

## Deteksi *Edwardsiella tarda* pada ikan lele (*Clarias* sp.) dengan metode fluorescent antibody technique (FAT)

### Detection of *Edwardsiella tarda* in catfish (*Clarias* sp.) by fluorescent antibody technique (FAT)

Firma<sup>1</sup>, Rahman Rizky Amalia<sup>1</sup>, Utami Sari<sup>1</sup>, Chotimah Chusbul<sup>1</sup>, Abdulgani Amri Siregar\*<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Balai Uji Standar Karantina Ikan  
Jl. Raya Setu No. 1 Setu Cipayung Jakarta Timur 13880

<sup>2</sup> Institut Pertanian Bogor, Indonesia  
Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

\*email: agas@ipb.ac.id

#### ABSTRACT

The fluorescent antibody technique (FAT) can be used to detect *Edwardsiella tarda* rapidly. As preliminary step, it have been performed purity test of bacteria by PCR, specificity test of mouse anti-*E. tarda* monoclonal antibody by blocking using chicken and rabbit serum, and optimization of conjugate secondary antibody mouse IgG-H&L (FITC) dillution rate. Fourty eights catfish were intraperitoneally injected by 0,3 mL of *E. tarda* with different concentration, namely: 10<sup>2</sup> CFU/mL, 10<sup>3</sup> CFU/mL, 10<sup>5</sup> CFU/mL. Kidney, spleen, and liver from three fishes in each treatment were collected at interval time of six hours, 12 hours, 24 hours, 48 hours after infection. The results showed that *E. tarda* could be detected in fish infected with 10<sup>2</sup> CFU of *E. tarda* after six hours of injection in kidney, liver, and spleen of infected fish. Hence, FAT is faster than detection by bacterial culture method, and this technique can be useful to prevent the spread of fish disease.

Keywords: fluorescent antibody technique, *Edwardsiella tarda*, detection, catfish

#### ABSTRAK

Teknik fluorescens antibodi (FAT) dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri *Edwardsiella tarda* secara cepat. Sebagai tahap awal, telah dilakukan uji kemurnian bakteri menggunakan PCR, uji spesifitas antibodi *E. tarda* tikus dengan cara blocking menggunakan serum ayam dan kelinci, dan optimasi tingkat pengenceran konjugat secondary antibody mouse IgG-H&L (FITC). Sebanyak 48 ekor ikan lele diinjeksi secara intraperitoneal dengan 0,3 mL *E. tarda* dengan konsentrasi berbeda, yaitu 10<sup>2</sup> CFU/mL, 10<sup>3</sup> CFU/mL, dan 10<sup>5</sup> CFU/mL. Ginjal, limpa, dan hati dari tiga ekor ikan diambil dari setiap perlakuan pada interval waktu enam jam, 12 jam, 24 jam, 48 jam setelah infeksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ikan yang diinfeksi dengan bakteri konsentrasi 10<sup>2</sup> CFU /mL dapat terdeteksi oleh FAT setelah enam jam injeksi, pada organ ginjal, hati, dan limpa. Dengan demikian, metode FAT lebih cepat daripada deteksi bakteri menggunakan metode pengulturan, dan teknik ini dapat bermanfaat untuk mencegah penyebaran penyakit ikan.

Kata kunci: teknik fluoresens antibodi, *Edwardsiella tarda*, deteksi, ikan lele

#### PENDAHULUAN

Berdasarkan hasil pemantauan Hama dan Penyakit Ikan Karantina yang dilakukan oleh Pusat Karantina Ikan pada tahun 2005, *Edwardsiella tarda* telah ditemukan di Pulau Jawa, Sumatera dan Kalimantan. Dilihat dari segi kesehatan masyarakat, bakteri ini bersifat zoonosis pada manusia (Plumb, 1993). Uji coba yang dilakukan ini dapat memantapkan uji fluorescent antibody technique (FAT) sebagai uji diagnostik *E.*

*tarda*

*E. tarda* adalah bakteri penyebab *Edwardsiellosis* pada ikan, bersifat Gram negatif, bergerak dengan flagela, tidak membentuk spora atau berkapsul, ukuran (0,3–1,2)×(1,0–6,03) µm. *E. tarda* dapat hidup di lingkungan air tawar (Austin & Austin, 1999) dan laut dengan kisaran suhu pertumbuhan 10–39 °C. Serangan *E. tarda* bersifat sistemik dalam berbagai kelompok umur dan populasi ikan (Ewing *et al.*, 1965) terutama pada ikan lele dan sidat (Frerichs &

Millar, 1993). Lesi patologis anatomis *E. tarda* adalah warna tubuh pucat, dan jika ikan lele terserang bakteri ini tampak pendarahan pada organ visceral. Infeksi ringan ditandai dengan adanya luka kecil, sementara jika infeksi akut luka ditandai dengan luka bernanah berisi gas dan berbau busuk.

Metode FAT telah digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi bakteri, virus, protozoa, jamur dan juga antigen pada berbagai jaringan (Blood & Studdert, 2007; Adams & Thompson, 2008). Prinsip dasar FAT adalah reaksi antara antigen spesifik (Ags) yang ada pada jaringan atau preparat apus dengan antibodi spesifik (Abs) yang telah diberi tanda pewarna berpendar, di mana ikatan yang terbentuk akan memancarkan warna tertentu yang dapat dilihat dengan mikroskop fluoresens. Metode FAT pertama kali diperkenalkan oleh Coons *et al.* pada tahun 1942. Metode ini mempunyai sensitivitas dan spesifitas yang tinggi dan dapat memvisualisasikan daerah di sekitar sel. Berdasarkan studi tersebut, maka peneliti melakukan uji coba sebagai cara untuk mendapatkan deteksi cepat yang dapat digunakan dalam melakukan pencegahan penyebaran penyakit ikan. Penelitian ini dilakukan untuk menguji sensitivitas dan kecepatan deteksi *E. tarda* menggunakan metode FAT. Pada tahap awal dilakukan juga optimasi metode.

## BAHAN DAN METODE

### Verifikasi bakteri *E. tarda*

Bakteri *E. tarda* yang diuji berasal dari laboratorium Balai Besar Karantina Ikan (BBKI) Soekarno-Hatta yang sebelumnya telah diinfeksi ulang pada ikan lele ukuran 7–10 cm. Bakteri kemudian diisolasi dan diidentifikasi kembali secara konvensional. Isolat diidentifikasi menggunakan metode PCR dengan menggunakan primer *forward* Eta2-351 (5'-TAG GGA GGA AGG TGT GAA-3') dan primer *reverse* Edwsp-780r (5'-CTC TAG CTT GCC AGT CTT-3')

### Uji spesifitas antibodi monoklonal *E. tarda* terhadap bakteri lain

Uji spesifisitas ditentukan dengan

melakukan pengujian reaksi silang dengan bakteri patogen lainnya, yaitu *Aeromonas hydrophila* dan *Escherichia coli*. Kedua bakteri ini dikultur pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) selama 24 jam pada suhu 25 °C. Kemudian bakteri dikultur kembali pada media *Tryptic Soy Broth* (TSB). Preparat *smear* patogen tersebut diuji spesifitasnya dengan uji FAT.

### Uji spesifitas antibodi *E. tarda* tikus menggunakan serum ayam dan kelinci

*E. tarda* dipreparasikan pada *slide glass* steril, dikeringanginkan dan selanjutnya difiksasi dengan pemanasan suhu 60 °C selama dua menit. Selanjutnya preparat diinkubasi dengan serum ayam dan serum kelinci selama 30 menit dan diinkubasi dalam suasana lembab dengan cara meletakkan slide dalam wadah yang diberi alas tisu atau kain basah kemudian ditutup rapat. Langkah selanjutnya preparat dicuci dengan PBS (*phosphat buffer saline*) 1% tween 20 selama lima menit dan diulangi tiga kali. Preparat diinkubasi kembali dengan konjugat selama 30 menit dengan suasana lembab dan gelap, selanjutnya dicuci dengan larutan PBS 1% tween selama lima menit, dan diulangi tiga kali. *Mounting* preparat dilakukan menggunakan gliserin PBS dan ditutup dengan *cover glass*, selanjutnya diamati di bawah mikroskop berpendar. Optimalisasi tingkat pengenceran menggunakan konjugat *secondary antibody mouse IgG-H&L (FITC)* yang berbeda, yaitu: 1:4000; 1:5000; 1:6000; dan 1:7000.

### Uji diagnostik *E. tarda*

Ikan uji sebanyak 48 ekor dipelihara dalam empat buah akuarium ukuran 40×30×20 cm<sup>3</sup>. Setiap akuarium diisi dengan 12 ekor ikan. Kemudian ikan diinjeksi dengan bakteri dengan konsentrasi berbeda, yaitu: 10<sup>2</sup> CFU/mL, 10<sup>3</sup> CFU/mL, 10<sup>5</sup> CFU/mL sebanyak 0,3 mL secara intraperitoneal. Ikan untuk kontrol negatif diinjeksi dengan NaCl fisiologis. Sampling dilakukan dengan interval waktu enam jam, 12 jam, 24 jam, 48 jam setelah injeksi dengan mengambil tiga ekor ikan dari setiap perlakuan. Selama pengujian ikan tetap diberi pakan dan diberi aerasi yang cukup

untuk menjaga kelangsungan hidup ikan uji. Organ target yang diuji adalah ginjal, limpa, hati. Organ diambil secara aseptis dan setiap organ dibuat *tissue inprint* pada *slide glass* steril.

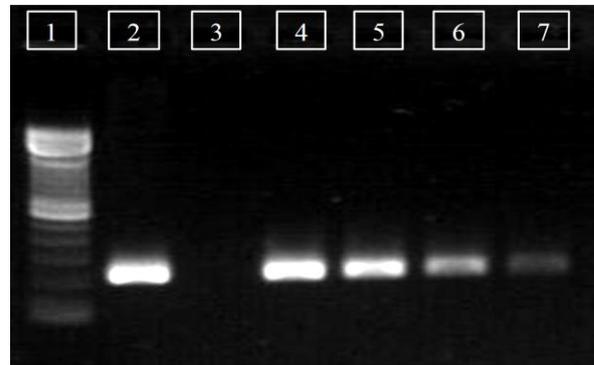
Setelah enam jam injeksi, organ target diambil secara aseptis dan dibuat *tissue inprint*, kemudian dilakukan fiksasi dengan aseton dingin selama 15 menit. Setelah kering, preparat diproses lanjut untuk uji FAT. Reaksi antibodi monoklonal dilakukan selama 30 menit pada suhu ruang dan lembab, kemudian preparat dibilas dengan PBS 1% tween 20 (pH 7,2). Selanjutnya preparat diinkubasi dengan antibodi FITC selama 30 menit pada suhu ruang, lembab dan gelap. Setelah itu, preparat dibilas dengan PBS pada ruang gelap, kemudian preparat dikeringanginkan. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 $\times$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

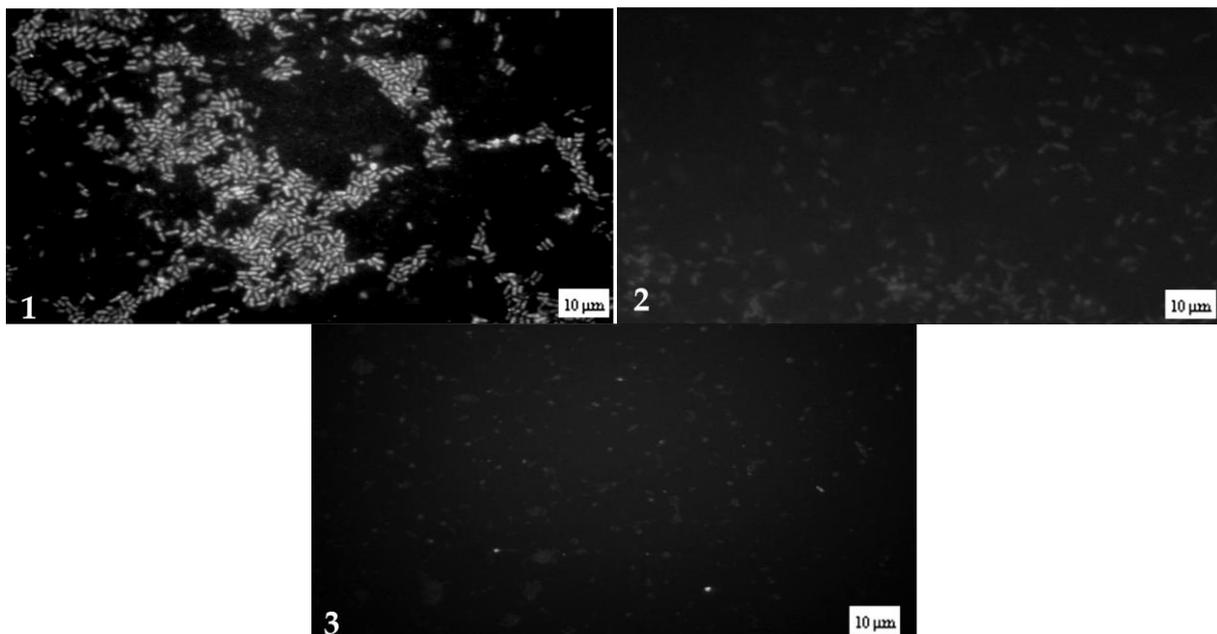
Isolat bakteri tersedia dalam bentuk murni, dan telah diawetkan dengan *freeze drying* dan gliserol. Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa isolat tersebut merupakan bakteri *E. tarda* (Gambar 1). Hasil uji spesifitas antibodi *E. tarda* tikus dengan cara reaksi silang menggunakan bakteri pathogen lain dapat dilihat pada

Gambar 2. Dari hasil uji spesifitas tersebut diketahui bahwa antibodi monoklonal *E. tarda* tidak dapat mendeteksi bakteri Gram negatif selain *E. tarda*.

Berdasarkan Gambar 3 dapat dipastikan bahwa antibodi monoklonal *E. tarda* dari tikus tidak dapat bereaksi dengan serum ayam dan kelinci, tetapi hanya dapat bereaksi dengan antibodi atau serum yang berasal dari tikus saja. Dari hasil optimasi, pengenceran konjugat *secondary antibody mouse* IgG-H&L (FITC) yang disarankan minimal 1:6000 (Tabel 1, Gambar 4). Hal ini tidak sesuai dengan saran pabrik (1:4000), karena fluoresens masih maksimal, dan tidak ditemukan adanya negatif palsu akibat reaksi

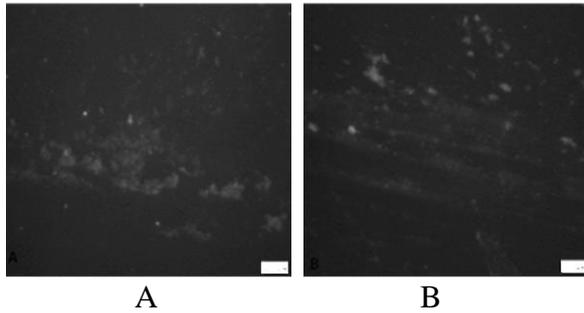


Gambar 1. Verifikasi bakteri *Edwardsiella tarda* Menggunakan metode PCR. Lajur 1: marker 100 bp; Lajur 2: kontrol positif pada 216 bp; Lajur 3: kontrol negatif (ddH<sub>2</sub>O); Lajur 4: bakteri isolat murni; Lajur 5: bakteri diawetkan dengan *freeze drying*; Lajur 6–7: bakteri diawetkan dengan gliserol.



Gambar 2. Reaksi positif uji spesifitas antibodi monoklonal *Edwardsiella tarda* terhadap bakteri *E. tarda* (1). Reaksi negatif uji spesifitas antibodi monoklonal *E. tarda* terhadap *Escherichia coli* (2) dan terhadap *Aeromonas hydrophila* (3). Konjugat *secondary antibody mouse* IgG-H&L yang digunakan adalah 1:4000.

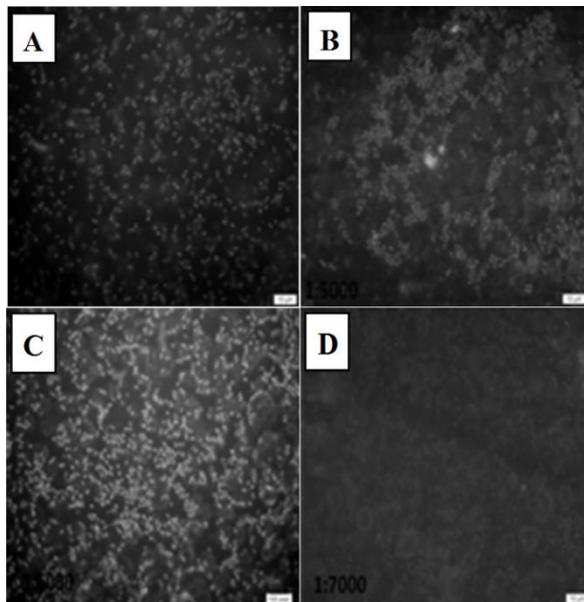
warna fluoresens yang kurang atau redup.



Gambar 3. Reaksi negatif *blocking* antibodi menggunakan serum ayam dan kelinci terhadap bakteri *Edwardsiella tarda*. A) dengan serum ayam; B) dengan serum kelinci. Satu skala (garis putih di kanan bawah) pada gambar setara dengan (200  $\mu$ m).

Tabel 1. Hasil uji optimalisasi tingkat pengenceran konjugat *secondary antibody mouse* IgG-H&L

Perlakuan	Pengenceran konjugat	Hasil FAT	Keterangan
Ginjal + suspensi bakteri	1:4000	+	Berpendar
	1:5000	+	Berpendar
	1:6000	+	Berpendar
	1:7000	-	Redup



Gambar 4. Hasil Pewarnaan FAT pada campuran ginjal dan bakteri *Edwardsiella tarda* dengan pengenceran 1:4000 (A), pengenceran 1:5000 (B), pengenceran 1:6000 (C), pengenceran 1:7000 (D) (FAT 1000x).

Deteksi *E. tarda* pada ikan dilakukan dengan menginfeksi ikan uji melalui suntikan intraperitoneal menggunakan bakteri *E. tarda* dengan konsentrasi  $10^2$  CFU,  $10^3$  CFU,  $10^5$  CFU dan NaCl fisiologis sebagai kontrol

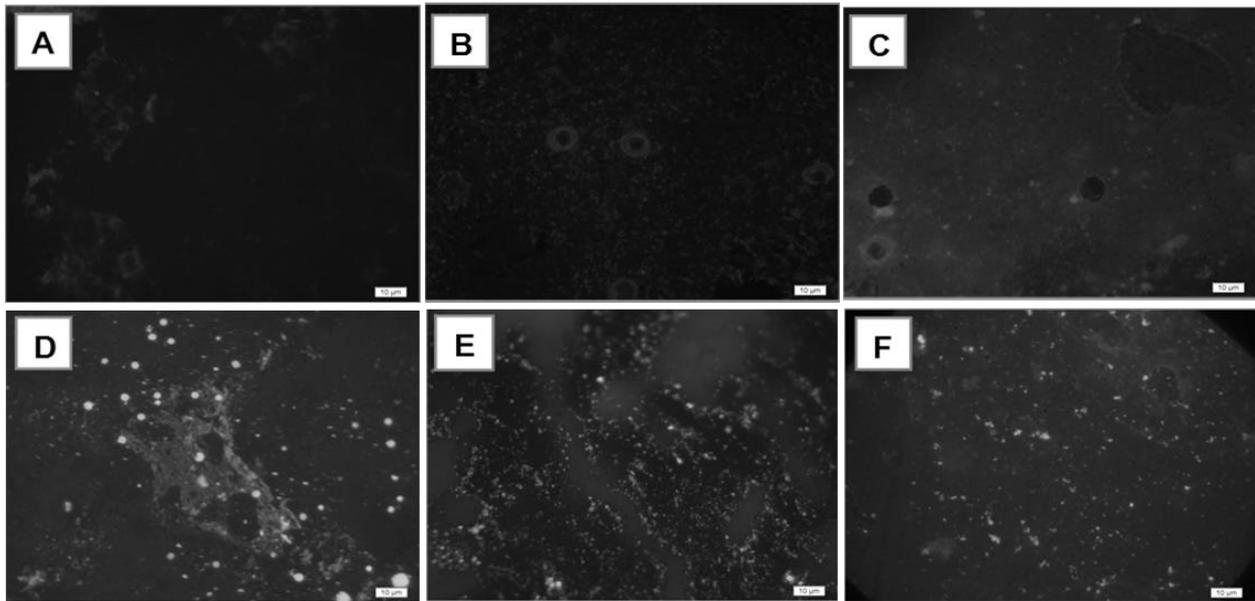
negatif. Pada sampling pertama dilakukan setelah jam keenam injeksi dengan asumsi bahwa bakteri yang diinfeksi telah masuk ke dalam organ tubuh. Ikan uji kemudian dinekropsi dan diambil organ target untuk uji FAT. Hasil uji FAT dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 5.

Tabel 2. Hasil uji FAT terhadap organ target ikan uji

No.	Konsentrasi bakteri	Waktu (jam ke)	Ginjal	Hati	Limpa
1	NaCl fisiologis steril	6	-	-	-
		12	-	-	-
		24	-	-	-
		48	-	-	-
2	$10^2$	6	+	+	+
		12	+	+	+
		24	+	+	++
		48	+	++	+++
3	$10^3$	6	+	+	+
		12	+	+	++
		24	+	++	+++
		48	++	++	+++
4	$10^5$	6	+	+	+
		12	+	++	++
		24	++	+++	+++
		48	++	+++	+++

Keterangan: negatif (-): tidak berpendar; positif (+): berpendar, dengan 1–15 antigen dalam satu preparat; positif (++): berpendar, dengan <30 antigen dalam 1 kali lapangan pandang. Positif (+++): berpendar, >30 antigen dalam satu kali lapangan pandang, menyebar merata pada preparat smear.

Metode FAT telah banyak digunakan untuk mendeteksi keberadaan bakteri pada ikan. Metode ini merupakan salah satu metode imunologi dengan berdasarkan penggunaan antibodi monoklonal pada immunoassay (Abbas et al., 2007). Prinsip dasar dari fluoresens antibodi adalah reaksi antara antigen spesifik (Ags) yang ada pada jaringan atau preparat apus dengan antibodi spesifik (Abs) yang telah diberi tanda dengan pewarna berpendar. Ikatan yang terbentuk antara antigen-antibodi spesifik akan memancarkan warna tertentu yang dapat dilihat dengan mikroskop berpendar. Fluoresens antibodi mempunyai spesifitas yang tinggi. Selain itu, metode ini dapat



Gambar 5. Konsentrasi injeksi  $10^2$  CFU,  $10^3$  CFU,  $10^5$  CFU Pewarnaan FAT pada sampel kontrol: A (organ ginjal pada jam keenam), B (organ hati pada jam ke-24), C (organ limpa pada jam ke-48) dan hasil pewarnaan FAT pada sampel uji: D (organ limpa kesentensi injeksi  $10^2$  CFU), E (organ hati kesentensi injeksi  $10^5$  CFU), F (organ ginjal konsentrasi injeksi  $10^3$  CFU) (FAT 1000 $\times$ ).

memvisualisasikan daerah di sekitar sel atau antigen secara langsung (Blood & Studdert, 2007).

Pada uji coba ini fluoresens antibodi menggunakan antibodi dan konjugat *mouse* IgG-H&L (FITC) Abcam menunjukkan reaksi positif terhadap *E. tarda*. Spesifikasi dari pabrik dinyatakan bahwa antibodi yang digunakan adalah antibodi monoklonal *E. tarda* tipe IgG1 dan pewarna FAT pada konjugat menggunakan *Diaminotriazinylzminoflourescein* (DTAF) dari antiserum monospesifik tikus, akan dihasilkan pewarnaan FAT dengan sangat spesifik antara antibodi dan antigen target, reaksi positif ditandai dengan adanya warna hijau apel yang berpendar. Pada uji coba ini dihasilkan warna hijau apel berpendar pada antigen atau jaringan yang terinfeksi. Hal ini sesuai dengan reaksi positif yang dinyatakan oleh manual pabrik. Warna ini timbul karena menggunakan larutan kromogen flouresein pada konjugat yang berikatan dengan hasil ikatan yang terbentuk antara antibodi monoklonal dengan antigen *E. tarda*.

Hasil uji spesifitas pada uji coba ini menunjukkan bahwa pewarnaan FAT dengan antibodi monoklonal *E. tarda* sangat spesifik. Hal ini ditandai dengan hasil negatif (tidak terbentuk warna hijau apel berpendar) pada *smear* bakteri *E. coli* dan *A. hydrophila*. Hal

ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Ryu *et al.* (1993) yang dapat mendeteksi bakteri *E. tarda* dan tidak dapat mendeteksi *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio anguillarum*, dan *Streptococcus* sp.

Dalam spesifikasi manual pabrik pengenceran konjugat yang disarankan adalah 1:4000 dengan pengenceran konjugat menggunakan PBS 1% BSA dengan interval pengenceran 1:4000, 1:5000, 1:6000, dan 1:7000. Berdasarkan Tabel 1, terlihat bahwa pengenceran 1:4000 sampai dengan 1:6000 dapat mendeteksi antigen *E. tarda* dengan warna hijau apel masih berpendar dengan jelas pada semua campuran organ dan inokulum bakteri. Pengenceran 1:7000 tingkat pendaran antigen *E. tarda* sudah mulai redup pada campuran darah dan inokulum bakteri, dan tidak berpendar pada setiap campuran organ ginjal dan hati dengan inokulum bakteri, sehingga untuk uji deteksi pada ikan digunakan konjugat 1:6000.

Pada uji coba ini diasumsikan pendaran positif satu (+) sebagai infeksi ringan dengan antigen yang terdeteksi 1–15 antigen per preparat. Pendaran positif 2 (++) sebagai infeksi sedang dengan antigen yang terdeteksi kurang dari 30 antigen pada satu kali lapangan pandang, dan pendaran positif tiga (+++) dengan asumsi antigen yang

terdeteksi lebih dari 30 antigen pada satu kali lapangan pandang. Berdasarkan hasil uji pada Tabel 4, pada jam keenam setelah infeksi menunjukkan pendaran positif satu (+) pada semua konsentrasi bakteri. Hal ini juga terlihat pada organ ginjal dan hati dengan konsentrasi injeksi bakteri  $10^2$  CFU/mL pada jam ke-12 dan ke-24, serta konsentrasi  $10^3$  CFU/mL pada jam ke-12 setelah injeksi yang dapat dikategorikan sebagai infeksi ringan.

Infeksi sedang terjadi pada konsentrasi  $10^2$  CFU/mL dengan daerah serangan pada organ limpa pada jam ke-24 dan organ hati pada jam ke-48. Kejadian ini juga terjadi pada konsentrasi injeksi  $10^3$  CFU/mL pada jam ke-24 dan ke-48, serta konsentrasi injeksi  $10^5$  CFU/mL dengan organ target yang terinfeksi limpa dan hati pada jam ke-12, organ ginjal pada jam ke-24 dan ke-48. Infeksi berat dengan lebih dari 30 antigen yang terlihat dalam satu kali lapangan pandang terlihat pada organ limpa dengan semua konsentrasi injeksi pada jam ke-24 dan jam ke-48, dan organ hati pada konsentrasi injeksi  $10^5$  CFU/mL.

Sejak terjadinya infeksi ringan menandakan adanya antigen bakteri *E. tarda* di dalam organ target yang menyebabkan terjadinya ikatan antara antigen dengan antibodi monoklonal *E. tarda* yang digunakan. Ikatan yang terbentuk ini akan mengikat konjugat berpendar, sehingga reaksi ikatan yang terbentuk dapat terlihat dengan terbentuknya warna dari ikatan IgG dengan enzim konjugat (*Diaminotriazinylaminofluorescein*). Reaksi positif dari ikatan tersebut jika di dalam jaringan dapat kita temukan reaksi warna hijau apel berpendar pada jaringan melalui mikroskop fluoresens.

Secara konvensional infeksi bakteri *E. tarda* pada ikan dapat dideteksi melalui pengambilan bagian tubuh ikan, dioleskan ke media kultur bakteri, diinkubasi semalam, dan kemudian dilakukan identifikasi dan karakterisasi bakteri. Waktu yang diperlukan relatif lama. Pada penelitian ini, aplikasi metode FAT dapat mendeteksi bakteri pada jam keenam pasca infeksi dengan dosis infeksi buatan  $10^2$  cfu/mL. Dengan demikian, metode FAT dapat mendeteksi lebih cepat

dan sensitivitas tinggi, dan hal ini dapat dijadikan sebagai salah satu bahan masukan untuk penyempurnaan metode standar diagnosa Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK).

## KESIMPULAN

Berdasarkan keseluruhan data hasil uji yang diperoleh maka dapat disimpulkan bahwa metode FAT memiliki spesifitas yang tinggi optimasi pengenceran konjugat bisa ditingkatkan sampai pengenceran 1:6000, dan dapat mendeteksi secara spesifik terhadap antigen *E. tarda*. Metode FAT dapat mendeteksi *E. tarda* sejak enam jam setelah infeksi buatan pada ikan lele (*Clarias* sp).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada mitra bestari yang telah membantu dalam perbaikan naskah.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2007. Cellular and Molecular Immunology 6<sup>th</sup> Edition. Philadelphia, USA: Saunder Elsevier.
- Adams A, Thompson KD. 2008. Recent applications of biotechnology ot novel diagnostics for aquatic animal: Review science technology. Off. int. Epiz. 27: 197–209.
- Austin B, Austin D. 1999. Characteristic of the diseases. In: Austin B, Austin D (eds) *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*, 3<sup>rd</sup> edition. London: Springer-Verlag Heidelberg. pp 13–15.
- Blood DC, Studdert VP. 2007. Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary, 3<sup>rd</sup> edition. Edinburgh, New York: Elsevier Saunders.
- Ewing WH, McWhorter AC, Escobar MR, Lubin AH. 1965. *Edwardsiella*, a new genus of enterobacteriaceae based on a new species. Int. Bull. Bacterial. Nomencl. Taxon. 15: 33–38.
- Frerichs GN, Millar SD. 1993. Characteristic of Gram negative pathogens. In: Frerichs GN, Millar SD. *Manual for The Isolation*

*and Identification of Fish Bacterial Pathogens.* Pisces Press Stirling. pp 28–29.

Plumb JA. 1993. *Edwardsiella septicaemia.* In: Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR (eds). *Bacterial Diseases of Fish.* Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications. pp

61–79.

Ryu HJ, Cho WY, Lee CS, Hoe GJ. 1993. Detection of *Edwardsiella tarda*, the pathogenic bacteria in freshwater fishes by means of the indirect fluorescent antibody technique. *Korean Journal Vet. Service* 16: 111–119.