

Phylogenetic Tree dari Empat Isolat *Edwardsiella Tarda* di Indonesia

Phylogenetic Tree from Four Isolates of *Edwardsiella tarda* in Indonesia

Siti Narwiyani^{1*} dan Kurniasih²

¹Balai Besar Karantina Ikan Hasanuddin Makasar
Jln. Dakota No. 24, Sudiang, Makasar

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
E-mail: stnarwiyani@gmail.com *Penulis untuk korespondensi

Abstract

The aim of this study was to determine a possibility subspecies of *Edwardsiella tarda* based on molecular study. *E. tarda* isolated from tilapia and polluted water based on PCR with hemolysin gene application. Isolates *E. tarda* were taken from Tilapia (Yogyakarta), catfish (Semarang and Jambi), Tortoise imports (Brazil), goldfish (Pontianak). Atypical isolates of *E. tarda* (ATCC) were imported from Singapore used comparison with 4 isolates of *E. tarda* from Indonesia. All isolates of *E. tarda* would be extracted, amplified the SSU rRNA-16S and sequenced. Multiple sequence alignment used by CLUSTAL W version 1.8. Neighbour-joining method and maximum parsimony method to analyze phylogenetic tree. The result showed that three isolates of *E. tarda* from Pontianak, Jambi, Yogyakarta was same strain originating from fish, whereas the isolates of *E. tarda* from turtle was same strain with ATCC isolates from human origin.

Key words: Phylogenetic tree, *Edwardsiella tarda*, Tilapia

Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengetahui adanya kemungkinan subspecies *Edwardsiella tarda* secara molekuler. *Edwardsiella tarda* dapat diisolasi dari ikan *Tilapia* dan air yang tercemar dan diidentifikasi secara PCR dengan amplifikasi gen hemolysin. Isolat *E. tarda* diperoleh dari ikan nila (Yogyakarta), lele (Semarang dan Jambi), kura-kura impor (Brazilia), ikan mas (Pontianak). Isolat atipikal *E. tarda* (ATCC) dari Singapura digunakan sebagai pembading 4 isolat *E. tarda* dari Indonesia. Semua isolat *E. tarda* diekstraksi, diamplifikasi rRNA pada SSU 16S dan disequencing. Hasil sekuensing alignment menggunakan program CLUSTAL W versi 1.8. Selanjutnya dianalisis dengan metode *neighbour-joining* dan metode *maximum parsimony* untuk menghasilkan pohon phylogenetik (Saitou dan Nei, 1987). *Phylogenetic tree* menunjukkan bahwa 3 isolat *E. tarda* dari ikan merupakan strain yang sama dibanding *E. tarda* dari kura-kura Brazil dan isolat ATCC yang berasal dari manusia.

Kata kunci: Phylogenetic tree, *Edwardsiella tarda*, Tilapia

Diterima: 01 Maret 2011, disetujui: 23 Mei 2011

Pendahuluan

Edwardsiella tarda adalah penyebab *Edwardsiellosis/ Emphistemathous Putrevactive disease of Catfish* (EPDC) atau *Edwardsiella Septicaemia* (ES). *Edwardsiellosis* dikenal sebagai penyakit utama pada budidaya *catfish* di Amerika. *Edwardsiella tarda* tidak memproduksi endotoksin seperti umumnya bakteri Gram negatif lainnya, tetapi menghasilkan 2 eksotoksin yang menyebabkan lesi. *Edwardsiella tarda* sudah tersebar di

beberapa negara diantaranya adalah Eropa, Jepang, Taiwan, Thailand, Amerika Serikat, Singapura dan Malaysia. Di Indonesia, *Edwardsiella tarda* sudah pernah ditemukan di Jawa, Sumatera dan Kalimantan. *Edwardsiella tarda* dapat diidentifikasi melalui gejala klinis, isolasi serta identifikasi secara morfologi dan molekuler DNA (Post, 1987).

Edwardsiella tarda merupakan tipe bakterium enterik. *Edwardsiellosis* dapat ditularkan secara horizontal antara ikan sakit dan ikan sehat, dapat bertahan di dalam air dan

lumpur sehingga air dan lumpur yang sudah bebas dari ikan sakit pun dapat menjadi karier dan menyebabkan penyakit (Wakabayasi dan Egusa, 1973). *Edwardsiella tarda* dapat hidup pada perairan tawar maupun di laut dan dapat dibawa oleh berbagai jenis hewan seperti reptil (kura-kura), katak, lobster air tawar, babi serta manusia (Wyatt, 1979). Infeksi *E. tarda* pada manusia ditularkan melalui kontaminasi tinja manusia, makanan dan air yang terkontaminasi bakteri ini atau disebut penularan oral-fecal. Strain *E. tarda* pada ikan diperoleh proses penularan hanya antar ikan (Nucci *et al.*, 2002).

Angka kematian pada *channel catfish* dalam perairan umum rendah sekitar 5%, namun jika ikan dipindahkan ke kolam pemeliharaan angka kematian akan cepat naik hingga 50%. Data kematian pada populasi *eels* belum ada di Taiwan dan Jepang. Di Amerika Serikat, *E. tarda* diisolasi dari 80% lebih *catfish* yang berasal dari perikanan dalam negeri (Wyatt *et al.*, 1979) dan ditemukan dalam 30% ikan tambak yang diimpor. *Edwardsiella tarda* telah diisolasi 75% dari sampel air kolam *catfish*, 64% pada sampel lumpur kolam *catfish* dan 100% dari kodok, kura-kura dan *crayfish* dari kolam *catfish*. Hal ini menunjukkan bahwa *E. tarda* termasuk dalam mikroflora pada kolam *catfish* dan adanya bakteri tersebut membuat potensi penyakit ikan tetap ada (Inglis *et al.*, 1993).

Edwardsiellosis dapat didiagnosa dengan cara isolasi dan identifikasi agen penyebabnya *E. tarda* (Inglis *et al.*, 1993) 2). Reaksi kekebalan dengan ELISA (Swaim *et al.*, 2001). 3). Imunohistokimia pada organ yang terinfeksi (Pirarat *et al.*, 2008) dan 4). Molekuler dengan metode PCR (Chen dan Lai, 1998).

Edwardsiella tarda telah diisolasi dari ikan *Tilapia* dan air yang tercemar dan keberadaannya dapat dideteksi secara PCR dengan mengamplifikasi gen hemolysin. Sampel yang berasal dari hati dan usus ikan menunjukkan hasil positif kecuali dari sampel air yang tercemar (Chen dan Lai, 1998). Deteksi *E. tarda* pada *oyster road fish* secara langsung menggunakan PCR memberikan hasil akurat dan cepat menggunakan pembanding *E. ictaluri* dan *Vibrio sp.* sebagai kontrol negatif (Baird *et al.*, 2003).

Metode *Randomized Fragment Length Polimorphism* (RFLP-PCR) dilakukan untuk deteksi isolat habitat spesifik. Semua isolat dari ikan secara genotip dijumpai pada ikan, bukan dari air atau sedimen. Endonuklease restriksi yang digunakan adalah *Apu I*, *Hae III* dan *Msp I*. Metode ini menghasilkan prevalensi specific genotipe site dalam ekosistem air tawar (Acharya *et al.*, 2007).

16s rRNA adalah suatu jenis RNA yang dilibatkan dalam produksi protein dan paling banyak digunakan sebagai penanda molekuler. Pada prokaryota terdapat tiga jenis RNA ribosomal, yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Di antara ketiganya, 16S rRNA yang paling sering digunakan. Molekul 5S rRNA memiliki urutan basa terlalu pendek, sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika, sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang sehingga menyulitkan analisis. Sekuens gen 16S rRNA ini dapat digunakan untuk identifikasi bakteri yang mengalami penyimpangan strain fenotip. *Edwardsiella tarda* berada pada area *Smaal Sub Unit* (SSU) 16S, sehingga lebih tepat bila menggunakan 16s rRNA. Analisis gen penyandi 16S rRNA telah menjadi prosedur baku untuk menentukan hubungan filgenetik dan menganalisis suatu ekosistem. 16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler karena molekul ini bersifat ubikuitus dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. (Hwang W dan Won Kim, 1995).

Metode Penelitian

Edwardsiella tarda telah diisolasi dan diidentifikasi dari ikan mas (Pontianak), ikan nila (Yogyakarta), ikan lele (Semarang), kura-kura (Brazil) dan isolat ATCC dari Singapura. Semua isolat dilakukan revirulensi terlebih sebelum perlakuan. Revirulensi dilakukan dengan cara menginfeksi ikan mas secara intraperitoneal dengan 0,1 cc dari masing-masing isolat *E. tarda* sebanyak 10^7 sel/ml. Semua ikan mas diotopsi, reisolasi dan reidentifikasi terhadap adanya *E. tarda*.

Sampel ikan yang diambil dari daerah potensi inang *E. tarda* diisolasi menggunakan media *Blood Agar*. Isolasi dilakukan dengan

melihat gejala klinis seperti hemoragi di sekitar kepala dan operkulum, lesi di bawah kulit dan abses di otot yang merupakan salah satu ciri penyerangan *E. tarda*. Bakteri yang tumbuh pada media blood agar dimurnikan dan diidentifikasi.

Identifikasi bakteri dilakukan dengan melihat morfologi, sifat gram, dan uji sifat biokemis seperti: oksidase, catalase, motilitas, TSI, indol, dan sifat-sifat kultur lainnya seperti kemampuan fermentasi. Pengujian biokimia dilakukan pada semua isolat secara konvensional terhadap *esculin hydrolysis*, *gelatine hydrolysis*, *lysine decarboxylase*, *ornithine decarboxylase*, *citrate*, *motility*, *indole*, *gluconat oksidasi*, *N-acetyl-D-glucosamine* produksi H₂S dan asam-asam yang dihasilkan dari *rhamnose*, *sorbitol*, *lactose*, *D-sucrose*, dan *salicin*. Isolat yang teridentifikasi *E. tarda* sebagai sampel yang akan digunakan untuk pengujian disimpan/diawetkan dalam inkubator di bawah kondisi yang sama seperti yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri.

Uji molekuler terhadap isolat dilakukan dengan metode PCR yang terdiri dari ekstraksi DNA dengan Qiagen kit dan amplifikasi fragmen gen 16S rRNA. Primer yang digunakan adalah Forward Eta 2-351 (5'-TAG GGA GGA AGG TGT GAA-3'). Reverse Edwsp-780r (5'CTC TAG CTT GCC AGT CTT-3') untuk isolat dari ikan dan dari manusia Eta 1-363 F (5'-GTG TCC GTG TTA ATA GCA-3') untuk isolat dari Kura-kura. Reaksi amplifikasi menggunakan Intron Kit dan dijalankan pada kondisi predenaturasi 94°C selama 2 menit, denaturasi pada 94°C selama 1 menit, *annealing* pada 51°C selama 1 menit, *extension* pada 72°C selama 30 detik dan *post-extension* pada 72°C selama 5 menit, dengan reaksi amplifikasi dijalankan sebanyak 26 siklus (Baird *et al.*, 2003). Hasil amplifikasi dielektroforesis dengan gel agarose 1,5 % pada 100V selama 30–45 menit. Hasil amplifikasi selanjutnya di purifikasi dan sequencing DNA di Laboratorium Bioteknologi, PT. Wilmar, Cikarang, Jawa Barat. Hasil sequencing rRNA pada area 16S rRNA dianalisis mulai dari *multiple sequence alignment* dengan program CLUSTAL W versi 1.8 dan dilanjutkan dengan metode *neighbour-joining* dan metode

maximum parsimony untuk menghasilkan pohon filogenetik dengan program MEGA.4.1. (Saitou dan Nei, 1987).

Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi dan identifikasi bakteri menunjukkan bahwa empat isolat yang diisolasi dari ikan Mas Pontianak, ikan Lele Semarang, ikan Nila Jogjakarta dan Kura-kura Brasil adalah *Edwardsiella tarda* sama dengan hasil ATCC. Hasil identifikasi karakteristik terlihat pada Tabel 1.

Hasil amplifikasi DNA *E. tarda* menunjukkan *band* dengan ukuran 216 bp. Hasil PCR-RFLP dengan enzim restriksi endonuklease menggunakan enzim *AluI* tidak menunjukkan perbedaan antara 5 isolat *E. tarda*. Semua isolat terdigesti pada 100 dan 120 bp. Penggunaan enzim *HaeIII* menunjukkan 2 macam variasi yang berbeda berdasarkan band restriksi endonuklease. Isolat *E. tarda* dari ikan di Kalimantan dan Jawa memiliki batasan *band* yang sama. *E. tarda* dari kura-kura Brazil impor menunjukkan *band* yang sama seperti isolat *E. tarda* dari ATCC.

Hasil sequencing 5 isolat *E. tarda* pada fragmen gen 16S rRNA (177nt) tampak adanya variasi genotip (Gambar 1). Hasil analisis *maximum parsimony* menunjukkan bahwa 3 isolat *E. tarda* dari Pontianak, Yogyakarta, Jambi satu *cluster* dengan *E. tarda* yang berasal dari *Genbank* dengan validitas 99%. Isolat *E. tarda* dari kura-kura Brazil satu *cluster* dengan isolat ATCC dengan validitas 93% (Gambar 2). Hasil analisis *neighbor-joining* menunjukkan bahwa 3 isolat *E. tarda* dari Pontianak, Yogyakarta, Jambi kekerabatannya sangat dekat dengan *E. tarda* dari *GenBank* dengan validitas 99%. Isolat *E. tarda* dari kura-kura Brazil satu kerabat dengan isolat ATCC dengan angka validitas 95% (Gambar 3).

Isolat yang berasal dari kura-kura diperoleh dari tinja manusia. *Edwardsiellosis* dapat menyerang manusia yang menyebabkan enteritis hemoragika, penularan penyakit dapat terjadi dari ibu yang sedang hamil kepada bayi yang dilahirkan atau manusia yang terinfeksi *Edwardsiella tarda* saat melakukan aktifitas di perairan yang tercemar (Mowbray *et al.*, 2003). *Edwardsiellosis* pada manusia menunjukkan akibat yang serius seperti enteritis hemoragika,

radang ginjal dibandingkan *Edwardsiellosis* pada ikan (Nucci *et al.*, 2002). Hal ini sesuai dengan *phylogenetic tree* yang diperoleh menunjukkan isolat dari kura-kura berada dalam satu *cluster* dengan isolat dari manusia (ATCC).

Kedua metode untuk menganalisis *Edwardsiella tarda* secara *maximum parsimony* dan *neighbor-joining* menunjukkan hasil yang

sama antara lain terbentuknya dua *cluster* yaitu *cluster* ikan dari Pontianak, Yogyakarta dan Semarang berada dalam satu *cluster* sedangkan isolat kura-kura berada satu *cluster* dengan isolat ATCC dari manusia. Hal ini disebabkan *E. tarda* yang berasal dari ikan memiliki strain yang sama sedangkan *E. tarda* dari Kura-kura dan ATCC berasal dari manusia.

```
#ETD          GTA TAT --A TTT ATC TTT TGT TTT CTC TTT [ 30]
#KK           ACT TAC CGA AAA AAC ACC GGG CTA CTC CGT [ 30]
#LL           AAT AAT AAA AAA AAA AAA GAA CGC AAG AGG [ 30]
#E2           ACC TAC AGA AGA AGC ACC GGC TAA CTC CGT [ 30]
#ETP          ACC TAC AGA AGA AGC ACC GGC TAA CTC CGT [ 30]
#Edwardsiella_tarda ACC TAC AGA AGA AGC ACC GGC TAA CTC CGT [ 30]

#ETD          TTT TTC TCC GAT CTT CCC TCT GGA TGC GTC [ 60]
#KK           GCC AGC AGC CGC GGT AAT ACG GAG GGT GCA [ 60]
#LL           CAG AGG AGG GGA TAA AAT AAG AAG AAC GTA [ 60]
#E2           GCC AGC AGC CGC GGT AAT ACG GAG GGT GCA [ 60]
#ETP          GCC AGC AGC CGC GGT AAT ACG GAG GGT GCA [ 60]
#Edwardsiella_tarda GCC AGC AGC CGC GGT AAT ACG GAG GGT GCA [ 60]

#ETD          CCA GTT AA- GCT GGT GTT CTT T-- --C AAT [ 90]
#KK           AGC GTT A-- ATC TGA ATT ACT GGG CGT AAA [ 90]
#LL           TAA GAA AAT AAC CAC AGC AAA CAA AAG AAA [ 90]
#E2           AGC GTT AT- ATC GGA ATT ACT GGG CGT AAA [ 90]
#ETP          AGC GTT A-- ATC GGA ATT ACT GGG CGT AAA [ 90]
#Edwardsiella_tarda AGC GTT A-- ATC GGA ATT ACT GGG CGT AAA [ 90]

#ETD          TTA CCA ATC GCT GCT GTC TTA CTC CCT TAA [120]
#KK           GCG CAC GCA GGC GGT TTG TTA ATA ATT GGA [120]
#LL           ATT TTT ATT TCT TTC CCT TTA CGC CCC CAA [120]
#E2           GCG CAC GCA GGC GGT TTG TTA A-- GTT GGA [120]
#ETP          GCG CAC GCA GGC GGT TTG TTA A-- GTT GGA [120]
#Edwardsiella_tarda GCG CAC GCA GGC GGT TTG TTA A-- GTT GGA [120]

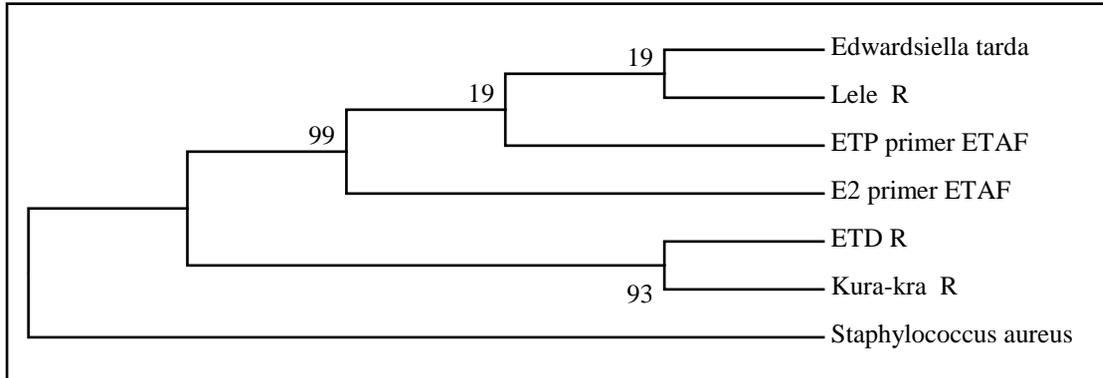
#ETD          TTC GTA AAT --G CTG CTC CTC CTA TGG CCT [150]
#KK           TGT GAA ATC --C CCG GGC TTA ACC TGG GAA [150]
#LL           ACA ACA ACT TAC CCA AAA CTC ATT TTA TTA [150]
#E2           TGT GAA ATC --C CCG GGC TTA ACC TGG GAA [150]
#ETP          TGT GAA ATC --C CCG GGC TTA ACC TGG GAA [150]
#Edwardsiella_tarda TGT GAA ATC --C CCG GGC TTA ACC TGG GAA [150]

#ETD          GGT GTT GCT AGT ATT TGC AGG TGT TAC [177]
#KK           CTG GAT CCA AGA CTG G-C AAG CTA CAG [177]
#LL           AAA TTT ACG AAA TCG CAC AAC AGT ACA [177]
#E2           CTG CAT CCA AGA CTG GGC AAG CTA CAG [177]
#ETP          CTG CAT CCA AGA CTG GGC AAG CTA CAG [177]
#Edwardsiella_tarda CTG CAT CCA AGA CTG G-C AAG CTA GAG [177]
```

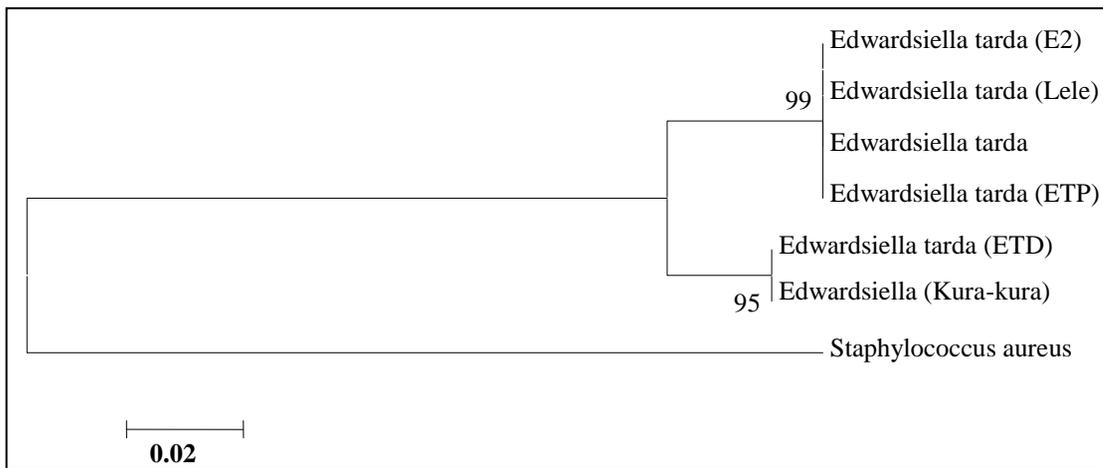
Gambar 1. Urutan hasil *sequencing* 5 isolat *E. tarda* pada area SSU 16S rRNA.

Keterangan: ETD = ATCC
 KK = Kura-kura
 LL = Lele Semarang
 E2=Yogyakarta (Nila)
 ETP=Pontianak (Mas)

Phylogenetic Tree dari Empat Isolat *Edwardsiella Tarda*



Gambar 2. Hasil analisis *maximum parsimony* dengan 1000x bootstrap resampling dari hasil sequencing 5 isolat *E.tarda* pada fragmen gen 16S rRNA (177 nt).



Gambar 3. Hasil analisis *neighbour-joining* dari hasil sequencing 5 isolat *E. tarda* pada area gen 16S rRNA.

Tabel 1. Hasil identifikasi karakteristik 5 isolat *Edwardsiella tarda*.

Media	ATCC	Pontianak Mas	Semarang Lele	Jogja Nila	Brazilia Kura-kura
Gram test	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+
Indole	+	+	+	+	+
H ₂ S in TSIA	+	+	+	+	+
Voges-proskover	+	+	+	+	+
Urea hydrolysis	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-
Gelatine hydrolysis	+	+	+	+	+
Gas of glucose	+	+	+	+	+
Acid of:					
Glucose	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+
Sucrose S	+	+	+	+	+

Simpulan dan Saran

Simpulan

Tiga isolat *E. tarda* adalah strain yang sama berasal dari ikan dibandingkan dengan isolat *E. tarda* dari kura-kura Brazil dan isolat ATCC yang berasal dari manusia secara *phylogenetic tree*.

Saran

Perlu dilakukan penelitian yang sama terhadap sedimen sungai dan kondisi lingkungan dari asal ikan yang positif terinfeksi *E. tarda* di berbagai lokasi di Indonesia.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih diucapkan kepada drh. Surya Amanu, MP. Bagian Mikrobiologi yang telah banyak membantu isolasi dan identifikasi bakteri.

Daftar Pustaka

- Acharya, M., Maiti, N.K., Mohanty, S., Mishra, P. dan Samanta, M. 2007. Genotyping of *Edwardsiella tarda* isolated from freshwater fish culture system. *J. Comparative Immunology. Microb. and infections*, 30: 33–40.
- Baird, K.D., Chikarmane, H.M., Smolowitz, R. dan Uhlinger, K.R.J. 2003. *Biological Laboratory*. 205: 235–236.
- Chen, J.D. dan Lai, S.Y. 1998. Molecular Identification of *Edwardsiella tarda*. *Zool. Stud.*, 37: 169–176.
- Inglis, V., Robert, R.J. dan Bromage, N.R. 1993. *Bacterial Disease of Fish*. Blackweell Scientific Publication. Oxford. 61–75.
- Hwang, W. dan Won Kim. 1995. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematic. 11–13.
- Nucci, C., Silveira, W.D., Correa, S.S., Nakazato, G., Bando, S.Y., Ribeiro, M.A. dan Castro, A.F.P. 2002. Microbiological Comparative Study of Isolates of *Edwardsiella tarda* Isolated in Different Countries from Fish and Human. *Veterinary Microb.*, 89: 29–39.
- Mowbray, E.E., Buck, G., Humbaugh, K.E. dan Marshall, G.S. 2003. Maternal Colonization and Neonatal Sepsis Caused by *Edwardsiella tarda*. *Pediatric* (111): 296–298.
- Pirarat, N., Katagiri, T., Maita, M., Endo, M. dan Sailasuta, A. 2008. Distribution of *Edwardsiella tarda* Antigens and IgM Containing Cells in Tilapia Immune Organs during Septicemia: An Immunohistochemical Study. *The Thai J. of Veterinary Medicine*, 38: 45–52.
- Post, G. 1987. *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications Inc. 31–37.
- Saitou, N. dan Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406–425.
- Swaim, P., Mukherjee, S.C., Sahoo, P.K., Das, B.K., Pattnaik, P., Murjani, G. dan Nayak, S.K. 2001. Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA) for the Diagnosis of *Edwardsiella terda* infection in Fish. *Asian Fisheries Science*, 14: 89–93.
- Wakabayashi, H. dan Egusa, S. 1973. *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel diseases, *Bull. of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 39: 931–936.
- Wyatt, L.E., Nickelson, R.H. dan Vanderzant, C. 1979. *Edwardsiella tarda* In Freshwater Catfish and Their Environment. *Appl. and Enviro. Microb.*, 38: 710–714.