

POSTER-4

Antigenicity protein of *Aeromonas hydrophila* caused ulcer disease on Goldfish (*Cyprinus carpio* linn) using indirect ELISA technique

Retno Bijanti¹, M. Gandul Atik Yuliani¹, dan Wiwik Tyasningsih²

¹Veterinary Basic Science Departement, ²Microbiology Department
Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University

“C” Campus, Mulyorejo Surabaya, 60115. Phone. 031-5992785 Fax. 031-5993015
E-mail:gandulfk@telkom.net

Abstract

The aim of this research is to know antigenicity protein from *Aeromonas hydrophila* (S-layer) local isolates which can be used as material diagnostic sources and to obtain monoclonal antibody as a kit diagnostic for ulcer disease and red sore disease.

Aeromonas hydrophila were isolated from gold fish (*Cyprinus Carpio* Linn) which got from Balai Budidaya Ikan Punten, Batu, East Java. Antigenicity Protein *Aeromonas hydrophila* were analyzed through some stages: creating antigen homogenate, determining antigen homogenate concentration, rabbit immunization with protein *Aeromonas hydrophila*, and measurement antigenic protein using Indirect ELISA technique.

Result showed that the optical density level of antibody increase 12 time in rabbits were immunized by protein *Aeromonas hydrophila* with four booster and two week interval. The conclusion of this research that *Aeromonas hydrophila* protein can induce humoral immune response of rabbits with increased optical density antibody level.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, Indirect ELISA, Gold fish, Fish diseases

Pendahuluan

Ikan mas (*Cyprinus Carpio* Linn) merupakan ikan air tawar yang mempunyai nilai ekonomis 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).

Serangan hama dan penyakit merupakan salah satu penyebab gagalnya usaha budidaya ikan mas. Seringkali ikan mas yang akan dipanen mengalami kematian karena serangan penyakit. Beberapa penyakit biasanya menimbulkan kerugian yang lebih besar dibandingkan dengan serangan hama. Sehingga para petani atau calon petani ikan mas dituntut memiliki pengetahuan dan ketrampilan mengenai cara pencegahan dan pengendalian hama dan penyakit pada ikan mas (Wahjuni et al., 2005).

Penyebab penyakit pada ikan mas adalah virus, jamur, bakteri, protozoa, cacing dan udang renik. Selain itu kenaikan atau penurunan suhu secara mendadak dapat

Disampaikan dalam Kongres Nasional Pertama,
Asosiasi Farmakologi dan Farmasi Veteriner Indonesia, Denpasar 26 Maret 2011

POSTER-4

menyebabkan stres pada ikan mas. Kandungan oksigen yang terlarut juga berpengaruh terhadap kehidupan ikan mas. Apabila kandungan oksigen yang terlarut sangat rendah akan menyebabkan penurunan nafsu makan ikan mas, sehingga pertumbuhan terganggu dan ikan mudah terserang penyakit (Fujaya, 2004).

Penyakit pada ikan mas antara lain yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*. Perubahan kondisi lingkungan, tekanan-tekanan, termasuk kepadatan dalam populasi, temperatur tinggi, rendahnya oksigen terlarut, status nutrisi yang kurang baik, infeksi parasit dan kontribusi perubahan fisiologis sering kali dihubungkan dengan terjangkitnya penyakit ini (Hayes, 2000).

"Ulcer disease" merupakan salah satu penyakit bakteri pada ikan mas yang sangat berbahaya serta menimbulkan kerugian milyar dollar di seluruh dunia dan cenderung meningkat setiap tahun. Di Indonesia kecenderungan kolam/tambak yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila* 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 cepat, tepat, dan akurat (Austin, 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.

Ciri utama bakteri *A. hydrophila* adalah kuman Gram negatif karena dengan metode pewarnaan menghasilkan warna merah, motil karena memiliki satu flagela (monotrichous flagella) yang keluar dari salah satu kutubnya, berbentuk batang dengan ukuran 1-4x0,4-1 mikron, fakultatif aerobik, tidak berspora (Kordi, Gufran, 2004). Umumnya *A. hydrophila* dapat diisolasi dari ginjal atau darah ikan yang terinfeksi.

Sifat biakan dengan menumbuhkan pada nutrient agar atau triptone soya agar (TSA), dimana dalam waktu 24 jam pada suhu 22-28°C akan terbentuk koloni melingkar, cembung, transparan serta berwarna putih hingga kuning tua (Austin, Austin, 1999;). Dari hasil uji biokimia yaitu uji katalase positif, oksidase positif, sitokrom oksidase positif, fermentasi gula dan produksi gula positif (Nabib dan Pasaribu, 1989). Memiliki sifat merusak arginin, tumbuh pada suhu 5-37°C dan tanpa NaCl, tidak tumbuh pada pH 9. Bakteri ini dapat tumbuh dengan medium KCN, OPNG positif, indol positif, hidrolisis gelatin tetapi tidak menghidrolisis kitin (Holt et al., 1994), uji methyl red positif, mampu menghasilkan gas H₂S, D-glukosa, L-arabinosa, maltosa, D-manitol, sukrosa dan trehalosa (Holt et al., 1994), sedangkan menurut ada beberapa strain *Aeromonas hydrophila* yang tidak membentuk gas H₂S. Untuk mengidentifikasi bakteri *A. hydrophila* dapat digunakan tes aglutinasi, namun perlu diperhatikan kemungkinan adanya reaksi silang dengan *A. salmonicida* dan *A. sobria* (Austin, Austin, 1999).

A. hydrophila merupakan bakteri yang sangat banyak di lingkungan air tawar, terutama pada lingkungan yang kaya bahan organik dan senang hidup di lingkungan bersuhu 15-30°C dan pH 5-5,9 (Austin, Austin, 1999; Sitanggang, 2002), namun apabila jumlah *A. hydrophila* pada perairan melebihi 10⁴ sel per mililiter maka dapat menjadi patogen (Irianto, 2003).

POSTER-4

Penyakit yang disebabkan *A. hydrophila* dapat menyerang hewan amfibi, mamalia, serta berbagai jenis ikan air tawar termasuk ikan mas (*Cyprinus sp.*), ikan salmon (*Salmonid sp.*), belut (*Anguilla sp.*), lele (*Clarias sp.*, *Ictalurus sp.*) yang sering disebut Motile Aeromonas Septicemia (MAS) atau Bacterial Haemorrhagic Septicemia disamping juga dapat menyerang manusia (Hayes, 2000).

Penyakit yang disebabkan oleh *A. hydrophila* mudah dikenali karena adanya luka-luka eksternal pada permukaan tubuh, rusaknya ekor dan sirip serta septikemik hemoragik. Septikemia hemoragik ditandai dengan adanya lesi kecil pada permukaan tubuh yang sering disertai dengan pengelupasan sisik, perdarahan insang dan anus, ulcer, abses, exoptalmia dan kembung (dropsy). Organ internal dijumpai akumulasi cairan nanah, anemia, dan kerusakan beberapa organ terutama ginjal dan hati (Irianto, 2003).

Materi dan metode

Isolasi Antigen *Aeromonas hydrophila*

Pembuatan homogenat dilakukan dengan teknik Sonikasi. *Aeromonas hydrophila* dicuci dengan PBS dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Pelet *Aeromonas hydrophila* dilarutkan dengan PBS 1 ml kemudian disonikasi pada 20 Hz selama 4x4 menit dengan interval waktu 2 menit. Supernatan diambil dan dipusangkan 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 hydrophila* digunakan metode Bradford Protein Assay dan dibaca dengan Spektrofotometer.

Imunisasi Pada Kelinci

Imunisasi pada kelinci dilakukan menggunakan protein yang telah berhasil di isolasi melalui tahap sebelumnya disuntikkan secara subcutan ke kelinci galur lokal yang berjenis kelamin jantan dan berumur 3 bulan. Sebagai kontrol (tanpa imunisasi). Kelinci yang di imunisasi sebanyak 7 ekor. Imunisasi kedua dilakukan setelah 2 minggu berikutnya dengan campuran antigen dalam Freund's incomplete adjuvan (perbandingan 1:1). Imunisasi ketiga dilakukan setelah 2 minggu berikutnya dengan cara dan bahan yang sama seperti imunisasi kedua demikian diulang hingga empat kali booster. Pada dua hari setelah imunisasi terakhir, serum Kelinci diambil melalui plexus retroorbitalis. Serum rabbit digunakan untuk menentukan titer antibodi dan mengetahui respon imun kelinci.

Penentuan Titer Antibodi

Titer antibodi yang berasal dari serum rabbit yang telah di imunisasi ditentukan dengan metode Indirect ELISA. Kontrol negatif diambil dari rabbit galur lokal yang tidak di imunisasi dengan jenis kelamin dan umur yang sama. Cawan mikrotiter yang digunakan adalah cawan mikrotiter 96 sumuran. Setiap sumuran di isi dengan 100 µl larutan antigen dengan konsentrasi 10 µg/ml dalam buffer pelapis dan di inkubasi pada suhu 20 °C selama 24 jam. Cawan mikrotiter dicuci satu kali dengan buffer pencuci lalu ke dalam tiap sumuran ditambahkan 100 µl serum rabbit yang telah di imunisasi dan diencerkan dengan PBS. Serum rabbit diencerkan berseri, yaitu 20, 2-1, 2-2, 2-3, 2-10. Cawan mikrotiter di inkubasikan pada suhu 37 °C selama satu jam dan dilanjutkan dengan pencucian tiga kali dengan buffer pencuci. Setiap sumuran di isi

Disampaikan dalam Kongres Nasional Pertama,

Asosiasi Farmakologi dan Farmasi Veteriner Indonesia, Denpasar 26 Maret 2011

POSTER-4

dengan 100 µl larutan konjugat IgG goat anti rabbit peroxidase. Konjugat di encerkan dengan PBS 10.000 X alalu ditambahkan BSA 1%. Cawan mikrotiter di inkubasikan pada temperatur 37° Celsius selama 1 jam dan selanjutnya dicuci tiga kali dengan buffer pencuci. Setiap sumuran ditambahkan substrat ABTS sebanyak 150 µl (1 mg/ml dalam buffer substrat ABTS dan 0,3 µl hidrogen peroksida). Cawan mikrotiter di inkubasikan dalam temperatur ruangan selama 30-45 menit. Titer antibodi dibaca dengan alat spektrofotometer untuk ELISA (ELISA reader) pada panjang gelombang 405 nm. Titer antibodi menunjukkan negatif jika hasil pembacaan ELISA antara rabbit kontrol dan rabbit yang di imunisasi diperoleh nilai optical density (OD) yang hampir sama. Titer antibodi menunjukkan hasil positif bila nilai OD rabbit imun lebih tinggi atau minimal 2 kali dari nilai OD dari rabbit kontrol (Graham, 1995).

Data yang diperoleh akan dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel, diagram dan gambar.

Diskusi

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 rusak 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.

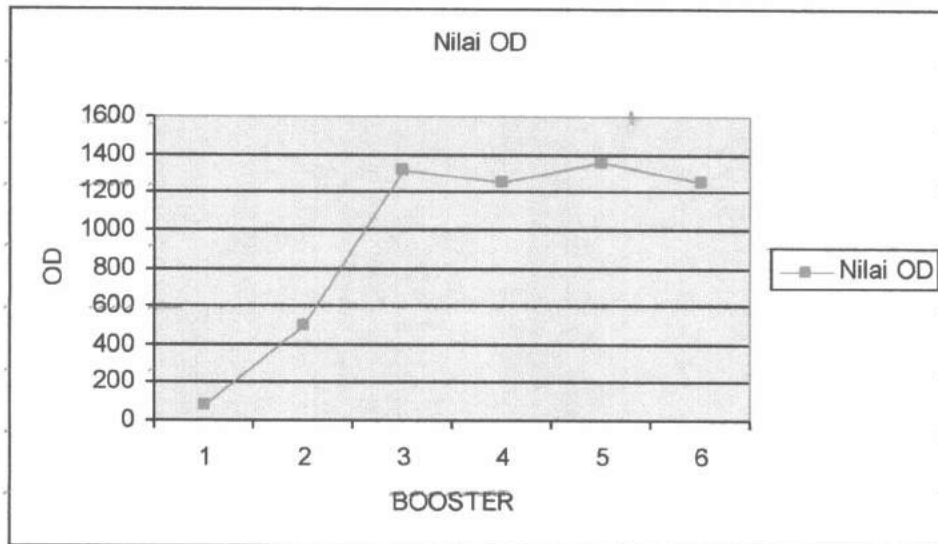
Pada penelitian ini ekstraksi protein dari *Aeromonas hydrophila* dilakukan dengan sonikasi dan penambahan Tween, dengan tujuan untuk memecah ikatan protein dari dinding sel kuman *Aeromonas hydrophila* sehingga dapat diekstraksi protein struktural pada bagian luar sel atau surface layernya. Supernatan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

Pemisahan s-layer dari sel *A. hydrophila* sangat penting untuk menentukan tingkat kemurniannya, kemurnian s-layer sangat menentukan daya antigenitas dan imunogenitasnya. Menurut Tizard (1995) molekul dikatakan 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 ELISA terhadap whole protein dapat dilihat pada gambar 1 di bawah. Pada gambar tampak terjadinya peningkatan nilai OD yang cukup signifikan setelah dilakukan dua kali penyuntikan setelah itu nilai OD cenderung stabil. Hal ini menandakan bahwa terjadi peningkatan antibodi dan titer antibodi tertinggi dicapai pada booster ke empat.

Pada hari pertama (sebelum injeksi protein) menunjukkan nilai OD sebesar 100, kemudian pada injeksi ketiga terjadi peningkatan nilai OD sebesar 1300 dan tertinggi pada injeksi kelima (booster keempat) menjadi 1400, hal tersebut menunjukkan protein *Aeromonas hydrophila* bersifat antigenik karena mampu menginduksi antibodi humoral yang ditunjukkan dengan peningkatan nilai OD antibodi. Persyaratan titer antibodi yang imunogenik minimal harus mencapai satu setengah sampai dua kali nilai OD awal (Rantam, 2003)

POSTER-4



Gambar 1. Hasil ELISA whole protein yang diimunisasi pada kelinci

Kesimpulan

Protein antigen *Aeromonas hydrophila* dapat menginduksi antibodi humoral dengan indikator peningkatan nilai Optical Density antibodi serum kelinci, sehingga bisa dijadikan sumber informasi untuk pengembangan bahan diagnostik maupun vaksin sub unit berbasis molekuler untuk mengatasi problem Ulcer disease pada ikan mas di Indonesia

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, and Austin, D.A. 1999. *Bacterial Fish Pathogens, Disease of farmed and Wild Fish 3rd*. Springer Praxis. Goldming.

Fujaya, Y. 2004 : *Fisiologi Ikan. Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan*. Cetakan Pertama. Penerbit Rineka Cipta

Graham, WB. 1995. *Teknologi ELISA, dalam Diagnosa dan Penelitian (Terjemahan Wayan, TA.)*. Gajah Mada University Press

Disampaikan dalam Kongres Nasional Pertama,
Asosiasi Farmakologi dan Farmasi Veteriner Indonesia, Denpasar 26 Maret 2011

POSTER-4

- Hayes, J. 2000. www.springteamproject.org. Oregon state university, Net/aeromonas hydrophila.net/html
- Holt, J.G, Krieg, N.R, Sneath, P.H.A, Staley, J.T, William, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Williams & Wilkins. A. Waverly Company, USA. P. 190-191; 254-255.
- Irianto, A. 2003. Patologi Ikan Teleostei. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Khairuman, Dodi S, Bambang G. 2002: Budidaya Ikan Mas secara Intensif. AgroMedia Pustaka.
- Kordi, K dan Ghufran, H. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit. Penerbit Bina Adiaksara. Jakarta.
- Rantam, FA. 2003. Metode Immunologi. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya.
- Spencer, T.L. 1995. Penyiapan antigen bakteri untuk ELISA dalam : Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian (Burgess, GW.). Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sitanggang, M. 2002. Mengatasi Penyakit dan Hama Pada Penyakit Ikan. Agro Media Pustakja, Jakarta. hal. 127-133.
- Tizzard, I. 1995. Pengantar Immunologi Veteriner. WB. Saunders Company. Philadelphia
- Wahjuni, R.S., Yuliani, M.G.A., Bijanti, R. 2005. Penetapan Nilai Hematologi Ikan Mas (Cyprinus Carpio Linn) dengan Metode Daisley. DIP A PNBP. Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Universitas Airlangga.