

**SKRIPSI**

**PEMERIKSAAN KADAR PROTEIN SPESIFIK  
HASIL ELUSI *Aeromonas hydrophila* YANG DIISOLASI  
DARI IKAN MAS (*Cyprinus carpio* Linn)  
DENGAN METODE BRADFORD PROTEIN ASSAY**



Oleh :

**YASKA IKARINA**  
NIM 060313173

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2007**

**PEMERIKSAAN KADAR PROTEIN SPESIFIK  
HASIL ELUSI *Aeromonas hydrophila* YANG DIISOLASI  
DARI IKAN MAS (*Cyprinus carpio* Linn)  
DENGAN METODE BRADFORD PROTEIN ASSAY**

Skripsi  
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan  
Pada  
Fakultas kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

YASKA IKARINA  
060313173

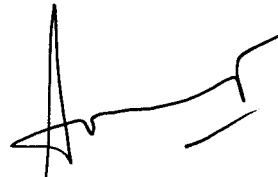
Menyetujui

Komisi Pembimbing,



(Retno Sri Wahyuni, M.S., drh)

Pembimbing Pertama



(Indah Norma Triana, M.Si., drh)

Pembimbing Kedua

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**PEMERIKSAAN KADAR PROTEIN SPESIFIK HASIL ELUSI  
*Aeromonas hydrophila* YANG DIISOLASI DARI IKAN MAS  
(*Cyprinus carpio* Linn) DENGAN METODE  
BRADFORD PROTEIN ASSAY**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, Juni 2007

Yaska Ikarina  
NIM 060313173

Telah diuji pada

Tanggal : 12 Juni 2007

**KOMISI PENGUJI SKRIPSI**

Ketua : Wiwiek Tyasningsih, M.Kes., drh

Anggota : Retno Bijanti, M.S., drh

Setyawati Sigit, M.S., drh

Retno Sri Wahyuni, M.S., drh

Indah Norma Triana, M.Si., drh

Surabaya, 25 Juni 2007

Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D.,Drh.  
NIP. 130 687 305

**ANALYSIS SPESIFIC PROTEIN LEVEL OBTAINED FROM ELUTIONED  
*Aeromonas hydrophila* ISOLATED FROM COMMON CARP  
(*Cyprinus carpio* Linn) USING BRADFORD PROTEIN ASSAY**

Yaska Ikarina

**ABSTRACT**

This research was aimed to determine protein level of *Aeromonas hydrophila* with quantitative measurement Bradford protein assay by knowing highest level of protein. *Aeromonas hydrophila* were isolated from common carp (*Cyprinus carpio* Linn) which got from Balai Benih Ikan Punten, Batu, East Java. Identification were done using biochemical test and were cultured on spesific media *Tryptone Soya Agar* (TSA). Protein characterization were analized through some stages : creating whole protein, protein characterizing using SDS-PAGE, rabbit immunization with whole protein, determining immunogenic protein using western blotting, protein purifying with elution techniques, and Bradford protein assay supported to measure spesific protein level of *Aeromonas hydrophila*. The result showed that *Aeromonas hydrophila* protein molecular weight 71,4 kDa; 61,7 kDa; 53,7 kDa; 41,5 kDa; 35,2 kDa its protein level is 0,53 gr%; 0,67 gr%; 0,62 gr%; 0,63 gr%; 0,6 gr%. The highest spesific protein level is reached at protein fractions 61,7 kDa.

**Key words** : spesific protein, *Aeromonas hydrophila*, Bradford protein assay

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Pemeriksaan Kadar Protein Spesifik Hasil Elusi *Aeromonas hydrophila* Yang Diisolasi Dari Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn) Dengan Metode Bradford Protein Assay.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Fakultas Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh atas kesempatannya mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ibu Retno Sri Wahyuni, M.S., drh selaku pembimbing pertama dan Ibu Indah Norma Triana, M.Si., drh selaku pembimbing kedua atas saran dan bimbingannya sampai dengan selesainya skripsi ini.

Ibu Wiwik Tyasningsih, M.Kes., drh. selaku ketua penguji, Ibu Retno Bijanti, M.S., drh. selaku sekretaris penguji dan Ibu Setyawati Sigit, M.S., drh. selaku anggota penguji.

Ibu M. Gandul Atik Yuliani, M.Kes., drh selaku ketua penelitian Proyek DUE-LIKE Batch III yang telah memberi kesempatan pada penulis untuk mengikuti penelitian.

Seluruh staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Fakultas Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak, Ibu dan adik-adikku tercinta yang telah memberikan segalanya, bantuan, doa, dorongan dan semangat.

Frida, Mia, Novita, Sartika, Maya, Nana dan Ela terima kasih buat persahabatan yang indah, mas Rifa, mas Rico, mbak Astri, teman-teman angkatan 2003, keluarga besar MU65, tim KKN untuk momen hebatnya, rekan tim penelitian (Dwi, Rusyanto, Destina) atas semua bantuan dan kerjasamanya selama penelitian berlangsung serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran untuk kesempurnaan skripsi ini, semoga skripsi ini dapat berguna untuk kemajuan ilmu pengetahuan dan bermanfaat bagi masyarakat khususnya dunia veteriner.

Surabaya, Juni 2007

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERNYATAAN .....	ii
HALAMAN IDENTITAS.....	iii
ABSTRACT .....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG .....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	4
1.3. Landasan Teori.....	4
1.4. Tujuan Penelitian.....	5
1.5. Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1 Ikan Mas .....	6
2.1.1 Klasifikasi.....	6
2.1.2 Morfologi .....	6
2.1.3 Habitat Ikan Mas .....	7
2.1.4 Kebiasaan Hidup Ikan Mas .....	8
2.1.5 Kebiasaan Makan Ikan Mas .....	8
2.1.6 Siklus Hidup Ikan Mas .....	9
2.2 <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	10
2.2.1 Klasifikasi.....	10
2.2.2 Morfologi dan Sifat Pewarnaan.....	11
2.2.3 Sifat Biakan .....	12
2.2.4 Habitat dan Penyebaran.....	13
2.2.5 Patogenesis .....	14
2.2.6 Gejala Klinis.....	15
2.2.7 Patologi Anatomi.....	17
2.2.8 Pencegahan dan Pengobatan .....	17
2.3 Protein .....	18
2.4 <i>Bradford protein assay</i> .....	19
BAB 3 MATERI DAN METODE .....	21
3.1 Tempat Dan Waktu Penelitian .....	21



3.2 Bahan dan Alat Penelitian .....	21
3.3 Metode Penelitian .....	22
3.3.1 Koleksi dan Kultur <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	22
3.3.2 Pembuatan <i>whole protein Aeromonas hydrophila</i> .....	23
3.3.3 Imunisasi pada Kelinci dengan <i>whole protein</i> .....	23
3.3.4 Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE .....	24
3.3.5 Karakterisasi <i>whole protein Aeromonas hydrophila</i> dengan <i>western blotting</i> .....	26
3.3.6. Isolasi Protein dengan Teknik Elusi .....	28
3.3.7. Penentuan Konsentrasi Protein Spesifik Hasil Elusi...	29
<b>BAB 4 HASIL PENELITIAN</b> .....	31
4.1 Isolasi dan Karakterisasi <i>whole protein Aeromonas hydrophila</i>	31
4.2 Isolasi Protein dengan Teknik Elusi dan Penentuan Konsentrasi Protein Spesifik Hasil Elusi dengan <i>Bradford</i> <i>protein assay</i> .....	32
<b>BAB 5 PEMBAHASAN</b> .....	33
5.1 Isolasi dan Karakterisasi <i>whole protein Aeromonas hydrophila</i>	33
5.2 Isolasi Protein dengan Teknik Elusi dan Penentuan Konsentrasi Protein Spesifik Hasil Elusi dengan <i>Bradford</i> <i>protein assay</i> .....	35
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	37
6.1 Kesimpulan.....	37
6.2 Saran.....	37
<b>RINGKASAN</b> .....	38
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	40
<b>LAMPIRAN</b> .....	44

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Istilah benih ikan mas berdasarkan ukuran tubuh .....	10
4.1 Hasil pembacaan spektrofotometer protein <i>Aeromonas hydrophila</i> dengan dengan panjang gelombang 595nm .....	29

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Gambaran mikroskopis <i>Aeromonas hydrophila</i> dengan pembesaran 1.000X .....	11
2.2 Biakan <i>Aeromonas hydrophila</i> di media TSA .....	13
2.3 Ikan yang terinfeksi <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	15
2.4 Gejala klinis infeksi <i>A. hidrophila</i> pada manusia.....	17
2.5 Struktur kimia <i>coomassie brilliant blue solution</i> .....	20
3.1 Bagan alir penelitian.....	30
4.1 Profil <i>whole protein Aeromonas hydrophila</i> dengan SDS-PAGE .....	31

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Isolasi dan identifikasi <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	44
2. Diagram SDS-PAGE 15% .....	46
3. Komposisi bahan-bahan yang digunakan dalam SDS-PSGE 15% ....	47
4. Hasil perhitungan Berat Molekul (BM) protein <i>Aeromonas hydrophila</i> pada Gel SDS-PAGE .....	49
5. Pemeriksaan kadar protein spesifik hasil elusi <i>Aeromonas hydrophila</i>	53

## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

APS	: Amonium Persulphate
BCIP	: 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt
BM	: Berat Molekul
BSA	: Bovine Serum Albumin
Cu	: Cuprum
Elusi	: Preparasi gel elektroforesis
Fe	: Ferum
g%	: Gram persen
KCN	: Potassium Cyanide
kDa	: Kilo dalton
Kg	: Kilogram
MAS	: Motile aeromonas septicemia
mg	: Mili gram
μl	: Mikro liter
NA	: Nutrient Agar
NaCl	: Natrium Clorida
NBT	: Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
Nm	: Nano meter
OPNG	: Orthonitrophenyl-β-D-Galactopyranoside Broth
PBS	: Phosphate Buffer Saline
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis
Temed	: Tetramethylendiamin
TSA	: Triptone Soya Agar
UV	: Ultraviolet
Zn	: Seng

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Semakin meningkatnya laju pertumbuhan penduduk dan taraf hidup masyarakat menyebabkan penyediaan pangan bagi masyarakat Indonesia merupakan masalah yang memerlukan perhatian besar. Akibatnya kebutuhan pangan menjadi semakin meningkat pula, baik kuantitas maupun kualitasnya terutama kebutuhan terhadap protein hewani. Pemenuhan gizi khususnya protein hewani yang dibutuhkan untuk kecerdasan semakin tinggi, termasuk kedalamnya adalah permintaan terhadap ikan. Ikan merupakan salah satu komoditas perairan yang mempunyai kandungan protein hewani yang tinggi dan diminati untuk pemenuhan kebutuhan gizi.

Penurunan kualitas sumber daya perairan yang semakin nyata akibat pencemaran pantai mengakibatkan berkurangnya tingkat produksi ikan. Salah satu alternatif potensial yang dapat dikembangkan untuk meningkatkan produksi ikan adalah dengan budidaya ikan air tawar.

Ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn) merupakan salah satu jenis ikan tawar yang dianjurkan oleh pemerintah untuk dikonsumsi. Ikan mas mempunyai prospek cerah untuk dibudidayakan, karena banyak digemari oleh orang Indonesia, tidak memiliki duri keras seperti nila atau duri lembut seperti bandeng, serta harganya cukup baik dan stabil. Ikan mas cepat menjadi besar dan lebih respon terhadap pemberian pakan tambahan serta dapat dibudidayakan pada berbagai media yang berbeda tergantung lahan yang tersedia dan daya dukung

alam (Susanto, 2002). Ikan mas juga merupakan salah satu ikan air tawar yang bernilai ekonomis. Ikan konsumsi ini termasuk salah satu komoditas sektor perikanan air tawar yang terus berkembang pesat dari waktu ke waktu, selain pemeliharaannya mudah, kemampuan tumbuh kembangnya sangat cepat, dan relatif tahan terhadap berbagai kondisi lingkungan, ikan mas juga kaya protein hewani serta mempunyai daging yang lezat (Khairuman, dkk. 2002).

Ikan mas dapat terserang penyakit seperti ikan-ikan lain. Berjangkitnya suatu penyakit pada ikan dapat disebabkan adanya perubahan keseimbangan antara ikan, mikroorganisme patogen dan lingkungan yang semakin mengarah pada kondisi yang mengacu berkembangnya suatu penyakit. Penyebab penyakit dapat berupa faktor abiotik dan faktor biotik. Faktor abiotik dikenal juga dengan istilah penyakit non infeksi, sedangkan faktor biotik dikenal dengan istilah penyakit infeksi. Faktor abiotik terutama berkaitan dengan berbagai defisiensi yang ditimbulkan oleh kekurangan atau tidak seimbangnya nutrisi, keadaan lingkungan akibat perubahan kualitas air juga dapat mengubah tingkat kesehatan ikan, sedangkan faktor biotik disebabkan oleh berbagai infeksi parasit, bakteri, virus, fungi dan agen biologi lainnya. Penyakit infeksi sangat berpotensi untuk berkembang dan menyebar dari suatu area ke area lain menjadi wabah dan menimbulkan banyak kerugian ekonomi (Supriyadi, 2004).

Agen penyakit infeksi dapat disebarkan dari satu ikan ke ikan lainnya tetapi gejala klinis tidak selalu tampak pada ikan yang tertular, hal tersebut tergantung pada kondisi individu bersangkutan. Secara umum bakteri patogen dan parasit dapat disebarkan secara vertikal maupun horisontal. Penularan vertikal

suatu mikroorganisme patogen yaitu penularan dari induk ke keturunannya, sedangkan penularan horisontal yaitu penularan penyakit ke ikan lain melalui kontak langsung, melalui vektor, peralatan terkontaminasi atau melalui lingkungan. Beberapa contoh bakteri patogen yang dianggap sebagai agen penyakit adalah *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, dan *Vibrio* sp (Austin and Austin, 1999).

Pada bulan Oktober 1980 di Indonesia terutama di daerah Jawa Barat terjadi wabah *Aeromonas hydrophila* dan kerugian yang ditimbulkan sangat besar, sebab dalam waktu yang relatif singkat seluruh ikan mati, baik ukuran kecil maupun induk (Irianto, 2003).

Pengendalian penyakit pada ikan sampai saat ini masih mengandalkan desinfektan dan antibiotik meskipun tingkat keberhasilannya masih terbatas (Subasinghe, 1997). Penggunaan senyawa antibiotika yang berlebihan telah meningkatkan kekhawatiran terhadap keamanan pangan dan kesehatan masyarakat, selain itu pencegahan dengan menggunakan antibiotika juga dapat memacu munculnya resistensi antibiotika pada berbagai bakteri, sehingga untuk sejumlah kasus penyakit pengendaliannya menjadi lebih sulit (WHO, 1998), oleh karena itu diperlukan strategi pengendalian penyakit akuakultur yang lebih baik lagi antara lain dengan pencegahan melalui program vaksinasi (Austin and Austin, 1999).

Penelitian ini dirancang untuk mendapatkan protein *Aeromonas hydrophila* isolat lokal yang antigenik dan imunogenik yang dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan vaksin sub-unit maupun untuk pembuatan antibodi



poliklonal yang dapat digunakan sebagai kit diagnostik penyakit “*Ulcer Disease*” atau “*Red Sore Disease*”. Penegakan diagnosis *Aeromonas hydrophila* memerlukan uji dan bahan uji dengan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. Spesifisitas bahan uji diperlukan mengingat banyaknya protein yang tidak spesifik pada infeksi bakteri, oleh karena itu perlu dipikirkan sumber protein yang spesifik untuk selanjutnya dilakukan isolasi terhadap protein spesifik tersebut. Teknik preparasi gel *electrophoresis* (elusi) merupakan salah satu metode untuk mendapatkan protein yang murni (*purified protein*). Pemurnian protein akan meningkatkan spesifisitas protein sehingga protein tersebut mempunyai potensi untuk digunakan sebagai bahan diagnostik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dijelaskan diatas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

Bagaimanakah kadar protein spesifik hasil elusi *Aeromonas hydrophila* yang diisolasi dari ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn) dengan menggunakan metode *Bradford protein assay*?

## 1.3 Landasan Teori

Penelitian mengenai profil protein bakteri *Aeromonas hydrophila* telah dimulai oleh Korkoca and Boynukara (2003) serta Esteve *et al.* (2004) bahwa protein utama yang telah berhasil diisolasi dan dimiliki oleh *Aeromonas hydrophila* serta memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai protein

imunogenik yaitu TF7 (52 kDa) terletak pada bagian S-layer pada permukaan sel. TF7 merupakan protein penting dan memegang peranan dalam infeksi *Aeromonas hydrophila* karena letaknya di permukaan sel.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar protein spesifik hasil elusi *Aeromonas hydrophila* yang diisolasi dari ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn) yang dilakukan dengan menggunakan metode *Bradford protein assay*.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Diharapkan dengan mengisolasi protein spesifik *Aeromonas hydrophila* menggunakan teknik preparasi gel *electrophoresis* (elusi) dan mengetahui kadar proteinnya dengan metode *Bradford protein assay*, hasil dari penelitian ini dapat melengkapi data dan dapat dijadikan untuk peninjauan dalam studi awal pembuatan *diagnostik kit* melalui pemeriksaan antibodi dengan uji imunologik yang mempunyai sensitifitas dan spesifitas tinggi sehingga dapat memberikan sumbangan bagi perkembangan dan kemajuan dunia Kedokteran Hewan, khususnya pengembangan biomolekuler di bidang bakteriologi.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn)

#### 2.1.1 Klasifikasi

Khairuman dkk. (2002) menyatakan ikan mas berdasarkan ilmu taksonomi hewan (sistem pengelompokan hewan berdasarkan bentuk tubuh dan sifat-sifatnya) dapat dipaparkan sebagai berikut :

Phylum : Chordata

Subphylum : Vertebrata

Class : Osteichthyes

Ordo : Actinopterygii

Subordo : Cypriniformes

Family : Cyprinoidea

Subfamily : Cyprinidea

Genus : *Cyprinus*

Spesies : *Cyprinus carpio* Linn

Nama asing : Common carp (English), Carpa (Spanish), Karp (Swedia)

Nama daerah : ikan mas-masan (Jawa), ikan rayo (Sumatera)

#### 2.1.2. Morfologi

Ikan mas (*Cyprinus carpio* L) mempunyai bentuk badan memanjang dan sedikit pipih ke samping (compresed). Mulutnya terletak di ujung tengah (terminal), dapat disembulkan (*protaktil*). Bagian mulut terdapat dua pasang

sungut dan tidak bergerigi. Di ujung dalam mulut terdapat gigi kerongkongan (*pharyngeal teeth*) yang tersusun dari tiga baris gigi geraham, secara umum hampir seluruh tubuh ikan mas ditutupi sisik kecuali beberapa varietas yang memiliki sedikit sisik. Sisik ikan mas berukuran cukup besar dengan tipe sisik melingkar (*cycloid*) dan terletak beraturan (Khairuman dkk., 2002)

Suseno (2003) mengatakan tubuh ikan mas juga dilengkapi dengan sirip. Sirip punggung (*dorsal*) berukuran relatif panjang dengan bagian belakang berjari-jari keras dan sirip terakhir, yaitu sirip ketiga dan keempatnya bergerigi. Letak permukaan sirip punggung berseberangan dengan permukaan sirip perut (*ventral*). Khairuman dkk. (2002) menjelaskan, sirip dubur (*anal*) yang terakhir mempunyai ciri seperti punggung, yakni berjari keras dan bergerigi. Garis rusuk atau gurat sisi (*linea lateralis*) pada ikan mas tergolong lengkap berada dipertengahan tubuh dengan posisi melintang dari tutup insang sampai ke ujung belakang pangkal ekor (Khairuman dkk., 2002).

### **2.1.3. Habitat Ikan Mas**

Habitat yang disukai ikan mas adalah perairan yang kedalamannya mencapai setengah sampai satu meter. Kolam dengan aliran air yang pelan dan subur yang ditandai melimpahnya makanan alami. Larva ikan mas menyukai perairan dangkal, tenang dan terbuka (tidak ternaungi pepohonan yang rindang) sedangkan benihnya yang berukuran cukup besar lebih menyukai perairan yang agak dalam, mengalir dan terbuka (Djarajah, 2001).

#### **2.1.4 Kebiasaan Hidup Ikan Mas**

Santosa (1993) mengemukakan bahwa ikan mas yang dibudidayakan di areal perkolaman dapat dikawinkan sepanjang tahun (tidak mengenal musim) tetapi bila di alam misalnya sungai, danau ataupun genangan air lainnya, ikan mas memijah pada awal atau sepanjang musim penghujan. Waktu pemijahan biasanya bertepatan dengan turunnya hujan. Luapan air hujan dan suara gemericik air yang mengalir ke kolam (perairan) akan merangsang induk matang telur untuk melakukan pemijahan.

Ikan mas dikenal sebagai ikan pemijah sejati. Proses pemijahan ikan mas berlangsung secara massal di perairan alami. Perilaku pemijahan diawali dengan membentuk kelompok induk yang berbeda kelamin dan bergerak beriringan menyusuri pinggiran perairan. Kelangsungan memijah ikan mas menjadi tinggi bila habitat pemijahannya ditumbuhi rumput-rumputan (Djarajah, 2001).

#### **2.1.5 Kebiasaan Makan Ikan Mas**

Ikan mas tergolong jenis omnivora, ikan yang dapat memangsa berbagai jenis makanan baik yang berasal dari tumbuhan maupun binatang renik. Pada umur muda (ukuran 10 cm) ikan mas senang memakan protozoa dan zooplankton. Hewan-hewan kecil tersebut disedot bersama lumpurnya, diambil yang dapat dimanfaatkan dan sisanya dikeluarkan melalui mulut (Santoso, 1993).

Ikan mas mencari sumber makanan (jasad-jasad renik) di sekeliling pematang menyebabkan sering rusak dan longsohnya pematang tersebut. Ikan mas juga suka mengaduk-aduk dasar kolam untuk mencari makanan yang biasa

dimanfaatkan seperti larva insecta, cacing dan lain sebagainya. Aktivitasnya ini akan membantu kawanan benih mencari makanan karena binatang-binatang di dasar kolam yang teraduk ke atas dapat menjadi santapan lezat bagi benih (Santosa, 1993).

### **2.1.6 Siklus Hidup Ikan Mas**

Khairuman dkk. (2002) mengemukakan bahwa siklus hidup ikan mas dimulai di dalam gonad, yakni ovarium pada ikan betina dan testis ikan jantan. Ikan mas memijah sepanjang tahun dan tidak terpengaruh oleh musim. Pemijahan alami terjadi pada tengah malam sampai akhir fajar. Biasanya sebelum memijah ikan mas cenderung mencari tempat rimbun pada tanaman air atau rumput-rumput yang menutupi permukaan air dan merangsang proses pemijahan, juga dapat menjadi tempat untuk menempel telur.

Fertilisasi terjadi apabila sel-sel segera terbuahi oleh sperma. Sperma bergerak aktif dan masuk membuahi sel telur melalui lubang kecil pada chorion. Telur yang telah dibuahi oleh sperma akan menghasilkan embrio yang tumbuh di dalamnya. Kira-kira dua sampai tiga hari kemudian telur-telur tersebut akan menetas dan tumbuh menjadi larva. Biasanya larva senang menempel pada substrat dan bergerak vertikal, larva kemudian berubah menjadi benih (Khairuman dkk., 2002)

Kira-kira dua sampai tiga minggu benih tumbuh menjadi burayak. Setelah dua sampai tiga minggu burayak tumbuh menjadi putihan. Putihan secara alami

tumbuh terus dan setelah tiga bulan menjadi benih gelondong atau kepalang. Benih gelondong tumbuh terus dan akhirnya menjadi induk (Khairuman dkk., 2002)

Tabel 2.1 Istilah benih ikan mas berdasarkan ukuran tubuh

Ukuran (Cm)	Istilah
Menetas	Larva
0,6 – 1,0	Kebul (larva stadium akhir)
1,0 – 3,0	Burayak
3,0 – 5,0	Putihan
5,0 – 8,0	Ngaramo
8,0 – 12,0	Ngaramo lepas (duaramo)

Sumber : Khairuman dan Amri (2002)

## 2.2 *Aeromonas hydrophila*

### 2.2.1 Klasifikasi

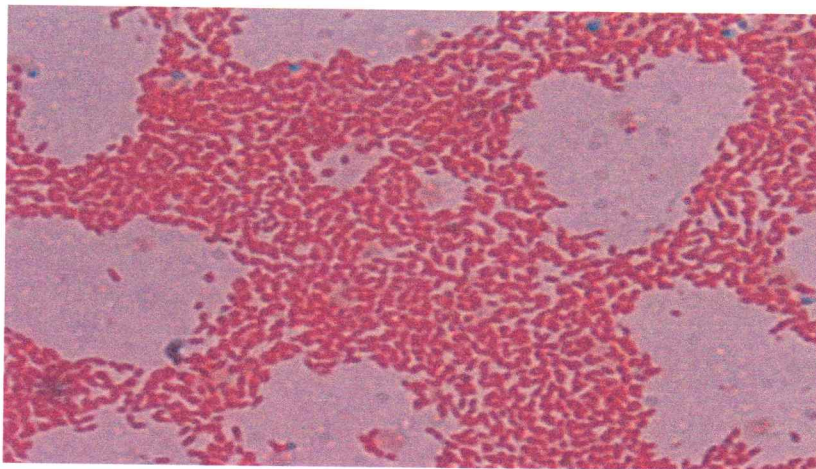
Klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* menurut Madigan *et al.* (2000), adalah sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria  
 Phylum : Proteobacteria  
 Class : Zymobacteria  
 Ordo : Aeromonadales  
 Famili : Aeromonadaceae

Genus : *Aeromonas*  
Species : *Aeromonas hydrophila*  
Nama lain : *Bacillus hydrophilus fuscus*, *Proteus hydrophilus*

### 2.2.2 Morfologi dan Sifat Pewarnaan

Ciri utama bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah bentuknya seperti batang, ukurannya 1-4 x 0,4-1 mikron, bersifat Gram negatif, fakultatif aerobik (dapat hidup dengan atau tanpa oksigen), tidak berspora, bersifat motil (bergerak aktif) karena mempunyai satu flagel (monotrichous flagella) yang keluar dari salah satu kutubnya (Kordi dan Ghuran, 2004). Pewarnaan Gram dengan metode ulasan menghasilkan warna merah yang menunjukkan bakteri Gram negatif (Holt *et al.*, 1994).



Gambar 2.1 Gambaran mikroskopis *A. hydrophila* dengan pembesaran 1.000X  
(Yuliani, dkk. 2006)

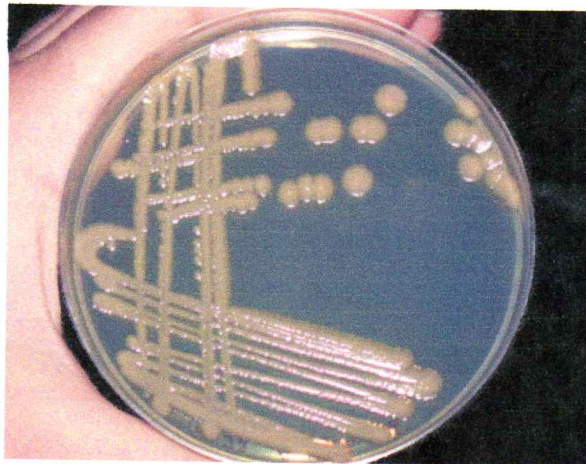


### 2.2.3 Sifat Biakan

*Aeromonas hydrophila* dapat diisolasi dari ginjal atau darah ikan yang terinfeksi bakteri ini dengan menumbuhkannya pada *Nutrient Agar* atau *Tryptone Soya Agar* (TSA). Dalam waktu 24 jam pada suhu 22<sup>0</sup> - 28<sup>0</sup> C akan terbentuk koloni yang melingkar, cembung, transparan serta berwarna putih hingga kuning tua (Roberts, 1989; Austin and Austin, 1999; Aoki, 1999). Identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* dapat menggunakan tes aglutinasi, namun perlu diperhatikan kemungkinan adanya reaksi silang dengan *Aeromonas salmonisida* dan *Aeromonas sobria* (Stoskopf, 1993 dan Austin and Austin, 1999).

Biakan *Aeromonas hydrophila* bersifat motil, aerobik dan fakultatif anaerobik, uji katalase positif, oksidase positif, cytochrome oksidase positif, fermentasi gula dan produksi gas (Nabib dan Pasaribu, 1989). Mempunyai sifat merusak arginin, tumbuh pada suhu 5-37°C dan tanpa NaCl, tidak tumbuh pada pH 9. Bakteri ini dapat tumbuh dengan medium potassium cyanide (KCN), OPNG positif, indol positif, hidrolisis gelatin tetapi tidak menghidrolisis chitin (Cowan and Steel's, 1974; Holt *et al.*, 1994). Uji methyl red positif, memproduksi gas H<sub>2</sub>S, D-glucose, L-arabinose, maltose, D-mannitol, sucrose dan trehalose (Holt *et al.*, 1994).

Gambar 2.2 Biakan *Aeromonas hydrophila* di media TSA



(Sumber : <http://ww2.truman.edu/~kes251/ahydrophila.htm>)

#### 2.2.4 Habitat dan Penyebaran

*Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu mikroflora normal air tawar, terutama pada lingkungan yang kaya akan bahan organik (Austin and Austin, 1999) dan senang hidup di lingkungan bersuhu 15-30°C dan pH 5-5,9 (Sitanggang, 2002) namun apabila jumlah *Aeromonas hydrophila* pada perairan melebihi  $10^4$  sel/ml maka dapat menjadi patogen (Irianto, 2003).

Penyakit yang disebabkan *Aeromonas hydrophila* dapat menyerang hewan amphibi, mamalia, serta beragam jenis ikan air tawar termasuk ikan mas (*Cyprinid*), ikan salmon (*Salmoid*), belut (*Anguilla* sp.), dan lele (*Clarias* sp, *Ictalurus* sp.) yang sering disebut *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) atau *Bacterial Haemorrhagic Septicaemia* (Hayes, 2000).

### 2.2.5 Patogenesis

Koleksi isolat *Aeromonas* pada sungai Porma, Propinsi Leon, Spanyol menemukan tiga grup spesies yaitu *A. hydrophila* (n=74 strains), *A. sobria* (n=11 strains), *A. caviae* (n=12 strains). *Aeromonas hydrophila* strains TW1, A19, E37, dan E40 virulen pada ikan (belut dan ikan air tawar) (Cipriano et al., 2001).

Bakteri *Aeromonas hydrophila* sering menyerang hewan air/ikan, bahkan beberapa laporan menyebutkan bakteri ini juga menyerang manusia. Penularan penyakit secara horisontal (antara ikan di dalam kelompok) dan tidak dapat terjadi secara vertikal (dari induk ke keturunannya) (Hayes, 2000). Penularan bakteri *Aeromonas hydrophila* dapat berlangsung melalui air, kontak badan, kontak dengan peralatan yang tercemar atau karena pemindahan ikan terserang *Aeromonas hydrophila* dari satu tempat ke tempat lain (Kordi dan Ghufran, 2004). Infeksi *Aeromonas hydrophila* juga bisa ditularkan melalui mulut dan kulit. Suatu luka kecil pada kulit mampu menginfeksi ikan sehat. Bakteri yang tertelan akan berkembangbiak di dalam epitel intestinum dan sejumlah bakteri selanjutnya dilepas melalui feses dan siklus infeksi terus berlanjut (Holm, 1999).

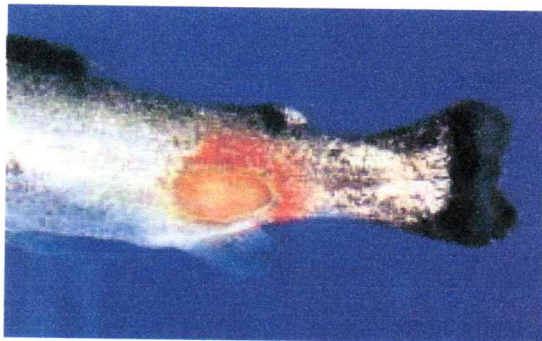
Pada ikan bakteri ini menyebabkan kerusakan pada sirip dan ekor, pendarahan pada pangkal sirip dan *haemorrhagic septicaemia*, sering disebut *Motile Aeromonas Septicaemia* (MAS). Septicaemia biasanya bersamaan dengan adanya luka pada permukaan tubuh, haemorrhagi pada insang dan anus, terjadi pendarahan pada hati, ginjal dan limpha, bernanah, abses, mata membesar dan abdominal membengkak. Kondisi lain dari infeksi *Aeromonas hydrophila* dikenal dengan penyakit sirip merah yang diketahui dari adanya permukaan haemorrhagi

dan pengikisan sisik (Adisukresno, 1994; Moeller, 1994; Hayes, 2000; Ryandini dkk, 2004).

### 2.2.6 Gejala Klinis

Ikan yang terserang bakteri ini biasanya memperlihatkan gejala-gejala berupa: warna tubuh ikan menjadi gelap, kemampuan berenang menurun, mata ikan rusak dan agak menonjol, sisik terkuak, seluruh siripnya rusak, insang berwarna merah keputihan dan mengalami beberapa kelainan, insang ikan mengalami kerusakan sehingga sulit bernafas, kulit ikan menjadi kasar dan timbul pendarahan selanjutnya diikuti dengan luka-luka borok, perut ikan kembung (*dropsi*) dan apabila dilakukan pembedahan maka akan kelihatan pendarahan pada hati, ginjal dan limpa (Kordi dan Ghufran, 2004).

Gejala pada setiap ikan yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* berbeda-beda tergantung dari beberapa faktor seperti virulensi bakteri, daya tahan ikan terhadap infeksi, dan faktor lingkungan yang menyebabkan stres pada ikan (Swann, 1991).



Gambar 2.3 Ikan yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila* (Hayes, 2000)

Gejala klinis pada manusia yang umum terjadi akibat infeksi *Aeromonas* ini manifestasi patogeniknya adalah bakterimia (bakteri dalam darah). Gejala ringan meliputi menggigil dan demam, tetapi yang terinfeksi *Aeromonas* biasanya mengalami sakit abdominal, muntah dan diare.

Laporan mengenai infeksi *Aeromonas* melalui luka semakin bertambah. Tidak seperti gastroenteritis, infeksi ini bisa berakibat fatal seperti amputasi. Lukanya dibagi menjadi tiga kategori dimulai dari pertambahan keparahan dari kerusakan : sellulitis, myonecrosis, dan *ecthyma gangrenosum*.

Sellulitis adalah luka infeksi yang paling sering dijumpai, merupakan inflamasi akut dari jaringan sub cutan yang ditandai oleh kemerahan dan semakin mengerasnya luka akibat infeksi sekunder. Myonecrosis dan *ecthyma* adalah dua tipe yang jarang terlihat dari infeksi *Aeromonas*, biasanya ditemukan pada penderita dengan *immunocompromised*. Myonecrosis atau lesi bula ditandai dengan liquifaksi muskulus dengan menghitamnya jaringan kemudian menjadi gangren dengan pembentukan gas. Penderita ini harus segera diterapi dengan antimikroba, apabila tidak segera diterapi bisa lukanya harus diamputasi (Haburchak, 1996). Tipe ketiga yaitu *ecthyma gangrenosum* adalah necrotic cutaneous atau pustula *gangrenosum* yang timbul dari infeksi sekunder. Lesi dengan batas erythematous yang mengelilingi vesikel yang bisa berkembang menjadi nekrosis jaringan lunak dalam 24 jam. Tipe infeksi ini bisa berakibat fatal (Musher, 1980).

Infeksi *Aeromonas* melalui luka sering terjadi akibat pencucian luka menggunakan air danau atau air sungai. Alternatif pengobatan yaitu dengan



fluoroquinolones, aztreonam, trimethoprim-sulfamethaxozole, atau aminoglikosida (Mani *et al.*, 1995)



Gambar 2.4 Gejala klinis infeksi *A. hydrophila* pada manusia (Hayes, 2000)  
Sellulitis (1); myonecrosis (2); ecthyma gangrenosum (3)

### 2.2.7 Patologi Anatomi

Perubahan yang tampak pada ikan yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila* ditandai dengan adanya luka-luka kecil di permukaan tubuh, haemorrhagi pada insang, eksoptalmia serta nekrosis pada organ-organ dalam seperti hati, pankreas, limpa (Austin and Austin, 1999), selain itu juga dijumpai kerusakan vili-vili intestinum yang mengakibatkan *mucous desquamative catarrh* dan nekrosis pada lapisan mukosa intestinum (Woo and Bruno, 1999).

### 2.2.8 Pencegahan dan Pengobatan

Pencegahan paling baik yang dapat dilakukan untuk menghindarkan ikan dari infeksi *Aeromonas hydrophila* adalah dengan meminimalkan faktor stres pada ikan. Terlalu padatnya jumlah ikan pada satu tempat pemeliharaan, temperatur yang tinggi, pasokan oksigen yang rendah, nutrisi yang buruk serta penanganan

yang kurang baik dapat memicu timbulnya stres pada ikan, sehingga menyebabkan perubahan fisiologis pada tubuh ikan dan pada akhirnya ikan menjadi mudah terinfeksi (Irianto, 2003).

Pengobatan pada ikan yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila* dapat menggunakan senyawa antibiotik yaitu dengan penyuntikan Oksitetrasiklin HCl 25-30 mg/kg BB, Kanamicin 20-40 mg/kg BB, Streptomisin 20-60 mg/kg BB, dan dengan cara perendaman dalam larutan Oksitetrasiklin 5-10 ppm selama 24 jam (Hayes, 2000). Namun dipihak lain, pemakaian antibiotika yang terus menerus dapat berakibat timbulnya galur bakteri yang resisten terhadap antibiotika tersebut (Tjahjaningsih dkk., 1999)

### 2.3 Protein

Protein merupakan polipeptida dengan berat molekul berkisar antara  $10^5$ - $10^6$  Dalton, beberapa protein larut dalam air sedangkan lainnya larut dalam garam encer. Banyak protein telah pecah dan dimurnikan berdasarkan atas ukuran molekul dan kelarutannya. Ultrasentrifugasi dapat digunakan untuk memisahkan molekul protein menurut berat molekulnya. Gaya gravitasi yang tinggi molekul-molekulnya mengendap dengan laju sebanding dengan berat dan bentuk molekulnya (Driyer, 1993).

Protein gabungan terdiri atas protein sederhana yang bergabung dengan komponen yang bukan protein atau yang bukan asam amino, yang lazim disebut gugus prostetik. Protein gabungan ini contohnya masing-masing adalah sebagai berikut : *Glikogen*, mencakup monopolisakarida dan oligosakarida sebagai gugus

prostetik (di jaringan ikat dan mukosa saliva); *lipoprotein*, gugus prostetiknya adalah lemak (di dalam plasma darah dan kuning telur); *Nukleoprotein*, gugus prostetiknya adalah asam nukleat (dalam nukleus sel, kromosom dan virus); *Kromoprotein*, gugus prostetiknya adalah Fe-profirin (hemoglobin, sitokrom); *Metaprotein*, gugus prostetiknya ialah Fe, Zn atau Cu (dalam transferin darah, feritin, anhidrose karbonat); dan *Fosfoprotein*, gugus prostetiknya adalah fosfat (kasein dalam susu, vitellin dalam telur) (Driyer, 1993).

Protein derivat adalah hasil pemecahan dari protein yang ada di alam, supaya dikurangi kompleksitasnya. Contohnya derivat protein primer, metaprotein, protein koagulasi, derivat protein sekunder, protease, peptose dan peptide (Frandsen, 1992).

Protein merupakan suatu rantai peptida atau polipeptida yang dihasilkan atau disintesis karena ekspresi gen, ekspresi gen yang menghasilkan protein melibatkan dua tahap proses yaitu transkripsi dan translasi. Transkripsi adalah proses pemindahan informasi genetika dari DNA ke RNA. Sedangkan sintesis protein atas dasar kode genetik kodon-kodon mRNA disebut translasi (Rahayu, 1988). Agar ekspresi gen dapat diwujudkan dalam waktu dan besaran yang tepat sesuai pula dengan sifat dan karakter gen, maka perlu ada pengaturan pengendalian ekspresi gen (Hartiko, 1988).

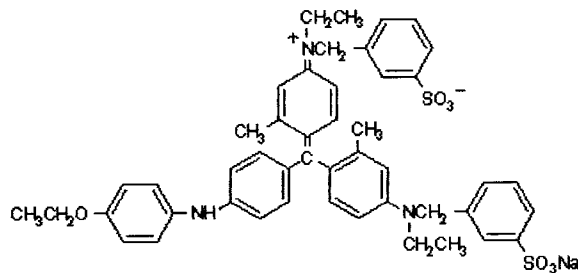
#### **2.4 Bradford Protein Assay**

*Bradford protein assay* adalah salah satu metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi protein dalam sebuah larutan. Metode ini sederhana,



cepat, sensitive dan murah. Reagen Bradford (*coomassie brilliant blue solution*) bekerja dengan mengikat protein pada arginine sehingga akan merubah warna reagen menjadi lebih gelap.

Gambar 2.5 Struktur kimia *coomassie brilliant blue solution*.



(Sumber : [http://www-class.unl.edu/biocham/protein assay/bradford assay](http://www-class.unl.edu/biocham/protein%20assay/bradford%20assay))

Intensitas warna yang dihasilkan tergantung pada banyaknya ikatan peptida yang terdapat dalam protein. Hal ini sebanding dengan jumlah molekul protein total yang ada pada molekul sampel, semakin banyak jumlah protein dalam sampel maka intensitas warnanya semakin besar karena adanya sejumlah ikatan peptida dalam sampel. Intensitas warna yang dihasilkan diukur dengan menggunakan spektrofotometer U.V (*ultra violet*) *visible* dengan panjang gelombang 595 nm. Konsentrasi protein dari sampel ditentukan oleh perbandingan dari protein standart dengan menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) (Bradford, 1976)

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Isolat lokal *Aeromonas hydrophila* dikoleksi dari kulit, ginjal dan intestinum ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn) yang berasal dari Balai Benih Ikan Punten, Batu, Jawa Timur yang diduga menderita *ulcer disease* atau *red sore disease*, kemudian ikan yang diduga terinfeksi tersebut dibawa dan diidentifikasi di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya serta di *Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga pada bulan Mei sampai dengan bulan November 2006.

### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Penelitian ini menggunakan bakteri *Aeromonas hydrophila* yang telah diisolasi dari media khusus *Tryptone Soya Agar* (TSA).

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini antara lain adalah: *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 7,3, detergen garam natrium N-Lauroilsarkosin, *acrilamide*, Tris HCl pH 6,8 dan pH 8,8, *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 10%, aquadest, *Ammonium Persulphate* (APS), tetramethylendiamin (TEMED), *laemml buffer*, butanol, *electrophoresis buffer*, NaOH 0,36%, asam asetat 7,5%, glutaraldehid 5%, NH<sub>3</sub> 25%, metanol 5% dan 50%, 0,5 mg/ml *bovine serum albumin* (BSA), 0,15 M NaCl, *coomassie brilliant blue solution*, albumin.

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi tabung reaksi, *cover glass*, *object glass*, bunsen, sentrifus, mikroskop, pipet, mikrotube, tabung

*Eppendorf*, *Backer glass*, erlenmeyer, kertas saring, gunting, pinset, sonikator, elektroelusi, timbangan sartorius, pH meter, *waterbath*, *chamber* SDS-PAGE, *glass plate*, *comb*, *cutter*, *shaker*, *power supply*, plastik selofan, spektrofotometer, *refrigerator*, tabung kuvet.

### 3.3 Metode Penelitian

Isolat lokal *Aeromonas hydrophila* dikoleksi dari kulit, ginjal dan intestinum ikan mas yang diduga terinfeksi bakteri tersebut yang dibiakkan dengan media khusus TSA, sedangkan *whole protein* diperoleh dari hasil sonikasi dengan frekuensi 25 kHz selama 4 menit lalu dihentikan selama 1 menit, proses sonikasi ini dilakukan 4 kali (Yuliati dkk., 2006). *Whole protein* digunakan untuk imunisasi kelinci dan dilakukan analisis protein dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk memperoleh profil protein bakteri *Aeromonas hydrophila* dan penentuan protein yang immunogenik dengan menggunakan *Western blotting*. Tahap berikutnya dilakukan purifikasi dengan teknik preparasi gel elektroforesis (ELUSI). Cairan hasil ELUSI tersebut kemudian ditentukan konsentrasi protein spesifiknya dengan metode *Bradford protein assay* dan dibaca dengan spektrofotometer U.V (*ultra violet*) *visible* dengan panjang gelombang 595 nm.

#### 3.3.1 Koleksi dan Kultur *Aeromonas hydrophila*

Isolat lokal *Aeromonas hydrophila* dikoleksi dari kulit, ginjal dan intestinum ikan mas yang diduga terinfeksi bakteri tersebut yang dikultur dengan

media khusus TSA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, jika pada media TSA terdapat bentukan koloni berwarna putih, bundar dengan tepi rata maka dilakukan pemeriksaan mikroskopis, uji biokimia dan uji gula-gula untuk memastikan koloni tersebut adalah *Aeromonas hydrophila*.

Uji biokimia yang dilakukan antara lain dengan menggunakan media *Triple Sugar Iron Agar*(TSIA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Simon Citrat Agar* dan *Urease*.

### 3.3.2 Pembuatan *whole protein Aeromonas hydrophila*

Hasil isolasi bakteri *Aeromonas hydrophila* dimasukkan dalam tabung reaksi dengan ditambahkan PBS untuk disonikasi. Sonikasi dilakukan dengan frekuensi 25 kHz selama 4 menit lalu dihentikan selama 1 menit, proses sonikasi ini dilakukan 4 kali (Yuliati dkk., 2006). Selama proses tersebut tabung tempat sampel *Aeromonas hydrophila* dimasukkan dalam air dingin (air bercampur es) dan garam.

### 3.3.3 Imunisasi pada Kelinci dengan *whole protein*

Imunisasi pada kelinci dilakukan menggunakan *whole protein* dan disuntikkan secara sub cutan ke kelinci galur lokal yang berjenis kelamin jantan dan berumur 3 bulan. Sebelum penyuntikan dilakukan pengambilan darah untuk mendapatkan kontrol. Kelinci yang diimunisasi sebanyak tiga ekor dengan menggunakan campuran antigen dengan *Freund's complete adjuvant* (perbandingan 1:1). Imunisasi kedua dilakukan setelah 14 hari berikutnya dengan

campuran antigen dalam *Freund's complete adjuvant* (perbandingan 1:1). Imunisasi ketiga dilakukan setelah tujuh hari berikutnya dengan cara dan bahan yang sama seperti imunisasi kedua begitu seterusnya sampai lima kali imunisasi. Setiap sebelum penyuntikan dilakukan pengambilan darah melalui *V.auricularis*. Serum kelinci digunakan untuk karakterisasi *whole protein* dengan cara *western blotting* (Yuliani, dkk. 2006).

### 3.3.4 Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE

Teknik ini bertujuan untuk menentukan berat molekul protein *Aeromonas hydrophila*. Analisis protein dengan teknik SDS-PAGE pada penelitian ini menggunakan larutan *running gel* 15% dan larutan *stackling gel* 15%.

Langkah pertama dari metode ini adalah mencetak *running gel* 15% dengan mencampurkan bahan-bahan *running gel* 15% yaitu acrilamid 15%, tris HCl pH8,8, SDS 0,5%, aquadest, TEMED, APS 10% sampai homogen. Kemudian dengan cepat memasukkan campuran bahan tersebut ke dalam plate kaca yang telah bersekat sampai 1 cm di atasnya dan melakukan fiksasi sedemikian rupa agar hasil *running gel* rata dan untuk meratakan bagian atas *running gel* ditambahkan butanol di atasnya, kemudian diinkubasi selama 25 menit pada suhu kamar agar *running gel* padat. Langkah terakhir adalah membuang butanol dan menambahkan *stackling gel*.

Langkah kedua adalah membuang *stackling gel* dengan mencampur acrilamid, tris HCl pH 6,8, SDS 0,5%, aquadest, TEMED, APS 10% hingga

homogen, kemudian dituangkan pada cetakan *running gel* dan dimasukkan ke dalam comb. Inkubasi selama 25 menit pada suhu kamar sampai *stackling gel* padat. Langkah akhir melepaskan comb dan membersihkan serta mencuci *stackling gel*.

Sampel yang akan diukur molekul proteinnya disiapkan. Sampel 20 $\mu$ l dan Laemmli buffer dengan perbandingan 3:1 dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Langkah selanjutnya dilakukan denaturasi protein dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 5 menit. Sampel termasuk kontrol positif dalam laemmli buffer diaplikasikan ke dalam tujuh sumuran sedangkan satu sumuran yang lainnya sebagai kontrol diisi dengan 5 $\mu$ l marka protein (*Color Burst<sup>TM</sup> Electrophoresis Markers*, No C.4105).

Proses elektroforesis diawali dengan memasang plate kaca pada Bio-Rad yang sudah dituangi dengan E – Buffer kira-kira 400ml dan menfiksasi plate kaca dengan baik. Langkah berikutnya adalah memasukkan sampel pada lubang comb dan bila ada gelembung udara harus dihilangkan dengan jarum, lakukan *running* dengan jenis arus searah pada voltase 100 V, 40 mA dan yang perlu diperhatikan jangan sampai ada gelembung udara. Untuk menghentikan elektroforesis harus menunggu sampai sampel turun melewati *running gel*, selanjutnya gel beku yang mengandung fraksi protein diambil dengan cara memisahkan plat kaca.

Setelah gel dilepas dari plate, dimasukkan ke dalam larutan pencuci yang terdiri dari metanol 50% 25ml, asam asetat 10% 3,7ml dan aquadest 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 *aquadest* selama 30 menit. Setelah dicuci, gel diwarnai dengan larutan *glutraldehyde* 10% dan *aquadest* selama 30 menit. Setelah dicuci, gel diwarnai dengan cara dicelupkan pada  $\text{AgNO}_3$  selama 15 menit, kemudian dilakukan pencucian dengan *aquadest* sebanyak dua kali masing-masing 100 ml selama dua menit, selanjutnya diberikan larutan pengembang warna yang terdiri dari *formaldehyde* 3,7% sejumlah 50 $\mu\text{l}$ , *zytroensauce* 5% 100  $\mu\text{l}$  dan *aquadest* 100 ml. Tahap selanjutnya gel dicuci kembali dengan *aquadest* sebanyak dua kali masing-masing 100 ml selama dua menit. Apabila pita (*band*) protein sudah terlihat, difiksasi dengan menambahkan asam asetat 10%.

Hasil gel yang telah menunjukkan adanya *band* protein, selanjutnya disimpan dalam larutan gliserol 10% sebanyak 10 ml dalam *aquadest* 1000 ml agar gel tidak rusak. Dokumentasi dilakukan dengan menggunakan peralatan scan yang dihubungkan dengan komputer. Perhitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan *band* protein yang dimaksud dengan standar yaitu marka protein (*Color Burst<sup>TM</sup> Electrophoresis Markers*, No C.4105) (Rantam, 2003).

### **3.3.5 Karakterisasi *Whole Protein Aeromonas hydrophila* dengan *Western Blotting***

Untuk melihat apakah protein *A. hydrophila* yang diperoleh mempunyai sifat imunogenik, maka dilakukan pengujian dimana protein tersebut akan direaksikan dengan anti *whole protein A. hydrophila* yang diperoleh dari hasil

imunisasi pada kelinci dengan menggunakan metode *Western blotting*. Adapun percobaannya diawali dengan SDS-PAGE, lalu gel hasil SDS-PAGE yang mengandung protein di pindahkan pada *membrane nitrocelulose*. Gel kemudian ditutup dengan kertas Whatman sebanyak empat lapis yang telah dibasahi dengan *blotting buffer*. *Blotter* ditutup dengan penutup *blotter*. Transfer protein dilakukan dengan *red current* yang menunjukkan angka 500 miliampere selama 1-2 jam. *Membrane nitrocelulose* lalu diambil dan dicuci dengan 0,05% Tween 20 dalam TBS (TBST) selama 30 menit, selanjutnya *membrane nitrocelulose* di *blocking* dengan BSA 1% dalam TBS Tween 0,5% selama satu jam dengan *shaker* pada temperatur kamar. *Membrane nitrocelulose* selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan yang mengandung anti *A. hydrophila* yang berasal dari serum kelinci dalam PBS (1:10) dan diinkubasikan selama satu jam pada suhu ruang dengan *shaker*. Pencucian dilakukan lima kali dengan TBS-Tween 0,5%, masing-masing selama 10 menit dengan *shaker*. *Membrane nitrocelulose* tersebut, selanjutnya di inkubasikan dalam larutan *IgG antirabbit alkaline phosphatase conjugate* (1:3.000) selama satu jam pada suhu kamar dengan *shaker* dan diikuti dengan pencucian sejumlah lima kali dengan TBS-Tween 0,05%, masing-masing selama 10 menit selanjutnya *membrane nitrocellulose* diwarnai dengan penambahan *western ready* yang mengandung substrat NBT dan BCIP dua ml dalam ruang gelap. Reaksi dihentikan apabila sudah terjadi pembentukan warna dan *membrane nitrocelulose* di masukkan ke dalam *aquadest*. *Membrane nitrocellulose* dikeringkan pada temperatur kamar untuk kepentingan dokumentasi (Rantam, 2003)



### 3.3.6 Isolasi Protein dengan Teknik Elusi

Proses preparasi gel *electrophoresis* (elusi) ini diawali seperti proses SDS-PAGE, akan tetapi setelah proses *running*, gel tidak diwarnai seperti halnya pada prosedur SDS-PAGE. Perbedaan lainnya terlihat pada jumlah kolom pada gel, pada satu gel SDS-PAGE dapat terdiri dari sepuluh kolom, sedangkan pada gel yang dipakai pada elusi hanya digunakan satu kolom untuk marker dan sisa gel lainnya dibuat menjadi satu kolom yang lebar. Sampel yang dibutuhkan untuk satu kolom pada gel kurang lebih 20 $\mu$ l, untuk elusi sembilan kolom dijadikan menjadi satu kolom sehingga sembilan kolom tersebut dikalikan dengan 20  $\mu$ l menjadi 180  $\mu$ l ( Rantam, 1997).

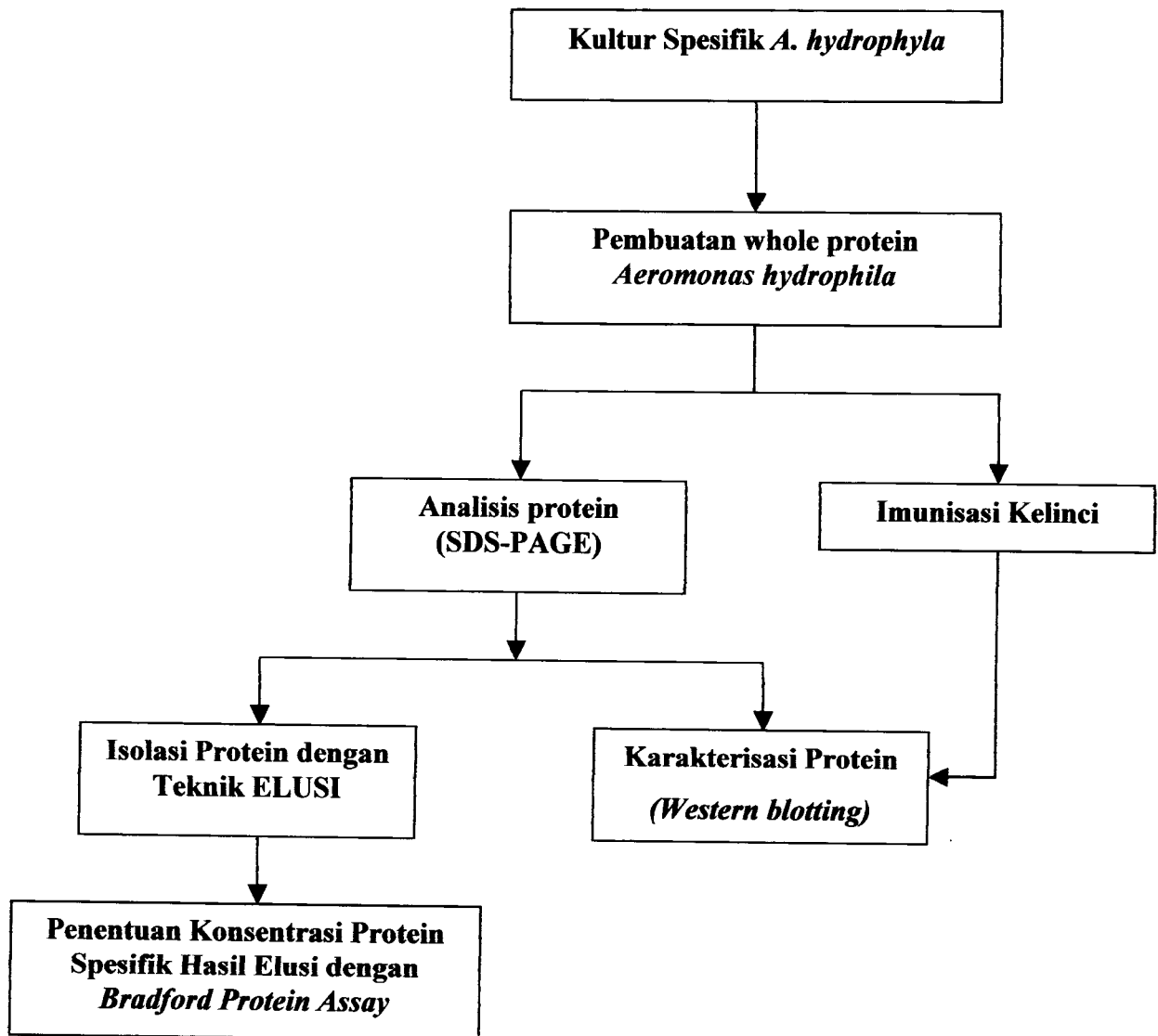
Pada proses elusi, setelah *running*, dilanjutkan dengan pemotongan marker untuk selanjutnya marker tersebut diwarnai menggunakan pewarnaan silver. Marker yang telah diwarnai nantinya berguna sebagai acuan pada proses pemotongan gel *band* atau pita yang diinginkan. Gel hasil pemotongan tersebut kemudian dimasukkan dalam plastik selofan. Setelah gel masuk ke dalam selofan, ujung selofan bagian bawah diikat dan dilanjutkan dengan penambahan cairan PBS satu kali 2 ml. Ujung selofan kemudian diikat pada ujung atasnya. Setelah itu dilakukan proses *running* pada *electroelusi* yang telah ditambahkan larutan buffer 500  $\mu$ l dengan cara meletakkan selofan tersebut pada kutub anoda katoda yang ada pada *electroelusi* dengan tegangan 125 volt, 40mA. Proses ini dilakukan kurang lebih selama 45 menit. Tujuan dari proses ini adalah memisahkan protein antigen dengan gel sehingga nantinya didapatkan cairan hasil protein antigen yang telah dimurnikan dari gel.

Cairan hasil *running* yang terdapat dalam selofan kemudian dimasukkan dalam tabung *ependorf* dan dapat disimpan pada suhu  $-30^{\circ}\text{C}$  (Rantam, 1997). Untuk memastikan protein antigen tersebut sudah murni atau tidak, hasil elusi tersebut kemudian dianalisis kembali dengan teknik SDS-PAGE.

### 3.3.7 Penentuan Konsentrasi Protein Spesifik Hasil Elusi

Penentuan kadar protein spesifik *Aeromonas hydrophila* hasil elusi dilakukan dengan menggunakan metode *Bradford protein assay* dengan penambahan larutan standar protein (BSA) dan dibaca dengan spektrofotometer U.V (*ultra violet*) *visible* dengan panjang gelombang 595 nm.

Sediakan tabung mikrosentrifus yang berisi 100 $\mu\text{l}$  sampel yang akan diperiksa kadar protein spesifiknya, masing-masing tabung ditambahkan reagen *Bradford* (1 ml coomassie brilliant blue; 0,5 mg/ml bovine serum albumin (BSA); 100 $\mu\text{l}$  0,15M NaCl) dan standart albumin 4,38 gr%, kemudian diamkan dalam suhu kamar selama 2 menit dan untuk mengukur intensitas warna yang dihasilkan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer 595 nm lalu dilakukan perhitungan kadar total protein (Bradford, 1976).

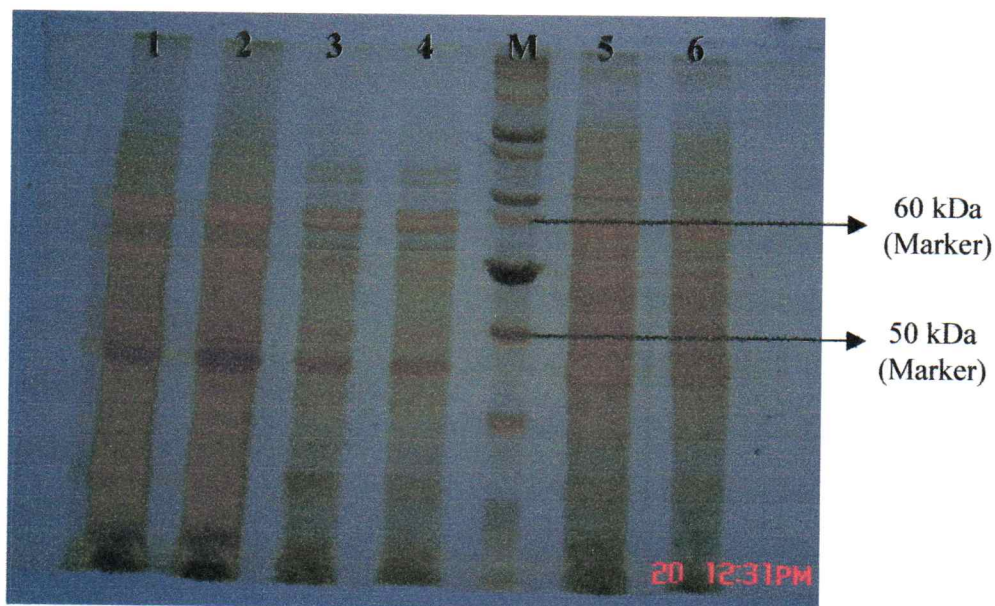


Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

## BAB 4 HASIL PENELITIAN

### 4.1 Isolasi dan Karakterisasi *whole protein Aeromonas hydrophila*

Hasil analisis protein dari *whole protein Aeromonas hydrophila* dengan menggunakan metode SDS-PAGE diperoleh 16 macam tampilan pita protein, masing-masing dengan berat molekul 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 4.1).



Gambar 4.1 Profil *whole protein Aeromonas hydrophila* dengan SDS-PAGE  
1, 2, 3, 4, 5, 6 : sampel; M : marker

Penentuan berat molekul (BM) protein tersebut dilakukan dengan perhitungan menggunakan persamaan regresi antara Rf dan Log BM melalui

program Statistical Program for Social Society (SPSS) for windows. Perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 3.

#### 4.2 Isolasi Protein dengan Teknik ELUSI dan Penentuan Konsentrasi Protein Spesifik Hasil Elusi dengan *Bradford Protein Assay*

Dari gambaran protein *Aeromonas hydrophila* hasil analisis protein dengan menggunakan teknik SDS-PAGE dan karakterisasi protein dengan menggunakan *western blotting* dijadikan acuan untuk melakukan isolasi protein menggunakan teknik preparasi *gel electrophoresis* (ELUSI). Preparasi protein difokuskan pada protein dengan berat molekul 71,4 kDa; 61,7 kDa; 53,7 kDa; 41,5 kDa; 35,2 kDa kemudian dilakukan penghitungan konsentrasi protein dengan metode *Bradford Protein Assay* dan didapatkan hasil 0,53 gr%; 0,67 gr%; 0,62 gr%; 0,63 gr%; 0,6 gr%. Perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel 4.1 Hasil pembacaan spektrofotometer protein *Aeromonas hydrophila* dengan dengan panjang gelombang 595nm

BM Protein	Absorbance
Standart albumin 4,38 gr%	0,0554
71,4 kDa	0,067
61,7 kDa	0,085
53,7 kDa	0,078
41,5 kDa	0,079
35,2 kDa	0,076

## BAB 5 PEMBAHASAN

### 5.1 Isolasi dan Karakterisasi *whole protein Aeromonas hydrophila*.

Beberapa metode elektroforesis yang digunakan untuk karakterisasi protein yaitu SDS-PAGE, *western blot*, *dot blot* dan elusi atau preparasi protein. *Polyacrilamide gel Electrophoresis* adalah merupakan standar pengujian terhadap berat molekul protein, struktur sub unit dan kemurnian protein. *Polyacrilamide* merupakan matrik pilihan untuk memisahkan protein yang berat molekulnya antara  $5-2500 \times 10^3$  Dalton. Penggunaan *polyacrilamide* dalam teknik ini memiliki keuntungan yaitu menghindarkan pita yang cembung pada gel (Wongsosupantio, 1990). Metode SDS-PAGE memiliki kelemahan mengikat protein yang dideteksi ditampilkan dalam bentuk umum, baik protein spesifik maupun protein non spesifik (Rantam, 2003). Pada SDS-PAGE, protein dielektroforesis dalam deterjen ionik yaitu *sodium dodecyle sulphate* (SDS). Deterjen ini akan mengikat residu hidrophobik dari bagian belakang peptida, salah satu dari setiap asam amino sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Dengan demikian protein SDS kompleks migrasi melalui *poliacrylamide* tergantung dari berat molekulnya.

SDS-PAGE mempunyai dua sistem yaitu *continue (webber and osbon)* dan *discontinue (Laemmli)*. Pada SDS-PAGE menampilkan profil protein dalam bentuk umum atau campuran protein, 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. Pita

protein yang terbentuk dari hasil SDS-PAGE menentukan perbedaan letak pita pada gel dengan membandingkannya pada marker protein, untuk mendapatkan berat molekul yang tepat, setelah melakukan analisis protein dengan teknik SDS-PAGE (*sodium dodecyle sulphate polyacrilamide gel*) dan didapatkan protein dengan berat molekul berbeda yang terpisah pada area gel, kemudian ditransfer dari *polyacrilamide gel* ke membran nitroselulose dengan teknik *western blotting*.

Teknik *western blotting* merupakan teknik pemindahan makro molekul dari medium gel ke atas membran setelah proses elektroforesis. Tujuannya yaitu untuk mendapatkan protein antigenik yang lebih spesifik. Metode ini sangat efektif untuk mendeteksi antigen yang mempunyai ukuran kecil dalam larutan yang banyak mengandung protein. Antibodi yang digunakan dalam teknik ini harus mempunyai spesififikasi tinggi dan memiliki daya ikat yang stabil. Teknik *western blotting* juga menggunakan membran nitroselulose untuk transfer protein. Membran nitroselulose mempunyai keunggulan dari membran yang lain yaitu mudah digunakan dan mempunyai kapasitas ikatan yang tinggi. Membran nitroselulose yang baru tahan terhadap aliran yang tinggi dan tidak mudah rapuh (Rantam, 2003).

Keuntungan metode *western blotting* adalah membran nitroselulose setelah direaksikan dengan substrat, pencucian dan pereaksi dengan antibodi dapat disimpan beberapa bulan. Metode ini juga mudah dilakukan pengecatan protein, *autoradiographi*, *colorimetric*, pada uji enzim dan *ligand binding assay*. Prinsip kerja dari western blot yaitu protein yang mempunyai berat molekul beragam, pertama kali dianalisis dengan SDS-PAGE, sehingga protein dengan berat

molekul yang berbeda akan terpisah pada area gel kemudian dilanjutkan dengan mentransfer susunan protein yang terpisah tersebut dari gel ke membran nitroselulose yang sesuai dan akhirnya dilabel dengan antibodi (Rantam, 2003). Ikatan yang terjadi antara protein antigenik dengan antibodi divisualisasikan dengan pewarnaan yang diinginkan seperti *fast red* atau *western blue* sehingga dapat diketahui informasi berat molekul dan jumlah protein yang spesifik (Harlow dan Lane, 1988).

Beberapa faktor yang mempengaruhi efektifitas western blot yaitu tebal dan macam gel yang digunakan, jenis protein, lama transfer dan macam transfer, tanpa mempengaruhi atau mengurangi reaktifitas dari protein. Proses western blot memberikan kemungkinan mendeteksi protein antigen secara radiografi, enzimatis dan imunologis (Artama, 1991 dikutip oleh Maria, 2003).

## **5.2 Isolasi Protein dengan Teknik ELUSI dan Penentuan Konsentrasi Protein Spesifik Hasil Elusi dengan *Bradford Protein Assay***

Preparasi protein dengan teknik elusi akan menghasilkan protein yang murni (*purified protein*) yang dapat digunakan Purifikasi protein akan meningkatkan spesitifitas protein dibanding dengan *whole extract*. Isolat murni yang didapatkan mempunyai potensi untuk digunakan sebagai bahan diagnostik dengan spesitifitas tinggi (Rantam, 2003). Dalam proses teknik elusi ini, gel hasil pemisahan SDS-PAGE dipotong dengan pita atau *band* yang spesifik kemudian potongan tersebut dielusi dengan cara digerus menggunakan pelarut yang cocok yang bertujuan agar protein terlepas dari gel (Wongsosupantio, 1990).



Pada tahap elusi ini dititik beratkan pada protein dengan berat molekul 71,4 kDa; 61,7 kDa; 53,7 kDa; 41,5 kDa; 35,2 kDa dan untuk keberadaan protein murni hasil isolasi protein perlu dilakukan kembali SDS-PAGE pada masing-masing protein.

Setelah protein dapat diidentifikasi dengan metode SDS-PAGE kemudian didapatkan isolat protein spesifik hasil elusi, isolat protein spesifik hasil elusi ini kemudian digunakan untuk menghitung konsentrasi protein secara kuantitatif dengan metode *Bradford protein assay*. Protein akan berikatan dengan reagen Bradford (*coomassie brilliant blue solution*) yang bereaksi dengan ikatan peptida dan akan merubah warna reagen menjadi lebih gelap dan untuk mengukur intensitas warna yang dihasilkan digunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595nm dan didapatkan hasil berturut-turut pada berat molekul 71,4 kDa; 61,7 kDa; 53,7 kDa; 41,5 kDa; 35,2 kDa adalah 0,53 gr%; 0,67 gr%; 0,62 gr%; 0,63 gr%; 0,6 gr%. Dari hasil tersebut konsentrasi tertinggi didapatkan dari fraksi protein 61,7 kDa, untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada protein spesifik *Aeromonas hydrophila* isolat lokal dengan berat molekul 61,7 kDa untuk dikembangkan sebagai bahan diagnostik penyakit ulcer disease pada ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn).

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa pada isolasi protein spesifik hasil elusi *Aeromonas hydrophila* yang diisolasi dari ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn) dengan menggunakan metode *Bradford protein assay* dengan berat molekul 71,4 kDa; 61,7 kDa; 53,7 kDa; 41,5 kDa; 35,2 kDa, menunjukkan konsentrasi proteinnya adalah 0,53 gr%; 0,67 gr%; 0,62 gr%; 0,63 gr%; 0,6 gr%. Konsentrasi protein tertinggi didapatkan dari fraksi protein 61,7 kDa.

### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada protein spesifik *Aeromonas hydrophila* isolat lokal dengan berat molekul 61,7 kDa untuk dikembangkan sebagai bahan diagnostik penyakit ulcer disease pada ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn).

## RINGKASAN

Ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn) merupakan salah satu jenis ikan tawar yang dianjurkan oleh pemerintah untuk dikonsumsi, mempunyai prospek cerah untuk dibudidayakan, harganya cukup baik dan stabil, bernilai ekonomis, termasuk salah satu komoditas sektor perikanan air tawar yang terus berkembang pesat dari waktu ke waktu, pemeliharaannya mudah, kemampuan tumbuh kembangnya sangat cepat, dan relatif tahan terhadap berbagai kondisi lingkungan, ikan mas juga kaya protein hewani serta mempunyai daging yang lezat.

Ikan mas juga dapat terserang penyakit seperti ikan-ikan lain salah satunya bakteri patogen yaitu *Aeromonas hydrophila*, namun pengendaliannya sampai saat ini masih mengandalkan desinfektan dan antibiotik meskipun tingkat keberhasilannya masih terbatas. Penggunaan senyawa antibiotika yang berlebihan telah meningkatkan kekhawatiran terhadap keamanan pangan dan kesehatan masyarakat, selain itu pencegahan dengan menggunakan antibiotika juga dapat memacu munculnya resistensi antibiotika pada berbagai bakteri, oleh karena itu diperlukan strategi pengendalian penyakit akuakultur yang lebih baik lagi antara lain dengan pencegahan melalui program vaksinasi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar protein spesifik hasil elusi *Aeromonas hydrophila* yang diisolasi dari ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn) yang dilakukan dengan menggunakan metode *Bradford protein assay*. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat melengkapi data dan dapat dijadikan untuk penajakan dalam studi awal pembuatan *diagnostik kit* melalui pemeriksaan

antibodi dengan uji imunologik yang mempunyai sensitifitas dan spesifitas tinggi.

Isolat lokal *Aeromonas hydrophila* dikoleksi dari kulit, ginjal dan intestinum ikan mas yang diduga terinfeksi bakteri tersebut yang dibiakkan dengan media khusus TSA. Sedangkan *whole protein* diperoleh dari hasil sonikasi dengan media khusus TSA. Sedangkan *whole protein* diperoleh dari hasil sonikasi dengan frekuensi 25 kHz selama 4 menit lalu dihentikan selama 1 menit, proses sonikasi ini dilakukan 4 kali. *Whole protein* digunakan untuk imunisasi kelinci dan dilakukan analisis protein dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk memperoleh profil protein bakteri *Aeromonas hydrophila* dan penentuan protein yang immunogenik dengan menggunakan *Western blotting*. Tahap berikutnya dilakukan purifikasi dengan teknik preparasi gel elektroforesis (elusi). Cairan hasil elusi tersebut kemudian ditentukan konsentrasi protein spesifiknya dengan metode *Bradford protein assay* dan dibaca dengan spektrofotometer U.V (*ultra violet*) *visible* dengan panjang gelombang 595 nm.

Penelitian ini berhasil menunjukkan bahwa pada isolasi protein protein spesifik hasil elusi *Aeromonas hydrophila* yang diisolasi dari ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn) dengan menggunakan metode *Bradford protein assay*, konsentrasi protein tertinggi didapatkan dari fraksi protein 61,7 kDa yaitu 0,67 gr%. Berdasarkan hasil penelitian ini maka disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut pada protein spesifik *Aeromonas hydrophila* isolat lokal dengan berat molekul 61,7 kDa untuk dikembangkan sebagai bahan diagnostik penyakit ulcer disease pada ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn).

## DAFTAR PUSTAKA

- Adisukresno, S. 1994. Petunjuk Pelaksanaan Penanggulangan Penyakit Ikan. Direktorat Jenderal Perikanan. Direktori Bina Sumber Hayati. Jakarta.
- Aoki, T. 1999. Motil Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). Fish Disease Disorders, vol 3: Viral, Bacterial and Fungal Infection. Editor P.T.K. Woo and D.W. Bruno). Cab International.
- Austin, B and Austin, D.A. 1999. Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish 3<sup>rd</sup>. Springer Praxis. Goldming
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem. <http://www-class.unl.edu/biochem/protein-assay/bradford-assay.htm> [29 Agustus 2006]
- Cipriano, R.C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonad Septicemias of Fish. United States Department of The Interior. Washington.
- Cowan and Steel's, 1974. Manual for The Identification of Medical Bacteria. Second Edition. Cambridge University Press. Cambridge New York.
- Djarajah, A. S. 2001. Pembenuhan Ikan Mas. Kanisius. Yogyakarta
- Driyer, R.L. 1993. Biokimia Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Esteve, C., Elena, A., Rocio, C., Susana, M., Dolores, B., Maria and J.F., Juan, M.T. 2004. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* Serogrup O:14 and O:81 Strains with an S Layer. American Society for Microbiology.
- Franson. 1992. Anatomy & Physiology of Farm Animal 4 thred. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Haburchak, D.R. 1996. *Aeromonas hydrophila*: An Underappreciated Danger to Fisherman. *Infections in Medicine*. 13(10):893-896
- Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hartiko, H. 1988. Ekspresi genetik & Pengendaliannya. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

- Hayes, J. 2000. MB592 – Disease Of Fish. *Aeromonas hydrophila*. Spring Term 2000 Project. Oregon State University.. <http://hmssc.oregonstate.edu/classes/MB492/hydrophilahayes>. [8 Agustus 2006]
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. William. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriologi*. Ninth Edition. Williams & Wilkins. A. Waverly Company. USA.
- Holm, J.A. 1999. Disease Prevention and Control. In Willoughby (Ed.). *Manual of Salmoning Farming*. Blacwell Science. London.
- Irianto, A. 2003. *Probiotik Akuakultur*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Khairuman, D. Sudenda dan B. Gunadi. 2002. *Budidaya Ikan Mas Secara Intensif*. Agro media Pustaka. Tangerang.
- Khairuman dan Amri K. 2002. *Membuat Pakan Ikan Konsumsi*. PT. Agromedia Pustaka. Jakarta
- Korkoca, H and Boynukara, B. 2003. The Characterization of Protein Profiles of The *Aeromonas hydrophila* and *A. cavie* Strains Isolated from Gull and Rainbow Trout Faeces by SDS-PAGE. *Turk J Vet Anim Sci*.
- Kordi, K dan Ghufran, H. 2004. *Penanggulangan Hama Dan Penyakit*. Penerbit Bina Adiaksara. Jakarta.
- Madigan, M.T, J.M. Martinko and J. Parker. 2000. *Biology of Microorganism* 9<sup>th</sup> Edition. Pretice Hall International Inc. USA (New Jersey).
- Mani, S., Sadigh, M. and Andriole V.T. 1995. Clinical spectrum of *Aeromonas hydrophila* infections: Report of 11 cases in a community hospital and review. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 4:79-86.
- Maria, A.P. 2003. *Profil Protein Antigen Larva Stadium Kedua (L<sub>2</sub>) Cacing *Toxocara vitulorum**. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Moeller, R.B.Jr., 1996. *Disease of Fish*. Armed Forces Institute of Pathology Washington, D.C. DVM LTC, VC, USA. <http://www.afip.org/vetpath/POLA/POLA96/fish.txt>.
- Musher, D.M. 1980. Cutaneous and soft-tissue manifestations of sepsis due to gram-negative enteric bacilli. *Rev. Infect. Dis.* 2:854–866.

- Nabib R. dan F. Pasaribu. 1989. Patologi dan Penyakit Ikan. Departemen P dan K. Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB.
- Rahayu, S.A. 1988. Biosintesa RNA pada Organisme Eukariotik. PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Rantam, F.A. 1997. *Borna Virus and Cell Culture. Isolation Infections Bornavirus from Human and Animal and Their Characterization*. Diss. Vet. Med. FV-Berlin.
- Rantam, F.A. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Ryandini, D., T.B. Suparyana dan S. Priyanto. 2004. Sensitivitas *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas fluorescens* Terhadap Ekstrak Polar Kayu Bengkirai. Proceeding Seminar Penyakit Ikan dan Udang Purwokerto. Kelompok B.
- Sitanggang, M. 2002. Mengatasi Penyakit dan Hama pada Penyakit Ikan. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Stoskopf, M.K. 1993. Fish Medicine. W.B. Sounder Comp. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sidney, Tokyo.
- Subasinghe, R. 1997. Fish Health and Quarantine In: Rewiev of the World Aquaculture. FAO Fisheries Circular No. 886. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Roma. Italy. <http://www.fao.org/DOCREP/003/W7499E/w7499e23.htm>.
- Supriyadi, H dan Tim Lentera. 2004. Membuat Ikan Hias Tampil Sehat dan Prima. PT Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Susanto, H. 2002. Kiat budidaya Ikan Mas di Lahan Kritis. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Santoso, B. 1993. Budidaya Ikan Mas. Kanisius. Yogyakarta
- Suseno, D. 2003. Pengelolaan Usaha Pembenuhan Ikan Mas. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Swann, L. 1991. Diagnosis and Treatment of *Aeromonas hydrophila* Infection of Fish. Animal Disease Diagnostic Laboratory. Purdue University. Illinois

- Tjahjaningsih. W, Sarmanu, Handiyanto. D, Ernawati R, Widjaja. S.N. 1999. Kajian Daya Proteksi Ikan Mas (*Cyprinus carpio Linn*) setelah perendaman dengan bakterin *Aeromonas hydrophila*. Jurnal Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- WHO. 1998. Antimicrobial Resistance. Fact sheet No. 194. World Health Organization. Geneva. Switzerland. (<http://www.who.int/inf-fs/en/fact194.html>)
- 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 and Disorders. Vol 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing.
- Yuliani, M.G.A., Bijanti. R, Wahyuni. R.S, dan Tyasningsih. W. 2006. Karakterisasi Protein spesifik *S-layer Aeromonas hydrophila* sebagai bahan diagnostik *Ulcer Disease* pada Ikan Mas. Universitas Airlangga. Surabaya.



### **Lampiran 1 : Isolasi dan identifikasi *Aeromonas hydrophila***

Isolasi dan identifikasi *Aeromonas hydrophila* dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dengan langkah-langkah sebagai berikut :

Isolat lokal *Aeromonas hydrophila* dikoleksi dari kulit, ginjal dan intestinum ikan mas yang diduga terinfeksi bakteri tersebut yang dikultur dengan media khusus TSA diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam, jika pada media TSA terdapat bentukan koloni berwarna putih, bundar dengan tepi rata maka dilakukan pemeriksaan mikroskopis, uji biokimia dan uji gula-gula untuk memastikan koloni tersebut adalah *Aeromonas hydrophila*.

#### Pemeriksaan mikroskopis :

Hasil pemeriksaan mikroskopis dengan perbesaran 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 flagella yang keluar dari salah satu kutubnya.

#### Uji Biokimia :

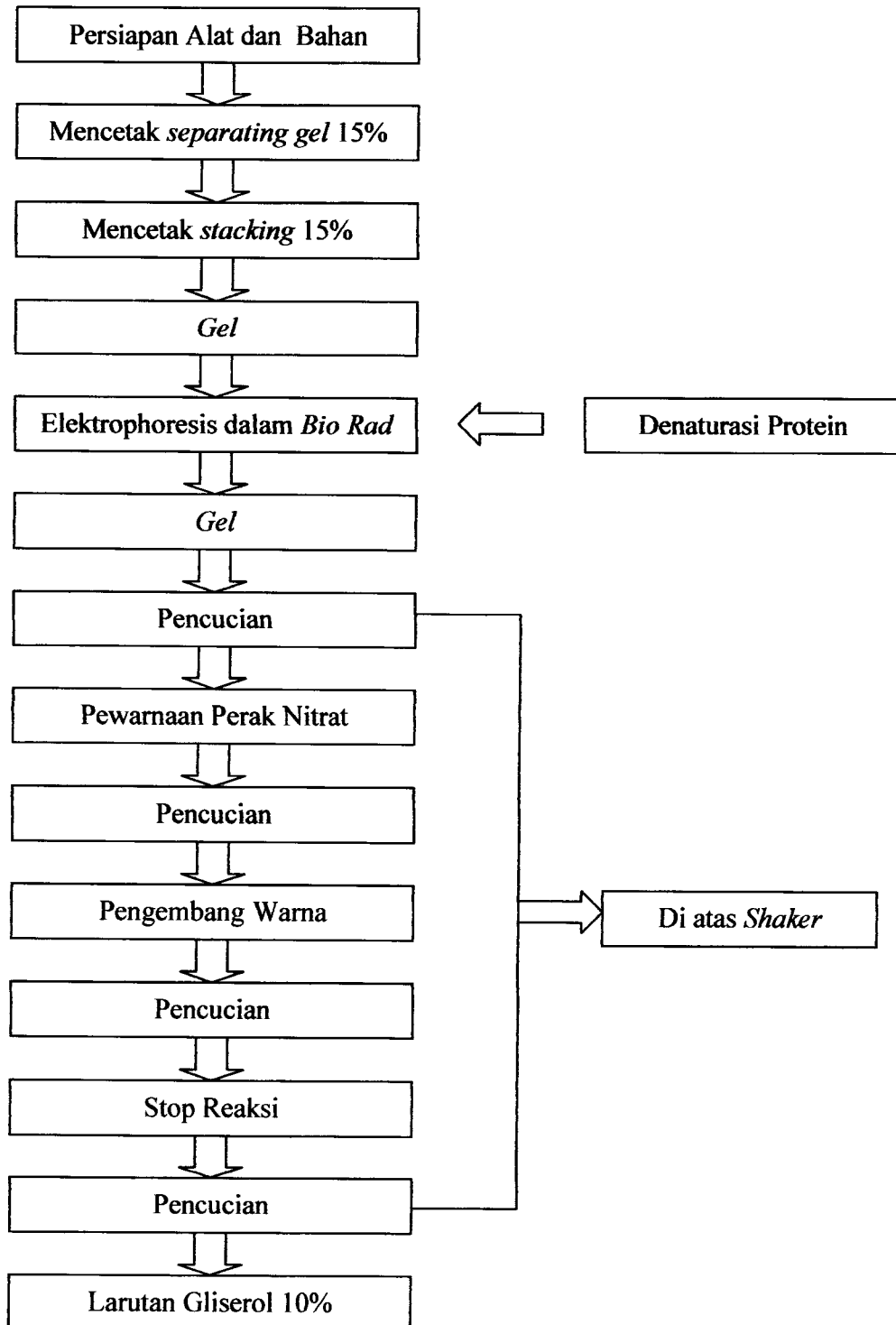
Pengujian biokimia yang dilakukan antara lain dengan menggunakan media *Triple Sugar Iron Agar*(TSIA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Simon Citrat Agar* dan *Urease*.

Hasil uji biokimia menunjukkan :

1. Uji TSIA : asam/asam, gas negatif, H<sub>2</sub>S negatif
2. SIM : indol positif, motilitas positif
3. Simon Sitrato Agar : negatif
4. Urease : negatif

Uji gula-gula :

Uji gula-gula yang dilakukan antara lain : glukosa positif; laktosa positif; maltosa positif; sukrosa negatif; manitol positif

**Lampiran 2 : Diagram SDS-PAGE 15%**

**Lampiran 3 : Komposisi bahan-bahan yang digunakan dalam SDS-PSGE 15%****1. Komposisi Running gel 15%**

Akrilamid	3,125	ml
Tris HClxPH 8,8	1,2	ml
SDS 0,5%	1,2	ml
Aquades	1,1	ml
Temed	5	μl
APS 10%	30	μl

**2. Komposisi Stacking gel 15%**

Akrilamid	0,825	ml
Tris HClxPH 8,8	0,8	ml
SDS 0,5%	0,8	ml
Aquades	0,8	ml
Temed	4	μl
APS 10%	20	μl

**3. Komposisi Pencucian****Pencucian I**

Metanol	25	ml
Aquadest	71,25	ml
Acetic acid	3,75	ml

**Pencucian II**

Metanol	25	ml
Aquadest	93,75	ml
Acetic acid	3,75	ml

**Pencucian III**

Glutaraldeid 10% (Glutaral 10 ml + Aquadest 90 ml)

## 4. Pewarnaan

AgNO<sub>3</sub> 0,8 ml ditambahkan dengan 4 ml aquadest

NaOH 0,36%            21    ml

NH<sub>3</sub>                      1,4   ml

Aquadest                73,5 ml

## 5. Pengembang warna

Formaldehid 3,7%    50    µl

Zitroensaure         100   µl

Aquadest               100   ml

## 6. Stop reaksi

Acetic acid 10%      1      ml

Aquadest               90    ml

Glycerol               10    ml

Aquadest               90    ml

## 7. Buat TBS pH 7,5

0,02 M Tris HCl        0,315 g

0,5 M NaCl             2,922 g

Aquadest            ad     100   ml

Tween 20 0,05%      0,1    ml

## 8. Buat Blocking Buffer dengan pH 7,4

NaCl 0,9%             0,9    g

Tris HCl 10M         0,157 g

Aquadest            ad     100   ml

### Lampiran 4 : Hasil perhitungan Berat Molekul (BM) protein *Aeromonas hydrophila* pada Gel SDS-PAGE

Penghitungan Nilai Rf untuk Mencari Hubungan antara Rf dan log BM (Dalton)

Jarak Marker	Rf*	BM (y KDa)	BM (y Da)	log y (Da)
10,0	0,096	200,0	200000	5,301
12,5	0,120	150,0	150000	5,176
17,0	0,163	120,0	120000	5,079
23,0	0,221	100,0	100000	5,000
26,5	0,255	85,0	85000	4,929
34,5	0,332	70,0	70000	4,845
38,0	0,365	60,0	60000	4,778
47,5	0,457	50,0	50000	4,699
58,0	0,558	40,0	40000	4,602
74,0	0,712	30,0	30000	4,477
90,0	0,865	20,0	20000	4,301
93,5	0,899	15,0	15000	4,176
103,0	0,990	10,0	10000	4,000

\*Rf = Jarak marker/Panjang Gel; Panjang Gel = 104 mm.

### Summarize

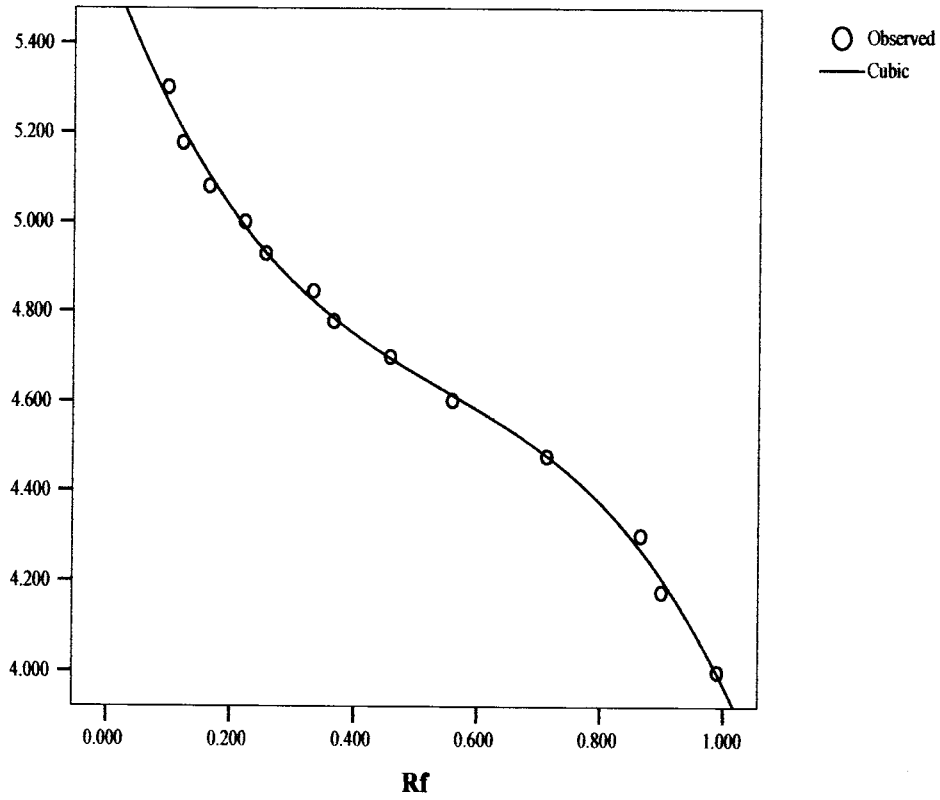
#### Case Summaries <sup>a</sup>

	Rf (x)	Log BM (y)
1	,096	5,301
2	,120	5,176
3	,163	5,079
4	,221	5,000
5	,255	4,929
6	,332	4,845
7	,365	4,778
8	,457	4,699
9	,558	4,602
10	,712	4,477
11	,865	4,301
12	,899	4,176
13	,990	4,000
Total	N	13
	Sum	61,363
	Mean	4,72023
	Std. Deviation	,395681

a. Limited to first 100 cases.

**Curve Fit**

**Log BM**



**Regression****Cubic****Model Summary**

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,999	,997	,996	,024

The independent variable is Rf.

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1,873	3	,624	1063,123	,000
Residual	,005	9	,001		
Total	1,879	12			

The independent variable is Rf.

**Coefficients**

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf	-3,633	,307	-2,868	-11,820	,000
Rf** 2	5,212	,676	4,492	7,711	,000
Rf** 3	-3,181	,426	-2,672	-7,473	,000
(Constant)	5,571	,038		146,704	,000



**Penghitungan BM sampel**

Jarak sampe l	Rf*	log y Da ( $y=5,517-3,633x+5,212x^2-3,181x^3$ )	antilog y (BM) Da	BM kDa	Pita Protein ke-
11,0	0,106	5,241	174180,7	174,2	1
12,0	0,115	5,216	164437,2	164,4	2
22,0	0,212	5,006	101391,1	101,4	3
27,0	0,260	4,923	83752,9	83,8	4
32,0	0,308	4,854	71449,6	71,4	5
33,5	0,322	4,835	68391,2	68,4	6
37,5	0,361	4,790	61659,5	61,7	7
40,0	0,385	4,764	58076,4	58,1	8
43,5	0,418	4,730	53703,2	53,7	9
47,0	0,452	4,700	50118,7	50,1	10
51,5	0,495	4,664	46131,7	46,1	11
57,5	0,553	4,618	41495,4	41,5	12
61,0	0,587	4,591	38994,2	39,0	13
66,5	0,639	4,547	35237,1	35,2	14
76,5	0,736	4,453	28379,2	28,4	15
85,0	0,817	4,347	22233,1	22,2	16

\*Rf = Jarak marker/Panjang Gel; Panjang Gel = 104mm.

### Lampiran 5 : Pemeriksaan kadar protein spesifik hasil elusi *Aeromonas hydrophila*

Data pembacaan kadar protein *Aeromonas hydrophila* dengan spektrofotometer U.V (*ultra violet*) *visible* dengan panjang gelombang 595 nm.

BM Protein	Absorbance
Standart albumin 4,38 gr%	0,0554
71,4 kDa	0,067
61,7 kDa	0,085
53,7 kDa	0,078
41,5 kDa	0,079
35,2 kDa	0,076

Kadar total protein (gr%) =  $\frac{\text{Absorbance sampel}}{\text{Absorbance standart}} \times \text{konsentrasi standart protein}$

$$\text{Protein 71,4 kDa} = \frac{0,067}{0,0554} \times 4,38 \text{ gr\%} = 0,53 \text{ gr \%}$$

$$\text{Protein 61,7 kDa} = \frac{0,085}{0,0554} \times 4,38 \text{ gr\%} = 0,67 \text{ gr\%}$$

$$\text{Protein 53,7 kDa} = \frac{0,078}{0,0554} \times 4,38 \text{ gr\%} = 0,62 \text{ gr\%}$$

$$\text{Protein 41,5 kDa} = \frac{0,079}{0,0554} \times 4,38 \text{ gr\%} = 0,63 \text{ gr\%}$$

$$\text{Protein 35,2 kDa} = \frac{0,076}{0,0554} \times 4,38 \text{ gr\%} = 0,60 \text{ gr\%}$$