

Deteksi *Edwardsiella Ictaluri* pada Ikan dengan Metode Co-Agglutination Test

Edwardsiella Ictaluri detection in fish by Co-Agglutination Test Method

Miftahul Fikar¹, Surya Amanu², Suhardo R.T. Simanjuntak¹, Mario Ari Yudistra¹

¹Stasiun Karantina Ikan dan Pengendalian Mutu Kelas I Jambi

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada
Email: miftahul.fikar@gmail.com

Abstract

Immunodiagnosics method using co-agglutination serological tests have long been known in the detection of bacterial and viral infections in humans, animals, fish, and contamination of the fishery products. The advantages of this technique is simple, rapid, inexpensive, and accurate, especially for application in the field because it can detect directly from the organ. However, the use of the method is less known than other more complex and expensive methods such ELISA and FAT. The development of this method in Indonesia has been conducted since 2014 and has been applied in the field with good results, especially in the detection of disease-causing bacteria *Edwardsiella ictaluri*, an etiological agents of *Edwardsiella Septicemia* disease in Patin (*Pengasius hypophthalmus*) and catfish (*Clarias garipienus*) in Jambi. Sampling was conducted on 70 locations of centers of aquaculture fish and catfish in 4 districts in Jambi province during April to June 2015. Testing by co-agglutination method to detect 5 positive *E. ictaluri* farms. Organ sampel was isolated to the media in order to be tested in a conventional and rapid serological method and confirmed positive agglutination slide. Isolates were tested to compare with results from an accredited laboratory in Batam and Tanjung Pinang, and got a positive result. These field tests prove that the co-agglutination technique may provide valid results just in several hours in compared to conventional methods that take several days, or by ELISA and FAT requiring high cost. Technological innovation with this method can be a response to the challenges of globalization, especially with the implementation of the Asean Economic Community area, where traffic distribution fish and development of fishery industries more widespread that brings to risk of fish disease outbreak.

Keywords: immunodiagnostic, *Co-agglutination*, *E. ictaluri*, patin, catfish

Abstrak

Teknik immunodiagnostik dengan menggunakan uji serologis *co-agglutination* telah lama dikenal dalam mendeteksi infeksi bakteri dan virus pada manusia, hewan, ikan, dan cemaran pada produk-produk perikanan. Keunggulan teknik ini adalah sederhana, cepat, murah, dan akurat, terutama untuk penerapan di lapangan karena dapat mendeteksi langsung dari organ. Namun penggunaan metode kurang dikenal dibandingkan metode lain yang lebih kompleks dan mahal seperti ELISA dan FAT. Pengembangan metode ini di Indonesia telah dilakukan sejak tahun 2014 dan telah diaplikasikan di lapangan dengan hasil yang memuaskan, terutama dalam mendeteksi bakteri *Edwardsiella ictaluri* penyebab penyakit *Edwardsiella Septicemia of Catfish* pada ikan patin (*Pengasius hypophthalmus*) dan lele (*Clarias garipienus*) di Jambi. Pengambilan sampel dilakukan di 70 lokasi sentra budidaya ikan patin dan lele di 4 kabupaten, di Provinsi Jambi selama bulan April-Juni 2015. Pengujian dengan teknik *co-agglutination* mendeteksi 5 lokasi budidaya positif tersebut *E. ictaluri*. Organ yang diuji dengan teknik ini diisolasi ke media agar untuk diuji secara konvensional dan serologis dengan metode *rapid slide agglutination* dan terkonfirmasi positif. Isolat yang diperoleh juga diujibandingkan ke laboratorium yang telah terakreditasi dalam ruang lingkup *E. ictaluri* di Batam dan Tanjung Pinang, dan mendapatkan hasil positif. Uji lapangan ini membuktikan bahwa teknik *co-agglutination* dapat memberikan hasil yang valid dalam waktu beberapa jam saja dibandingkan dengan metode konvensional yang memakan waktu berhari-hari, ataupun dengan metode ELISA dan FAT yang membutuhkan biaya tinggi. Inovasi teknologi dengan metode ini dapat menjadi jawaban atas tantangan globalisasi terutama dengan diberlakukannya kawasan Masyarakat Ekonomi Asean, dimana lalu lintas peredaran ikan dan pengembangan industri perikanan makin meluas yang membawa resiko merebaknya wabah penyakit ikan.

Kata kunci : immunodiagnostik, *co-agglutination*, *E. ictaluri*, patin, lele

Pendahuluan

Teknik immunodiagnostik dengan menggunakan uji *co-agglutination* telah lama dikenal dalam mendeteksi patogen bakteri (Yoshimizu dan Kimura, 1985; Saharia dan Prasad, 2001) dan virus (Bootland dan Leong, 1992) pada ikan. Teknik ini terbukti memiliki banyak keunggulan diantaranya sederhana, cepat, murah, akurat, terutama untuk penerapan di lapangan. Namun di Indonesia, teknik ini belum mendapat perhatian dan pengembangan selayaknya. Hingga saat ini belum tercatat adanya kajian mengenai penerapan uji *co-agglutination* untuk mendeteksi patogen ikan di Indonesia. Padahal metode ini amat tepat diterapkan di Indonesia dimana keterbatasan peralatan dan/atau akses laboratorium adalah kondisi yang umum ditemukan pada budidaya ikan hampir di seluruh wilayah.

Uji *co-agglutination*, pada prinsipnya adalah teknik immunodiagnostik dimana Immunoglobulin

dari antibodi diikat dengan protein A dari *Staphylococcus aureus* yang berukuran besar. Saat ikatan IgG-*S.aureus* ini terikat dengan antigen target maka akan terbentuk kompleks berukuran besar kendati jumlah antigen sedikit, sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi antigen bakteri dari organ tanpa perlu dipupuk pada media buatan dan dapat dilihat dengan mata telanjang atau dengan mikroskop biasa (lensa objektif pembesaran 10x). Metode ini sering juga disebut Metode *Antibody Sensitized Staphylococci* atau *super-agglutination*.

Edwardsiella ictaluri adalah agen penyebab penyakit yang kerap ditemukan menyebabkan kegagalan pada budidaya ikan patin di Indonesia khususnya di daerah Jambi (Yuasa et al. 2003). Diagnosa yang cepat, tepat dan akurat amat menentukan dalam penerapan tindakan dan pengelolaan yang diperlukan untuk mengatasi dan mencegah merebaknya penyakit ini.. Penelitian ini karena itu mencoba untuk mengembangkan metode

co-agglutination dalam pemeriksaan bakteri *E. ictaluri* untuk memperoleh hasil yang valid terutama untuk pengujian di lapangan.

Materi dan Metode

Penyiapan Kit Uji Co-agglutination

Serum kebal polivalen diproduksi dengan menyuntikkan antigen pada kelinci percobaan. Antigen yang digunakan dalam penelitian ini adalah antigen somatik (*heat stable*) dari bakteri *Edwardsiella ictaluri* (NCIMB 13272) yang diproduksi dengan metode Garvey *et al.* (1977). Pemanenan serum kebal dilakukan setelah titer antibodi pada kelinci mencapai nilai 1:640. Pemisahan immunoglobulin dilakukan dengan metode presipitasi amonium sulfat (Hudson dan Hay, 1991 dalam Saharia dan Prasad, 2001). Serum kebal ditambahkan dengan Amonium sulfat 50 % (pH 8.0) secara perlahan hingga volume yang sama sembari diaduk dengan stirrer selama 30 menit. Suspensi disentrifugasi (6000 rpm, 30 menit), supernatan dibuang dan pellet diresuspensi lagi dengan NaCl fisiologis hingga sejumlah volume awal dan dipresipitasi kembali menggunakan Ammonium sulfat. Dilakukan perulangan proses ini hingga 3 kali. Presipitat/pellet akhir dilarutkan kembali dengan PBS (phosphate buffered saline) hingga sejumlah volume awal dan diletakkan dalam membran dialisa. Dilakukan proses pencucian dengan merendam membran dialisa pada larutan PBS selama 48 jam, setiap 12 jam dilakukan penggantian larutan PBS. Suspensi *S.aureus* dan Immunoglobulin dengan volume 1:1 dihomogenkan. Setelah diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang suspensi disentrifugasi 1500 rpm

selama 20 menit. Supernatan dibuang, ditambahkan PBS hingga kembali ke volume suspensi awal dan digunakan sebagai kit untuk uji *co-agglutination*.

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di 70 (tujuh puluh) lokasi budidaya ikan patin dan lele di provinsi Jambi yang tersebar di empat kabupaten/Kota yaitu Kabupaten Batanghari (23 lokasi), Kabupaten Muaro Jambi (23 lokasi), Kabupaten Sarolangun (1 lokasi) dan Kota Jambi (23 lokasi). Sampel yang diambil berukuran benih, gelondongan, dan konsumsi di panti pembenihan (hatchery), kolam pendederan, dan kolam pembesaran. Setiap lokasi/kolam budidaya diambil 18 ekor ikan sebagai sampel baik yang menunjukkan gejala klinis terinfeksi penyakit ataupun yang sehat dari pengamatan visual. Organ yang diuji dengan kit *co-agglutination* juga diisolasi ke media agar sebagai perbandingan/konfirmasi isolat yang tumbuh dengan uji secara konvensional (biokimia) dan *rapid slide agglutination*.

Prosedur uji co-agglutination

Uji *co-agglutination* dilakukan menggunakan metode Yoshimizu dan Kimura (1985). Organ sampel dihomogenkan dengan perbandingan 1:1 dengan pelarut NaCl fisiologis (w/v) dan dipanaskan dengan air mendidih selama 30 menit. Homogenat disentrifugasi 4000 rpm selama 20 menit. Filtrat/supernatan sampel diteteskan pada kaca obyek dan ditambahkan reagen test kit *co-agglutination* dengan volume yang sama (1:1). Pengamatan terjadinya aglutinasi dilakukan setelah inkubasi selama 10, 20 dan 30 menit. Sebagai kontrol positif digunakan antigen terlarut dari *E. ictaluri* (NCIMB 13272) yang dibuat dengan

menumbuhkannya pada TSA dan dipanen setelah 24 jam. Suspensi dicuci dengan PBS dan dipanaskan dengan air mendidih selama 2 jam, disentrifugasi kembali dan supernatan digunakan sebagai antigen terlarut. Untuk kontrol negatif digunakan antigen terlarut *E. tarda* (ATCC 15947) dan *A. hydrophila* (ATCC 35654) dengan prosedur pembuatan yang sama

Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini mencoba mengaplikasikan test kit *co-agglutination* karena keunggulan – keunggulan

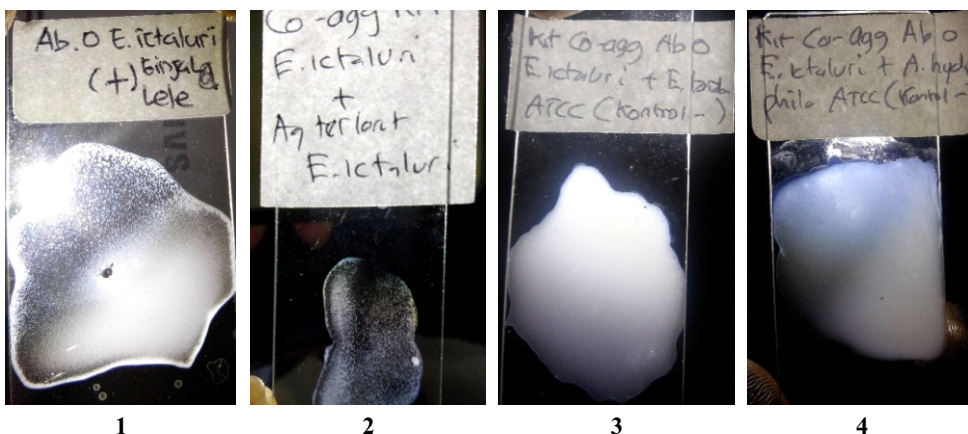
yang dimiliki oleh metode tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa test kit yang diproduksi mampu mendeteksi *E. ictaluri* dengan lebih cepat, lebih sederhana dan ekonomis dibandingkan uji aglutinasi slide atau biokimia konvensional. Sampel dari lima lokasi yang terdeteksi positif *E. ictaluri* menunjukkan gejala klinis *swirling*, *lethargic*, dan berenang di permukaan sebagaimana juga diungkapkan Austin dan Austin (2007) dan Hawke et al (1979). Terdapat bintik atau nodul – nodul putih pada organ dalam terutama hati dan limpa. (Gambar 1).



Gambar 1. Gejala klinis Ikan yang terinfeksi *Edwardsiella ictaluri*

Reaksi positif ekstrak organ yang diuji dengan Kit *Co-agglutination* terutama ditandai dengan suspensi reagen-sampel yang terlihat

granular/clumping secara visual (makroskopis). Hal ini terjadi karena terbentuknya kompleks aglutinin Immunoglobulin-*S.aureus* dengan antigen terlarut *E. Ictaluri* (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil Uji Co-agglutination

Organ yang diuji langsung dengan kit *Co-agglutination* juga diisolasi media agar. Isolat bakteri yang tumbuh diuji secara biokimia berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* dan mendapatkan isolat positif

E.ictaluri berdasarkan karakteristik biokimianya. Hasil konfirmasi (uji banding) isolat tersebut juga menunjukkan hal yang sama. (Tabel 1). Lima lokasi terdeteksi positif *E. coli* dari 70 lokasi yang dijadikan sampel.

Tabel 1. Perbandingan Hasil Uji *Edwardsiella ictaluri*

No	Lokasi Pengambilan Sampel	Coagglutination (SKIPM Jambi)	Biokimia (SKIPM Jambi)	Slide Agglutination (SKIPM Jambi)	SKIPM Batam	SKIPM Tanjung Pinang
1	Pokdakan Sejahtera Ma. Jambi	+	+	+	+	+
2	Pokdakan Sampoloe Ma. Jambi	+	+	+	+	+
3	Pokdakan Patin Berjaya Ma. Jambi	+	+	+	+	+
4	Pokdakan Rosella Jaya Kota Jambi	+	+	+	+	+
5	Pokdakan Mekar Serumpun Batanghari	+	+	+	+	+

Kesimpulan

Test kit *Co-agglutination* yang diproduksi mampu mendeteksi *Edwardsiella ictaluri* dari organ ikan. Tidak ditemukan reaksi silang (*false positive*) dengan pengujian menggunakan antigen terlarut dari *E. tarda* dan *A. hydrophila*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penerapan kit uji *co-agglutination* sangat menjanjikan untuk dikembangkan sebagai kit uji cepat *E. ictaluri*.

Daftar Pustaka

Austin, B. and Austin, D.A. (2007). Bacterial fish patogen in Diseases in farmed and wild fish”. Fourth Edition. Ellis Horwood Limited, England.

Bootland, L.M and Leong, J.A.C. (1992). Staphylococcal Coagglutination, a Rapid Method of Identifying Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. *Applied And Environmental Microbiology*, pp. 6-13

Garvey, J. S., Cremer, N. E., Sussdorf, D.H. (1977).. A Laboratory Text for Instruction and Research. Methods in Immunology. 3rd Edition W.A. Benjamin Inc. Massachusetts.

Hawke, J.P., Mc Whorter, A.C., Steigerwau, A.G. and Brenner, D.J. (1981) *Edwardsiella ictaluri* sp. the causative agent of enteric septicaemia of catfish. *International Journal of Systematic Bacteriology* 31, 396-400.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1998). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. William and Wilkins. Baltimore

- Saharia, P. K. And Prasad, K. P. (2001). Development of co-agglutination kit for the diagnosis of *Pseudomonas fluorescens* infection in fishes. *Asian Fisheries Science* 14: 293-300
- Yoshimizu, M. and Kimura, T.A. (1985). Coagglutination test with antibody-sensitized Staphylococci for rapid and simple diagnosis of bacterial and viral diseases of fish. *Fish Pathology* 20 (2/3): 243-261.
- Yuasa, K., Kholidin, E.B., Panigoro, N. and Hatai, K. (2003) First isolation of *Edwardsiella ictaluri* from cultured striped catfish *Pangasius hypophthalmus* in Indonesia. *Fish Pathology* 38, 181-183.