

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI *Edwardsiella ictaluri* PENYEBAB PENYAKIT *Enteric Septicemia of Catfish (ESC)* PADA IKAN PATIN (*Pangasius* sp.)

Uni Purwaningsih[#], Hesy Novita, Desy Sugiani, dan Septyan Andriyanto

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan
Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154

(Naskah diterima: 29 Januari 2018; Revisi final: 4 April 2019; Disetujui publikasi: 4 April 2019)

ABSTRAK

Penyakit *Enteric Septicemia of Catfish (ESC)* merupakan salah satu kendala pada budidaya ikan patin yang disebabkan oleh bakteri *Edwardsiella ictaluri*. *E. ictaluri* termasuk kelompok golongan bakteri gram negatif. Infeksi ESC ditandai dengan gejala klinis antara lain bercak putih pada organ internal, pendarahan pada pangkal sirip dan ekor. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan karakterisasi isolat *E. ictaluri*, serta mengetahui tingkat patogenitasnya pada ikan patin (*Pangasius* sp.). Sampel ikan patin sakit yang terduga terinfeksi ESC diperoleh dari tiga lokasi budidaya yaitu dari Jatiluhur, Sukabumi, dan Sukamandi. Berdasarkan hasil uji karakterisasi secara biokimia diperoleh delapan isolate; masing-masing satu isolat dari Jatiluhur, tiga isolat dari Sukabumi, dan empat isolat dari Sukamandi, yang definitif sebagai *E. ictaluri*. Hal ini juga didukung dengan diagnosa *Polymerase Chain Reaction* dan sekuensing DNA dari delapan isolat menunjukkan berat molekul pada 2.000 bp dan memiliki tingkat *similarity* sebesar 97%-99%. Berdasarkan uji patogenitas diperoleh hasil bahwa isolat *E. ictaluri* dengan kode PJh-01 asal Jatiluhur sebagai isolat yang memiliki patogenitas tinggi dengan nilai LD₅₀ sebesar 3,23 x 10⁷ cfu.

KATA KUNCI: *E. ictaluri*; patin; patogenitas; identifikasi; karakterisasi

ABSTRACT: *Identification and characterisation of bacteria Edwardsiella ictaluri causing Enteric Septicemia of Catfish (ESC) on catfish (Pangasius sp.). By: Uni Purwaningsih, Hesy Novita, Desy Sugiani, and Septyan Andriyanto*

Infection of Enteric Septicemia of Catfish (ESC) in catfish is caused by bacteria Edwardsiella ictaluri. E. ictaluri belongs to gram-negative bacteria. ESC infection was characterized by clinical symptoms such as whitish spots on internal organs and bleeding at the base of the fins and tail. The study aimed to identify and characterize E. ictaluri isolates and to determine its pathogenicity on catfish (Pangasius sp.). The sample of diseased catfish and suspected infected fish by ESC was collected from three sites of catfish aquaculture (Jatiluhur, Sukabumi, and Sukamandi). Biochemical characterization revealed that eight isolates, i.e.; one isolate from Jatiluhur, three isolates from Sukabumi, and four isolates from Sukamandi, were identified as E. ictaluri. This finding was confirmed by the result of Polymerase Chain Reaction and DNA sequencing that all eight isolates had a molecular weight of 2,000 bp and showed a similarity level of 97%-99% to E. ictaluri. Based on the pathogenicity test, it was found that E. ictaluri isolate with code of PJh-01 collected from Jatiluhur has the highest pathogenicity LD50 value of 3.23 x 10⁷ cfu.

KEYWORDS: *E. ictaluri*; catfish; pathogenicity; identification; characterization

PENDAHULUAN

Enteric Septicemia of Catfish (ESC) merupakan salah satu jenis penyakit yang cukup serius dan banyak menyerang budidaya ikan patin yang disebabkan oleh bakteri *Edwardsiella ictaluri*. Kematian ikan patin akibat

infeksi bakteri *E. ictaluri* menjadi penghambat keberhasilan produksi budidaya. Di Indonesia dilaporkan, *E. ictaluri* pertama kali ditemukan telah menginfeksi ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) di Provinsi Jambi pada bulan Januari 2002 (Panigoro *et al.*, 2005). Penyakit ESC pertama kali dikenal pada tahun 1976 sebagai penyebab kematian pada benih *channel catfish (Ictalurus punctatus)* di Alabama dan Georgia, USA. Bakteri penyebab penyakit ini diidentifikasi sebagai spesies *E. ictaluri*. *E. ictaluri* juga dilaporkan telah menginfeksi *walking*

[#] Korespondensi: Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan.
Jl. Sempur No. 1, Bogor 16129 Indonesia.
Tel. + 62 251 8313200
E-mail: uni_fish@yahoo.com

catfish (*Clarias batrachus*) yang dibudidayakan di Thailand pada tahun 1987.

Keskin *et al.* (2004) juga melaporkan terjadi infeksi *E. ictaluri* pada ikan *Rainbow Trout* (*Oncorhynchus mykiss*). Infeksi *E. ictaluri* menyerang industri ikan patin di Vietnam dan menyebabkan kerugian ekonomi yang besar akibat angka kematian tinggi, kerentanan terhadap penyakit lain, serta biaya pengobatan yang tinggi (Plumb, 1999; Wagner *et al.*, 2002; Crumlish *et al.*, 2002). *E. ictaluri* sebagai penyebab utama *Enteric Septicemia* dapat mengakibatkan kematian 10%-50% pada catfish. Pada infeksi akut, kematian dapat terlihat pada hari ke-4 sampai hari ke-12. *E. ictaluri* umumnya menyerang golongan catfish dan dikenal dengan penyakit *Hole in the Head Disease* karena menyebabkan lesi terbuka pada daerah kepala (Keskin *et al.*, 2004). Hawke *et al.* (2013) juga melaporkan kejadian infeksi *Edwardsiellosis* sebagai penyebab kematian pada ikan *zebrafish* (*Danio rerio*). Soto *et al.* (2012) meneliti kasus *E. ictaluri* sebagai penyebab kematian pada ikan nila tilapia.

Menurut Inglis *et al.* (1993), *E. ictaluri* dapat bertahan hidup pada kolam berlumpur selama lebih dari 90 hari pada 25°C. Bakteri ini diduga bersifat karier dalam usus ikan yang terinfeksi. Pada penelitian *channel catfish* yang terinfeksi ESC mortalitas tertinggi terjadi pada suhu 25°C, terendah pada suhu 23°C dan 28°C, sedangkan pada suhu 17°C, 21°C, atau 32°C tidak ada kematian. Pasnik *et al.* (2007) menyatakan bahwa ikan white perch *Morone americana*, chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*, dan rainbow trout *O. mykiss* dapat terinfeksi secara buatan oleh bakteri ini. Masing-masing ikan mempunyai kerentanan yang berbeda terhadap infeksi *E. ictaluri*. Ikan nila dapat mengalami kematian sampai 40% pada infeksi bakteri dengan konsentrasi 10³ cfu/mL (Soto *et al.*, 2012) dan kematian mencapai 50% pada ikan ayu jika diinfeksi 10⁴ cfu/mL (Sakai *et al.*, 2008). Selain itu, Suanyuk *et al.* (2014) melaporkan bahwa konsentrasi *E. ictaluri* 10⁶ cfu/mL menimbulkan kematian 50% ikan lele hibrid dan menurut laporan Pasnik *et al.* (2007) bahwa kematian ikan white perch terjadi sampai 100% pada infeksi *E. ictaluri* 10⁷ cfu/mL.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi isolat *E. ictaluri*, serta menentukan tingkat patogenitasnya pada ikan patin (*Pangasius sp.*).

BAHAN DAN METODE

Nekropsi Sampel Ikan Patin Sakit

Pengambilan sampel ikan sakit yang menunjukkan gejala klinis terhadap infeksi *E. ictaluri* berasal dari daerah Jatiluhur (tiga ekor), Sukabumi (enam ekor),

dan Sukamandi (16 ekor). Nekropsi dilakukan untuk mengisolasi organ target yaitu ginjal. Isolasi dengan cara mengkultur goresan ose dari organ target ke media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C. Koloni yang tumbuh selanjutnya dimurnikan 3-4 kali dengan metode goresan ose secara bertingkat pada media yang sama sampai diperoleh koloni yang seragam.

Identifikasi dan Karakterisasi Isolat Bakteri dengan Metode Biokimia dan API 20E

Kultur murni bakteri hasil isolasi yang diperoleh selanjutnya diidentifikasi dan karakterisasi menggunakan media uji biokimia kit API 20E. Bakteri dikultur pada media BHIA, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Sebanyak 1-2 ose kultur bakteri dimasukan NaCl fisiologis 0,85%; diencerkan sampai kepadatan standar kekeruhan Mac Farland 4. Suspensi bakteri dimasukan ke kolom API hingga batas kolom yang ditentukan, khusus untuk parameter ADH, LDC, ODC, H₂S, dan Urea ditambahkan parafin cair terlebih dahulu sebelum diinkubasi. Inkubasi dilakukan pada suhu 36°C ± 2°C selama 18-24 jam. Pada parameter TDA, Indole dan VP, masing-masing ditambahkan reagen TDA (Ref. 70 402), reagen James (Ref. 70 542), dan reagen VP1 + VP2 (Ref. 70 442) sebelum pembacaan (Popovic *et al.*, 2009). Interpretasi pembacaan untuk API 20E ditunjukkan dengan adanya perubahan warna. Hasil API 20E selanjutnya dianalisis menggunakan program API sistem untuk menentukan spesies bakteri yang diperoleh.

Amplifikasi DNA Isolat Bakteri dengan Polymerase Chain Reaction

DNA isolat bakteri diamplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* dengan mengembangkan metode yang telah dilakukan oleh Williams & Lawrence (2010). Preparasi isolasi DNA diawali dengan mengkultur bakteri dalam media BHI Broth pada volume 10 mL. Hasil kultur disentrifus pada 10.000 rpm (10 menit) dan *pellet* yang terbentuk merupakan material uji untuk isolasi DNA. Pelet dilarutkan dalam 200 µL DNA *free water* (NFW) dan disentrifus pada 10.000 rpm (10 menit), serta dipanaskan pada suhu 98°C selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan DNA hasil ekstraksi. Tahap pertama dalam amplifikasi DNA untuk mendeteksi genus *Edwardsiella*, berdasarkan Williams & Lawrence (2010) digunakan primer 16 S-*flank* (5'-TAT CTA ATC CTG TTT GCT CCC C-3') dan 23 S-F (5'-GAC GTT GAT AGG CTG GGT GT-3'). Analisis PCR tahap kedua adalah membedakan spesies *E. ictaluri* dan *E. tarda*, digunakan primer spesifik IVS (5'-TTA AAG TCG AGT TGG CTT AGG G-3') dan IRS (5'-TAC GCT TTC CTC AGT GAG TGT C-3'). Siklus suhu amplifikasi yang digunakan untuk semua

tahapan identifikasi dengan PCR adalah suhu predenaturasi 95°C selama empat menit kemudian suhu denaturasi 95°C selama 30 detik, sedangkan suhu *annealing* 55°C selama 30 detik dan elongasi pada 72°C selama dua menit. Siklus denaturasi, *annealing*, dan elongasi diulang sebanyak 30 kali dan dilanjutkan dengan satu siklus final elongasi pada 72°C selama 10 menit.

Sekuensing Hasil PCR dari DNA Isolat Bakteri

Produk DNA yang dihasilkan disekuensing menggunakan jasa perusahaan sekuensing 1st Base Singapura. *Alignment Multiple analysis* kelompok dilakukan mengacu pada data *genbank* dengan program BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) pada level nukleotida. Pohon hubungan kekerabatan filogenik *strain* isolat bakteri dibuat dengan menggunakan program MEGA (Moleccular Evolusionare Genetic Analysis software version 7.1).

Uji Patogenitas

Ikan uji menggunakan ikan patin (*Pangasius* sp.) berukuran 11-12 cm. Ikan yang digunakan harus memenuhi asumsi *Spesifik Pathogen Free* (SPF) dan melewati masa aklimatisasi selama 14 hari. Pengujian sifat SPF dilakukan dengan pemeriksaan secara bakteriologi dan PCR. Kelompok ikan patin uji masing-masing diinjeksi secara intraperitoneal dengan kandidat isolat bakteri yang terindikasi sebagai *E. ictaluri* dipilih empat isolat dari delapan isolat terseleksi berdasarkan asal, yaitu isolat dengan kode PJh-01, PCr-01, PSkm-07, dan PSkm-11. Bakteri uji dikultur pada media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB). Pengujian menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan lima perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah perbedaan jumlah sel bakteri yang diinfeksi yaitu 10^4 , 10^6 , 10^8 , dan 10^{10} , untuk kelompok kontrol diinjeksi dengan NaCl fisiologis 0,85%. Dosis injeksi masing-masing perlakuan adalah 0,1 cc. Pengamatan dilakukan terhadap tingkat mortalitas harian selama 14 hari. Menurut Tauhid & Purwaningsih (2011), penghitungan nilai LD_{50} dapat dihitung menggunakan statistik analisis regresi linier sederhana dengan program SPSS versi 11.0. Model persamaan regresi linier sederhana adalah seperti berikut ini:

$$Y = a + bX$$

di mana:

- Y = variabel response atau variabel akibat (*dependent*)
- X = variabel predictor atau variabel faktor penyebab (*independent*)
- a = konstanta
- b = koefisien regresi (kemiringan)

HASIL DAN BAHASAN

Hasil pemeriksaan terdapat 25 ekor ikan patin sakit yaitu tiga ekor dari Jatiluhur, enam ekor dari Sukabumi, dan 16 ekor dari Sukamandi. Hasil kultur murni target organ (ginjal) pada BHI Agar menunjukkan bahwa delapan sampel terduga terinfeksi bakteri *E. ictaluri* yang yaitu satu ekor berasal dari Jatiluhur, tiga dari Sukabumi, dan empat dari Sukamandi (Tabel 1). Karakteristik pertumbuhan yang khas *E. ictaluri* ditunjukkan pada media BHI Agar yaitu koloni putih halus, kecil terpisah, bentuk bulat, elevasi cembung, dan memiliki ukuran 0,5-1,0 x 1.0-3 μ m.

Seleksi isolat tahap awal dari hasil kultur yang tumbuh sebelum dilakukan karakterisasi dengan API-20E dilakukan dengan melihat kemampuan tumbuh, warna koloni, bentuk koloni, dan sudut elevasi. Isolat yang menunjukkan warna koloni putih kekuningan transparan, halus, bulat, dan cembung ramping keseluruhan tepi, dipilih untuk diuji dengan Kit API-20E. Sebanyak delapan isolat diperoleh sebagai isolat yang definif *E. ictaluri* berdasarkan pemeriksaan uji karakterisasi biokimia dan API-20 (Tabel 3) yaitu isolat PJh-01, PCr-01, PCr-02, PCr-05, PSkm-04, PSkm-07, PSkm-08, dan PSkm-11. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian-penelitian yang telah dilakukan; menunjukkan bahwa *E. ictaluri* adalah bakteri fakultatif anaerob, batang Gram negatif termasuk famili Enterobacteriaceae, non-spora, motil, katalase positif, oksidase negatif, fermentasi glukosa (Keskin *et al.*, 2004). Karakteristik biokimia *E. ictaluri* pertama kali digambarkan oleh Hawke *et al.* (1981) dan dipelajari lebih lanjut oleh Waltman *et al.* (1986) dengan menguji 119 isolat *E. ictaluri* dan ditemukan 100% positif dalam pengujian metil red, nitrat reduktase, lisin dekarboksilase, ornithin dekarboksilase, dan katalase. Selain itu, hasil pengujian menyatakan 100% negatif dalam pengujian sitrat, malonat, Voges Proskauer, phenylalanin, indol, arginin dihidrolase, sitokrom oksidase, α -galactosidase, dan hydrolyzing urea. Karakteristik dari *E. ictaluri* adalah bergerak dengan flagella, tidak berspora, dan tidak berkapsul, batang, pleomorfik, Gram negatif, berukuran 0,75-2,5 μ m; koloni kecil, bulat transparan, tidak berwarna, suhu optimum 28°C-30°C, oksidase -, katalase +, H₂S -, Indol - (dari tryptophan), fermentatif, 0/129 resistan, lisin dekarboksilase +, arginin dihidrolase -, ornithin +, Gelatin -, Urea -, Citrate -, VP -, Glukosa +, Inositol -, Sorbitol -, Rhamnose -, Mannitol -, Arabinose -, Sukrose -, fakultatif anaerob (Austin & Austin, 1987; Crumlish *et al.*, 2002; World Organization for Animal Health, 2006a; Holt *et al.*, 1994). Masa inkubasi *E. ictaluri* adalah 36-48 jam, tampak sebagai koloni non-pigmen yang halus, bundar (diameter 1-2 mm),

Tabel 1. Hasil kultur bakteri pada Agar BHI dari organ ginjal ikan uji di tiga lokasi budidaya ikan patin (Jatiluhur, Sukabumi, dan Sukamandi)

Table 1. The result of bacteria cultured in BHI Agar collected from kidney of sampled fish from three farming locations (Jatiluhur, Sukabumi, and Sukamandi)

Lokasi sampel Sampling sites	Kultur bakteri organ ginjal pada BHIA Bacteria culture from kidney samples	Koloni tumbuh Growth colony	Koloni terduga <i>E. ictaluri</i> Suspected colony of <i>E. ictaluri</i>
Jatiluhur	3	3	1
Sukabumi	6	5	3
Sukamandi	16	10	5
Total sampel	25	18	8

cembung ramping sampai keseluruhan tepi. *E. ictaluri* dengan mudah dapat dibedakan dari *E. tarda* dari ketidakmampuannya untuk memproduksi indol dan H₂S (*E. tarda* mampu memproduksi keduanya).

Konfirmasi menggunakan analisis molekuler PCR juga dilakukan terhadap ke-8 isolat *E. ictaluri* dengan kode PJh-01, PCr-01, PCr-02, PCr-05, PSKm-04, PSkm-07, PSkm-08, dan PSkm-11, mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Williams & Lawrence (2010). Semua isolat yang diujikan menunjukkan pita gen yang teramplifikasi pada 1.300 bp, menandakan sebagai genus *Edwardsiella* (Gambar 1A). Dari hasil analisis PCR semua isolat yang diujikan menunjukkan definitif sebagai *E. ictaluri* ditandai dengan pita pada 2.000 bp (Gambar 1B).

Dari kedelapan isolat selanjutnya dipilih empat isolat yaitu PJh-01, PCr-01, PSkm-07, dan PSkm-11 berdasarkan asal isolat dan waktu pengambilan sampel untuk analisis sekuensing DNA. Analisis sekuensing dari produk PCR empat isolat yaitu PJh-01, PCr-01, PSkm-08, dan PSkm-11 dilakukan oleh rekanan swasta dengan menggunakan primer 16S-*flank* dan 23S-F. *Alignment multiple analysis* kelompok dilakukan mengacu pada data bank gen dengan program BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) pada level nukleotida. Pohon hubungan kekerabatan pilogenik dibuat dengan menggunakan program MEGA software version 7.1.

Sekuensing menggunakan primer 16S-*flank* dan 23S-F menunjukkan bahwa isolat yang digunakan pada penelitian ini termasuk dalam kelompok *E. ictaluri* dengan indeks kemiripan sebesar 97%-99% yang merupakan anggota kelompok pilogenik dari genus *Edwardsiella*, hal tersebut dapat dilihat pada Tabel 3. Tingkat kedekatan dihitung dengan menggunakan metode *neighbour-joining*. Isolat *E. ictaluri* yang diperoleh di atas memiliki kemiripan 97%-99% dengan *E. ictaluri* 93-146 asal gen bank. William *et al.* (2012)

meneliti bahwa *E. ictaluri* 93-146 merupakan isolat yang menyebabkan wabah penyakit *Enteric Septicemia of Catfish* pada ikan *channel catfish* di Amerika Serikat. Panangala *et al.* (2005) melakukan analisis sekuensing dengan primer 16S-23S untuk deteksi *E. ictaluri* yang berasal dari ikan menunjukkan hasil kemiripan 97%-98% dengan *E. ictaluri* gen bank. Menurut Wang *et al.* (2009), *E. ictaluri* secara filogenik dekat dengan kelompok bakteri enterobacteriae *Salmonella* sp. karena sama-sama menyebabkan enteric septicemia.

Hasil analisis pilogenik menunjukkan terbentuk tiga kluster dari empat isolat lokal sampel *E. ictaluri* ikan patin. *E. ictaluri* kode PCr-01 dan PSkm-11 berada dalam satu kluster masih berdekatan dengan *E. ictaluri* kode PJh-01 meskipun berbeda kluster dan ketiganya sangat berbeda dengan *E. ictaluri* PSkm-07 yang terletak pada kluster lain, namun masih memiliki kemiripan dengan *E. ictaluri* (gen bank kode 93-146) *complete genome* dan berbeda jauh dengan *E. tarda* (*strain* Kc-Pc1 16S ribosomal RNA *gene*). Perbedaan isolat *E. ictaluri* ikan patin yang berasal dari tiga daerah sentra budidaya (Jatiluhur, Sukabumi, dan Sukamandi) yang ditunjukkan oleh posisi kluster yang berbeda kemungkinan adalah *E. ictaluri* dengan *strain* yang berbeda oleh karena pengaruh lingkungan dan habitat hidup yang menyebabkan mungkin tidak ada gen *flow* dari masing-masing habitat (Gambar 2).

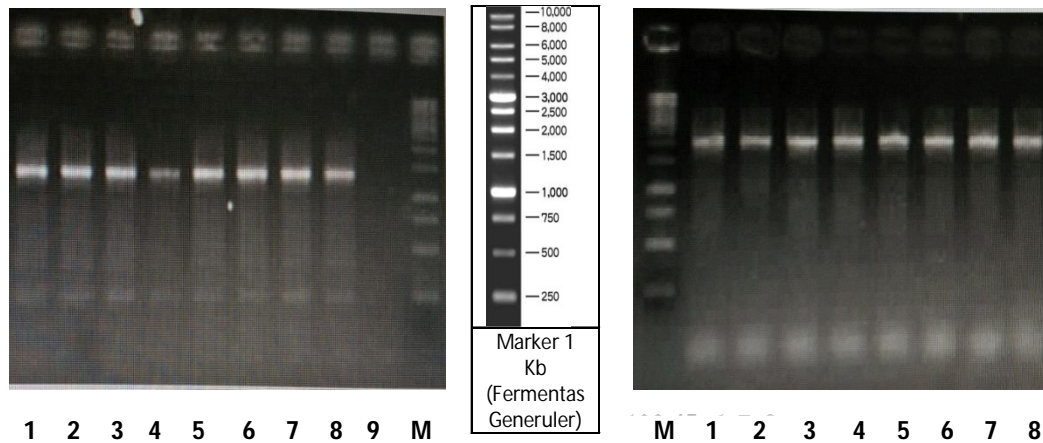
Perbedaan kluster yang terbentuk terjadi karena ada beberapa basa nukleotida tunggal yang berbeda antara ke-4 sampel *E. ictaluri* maupun dengan *E. ictaluri* dari gen bank (kode 93-146) dengan separasi nukleotida yang lengkap (*complete genome*). Berdasarkan analisis perbandingan sekuen DNA dengan menggunakan program bioedit menunjukkan adanya perbedaan basa nukleotida tunggal mulai posisi kelompok 5-25, 965, dan 1.085-1.365. *E. ictaluri* PCr-01 dan PSkm-11 menunjukkan kemiripan sekuen

Tabel 2. Hasil uji karakteristik biokimia dengan API-20E pada isolat bakteri yang diisolasi dari ikan patin pada lokasi yang berbeda

Table 2. The result of characterization of bacteria isolates using API-20E test on catfish isolated from different locations

Karakteristik Characteristics	Jatiluhur	Sukabumi			Sukamandi			
	PJh-01	PCr-01	PCr-02	PCr-05	PSkm-04	PSkm-07	PSkm-08	PSkm-11
Pewarnaan gram Gram staining	Gram negatif Gram negative	Gram negatif Gram negative	Gram negatif Gram negative	Gram negatif Gram negative	Gram negatif Gram negative	Gram negatif Gram negative	Gram negatif Gram negative	Gram negatif Gram negative
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidase	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+
TSIA	Tumbuh lambat Slowly growth	Tumbuh lambat Slowly growth	Tumbuh lambat Slowly growth	Tumbuh lambat Slowly growth	Tumbuh lambat Slowly growth	Tumbuh lambat Slowly growth	Tumbuh lambat Slowly growth	Tumbuh lambat Slowly growth
O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Novobiocin	+	+	+	+	+	+	+	+
TSA	Tumbuh Grow	Tumbuh Grow	Tumbuh Grow	Tumbuh Grow	Tumbuh Grow	Tumbuh Grow	Tumbuh Grow	Tumbuh Grow
Warna koloni Colony color	Transparan Transparent	Transparan Transparent	Transparan Transparent	Transparan Transparent	Transparan Transparent	Transparan Transparent	Transparan Transparent	Transparan Transparent
Motil 28°C	Bergerak lambat Moving slowly	Bergerak lambat Moving slowly	Bergerak lambat Moving slowly	Bergerak lambat Moving slowly	Bergerak lambat Moving slowly	Bergerak lambat Moving slowly	Bergerak lambat Moving slowly	Bergerak lambat Moving slowly
Motil 37°C	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukroe	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-
API 20E								
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+	+	+
Gel	-	-	-	-	-	-	-	-
Gw	+	+	+	+	+	+	+	+
Man	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	+	+	+	+	+	+	+	+
SaC	-	-	-	-	-	-	-	-
MCL	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan (Note): + = tumbuh (grow); - = tidak tumbuh (not grow)

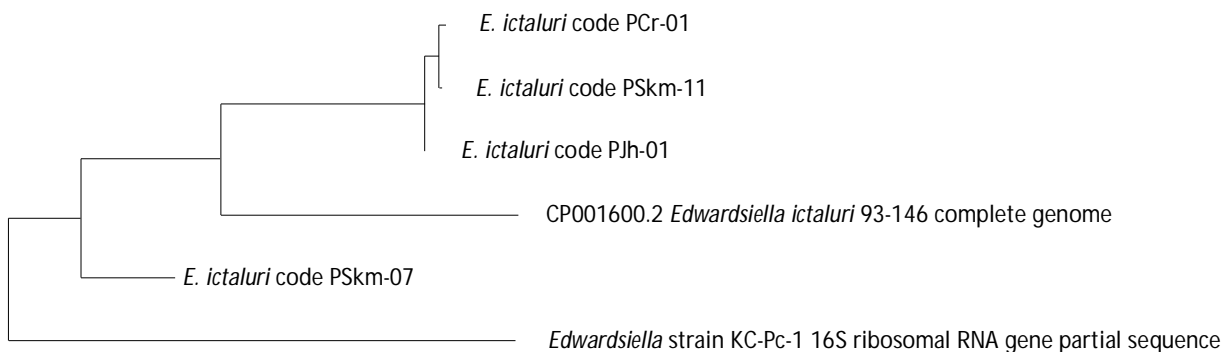


Gambar 1. Amplifikasi DNA dengan *polymerase chain reaction* (PCR) pada delapan isolat bakteri yang terindikasi sebagai *Edwardsiella* (A) dan *Edwardsiella ictaluri* (B) yang diisolasi dari organ ginjal ikan patin (*Pangasius* sp.). M= marker 1 kb; 1= bakteri kode PJh-01; 2= PCr-01; 3= PCr-02; 4= PCr-05; 5= PSkm-04; 6= PSkm-07; 7= PSkm-08; 8= PSkm-11; 9= kontrol negatif (*A. hydrophila*).

Figure 1. The DNA amplification with polymerase chain reaction (PCR) from eight isolates suspected as *Edwardsiella* (A) and *Edwardsiella ictaluri* (B) isolated from kidney of catfish. M = marker; 1 = bacteria PJh code 01; 2 = PCr code 01; 3 = PCr code 02; 4 = PCr code 05; 5 = PSkm code 04; 6 = PSkm code 07; 7 = PSkm code 08; 8 = PSkm code 11, 9 = negative control (*A. hydrophila*). (A) PCR primer-flank 16S and 23S-F, (B) PCR primer IVS and IRS.

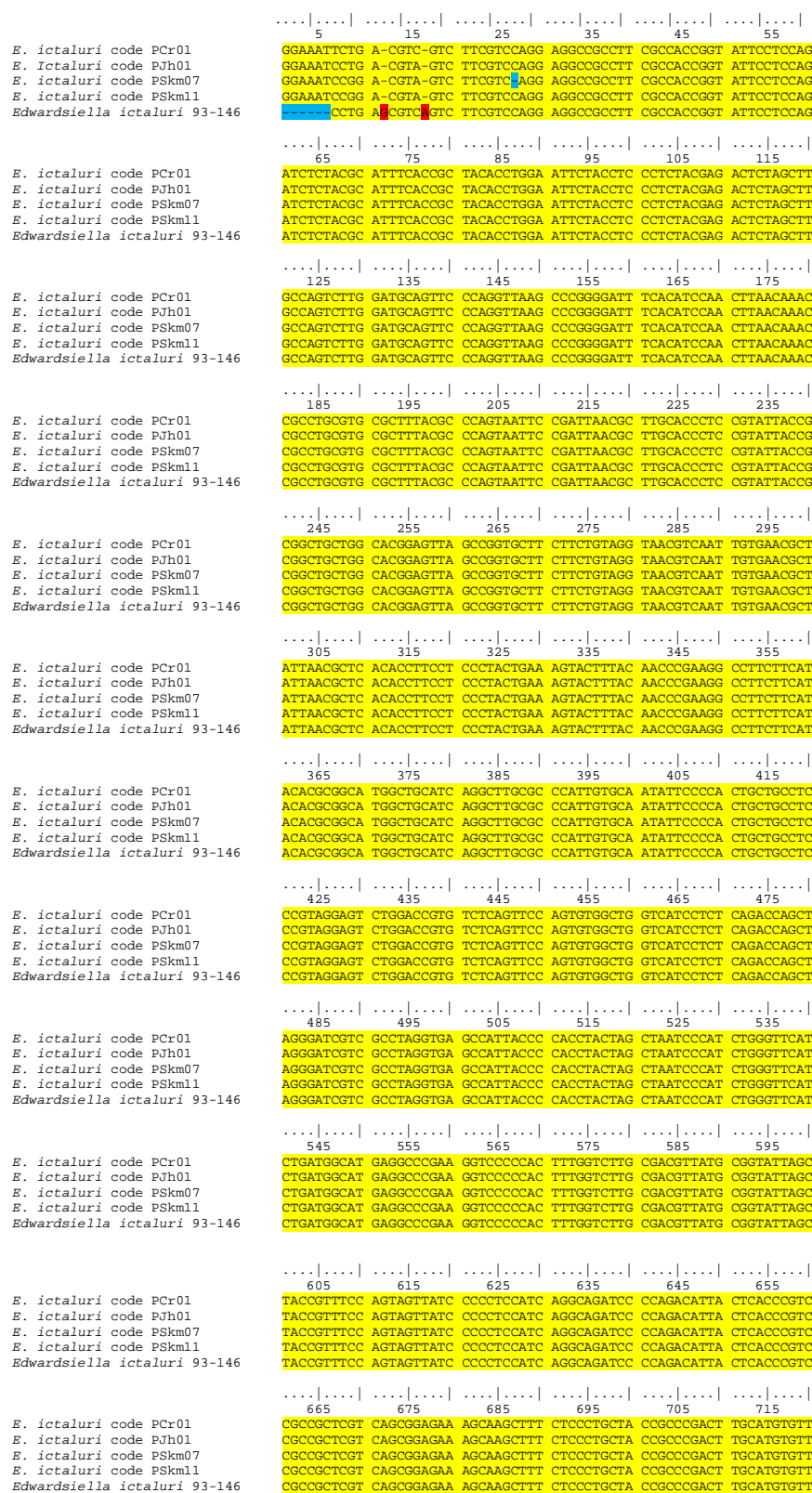
Tabel 3. Hasil sekuensing isolat *E. ictaluri* dengan primer 16S-flank dan 23S-F
 Table 3. The sequencing result of *E. ictaluri* by 16S-flank and 23S-F primer

Isolat Isolate	Kemiripan Identity (%)	Gen bank Gene bank
<i>E. ictaluri</i> kode PCr-01 (<i>E. ictaluri</i> code PCr-01)	97	<i>E. ictaluri</i> 93-146, complete genome
<i>E. ictaluri</i> kode PJh-01 (<i>E. ictaluri</i> code PJh-01)	99	<i>E. ictaluri</i> 93-146, complete genome
<i>E. ictaluri</i> kode PSkm-07 (<i>E. ictaluri</i> code PSkm-07)	99	<i>E. ictaluri</i> 93-146, complete genome
<i>E. ictaluri</i> kode PSkm-11 (<i>E. ictaluri</i> code PSkm-11)	99	<i>E. ictaluri</i> 93-146, complete genome



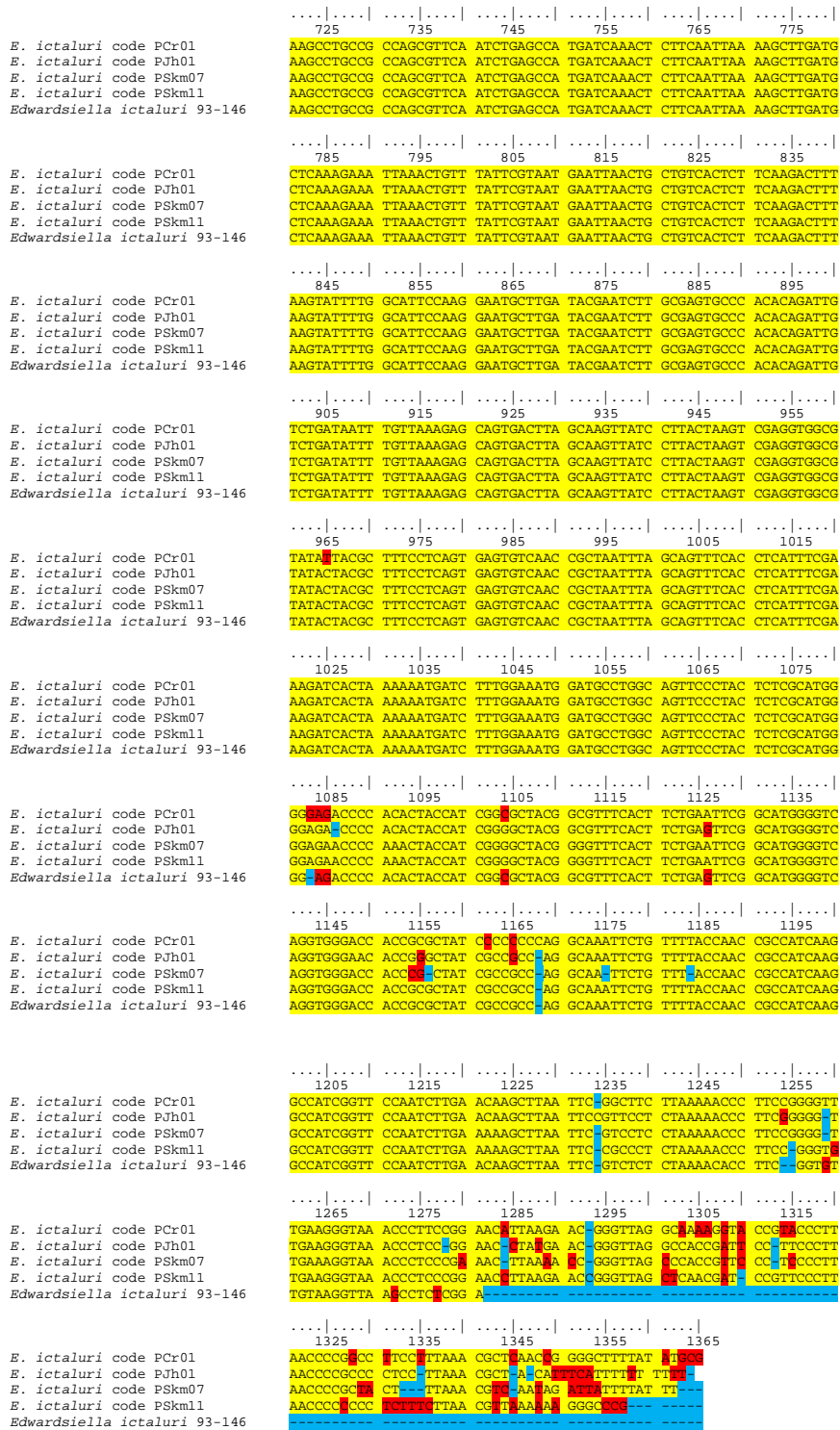
Gambar 2. Hubungan filogenik keempat isolat *E. ictaluri* ikan patin (*Pangasius* sp.) yang berasal dari Jatiluhur, Sukabumi, dan Sukamandi.

Figure 2. The phylogenetic neighbouring-joining of four isolates *E. ictaluri* of catfish (*Pangasius* sp.) from Jatiluhur, Sukabumi, and Sukamandi.



Gambar 3. Perbandingan sekuen antar keempat sampel *E. ictaluri* dan dengan *E. ictaluri* gen bank kode 93-146 (warna kuning: basa nukleotida sama; merah: basa nukleotida yang berbeda; biru: basa nukleotida yang hilang).

Figure 3. The sequences comparison between four *E. ictaluri* samples and with *E. ictaluri* gen bank code 93-146 (yellow: the same nucleotide base; red: the different nucleotide base; blue: the missing nucleotide base).



Gambar 3. Lanjutan
Figure 3. Continued

namun berbeda dengan *E. ictaluri* gen bank kode 93-146 complete genome. *E. ictaluri* PJh-01 menunjukkan perbedaan dengan ketiga isolat sampel maupun *E. ictaluri* gen bank kode 93-146 complete genome. *E. ictaluri* PSkm-07 menunjukkan perbedaan basa nukleotida tunggal yang jauh berbeda dengan ketiga isolat sampel

yang ada maupun *E. ictaluri* gen bank kode 93-146 complete genome. Hasil perbandingan sekuen basa menunjukkan bahwa keempat sampel isolat *E. ictaluri* memiliki polimorfisme nukleotida tunggal pada setiap isolat yang diuji. Ini adalah salah satu bentuk paling umum dari variasi genetik. Menurut Clancy (2008),

polimorfisme biasanya terjadi akibat substitusi nukleotida tunggal atau disebut juga *single nucleotide polymorphism* (SNP) yang merupakan variasi sekuens DNA yang terjadi ketika ada nukleotida tunggal atau satu nukleotida A, T, C, atau G di dalam genom yang berbeda dengan suatu spesies biologis. Polimorfisme nukleotida tunggal menyebabkan variasi *strain* dari spesies yang sama. Variasi *strain* terjadi karena bakteri sangat mudah sekali mengalami mutasi.

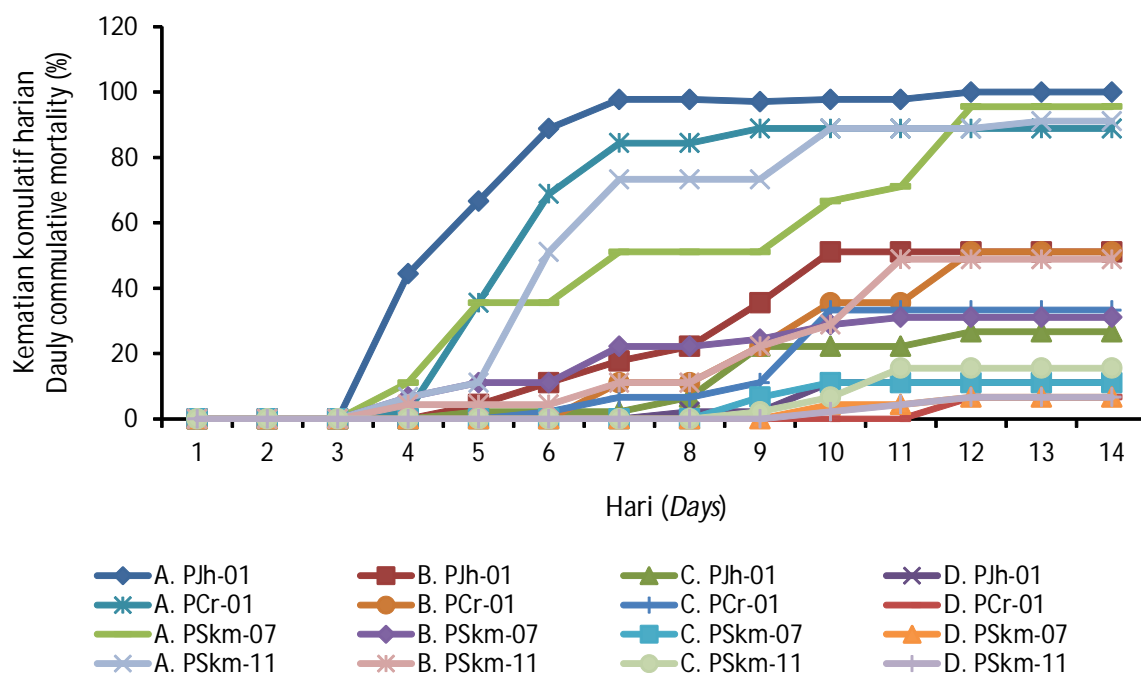
Uji patogenitas keempat isolat *E. ictaluri* dilakukan menggunakan rancangan acak kelompok (RAK). Pola kematian akibat infeksi dari keempat isolat tersebut berbeda tergantung dosis yang diberikan, semakin tinggi dosisnya, kematian yang terjadi lebih cepat dan gejala klinis juga lebih terlihat cepat. Pada kelompok kontrol tidak diperoleh kematian ikan uji. Ikan uji kelompok perlakuan dengan jumlah sel bakteri 10^9 cfu menunjukkan kematian akibat infeksi *E. ictaluri* mulai hari keempat pascainfeksi. Gejala klinis yang terlihat adalah pembengkakan pada daerah bekas suntikan, luka pada pangkal sirip dan luka pada bagian kepala. Kematian tertinggi sebesar 100% terjadi pada perlakuan ikan patin uji yang diinfeksi dengan isolat *E. ictaluri* PJh-01 dengan jumlah sel bakteri sebesar 10^9 cfu pada hari ke-12. Infeksi *E. ictaluri* PJh-01 dengan

jumlah sel bakteri sebesar 10^7 cfu menyebabkan kematian 50% pada hari ke-10 pascainfeksi. Isolat *E. ictaluri* PJh-01 merupakan isolat yang memiliki nilai patogenitas tinggi dibanding ketiga isolat lainnya. Pada isolat Kematian masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Gambar 4.

Berdasarkan nilai rata-rata persen mortalitas kumulatif yang diperoleh selama proses uji patogenitas. Formulasi matematis dari masing-masing isolat bakteri selengkapnya disajikan pada Tabel 5. Pemilihan kandidat isolat bakteri *E. ictaluri* yang digunakan untuk preparasi vaksin didasarkan pada pendekatan patogenitas, oleh karena itu, isolat kode PJh-01 digunakan sebagai sumber antigen dalam pembuatan vaksin anti *E. ictaluri* pada tahap selanjutnya karena memiliki derajat patogenitas lebih tinggi dari ketiga isolat lainnya.

KESIMPULAN

Hasil identifikasi dan karakterisasi isolat bakteri yang diisolasi dari ikan patin (*Pangasius* sp.) berdasarkan uji biokimia dan molekuler diperoleh sebanyak delapan isolat dengan nama species *Edwardseilla ictaluri*. Isolat bakteri *E. ictaluri* kode PJh-01 asal Jatiluhur memiliki tingkat patogenitas lebih



Gambar 4. Kematian kumulatif harian dari berbagai perlakuan ikan patin yang diinjeksi dengan isolat *E. ictaluri* yang berbeda dengan jumlah sel bakteri yang berbeda (A = 10^9 cfu; B= 10^7 cfu; C= 10^5 cfu; D= 10^3 cfu).

Figure 4. Daily cumulative mortality of catfish after infection with different *E. ictaluri* isolates in different number of cells bacteria (A = 10^9 cfu; B= 10^7 cfu; C= 10^5 cfu; D= 10^3 cfu).

Tabel 4. Formulasi analisis regresi linier sederhana dengan program SPSS versi 11.0 dan nilai LD₅₀ dari empat isolat bakteri *E. ictaluri*

Table 4. The formulations of simple linear regression analysis with SPSS version 11.0 and LD₅₀ value from four *E. ictaluri* isolates

Jenis bakteri <i>Type of bacteria</i>	Kode isolat <i>Code of isolates</i>	Formula nilai LD ₅₀ <i>Value formula LD₅₀</i>	Nilai LD ₅₀ <i>Value LD₅₀</i>
<i>E. ictaluri</i>	PJh-01	Y = 21.7 + 5.33x	3.23 x 10 ⁷ cfu
<i>E. ictaluri</i>	PCr-01	Y = 8.3 + 10.3x	0.53 x 10 ⁷ cfu
<i>E. ictaluri</i>	PSkm-07	Y = 3.33 + 10.3x	3.04 x 10 ⁷ cfu
<i>E. ictaluri</i>	PSkm-11	Y = 35.0 + 9.0x	2.30 x 10 ⁷ cfu

tinggi dari isolat lain yang diuji dengan nilai LD₅₀ yaitu sebesar 3,23 x 10⁷ cfu/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini telah terlaksana dengan sumber dana dari DIPA BPPBAT TA 2016 Kementerian Kelautan dan Perikanan. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Setiadi, Edy Farid Wadjdy, Ahmad Wahyudi, dan Johan Afandi yang telah membantu secara teknis kegiatan penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

Amanu, S. (2007). Komunikasi pribadi. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan UGM. Yogyakarta. [2-07-2007, Yogyakarta].

Austin, B. & Austin, D.A. (1987). Bacterial fish pathogens : Disease in farmed and wild fish. England: John Willy and Sons Ltd.

Clancy, S. (2008). Genetic mutation. *Nature Education*, 1(1).

Crumlish, M., Dung, T.T., Turnbull, J.F., Ngoc, N.T.N., & Ferguson, H.W. (2002). Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *J. of Fish Disease*, 25, 733-736.

Hawke, J.P., McWhorter, A.C., Steigerwait, A.G., & Brenner, D.J. (1981). *Edwardsiella ictaluri*, the causative agent of enteric septicaemia of catfish. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 31, 396-400.

Hawke, J.P., Kent, M., Rogge, M., Baumgartner, W., Wiles, J., Shelley, J., Sarolainen, L.C., Wagner, R., Murray, K., & Peterson, F.S. (2013). Edwardsiellosis cause by *Edwardsiella ictaluri* in laboratory populations of zebrafish *Danio rerio*. *J. Aquat. Anim. Health*, 25(3), 171-183.

Inglis, V., Roberts, R.J., & Bromage, N.R. (1993). Bacterial disease of fish. Institute of Agriculture. Oxford, London: Blackwell Scientific Publication, p. 61-79.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., & Williams, S.T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 175-289.

Keskin, O., Secer, S., Izgur, M., Turkyilmaz, S., & Mkakosya, R.S. (2004). *Edwardsiella ictaluri* Infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk. Journal Veterinary Animal Science*, 28, 649-653.

Panangala, V.S., Van Santen, V.L., Shoemaker, C.A., & Klesius, P.H. (2005). Analysis of 16S-23S intergenic spacer regions of the rRNA operons in *Edwardsiella ictaluri* and *Edwardsiella tarda* isolates from fish. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 657-669.

Panigoro, N., Bahnan, M., Kholidin, E.B., & Yuasa, K. (2005). Pathogenicity of *Edwardsiella ictaluri*. <http://www.was.org/meetings/sessionAbstract.asp?MeetingCode=WA2005&Session=55-24k> [11-08-2006].

Pasnik, D.J., Evans, J.J., & Klesius, P.H. (2007). Experimental *Edwardsiella ictaluri* infection causes mortality in white perch *Morone americana*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6, 646-649.

Plumb, J.A. (1999). Health maintenance and principle microbial diseases of cultured fishes. Iowa State University Press. Ames, Iowa, 344 pp.

Popovic, N.T., Rakovac, R.C., & Perovic, I.S. (2009). Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: A review. *Journal of Veterinarni Medicina*, 52(2), 49-53.

Sakai, T., Kamaishi, T., Sano, M., Tensha, K., Arima, T., Iida, Y., Nagai, T., Nakai, T., & Lida, T. (2008).

- Outbreaks of *Edwardsiella ictaluri* infection in ayu *Plecoglossus altivelis* in Japanese Rivers. *Fish Pathology*, 43, 152-157.
- Soto, E., Griffin, M., Arauz, M., Riofrio, A., Martinez, A., & Cabrejos, M.E. (2012). *Edwardsiella ictaluri* as the causative agent of mortality in cultured Nile tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health*, 24, 81-90.
- Suanyuk, N., Rogge, M., Thune, R., Watthanaphiromsakul, M., Champhat, N., & Wiangkum, W. (2014). Mortality and pathology of hybrid catfish, *Clarias macrocephalus* (Günther) x *Clarias gariepinus* (Burchell), associated with *Edwardsiella ictaluri* infection in southern Thailand. *Journal of Fish Diseases*, 37, 385-395.
- Taukhid & Purwaningsih, U. (2011). Penapisan isolat bakteri *Streptococcus* spp. sebagai kandidat antigen dalam pembuatan vaksin, serta efikasinya untuk pencegahan penyakit streptococcosis pada ikan nila, *Oreochromis niloticus*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 6(1), 103-118.
- Wagner, B. A., Wise, D.J., Khoo, L. H., & Terhune, J.S. (2002). The Epidemiology of Bacterial Diseases in Food-Size Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 14(4), 263-272. doi:10.1577/1548-8667(2002)014<0263:teobdi>2.0.co;2.
- Waltman, W.D., Shotts, E.B., & Hsu, T.C. (1986). Biochemical characteristics of *Edwardsiella ictaluri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(1), 101-104.
- Wang, Q., Yang, M., Xiao, J., Wu, H., Wang, X., Lv, Y., Xu, L., Zheng, H., Wang, S., Zhao, G., Liu, Q., & Zhang, Y. (2009). Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. www.plosone.org. Volume 4/issue10/e7646.
- Williams, M.L. & Lawrence, M.L. (2010). Verification of an *Edwardsiella ictaluri* specific diagnostic PCR. *Journal Applied Microbiology*, 50, 153-157.
- Williams, M.L., Gillaspay, A.F., Dyer, D.W., Thune, R.L., Waldbieser, G.L., Schuster, G.C., Gibson, J., Zaitshik, J., Landry, C., Banes, M.M., & Lawrence M.L. (2012). Genome sequence of *Edwardsiella ictaluri* 93-146, a strain associated with a natural channel catfish outbreak of enteric septicemia of catfish. *Journal of Bacteriol.*, 193(3), 740-741.
- World Organization for Animal Health. (2006a). Manual of diagnostic tests for aquatic animals: Enteric septicemia of catfish (*Edwardsiella ictaluri*). *OIE*, p. 214-220.
- Ye, S., Qiao, H.L.G., & Li, Z. (2009). First case of *Edwardsiella ictaluri* infection in China Farmed-yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of Aqua-culture*, 292,