

Karakterisasi Protein Spesifik *Aeromonas hydrophila* Penyebab Penyakit Ulser pada Ikan Mas

(CHARACTERITATION OF SPESIFIC PROTEIN AEROMONAS HYDROPHILA
CAUSED ULCER DISEASE ON GOLDFISH)

Bimo Aksono Herupradoto, Gandul Atik Yuliani

Departemen Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya, 60115. Telp. 031-5992785 Fax. 031-5993015
Email:gandulfkh@telkom.net

ABSTRACT

The aim of this research is to find antigenic protein of *Aeromonas hydrophila* (S-layer) local isolates which can be used as a material diagnostic reagent and to produce monoclonal antibody as a kit diagnostic for ulcer disease and red sore disease. *Aeromonas hydrophila* were isolated from gold fish (*Cyprinus Carpio Linn*) that were got from Balai Budidaya Ikan Punten, Batu, East Java. Identification were done using biochemical test and were cultured on specific media called TSA. Protein characterized were analyzed through some stages: creating antigen homogenate, determining antigen homogenate concentration, and protein characterizing using SDS-PAGE. Result showed that *Aeromonas hydrophila* protein molecular weight 174,2 kDa; 164,4 kDa; 101,4 kDa; 83,8 kDa; 71,4 kDa; 68,4 kDa; 61,7 kDa; 58,1 kDa; 53,7 kDa; 50,1 kDa; 46,1 kDa; 41,5 kDa; 39,0 kDa; 35,2 kDa; 28,4 kDa; 22,2 kDa. *Aeromonas hidrophylla* s-layer protein molecular weight 53 kDa and 61 kDa had immunogenic trait. Thus, it can be concluded that the protein can be developed potentially as a diagnostic reagent.

Key words : *Aeromonas hydrophila*, ulcer disease, gold fish.

PENDAHULUAN

Ikan mas (*Cyprinus Carpio Linn*) merupakan ikan air tawar yang mempunyai nilai ekonomi cukup tinggi, pemeliharaannya mudah dan banyak diminati masyarakat karena dagingnya enak dan gurih serta kandungan proteinnya cukup tinggi (Bijanti, 2005). Kandungan gizi ikan mas per 100 gram berat badan yaitu berupa kalori sebanyak 95 kalori; protein 4,5 gram; lemak 0,2 gram; karbohidrat 23,1gram; kalsium 42 miligram; fosfor 134 miligram; besi 10 miligram; vit B1 0,22 miligram dan air 71,0 gram (Khairuman *et al.*, 2002).

"Ulcer disease" merupakan salah satu penyakit bakteri pada ikan mas yang sangat berbahaya serta menimbulkan kerugian hingga milyaran dollar di seluruh dunia dan cenderung meningkat setiap tahun. Di Indonesia kecenderungan kolam/tambak yang terinfeksi *Aeromonas hidrofila* sejak tahun 1999 hingga 2001 juga terus meningkat dan penyebab kerugian terbesar (Irianto, 2003).

Diagnosa penyakit ini pada ikan lebih sulit. Gejala penyakit ini sering dikacaukan dengan

trauma akibat perkelahian antar ikan serta gejala klinis yang tidak spesifik tergantung dari spesies ikan dan lingkungan sekitarnya. Oleh karena itu diperlukan strategi pengendalian penyakit akuakultur yang lebih baik lagi antara lain dengan diagnosa penyakit yang cepet, tepat, dan akurat (Austin and Austin, 1999).

Berdasarkan permasalahan tersebut diatas, maka perlu adanya pemikiran untuk mengetahui fraksi protein *Aeromonas hydrophila* dan produksi antibodi poliklonal protein spesifik untuk diagnosa "Ulcer disease" atau "Red Sore Disease". Diharapkan dengan adanya diagnosa yang tepat maka pengendalian penyakit ini dapat dilakukan dengan tepat.

METODE PENELITIAN

Koleksi dan Kultur *Aeromonas hidrofila* Isolat Lokal

Koleksi isolat *Aeromonas hidrofila* lokal berasal dari kolam/tambak di Malang Jawa Timur yang menderita "Ulcer disease" atau "Red Sore Disease", kemudian ikan mas yang diduga terinfeksi dibawa ke Laboratorium Biologi

Molekuler Unair Surabaya, untuk menegakkan diagnosis (uji biokimiawi) lalu di kultur dengan media khusus TSA.

Isolasi Antigen *Aeromonas hydrophila*

Pembuatan homogenat dilakukan dengan teknik sonikasi. *Aeromonas hidrofila* dicuci dengan PBS dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Pelet *Aeromonas hidrofila* dilarutkan dengan PBS 1 ml kemudian disonikasi pada 20 Hz selama 4x4 menit dengan interval waktu 2 menit. Supernatan diambil dan dipusing kembali pada 8000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh selanjutnya disimpan untuk bahan analisis protein. Untuk menentukan konsentrasi homogenat protein antigen yang diperoleh dari *Aeromonas hidrofila* digunakan metode *Bradford Protein Assay* dan dibaca dengan Spektrofotometer.

Identifikasi Profil Protein Homogenat *Aeromonas hidrofila*

Bertujuan untuk melihat pola berat molekul dari protein *Aeromonas hidrofila*. *Running gel* disiapkan, dengan cara menuangkan larutan acrylamide 15% di antara celah plat kaca elektroforesis dan di ratakan permukaannya dengan butanol 50%. Setelah larutan acrylamide 15% membeku, butanol dibuang dan dicuci dengan aquades, selanjutnya membuat *stacking gel* yaitu menuangkan larutan acrylamide 3% di atas acrylamide 15% yang sudah membeku, lalu sisir segera diletakkan untuk membuat sumuran tempat aplikasi sampel. Setelah acrylamide 3% membeku, plat kaca dirangkai pada perangkat elektroforesis, dan buffer elektroda dituang pada alat elektroforesis. Sampel *Aeromonas hidrofila* hasil isolasi ditambahkan *laemly buffer* dengan perbandingan 3:1. Sebelum di-loading pada gel, terlebih dahulu sampel dilakukan denaturasi. Denaturasi dilakukan dengan pemanasan suhu 100° C selama lima menit, selanjutnya 20 µl sampel termasuk kontrol positif dalam *laemly buffer* diaplikasikan ke dalam tujuh sumuran sedangkan satu sumuran lain sebagai kontrol yaitu di isi dengan 5 µl marka protein (Color Burst™ Electrophoresis Markers, No. C.4105). Perangkat alat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* 100 v dan 40 mA selama kurang lebih dua jam. Setelah sampel hampir mencapai tepi bawah gel, selanjutnya gel beku yang telah mengandung fraksi protein diambil dengan cara memisahkan plat kaca. Gel

kemudian dicuci dengan larutan pencuci yang terdiri dari metanol 50% 25 ml, asam asetat 10% 3,7 ml dan aquades ad 100 ml. Gel dicuci dengan cara digoyang di atas *shaker* selama 30 menit, kemudian dilakukan pencucian ulang menggunakan larutan yang sama, tetapi kandungan metanol dikurangi menjadi 2,5 ml dan penambahan asam asetat menjadi 37,5 ml dari sebelumnya kemudian ditambahkan aquades selama 30 menit. Pencucian berikutnya dengan larutan glutaraldehyde 10% dan aquades selama 30 menit. Setelah dicuci, gel diwarnai dengan cara dicelup pada AgNO₃ selama 15 menit, kemudian dilakukan pencucian dengan aquades sebanyak dua kali masing-masing 100 ml selama dua menit, selanjutnya diberikan larutan pengembang warna yang terdiri dari formaldehyde 3,7% sejumlah 50 µl, zytroensauce 5% 100 µl dan aquadest 100 ml. Tahap selanjutnya gel dicuci kembali dengan aquades sebanyak dua kali masing-masing 100 ml selama dua menit. Apabila pita (*band*) protein sudah terlihat maka reaksi difiksasi dengan menambahkan asam asetat 10%. Hasil gel yang telah menunjukkan adanya *band* protein, selanjutnya disimpan dalam larutan gliserol 10% sebanyak 10 ml dalam aquades 100 ml agar gel tidak rusak. Dokumentasi dilakukan dengan menggunakan peralatan *scan* yang dihubungkan dengan komputer. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan band protein dimaksud dengan standar yaitu marka protein (Color Burst™ Electrophoresis Markers, No. C.4105) (Rantam, 2003).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi Sampel *Aeromonas hydrophila*

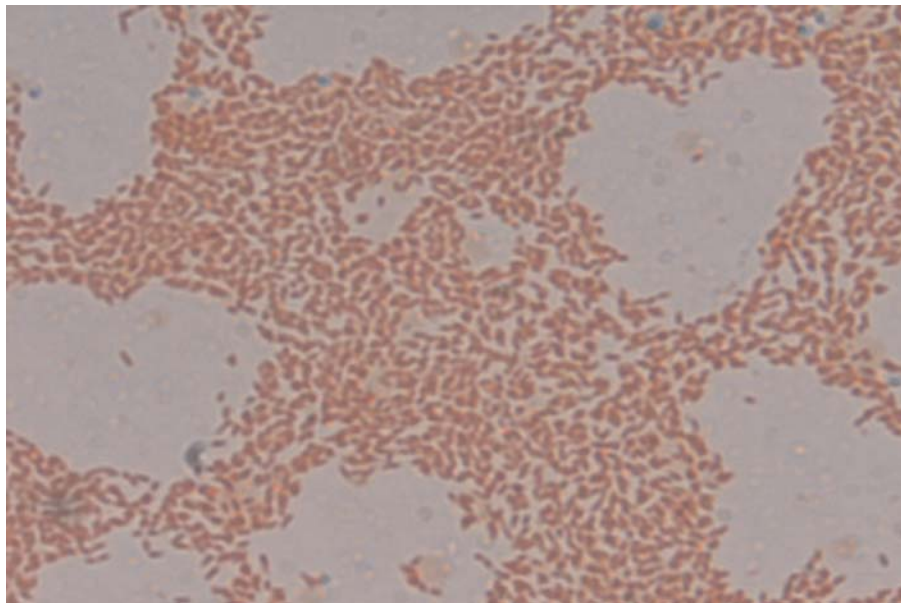
Untuk mendapatkan isolat *Aeromonas hydrophila* diperoleh dari ikan mas (*Cyprinus Carpio Linn*) yang secara makroskopis menunjukkan gejala terinfeksi yaitu adanya tanda klinis yang khas berupa *dropsy*. *Dropsy* merupakan gejala yang ditandai dengan perut ikan tampak mengembung sebagai akibat adanya pelepasan *Aerolysin Cytotoxic Enterotoxyn (ACT-gene)* yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan (Austin dan Austin, 1999). Hasil ini sama dengan yang dilaporkan oleh Kordi dan Gufran (2004) bahwa secara umum gambaran klinis yang paling khas adalah adanya *dropsy* dan

permukaan kulit yang kasar karena adanya pertumbuhan koloni.

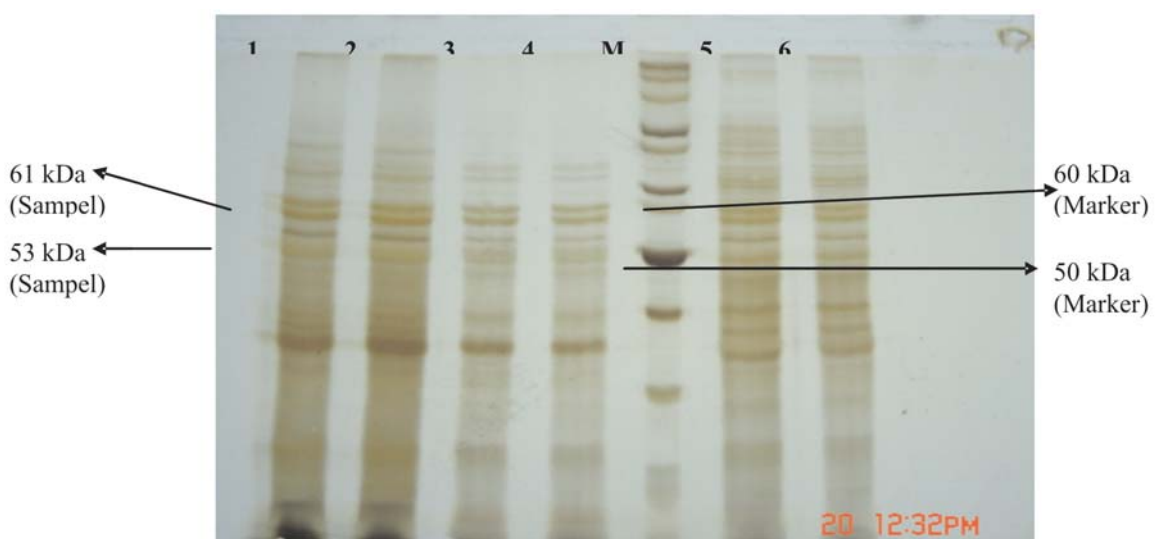
Untuk menegakkan diagnosis terhadap ikan mas tersebut dilakukan serangkaian pemeriksaan antara lain : dilakukan *scrapping* kulit, preparasi saluran usus, dan ginjal dengan tujuan untuk kepentingan kultur kuman dengan media TSA. Walau pun demikian pertumbuhan kuman yang terbaik adalah kuman yang berasal dari preparasi saluran usus. Hasil pemeriksaan mikroskopis (Gambar 1) dengan pembesaran 1.000X, terlihat kuman yang tumbuh pada media TSA berbentuk

batang, dengan pewarnaan Gram berwarna merah yang berarti kuman Gram negatif, tidak berspora, bersifat motil dengan satu flagela yang keluar dari salah satu kutubnya serta dilakukan uji katalase menunjukkan hasil positif. Semua ciri ini sesuai dengan ciri kuman *Aeromonas hydrophila* yang telah dilaporkan sebelumnya (Kordi dan Gufran, 2004; Holt *et al.*, 1994).

Hasil uji biokimia menunjukkan : Uji TSIA (asam/asam, gas negatif dan H₂S negatif) (A); Uji Simon-sitrat negatif (B); Uji indol positif dan motilitas positif(C); Uji urease negatif (D);



Gambar 1. Gambaran mikroskopis *A. hydrophila* dengan pembesaran 1.000X



Gambar 2. Profil *whole protein A. hydrophila* dengan SDS-PAGE. 1,2,3,4,5,6 : sampel ; M : marker

ditambah dengan uji gula-gula antara lain glukosa positif; laktosa positif; maltosa positif; sukrosa negatif dan manitol positif. Dimana semua hasil tersebut menunjukkan sifat biokimia dari kuman *A. hydrophila* (Jang *et al.*, 1978; Kordi dan Gufran, 2004).

Berdasarkan pendapat beberapa peneliti tersebut di atas, maka hasil identifikasi kuman meliputi morfologi dan pewarnaan gram serta hasil uji biokimia menunjukkan bahwa biakan kultur *A. Hydrophila* tidak terkontaminasi dengan kuman lain, sehingga biakan kultur dapat dilanjutkan untuk karakterisasi profil proteinnya.

Hasil Isolasi Antigen *Aeromonas hydrophila*

Antigen merupakan substansi yang yang dapat dikenali dan diikat dengan baik oleh sistem imun (Rantam, 2003). Menurut Spencer (1995) antigen bakteri adalah bakteri utuh yang dirusak secara mekanis, fisik atau kimiawi seperti penggerusan, pengocokan dengan manik-manik kaca, sonikasi, vorteks *homogenizer*, pemanasan dengan suhu tinggi, pendidihan, autoklaf, surfaktan non ion, anion atau kation.

Pada penelitian ini ekstraksi protein dari *Aeromonas hydrophila* dilakukan dengan sonikasi dan penambahan Tween, untuk memecah ikatan protein dari dinding sel kuman *Aeromonas hydrophila* sehingga dapat diekstraksi protein struktural pada bagian luar sel atau *surface layer*nya. Supernatan hasil ekstraksi ditampung dalam *mikrotube*, kemudian kandungan proteinnya diukur dengan metode *Bradford* dan dihasilkan kadar protein 3,84 g%.

Pemisahan *s-layer* dari sel *Aeromonas hydrophila* sangat penting untuk menentukan tingkat kemurniannya, kemurnian *s-layer* sangat menentukan daya antigenitas dan imunogenitasnya. Menurut Tizard (1995) molekul bersifat imunogen bila terjamin keasingannya dan memiliki berat molekul lebih dari 5 kDa dan untuk molekul yang lebih kecil dikatakan imunogenik bila berikatan dengan makromolekul sebagai karier.

Hasil Karakterisasi *Whole Protein* dan *Protein S-Layer*

Karakterisasi protein antigen berdasarkan berat molekul dapat dilakukan dengan analisis protein menggunakan *Sodium Dodecyl*

Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Pada SDS-PAGE, protein dielektroforesis dalam detergen ionik, yaitu *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) yang akan mengikat residu hidrofobik dari bagian belakang peptida secara komplit dan protein SDS-komplek migrasi melalui poliakrilamid tergantung dari berat molekulnya (Rantam, 2003)

Dari hasil karakterisasi *whole protein* dari *Aeromonas hydrophila* dengan SDS-PAGE 15% menunjukkan beberapa pita (*band*) yang dominan meliputi 174,2 kDa; 164,4 kDa; 101,4 kDa; 83,8 kDa; 71,4 kDa; 68,4 kDa; 61,7 kDa; 58,1 kDa; 53,7 kDa; 50,1 kDa; 46,1 kDa; 41,5 kDa; 39,0 kDa; 35,2 kDa; 28,4 kDa; 22,2 kDa (Gambar 2). Dimana protein *S-layer* terletak diantara 52-55 kDa (Esteve *et al.*, 2004). Untuk kepentingan penelitian protein *S-layer* (53,7 kDa) akan diambil untuk dimurnikan.

Hasil analisis protein berdasarkan berat molekulnya pada penelitian ini, maka isolat *s-layer Aeromonas hydrophila* mempunyai kemampuan imunogenik, karena memenuhi syarat untuk dijadikan imunogen. Hal ini sesuai dengan pendapat Baratawidjaja (2002) bahwa imunogen yang efektif mempunyai berat molekul (BM) lebih besar dari 10.000 Da. Zat-zat yang mempunyai berat molekul lebih kecil dari 10.000 Da bersifat imunogenik lemah atau tidak imunogenik (Subowo, 1993).

SIMPULAN

Berdasarkan karakterisasi protein dari *A. hydrophila* isolat lokal yang diisolasi dari ikan mas (*Cyprinus carpio Linn*) menunjukkan bahwa ada beberapa pita (*band*) yang dominan meliputi 174,2 kDa; 164,4 kDa; 101,4 kDa; 83,8 kDa; 71,4 kDa; 68,4 kDa; 61,7 kDa; 58,1 kDa; 53,7 kDa; 50,1 kDa; 46,1 kDa; 41,5 kDa; 39,0 kDa; 35,2 kDa; 28,4 kDa; 22,2 kDa. Berdasarkan hasil Western Blotting pita protein dengan berat molekul 53,7 kDa memiliki sifat imunogenik sehingga berpotensi dikembangkan sebagai bahan diagnostik.

SARAN

Disarankan perlunya melakukan uji sensitivitas dan spesifisitas serta dilanjutkan uji silang pada ikan mas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi atas Pemberian Dana DUE-like Batch III dengan Nomor Kontrak 55/PL/DUE-Like/UA/2006. Tanggal 12 Mei 2006.

DAFTAR PUSTAKA

- Austin B, Austin DA. 1999. *Bacterial Fish Pathogens, Disease of farmed and Wild Fish* 3rd. Goldming. Springer Praxis.
- Baratawidjaja, K.G. 2002. *Imunologi Dasar*. Edisi Kelima. Jakarta. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath, PHA, Staley JT, William ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Williams & Wilkins. A. Waverly Company, USA. Pp. 190-191; 254-255.
- Irianto A. 2003. *Patologi Ikan Teleostei*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Jang,S.S., E.L Biberstein and D.C. Hirsh. 1978. *A Diagnostic Manual of Veterinary Clinical Bacteriology and Mycology*. University of California, Davis.
- Khairuman, Dodi S, Bambang G. 2002. *Budidaya Ikan Mas secara Intensif*. AgroMedia Pustaka.
- Kordi K, Ghufran H. 2004. *Penanggulangan Hama dan Penyakit*. Jakarta. Penerbit Bina Adiaksara.
- Rantam FA. 2003. *Metode Imunologi*. Cetakan Pertama. Surabaya. Airlangga University Press.
- Spencer TL. 1995. *Penyiapan antigen bakteri untuk ELISA*. Dalam : *Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian* (Burgess, GW.). Yogyakarta. Gadjah Mada University Press.
- Subawo. 1993. *Imunologi Klinik*. Bandung. Penerbit Angkasa.