoleh dari tambak di daerah Karawang-Jawa Barat yang mengalami kasus kematian ikan yang cukup tinggi dengan mortalitas sekitar 50%. Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dipelihara dalam tambak bekas budidaya udang dengan salinitas rendah. Ikan mengalami gejala streptococociacis dengan ciri-ciri berenang berputar, mata menonjol dan tubuh berwarna kehitaman. Ikan dibawa dalam keadaan hidup ke Laboratorium Riset Kesehatan Ikan-Jakarta dan dilakukan isolasi bakteri dari otak masing-masing ikan (sebagai kontrol). Isolat ditumbuhkan pada media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*, Oxoid) dan ditumbuhkan di dalam inkubator pada suhu 28°C selama 24-48 jam. Setelah dimurnikan beberapa kali, isolat bakteri (10-20 koloni) diambil menggunakan ose steril dan disimpan dalam 400 µl *RNAse free water*. Sampel jaringan otak, hati, limfa dan ginjal dari setiap ikan sampel, masing-masing disimpan dalam mikrotube 1,5 ml berisi 750 µl alkohol 95%.

#### Isolasi DNA bakteri

DNA bakteri dari isolat maupun jaringan ikan yang digunakan dalam uji PCR ini diekstraksi dengan menggunakan metoda pemanasan. Ekstraksi DNA dari isolat bakteri dilakukan dengan memanaskan mikrotube berisi koloni dalam 400 µl *RNAse free water* pada suhu 98°C selama 10 menit diatas *thermomixer* sambil sesekali divortex. Debris sel dipisahkan dari DNA bakteri dengan cara sentrifugasi pada 8000xg selama 10 menit. Cairan bening (*supernatant*) diambil sebanyak 300 µl dan dipindahkan ke dalam mikrotube baru dan disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Ekstraksi DNA bakteri dari jaringan ikan yang terinfeksi dilakukan dengan mengambil sedikit dari masing-masing organ (15-20 gram) dan dipindahkan ke mikrotube 1,5 ml baru. Jaringan dihancurkan dengan bantuan pisau dan pestle bersih kemudian ditambahkan *RNAse free water* sebanyak 400 µl. Mikrotube kemudian dipanaskan pada suhu 98°C selama 10 menit diatas *thermomixer* sambil sesekali divortex. Debris sel dipisahkan dari DNA bakteri dengan cara sentrifugasi pada 8000xg selama 10 menit. Cairan bening (*supernatant*) diambil sebanyak 300 µl dan dipindahkan ke dalam mikrotube baru dan disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

#### Primer dan Amplifikasi PCR

Pasangan primer oligonukleotida yang digunakan untuk mendeteksi bakteri patogen *Streptococcus difficilis* (Mata *et al.*, 2004) sebagai berikut: Sdi 61 : 5'-AGGAAACCTGCCATTTGCG-3' Sdi 252: 5'-CAATCTATTTCTAGATCGTGG-3' dengan target gen 16S *intergenic spacer* dengan panjang 192 bp. Primer yang digunakan dalam proses PCR ini disintesa oleh Alpha DNA (Montreal, Quebec).

Proses amplifikasi PCR dilakukan di dalam campuran reaksi dengan volume 25 µl per sampel sebagai berikut: *master mix GoTaq@Green* (Promega, Madison WI USA) sebanyak 12,5 µl, *nuclease free water* sebanyak 8.5 µl, primer (*reverse* dan *forward*) masing-masing sebanyak 1 µl dan template DNA sebanyak 2 µl. Amplifikasi dilakukan menggunakan *thermal cycler T-personal* (Biometra) dengan program siklus amplifikasi sebagai berikut: setelah tahap denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, kemudian lakukan 25 kali siklus denaturasi pada 92°C selama 1 menit, *annealing* pada 55°C selama 1 menit, dan elongasi pada 72°C selama 90 detik. Terakhir dilakukan proses elongasi akhir pada 72°C selama 5

menit. Sebagai negative kontrol (*no template DNA*) digunakan *RNAse free water*.

#### Elektroforesis

Hasil amplifikasi dideteksi dengan mengelektrophoresis masing-masing amplicon sebanyak 10 µl pada 1,5% gel agarose di dalam buffer 1x Tris-acetate-EDTA (220 V selama 25 menit). Pewarnaan DNA dilakukan dengan perendaman gel dalam larutan ethidium bromide (0,5 µg per 100 ml TAE buffer) selama 15 menit, diamati di bawah uv transiluminator dan hasilnya didokumentasikan dengan kamera polaroid.

#### Hasil dan Pembahasan

Kasus kematian ikan nila yang dibudidayakan di tambak bersalinitas rendah di Karawang terjadi pada bulan Mei 2010. Gejala klinis ikan yang terinfeksi antara lain mata menonjol, kulit berwarna kehitaman dan berenang tidak beraturan (Gambar 1). Dari gejala tersebut diduga kematian ikan disebabkan oleh streptococcosis seperti yang dijelaskan Eldar *et al.* (1994).

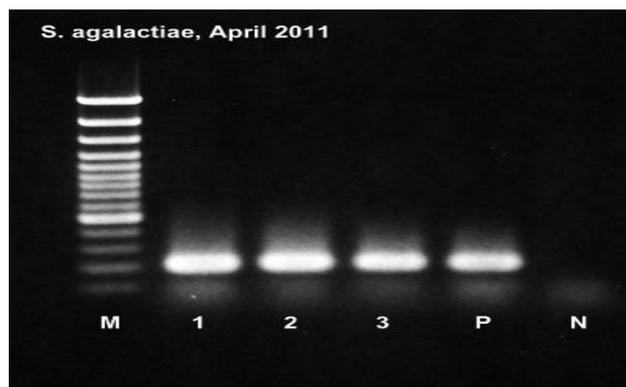
Hasil isolasi dari otak masing-masing ikan, diperoleh koloni yang hampir sama. Ketiga koloni bakteri yang tumbuh pada media BHIA tersebut berukuran kecil dan halus (berdiameter kurang dari 2 mm) serta tidak berwarna. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan koloni bakteri tersebut merupakan bakteri gram positif berbentuk *coccus* (bulat), berukuran kecil dan berantai panjang.

Hasil isolasi bakteri yang diperoleh dari otak ikan nila, telah diperoleh 3 isolat yaitu isolat N1Ot, N2Ot dan N3Ot. Diagnosa PCR menggunakan primer spesifik untuk *Streptococcus agalactiae* yaitu Sdi252 dan



Gambar 1. Ikan nila dari tambak di Karawang yang terinfeksi *Streptococcus agalactiae*. Ikan terlihat berenang berputar, mata menonjol (tanda panah) dan tubuh kehitaman.

Sdi61 (Mata *et al.*, 2004) yang mengamplifikasikan gen 16S-23S RNA *intergenic spacer*. Hasil amplifikasi DNA tersebut menghasilkan pita positif pada berat molekul target (192 bp) pada ketiga isolat (Gambar 2). Hal ini menunjukkan semua isolat merupakan bakteri *S. agalactiae*. Semua ikan yang mengalami gejala streptococcosis, 100% positif terinfeksi *S. agalactiae* yang merupakan salah satu agen penyebab streptococcosis.

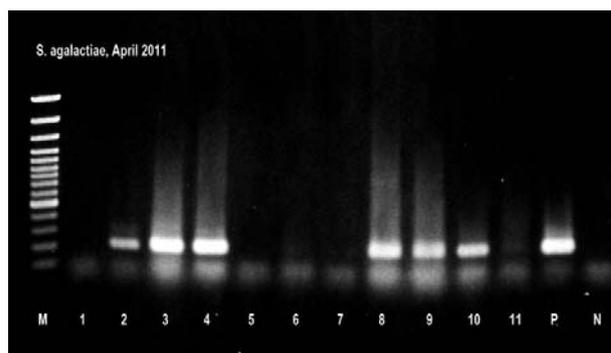


Gambar 2. Hasil deteksi *S. agalactiae* dengan PCR dari isolat bakteri dari otak ikan nila.

Ket: M. *Marker 100bp ladder plus* (Fermentas) No.1 isolat N1Ot; No.2 isolat N2Ot; No.3 N3Ot; P. Positif kontrol dan N. Negatif kontrol

*Streptococcus agalactiae* pada ikan menyebabkan septisemia dengan pendarahan pada permukaan tubuh, organ eksternal dan internal. Pada Gambar 3 terlihat bahwa DNA bakteri *S. agalactiae* dapat diisolasi langsung dari internal organ seperti otak, hati, limfa dan ginjal. Austin & Austin (1999) menyatakan bahwa organ dalam yang banyak terserang adalah limfa, hati dan otak, kemudian ginjal, usus dan jantung. Selain itu, *S. agalactiae* juga dapat diisolasi dari lubang hidung dan mata dari ikan yang terinfeksi (Garcia, 2007). Melalui pengamatan histopatologis diketahui bakteri ini menyebabkan kerusakan pada hati dan limfa (Lusiastuti *et al.*, 2010). Hasil PCR memperlihatkan bahwa otak, hati, limfa dan ginjal merupakan organ target *S. agalactiae*. Bakteri ini dapat diisolasi dan diidentifikasi dari keempat organ tersebut. Pita positif pada 192 bp menggunakan primer spesifik Sdi252 dan Sdi 61 (Mata *et al.*, 2004) diperoleh dari otak (2/3), hati (2/3), limfa (3/3) dan ginjal (2/2).

Hasil amplifikasi DNA bakteri yang diisolasi dari jaringan ikan nila menunjukkan ketiga ikan nila tersebut mengalami tingkat infeksi *S. agalactiae*



Gambar 3. Hasil deteksi PCR *S. agalactiae* dari jaringan ikan nila. M. *Marker 100 bp ladder plus* (Fermentas), No. 1-3, jaringan ikan nila-1 (otak, hati dan limfa). No. 4-7, jaringan ikan nila-2 (otak, hati, limfa dan ginjal). No. 8-11, jaringan ikan nila-3 (otak, limfa, ginjal dan usus). P. Positif kontrol dan N. Negatif kontrol

yang berbeda (Gambar 3). Tingkat infeksi ditunjukkan secara kualitatif dari intensitas cahaya pada gel agarosa yang telah diwarnai dengan ethidium bromida dan dilihat menggunakan UV transiluminator (Tabel 1) menunjukkan ikan nila-3 yang mengalami tingkat infeksi tertinggi.

Tabel 1. Hasil Diagnosa PCR pada berbagai macam organ ikan nila Karawang.

Jenis Organ	Ikan Nila-1	Ikan Nila-2	Ikan Nila-3
Otak	-	+++	+++
Hati	++	-	+
Limfa	+++	+	+++
Ginjal	ND	+	+++

Ket: ND: tidak dilakukan, +++: infeksi parah, ++: infeksi medium dan +: infeksi ringan

Isolasi DNA dapat dilakukan baik dari otak, hati, limfa dan ginjal. Organ-organ tersebut merupakan organ target *Streptococcus agalactiae* yang dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri tersebut secara langsung dari jaringan. Hasil negatif maupun munculnya pita DNA tipis pada Gambar 3 dan Tabel 1, tidak menunjukkan bahwa bakteri tidak ada atau jumlah bakteri yang tumbuh pada jaringan tersebut hanya sedikit. Metoda yang digunakan kemungkinan kurang efektif dalam mengisolasi DNA bakteri langsung dari organ target, sehingga perlu dilakukan perbandingan beberapa metoda ekstraksi. Hal ini sangat diperlukan agar memperoleh informasi metoda yang paling efektif agar terhindar dari hasil *false negative*.

## Kesimpulan

1. Identifikasi dan diagnosa bakteri *Streptococcus agalactiae* dapat dilakukan dengan teknik PCR (Polymerase Chain Reaction) menggunakan primer spesifik langsung dari jaringan/organ target.
2. DNA bakteri dari jaringan ikan terinfeksi dapat diperoleh dari otak, limfa, hati dan ginjal, namun hanya limfa yang menunjukkan hasil konsisten dibandingkan organ lainnya.

## Daftar Pustaka

- Austin B. & D.A. Austin. 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish.. Ellis Horwood Ltd. Chichester, England.
- Dorsch, M., N.J. Ashbolt, P.T. Cox & A.E. Goodman. 1994. Rapid identification of *Aeromonas* species using 16SrDNA targeted oligonucleotide primers: A molecular approach based on screening of environmental isolates. *J. Appl. Bacteriol.*, 77: 772-726.
- Eldar, A., P.F. Frelier, L. Assenta, P.W. Varner, S. Lawhon & H. Bercovier. 1995. *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. *Int. J. Syst Bacteriol* 45: 840–842.
- Eldar, A., Y. Bejerano & H. Bercovier. 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Curr Microbiol.* 28: 139–143.
- Garcia, J.C. 2007. A comparative investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish and cattle. *In A dissertation. Submitted to the Graduate Faculty of Auburn University.* Auburn, Alabama.
- Kitao T. 1993. Streptococcal infections. In: Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR (eds) Bacterial disease of fish. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 196-210
- Klesius, P. H., C.A. Shoemaker & J.J. Evans. 2000. Vaccination: A health management practice for preventing diseases caused by streptococcus in tilapia and other cultured fish. *in J. Carvalho, editor. Fifth International Symposium on Tilapia Aquaculture.* International, Rio de Janeiro, Brazil. September 3 - 7, 2000. Pages 558-564
- Kusuda, R. 1992. Bacterial fish diseases in marine culture in Japan with special emphasis on Streptococcosis. *Isr. J. Aquaculture.* 44: 140
- Lusiastuti A., U. Purwaningsih & T. Sumiati. 2010. Isolasi bakteriofaga anti *Streptococcus agalactiae* dari ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *J. Ris. Akuakultur* 5 (2): 237-243
- Mata, A. I., A. Gibello, A. Casamayor, M.M. Blanco, L. Domínguez & J.F. Fernández-Garayzábal. 2004. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Appl. Environm. Microbiol.* 70: 3183-3187.
- Wardoyo, S.E. 2007. Ternyata ikan nila, *Oreochromis niloticus* Mempunyai Potensi yang Besar untuk Dikembangkan. *Media Akuakultur*, 1(2): 147-150.
- Wardoyo, S.E. 1997. Nila “gift”, ikan unggul Pilipina. *Mimbar Pertanian.* S.K. Suara Karya. Tgl. 10 Juni 1997, 6 pp.
- Yanong, R. & R. Francis-Floyd. 2002. Circular FA057. Dept. Of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service. Inst. Of Food and Agricultural Sciences. University of Florida ([http://ufl.edu/BODY\\_FA057](http://ufl.edu/BODY_FA057)) p.