

**KARAKTERISASI PROTEIN *Zoothamnium penaei*
DENGAN METODE ELEKTROFORESIS SDS-PAGE**

SKRIPSI

PROGRAM STUDI S-1 BUDIDAYA PERAIRAN



Oleh :

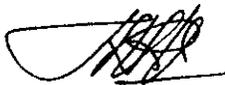
DAUS SUMBODO
SURABAYA - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

**KARAKTERISASI PROTEIN *Zoothamnium penaei* DENGAN
METODE ELEKTROFORESIS SDS-PAGE**

Oleh :
DAUS SUMBODO
NIM. 060210037P

Menyetujui,
Komisi Pembimbing



Prof. Dr. Drh. Hj. Sri Subekti B. S., DEA
NIP. 130 687 296



Ir. Wahyu Tjahjaningsih, Msi.
NIP. 131 569 345

Mengetahui
Ketua Program Studi S-1
Budidaya Perairan

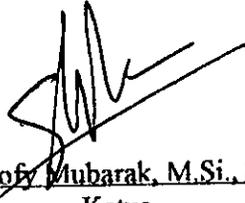


Prof. Dr. Drh. Hj. Sri Subekti B. S., DEA
NIP. 130 687 296

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa Laporan Skripsi ini, baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Perikanan

Menyetujui,

Panitia Penguji,



A Shofy Mubarak, M.Si., S.Pi
Ketua



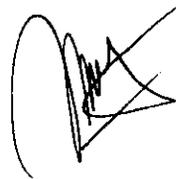
Rr Juni Triastuti, M.Si., S.Pi
Sekretaris



Ir. Kismiyati, M.Si., S.Pi
Anggota



Prof. Dr. Drh. Hj. Sri Subekti B. S., DEA
Anggota



Ir. Wahyu Tjahjaningsih, M.Si
Anggota

Surabaya, 26 Pebruari 2007

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan



Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh.
NIP. 130 687 297

RINGKASAN

DAUS SUMBODO. Skripsi tentang Karakterisasi Protein *Zoothamnium penaei* dengan Metode Elektroforesis SDS-PAGE. Dosen Pembimbing Prof. Dr. Drh. Hj. Sri Subekti B.S., DEA dan Ir. Wahyu Tjahjaningsih, MSi.

Zoothamniosis adalah penyakit parasiter pada udang yang disebabkan oleh *Zoothamnium penaei*. Penyakit ini menyerang permukaan tubuh, kaki, rostrum dan insang. Penyakit ini perlu mendapatkan perhatian yang serius karena sudah menyebabkan kerugian besar bagi pembesaran ataupun di pembenihan. Usaha pencegahan dan penanggulangan sudah sering dilakukan, seperti perbaikan sistem resirkulasi, perendaman dengan formalin dan bahan-bahan kimia lain namun hasilnya belum dapat direalisasikan dengan baik. Salah satu cara yang mungkin efektif untuk direalisasikan adalah dengan pengaktifan respon imun non spesifik pada udang. Sebagai informasi awal, perlu adanya penelitian tentang karakterisasi protein *Zoothamnium penaei* berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis SDS-PAGE.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui karakter protein *Zoothamnium penaei* dengan metode elektroforesis SDS-PAGE. Hasil penelitian ini dapat dijadikan informasi awal bagi penelitian selanjutnya dalam mencari protein spesifik *Zoothamnium penaei*. Penelitian ini dilaksanakan pada Oktober 2006 hingga 8 Desember 2006 di Laboratorium Parasitologi Veteriner, Laboratorium Biologi Molekuler Veteriner, Laboratorium Pendidikan Perikanan Fakultas Kedokteran Hewan, *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Surabaya dan Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang.

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian deskriptif eksploratif untuk memaparkan karakter protein *Zoothamnium penaei* berdasarkan berat molekulnya dengan Elektroforesis SDS-PAGE. Data pengamatan berupa ekspresi protein yang ditunjukkan dengan BM pita protein (*band*) pada gel.

Penelitian ini menghasilkan sepuluh pita protein (*band*) *Zoothamnium penaei* dengan BM 163 kDa, 115,5 kDa, 44 kDa, 35,5 kDa, 25,4 kDa, 20,4 kDa, 18 kDa, 13,7 kDa, 10 kDa dan 8 kDa. Protein dengan BM 115,5 kDa dan 18 kDa mempunyai pita yang lebih tebal dari yang lainnya

SUMMARY

DAUS SUMBODO. Thesis about Description of Characterisation of Protein *Zoothamnium penaei* With the Methode of SDS-PAGE Electrophoresis. Counselors Lecturer Prof. Dr. Drh. Hj. Sri Subekti B.S., DEA dan Ir. Wahyu Tjahjaningsih, Msi.

Zoothamniosis is a parasitic diseases at Tiger Shrimp cause by *Zoothamnium penaei*. It is attack the body surface, foot, rostrum and gill of tiger shrimp. This diseases require to get the serious attention, because it have caused the big loss for the farmer and hatchery. The prevention effort have often done, as repaire of resirculation system, deeping by formalin and chemicals but the result cannot realized better. A method that more effective to be realized by the immuned activation respon non specific at tiger shrimp. As information of early from that methode, need of the research about characterisation of protein *Zoothamnium penaei* based on molecule weight (MW) with the method of SDS-PAGE electrophoresis

This research aim to know character of protein *Zoothamnium penaei* with the methode of SDS-PAGE electrophoresis. The result can be made early information for the first research in searching specific protein of *Zoothamnium Penaei*. This study was done at oktober up to December 2006, in Parasitology Laboratory Veteriner, Molecular Biology Laboratory and Laboratory of Fishery Education of Faculty Veterinary Medicine of Airlangga University Surabaya and Molecular Biology Laboratory of Faculty Mathematics and Natural Sciences of Brawijaya University.

The study used eksplorative descriptive, to explain the character of protein *Zoothamnium penaei* based on molecule weight by SDS-PAGE Electrophoresis. Observation data of protein expression at gel was the form of protein band by MW is certain.

The result got ten band of protein *Zoothamnium penaei* by MW as factor: 163 kDa, 115,5 kDa, 44 kDa, 35,5 kDa, 25,4 kDa, 20,4 kDa, 18 kDa, 13,7 kDa, 10 kDa and 8 kDa. Protein of MW 115,5 kDa and 18 kDa have the band which is thicker than other protein faction.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga skripsi tentang “Karakterisasi Protein *Zoothamnium penaei* dengan Metode Elektroforesis SDS-PAGE” ini dapat terselesaikan. Laporan ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan pada Program Studi S-1 Budidaya Perairan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan dan kesempurnaan laporan-laporan selanjutnya. Akhirnya penulis berharap semoga karya ilmiah ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi kepada semua pihak, khususnya bagi Mahasiswa Program Studi S-1 Budidaya Perairan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya guna kemajuan serta perkembangan ilmu dan teknologi dalam bidang perikanan, terutama budidaya perairan.

Surabaya, 1 januari 2007

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyadari bahwa tanpa bekal ilmu pengetahuan, dorongan, bimbingan serta bantuan lainnya dalam penulisan laporan skripsi. Hal ini tidak dapat berjalan dengan baik karena itulah tiada imbalan yang dapat disampaikan atas segala bantuan dan sumbangsuhnya.

Pada kesempatan ini, tidak lupa penulis haturkan terima kasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
2. Ibu Prof. Dr. Drh. Hj. Sri Subekti B. S., DEA. selaku ketua program studi S-1 Budidaya Perairan serta Dosen Pembimbing I.
3. Ibu Ir. Wahyu Tjahjaningsih, M.Si selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan petunjuk sejak penyusunan usulan sampai terselesaikannya skripsi ini.
4. Ibu Ir. Gunanti Mahasri M.Si yang telah memberikan judul skripsi serta bimbingan dan petunjuk sampai terselesaikannya skripsi ini.
5. Ayah Darul Madjedi, SE. , Ibu Rofi'ah, Mas Burhan, S.Kom. , dan saudara – saudaraku tersayang yang telah memberikan do'a, perhatian dan dukungan yang sangat berarti bagi penulis.
6. Teman seperjuangan Budidaya Perairan Angkatan 2002 atas dukungan dan kebersamaan dalam suka dan duka.
7. Pak Sofy, Mbak Linda, Mbak Idah, Rofik dan Mbak Ika yang turut membantu dalam pelaksanaan penelitian.

8. Pak Hanif sekeluarga yang telah memberikan penginapan gratis selama penelitian di Malang.
9. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam pelaksanaan maupun penyelesaian laporan skripsi ini.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
RINGKASAN	iv
SUMMARY	v
KATA PENGANTAR	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	5
BAB II. STUDI PUSTAKA	
2.1 <i>Zoothamnium penaei</i>	6
2.1.1 Klasifikasi dan morfologi	6
2.1.2 Siklus hidup dan reproduksi <i>Zoothamnium sp.</i>	7
2.1.3 Zoothamniosis	8
2.2 Antigen Parasit	9
2.3 Elektroforesis SDS-PAGE	11
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL	14

BAB IV. METODOLOGI

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
4.2 Materi Penelitian	17
4.2.1 Bahan penelitian	17
4.2.4 Peralatan penelitian	18
4.3 Metode Penelitian	18
4.3.1 Isolasi sampel <i>Zoothamnium penaei</i>	18
4.3.2 Isolasi protein <i>Zoothamnium penaei</i> tanpa divortex	19
4.3.3 Isolasi protein <i>Zoothamnium penaei</i> dengan vortex	19
4.3.3 Analisis dengan metode elektroforesis SDS – PAGE	19

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN 23

5.1 Isolasi <i>Zoothamnium penaei</i>	23
5.2 Identifikasi Protein <i>Zoothamnium penaei</i>	24
5.3 Pembahasan	28

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN 32**DAFTAR PUSTAKA** 33**LAMPIRAN** 37

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Nilai protein standart	21
2. Nilai Rf(x) dan Log BM marker	26
3. Hasil analisis protein <i>Zoothamnium penaei</i> berdasarkan berat molekul (BM)	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi <i>Zoothamnium</i> sp.	7
2. Hubungan antara udang, lingkungan dan patogen.....	8
3. Bagan kerangka konseptual penelitian.....	16
4. Bagan kerangka operasional penelitian22	
5. Koloni <i>Zoothamnium penaei</i>23	
6. Gel hasil <i>running</i> dengan sampel tanpa divortex terlebih dahulu.....24	
7. Hasil analisis protein <i>Zoothamnium penaei</i> dengan teknik SDS-PAGE25	

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kurva regresi linier dan perhitungan berat molckul.....	37
2. Persiapan gel.....	38
3. Diagram alur <i>running</i>	39
4. Pembuatan reagensia	40
5. Udang terscrang zoothamniosis	41
6. Alat-alat penelitian	42
7. Elektroforesis dengan SDS-PAGE	43

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Masa kejayaan udang mencapai titik klimaks pada awal tahun 1993 karena mulai akhir tahun 1993 sampai sekarang banyak terjadi kasus kematian massal pada udang windu baik di tambak maupun di panti pembenihan. Banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan usaha budidaya ini, antara lain kualitas air, benih, pakan, teknologi dan penyakit. Dua faktor sebagai penyebab utama kematian udang windu adalah serangan penyakit dan kualitas air yang menurun dimana ke dua faktor tersebut saling berhubungan karena menurunnya kualitas air akan diikuti dengan munculnya penyakit (Chamratchacool, 1996; Rukyani, 1996).

Kasus kematian udang umumnya terjadi secara mendadak dan pengenalan secara dini sulit dilakukan sehingga kasus kematian udang sampai saat ini sulit ditekan atau dihindari. Salah satu penyakit yang sering menyerang udang windu baik di tambak maupun di panti pembenihan adalah *Zoothamnium penaei* (Sumawijaya, 1991). *Zoothamniosis* adalah penyakit parasiter pada udang yang disebabkan oleh *Zoothamnium* sp. Parasit tersebut merupakan ciliata yang hidup normal pada perairan yang kualitasnya cukup baik akan tetapi aktivitas dan jumlah parasit ini akan meningkat pada kondisi perairan yang kualitasnya mulai menurun. Penyebaran *Zoothamnium* sp. meliputi daerah pertambakan di seluruh Indonesia, Thailand, Malaysia, India, Cina, Jepang dan Amerika (Rukyani, 1996).

Zoothamniosis menyerang pada permukaan tubuh, kaki, rostrum dan insang. Pada permukaan tubuh udang yang terserang diseliputi oleh suatu benda yang

menempel berwarna putih kecoklatan. Bila infestasinya terlalu berat penempelannya menyebar dan menebal, sehingga disebut penyakit udang lumutan (Chamratchakool, 1996), penyakit udang bersepatu atau berjaket (Rukyani, 1996). Kondisi ini menyebabkan udang sulit bernafas dan melakukan pergantian kulit (*moulting*), pertumbuhan terhambat, kematian dan menurunkan nilai ekonomi udang (Tonguthai, 1991). Zoothamniosis menyerang udang pada semua fase, dan apabila menyerang udang di pembenihan, kematian dapat terjadi pada dua sampai tiga hari pasca infeksi berat (Sumawidjaja, 1991; Mahasri, 1998). Bila menyerang udang di daerah pembesaran kematian terjadi mulai hari ke tiga sampai ke tujuh pasca infeksi berat (*Asian Shrimp News*, 1996).

Kejadian zoothamniosis baik ditambak maupun di panti pembenihan di Indonesia perlu mendapatkan perhatian yang serius. Sumawijaya (1991) melaporkan bahwa kejadian zoothamniosis di pantai utara dan selatan Jawa Barat mencapai 85%, di pertambakan Sidoarjo 90% dan di pembenihan 92% (Mahasri, 1998), di daerah pertambakan udang di Pasuruan mencapai 96% (Mahasri, 2000; Mahasri *dkk.*, 2003). Kejadian Zoothamniosis di tambak udang windu tradisional mencapai 90% (Venkatesen *et al.*, 1995).

Usaha penanggulangan zoothamniosis sudah banyak dilakukan, antara lain dengan menggunakan sistem resirkulasi dan perendaman dengan formalin akan tetapi sampai saat ini belum dapat berhasil dengan baik. Pengobatan zoothamniosis baik di panti pembenihan maupun di pembesaran dengan bahan kimia, selama ini sudah memberikan hasil yang cukup baik tetapi dapat menyebabkan patogen menjadi resisten dan juga residu yang terakumulasi pada karkas udang dapat mempengaruhi mutu udang. Rukyani (1996) dan Salfira

(1998) mengatakan bahwa untuk meningkatkan ketahanan tubuh udang baik di panti pembenihan maupun di tambak dapat dilakukan dengan menggunakan immunostimulan yaitu suatu bahan kimia atau zat asing yang dapat mengaktifkan sel hemosit sehingga organisme lebih tahan terhadap infeksi virus, bakteri, jamur dan parasit (Raa, 2000).

Vaksinasi pada udang sudah pernah dilakukan namun belum dapat dikatakan berhasil dengan baik karena tidak sesuai dengan kekebalan tubuh udang yang tergolong primitif. Sistem kekebalan non spesifik pada udang lebih berperan dalam pertahanan tubuhnya dibandingkan dengan sistem kekebalan spesifik. Pada invertebrata yang berperan adalah mekanisme pertahanan tubuh oleh hemosit dimana penyebaran dan peningkatan jumlah hemosit diasumsikan sebagai bentuk dari respon imun seluler pada tubuh udang (Itami, 1994).

Amos *et al.*, (1975) telah menganalisis protein dari spasmonema kontraktile dari *Zoothamnium arbuscula* dan membandingkan dengan protein lain pada organ lain yang bergerak. Deteksi protein dilakukan dengan *Polyacrilamide Gel Electrophoresis* yang menunjukkan bahwa hampir 60% protein di dalam *sodium dodecyl sulphate gel* tersebar pada pita (*band*) dengan berat molekul mendekati 20.000 Da.

Menurut Sumitro *dkk.*, (1996) karakterisasi protein berdasarkan berat molekulnya dapat diketahui dengan metode elektroforesis SDS-PAGE, dan hasil yang didapat dari metode elektroforesis SDS-PAGE ini berupa pita protein (*band*). *Zoothamnium* sp. memiliki karakter protein yang berbeda-beda dalam menginfeksi udang sehingga setiap protein yang diproduksi tersebut menentukan besar patogenitas parasit tersebut (Pelezar *et al.*, 1986).

Prinsip dasar dari metode SDS – PAGE adalah denaturasi protein oleh *sodium dodecyl sulphate* dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan berat molekulnya dengan cara elektroforesis menggunakan gel *polyacrilamide* (Davis, *et al.*, 1994). Menurut Wongsosupantio (1990), beberapa keuntungan elektroforesis menggunakan gel antara lain dapat digunakan untuk pemisahan sampel dengan jumlah besar khususnya untuk senyawa makromolekul serta komposisi matriks gel dapat diubah sesuai kebutuhan.

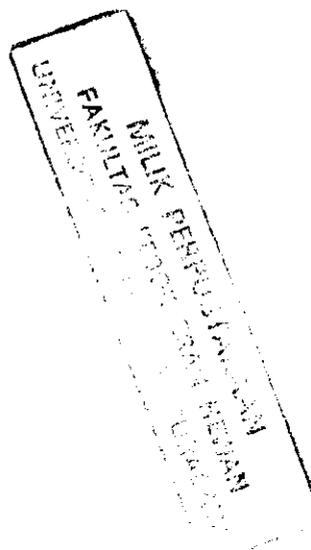
Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakter protein *Zoothamnium penaei* berdasarkan berat molekul dengan harapan dapat dijadikan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.

I.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan tersebut di atas maka perumusan masalah penelitian ini adalah bagaimana karakter protein *Zoothamnium penaei* menggunakan elektroforesis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis*) ?.

I.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter protein *Zoothamnium penaei* dengan metode SDS-PAGE.



I.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan manfaat :

- 1) Sebagai informasi tentang karakter protein *Zoothamnium penaei* berdasarkan berat molekulnya
- 2) Menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya dalam mencari protein spesifik parasit *Zoothamnium penaei*

BAB II

STUDI PUSTAKA

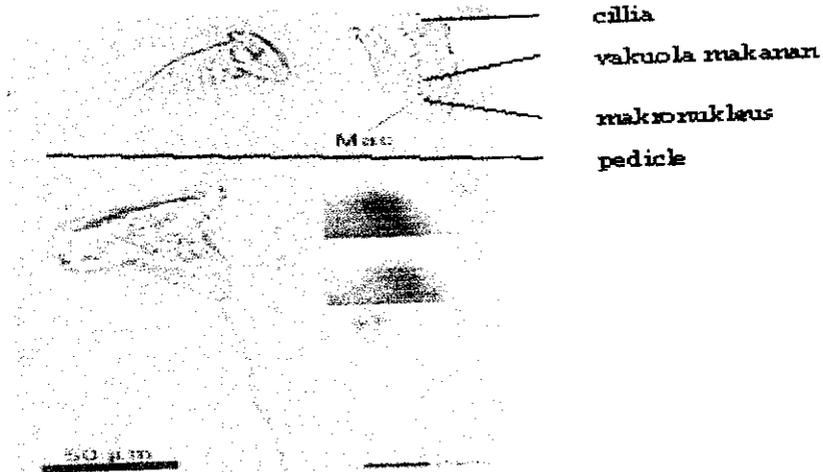
BAB II

STUDI PUSTAKA

2.1 *Zoothamnium penaei*

2.1.1 Klasifikasi dan morfologi

Zoothamnium penaei merupakan protozoa dari kelas Ciliata, ordo Peritricha, famili Vorticellidae, genus *Zoothamnium*. terdiri dari 16 spesies (Lom and Dycova, 1992). *Zoothamnium* sp. adalah protozoa ciliata yang hidup berkoloni, mempunyai zooid bersifat dimorfisme. Menurut Sumawidjaya (1991) koloni *Zoothamnium* sp. berwarna keputih-putihan dan menempel pada substrat menggunakan tangkai (*pedicle*) yang bercabang, kadang tiga zooid dalam satu koloni mempunyai bentuk dan model yang sama tetapi bervariasi dalam ukuran. Zooid *Zoothamnium* sp. mempunyai peristome yang berbentuk lingkaran yang dikelilingi oleh Cilia yang berfungsi sebagai mobilitas pada fase teleotroch (zooid bebas). Pada fase trophont terdapat tangkai yang berfungsi untuk menempel dan didalamnya terdapat membran spasmonema yang berhubungan satu dengan yang lain pada tiap-tiap cabang pada setiap koloni (Debauffer and Bushe, 1998). Lebih jelasnya, morfologi *Zoothamnium* sp dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi *Zoothamnium* sp. (www.digisys.com, 2004)

2.1.2 Siklus hidup dan reproduksi *Zoothamnium* sp.

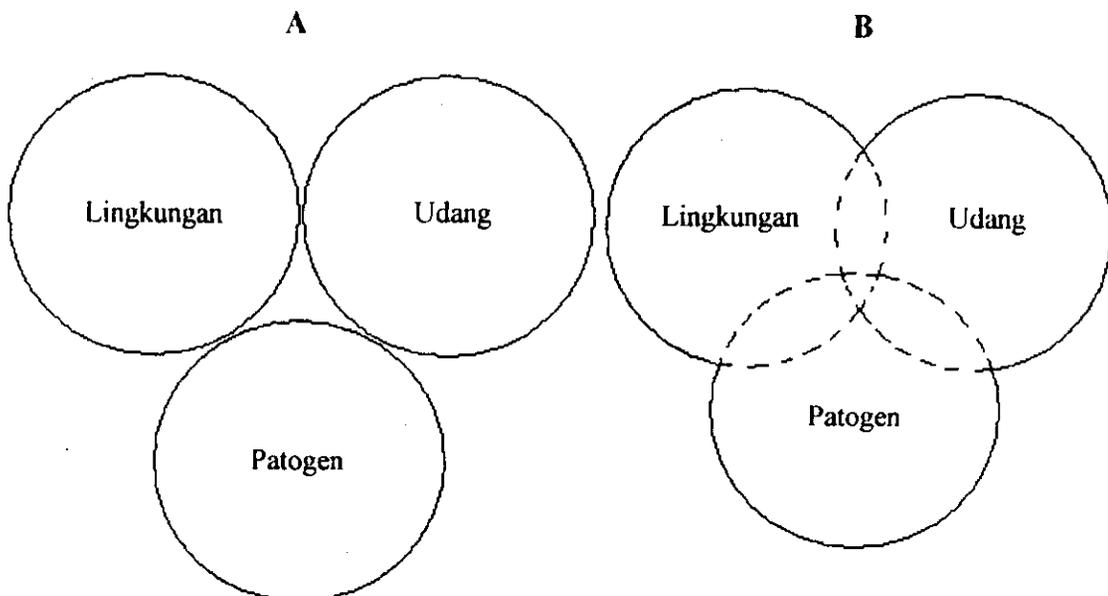
Siklus hidup *Zoothamnium* sp. dibagi dalam dua fase yaitu fase trophont dan fase teleotroch. Fase trophont adalah fase dimana *Zoothamnium* mempunyai bentuk badan (zooid) yang lengkap dan tangkai (*pedicle*) yang digunakan untuk menempel pada substrat. Sedangkan fase teleotroch adalah fase dimana *Zoothamnium* hanya terdiri dari zooid yang berenang bebas. Fase teleotroch ini akan berubah menjadi trophont jika menemukan substrat yang cocok untuk menempel (Utz, *et. al.*, 2002). Pada fase teleotroch dapat bertahan 2-3 hari hingga bertemu dengan inang (Ji dan Weibo, 1986).

Zoothamnium penaei berkembang biak dengan pembelahan dan prosesnya tergantung dari kondisi lingkungan. Proses pembelahan berlangsung selama 15 menit, 30 menit, 80 menit, 4 jam bahkan sampai 4 hari. Semakin menurunnya kualitas perairan dan daya tahan tubuh udang maka proses pembelahan terjadi lebih cepat. Perkembangbiakan ini terjadi hanya untuk memperbesar koloni

sehingga setelah membelah biner akan terdapat cabang tangkai atau akar yang baru (Ji dan Weibo, 1986).

2.1.3 Zoothamniosis

Timbulnya suatu penyakit adalah suatu proses yang dinamis dan merupakan hasil interaksi antara inang (*host*), agen penyakit (patogen) dan lingkungan. Faktor lingkungan memegang kendali dalam interaksi ini dan dapat menimbulkan pengaruh positif dan negatif terhadap hubungan antara inang dan patogen (Martin *et al.*, 1997). Hubungan ketiga unsur tersebut disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan antara udang, lingkungan dan patogen

Keterangan : A. Hubungan seimbang

B. Hubungan tidak seimbang

Sumber (Woo dan Bruno, 1999)

Zoothamniosis merupakan penyakit parasiter pada udang windu yang disebabkan oleh *Zoothamnium penaei*, disebut penyakit udang lumutan atau penyakit udang berjaket dan juga dikenal dengan penyakit udang bersepatu (Rukyani, 1996).

Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan *Zoothamnium penaei* ini adalah (1) perairan dengan padat penebaran yang tinggi, (2) kadar oksigen rendah (< 3 ppm) dan (3) bahan organik yang tinggi, dimana kondisi seperti ini sering terjadi pada budidaya udang. Penyakit zoothamniosis muncul dan menyerang udang baik secara individu maupun bersamaan dengan munculnya penyakit infeksius maupun non infeksius lainnya sehingga tingkat kematian udang karena penyakit ini mencapai 100% (Venkatesen and Srinivasan, 1995).

Gejala klinis udang yang terserang zoothamnium adalah terdapat suatu benda berwarna putih kecoklatan yang menempel pada seluruh permukaan tubuh, insang, kaki dan rostrum sehingga udang sulit bernafas, sulit bergerak, tidak dapat berganti kulit dan berenang ke permukaan (Chamratchakool, 1996).

Menurut Tonguthai (1991), pada kasus infeksi berat di seluruh permukaan tubuh udang yang tertempeli oleh parasit mengakibatkan udang sulit untuk bergerak, sulit bernafas dan sulit untuk ganti kulit. Hal ini akan menyebabkan udang stres dan akan mengalami kematian, terutama pada stadia larva 3-7 hari setelah infeksi. Saat *Zoothamnium* menyerang, udang akan mengeluarkan mucus spesifik yang dapat menyebabkan peradangan pada kulit dan membahayakan kesehatan udang (Lightner, 1998).

2.2 Antigen Parasit

Secara umum, pengertian antigen adalah substansi yang dapat dikenali sebagai benda asing oleh sistem imun tubuh dan diukur berdasarkan keberhasilannya dalam berikatan dengan antibodi. Antigen yang mempunyai potensi imunogenitas bila memiliki molekul besar dengan susunan kimiawi yang

kompleks. Namun molekul kecil bisa juga sebagai antigen tetapi molekul besar jauh lebih baik. Protein antigen adalah zat asing, protein asing atau benda asing (Baratawidjaja, 2000).

Protein merupakan kelompok senyawa yang terbesar dan terdapat sebagai biomolekul yaitu sekitar 50 % berat kering senyawa organik total yang terdapat dalam sel. Protein merupakan makromolekul dengan struktur yang kompleks dan berperan sebagai antigen yang jauh lebih baik dari pada polimer besar sederhana, misalnya lemak, karbohidrat, asam nukleat dan protein dengan berat molekul besar dari 10000 Dalton dapat dikatakan antigenik (Tizard, 1988).

Antigen yang berasal dari parasit akan menjadi imunogenik apabila dikenali sebagai *non self* dengan berat molekul tertentu dan dapat menimbulkan sistem imun. Secara kimiawi, zat imunogen parasit dapat berupa protein, karbohidrat, glikoprotein dan glikolipida. Masing-masing komponen kimiawi tersebut mempunyai karakteristik ukuran, susunan rantai, dan jumlah determinan yang mungkin berbeda (Baratawidjaja, 2000).

Berbagai jenis antigen yang berasal dari parasit dapat diperoleh dari sumber dan lokasi parasit, maupun fase hidup parasit. Berdasarkan sumber dan lokasi jenis antigen parasit dapat diperoleh dari: 1) eksoantigen yang berasal dari parasit hidup atau dalam media buatan yang merupakan produk ekskresi berupa metabolit; 2) antigen somatik terlarut yang berasal dari sel permukaan tubuh parasit; 3) parasit yang mati; 4) parasit yang hidup secara utuh; dan 5) cairan tubuh organisme (Tizard, 1988).

Zoothamnium penaei memiliki protein dengan karakter yang berbeda-beda dalam melakukan penyerangan terhadap udang, sehingga setiap protein yang

diproduksi tersebut menentukan besar patogenitas parasit tersebut (Pelezar *et al.*, 1986).

Menurut Itabashi *et al.*, (2003) protein spasmin pada spasmonema dan sudah dapat dibuat antibodi poliklonal. Analisis hasil imunoblotting menunjukkan bahwa protein antigen mempunyai berat molekul 68 kDa, 55 kDa, dan 71 kDa.

Karakterisasi protein spasmin dari *Zoothanium arbuscula* dengan menggunakan SDS-PAGE menghasilkan 60% pita (*band*) protein tersebar pada berat molekul sekitar 20 kDa yang kaya akan glicin dan serine tetapi miskin asam amino aromatik dan tidak mempunyai cystin dan methionin (Amos, *et al.*, 1975).

2.3 Elektroforesis SDS-PAGE

Metode elektroforesis sering digunakan untuk karakterisasi protein berdasarkan berat molekul. *Polyacrilamide gel electroforesis* (PAGE) adalah standar metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur subunit dan kemurnian protein. Protein adalah molekul yang bersifat amphoterik karena mengandung kedua grup dengan muatan berlainan yaitu grup karboksil negatif dan grup amino positif. *Isoelectric point* (pI) adalah suatu titik pada protein yang tidak bermuatan listrik (Rantam, 2003).

Istilah elektroforesis menggambarkan migrasi muatan partikel dibawah pengaruh medan listrik. *Electro* berarti energi listrik, *phoresis* berasal dari bahasa Yunani yaitu Phoros yang berarti melintasi (www.chemistry.org, 2005). Jadi, elektroforesis adalah gerakan partikel (koloid) yang bermuatan melalui suatu gel karena pengaruh medan listrik.

Ada dua sistem pada SDS-PAGE yaitu kontinyu (Weber dan Osbon) dan diskontinyu (Laemmli). Pada sistem kontinyu, campuran protein dimasukkan pada bagian atas (*separating gel*), hal ini menyebabkan terjadinya resolusi dengan sampel. Sedangkan pada sistem diskontinyu protein migrasi dengan cepat melalui pelarut ion pada *stacking gel* dan *separating gel*. Protein terkonsentrasi pada garis tipis berupa pita atau band yang tipis (Rantam, 2003).

Pada SDS-PAGE digunakan *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) dan β -merkaptoetanol. SDS merupakan detergen anionik yang bersama dengan β -merkaptoetanol sebagai agen pereduksi, ditambah dengan pemanasan menyebabkan rusaknya struktur tiga dimensi protein. Hal ini disebabkan terpecahnya ikatan disulfida yang selanjutnya tereduksi menjadi gugus sulfhidril.

Medium pendukung ideal untuk elektroforesis adalah bahan kimia inert (tidak bermuatan listrik), mudah ditangani dan mempunyai daya serap yang baik. Medium elektroforesis mempunyai efek langsung dalam pemisahannya. Jika ukuran pori kira-kira sama dengan molekul maka molekul yang lebih kecil akan berpindah lebih bebas dimedan listrik, sedangkan molekul yang lebih besar akan dibatasi dalam migrasinya.

Tiga jenis gel yang umum digunakan adalah kanji, poliakrilamid dan agarosa (Patel *et al.*, 1994). Gel poliakrilamida merupakan medium yang secara kimiawi bersifat inert. Gel ini lebih menguntungkan daripada gel pati karena gel poliakrilamida bersifat transparan sehingga dapat discan memakai sinar tampak ataupun UV. Selain itu, ukuran pori gel poliakrilamida dapat diatur untuk menghasilkan separasi yang lebih baik (Sumitro *dkk.*, 1996).

Awal terjadinya polimerasi pada gel poliakrilamida adalah ketika amonium persulfat $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$ membentuk radikal bebas jika dilarutkan di dalam air kemudian radikal bebas ini bereaksi dengan *acrylamid* sehingga membentuk *acryl* aktif. Molekul *acrylamid* aktif ini bereaksi dengan molekul *acryl* yang lain sehingga akan dihasilkan rantai polimer yang panjang. Pembentukan gel ini memerlukan *bis-acrylamid* sebagai pembentuk ikatan silang (*cross linking agent*) dan dikatalisa oleh N,N,N,N tetramethylethylenediamine (TEMED) (Rantam, 2003).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual

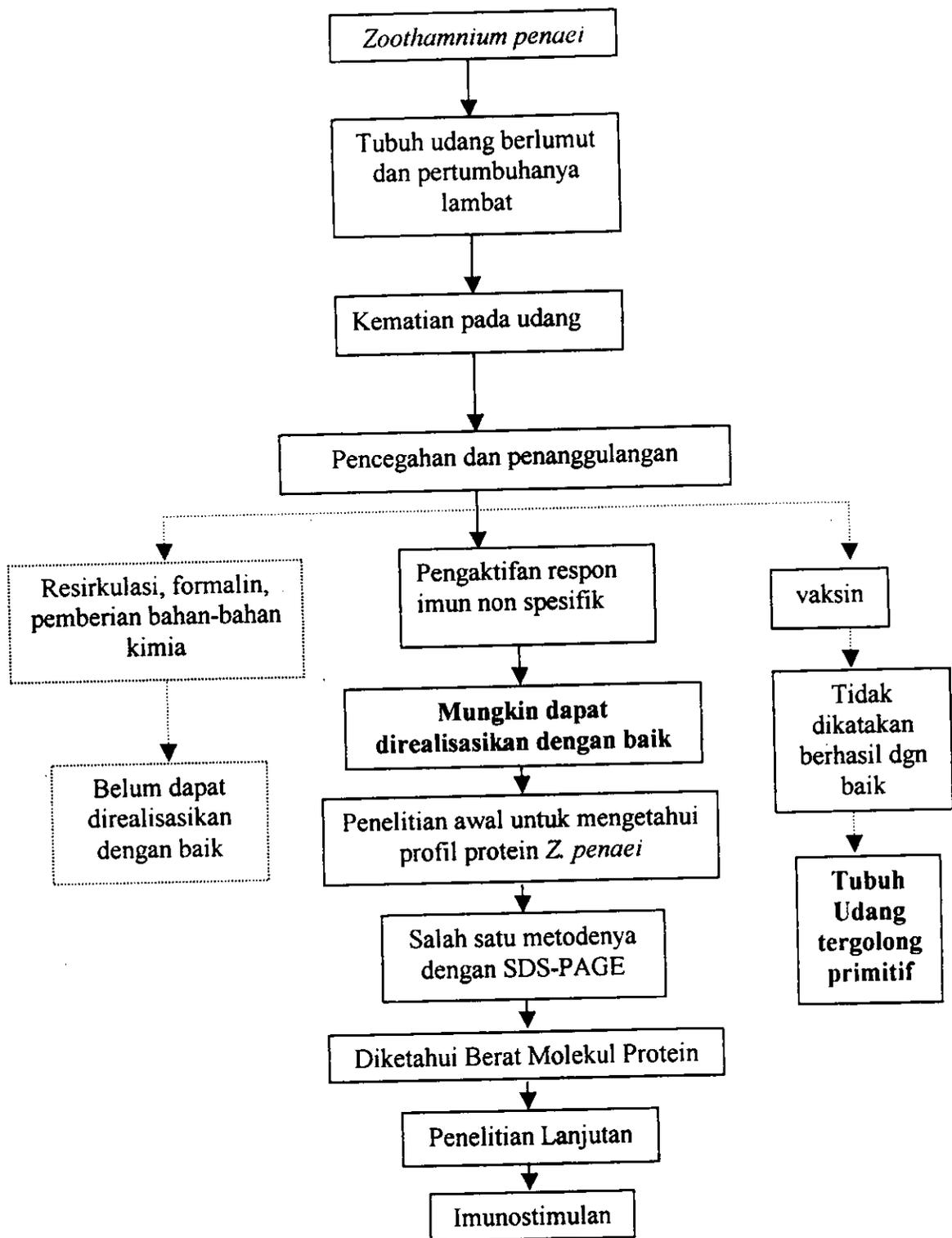
Zoothamnium sp. merupakan jenis ciliata yang menyerang seluruh permukaan tubuh udang, terutama pada insang sehingga dapat menyebabkan terganggunya sistem pernapasan pada udang. Penyakit yang disebabkan oleh parasit ini disebut dengan *ektocommensal fouling disease* karena mengakibatkan penampilan udang tidak menarik. Udag yang terserang penyakit ini tubuhnya berlumut, pertumbuhannya terlambat dan dapat menyebabkan kematian (Chamratchakoll, *et al.*, 1996).

Usaha untuk menghambat ataupun menghentikan zoothamniosis ini sudah banyak dilakukan namun belum satupun cara yang digunakan dapat memenuhi target yang diinginkan. Salah satu cara yang mungkin dapat digunakan dalam menanggulangi penyakit ini adalah dengan meningkatkan ketahanan tubuh udang dengan menggunakan imunostimulan. Vaksinasi pada udang tidak dapat dilakukan karena sistem kekebalan udang tergolong primitif. Sistem kekebalan non spesifik pada udang lebih berperan dari sistem kekebalan spesifiknya sehingga dengan menggunakan immunostimulan organisme lebih tahan terhadap infeksi parasit (Raa, 2000).

Protein merupakan antigen yang baik karena merupakan makromolekul dan mempunyai struktur kimia yang kompleks. Semakin besar molekul antigen maka semakin besar pula sifat antigenitasnya (Tizard, 1988). Diketuainya karakterisasi protein *Zoothamnium penaei* akan dapat menjadi dasar dari penelitian lanjutan.

Oleh karena itu penting untuk dilakukan peneraan dan identifikasi protein, salah satunya dengan menggunakan metode SDS – PAGE (Kusnoto, 2003).

Metode SDS – PAGE dapat mendenaturasikan protein dengan *sodium dodecyl sulphate* dan dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan berat molekulnya dengan cara elektroforesis menggunakan gel *polyacrilamide* (Davis, *et al.*, 1994). Sampel yang digunakan dalam menganalisis protein dengan SDS-PAGE dapat berupa komponen protein seperti *extracellular product*, membran luar protein, dan *whole cell*. Pada penelitian ini protein yang akan dianalisis adalah protein *whole cell* dari *Zoothamnium penaei* untuk diketahui berat molekulnya dengan metode SDS – PAGE.



Gambar 3. Bagan kerangka konseptual penelitian

BAB IV

METODOLOGI

BAB IV

METODOLOGI

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Oktober tahun 2006 sampai dengan Desember 2006 bertempat di Laboratorium Parasitologi Veteriner, Laboratorium Biologi Molekuler Veteriner, Laboratorium Pendidikan Perikanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Surabaya dan Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Bahan penelitian

Unit analisa penelitian ini adalah preparasi protein *Zoothamnium penaei* yang didapatkan dari udang yang terinfeksi berat oleh parasit ini. Untuk mendapatkan parasit tersebut cukup dilakukan *scraping* pada kulit atau carapas udang yang menderita zoothamniosis. Bahan yang digunakan untuk mengisolasi koloni *Zoothamnium penaei* yang didapatkan adalah *aquadest*, dan *phosphate buffer saline* (PBS).

Bahan untuk menganalisis protein dengan metode SDS – PAGE adalah : *butanol*, *polyacrylamide*, *ammonium persulphate*, *tetra methyl diamine* (TEMED), Tris HCL, *sodium dodecyl sulphate*, *methanol*, asam asetat, asam sitrat, *glutaraldehyde*, NaOH, NH₃, AgNO₃, *formaldehyde* dan pewarna gel yaitu *Comassie Brilliant Blue*.

4.2.2 Peralatan penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah mikroskop cahaya, cawan petri, *scalpel* (pisau sectio), tabung reaksi, sentrifuse, *object glass*, hemocitometer, *cover glass*, pipet plastik, mikropipet, inkubator, *electrophoresis equipment* (Bio-Rad), *chamber* untuk *running* SDS-PAGE, pinset, *deep freezer* (4°C), *water bath shaker* (Sibata WS120Japan), *microtube*, dan *tip*.

4.3 Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksploratif yang bersifat deskriptif, bertujuan untuk memaparkan karakter protein *Zoothamnium penaei* berdasarkan berat molekulnya.

4.3.1 Isolasi sampel *Zoothamnium penaei*

Sampel berupa *Zoothamnium penaei* yang digunakan dalam penelitian didapatkan dari tambak udang windu yang terserang zoothamniosis yang berasal dari tambak tradisional di Lamongan.

Udang yang terserang zoothamniosis pertama kali dicuci dengan *aquadest* supaya kotoran yang menempel di tubuh udang hilang kemudian dilakukan *scraping* dengan *scalpel*. Hasil *scraping* diberi *aquadest* secukupnya kemudian disentrifuse dua kali untuk memisahkan sel *zoothamnium* dan memecah koloninya yaitu dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit kemudian diambil endapannya dan ditambah *aquadest* lagi lalu disentrifuse kembali hingga memadat

dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya pellet yang dihasilkan disimpan di dalam *freezer* 4°C.

4.3.2 Isolasi protein *Zoothamnium penaei* tanpa divortex terlebih dahulu

Pellet *Zoothamnium penaei* yang diperoleh dari isolasi diambil 1 mililiter, dan disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 1 jam. Supernatan dibuang dan pellet ditambah PBS 10 % dengan perbandingan 1:1 lalu dianalisis dengan elektroforesis SDS-PAGE.

4.3.3 Isolasi protein *Zoothamnium penaei* dengan divortex terlebih dahulu

Pellet *Zoothamnium penaei* disentrifus 4000 rpm selama 1 jam kemudian diambil pelletnya dan ditambah PBS 10% dengan perbandingan 1:1 dan sebelum dianalisis, terlebih dahulu sampel divortex supaya terbentuk *whole* protein yang diharapkan. Vortex sampel dilakukan dengan suhu sampel tetap sekitar 4°C yaitu dengan direndam dalam es batu kemudian divortex selama ±15 detik dan direndam lagi. Hal ini dilakukan berulang-ulang selama 5 menit hingga terbentuk dua lapisan pada sampel, selanjutnya supernatan diambil untuk dianalisis dengan metode SDS-PAGE .

4.3.4 Analisis dengan metode elektroforesis SDS-PAGE

Analisis protein *Zoothamnium penaei* dilakukan dengan teknik SDS-PAGE dengan komposisi *separating gel* 12,5 % dan *stacking gel* 5% (pembuatannya dapat dilihat dalam Lampiran 4). Sebelum dilakukan *running* dilakukan persiapan gel (Lampiran 2). Isolat protein yang didapat *dirunning* dengan arus listrik sebesar

30 mA 600 volt selama dua sampai tiga jam, adapun proses *running* dapat dilihat dalam Lampiran 3. Sebagai marker, digunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 6,5 – 212 kDa (*NEW ENGLAND Bio-Labs*). Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda $\pm 0,5$ cm dari batas bawah plate gel.

Perlakuan setelah *running*, gel hasil *running* direndam dalam larutan *staining* (Lampiran 4) sambil digoyang selama 30 menit untuk pewarnaan gel. Kemudian dicuci dengan 150 mL asam asetat dan direndam dalam larutan *destaining* (Lampiran 4) selama 30 menit sambil digoyang. Selanjutnya dicuci dengan asam asetat sampai bening dan dilanjutkan dengan air. Perlakuan di atas menggunakan penggoyang otomatis (*shaker*).

Cara pembacaan hasil SDS-PAGE, menurut Rantam, (2003) berat molekul protein dapat dicari dengan menghitung nilai Rf (*Retardation Factor*) dari masing-masing pita dengan rumus :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Kemudian nilai Rf dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier, dengan rumus

$$Y = a + bX$$

Keterangan : Y = berat molekul

X = nilai Rf sampel

Menurut laemmli (1970) nilai berat molekul protein standart seperti pada

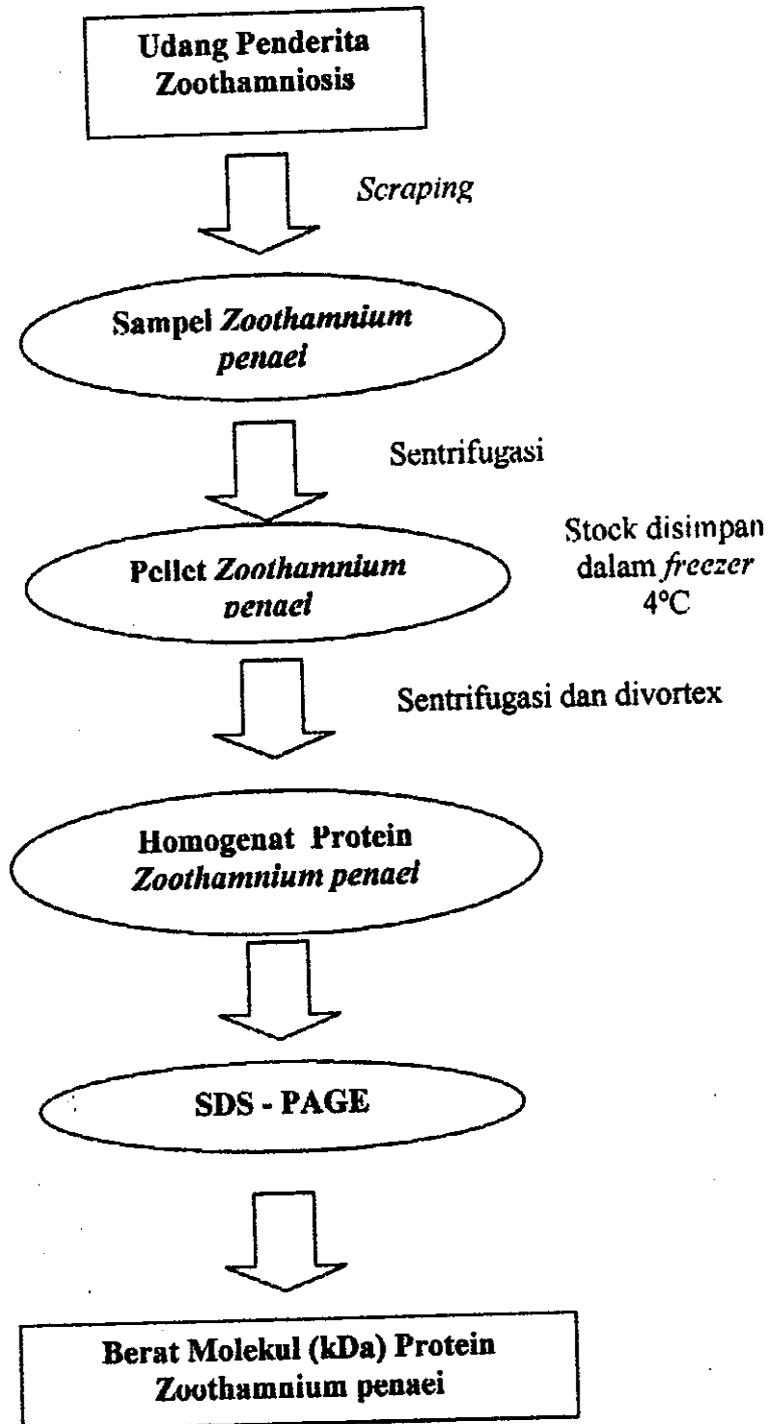
Tabel 1.

Tabel 1. Nilai protein standart

PROTEIN STANDART	BM (kDa)
Myosin	212
MBP- β -galactosidase	158,194
β -galactosidase	116,351
Phosphorilase	97,184
Serum albumin	66,409
Glutamic dehidrogenase	55,561
Maltose-binding protein	42,710
Thioredoxin reductase	34,622
Triosephosphate isomerase	26,972
Trypsin inhibitor	20
Lysozyme	14,313
Aprotinin	6,517

Sumber : Bio-Lab (P7702S)

Kerangka operasional penelitian



Gambar 4. Bagan kerangka operasional penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Isolasi *Zoothamnium penaei*

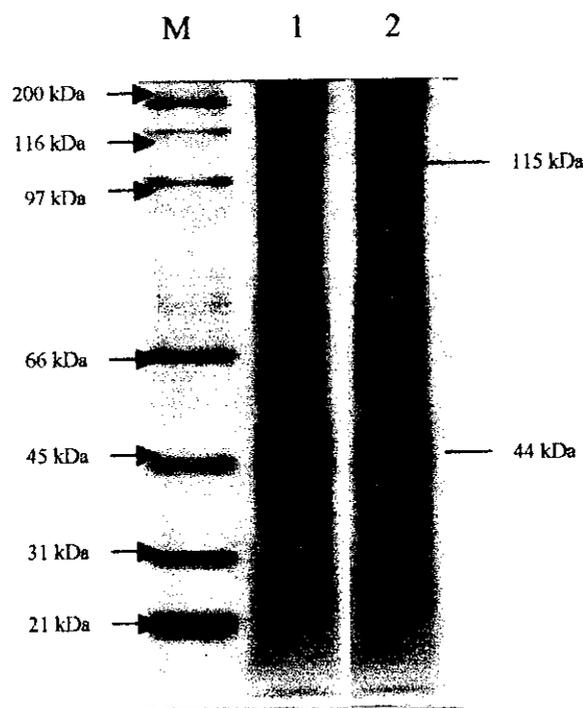
Pada penelitian ini sampel *Zoothamnium penaei* diperoleh dari tambak pembesaran udang windu di daerah Lamongan, yang banyak terserang penyakit zoothamniosis. Udang windu yang terserang penyakit ini tubuhnya akan terselimuti oleh *Zoothamnium penaei*, dan udang terlihat seperti memakai jaket. Koleksi *Zoothamnium penaei* ini dilakukan dengan diskraping pada bagian tubuh udang yang banyak terserang oleh zoothamnium, seperti bagian ekor, kepala (rostrum) dan badan udang (abdomen). Dalam penelitian ini tidak memanfaatkan zoothamnium yang menyerang udang di bagian insang, kaki renang dan kaki jalan. Hasil koleksi dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Koloni *Zoothamnium penaei*

5.2 Identifikasi Protein *Zoothamnium penaei*

Hasil *running* sampel yang tanpa divortex terlebih dahulu menunjukkan hasil yang kurang bagus dan terlihat seperti *smear* (Gambar 6). Selain itu hasil *running* dengan sampel ini tidak menunjukkan ekspresi protein yang baik dan hanya diperoleh dua pita protein.

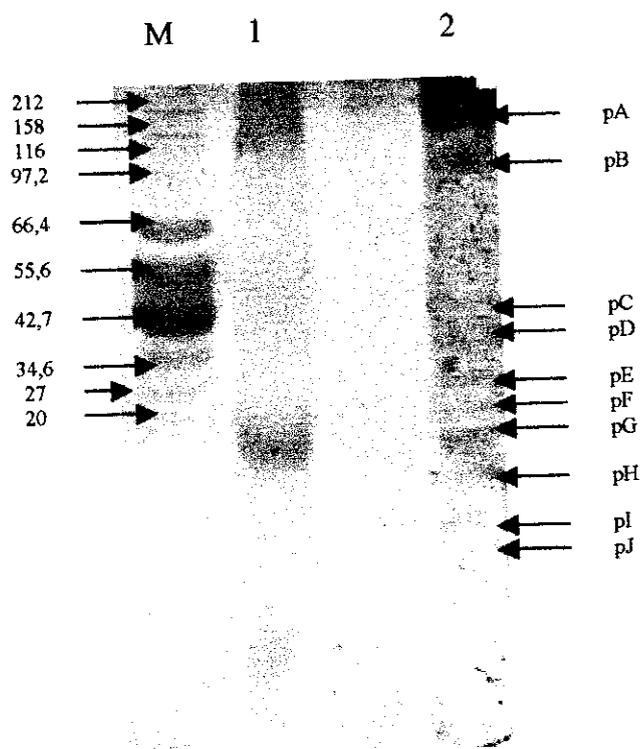


Gambar 6. Gel hasil running dengan sampel tanpa divortex terlebih dahulu

Keterangan : M = Marker

1&2 = *whole protein Zoothamnium penaei* tanpa divortex

Hasil analisis protein dengan elektroforesis SDS-PAGE yang menggunakan sampel dengan divortex terlebih dahulu dapat dilihat pada Gambar 7. Hasil preparasi sampel protein dengan atau tanpa divortex terlebih dahulu, terdapat perbedaan ekspresi protein pada gel hasil *running*.



Gambar 7. Hasil analisis protein *Zoothamnium penaei* dengan teknik SDS-PAGE.

Keterangan :M = marker; Kolom 1 = protein membran *Zoothamnium penaei*; 2 = *whole protein Zoothamnium penaei*

Gambar 7 yaitu sumuran nomor satu adalah ekspresi protein membran *Zoothamnium penaei* yang hanya keluar tiga pita protein. Ini berbeda dengan ekspresi *whole protein* dari *Zoothamnium penaei* yang ditunjukkan di sumuran nomer dua yang muncul sepuluh pita protein yang lebih banyak dari protein membran dan di dalam *whole protein* terdapat beberapa kesamaan pita protein yang terbentuk pada protein membran, yaitu pita protein pA, pC dan pG.

Berat molekul protein dihitung dengan menggunakan regresi linier. Perhitungan pertama dilakukan pada marker dengan cara mencari nilai $R_f(x)$. Nilai R_f diperoleh dari perbandingan antara jarak (jarak pergerakan protein dari tempat awal hingga terbentuknya pita) dengan panjang gel. Hasil perhitungan R_f

pada protein marker dapat dilihat pada Tabel 2. Hubungan linier antara Rf (x) dengan log BM menggunakan persamaan regresi linier.

Tabel 2. Nilai Rf (x) dan Log BM marker

Jarak	Rf	BM (kDa)	Log BM
3	0,0428	212	2,3263
6	0,0857	158	2,1986
7	0,1	116	2,0644
10	0,1428	97,2	1,9876
15	0,2143	66,4	1,8221
19	0,2714	55,5	1,7443
23	0,3286	42,7	1,6304
28	0,4	34,6	1,5391
31,5	0,45	27	1,4314
34	0,4857	20	1,3010

Keterangan

- Panjang Gel = 70 mm
- Satuan jarak = mm

Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh persamaan regresi linier yang diperoleh dari marker yaitu : $y = 2,3313 - 2,0893x$. Setiap titik (xy) mempunyai koordinat x (absis) dan koordinat y (ordinat) yang mana nilai-nilainya memenuhi persamaan $y = 2,3313 - 2,0893x$ (Lampiran 1).

Gambar 7 menunjukkan hasil preparasi protein dipaparkan pita-pita protein berturut turut dari atas ke bawah adalah protein pA, pB, pC, pD, pE, pF, pG, pH, pI dan pJ. Berat molekul masing-masing protein tersebut dapat diketahui melalui persamaan regresi linier. Caranya adalah dengan memasukkan nilai Rf pada persamaan regresi linier maka nilai Y yaitu log BM dari protein Zoothamnium yang dapat diketahui dan anti log BM merupakan BM dari protein tersebut.

Protein pA terletak antara protein marker dengan BM 116 – 212 kDa sesuai perhitungan menggunakan regresi linier, pA diperkirakan mempunyai BM 163 kDa. Protein pB yang terletak antara marker dengan BM 97 – 116 kDa, diperkirakan pada BM 115,5 kDa. Protein pC yang berada diantara marker 42 – 55 kDa, diperkirakan memiliki BM 44 kDa. Protein pD yang terletak diantara marker 34 – 42,7 kDa, diperkirakan memiliki BM 35,5 kDa. Protein pE dan pF yang terletak pada marker 20 – 27 kDa, yang diperkirakan masing – masing pada BM 25,4 kDa dan 20,4 kDa. Dan dibawahnya lagi terdapat empat pita protein yang terletak dibawah protein marker dengan BM 20 kDa, diperkirakan masing – masing yaitu pG = 18 kDa, pH = 13,7, pI = 10 kDa dan pJ = 8 kDa (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil analisis protein *Zoothamnium penaei* berdasarkan berat molekul (BM)

Protein	Jarak pada gel (mm)	Nilai Rf	Y kDa (dari regresi linier)	Antilog (kDa)
A	4	0,0571	2,212	163
B	9	0,1285	2,0626	115,5
C	23	0,3286	1,6448	44
D	26	0,3714	0,7759	35,5
E	31	0,4428	1,4062	25,4
F	34	0,4857	1,3165	20,4
G	36	0,5143	1,2568	18
H	40	0,5714	1,1375	13,7
I	44,5	0,6357	1,0031	10
J	47,5	0,6786	0,9135	8

Keterangan :

Panjang gel = 70 mm

Persamaan regresi : $y = 2,3313 - 2,0893x$

5.3 Pembahasan

Koleksi *Zoothamnium penaei* ini diambil dari bagian tubuh udang yang banyak terserang oleh zoothamnium, seperti bagian ekor, kepala (rostrum) dan badan udang (abdomen). Menurut Itabashi *et al.*, (2003), koloni zoothamnium dapat diperoleh dari tubuh udang yang banyak terserang oleh parasit ini. Menurut Raya (2005), zoothamnium ini banyak menyerang permukaan tubuh udang windu, seperti chepalotorax, abdomen, kaki jalan, kaki renang, ekor dan insang. Dalam penelitian ini tidak memanfaatkan zoothamnium yang menyerang udang di bagian insang, kaki renang dan kaki jalan, karena bagian ini mudah patah bila diskraping dan dapat mengkontaminasi sampel zoothamnium yang di dapat.

Pada penelitian ini, sampel protein zoothamnium diperoleh dengan melakukan pemecahan sel secara fisik, yaitu dengan sentrifus yang cukup lama. Menurut Sumitro *dkk.*, (1996), teknik untuk memisahkan bagian sel dapat menggunakan cara mekanis yaitu dengan sentrifugasi dan untuk memecah dan mengeluarkan protein dari bagian sel dapat menggunakan alat vortex.

Menurut Sumitro, *dkk.*, (1996) tidak satupun prosedur tunggal yang dapat digunakan untuk mengisolasi suatu protein secara murni, tetapi proses pemurnian ini memerlukan suatu rangkaian prosedur yang masing-masing dapat membedakan antara protein dengan karakteristik struktur dan fungsi yang spesifik karena perbedaan struktural dan fungsional diantara protein-protein yang ada merupakan suatu urutan kerja yang ideal belum tentu memberikan keberhasilan yang sama untuk protein yang lain. Oleh karena itu dalam penerapan prosedur tidaklah terdapat urutan atau tata cara yang standar untuk memperoleh kemurnian protein yang optimal.

Identifikasi karakter protein *Zoothamnium penaei* berdasarkan berat molekulnya dengan preparasi protein struktural menggunakan teknik SDS-PAGE. Untuk mendapatkan berat molekul yang tepat digunakan marker protein yang berkisar antara 6 – 212 kDa. Menurut Sahrial *dkk.*, (2001), SDS-PAGE merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi fraksi protein berdasarkan berat molekulnya. Prinsip dasar metode ini adalah denaturasi protein oleh *sodium dodecyl sulphate* dan dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan berat molekulnya dengan elektroforesis yang menggunakan gel. Metode ini dapat mengikat atau mendeteksi protein berdasarkan berat molekulnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu.

Perbedaan karakter protein pada sumuran satu dan dua dapat dilihat pada Gambar 7. Sumuran ke dua adalah karakter *whole protein* dari *Zoothamnium penaei* yang jumlah pita proteinnya lebih banyak dari pita protein membran yang terdapat pada sumuran satu. Kemungkinan hal ini disebabkan *whole protein* merupakan protein keseluruhan sehingga pita protein yang terbentuk pada gel lebih banyak dari protein membran.

Perbedaan hasil *running* tampak pada sampel yang divortex terlebih dahulu (Gambar 7) dengan yang tidak divortex (Gambar 6). Sampel yang diambil supernatannya (divortex terlebih dahulu) menghasilkan isolat protein yang lebih murni sehingga pita protein yang dihasilkan lebih banyak. Kurang jelasnya ekspresi protein dari hasil *running* ini disebabkan karena konsentrasi dari *whole protein Zoothamnium penaei* ini kurang banyak. Untuk mendapatkan protein keseluruhan dari sel dengan divortex dapat mempengaruhi hasil separasi protein dengan SDS-PAGE. Berbeda dengan *running* sampel yang tanpa divortex terlebih

dahulu menunjukkan hasil yang kurang bagus (*smear*) (Gambar 6). Hal ini disebabkan protein yang didapat belum seluruhnya keluar dari sel dan masih banyak kontaminan dari pecahan-pecahan sel. Pada sampel yang belum divortex, isolat protein dari *mikrotube* sulit untuk diambil dengan mikro pipet karena masih terdapat serat-serat dari organ tubuh *zoothamnium*. Selain itu hasil running dengan sampel ini tidak menunjukkan hasil separasi protein yang baik dan jumlah pita protein atau band yang didapat lebih sedikit dari sampel yang divortex terlebih dahulu. Menurut Kusnoto (2003) bahwa keberhasilan preparasi protein dengan SDS-PAGE dipengaruhi tingkat kebersihan (tidak terkontaminasi) isolat serta konsentrasi protein yang cukup. Konsentrasi protein homogenat akan mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada proses analisis dan pembentukan pita protein yang lebih cepat, sedangkan kebersihan isolat akan menghasilkan kualitas pita protein yang baik. Pita yang terlihat tajam dan jelas dengan gel yang terang dapat mempermudah analisis berat molekul pada pita protein.

Hasil karakterisasi protein *Zoothamnium penaei* pada penelitian ini didapatkan sepuluh fraksi protein berturut-turut dari atas ke bawah adalah protein pA, pB, pC, pD, pE, pF, pG, pH, pI dan pJ. Dimana protein-protein tersebut diperkirakan mempunyai berat molekul masing-masing 163 kDa, 115,5 kDa, 44 kDa, 35,5 kDa, 25,4 kDa, 20,4 kDa, 18 kDa, 13,7 kDa, 10 kDa dan 8 kDa. Dari sepuluh jenis protein tersebut protein pB dan pG terlihat lebih tebal diantara protein yang lain dan juga pita protein ini muncul pada karakter protein membran yang dianalisis. Menurut Tung *et al.*, (1995) kejelasan dalam pita protein dalam gel dipengaruhi oleh konsentrasi protein yang digunakan.

Hasil penelitian ini hampir sama dengan penelitian lain yang menyatakan bahwa dalam protein spasmonema pada *Zoothamnium arbuscula* mempunyai berat molekul 19,6 kDa (Itabashi *et al.*, 2003). Begitu juga dengan pernyataan Amos *et al.*, (1975) bahwa analisis protein dengan SDS-PAGE yang memanfaatkan protein spasmonema menghasilkan 60 % pita protein tersebar pada berat molekul sekitar 20 kDa. Berat molekul ini hampir sama dengan berat molekul yang dihasilkan dari penelitian ini yaitu protein dengan berat molekul 20,4 kDa dan 18 kDa pada sampel protein yang divortex terlebih dahulu. Persamaan genus *Zoothamnium* ini memungkinkan adanya persamaan berat molekul proteinnya. Menurut Kusnoto (2003), beberapa pita protein yang memiliki perbedaan dengan penelitian lain kemungkinan karena perbedaan relatif dalam menentukan jarak protein maupun panjang dan awal pengukuran gel untuk perhitungan dengan regresi linier.

Kesepuluh pita protein antigen hasil fraksinasi di atas mungkin memiliki daya antigenitas yang berbeda, Tizard (1988) menyatakan bahwa salah satu faktor yang menentukan antigenitas suatu zat adalah besarnya suatu molekul protein. Molekul yang mempunyai berat molekul besar lebih antigenik dibandingkan dengan berat molekul yang kecil walaupun antigenitas juga ditentukan dari kompleksitas fisikokimiawi suatu zat.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil preparasi protein *Zoothamnium penaei* dengan metode SDS-PAGE didapatkan 10 fraksi protein dengan berat molekul (BM) yaitu 163 kDa, 115,5 kDa, 44 kDa, 35,5 kDa, 25,4 kDa, 20,4 kDa, 18 kDa, 13,7 kDa, 10 kDa dan 8 kDa. Dari semua fraksi protein yang muncul, protein dengan BM 115,5 kDa dan 18 kDa terlihat lebih dominan diantara pita protein yang lain.

6.2 Saran

Dari kesepuluh pita protein tersebut perlu dilanjutkan dengan immunoblotting untuk mengetahui protein spesifik *Zoothamnium penaei* yang bersifat antigenik.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Amos, W.B, L.M. Routledge, FF. Yew. 1975. Calcium-binding protein in avorticellid contractile organelle. *Journal of cell science*. Vol.19. Issue 203-213. Company of biologists.
- Asian Shrimp News*. 1996. Common Diseases Found in Cultured Shrimp in Thailand, ASCC News. Issue 1-5 : 103-112
- Baratawidjaja, K. G. 2000. *Imunologi Dasar*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Chamratchakool, P. 1996. Health Management in Shrimp Ponds. *Health Research Institut*. Bangkok. Thailand. PP. 50-53
- Davis, L.,M, Kuehl dan Batley, 1994. *Basic Molecular in Biology*. Appleton And Lange Press Connecticut. Hal. 616-689
- Debauffer, P. J. and H.E. Buhse, Jr. 1998. A Possible Mechanism For Initiating Stalked Zooid to Telotroch Transformation in Vorticella. *Proceeding of the 51st Annual Meeting of The Society of Protozoologist*. August.
- Itabashi, T, Terasaki dan H, Asai, 2003. Characterization of the Spasmin 1 gene in *Zoothamnium arbuscula* strain Kawagoe (protozoa, ciliophora) and its relation to other spasmins and centrins. *Miyagi University of Education and Waseda University*. Japan. 361-367.
- Itami. T, 1994. Body Defense System of Penaeid Shrimp, Seminar on Fish Physiology and Prevention of Epizootics. *Departement of Aquaculture and Biology*. Shimonoseki University Of Fisheries. Japan. 7:59-65.
- Ji, D and Weibo S. 1986. Notes On a New Marine Peritrichous Cillite (ciliophora : Peritrichida). With Reconsideration Of *Zoothamnium Maximum* Song. *Acta Protozool*. 43 : 61-71
- Kusnoto. 2003. *Isolasi & Karakterisasi Protein Immunologi Larva Stadium II Toxocara cati Isolat Local*. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Hal. 3 : 11-13 :14
- Laemmli, U.K. 1970. Protein Marker. Broad range (Premixed Format). *Nature* 227, 680
- Lightner, D. V. 1998. Prevalence and Geographic Distribution of MBV and Other Diseases in Cultured Giant Tiger Prawns (*Penaeus monodon*) in the Philipines. *The Oceanic Institute*. Honolulu. Hawaii.

- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S.C. Zapusky, P. Matsudaria dan Darnel. 1995. *Molecular Biology*. 3th Edition. Scientific American Book. New York.
- Lom, S. and Dykova, I. 1992. *Protozoa Parasites of Fishes*. Amsterdam. London. New York. Tokyo. P. 315.
- Mahasri, G. 1998. Hubungan Infestasi Cilliata Patogen Pada Udang Windu Pada Padat Tebar Dan Aerasi Yang Berbeda, Media Kedokteran Hewan. FKH Unair. Surabaya
- Mahasri, G. 2000. Peningkatan Kualitas Dan Kuantitas Udang Windu Melalui Budidaya Semi Intensif Dengan Petak Biofilter. Fakultas Kedokteran Hewan. UNAIR. Surabaya
- Mahasri, G, Kismiyati & P. Hastutik, 2003. Kemampuan Ikan Bandeng Sebagai Filter Biologis Dalam Menekan Munculnya Cilliata Patogen Pada Budidaya Udang Windu (*Penaeus monodon* fab.) di tambak. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya
- Martin, S. W., A.H. Mech and P. Willeborg. 1997. *Veterinary Epidemiologi, primadles and methode*. Lova state university press. Hal 10-16.
- Patel, D., Willey, J. and Sons. 1994. *Gel Elektrophoresis. Inc.*. New York. pp. 12
- Pelezar. M. J, E. S. C. Chan and N. R. Krieg, 1986. *Microbiology*, 5th Ed. PP. 687-702, Mc Graw Hiel Book Company
- Raa, J, 2000. The Use Of Immunostimulant in Fish and Shellfish Feeds. In : LE. Cruz Suarez. D. Richie-Marie. M Tapia-salazar. MA.Olver-Novoa. R. Civeracerecedo. (Eds). *Avends en Nutricion Acuicola*. Merid. Yucatan. Mexico : 47-54.
- Rantam, F. A. 2003. *Metode Imunologi*. Airlangga University Press. Surabaya
- Raya, L. 2005. Gambaran Patologi Insang dan Kulit Udang Windu (*Paneus monodon* Fab.) yang Treserang Cilliata Patogen dari *Vorticella* (*Zoothamnium* sp.). Skripsi. Program Studi S-1 Budidaya Perairan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Robert, G.P.S and James, H.T. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik*. 2nd Terjemahan. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta 289-300.
- Rosati, R, 1994. *Indonesia Shrimp Industri Status And Development Project*. Jakarta:Puslitbang Perikanan.

- Rukyani, A, 1996. Jenis Penyakit Udang di Tambak dan Cara Pengendaliannya. Makalah Pertemuan Aplikasi Paket Teknologi Pertanian. tgl 9 - 11 Januari di BIP Lampung.
- Sahrial, I., Rantam, F.A dan D. Prijatna, Y. 2001. Identifikasi Varian Antigenik *Trypanosoma evansi* Hasil Isolasi dari Mencit Fase Akut dan Kronik. Media Kedokteran Hewan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya Hal 62.
- Salfira, 1998. Pengaruh Pemberian LPS (lipopolisakarida) dari Dinding Sel Bakteri *Vibrio Harvey* Terhadap Gambaran Sistem Kekebalan non Spesifik pada Udang Windu. Thesis. Institut Pertanian Bogor. 42 halaman.
- Sumitro, B.S., Rahayu, Fatchiyah dan S. Widyarti. 1996. Materi Kursus Teknik-teknik Dasar Analisa Protein dan DNA. Jurusan Biologi. FMIPA. Unibraw. Malang. Hal 25-26.
- Sumawidjaja, 1991. Penyakit Benih Udang Windu (*Penaeus monodon*. fab.), Makalah Seminar Hasil-hasil Penelitian, Institut Pertanian Bogor. 7 April. 8 hal.
- Tizard, I.R. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner (Terjemahan). Airlangga University Press. Surabaya.
- Tonguthai, K.. 1991. Disease Of the Freshwater Prawn. *Macrobranchium rosenbergii*. AAHRI News Letter Artikel. Vol 4 No 2. Deumber. Bangkok. Thailand.
- Tung, Y.C., Chang S.f., Ko, Y.C., Chen H.Y and Lind, K.H. 1995. Comparison of The Genetic Variation In Type I Dengue Virus Isolates In Taiwan 1987-1992. Kaoshing J.Med. Sci. 11; 243-249.
- Utz, LRP, DW Coat and EB Small. 2002. Induction Of Teleotroch Formation In the Peritrich Epibionts *Zoothamnium* sp. Journal Of Eukariotic Microbiology. 145:263-270
- Venkatesen, V. Bose, And SVC. Srinivasan. 1995. Transport on the Infestation of Peritrich Ciliate *Zoothamnium* sp. and *Epistylis* sp. on Pond Natural Toger Prawn. J. In land Fish Soc., India. 2 (13) : 107-109.
- Wongsosupantio. S. 1990. Pedoman Kuliah Elektroforesis Gel Protein. Pusat Antar Universitas-Bioteknologi UGM. Yogyakarta
- Woo, P. T. K. and D. W Bruno. 1999. Fish Disease & Disorders vol. 3 viral, bacterial & fungal infection. CABI PUBLISHING. New york
- www. Digisys.net. 2004. peritechs and hydras lake Erie Avon Point Ohio. <http://www.Digisi.net/lakeriekosistem/PERITECHS.html>. 8 p.

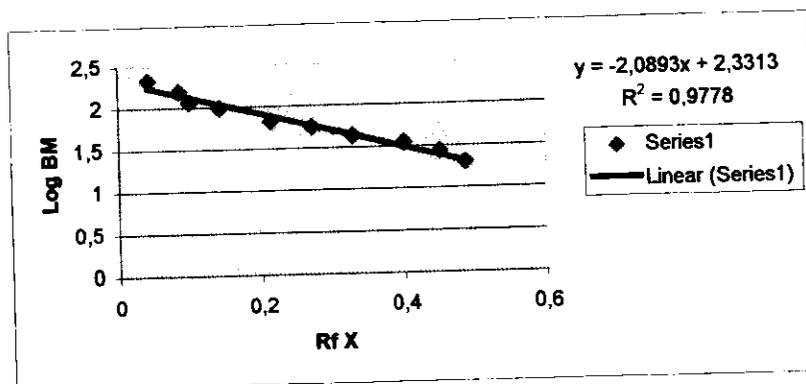
www.chemistry.org. 2005. What Is Gel Elektrophoresis?.

Xiaozhong Hu And Weibo Song. 2000. Description Of Zoothamnium chlamydis sp. (Protoa: Ciliophora: Peritrichida). An Ectommenseal Peritrichous Cilliate From Culture Scallop In North China. Laboratory of Protozooloy. KLM. Ocean. Qingdao. University Of Qingdao.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Kurva Regresi Linier dan Perhitungan Berat Molekul

A. Kurva Regresi Linier



Gambar 1. Bentuk hubungan antara nilai Rf dan Log BM pada marker

B. Perhitungan Berat Molekul Protein

Berdasarkan persamaan regresi linier :

$$Y = aX + b$$

$$a = -2,0893$$

$$b = 2,3313$$

Maka:

$$Y = -2,0893x + 2,3313$$

Perhitungan berat molekul protein dengan mengukur harga Rf dari masing-masing sampel dengan mengkonversikan dalam persamaan regresi linier.

$$\begin{aligned} \text{Misal nilai Rf} &= \frac{\text{Jarak pergerakan pita dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}} \\ &= \frac{4}{70} \\ &= 0,0571 \end{aligned}$$

Maka dikonversikan dalam persamaan

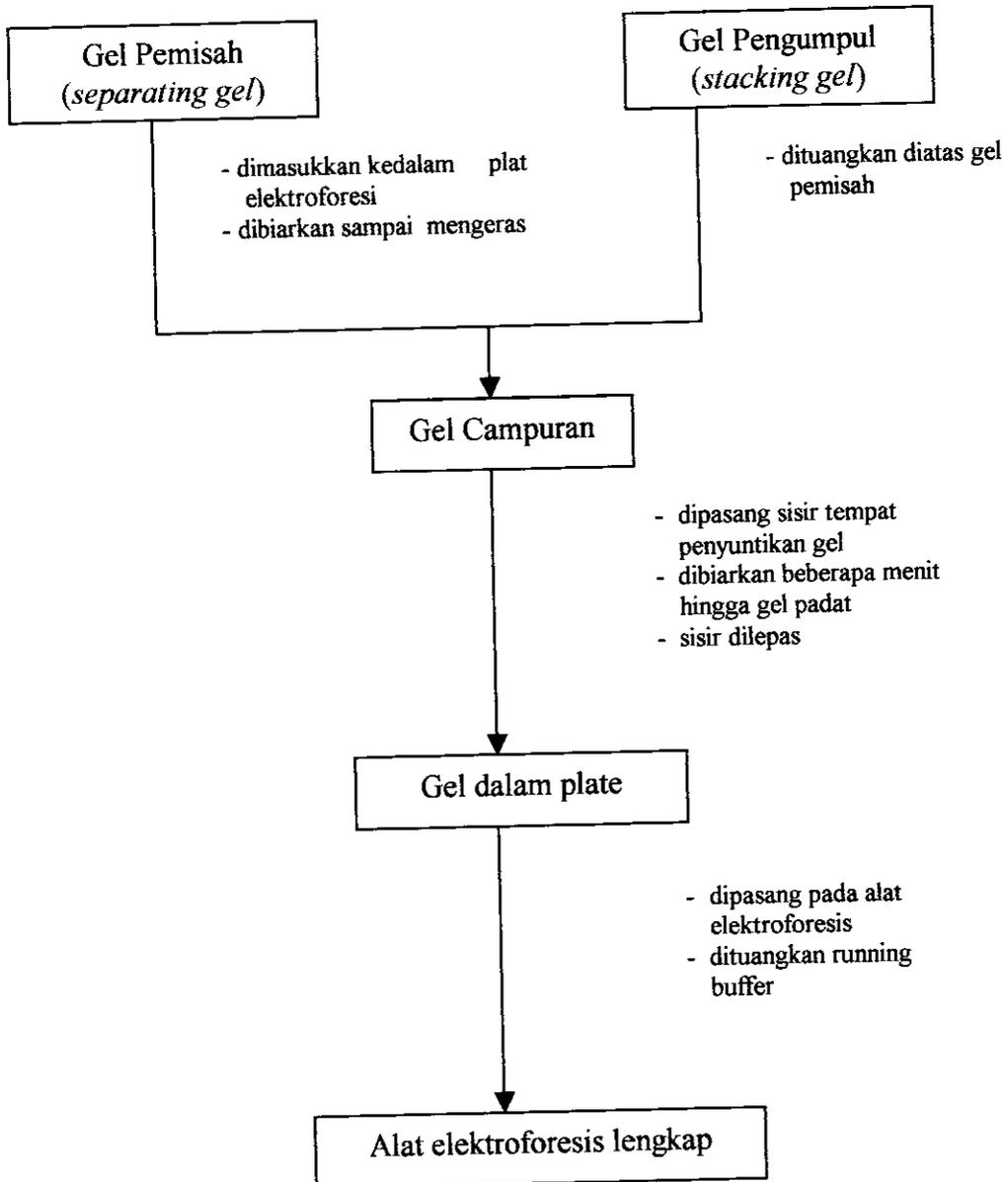
$$Y = aX + b$$

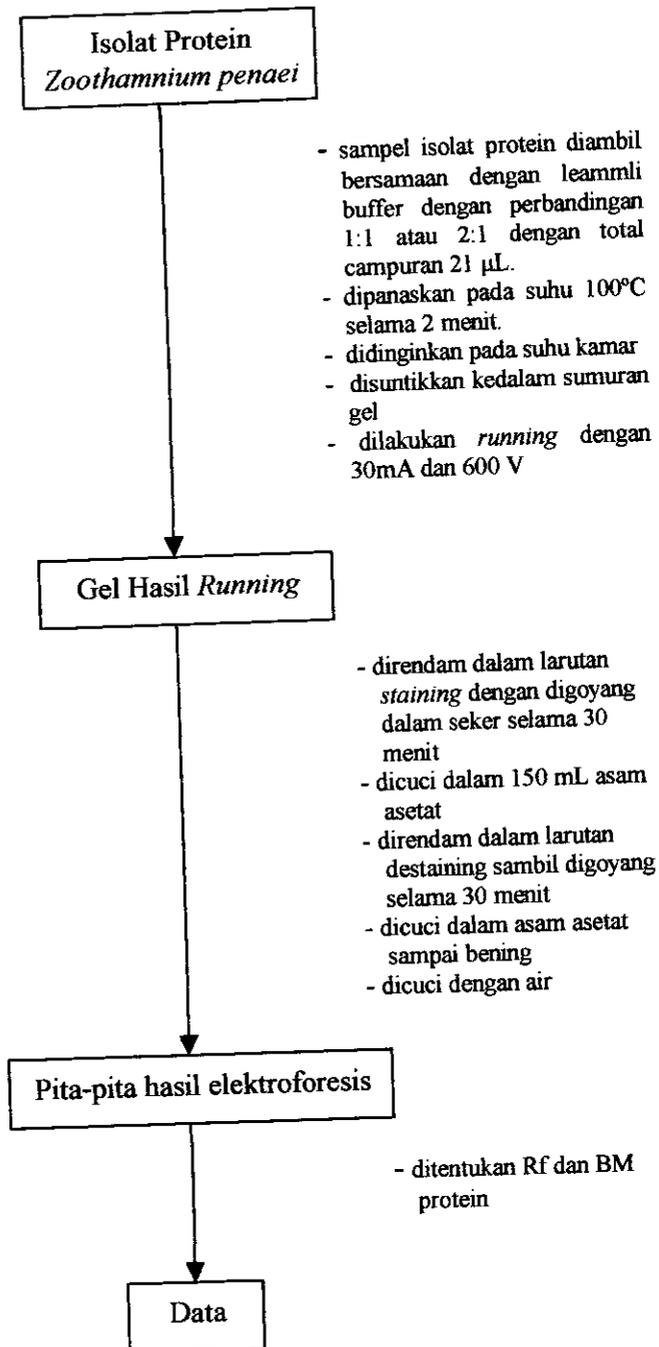
$$Y = -2,0893 (0,0571) + 2,3313$$

$$= 2,212$$

$$\begin{aligned} \text{Jadi berat molekul protein} &= \text{anti log } 2,212 \\ &= 163 \text{ kDa} \end{aligned}$$

Lampiran 2. Persiapan Gel



Lampiran 3. Diagram Alur *Running*

Lampiran 4. Pembuatan Reagensia

a. *Separating gel*

2,5 ml *acrylamide* 30% + 0,8% *bis-acrylamide* ; 1, ml Tris-HCL pH 8,8; 1,2 ml SDS 0,5%; 1,1 ml *aquadest*; 5 μ l TEMED dan 30 μ l APS 10%

b. *Stacking gel*

0,3 ml *acrylamide* 30% + 0,8% *bis-acrylamide*; 0,4 ml 0,625 M Tris-HCL pH 6,8; 0,4 ml SDS 0,5%; 0,87 ml *aquadest*; 2 μ l TEMED dan 10 μ l APS 10%

c. *Running sample buffer*

2 ml 0,625 M Tris-HCL pH 6,8 ; 5 ml *glycerol*; 0,2 g SDS; 0,5 ml *bromofenolblue* 0,5%; 0,5 ml β -*mercaptoetanol*; 2,4 ml *aquadest*

d. *Elektroforesis buffer*

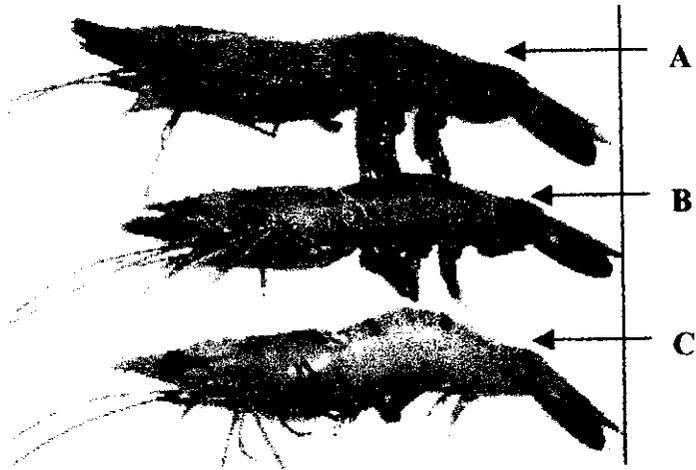
30,29 g *Trisaminomethan* ; 144,13 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml *aquadest*

e. *Staining (pewarna)*

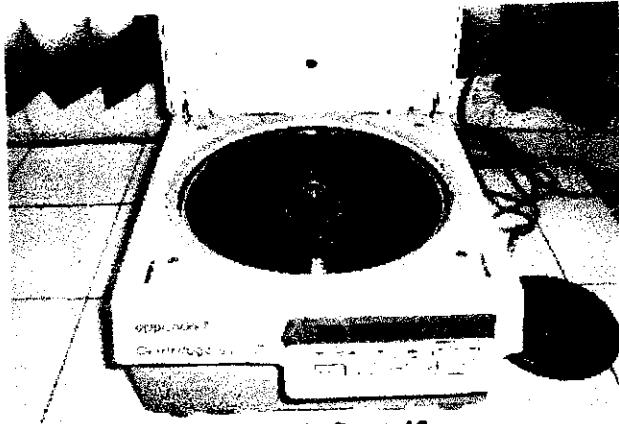
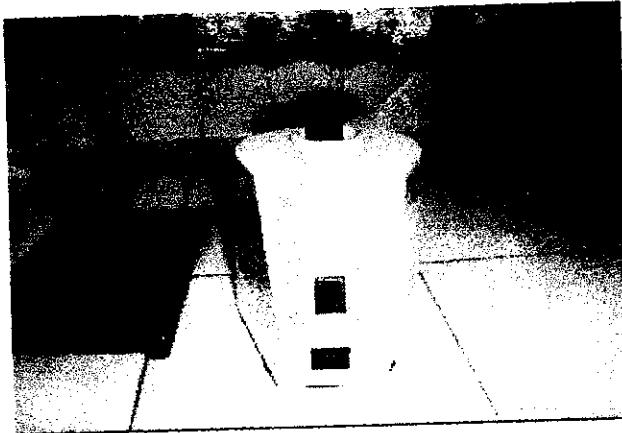
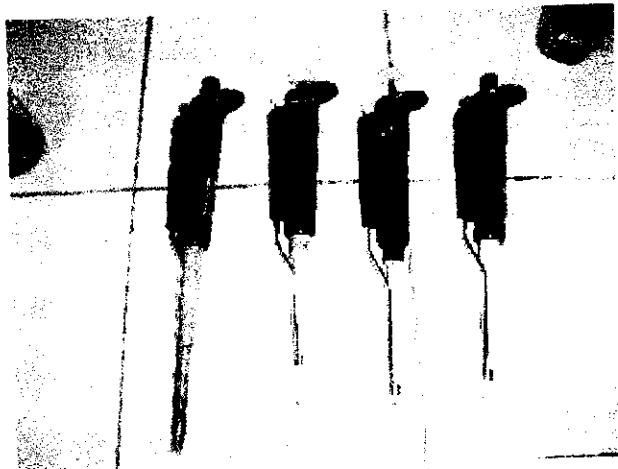
0,25 g *Comassie Brilliant Blue R-250*, 45,4 ml metanol dan 9,2 ml asam asetat kemudian ditambah *aquades* sampai volume 100 ml

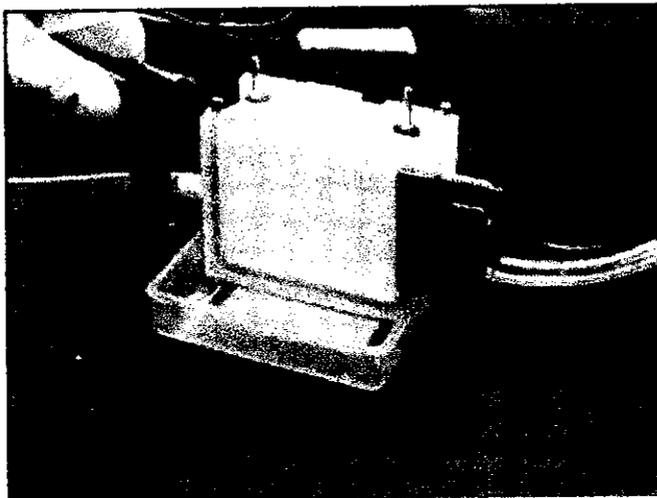
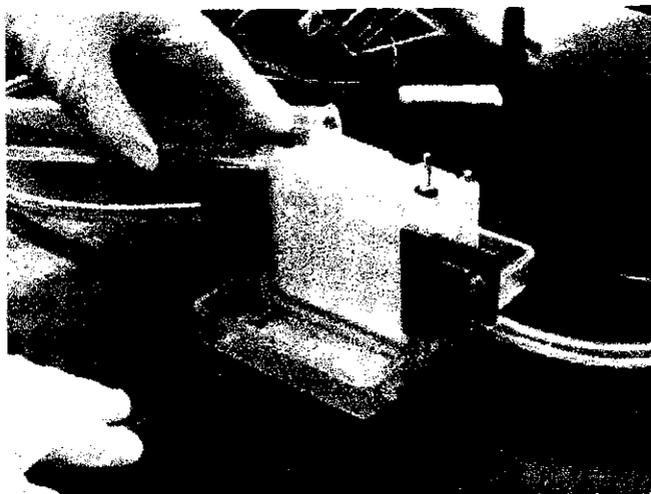
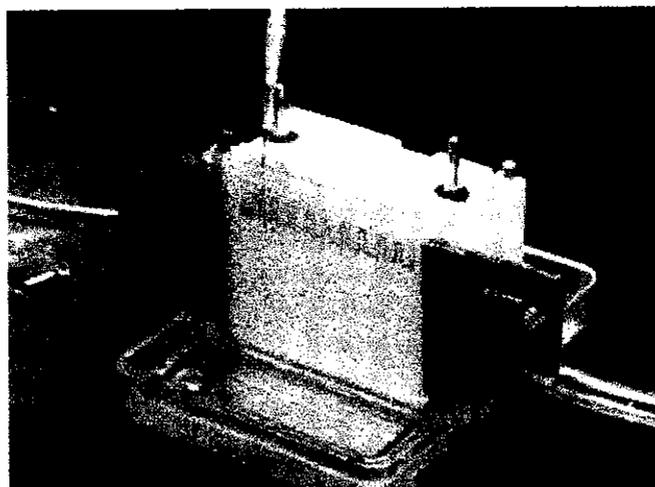
f. *Destaining*

7 ml asam asetat, 7 ml metanol dan diencerkan dengan *aquades* sampai volume 100 ml

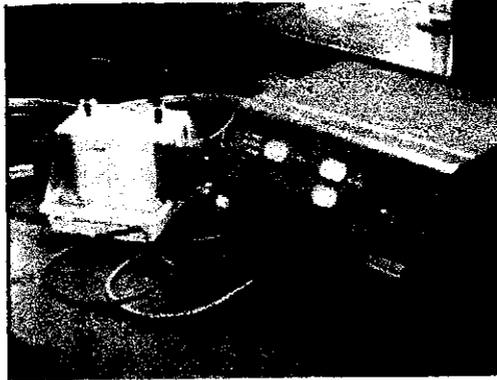
Lampiran 5. Udang terserang zoothamniosis

Keterangan : A ; Udang terinfeksi berat, B ; Terinfeksi sedang, dan C ; Terinfeksi ringan.

Lampiran 6. Alat – alat penelitian**Gambar 1. Sentrifuse****Gambar 2. Vortex****Gambar 3. Mikropipet**

Lampiran 7. Elektroforesis dengan SDS-PAGE**Gambar 4. Pemasangan plate ke chamber****Gambar 5. Pengisian buffer sampel****Gambar 6. Pengisian sampel ke sumuran gel**

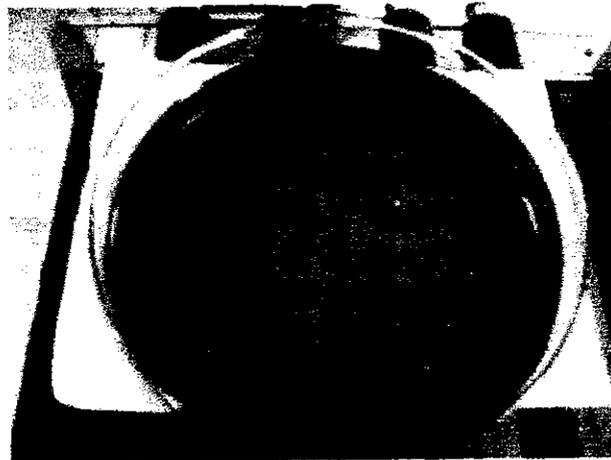
MILIK PERPUSTAKAAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS PADJARAN



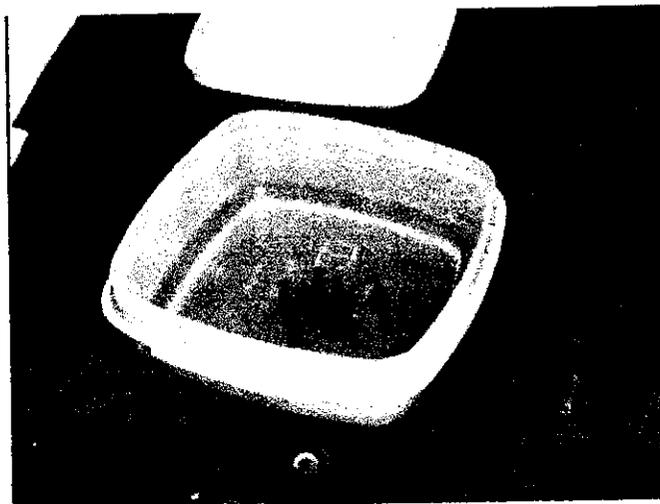
Gambar 7. Running sampel



Gambar 8. Pengambilan gel



Gambar 9. Pewarnaan dengan *Commasie blue*



Gambar 10. Gel hasil running setelah melalui beberapa pencucian