

DETEKSI POLYMORPHISME DENGAN SUBSTITUSI NUKLEOTIDA TUNGGAL PADA *Streptococcus agalactiae* ISOLAT LOKAL INDONESIA

Angela Mariana Lusiasuti¹⁾, Helga Seeger²⁾, Desy Sugiani¹⁾, Tatik Mufidah¹⁾, dan Hesy Novita¹⁾

¹⁾Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar
Jl. Raya Sempur No. 1, Bogor 16154
E-mail: lusiasuti_61@yahoo.co.id

²⁾Hessian State Laboratory Schubert Straße 60, H 13, 35396 Gießen, Germany

ABSTRAK

Kasus penyakit pada budidaya ikan nila di wilayah di Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Sulawesi Utara dan Papua Barat, disebabkan *Streptococcus* yang menyebabkan penyakit *Streptococcosis* di mana 80% disebabkan oleh grup B *S. agalactiae*. Tujuan penelitian ini adalah melakukan deteksi pada nukleotida isolat *S. agalactiae* untuk mengetahui sampai sejauh mana terjadinya nukleotida polimorfisme tunggal (SNP) pada isolat tersebut. Identifikasi menggunakan PCR dilakukan terhadap 16S rDNA dan primer spesifik spesies terhadap *S. agalactiae* yaitu agal I 5'-ATAAGAGTAATTAACACATGTTAG-3' (*forward*) dan agal II 5'-ACTTCGGGTGTACAAAC-3' (*reverse*) dengan target 1250 bp. Produk PCR diamplifikasi terlebih dahulu menggunakan tujuh pasangan primer oligonukleotida yang berbeda yang didesain dari sekuens genom NEM316 GBS. Sekuens yang diperoleh dibandingkan dengan sekuens di Gene Bank database menggunakan *National Center for Biotechnology Information Blast search tool*. Hasil yang diperoleh ternyata ada dua basa yang berubah yaitu pada basa 24 dan basa 167. Pada basa 24 jelas terjadi substitusi basa baru yaitu G, yang seharusnya tidak ada basa tersebut pada gen *adhP-54* dan *adhP-49* standar. Sedangkan pada basa 167 terjadi perbedaan basa dari seharusnya A pada standar menjadi G pada isolat 2.

KATA KUNCI: polimorfisme, *Streptococcus agalactiae*, PCR

ABSTRACT: *The single strand conformational polymorphism to detect a nucleotide substitution in Streptococcus agalactiae isolate from Indonesia. By: Angela Mariana Lusiasuti, Helga Seeger, Desy Sugiani, Tatik Mufidah, and Hesy Novita*

Cases of the disease in tilapia farming in West Java, Central Java, East Java, North Sulawesi and West Papua, is caused by Streptococcus species that cause disease Streptococcosis where 80% are caused by group B S. agalactiae. The purpose of this study was to detect the nucleotide S. agalactiae to determine the occurrence of single nucleotide polymorphisms (SNPs). Identification using 16S rDNA and species-specific primers of S. agalactiae were agal I 5'-ATAAGAGTAATTAACACATGTTAG-3' (forward) and agal II 5'-ACTTCGGGTGTACAAAC-3' (reverse) with a target of 1250 bp. PCR products amplified using 7 different oligonucleotide primer pairs were designed from the genome sequences of GBS NEM316. Sequences obtained were compared with sequences in the Gene Bank database using the National Center for Biotechnology Information Blast search tool. The results showed there were two bases change on base 24 and base 167. At base 24 occurred G base substitution, which there should be no such bases in the gene and adhP-54 and adhP-49 standard. While there was a difference in base 167 should be a standard A to G in isolate 2.

KEYWORDS: polymorphism, *Streptococcus agalactiae*, PCR

PENDAHULUAN

Streptococcus sp. merupakan agen penyebab penyakit *Streptococcosis* pada ikan budidaya. Bakteri ini mampu menginfeksi langsung ke dalam tubuh inang apabila terjadi kontak (Evans *et al.*, 2006). Clark *et al.* (2000) menyatakan bahwa *Streptococcosis* di Filipina menyebabkan kematian ikan nila sekitar 50% sejak bulan pertama dan meningkat menjadi 80% sampai pada akhir masa pemeliharaan dalam karamba.

Infeksi *Streptococcus* grup B dikaitkan dengan morbiditas dan kematian yang signifikan pada spesies

ikan air tawar, estuaria dan laut. Patogenesis pada ikan menimbulkan septikemia dan kolonisasi pada berbagai organ, seperti mata, otak, ginjal dan usus; Tanda-tanda klinis muncul segera setelah infeksi termasuk depresi atau aksitabiliti, anoreksia, bentuk tubuh seperti huruf C, berenang dan berputar-putar tak menentu, dan kematian pada ikan (Evans *et al.*, 2002). Histopatologi menunjukkan septikemia dengan kerusakan mononuklear pada meninges, epikardium dan mata. Di mana peradangan terjadi pada hari ke-3 dan ke-7 setelah infeksi (Filho *et al.*, 2009). Evans *et al.* (2006)

menyatakan gejala klinis lain dari *Streptococcus* adalah perut bengkak, lambung dan usus terisi dengan cairan gelatinous atau kekuning-kuningan dan pada beberapa ikan terjadi hemoragik kecil di mata, eksophtalmia dan kornea mata buram (opasiti), selain itu hati membesar, kongesti ginjal dan limpa, dan adanya cairan di rongga peritoneal. Ikan nila yang sakit menjadi lesu, berenang tak menentu dan menunjukkan kekakuan dorsal.

Berdasarkan hasil penelitian Lusiasuti *et al.* (2012), tipe *S. agalactiae* isolat lokal Indonesia adalah non-hemolitik dengan uji cAMPnegatif dan masuk dalam Lancefield grup B. Dari 6 isolat yang positif *S. agalactiae*, hanya isolat 1, 3, 4 dan 6 saja yang mempunyai kesamaan 100% sekuens gen 16S rDNA menggunakan BLASTN 2.2.1 *S. agalactiae* dari NCBI. Sedangkan isolat 2 dan 5 tidak 100% kesamaannya karena mengalami polimorfisme nukleotida tunggal.

Polimorfisme adalah variasi urutan DNA yang terjadi ketika satu nukleotida (A, T, C, atau G) dalam urutan genom berubah. Istilah yang sering juga digunakan adalah nukleotida polimorfisme tunggal (single nucleotide polymorphisms, SNP). Hal ini disebut juga mutasi. Mutasi titik merupakan perubahan pada basa N dari DNA atau RNA. Mutasi titik relatif sering terjadi namun efeknya dapat dikurangi oleh mekanisme pemulihan gen. Mutasi titik dapat berakibat berubahnya urutan asam amino pada protein, dan dapat mengakibatkan berkurangnya, berubahnya atau hilangnya fungsi enzim. Teknologi saat ini menggunakan mutasi titik sebagai marker (disebut SNP) untuk mengkaji perubahan yang terjadi pada gen dan dikaitkan dengan perubahan fenotipe yang terjadi.

Tujuan penelitian ini adalah melakukan deteksi pada nukleotida isolat *S. agalactiae* untuk mengetahui sampai sejauh mana terjadinya polimorfismenukleotida tunggal (SNP) pada isolat tersebut.

BAHAN DAN METODE

Sampel berasal dari ikan nila *Oreochromis niloticus* yang terinfeksi dengan gejala klinis berenang tidak beraturan (*whirling*), eksophtalmia (*pop eye*), warna tubuh kehitaman dan adanya hemoragi eksternal pada anus dan di beberapa tempat pada tubuh. Isolat diperoleh dari otak, ginjal anterior, mata dan hati yang dikultur pada 5% *Columbia sheep blood agar* (Oxoid, Wernigerode, Germany) pada suhu 32°C (Evans *et al.*, 2002).

Semua isolat yang diduga isolat *S. agalactiae* Grup B (GBS) diuji biokimiawi dengan metode hemolisis dan uji cAMP (MacFaddin, 2000). Hasil dari Voges Proskauer dan fermentasi sorbitol, trehalose, ribose, inulin, mannose, xylose dan lactose dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan API 20 Strep System (bioMerieux, France). Tipe B antisera (Oxoid) dikelompokkan berdasarkan grup Lancefield.

Identifikasi menggunakan PCR dilakukan terhadap 16S rDNA dan primer spesifik spesies terhadap *S. agalactiae*

yaitu agal I 5'-ATAAGAGTAATTAACACATGTTAG-3' (*forward*) dan agal II 5'-ACTTCGGGTGTTACAAAC-3' (*reverse*) dengan target 1250 bp. Kondisi *cycling* yang digunakan adalah 95°C selama 5 menit, diikuti denaturasi 35 siklus pada 94°C selama satu menit, *annealing* pada 50°C satu menit dan *extension* pada 72°C selama 7 menit, diikuti *final extension* pada 72°C selama 7 menit. Produk PCR kemudian dielektroforesis menggunakan 12 µL amplicon dalam 2% agarose gel (Biozym, Hessisch-Oldendorf, Germany) pada 120 Volt dalam 1x Tris-acetate-electrophoresis buffer (TAE) [(0,04 mol/L Tris, 0,001 mol/L EDTA; pH 7.8)]. Marker yang digunakan adalah GeneRuler 100 bp DNA ladder (MBI Fermentas).

Produk PCR dari sampel positif hasil identifikasi PCR di atas kemudian diuji berdasarkan skema *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) terhadap 7 loci yaitu: alcohol dehydrogenase *gbs0054 (adhP)*, phenylalanyl tRNA synthetase (*pheS*), amino acid transporter *gbs0538 (atr)*, glutamine synthetase (*glnA*), serine dehydratase *gbs2105 (sdhA)*, glucose kinase *gbs0518 (glcK)*, dan transketolase *gbs2105 (tkt)*. Produk PCR diamplifikasi terlebih dahulu menggunakan tujuh pasangan primer oligonukleotida yang berbeda seperti tersebut di atas yang didesain dari sekuens genom NEM316 GBS. Adapun amplifikasi PCR adalah sebagai berikut: 50 µL campuran dari 5 µL sampel DNA, 20 pmol/µL primer PCR (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin, Germany), 1x PCR buffer 1,5 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Germany), 0,5 µL Taq DNA polymerase (Qiagen), dan 1,6 mM deoxynucleoside triphosphate mix (dNTPs, ABgene, Epsom, United Kingdom). Kondisi *cycling* yang digunakan adalah denaturasi awal pada 94°C selama satu menit, primer *annealing* pada 55°C selama 45 detik, dan *extension* pada 72°C selama satu menit untuk 35 cycles. Produk PCR dielektroforesis dan dimurnikan menggunakan *Microelute Cycle Pure Kit* (Omega Bio-tek) dan disekuens di Gottingen Laboratories. Sekuens yang diperoleh dibandingkan dengan sekuens di Gene Bank database menggunakan *National Center for Biotechnology Information Blast search tool*.

HASIL DAN BAHASAN

Berdasarkan hasil pengujian dengan menggunakan uji cAMP, hemolisis dan API 20 STREP System maka ada dua isolat yaitu isolat 2 dan isolat 5 yang mempunyai tingkat kemiripan dengan *S. agalactiae* sebesar 79,3% dan 89,8% Taxa yang signifikan berdekatan dengan *S. agalactiae* dengan kemiripan 79,3% dan 89,8% adalah *Streptococcus acidominimus*. Sedangkan isolat yang lain yaitu isolat 1, 3, 4, dan 6 mempunyai tingkat kemiripan dengan *S. agalactiae* sebesar 99,8% sampai 100%.

Berdasarkan data sekuens gene dari NCBI Blast, maka untuk isolat 1, 3, 4, dan 6 diperoleh *query coverage* sebesar 97% dan maksimum identifikasi 98% dideskripsikan sebagai *S. agalactiae* NEM316 (accession number gi123094426AL766843.1) dan merupakan genom yang lengkap. Isolat 2 dan 5 memperoleh *query*

coverage yang rendah yaitu 76% tetapi maksimum identifikasinya sebesar 99% dan dideskripsikan sebagai *S. agalactiae* strain GBS267 *alcohol dehydrogenase* (*adhP*) pseudogene, sekuens parsial (accession number: J1224925311 FJ719775.1).

Untuk mengetahui lebih lanjut mengapa pada isolat 2 dan 5 mempunyai *query coverage* yang rendah tetapi tetap teridentifikasi sebagai *S. agalactiae* maka dilanjutkan dengan melihat internal fragmennya isolat 2. Internal fragmen dari isolat 2 dibandingkan dengan internal fragmen standar dari gen *adhP-54* dan *adhP-49* yang dilakukan melalui *multiple sequence alignment* menggunakan program Clustal W2. Hasil yang diperoleh ternyata ada dua basa yang berubah yaitu pada basa 24 dan basa 167. Pada basa 24 jelas terjadi substitusi basa baru yaitu G, yang seharusnya tidak ada basa tersebut pada gen *adhP-54* dan *adhP-49* standar. Sedangkan pada basa 167 terjadi perbedaan basa dari seharusnya A pada standar menjadi G pada isolat 2. Pada Tabel 1 menunjukkan contoh kelainan penyakit pada manusia jika terjadi mutasi DNA, dan jika hal ini terjadi pada *S. agalactiae* maka kemungkinannya adalah timbulnya gejala klinis yang berbeda dari *S. agalactiae* yang sejati. Menurut pendapat Shehaan *et al.* (2009), bahwa terdapat *S. agalactiae* biotipe 1 dan biotipe 2. Kemungkinan lain adalah *S. agalactiae* dengan tipe sekuens yang sama atau serumpun dengan *S. agalactiae* pada sapi dan manusia. Tetapi hal ini memerlukan penelitian yang lebih lanjut.

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 dalam hal ini adalah bakteri *S. agalactiae*. Menurut Clancy (2008), penyakit sickle-cell anemia pada manusia disebabkan perubahan genetik yang relatif kecil yang terjadi akibat kerusakan pada nukleotida tunggal pada rantai beta dari protein hemoglobin. Sehingga hal ini menyebabkan gen dari hemoglobin normal berubah menjadi gen hemoglobin sickle-cell. Adanya perubahan yang terjadi hanya pada satu nukleotida saja tetapi dapat memberikan dampak yang buruk. Beta hemoglobin (beta globin) adalah rantai tunggal dengan 147 asam amino. Sickle-cell anemia disebabkan oleh gen beta globin yang bermutasi yaitu hanya mutasi satu basa saja sehingga harusnya asam amino keenam adalah asam glutamik menjadi asam amino valin menyebabkan sel darah berbentuk seperti sickle (batang) yang saling melekat satu sama lain, sehingga tidak dapat mengangkut oksigen dengan baik yang berakibat suplai oksigen tidak lancar sehingga menyebabkan serangan jantung atau stroke (Clancy, 2008).

Menurut Twyman (2003), mutasi didefinisikan sebagai adanya perubahan pada sekuens DNA, yang disebut juga istilah *single nucleotide polymorphism* (SNP) untuk menjelaskan adanya perubahan satu pasang basa

pada suatu populasi. Polimorfisme dapat terjadi pada setiap lokasi genetik dan sedikitnya dapat ditemukan pada dua sekuens yang berbeda, yaitu setiap sekuens yang muncul pada sedikitnya satu persen dari populasi. Lebih jauh, *cut off* prevalensi minimal 1% diklasifikasikan sebagai polimorfisme dan jika frekuensinya lebih kecil dari 1% maka alel dianggap mengalami mutasi (Twyman, 2003).

Menurut International Human Genome Sequencing Consortium (2001), SNP biasanya sebagai marker untuk menentukan populasi organisme yang mengalami perubahan genetik sehingga menjadikan individu membawa sifat tertentu termasuk menderita suatu penyakit. DNA terganggu akibat terpapar faktor lingkungan seperti bahan kimia dan radiasi ultraviolet pada waktu proses replikasi. Tabel 1 menyajikan contoh tipe mutasi DNA yang mengakibatkan kelainan penyakit pada manusia.

Mutasi dapat dihasilkan dari kejadian yang disebut sebagai *crossing-over* selama proses meiosis. Hal ini dapat terjadi pada beberapa area dari genom yang sering disebut sebagai *hot spots* di mana sekuens mengalami pengulangan berkali-kali. Sebagai contoh, sekuens pengulangan trinukleotida pada saat replikasi DNA karena polimerase dapat mengalami "slip" disosiasi dan reasosiasi dengan untai DNA (Viguera *et al.*, 2001).

Pada kasus yang lain, mutasi dapat terjadi dengan cara karena adanya insersi atau terhapusnya satu basa. Hal ini disebut *frameshift mutations*, di mana keseluruhan protein akan berubah sebagai akibat terjadi penghapusan atau insersi. Hal ini terjadi karena nukleotida dibaca oleh ribosom dalam bentuk grup tiga basa yang disebut kodon. Jadi, jika basa terhapus atau diinsersi dari gen yang tidak terdiri dari tiga basa, maka reading frame yang tersisa dari protein tersebut akan dibuang.

Faktor-faktor yang dapat menyebabkan mutasi antara lain adalah terpapar ultraviolet (UV) dari cahaya matahari. Salah satu akibat terpapar UV adalah hidrolisis basa sitosin menjadi bentuk hidrat yang menyebabkan basa tersebut salah berpasangan dengan adenin dan pada replikasi berikutnya posisinya diganti oleh timin (Viguera *et al.*, 2001). Penyebab lain adalah terpapar bahan kimia seperti *Oxidizing agents* yang umum disebut sebagai radikal bebas di mana bahan ini dapat memodifikasi nukleotida sehingga merubah pasangan basa. Mutasi juga dapat terjadi secara spontan, misalnya depurinasi di mana basa purin hilang dari nukleotida melalui proses hidrolisis. Deaminasi atau hilangnya grup amin dari basa juga dapat terjadi.

Adanya perbedaan dalam sekuens *S. agalactiae* isolat lokal Indonesia ditunjang dengan penelitian Sheehan *et al.* (2009) yang melaporkan bahwa isolat *S. agalactiae* dari ikan nila, *Oreochromis niloticus* menunjukkan dua karakter kluster yang berbeda berdasarkan variasi di

Tabel 1. Tipe mutasi DNA dan akibat yang ditimbulkan
 Table 1. DNA mutation type and the impact

Jenis mutasi Mutations variety	Tipe mutasi Type of mutations	Deskripsi (Description)	Penyakit akibat mutasi Diseases caused by mutations
Point mutation	Substitusi Inseri Penghapusan (Deletion)	Salah menambahkan satu basa selama proses replikasi dan menggantikan pasangan dalam posisi yang berdekatan Satu atau lebih nukleotida diinsersikan ke DNA yang replikasi Satu atau lebih nukleotida hilang atau terhapus selama replikasi	Sickle-cell anemia beta-thalassemia Cystic fibrosis
Mutasi kromosom	Inversi Penghapusan (Deletion) Duplikasi Translokasi	Satu bagian kromosom terlipat dan re-inseri Bagian kromosom hilang sehingga gen tidak ada pada satu area tertentu Bagian kromosom terulang sehingga terjadi peningkatan jumlah gen pada suatu area tertentu Bagian kromosom melekat satu sama lain dengan kromosom yang lain	Opitz-Kaveggia syndrome Cri du chat syndrome Beberapa jenis penyakit kanker Leukemia
Variasi jumlah copy Perluasan pengulangan trinukleotida	Amplifikasi gene	Jumlah kopi tandem pada lokus bertambah Jumlah normal sekuen trinukleotida yang berulang makin banyak	Kanker payudara Fragile x syndrome, Huntington's disease

dalam propertis biokimiawi dan fenotipiknya sebagai contoh karakteristik hemolitik. Lebih lanjut Sheehan *et al.* (2009) menyatakan bahwa perbedaan kluster atau biotipe itu dibagi menjadi *S. agalactiae* beta-hemolitik atau klasik atau *S. agalactiae* biotipe 1 dan *S. agalactiae* non-beta-hemolitik atau *S. agalactiae* biotipe 2. *S. agalactiae* biotipe 1 menginfeksi keseluruhan siklus produksi dari benih sampai pembesaran, sedangkan *S. agalactiae* menginfeksi pada ikan konsumsi. Sheehan *et al.* (2009) juga melaporkan bahwa *S. agalactiae* biotipe 2 lebih umum dijumpai di Asia (Cina, Indonesia, Vietnam, dan Filipina).

KESIMPULAN

Isolat 1, 3, 4 dan 6 diperoleh *query coverage* sebesar 97% dan maximum identifikasi 98% dideskripsikan sebagai *S. agalactiae* NEM316 (accession number gi123094426AL766843.1) dan merupakan genom yang lengkap. Isolat 2 dan 5 memperoleh *query coverage* yang rendah yaitu 76% tetapi maksimum identifikasinya sebesar 99% dan dideskripsikan sebagai *S. agalactiae* strain GBS267 alcohol dehydrogenase (*adhP*) pseudogene, sekuens parsial (accession number gi1224925311 FJ719775.1). Ada dua basa yang berubah yaitu pada basa 24 dan basa 167. Basa 24 terjadi substitusi basa baru yaitu G, yang seharusnya tidak ada basa tersebut pada gen *adhP*-54 dan *adhP*-49 standar. Basa 167 terjadi perbedaan basa dari seharusnya A pada standar menjadi G pada isolat 2.

DAFTAR ACUAN

- Clancy, S. (2008). Genetic mutation. *Nature Education*, 1(1).
- Clark, J.S., Paller, B., & Smith, P.D. (2000). Prevention of *Streptococcus* in tilapia by Vaccination. The Philippine Experience. Camrose1@hotmail.com.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Gilbert, P.M., Shoemaker, C.A., Al-Sarawi, M.A., Landsberg, J., Duremdez, R., Al-Marzouk, A., & Al-Zenki, S. (2002). Characterization of β -haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* (L.), and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *Journal of Fish Disease*, 25, 505-513.
- Evans, J.J., Pasnik, D.J., Klesius, P.H., & Al-Ablani, S. (2006). First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garviae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Disease*, 42, 561-569.
- Filho, C.I., Muller, E.E., Pretto-Giordano, L.G., Paula, A., & Bracarense, F.R.L. (2009). Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Braz. J. Vet. Pathol.*, 2(1), 12-15.
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- Lusiastuti, A.M., Seeger, H., & Zschoeck, M. (2012). Penyiapan isolat *Streptococcus agalactiae* untuk deteksi multilocus sequence typing system. *Seminar Bioteknologi Universitas Diponegoro*. Semarang, 6 Oktober 2012.
- MacFaddin, J.F. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 3rd eds. Philadelphia, PA. Lippincott Williams and Wilkins.
- Sheehan, B., Lee, Y.S., Wong, F.S., Chan, J., Labrie, L., Komar, C., Wendover, N., & Grisez, L. (2009). Streptococcosis in tilapia: A more complex problem than expected. *World Aquaculture Meeting 2009*.
- Twyman, R. (2003). Mutation or polymorphism? Wellcome Trust website, http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020780.html (2003).
- Viguera, E., Cancell, D., & Ehrlich, S.D. (2001). Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO Journal*, 20, 2587-2595.

