

**SKRIPSI**

**DETEKSI *Aeromonas hydrophila* PADA GINJAL MENCIT  
(*Mus musculus*) DENGAN TEKNIK  
IMUNOHISTOKIMIA**



**Oleh :**

**INTAN GALUH BINTARI**  
**NIM 061211133058**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2016**

**DETEKSI *Aeromonas hydrophila* PADA GINJAL MENCIT  
(*Mus musculus*) DENGAN TEKNIK  
IMUNOHISTOKIMIA**

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Oleh

**INTAN GALUH BINTARI**

NIM 061211133058

Menyetujui

Komisi Pembimbing,

**Prof. Dr. Anwar Ma'ruf, drh., M.Kes**  
Pembimbing Utama

**Dr. Sri Mulvati, drh., M.Kes**  
Pembimbing Serta

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**Deteksi *Aeromonas hydrophila* pada Ginjal Mencit (*Mus musculus*) dengan Teknik Imunohistokimia**

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, Februari 2016



Intan Galuh Bintari  
NIM 061211133058

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 27 Januari 2016

**KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN**

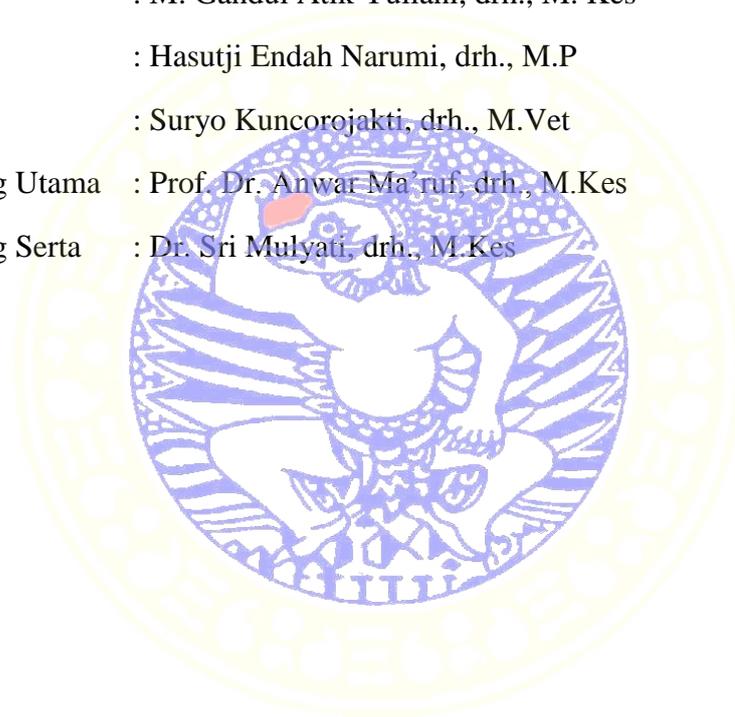
Ketua : M. Gandul Atik Yuliani, drh., M. Kes

Sekretaris : Hasutji Endah Narumi, drh., M.P

Anggota : Suryo Kuncorojakti, drh., M.Vet

Pembimbing Utama : Prof. Dr. Anwar Maruf, drh., M.Kes

Pembimbing Serta : Dr. Sri Mulyati, drh., M.Kes



Telah diuji pada

Tanggal : 10 Februari 2016

**KOMISI PENGUJI SKRIPSI**

Ketua : M. Gandul Atik Yuliani, drh., M. Kes

Anggota : Hasutji Endah Narumi, drh., M.P

Suryo Kuncorojakti, drh., M.Vet

Prof. Dr. Anwar Ma'rif, drh., M.Kes

Dr. Sri Mulyati, drh., M.Kes



Surabaya, Februari 2016

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes.  
NIP. 195601051986011001

**DETECTION OF *Aeromonas hydrophila* IN KIDNEY'S MICE (*Mus musculus*) WITH IMMUNOHISTOCHEMISTRY TECHNIQUE**

**ABSTRACT**

This research was aimed to determine whether the *Aeromonas hydrophila* can be detected by using immunohistochemistry technique. Immunohistochemistry was a process to detect antigens (proteins, carbohydrates, etc.) towards the cells of the tissues with antibodies reaction principle that binded to antigen in the tissues. The parameter of this research was an interaction between antigens and antibodies which were visualized by the appearance of brown color in the kidneys which were infected by *Aeromonas hydrophila*. The three-month old mice (*Mus musculus*) with 30 grams of weight were infected by *Aeromonas hydrophila* with  $10^6$  CFU/ml of doses. After a week, the kidneys were prepared for histopathology preparation by using immunohistochemistry staining. The primary antibodies used were rabbits' antibodies (*New zealand white*) with two treatments (P1 and P2). P1 was infected by using specific proteins of *Aeromonas hydrophila* 30 kDa and P2 was infected by using the whole proteins of *Aeromonas hydrophila*. The results were showed by comparing P1 and P2. The results showed that there was a difference in the brown color which was more through in P2 compared to P1.

**Keyword:** *Aeromonas hydrophila*, Mice (*Mus musculus*), Antigens, Immunohistochemistry Technique.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT karena atas ridhonya penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi mengenai **Deteksi *Aeromonas hydrophila* pada Ginjal Mencit (*Mus musculus*) dengan Teknik Imunohistokimia.**

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu secara langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan skripsi ini, antara lain:

Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Bapak Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes dan juga kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga periode sebelumnya, Ibu Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak Prof. Dr. Anwar Ma'ruf, drh., M.Kes. selaku dosen pembimbing utama dan Ibu Dr. Sri Mulyati, drh., M.Kes. selaku dosen pembimbing serta atas segala arahan, informasi, bimbingan, dan kesabarannya sampai dengan selesainya penelitian ini.

Ibu M. Gandul Atik Yuliani, drh., M. Kes selaku ketua penilai dan juga selaku dosen pembimbing penelitian, Ibu Hasutji Endah Narumi, drh., M.P selaku sekretaris penilai dan Bapak Suryo Kuncorojakti, drh., M.Vet selaku anggota penilai atas segala saran dan arahan yang telah diberikan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Ibu Suzanita Utama, drh., M.Phil., Ph.D selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan selama menempuh kegiatan perkuliahan dan membantu memberikan masukan yang bermanfaat bagi penulis selama menempuh S1 di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Seluruh Bapak Ibu Dosen atau Staf Pengajar yang telah banyak memberi ilmu dan pengalaman selama menempuh kegiatan perkuliahan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Seluruh Bapak Ibu Staf Kependidikan, Bagian Kemahasiswaan, Bagian Akademik, Bagian Keuangan, Bagian Tata Usaha, dan Bagian Sistem Informasi yang telah banyak membantu selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Kepada Kedua orangtua: Bapak Ir. H. Soedarminto, Ibu Joice Liliani, dan kedua saudara: Ineke Permatasari dan Risang Abiseka Wijaya atas limpahan doa dan pengorbanan yang tak henti-hentinya, kasih sayang, ketulusan cinta, kepercayaan, semangat serta kebahagiaan selama hidup penulis.

Teman-teman seperjuangan penelitian saya, Ratna dan Rani yang senantiasa bekerja sama, menemani dalam suka maupun duka selama penelitian berlangsung sehingga menjadi lebih dekat satu sama lain. Tika, Binar, Dewi, Bella dan Nisrina yang menyemangati dikala saya sedang tidak semangat dan membuat hari-hari kuliah menjadi lebih indah.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat kesalahan dan kekurangan pada skripsi ini, untuk itu mohon kritik dan saran yang membangun demi perbaikan di masa mendatang. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya semua pihak yang membutuhkan.

Surabaya, Februari 2016

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iii
HALAMAN IDENTITAS .....	iv
ABSTRACT.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	3
1.3 Landasan Teori.....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	5
1.6 Hipotesis.....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	6
2.1.1 Klasifikasi .....	7
2.1.2 Morfologi dan karakteristik <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	7
2.1.3 Isolasi dan identifikasi.....	8
2.1.4 Patogenesis <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	9
2.2 <i>Outer Membrane Protein (OMP) Aeromonas hydrophila</i> .....	10
2.3 Sistem Imun .....	11
2.4 Imunisasi .....	13
2.5 Antigen .....	15
2.6 Antibodi.....	17
2.7 Imunohistokimia .....	17
2.8 Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	19
2.9 Ginjal.....	20
2.9.1 Makroskopis ginjal.....	20
2.9.2 Mikroskopis ginjal .....	21
2.9.3 Fungsi ginjal.....	24
<b>BAB 3 MATERI DAN METODE</b>	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	25
3.2 Bahan dan Alat .....	25
3.2.1 Bahan penelitian.....	25

3.2.2 Alat penelitian .....	25
3.2.3 Hewan percobaan .....	26
3.2.4 Kandang penelitian.....	26
3.3 Variabel yang Diamati .....	27
3.4 Definisi Operasional Variabel.....	27
3.5 Metode Penelitian.....	28
3.5.1 Kultur Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	28
3.5.2 Imunisasi pada kelinci untuk mendapatkan antibodi primer .....	28
3.5.3 Infeksi <i>Aeromonas hydrophila</i> pada mencit ( <i>Mus musculus</i> ).....	29
3.5.4 Pengambilan Sampel.....	29
3.5.5 Perlakuan.....	29
3.5.5.1 Perlakuan pada mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	29
3.5.5.2 Perlakuan pada kelinci.....	29
3.5.4 Metode Pewarnaan Imunohistokimia.....	30
3.6 Kerangka Operasional.....	31
BAB 4 HASIL PENELITIAN .....	33
BAB 5 PEMBAHASAN .....	38
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN .....	
6.1 Kesimpulan .....	41
6.1 Saran.....	41
RINGKASAN .....	42
DAFTAR PUSTAKA .....	44
LAMPIRAN.....	50

## DAFTAR GAMBAR

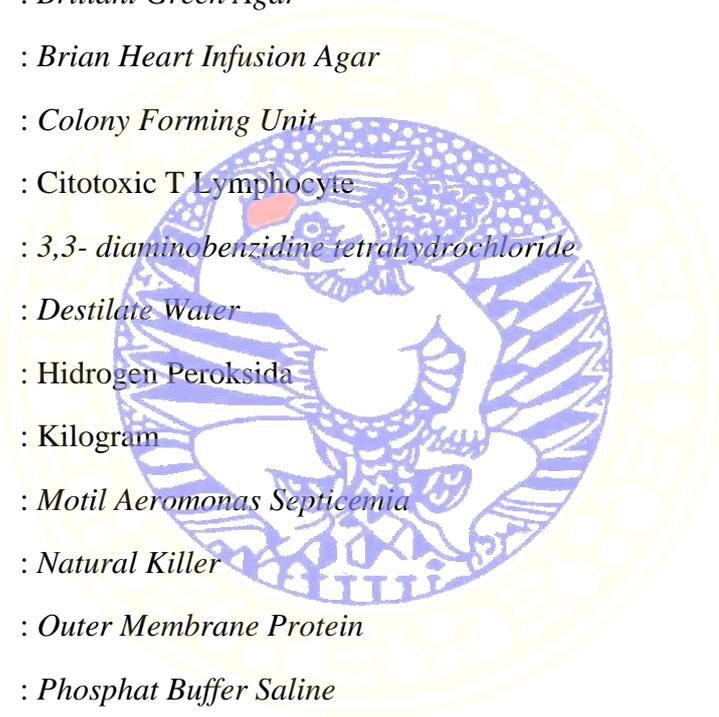
Gambar	Halaman
2.1 <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	7
2.2 Skema <i>Outer Membrane Protein</i> .....	10
2.3 Interaksi antara antigen dengan antibodi .....	18
2.4 Struktur anatomi ginjal .....	21
2.5 Struktur mikroskopik glomerulus dan sel sel tubulus ginjal.....	22
3.1 Diagram alir penelitian (Tahap I).....	31
3.3 Diagram alir penelitian (Tahap II).....	32
4.1 Glomerulus dan tubulus ginjal mencit kontrol pembesaran 400x dengan pewarnaan imunohistokimia.....	35
4.2 Glomerulus dan tubulus ginjal mencit perlakuan 1 pembesaran 100x dengan pewarnaan imunohistokimia .....	35
4.3 Glomerulus dan tubulus ginjal mencit perlakuan 1 pembesaran 400x dengan pewarnaan imunohistokimia .....	36
4.4 Glomerulus dan tubulus ginjal mencit perlakuan 2 pembesaran 100x dengan pewarnaan imunohistokimia .....	36
4.5 Glomerulus dan tubulus ginjal mencit perlakuan 2 pembesaran 400x dengan pewarnaan imunohistokimia.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur pembuatan preparat histopatologi ginjal mencit.....	50
2. Prosedur pewarnaan imunohistokimia preparat histopatologi ginjal mencit.....	52
3. Prosedur teknik imunohistokimia .....	53
4. Gambar bahan dan alat penelitian.....	55
5. Gambar penelitian.....	56



**SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG**



APC	: <i>Antigen Presenting Cells</i>
BGA	: <i>Briliant Green Agar</i>
BRIA	: <i>Brian Heart Infusion Agar</i>
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
CTL	: <i>Citotoxic T Lymphocyte</i>
DAB	: <i>3,3- diaminobenzidine tetrahydrochloride</i>
DW	: <i>Destilate Water</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: <i>Hidrogen Peroksida</i>
Kg	: <i>Kilogram</i>
MAS	: <i>Motil Aeromonas Septicemia</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
OMP	: <i>Outer Membrane Protein</i>
PBS	: <i>Phosphat Buffer Saline</i>
SA-HRP	: <i>Strep avidin horseradish peroxidase</i>
SIM	: <i>Sulfite Indol Motility</i>
TSA	: <i>Tryptic Soya Agar</i>



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Sumber daya perikanan yang dimiliki oleh Indonesia sangat beragam dan memiliki banyak potensi, diantaranya budidaya laut dan tambak atau payau yang mengarah untuk kemajuan perekonomian Indonesia (Juanti dkk., 2014). Salah satu sumber pertumbuhan ekonomi andalan adalah budidaya ikan yang diwujudkan melalui sistem budidaya yang berdaya saing (Sukadi, 2002).

Kegiatan budidaya ikan merupakan usaha manusia untuk mengelola faktor- faktor budidaya, hama, dan penyakit organisme (Reksono dkk., 2012). Menurut Wiyanto (2010), indikator keberhasilan dalam usaha budidaya ikan salah satunya adalah kesehatan ikan yang terkait dengan pemeliharaan lingkungan dan daya tahan terhadap serangan bakteri patogen. Salah satu bakteri yang umum dijumpai pada ekosistem perairan dan mempunyai peranan sebagai mikrobial flora bagi organisme air pada kondisi lingkungan yang stabil yaitu bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit yang berbahaya pada budidaya ikan air tawar. Bakteri tersebut banyak menyerang ikan mas yang merupakan salah satu komoditas unggulan air tawar dan dapat menginfeksi ikan pada semua ukuran yang dapat menyebabkan kematian hingga mencapai 80 %, sehingga mengakibatkan kerugian yang sangat besar dalam usaha budidaya ikan air tawar (Sanoesi, 2008).

*Aeromonas hydrophila* melimpah pada lingkungan air tawar terutama dengan kandungan bahan organik yang tinggi. Infeksi bakteri ini bersifat oportunistik, yaitu infeksi yang biasanya tidak menyebabkan penyakit pada hewan dengan sistem kekebalan tubuh yang normal, tetapi dapat menyerang hewan dengan sistem kekebalan tubuh yang buruk. Infeksi *Aeromonas hydrophila* dapat dikenali karena adanya luka-luka eksternal (*ulcer*), terdapat bercak perdarahan pada daerah latero-ventral tubuh dan sirip serta sisik terkelupas (Wijyaning dan Wahyu, 2008).

*Aeromonas hydrophila* memiliki *Outer Membrane Protein* (OMP) yang merupakan protein pada bagian dinding sel bakteri gram negatif yang berhubungan dengan sifat virulensi dan bersifat imunogenik. *Outer Membrane Protein* (OMP) bakteri memainkan peran penting dalam virulensi karena OMP merupakan lapisan permukaan terluar dari sel yang juga terlibat pada induksi faktor kekebalan dalam pertahanan. OMP terletak pada lapisan paling luar bakteri yang penting untuk respon kekebalan bagi *host* dan sebagai target untuk obat terapi. Baru-baru ini, banyak perhatian mengenai OMP sebagai sebuah potensial yang sangat penting dalam komponen vaksin (Thangviji *et al.*, 2012).

Penelitian tentang *Outer Membrane Protein* (OMP) telah banyak diteliti dalam usaha mendapatkan antigen yang dapat diandalkan baik untuk diagnosis maupun untuk vaksin. Beberapa penelitian menggunakan hewan coba kelinci ataupun mencit. Digunakan hewan coba kelinci untuk memudahkan pengambilan darah dan pemeliharaan. Beberapa penelitian juga menggunakan organ ginjal sebagai sampel percobaan hal ini dikarenakan ginjal merupakan organ

hematopoetik dan predileksi dari *Aeromonas hydrophila* pada hewan coba. Di dalam penelitian ini penulis ingin melakukan penelitian mengenai reaktivitas *Outer Membrane Protein* (OMP) *Aeromonas hydrophila* pada ginjal mencit (*Mus musculus*) dengan teknik Imunohistokimia untuk mengetahui adanya interaksi antigen dengan antibodi pada ginjal mencit (*Mus musculus*) secara mikroskopis. Selain itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas teknik imunohistokimia dalam mendeteksi adanya *Aeromonas hydrophila* pada preparat histopatologi.

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut dapat dirumuskan masalah yaitu apakah *Aeromonas hydrophila* dapat terdeteksi pada jaringan histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) dengan menggunakan teknik Imunohistokimia?

## 1.3 Landasan Teori

Patogenesis bakteri untuk menimbulkan suatu penyakit, secara umum ada dua tahap. Pada tahap pertama bakteri akan melakukan perlekatan ke sel inang, pada perlekatan awal diperankan oleh filii, setelah itu dilanjutkan dengan perlekatan melalui *outer membrane* sel (Mufida dkk., 2006).

*Outer membrane protein* (OMP) bakteri gram negatif adalah beberapa protein yang merupakan bagian dinding sel bakteri gram negatif yang berhubungan dengan sifat virulensi (Kushiramani *et al.*, 2008) dan bersifat imunogenik. Dalam skala laboratorium OMP terbukti merupakan komponen

vaksin yang potensial mengendalikan penyakit ikan karena OMP bakteri gram negatif mengandung lipoprotein dan berbagai faktor virulensi seperti siderofor, hemolysin, porin dan adhesin yang merupakan antigenik dan imunogenik kuat (Desrina dkk., 2011).

Apritya (2008) menyatakan bahwa terdapat dua kelompok senyawa yang dijumpai secara alamiah yang jelas bersifat imunogenik artinya mempunyai kemampuan untuk merangsang respons kekebalan. Senyawa yang dimaksud adalah protein dan polisakarida. Protein pada umumnya lebih efektif dalam merangsang pembentukan antibodi dibandingkan dengan polisakarida.

Metode deteksi antigen dan antibodi telah banyak dikembangkan salah satunya adalah teknik imunohistokimia. Imunohistokimia adalah gabungan antara diagnosis histopatologi dengan diagnosis imunokimia yaitu diagnosis yang melibatkan reaksi antigen antibodi membentuk antigen kompleks (Putu dkk., 2009).

Imunohistokimia diartikan sebagai suatu metode untuk mendeteksi suatu molekul yang ada dalam jaringan dengan menggunakan antibodi poliklonal atau monoklonal terhadap molekul yang akan dideteksi (merupakan reaksi antigen-antibodi) dan dapat memberikan gambaran kualitatif dari intensitas warna yang terbentuk maupun gambaran kuantitatif. Teknik imunohistokimia dapat digunakan untuk mempelajari distribusi enzim yang spesifik pada struktur sel intak (normal/lengkap), mendeteksi komponen sel, biomakromolekul seperti protein, karbohidrat (Balqis dkk., 2011).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya *Aeromonas hydrophila* pada ginjal mencit (*Mus musculus*) dan mengetahui adanya interaksi antara antigen dengan antibodi pada jaringan histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) dengan menggunakan teknik Imunohistokimia.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang efektivitas teknik Imunohistokimia dalam mendeteksi adanya *Aeromonas hydrophila* pada ginjal mencit (*Mus musculus*) dan dapat memberikan informasi tentang interaksi antigen dengan antibodi pada jaringan mikroskopis ginjal mencit (*Mus musculus*). Selain itu, penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi dalam penelitian selanjutnya mengenai pembuatan vaksin *Aeromonas hydrophila*.

#### 1.6 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah *Aeromonas hydrophila* pada ginjal mencit (*Mus musculus*) dapat terdeteksi dengan menggunakan teknik Imunohistokimia yang ditunjukkan adanya interaksi antara antigen dan antibodi pada jaringan histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Aeromonas hydrophila*

*Aeromonas hydrophila* pertama kali ditemukan pada tahun 1962, oleh Hoshina ketika mengamati penyebab dari penyakit yang menyerang ikan dan belut yang dinamakan *red fin*. *Aeromonas hydrophila* telah dihubungkan dengan beberapa penyakit pada ikan antara lain lesi pada ekor, kerusakan pada insang dan hemoragi septikemia (Martin, 2004).

Ruth (2002) menyatakan bahwa *Aeromonas hydrophila* menyebabkan *Motil Aeromonas Septicemia (MAS)* yang merupakan penyakit terbesar yang mempengaruhi keberhasilan budidaya ikan diseluruh dunia. *Aeromonas hydrophila* adalah mikroorganisme patogen oportunistik dari berbagai hewan air dan darat, termasuk manusia.

*Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri yang banyak ditemukan di lingkungan air tawar, terutama pada lingkungan yang kaya bahan organik. Suhu optimal untuk pertumbuhan bakteri ini adalah 20-37°C. Jumlah *Aeromonas hydrophila* pada perairan  $10^7$  CFU/ml mengakibatkan kematian 100% pada ikan. Penelitian pada udang karang yang hampir mati menunjukkan bahwa nekrosis ditemukan pada jaringan termasuk insang, jantung, hepatopankreas dan sistem peredaran darah (Pathol *et al.*, 2009).

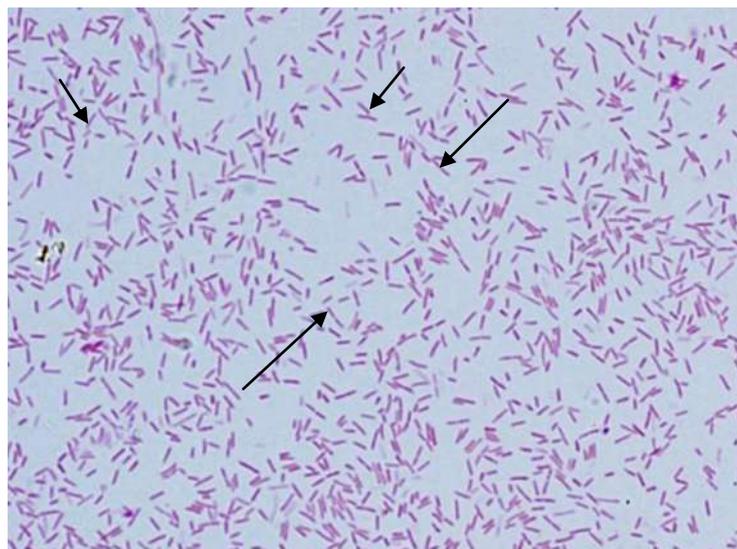
### 2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* menurut Buchanan dan Gibbons (1994 dalam Endarti, 2009) adalah sebagai berikut :

Filum	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Pseudanonadeles
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>

### 2.1.2 Morfologi dan karakteristik *Aeromonas hydrophila*

Ciri utama bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah kuman Gram negatif dan motil (Austin and Dawn, 2007). Bentuk morfologi *Aeromonas hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 *Aeromonas hydrophila* dengan pewarnaan gram dan perbesaran 1000x (Park *et al.*, 2011)

Morfologi koloni *Aeromonas hydrophila* permukaannya agak menonjol, berbentuk bulat, mengkilat dan memiliki diameter 2-3mm. Pada uji biokimia oksidase positif, memfermentasi glukosa dengan atau tanpa memproduksi gas. Produksi gas dibuktikan dengan pembentukan gelembung dalam media gula-gula. Meskipun kebanyakan strain *Aeromonas hydrophila* menghasilkan gas selama fermentasi laktosa, beberapa strain bakteri ini tidak menghasilkan gas saat diisolasi dari ikan terinfeksi (Saraswati, 2015).

### 2.1.3 Isolasi dan identifikasi

Isolasi dan identifikasi dapat digunakan untuk menentukan adanya infeksi pada hewan didalam suatu kelompok peternakan dan dapat dipakai sebagai pembanding pelengkap terhadap uji serologis (Soebronto, 2003).

*Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri yang mampu memfermentasi laktosa, oleh sebab itu kultur primer pada umumnya dipergunakan media yang bisa membedakan bakteri tersebut memfermentasi laktosa atau tidak, antara lain: *Briliant Green Agar* (BGA), *MacConkey Agar*, *Tryptic Soya Agar* (TSA), dan *Brian Heart Infusion Agar* (BRIA) (Cipriano, 2001). Sifat biakan dengan menumbuhkan pada *Nutrien Agar* atau *Tryptic Soya Agar* (TSA), dimana dalam waktu 24 jam pada suhu 22-28°C akan terbentuk koloni melingkar, cembung, transparan serta berwarna putih. Untuk mengidentifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* dapat digunakan tes aglutinasi, namun perlu diperhatikan kemungkinan adanya reaksi silang dengan *Aeromonas salmonisida* dan *Aeromonas sobria* (Austin and Austin, 1999).

#### 2.1.4 Patogenesis *Aeromonas hydrophila*

Proses invasi bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* kedalam tubuh host diawali dengan melekatnya bakteri pada permukaan kulit dengan memanfaatkan flagela dan kait untuk bergerak dan melekat kuat pada lapisan terluar tubuh ikan yaitu sisik yang dilindungi oleh zat kitin. Selama proses berlangsung bakteri *Aeromonas hydrophila* memproduksi enzim kitinase yang berperan dalam mendegradasi lapisan kitin sehingga bakteri dapat dengan mudah masuk ke dalam host. Selain memanfaatkan enzim kitinase bakteri *Aeromonas hydrophila* juga mengeluarkan enzim lainnya seperti lesitinase dalam upaya masuk ke dalam aliran darah (Mangunwardoyo dkk., 2010).

Menurut Zhang *et al.*, (2000) perbedaan genetik antara isolat virulen dan avirulen, mengkonfirmasi bahwa virulensi diantara *Aeromonas* motil bergantung pada banyak faktor. Sebagian besar galur virulen *Aeromonas hydrophila* mempunyai lima faktor virulensi yaitu: hemolisin, protease (oligopeptidase), *Outer Membrane Protein* (OMP), dan protein seperti histone (HU-2).

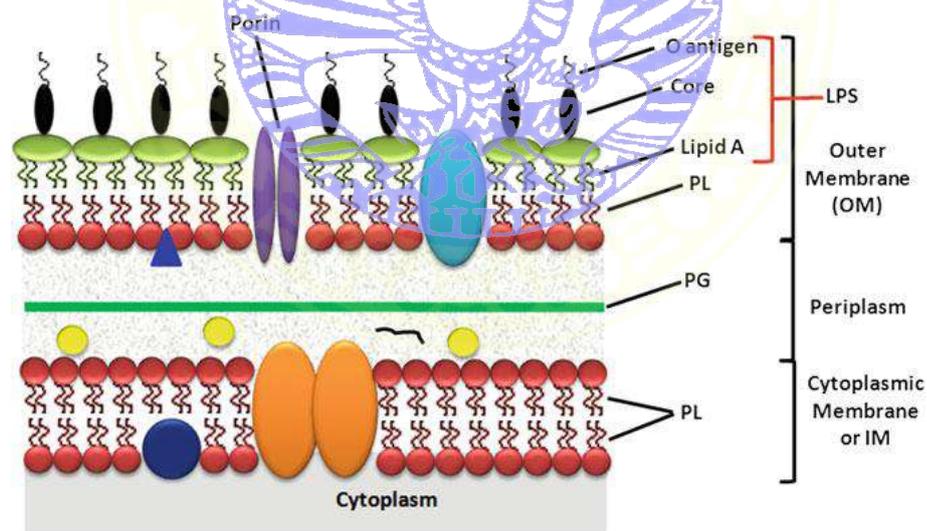
Toksin *Aeromonas hydrophila* dapat diklasifikasikan sebagai eksotoksin dan endotoksin. *Aeromonas hydrophila* memiliki toksin berupa endotoksin yang merupakan bagian integral dari dinding sel bakteri Gram negatif yang dilepas seluruhnya pada bakteri yang mati dan sebagian dilepas selama pertumbuhan (Brooks dkk., 2001).

Enzim-enzim eksotoksin yang dihasilkan *Aeromonas hydrophila* bersifat virulen seperti hemolisin, protease dan elastase. Hal ini menyebabkan adanya penurunan respon terhadap pakan, berenang abnormal, luka kemerahan dibagian

tubuh seperti punggung, sirip ekor dan sirip dada dan kemudian berlanjut pada kulit mengelupas, daging rusak dan terjadinya *abdominal dropsy* pada ikan yang terinfeksi (Triyaningsih dkk., 2014).

## 2.2 Outer Membrane Protein (OMP) *Aeromonas hydrophila*

*Outer membrane protein* (OMP) bakteri Gram negatif adalah beberapa protein yang merupakan bagian dinding sel bakteri yang berhubungan dengan sifat virulensi. Sebagaimana kuman Gram negatif bakteri *Aeromonas hydrophila* memiliki struktur pada lapisan dinding sel sebagaimana berikut pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Skema diagram membran luar (OM), sitoplasma atau IM, dan lapisan periplasmik yang mengandung peptidoglikan. Sumber: Chatterjee and Chaudhurik (2012).

Dinding sel kuman Gram negatif mengandung 3 polimer yang terletak di luar lapisan peptidoglikan yaitu lipoprotein, selaput luar dan liposakarida. Molekul lipoprotein terdiri dari lipid yang terikat pada selaput luar dan senyawa protein mengandung 57 asam amino. Protein ini berhubungan dengan peptidoglikan melalui rantai samping peptidoglikan (tetrapeptida). Pada selaput

luar terdapat protein utama dan protein minor. Protein utama menembus kedua sisi selaput luar bergabung dengan lipoprotein dan terikat dengan peptidoglikan, sedangkan protein minor di dalam selaput luar berfungsi sebagai pengangkut (Samsudin, 2008).

Lipoprotein merupakan faktor virulensi bagi bakteri Gram negatif yang terdiri dari tiga bagian yaitu: lipid A, *oligosakarida* dan O-antigen. Lipid A terdiri dari 2,3 diamino, 2,3 dideoxy-D-glukosa (diaminoglukosa), amide, rantai panjang ester C<sub>16:0</sub> sampai C<sub>18:0</sub> dan asam lemak *hidroxylated*. Sedangkan *oligosakarida* terdiri dari 2-amino, 2,6 dideoxy-D-glucose (quinovosamine), 2-amino-2-deoxy-D-glukosa (glukosamine), 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) dan gula (Cardoso *et al.*, 2006).

Bagian lapisan lipoprotein mengandung asam amino yang terdiri dari tripsin, lisin, tirosin, arginin, dan leusin. Sedangkan pada lapisan luar terdapat protein (OMP A protein) (Wolfgang *et al.*, 1992). Menurut Suarsana (2005) komposisi asam amino protein A disusun oleh 16 macam asam amino yaitu lisin, histidin, arginin, asam aspartat, threonon, serin, asam glutamat, prolin, glisin, alanin, valin, methionon, isoleusin, leusin, tirosin dan phenilalanin.

### 2.3 Sistem Imun

Imunitas (kekebalan) merupakan jawaban reaksi tubuh terhadap adanya bahan asing secara molekuler maupun seluler. Pada proses ini terjadi serangkaian mekanisme yang meliputi pengenalan, penempatan, netralisasi dan eliminasi bahan - bahan dari dalam tubuh. Secara garis besar mekanisme kekebalan terdiri

dari dua yaitu *innate immunity* (kekebalan bawaan atau sistem imun tidak spesifik) serta *adaptive immunity* (kekebalan didapat atau sistem imun spesifik). *Innate immunity* adalah pertahanan tubuh yang didapat karena adanya respons yang tidak spesifik dan merupakan bagian dari sistem imun yang berfungsi sebagai barier terdepan pada awal terjadinya infeksi penyakit. Perangkat imun yang berperan pada sistem imun tidak spesifik adalah makrofag, eritrosit, sel asessoris, monosit, sel *Natural Killer* (NK), sel-sel toksik dan sekresi lisosim (Rantam, 2003). Efektor imunitas nonspesifik utama terhadap bakteri intraselular adalah sel fagosit dan sel NK. Sel fagosit menelan dan mencoba menghancurkan mikroba tersebut, namun mikroba dapat resisten terhadap efek degradasi fagosit. Bakteri intraselular dapat mengaktifkan sel NK secara langsung atau melalui aktivasi makrofag yang memproduksi IL-12, sitokin poten yang mengaktifkan NK. Sel NK memproduksi IFN- $\gamma$  yang kembali mengaktifkan makrofag dan meningkatkan daya membunuh bakteri yang dimakan. Jadi, sel NK memberikan respons dini, dan terjadi interaksi antara sel NK dan makrofag (Baratawidjaya, 2002).

*Adaptive immunity* merupakan sistem pertahanan tubuh lapis kedua, apabila *innate immunity* tidak mampu mengeliminasi agen penyakit. Hal ini terjadi akibat fagosit tidak mengenali agen infeksius. Penanggulangannya diperlukan molekul spesifik yang akan berikatan langsung dengan agen infeksius yang dikenal dengan antibodi, sehingga menstimulir proses fagositosis. Pada sistem imun spesifik, kekebalan dapat ditingkatkan baik kualitas maupun kuantitasnya dengan stimulasi berulang dari molekul asing yang sama. Sel yang

berperan sebagai mediator pada proses ini adalah sel limfosit yang mensintesis sel reseptor sesuai dengan antigen determinan yang masuk (Rantam, 2003). Proteksi utama respons imun spesifik terhadap bakteri intraselular berupa imunitas selular. Imunitas selular dibagi menjadi dua tipe reaksi, yaitu aktivasi makrofag oleh sel  $CD4^+$  Th1 yang memacu pembunuhan mikroba dan lisis sel terinfeksi oleh  $CD8^+$  atau CTL (Batarawidjaya, 2002).

Respons imun terjadi karena antigen yang merupakan molekul bereaksi dengan antibodi dan sel T (Roitt *et al.*, 2005). Imunitas merupakan reaksi tubuh terhadap bahan asing secara molekuler maupun seluler. Imunitas merupakan perlindungan terhadap penyakit. Bahan pemicu respons imun dikenal dengan antigen sedangkan hasil dari reaksi imun dikenal dengan antibodi (Rantam, 2003).

## 2.4 Imunisasi

Imunisasi atau vaksinasi adalah prosedur untuk meningkatkan derajat imunitas, memberikan imunitas protektif dengan menginduksi respons memori terhadap patogen tertentu atau toksin dengan menggunakan preparat antigen nonvirulen atau nontoksik.

Imunisasi secara berulang dengan selang waktu tertentu akan meningkatkan respons imun suatu individu. Penyuntikan suatu molekul antigen berarti akan menstimulir sejumlah klon sel limfosit B yang spesifik terhadap antigen determinan dari molekul tersebut yang menyebabkan masing-masing sel akan berproliferasi dan berdeferensiasi menjadi imunoblast dan sentroblast. Imunoblast akan berkembang menjadi limfoblast dan dideterminasi menjadi sel

plasma yang tidak lagi membelah sebagai pabrik antibodi. Sentroblast akan menjadi sel memori yang dapat meningkatkan respons imun pada kontak berikutnya dengan antigen yang sama (Baratawidjaya, 2002).

Dua jalur utama, limfoid dan myeloid berasal dari sel pluripoten dalam sumsum tulang. Progenitor limfoid mempunyai kemampuan untuk berkembang menjadi limfoid B dan T. Sel B berkembang dalam sumsum tulang belakang dan bila sudah matang akan menjadi sel plasma yang membentuk antibodi. Progenitor myeloid berkembang menjadi sel granulosit (basofil, eosinofil dan netrofil), monosit yang berdeferensiasi menjadi makrofag bila masuk ke dalam jaringan dan megakariosit atau trombosit. Neutrofil (leukosit polimorfonuklear atau PMN) adalah granulosit dalam sirkulasi dan bermigrasi ke jaringan sebagai respons terhadap migrasi mikrobial (Baratawidjaya, 2002).

*Antigen Presenting Cells* (APC) adalah sel asesoris yang berfungsi mempresentasikan antigen terhadap limfosit agar respons imun berhasil dengan baik. Jenis sel yang dapat bertindak sebagai APC antara lain makrofag, sel dendrit, sel B dan sel Langerhans (Rantam, 2003).

Ada dua cara untuk membuat hewan kebal terhadap penyakit menular yaitu imunisasi pasif dan aktif. Pada imunisasi pasif menghasilkan resistensi sementara dengan memindahkan antibodi dari hewan resisten ke hewan rentan. Antibodi ini memberikan perlindungan yang cepat, tetapi cepat dikatabolisis. Sedangkan pada imunisasi aktif akan menghasilkan perlindungan yang berlangsung lama. Ada dua macam vaksin yang digunakan imunisasi aktif yaitu vaksin hidup dan vaksin mati (inaktif), keduanya mempunyai kelebihan dan

kekurangan. Vaksin aktif bersifat imunitas kuat, tidak memerlukan adjuvant, tidak stabil dalam penyimpanan dan dapat bereplikasi didalam sel. Vaksin mati bersifat baik dalam penyimpanan, tidak bereplikasi didalam tubuh sehingga cenderung menghasilkan tanggap kebal yang lebih rendah dibandingkan dengan vaksin hidup (Tizard, 1988).

## 2.5 Antigen

Antigen adalah suatu bahan bila dimasukkan kedalam tubuh dapat menimbulkan respon imun baik respon imun seluler maupun humoral. Respon kekebalan antigen menunjukkan reaktivitas antigenesitas. Antigenesitas merupakan kemampuan antigen yang berinteraksi secara khusus dengan antibodi. Sifat antigenesitas dari suatu antigen dapat ditentukan oleh keasingan, ukuran molekul, susunan kimia, dosis pemberian, dan konstitusi genetik (Bakhri, 2003).

Sifat-sifat umum antigen adalah keasingan yaitu dalam lingkungan normal sistem imun membedakan antara *self* dan *non self*, ukuran yaitu antigen harus mempunyai ukuran minimum yang efektif dengan berat molekul yang lebih besar dari 10.000 Dalton, dan kompleksitas yaitu sifat fisik dan kimia molekuler (Wahab dan Noerjati, 1993).

Ciri penting dari antigen adalah kemampuannya untuk menimbulkan respon imun dengan bantuan limfosit T. Antigen sedikitnya memiliki dua determinan atau epitop untuk dapat merangsang pembentukan antibodi dan sedikitnya satu epitop untuk dapat merangsang limfosit T (Kresno, 1996).

Tempat dan cara masuknya antigen dalam tubuh turut menentukan jenis respon yang dihasilkan dan hal ini tergantung pula pada jenis *antigen presenting cells* (APC). Antigen yang masuk ke dalam sel akan ditangkap oleh makrofag atau sel-sel APC, kemudian masuk ke dalam sel dengan cara endositosis atau pinositosis. Antigen diproses dengan berbagai cara di dalam sel diantaranya denaturasi atau proteolisis yang terjadi di dalam endosom. Fragmen-fragmen antigen yang terdiri dari rantai peptida dan bersifat hidrofobik, dipresentasikan pada permukaan sel bersama-sama dengan *major histocompatibility complex* (MHC) (Vilk, 1992).

Mekanisme antigen masuk ke dalam tubuh pertama-tama antigen masuk ke dalam *antigen presenting cell* (APC). *Antigen presenting cell* (APC) mengeluarkan *interleukin 1* atau *interleukin 12* yang dapat merespon *T helper 2* dan mengeluarkan *interleukin 1* yang dapat merespon sel *T helper 1*. Sel *T helper 1* mengeluarkan *interleukin 2* dan *interferon  $\gamma$*  yang dapat mengaktifkan sel *natural killer* (NK). Akibat adanya *interleukin 2* dan *interferon  $\gamma$*  dapat menyebabkan sel NK menjadi aktif. Sel NK yang aktif kemudian mengeluarkan sitotoksin yang menyebabkan lisisnya sel yang abnormal. Sel *T helper 2* mengeluarkan *interleukin 4* dan *interleukin 5* yang dapat merespon limfosit B yang akan menghasilkan sel memori dan mengeluarkan *interleukin 6* yang dapat merespon sel plasma. Pada sel plasma antibodi dilepas kemudian diikat oleh sel NK yang aktif. Sel NK yang aktif kemudian mengeluarkan sitotoksin yang menyebabkan lisisnya sel yang abnormal (Sudiana, 2010).

## 2.6 Antibodi

Antibodi merupakan imunoglobulin yang dieksresi oleh sel B yang teraktivasi oleh antigen. Semua molekul antibodi mempunyai empat rantai polipeptida dasar yang terdiri dari dua rantai berat (*heavy chain*) dan dua rantai ringan (*light chain*) yang identik dan dihubungkan satu sama lain oleh ikatan *disulfide*. Tipe dari rantai berat menentukan kelas atau isotipe dari imunoglobulin (IgA, IgD, IgG, IgE, dan IgM) (Rantan, 2003).

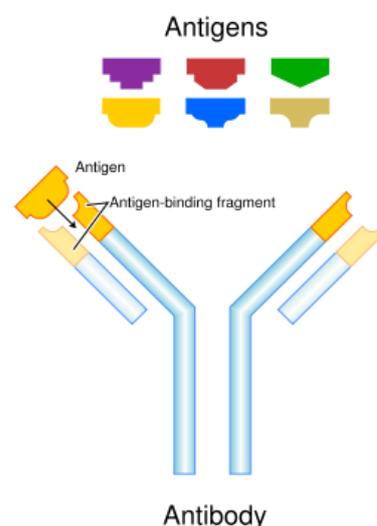
Antibodi didapat dengan jalan mengumpulkan darah dari hewan yang diimunisasi. Antibodi yang didapat dari hiperimunisasi dikenal sebagai antibodi poliklonal. Produksi serum hiperimun (antiserum) melalui imunisasi yang diberikan secara sengaja terhadap hewan dengan suatu imunogen yang spesifik untuk mendapatkan antibodi terhadap imunogen (Smith, 1995).

## 2.7 Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan proses untuk mendeteksi antigen (protein, karbohidrat, dsb) pada sel dari jaringan dengan prinsip reaksi antibodi yang berikatan terhadap antigen pada jaringan. Nama imunohistokimia diambil dari nama "*immune*" yang menunjukkan bahwa prinsip dasar dalam proses ini ialah penggunaan antibodi dan "*histo*" menunjukkan jaringan secara mikroskopis. Imunohistokimia seringkali digunakan untuk mengukur dan mengidentifikasi proses proliferasi sel dan apoptosis sel. Imunohistokimia juga sering digunakan untuk penelitian dasar dalam rangka mengetahui distribusi dan lokasi *biomarker* ataupun protein tereksresi pada berbagai macam jaringan pada tubuh (Ramos-

Vara, 2005). Untuk memvisualisasikan hasil interaksi antara antigen dan antibodi dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, dimana cara yang paling sering digunakan ialah dengan konjugasi antibodi dengan enzim seperti peroksidase. Selain itu juga bisa digunakan fluorophore seperti fluorescen atau rhodamin. Untuk mempelajari morfologi sel, sel dalam jaringan difiksasi kemudian dilokalisasi diantara sel dan divisualisasikan dengan mikroskop elektron atau mikroskop cahaya (Rantam, 2003).

Imunohistokimia merupakan pemeriksaan imunopatologik yang sangat potensial untuk memeriksa antigen secara lokal di jaringan yang menggunakan antibodi spesifik. Pemeriksaan imunohistokimia mempunyai kemampuan yang tinggi untuk memisahkan, menseleksi, dan bersifat spesifik. Pemeriksaan imunohistokimia untuk mendeteksi adanya antigen, hal ini disebabkan adanya ikatan spesifik antara antigen dan antibodi (Ambari 2003; Roitt *et al.*, 1989; Haines and Chelack, 1991). Interaksi antara antigen dengan antibodi dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 : Interaksi antara antigen dengan antibodi (Roitt *et al.*, 1989)

Imunohistokimia merupakan gabungan antara histologi atau sitologi dan imunologi. Imunohistokimia adalah suatu metode pewarnaan substansi atau bahan aktif di dalam jaringan dengan menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti bahan aktif (antibodi). Hasil reaksi antigen dan antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen bila antibodi diikat oleh suatu penanda (*marker*) berupa fluoresin, enzim, bahan partikel, atau isotop yang dapat divisualisasikan, sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif tersebut dalam jaringan. Bahan aktif tersebut dapat berupa protein, karbohidrat, asam nukleat, lemak, bahan-bahan alami lainnya serta bahan-bahan sintetik (Nurhidayat 2002; Setijanto 2002).

## 2.8 Mencit (*Mus musculus*)

Tikus dan mencit adalah binatang yang paling umum digunakan dalam penelitian dan pengujian. Penggunaan tikus dan mencit mencapai sekitar 90% dari semua mamalia yang digunakan dalam penelitian dan pengujian ilmiah (Moore, 2000).

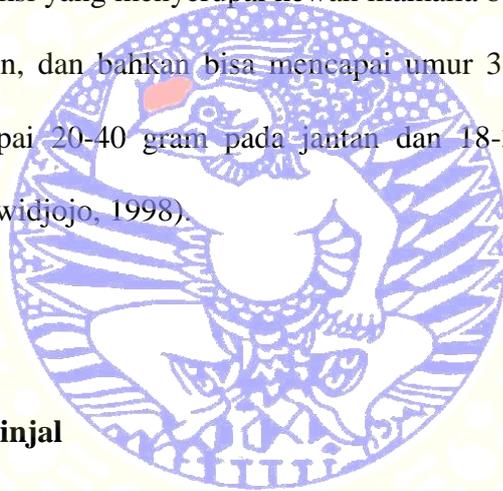
Vanderlip (2001) mengklasifikasikan mencit sebagai berikut:

Kingdom : Animalia  
Phylum : Chordata  
Kelas : Mamalia  
Ordo : Rodentia  
Sub ordo : Myorporpha  
Famili : Muridae

Genus : Mus

Spesies : *Mus musculus*

Salah satu hewan coba yang sering digunakan dalam penelitian adalah mencit (*Mus musculus*). Mencit merupakan hewan yang dinilai cukup efisien dan ekonomis sebagai hewan coba, karena mencit mudah dipelihara dan memiliki sifat produksi dan reproduksi yang menyerupai hewan mamalia besar. Mencit memiliki masa hidup 1-2 tahun, dan bahkan bisa mencapai umur 3 tahun. Berat dewasa mencit dapat mencapai 20-40 gram pada jantan dan 18-35 gram pada betina (Smith dan Mangkoewidjojo, 1998).

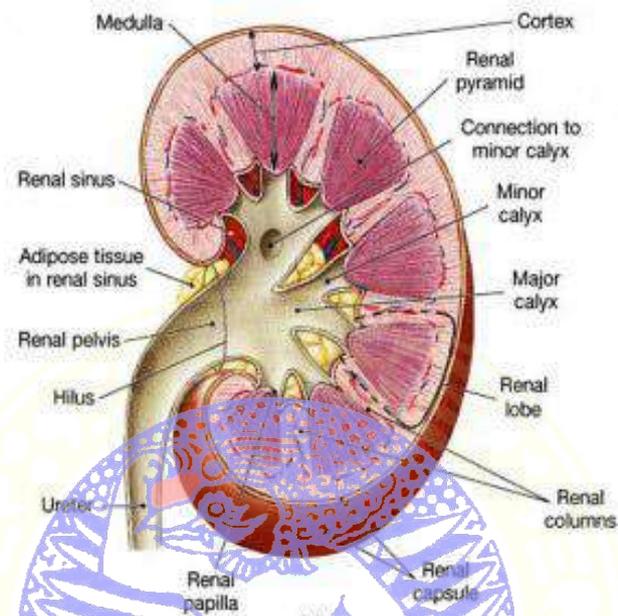


## 2.9 Ginjal

### 2.9.1 Makroskopis ginjal

Ginjal merupakan organ yang berbentuk seperti kacang terletak di belakang peritoneum, di kedua sisi columna vertebralis dengan bagian kiri lebih caudal. Pada potongan melintang ginjal terbagi menjadi dua bagian yaitu korteks dan medulla. Dimana korteks berwarna lebih gelap daripada medulla (Dellman and Brown, 1992). Daerah medulla terdapat piramid yang berisi sejumlah pembuluh yang bermuara pada pelvis dan bagian korteks berisi nefron sebagai kesatuan dasar fungsional ginjal (Ganong, 2002).

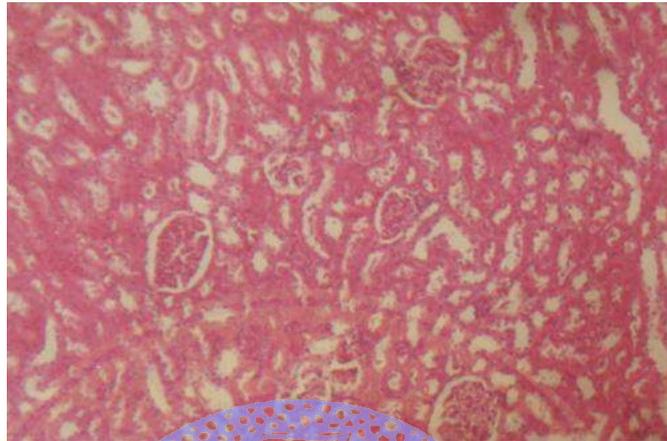
Bertempat pada sisi tengah atau sisi cekung dari ginjal yang disebut dengan hilus terdapat arteri dan vena ginjal, serta ureter. Ginjal memiliki sebuah kelenjar yang disebut dengan kelenjar adrenal (Guyton and Hall, 2006). Gambaran makroskopis ginjal dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Struktur anatomi ginjal (Yanpuh, 2009)

### 2.9.2 Mikroskopis ginjal

Nefron (korpuskel ginjal dan tubulus ginjal) merupakan unit fungsional dari ginjal. Nefron terdiri dari korpuskulus ginjal dan sistem tubulus. Korpuskulus ginjal terdiri dari glomerulus yang merupakan kumpulan kapiler-kapiler yang dikelilingi oleh dua lapis sel epitel yang disebut kapsula bowman. Kapsula bowman merupakan bagian awal dari nefron, dimana darah yang mengalir melalui kapiler ginjal mengalami filtrasi untuk menghasilkan ultrafiltrat glomerulus. Kapiler glomerulus disuplai oleh arteriol aferen dan dikosongkan oleh arteriol eferen, yang kemudian bercabang membentuk jaringan kapiler baru untuk mensuplai tubulus ginjal (Ganong, 2001). Struktur mikroskopik glomerulus dan tubulus ginjal dapat dilihat pada Gambar 2.5 dibawah ini.



Gambar 2.5. Struktur mikroskopik glomerulus dan sel-sel tubulus ginjal normal (Salim, 2014)

Awal dari tubulus ginjal adalah kapula Bowman yang mengelilingi glomerulus. Kapsula Bowman tersebut berbentuk seperti cangkir dengan lapisan dalam dan luar. Lapisan luar yang disebut dengan lapisan parietal merupakan lanjutan dari sel-sel epitel dari tubulus proximal pada korpuskel ginjal. Sedangkan lapisan dalam disebut dengan lapisan visceral yang merupakan penyusun sel khusus yaitu podosit (Clarkson *et al.*, 2011).

Lanjutan dari kapsula Bowman adalah bagian dari tubulus yang tersusun oleh : a). Bagian proksimal yang tebal terdiri dari tubulus tubulus konvoluta proksimal (Roos *et al.*, 2003) yang mana dindingnya dibentuk oleh salah satu lapisan sel-sel yang saling berhubungan satu sama lain dan disatukan oleh *apical tight junctions* (Ganong, 2001) serta tubulus rekta proksimal (Roos *et al.*, 2003). permukaan bebas dari tubulus proksimal ini memiliki mikrofil yang panjang (*Brush Border*). b). Bagian yang tipis merupakan bagian lengkung henle. Lengkung henle merupakan tempat reabsorpsi air dan natrium. Klorida ditransport keluar secara aktif dari bagian lengkung ascenden dan diikuti secara pasif oleh

$\text{Na}^+$ .  $\text{NaCl}$  selanjutnya akan berdifusi secara pasif masuk ke bagian lengkung ascenden. Proses ini penting dalam pemekatan urin (Bijanti, 2011). c). Bagian distal yang tebal yang terdiri dari tubulus distal bersegmen lurus (pars rekta) yang lebih rendah letaknya dibanding tubulus distal yang lengkung (pars konvoluta). Dalam korteks, tubulus konvoluta distal mengadakan kontak dengan kutub vaskular dari korpuskel ginjal yang berasal dari induk nefronnya. Ruang dinding tubulus distal tampak lebih gelap karena rapatnya inti-inti disebut makula densa (Ganong, 2001).

Setelah plasma difiltrasi oleh glomerulus terjadi reabsorpsi selektif zat-zat yang sudah difiltrasi. Sebagian besar zat yang difiltrasi akan direabsorpsi melalui pori-pori kecil yang terdapat pada tubulus, sehingga zat-zat tersebut akan kembali ke dalam kapiler peritubuler yang mengelilingi tubulus. Tubulus kontortus proksimal mereabsorpsi glukosa, asam amino, sebagian besar  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{HPO}_4^-$  dengan cara transport aktif. Sedangkan air, klorida dan urea direabsorpsi melalui transport pasif. Para-amino-hipurat, penisilin dan kreatinin secara aktif disekresikan ke dalam tubulus proksimal. Kalium dan asam urat hampir seluruhnya direabsorpsi tubulus kontortus distal dan keduanya disekresikan ke dalam tubulus distalis. Di dalam tubulus kontortus distal terjadi pembentukan ammonia, pengasaman urin dan pengaturan tahap air keseimbangan air dan asam basa. Proses sekresi dan reabsorpsi selektif diselesaikan dalam tubulus kontortus distal dan duktus koligentes (Bijanti, 2011).

### 2.9.3 Fungsi ginjal

Ginjal merupakan organ yang kompleks baik anatomi maupun fisiologi dalam melakukan fungsinya sebagai pengatur volume dan komposisi kimia darah dengan mengekskresikan solut dan air secara selektif. Fungsi ginjal dapat dibedakan menjadi dua, yaitu fungsi ekskresi dan fungsi non ekskresi.

Fungsi ginjal adalah (1). Mengatur keseimbangan asam basa dengan mengatur sekresi H<sup>+</sup> dan elektrolit. (2). Mengekskresikan hasil akhir metabolisme protein yang mengandung nitrogen terutama urea, asam urat, kreatinin dan mengekskresikan zat-zat toksik. (3). Mengatur konsentrasi elektrolit dan tekanan osmotik cairan ekstraseluler. (4). Mengatur komposisi urin dengan tujuan untuk mengeliminasi sisa metabolisme. (5). Menghasilkan eritropoetin, renin dan mengaktifkan vitamin D. (6). Mensintesis glukosa dari asam amino dan prekursor lainnya selama masa puasa panjang. (7). Mendegradasi insulin dan membuat prostaglandin (Gibson, 2003; Guyton and Hall, 2006).

## BAB 3 MATERI DAN METODE

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di kandang hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya untuk mengerjakan imunisasi maupun pemeliharaan mencit dan kelinci, Departemen Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya untuk mengerjakan teknik imunohistokimia. Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan dimulai bulan Agustus sampai Oktober 2015.

### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.2.1 Bahan penelitian

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi : protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila*, *whole protein Aeromonas hydrophila*, *Complete Freund's Adjuvant*, *Incomplete Freund's Adjuvant* (SIGMA F5506). Bahan yang digunakan untuk imunohistokimia adalah jaringan histopatologi ginjal mencit, xylol, alkohol 96%, 90%, 80%, dan 70%. Aquadest, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), formalin 10%. Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) 3%, antibodi primer (anti 30 kDa *Aeromonas hydrophila* dan anti *whole protein Aeromonas hydrophila*), antibodi sekunder berlabel SA-HRP (*Strep Avidin Horseradish Peroksidase*), dan 1% BSA.

#### 3.2.2 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini terdiri dari : S spuit (*disposable*) untuk imunisasi dengan ukuran 3 ml. Sedangkan alat-alat yang

digunakan untuk pewarnaan Imunohistokimia adalah pinset, pipet pasteur, pipet (mikropipet) original eppendorf (*made in Germany*), tabung eppendorf, mikrotom, inkubator dan mikroskop (Nikon H600L) dengan fasilitas pendukung *Optilab* dengan pembesaran 100 dan 400 kali (Andonian *et al.*, 2001).

### 3.2.3 Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 2 kelompok hewan percobaan. Kelompok pertama digunakan untuk produksi antibodi primer adalah kelinci jantan berumur lima bulan, berat badan 3 Kg, jenis *New Zealand White* yang belum mendapatkan vaksinasi, diperoleh dari salah satu tempat budidaya kelinci di Sidoarjo. Kelinci yang digunakan sebanyak tiga ekor yaitu satu ekor kelinci sebagai kontrol, satu ekor mendapat imunisasi protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila* dan satu ekor mendapat imunisasi *whole protein Aeromonas hydrophila*. Dipilih kelinci karena hewan ini mudah dipelihara, daya tahannya tinggi dan mudah diambil darahnya.

Kelompok kedua digunakan untuk imunohistokimia yaitu 3 ekor mencit (*Mus musculus*) yang akan diinfeksi *Aeromonas hydrophila*  $10^6$  CFU/ml kemudian dipreparasi ginjalnya dan akan dilakukan pewarnaan imunohistokimia. Mencit (*Mus musculus*) diperoleh dari Pusat Veterania Farma (PUSVETMA) Surabaya berumur 3 bulan, berat badan 20-30 gr dan berjenis kelamin jantan.

### 3.2.4 Kandang penelitian

Kandang yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang yang terbuat dari kayu berbentuk bujur sangkar untuk kelinci dan kandang yang terbuat

dari kotak plastik dengan kawat penutup untuk mencit. Dalam penelitian ini mencit dan kelinci ditempatkan secara individual.

### 3.3 Variabel yang Diamati

Variabel yang diamati adalah sebagai berikut:

- a. Variabel bebas, yaitu imunisasi protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila* dan *whole protein Aeromonas hydrophila*.
- b. Variabel tergantung, yaitu gambaran pada jaringan histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) yang menunjukkan adanya interaksi antara antigen dengan antibodi *Aeromonas hydrophila* yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan.
- c. Variabel kendali, yaitu jenis kelamin, berat badan, makanan, umur dan lingkungan.

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

1. Imunisasi protein spesifik *Aeromonas hydrophila* yaitu imunisasi pada kelinci yang dilakukan menggunakan protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila* dan *whole protein Aeromonas hydrophila* yang telah berhasil diisolasi, sonikasi, elusi dan disuntikkan secara intramuskular.
2. Ekspresi *Aeromonas hydrophila* yaitu adanya gambaran ikatan antigen dengan antibodi pada jaringan mikroskopis yang tervisualisasi dengan warna coklat dengan teknik Imunohistokimia.

### 3.5 Metode Penelitian

#### 3.5.1 Kultur Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Suspensi *Aeromonas hydrophila* pada penelitian ini didapatkan dari penelitian sebelumnya. Suspensi bakteri dikultur dalam media TSA (*Trypticase Soy Agar*) selanjutnya diidentifikasi pada Media TSIA, Media SIM, Media SCA, Media Urea agar, Media Gula-gula (Glukosa, Laktosa, Manitol, Maltosa dan Sukrosa).

#### 3.5.2 Imunisasi pada Kelinci untuk mendapatkan Antibodi Primer

Imunisasi pada kelinci dilakukan menggunakan protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila* dan *Whole protein Aeromonas hydrophila* yang telah berhasil diisolasi, sonikasi, dan elusi. Kemudian disuntikkan secara intramuskular pada kelinci galur *New Zealand White* yang berjenis kelamin jantan, berumur 5 bulan dan berat badan 3 kg. Kelinci yang diimunisasi sebanyak 2 ekor (P1 dan P2) dan 1 ekor sebagai kontrol (tanpa imunisasi). Sebelum dilakukan imunisasi kelinci diadaptasikan pakan, kandang dan lingkungan terlebih dahulu selama 7 hari.

Kedua kelinci diimunisasi dengan menggunakan campuran antigen dengan *Complete Freund's Adjuvant* (perbandingan 1:1). Imunisasi ke dua dilakukan setelah 14 hari berikutnya dengan campuran antigen dalam *Incomplete Freund's Adjuvant* (perbandingan 1:1). Imunisasi ke tiga dilakukan setelah 14 hari berikutnya dengan cara dan bahan yang sama seperti imunisasi ke dua dan seterusnya hingga imunisasi ke empat. Setiap sebelum melakukan *booster* dilakukan pengambilan darah melalui vena *auricularis* untuk mendapatkan antibodi primer.

### 3.5.3 Infeksi *Aeromonas hydrophila* pada mencit (*Mus musculus*)

Tiga ekor mencit (*Mus musculus*) diinfeksi *Aeromonas hydrophila*  $10^6$  CFU/ml secara intraperitoneal. sebelum diinfeksi mencit diadaptasikan pakan, kandang dan lingkungan terlebih dahulu selama 7 hari.

### 3.5.4 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel jaringan ginjal mencit dilakukan pada hari ke 7 setelah infeksi. Mencit di euthanasia dengan menggunakan kloroform kemudian dilakukan laparotomi untuk mengambil jaringan ginjal, dengan segera jaringan ginjal diletakkan pada toples/pot yang berisi larutan formalin 10% untuk kemudian dibuat preparat histopatologi ginjal. Cara pembuatan preparat ginjal mencit dapat dilihat pada Lampiran 1.

### 3.5.5 Perlakuan

#### 3.5.5.1 Perlakuan pada Mencit (*Mus musculus*)

Setelah adaptasi selama satu minggu, mencit diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*  $10^6$  CFU/ml secara intraperitoneal.

#### 3.5.5.2 Perlakuan pada Kelinci

Setelah adaptasi selama satu minggu, semua kelompok perlakuan dari hewan coba diinfeksi dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*, kecuali pada P0.

- P0 : Kelompok perlakuan kontrol negatif
- P1 : Kelinci pada kandang kedua diinfeksi protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila*
- P2 : Kelinci pada kandang ketiga diinfeksi *Whole Protein Aeromonas hydrophila*

### 3.5.6 Metode Pewarnaan Imunohistokimia

Preparat direndam dalam xylol sebanyak 2 kali, alkohol bertingkat secara berurutan (96%, 90%, 80%, 70%) untuk proses hidrasi. Dicuci dalam PBS pH 7,4 3 kali masing-masing selama 5 menit. Direndam dalam 3% hidrogen peroksida (dalam *destilate water*) selama 20 menit. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Direndam dalam 1% BSA selama 10-30 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan antibodi primer selama 1 jam pada suhu ruang. Lalu diinkubasi selama semalam.

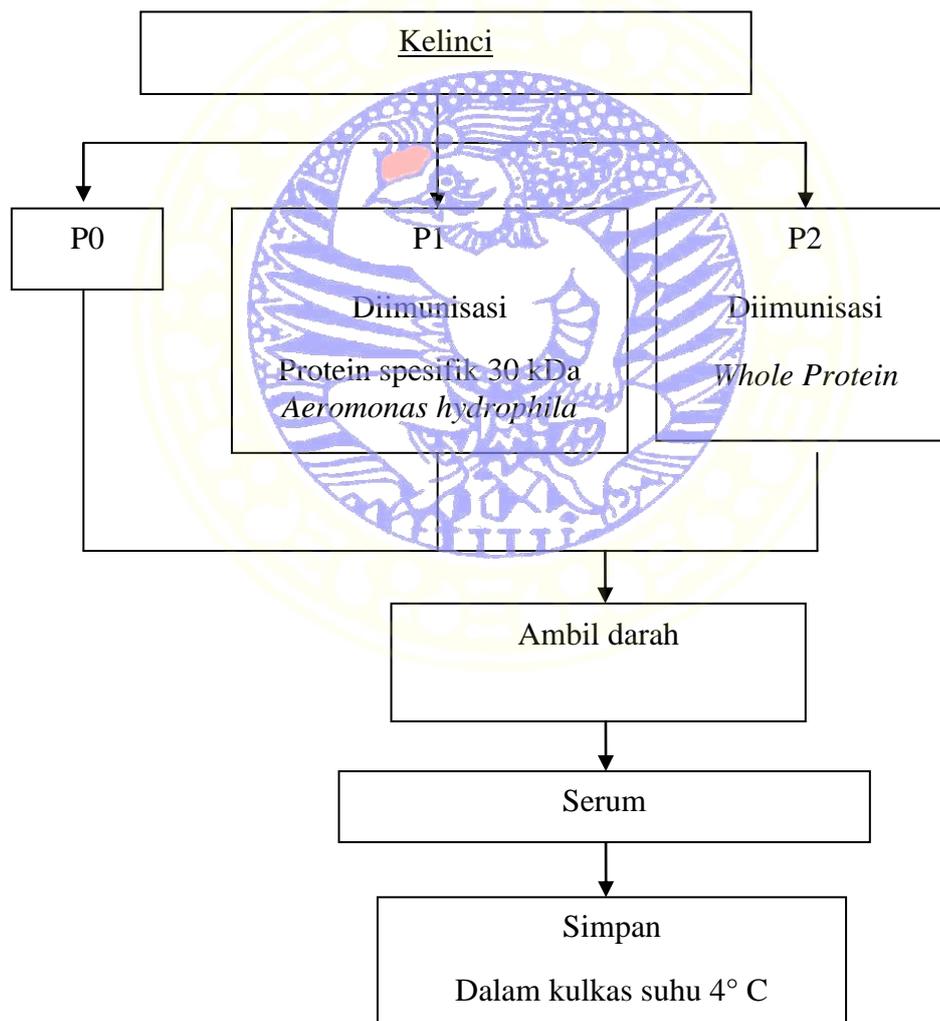
Kemudian dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Kemudian ditambah antibodi sekunder berlabel *Strep avidin horseradish peroxidase* (SA-HRP) selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit.

Preparat ditambahkan kromogen DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) selama 10-20 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam aquades selama 3x5 menit. Dilakukan *counterstain* dengan *hematoksilin* selama 5 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam aquades selama 3x5 menit. Dilakukan *mounting* dengan entellan. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop *optilab* pada pembesaran 100 dan 400 kali.

### 3.6 Kerangka Operasional

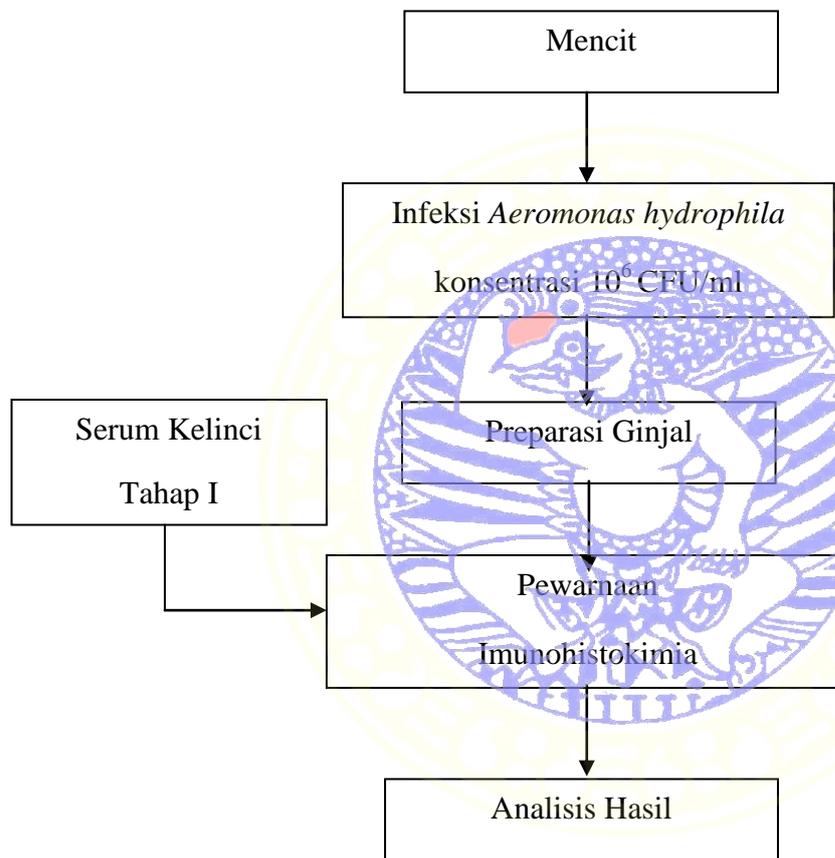
Untuk memperjelas gambaran penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada skema di bawah ini:

Tahap I. Persiapan antibodi primer pada kelinci



**Gambar 3.1** Diagram Alir Penelitian (Tahap I)

## Tahap II : Imunohistokimia Mencit



Gambar 3.2 Diagram Alir Penelitian (Tahap II)

## BAB 4 HASIL PENELITIAN

Pada bab ini memuat hasil penelitian yang sesuai dengan tujuan dan kerangka konseptual. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk foto atau gambar. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya *Aeromonas hydrophila* pada ginjal mencit (*Mus musculus*) dengan menggunakan teknik Imunohistokimia dan mengetahui adanya interaksi antara antigen dengan antibodi pada jaringan histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) dengan menggunakan teknik Imunohistokimia.

Proses infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada mencit dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml melalui intraperitoneal selama 7 hari tidak menunjukkan adanya perubahan patologi.

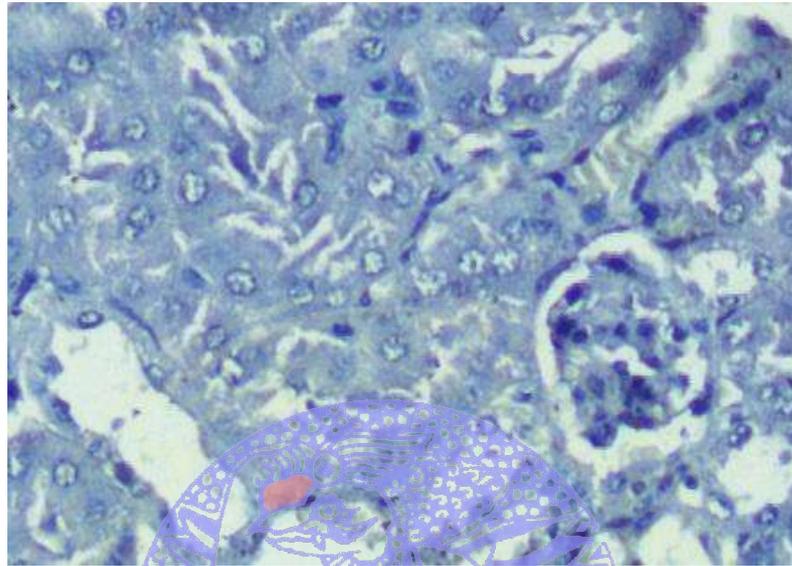
Hasil pemeriksaan preparat histopatologi ginjal mencit dengan pewarnaan imunohistokimia dan diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x guna melihat adanya *Aeromonas hydrophila*. Pada pemeriksaan tersebut didapatkan bahwa pada perlakuan pertama (P1) dan perlakuan kedua (P2) dapat diidentifikasi adanya *Aeromonas hydrophila* pada histopatologi ginjal. Hal ini terlihat dengan adanya warna kecoklatan pada jaringan histopatologi ginjal mencit. Sedangkan pada perlakuan kontrol (P0) tidak terlihat adanya warna kecoklatan pada jaringan histopatologi ginjal.

Hasil pada perlakuan pertama (P1) pada jaringan histopatologi terlihat adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan di glomerulus ginjal. Sedangkan pada perlakuan kedua (P2) hasil

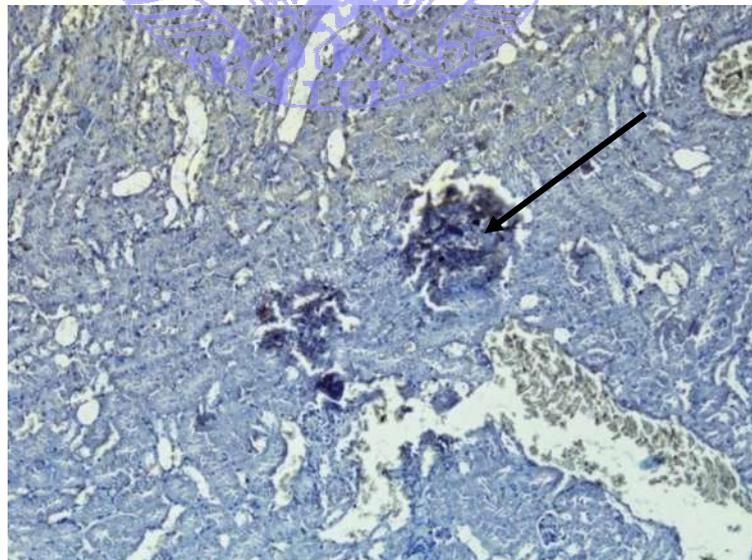
pemeriksaan histopatologi menunjukkan bahwa warna kecoklatan lebih banyak dan lebih menyebar, yaitu terdapat di glomerulus, capsula bowman maupun tubulus ginjal.

#### **4.1 Identifikasi adanya *Aeromonas hydrophila* pada ginjal.**

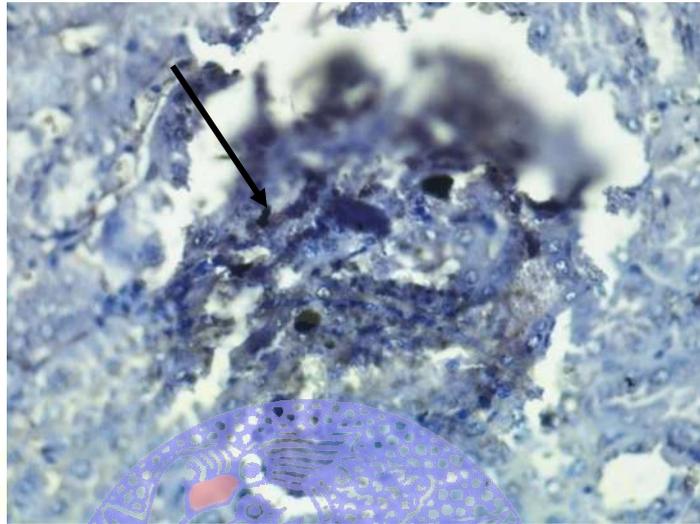
Preparat histopatologi ginjal mencit jantan berumur 3 bulan dapat dilihat adanya *Aeromonas hydrophila* dengan metode imunohistokimia. Adanya *Aeromonas hydrophila* pada jaringan histopatologi ginjal mencit dapat tervisualisasi dengan warna kecoklatan. Warna coklat merupakan hasil reaksi antara antigen yang berikatan antibodi primer dan antibodi sekundernya berupa *Streptavidin horseradish peroxidase* (SA-HRP) serta *substrate diamino benzidine* (DAB). Hasil ekspresi antigen *Aeromonas hydrophila* pada jaringan histologi ginjal mencit dapat dilihat pada Gambar dibawah ini.



Gambar 4.1 Glomerulus dan tubulus ginjal mencit kontrol pembesaran 400x dengan pewarnaan imunohistokimia.  
Keterangan : Glomerulus dan tubulus ginjal normal.

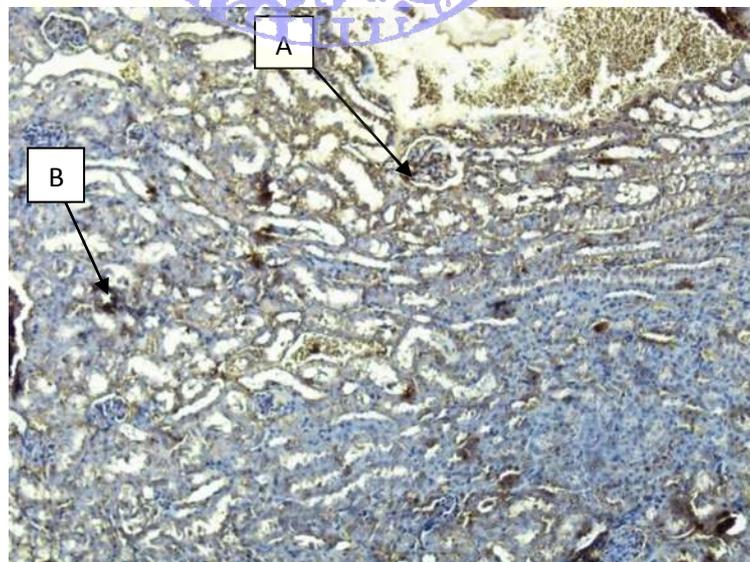


Gambar 4.2 Glomerulus dan tubulus ginjal mencit perlakuan 1 (protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila*) pembesaran 100x dengan pewarnaan imunohistokimia.  
Keterangan : Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada glomerulus ginjal mencit.



Gambar 4.3 : Glomerulus ginjal mencit perlakuan 1 (protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila*) pembesaran 400x dengan pewarnaan imunohistokimia.

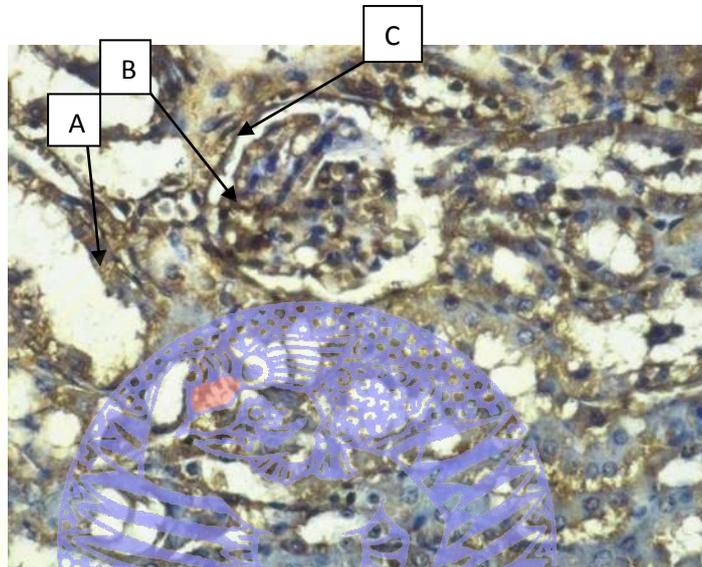
Keterangan : Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada glomerulus ginjal mencit.



Gambar 4.4 : Glomerulus dan tubulus ginjal mencit perlakuan 2 (*whole protein*) pembesaran 100x dengan pewarnaan imunohistokimia.

Keterangan A: Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada glomerulus ginjal mencit.

B: Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada tubulus ginjal mencit.



Gambar 4.5 : Glomerulus dan tubulus ginjal mencit perlakuan 2 (*whole protein*) pembesaran 400x dengan pewarnaan imunohistokimia

- Keterangan
- A : Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada tubulus ginjal mencit.
  - B : Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada glomerulus ginjal mencit.
  - C : Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada capsula bowman ginjal mencit.

## BAB 5 PEMBAHASAN

*Aeromonas hydrophila* menyebabkan penyakit pada ikan yang dikenal sebagai *Motil Aeromonas Septicemia* (MAS) dimana bakteri atau racun bakteri terdapat diberbagai organ ikan dan menyebabkan adanya bercak-bercak merah pada kulit ikan. *Aeromonas hydrophila* termasuk bakteri gram negatif dan berbentuk batang yang pada umumnya diisolasi dari kolam air tawar. Penyakit yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* sering menyerang ikan air tawar seperti *catfish* dan beberapa spesies bass (ikan kakap dan kerapu) (Swann, 1989).

Penyakit yang ditimbulkan akibat serangan dari bakteri *Aeromonas hydrophila* mengakibatkan kerugian yang cukup besar dalam bidang perikanan. Gejala klinis yang tampak pada ikan yang terserang bakteri ini adalah adanya bercak kemerahan pada bagian tubuh ikan, organ mata mengalami *exophthalmia* (organ mata yang menonjol keluar), dan seluruh bagian kepala berwarna pucat kemerahan (Asniatih dkk., 2013).

Pada preparat histopatologi ginjal mencit jantan berumur 3 bulan dapat dilihat adanya *Aeromonas hydrophila* dengan metode imunohistokimia. Imunohistokimia adalah suatu metode pewarnaan substansi atau bahan aktif di dalam jaringan dengan menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti bahan aktif (antibodi). Hasil reaksi antigen dan antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen bila antibodi diikat oleh suatu penanda (*marker*) berupa fluoresin, enzim, bahan partikel, atau isotop yang dapat divisualisasikan, sehingga dapat

menandai keberadaan bahan aktif tersebut dalam jaringan. Bahan aktif tersebut dapat berupa protein, karbohidrat, asam nukleat, lemak, bahan-bahan alami lainnya serta bahan-bahan sintetik.

Beberapa syarat yang harus dipenuhi dari metode imunohistokimia adalah bahan aktif tersebut harus dapat membentuk antibodi yang spesifik terhadap bahan aktif tersebut bila disuntikkan ke hospes kedua yang berbeda dengan hospes tempat asal bahan aktif tersebut. Bahan aktif tersebut juga harus terakumulasi dalam jumlah yang cukup di dalam sel atau jaringan sehingga dapat diikat oleh antibodi spesifik serta dapat divisualisasikan (Setijanto, 2002).

Pada preparat histopatologi ginjal mencit jantan berumur 3 bulan dapat dilihat adanya *Aeromonas hydrophila* dengan metode imunohistokimia. Adanya *Aeromonas hydrophila* pada jaringan histopatologi ginjal mencit dapat tervisualisasi dengan warna kecoklatan. Warna coklat merupakan hasil interaksi antara antigen yang berikatan dengan antibodi primer (anti 30 kDa dan anti *whole protein Aeromonas hydrophila*) dan antibodi sekundernya berupa *Strep Avidin horseradish peroxidase* (SA-HRP) serta *substrate diamino benzidine* (DAB).

Kromogen DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) ini telah mengandung peroksida H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebagai substansi penanda yang akan membentuk kompleks dengan enzim peroksidase dalam kompleks SA-HRP (*Streptavidin horseradish peroxidase*). Komplek yang terbentuk dari kromogen DAB akan membentuk warna coklat gelap. Kromogen ini mempunyai ikatan yang sangat kuat dengan peroksida sehingga dengan proses dehidrasi dan *clearing* tidak akan mengalami perubahan warna.

Identifikasi adanya *Aeromonas hydrophila* pada jaringan ginjal mencit dengan menggunakan antibodi primer anti 30 kDa *Aeromonas hydrophila* menunjukkan adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan di glomerulus ginjal. Sedangkan identifikasi pada jaringan ginjal mencit dengan menggunakan antibodi primer anti *whole protein Aeromonas hydrophila* menunjukkan bahwa warna kecoklatan lebih banyak dan lebih menyebar, yaitu terdapat di glomerulus, capsula bowman maupun tubulus ginjal. Hal ini terjadi karena pada antibodi primer anti *whole protein Aeromonas hydrophila* antigen yang diikat lebih banyak dibandingkan dengan antibodi primer anti 30 kDa *Aeromonas hydrophila*. Antibodi primer anti 30 kDa *Aeromonas hydrophila* lebih spesifik hanya mengikat protein dengan berat molekul 30 kDa saja berbeda dengan antibodi primer anti *Whole protein Aeromonas hydrophila* yang dapat mengikat semua jenis protein yang berada pada bagian manapun dari bakteri *Aeromonas hydrophila*.

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa *Aeromonas hydrophila* dapat terdeteksi pada jaringan histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) yang ditunjukkan dengan adanya interaksi antara antigen dan antibodi dengan menggunakan teknik imunohistokimia yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan.

### 6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah didapat, maka saran yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

1. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi dalam penelitian selanjutnya mengenai pembuatan vaksin *Aeromonas hydrophila*.
2. Dilakukan penelitian dengan menggunakan antibodi *Aeromonas hydrophila* untuk melakukan diagnosa penyakit pada ikan.
3. Dilakukan penelitian dengan menggunakan teknik yang sama guna melihat perubahan gambaran histopatologi pada organ yang lain.

## RINGKASAN

**INTAN GALUH BINTARI** . Deteksi *Aeromonas hydrophila* pada ginjal mencit (*Mus musculus*) dengan teknik imunohistokimia, dibawah bimbingan Prof. Dr. Anwar Ma'ruf, drh., M.Kes. sebagai dosen pembimbing I dan Dr. Sri Mulyati, drh., M.Kes. sebagai dosen pembimbing II.

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit yang berbahaya pada budidaya ikan air tawar. Bakteri tersebut banyak menyerang ikan mas yang merupakan salah satu komoditas unggulan air tawar, sehingga mengakibatkan kerugian yang sangat besar dalam usaha budidaya ikan air tawar (Sanoesi, 2008). *Aeromonas hydrophila* memiliki *Outer Membrane Protein* (OMP) yang merupakan protein pada bagian dinding sel bakteri gram negatif yang berhubungan dengan sifat virulensi dan bersifat imunogenik. Penelitian tentang *Outer Membrane Protein* (OMP) telah banyak diteliti dalam usaha mendapatkan antigen yang dapat diandalkan baik untuk diagnosis maupun untuk vaksin.

Penulis ingin melakukan penelitian mengenai reaktivitas *Outer Membrane Protein* (OMP) *Aeromonas hydrophila* pada ginjal mencit (*Mus musculus*) dengan teknik Imunohistokimia untuk mengetahui adanya interaksi antibodi dengan antigen pada ginjal mencit (*Mus musculus*) secara mikroskopis. Penelitian ini menggunakan tiga ekor kelinci (P0, P1 yang diimunisasi dengan protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila*, dan P2 yang diimunisasi dengan *whole protein Aeromonas hydrophila*) untuk produksi antibodi primer dan tiga ekor mencit (*Mus*

*musculus*) yang diinfeksi *Aeromonas hydrophila*  $10^6$  CFU/ml kemudian dipreparasi ginjalnya dan dilakukan pewarnaan imunohistokimia.

Hasil pemeriksaan preparat histopatologi ginjal mencit yang diwarnai dengan pewarnaan imunohistokimia dan diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x guna melihat adanya *Aeromonas hydrophila*. Pada pemeriksaan tersebut didapatkan bahwa pada semua perlakuan dapat diidentifikasi adanya *Aeromonas hydrophila* pada histopatologi ginjal. Hal ini terlihat dengan adanya warna kecoklatan pada jaringan histopatologi ginjal mencit.

Kelompok perlakuan P1 yang diimunisasi menggunakan protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila*, hasil pemeriksaan terhadap preparat histopatologi terlihat adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan dipermukaan glomerulus ginjal mencit.

Kelompok perlakuan P2 yang diimunisasi menggunakan *Whole protein Aeromonas hydrophila*, hasil pemeriksaan terhadap preparat histopatologi terlihat adanya ikatan antara antigen dan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan. Warna coklat lebih banyak dan lebih menyebar pada perlakuan ini, yaitu terdapat pada glomerulus ginjal, capsula bowman maupun tubulus ginjal mencit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ambari, E. 2003. Deteksi Antigen *Toxoplasma* dengan Teknik Imunohistokimia pada Abortus Spontan. Tesis. Fakultas Kedokteran. Semarang.
- Andonian, L., A.A. Mohammadi and J.Akbarzadeh. 2001. Preparation of HY Antibody in Female Mice as a Model for Sex Preselection. Iranian J. Publ. Health, 30(1-2).
- Apritya, D. 2008. Reaktivitas Outer Membran Protein *Brucella abortus* Strain 19 Terhadap Antibodi Poliklonal Anti *Brucella abortus* Strain 19 [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Surabaya.
- Asniatih, Idris., dan Sabilu. 2013. Studi Histopatologi pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Jurnal Mina Laut Indonesia. Vol. 03 No. 12 : 13-21.
- Austin, B and Dawn. 2007. *Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish*. Fourth Edition. Springer Praxis Publishing: Chichester, UK
- Austin, B and Austin. 1999. *Bacterial Fish Pathogens, Disease of farmed and Wild Fish 3<sup>rd</sup>*. Springer Praxis. Goldming.
- Bakhri, S. 2003. Immunogenecity Of Salmonella Typhi-O Antigen Among Isolates From Makasar Strain And Surabaya Strain In Inducing The Antibody Formation. JBP. Vol 05 (01).
- Balqis, U., Darmawi., E.Handharyani., dan M.Hambal. 2011. Deteksi keberadaan Antigen pada kutikula *Ascaridia galli* dengan imunoglobulin *yolk* melalui metode imunohistokimia. Unsyiah Banda Aceh
- Baratawidjaya, K.G. 2002. *Imunologi Dasar*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 13, 29, 33 dan 336.
- Bijanti, R.2011. buku Ajar Patologi Klinik Veteriner: Pemeriksaan dan Gangguan Fungsi Ginjal. Airlangga University Press.pp 71-85.
- Brooks, G.F., J.S.Butel.,and S.A.Morse. 2001. *Adelbergs Medical Microbiology (22<sup>nd</sup> Edition)* Apption and Lange, New York, 179-193.
- Cardoso., G.Patricia., Gison., Masco Azevedo and Sergio. 2006. *Brucella spp Noncanonical LPS: Structure, Biosynthesis, and Interaction with Host Immune System*.

- Chatterjee, S.N and Chaudhuri. 2012. Outer Membrane Vesicles of Bacteria Springer Briefs in Microbiology..
- Clarkson, P., Li, Y., G.Richardson.,and Vasivari. 2011. Determinants and consequences of proaktif environmental strategies. 122-144.
- Dellmann,H.D and E.M.Brown. 1992. Buku Teks Histologi Veteriner. Diterjemahkan Hertono, R. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 411-444.
- Desrina., Arief., Ambariyanto dan B.K Jati. 2011. Pengaruh Dosis terhadap Efektivitas Vaksin POM *Alginolyticus* 74 kDA pada Ikan Kerapu Macan *Ephinephelusfuscus guttatus*. Brakish water Agriculture Depvelopment centre. Diponegoro University. Tembalang Campus. Semarang.
- Endarti. 2009. Pengaruh Pemberian Jintan Hitam(*Nigella sativa*)Sebagai Imunostimulan Terhadap Hematologi Ikan Lele Dumbo (*Clariasgariiepinus*) Setelah Uji Tantang Dengan Bakteri *Aeromonas hydrophila*. [Skripsi] Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Ganong, W.F. 2001. Review of Medical Physiology. McGraw-Hill Companies, Inc. San Fransisco. 675-678.
- Ganong, W.F. 2002. Fisiologi Kedokteran. Edisi 20. Penerbit Buku Kedokteran. E.G.C. Jakarta. 671.
- Gibson,J. 2003. Fisiologi dan Anatomi Modern untuk Perawat. Edisi 2. Diterjemahkan oleh Bertha Sugiarto. Penerbit Buku Kedokteran ECG.Jakarta.
- Guyton, A.C and J.E. Hall. 2006. Textbook of medical physiology. 11th Ed. W.B.Saunders Company. Philadelphia.pp 859-864.
- Haines, M.D. and B.J. Chelack. 1991. *Technical Considerationssm For Developing Enzyme Immunohistochemical Staining Procedures On Formalin- Fixed Paraffin- Embedded Tissues For Diagnostic Pathology*. J.Vet. Diagn. Invest 3 : 101- 112.
- Juanti, F., Aisah dan Edy. 2014. Economic Landscape Sub Sektor Perikanan Pada Perekonomian Kabupaten Sidoarjo: Model Input Output Dan Analytical Hierarchy Process. e-Journal Ekonomi Bisnis dan Akuntansi. Universitas Jember. Volume 1 (1): 42 -52.
- Kresno, S.B. 1996. Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Edisi Ketiga. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

- Kushiramani, R., S.K. Girisha., P.P. Bhowmick., I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2008. Prevalence of different outer membrane proteins in isolates of *Aeromonas* species. *World J. Microbiology and Biotechnology*, 24: 2263-2268.
- Mangunwardoyo, W., I.Ratih., and R.Etty. 2010. *Uji Patogenitas dan Virulensi Aeromonas hydrophila Stanier pada Ikan Nila (Oreochromis niloticus Lin.) Melalui Postulat Koch*. Departemen Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Alam. Universitas Indonesia. Depok.
- Martin. 2004. *Aeromonas hydrophila*. [http://www.mst.edu/microbio/BIO221\\_2004/A\\_hydrophila.htm](http://www.mst.edu/microbio/BIO221_2004/A_hydrophila.htm). [10 Juni 2015].
- Moore, D.M. 2000. *The Laboratory Animal Medicine and Science- series II*. Health Sciences Center for Educational Resources University of Armico. Bandung.
- Mufida, D.C., B.Candra., dan F.Heni. 2006. Peran Protein Mebran Luar 55 kDA *Salmonella typhi* Isolat Jember sebagai Protein Hemaglutinin dan Adhesin. Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Jember.
- Nurhidayat. 2002. *Deteksi Bahan Aktif Dengan Metode Immunohistokimia*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Park, S. Y., M.N.Hyun., P.Kun., and D.P.Seok. 2011. *Aeromonas hydrophila Sepsis Mimicking Vibrio vulnificus Infection*. Department of Dermatology and Institute of Wonkwang Medical Science. Wonkwang University School of Medicine. Iksan-Korea. Vol. 23.
- Pathol, J., Roos., L Edsman., H.Liu., and Söderhäll. 2009. *A Highly Virulent Pathogen, Aeromonas Hydrophila, From The Freshwater Crayfish Pacifastacus Leniusculus*. Elsevier. PubMed – NCBI.
- Putu.,P.N, Putra., N Sri Muktiati., K Mulyartha dan Siswanto. 2009. Ekspresi Sitokeratin 19 dari Bilasan Bronkus Penderita Kanker Paru Jenis Karsinoma bukan Sel Kecil dan Penderita Resiko Tinggi Knker paru dengan Metode Immunohistokimia. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Malang.
- Ramos-Vara, J.A.2005. Technical Aspects Of Immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* Vol 42 : 405- 426.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 3-88.

- Reksono, B., Herman dan Yuniarti. 2012. Pengaruh Padat Penebaran *Grailaria sp.* Terhadap Pertumbuhan dan Kelangsungan Hidup Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) pada Budidaya Sistem Polikultur. Jurnal Perikanan dan Kelautan. Vol.3. no.3. Hal.41-49.
- Roitt, L., B. Jonathan, and M. David. 1989. *Immunology*. Second Edition. The C.V Mosby Company. St Louis. Washington. London.
- Roitt, I., D. Male and J.f. Brostof. 2005. *Immunology*. 6<sup>th</sup> Ed. Black Well Scientific Pub. Oxford.
- Ross, J., H.Jiang., M.R.Kanost., and Y.Wang. (2003). Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. 117-131.
- Ruth, F.2002. *Aeromonas Infection*. Universitas Florida. //http .www. edis. ifas.ufl.edu /FA042. [10 Juni 2015].
- Salim, Nur. 2014. Struktur Mikroskopis Ginjal dengan Pemberian Vitamin D3 pada Tikus Ovariectomi. Universitas Syiah Kuala. Banda Aceh.
- Samsudin, A. U. 2008. Identifikasi Profil Outer Membran Protein *Brucella Abortus Strain 19* dengan menggunakan Metode SDS-PAGE. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Sanoesi, E. 2008. Penggunaan Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya Linn*) terhadap Jumlah Sel Makrofag pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio L*) yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Jurnal Penelitian Perikanan, Vol 11, No. 2, Desember 2008.
- Saraswati, R. 2015. Pemeriksaan Jumlah dan Hitung Jenis Sel Leukosit Darah Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) setelah Diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Setijanto, H. 2002 Teknik Mempelajari Biologi Sel; Identifikasi Beberapa Substansi atau Senyawa Yang Terlibat Dalam Metabolisme Sel. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Smith, J.B dan S. Mangkoewidjojo. 1998. Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Smith, J.R. 1995. Produksi Serum Hiperimun dalam Diagnosis dan Penelitian Graham W. Burges (Ed). Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Soebronto. 2003. Ilmu Penyakit Ternak I. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 464- 484.

- Suarsana, I. N. 2005. Protein A: II. Penggunaan dalam Diagnostik Laboratorium. Jurnal Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Bali. ISSN : 1411- 8327. Vol 6 no 1. Hal 31- 38.
- Sudiana, K.I. 2010. Konsep Dasar Immunologi. Second Edition. Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga.
- Sukadi, M. 2002. Peningkatan Teknologi Budidaya Perairan (*The Improvement of fish Culture Technology*). Direktur Jenderal Perikanan Budidaya. Departemen Kelautan dan Perikanan. Hal.16.
- Swann L. and M.R.White. 1989. Diagnosis and treatment of *Aeromonas hydrophila* infection of fish. Aquaculture extension- Illinois-Indiana Sea Grant Program. pp.91-92
- Thangviji, V., M.Mariavincen., and B.A.Setty., Paramasamy and Thavasimuthu. 2012. Immunization with the *Aeromonas* OMP provides Protection against *Aeromonas hydrophila* in Goldfish (*Carassius auratus*). Centhe for Marine Science and Technology. Manonmaniam Sundaran University. India.
- Tizard. 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Airlangga University Press. Hal 46, 117-178
- Triyaningsih., Sarjito dan Slamet. 2014. Patogenesisitas *Aeromonas hydrophila* yang Diisolasi dari Lele Dumbo (*Clarias Gariepinus*) yang Berasal dari Boyolali. Journal of Aquaculture Management and Technology. Volume 3, Nomor 2. 11-17.
- Vanderolip, S.L. 2001. Mice. Barron's. China
- Vilk, W.A. 1992. *Basic Microbiology 7<sup>ed</sup>*. Harper Collins Publisher Inc. USA.P. 276-277
- Wahab, A.S dan S. Noerjati. 1993. Immunologi III. Gadjah Mada Press. Yogyakarta. Hal 45-49.
- Wijayaning, R., dan Wahyu didik. 2008. Daya Antibakterial Pigmen Pyocyanin dari Isolat (*Pseudomonas aeruginosa*) terhadap *Aeromonas hydrophila* secara IN VITRO. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Wiyanto, D.B. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak rumput laut *kappaphycus alvarezii* dan *Euclima denticulatum* terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio harveyii*. Jurnal Kelautan. Universitas Trunojoyo. Vol.3.no.1.

Wolfgang, K.J., H.P.Willet., D.D.Amos., and C.M.Willfeet.1992. Zinsser Microbiology. 19<sup>th</sup>. Ed. Prentice Hall International Inc. Appleton and Lange. USA.

Yanpuh, 2009. Struktur dan Anatomi Ginjal. Jakarta

Zhang, Y.L., C.T.Ong., and K.Y.Leung. 2000. Molecular analysis of genetic between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. Microbiology 146, 999-1009.



## LAMPIRAN

### **Lampiran 1.** Prosedur pembuatan preparat histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*)

#### 1. *Embedding*

Ginjal direndam dalam larutan fiksatif berupa formalin selama 1-7 hari. Kemudian direndam dalam etanol 70% selama 24 jam dan dilanjutkan dengan etanol 80% selama 2 jam, direndam dalam etanol 90% dan 96% secara berurutan, masing-masing 30 menit. Dilanjutkan perendaman sebanyak 3 kali dalam etanol selama 30 menit masing-masing dalam botol yang berbeda. Direndam dalam xylol sebanyak 2 kali masing-masing selama 30 menit. Proses selanjutnya dikerjakan dalam inkubator dengan suhu 56-58°C. Direndam dalam xylol, kemudian dalam paraffin sebanyak 3 kali, kemudian dilanjutkan dengan embedding dengan mencelupkan ginjal dalam paraffin cair yang telah dituang dalam wadah. Setelah beberapa saat, paraffin akan memadat dan ginjal berada dalam blok.

#### 2. *Coating* objek gelas

Objek gelas (baru) ditandai dengan kikir atau pen dan direndam dalam alkohol 70% selama semalam. Dikeringkan dan dihindarkan dari debu. Dichelupkan selama 30 detik dalam 0,05% gelatin hangat yang dilarutkan dalam aquades. Gelatin 0,5% sebanyak 100 ml digunakan untuk 100 Objek gelas. Kemudian dikeringkan dalam ruang tertutup. Objek gelas dapat digunakan dalam dua hari.

### 3. Pembuatan preparat jaringan

Jaringan ginjal pada blok paraffin hasil *embedding* dimasukkan dalam penjepit (blok holder) mikrotom dan diatur kesejajaran permukaannya potong dengan mata pisau mikrotom. Pemotongan diawali dengan mengatur ketebalan irisan diatas 10  $\mu\text{m}$ . Pemotongan yang bagus akan menghasilkan bentuk potongan seperti pita. Irisan diambil dengan pinset dan dimasukkan air (suhu ruang) untuk membuka lipatan yang mungkin terjadi pada preparat. Hasil irisan dipindahkan dengan menggunakan jarum bertangkai ke air hangat (38°-40°C) untuk meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas objek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakan di atas *hotplate* (38°-40°C) sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator suhu 38°-40°C selama 24 jam.

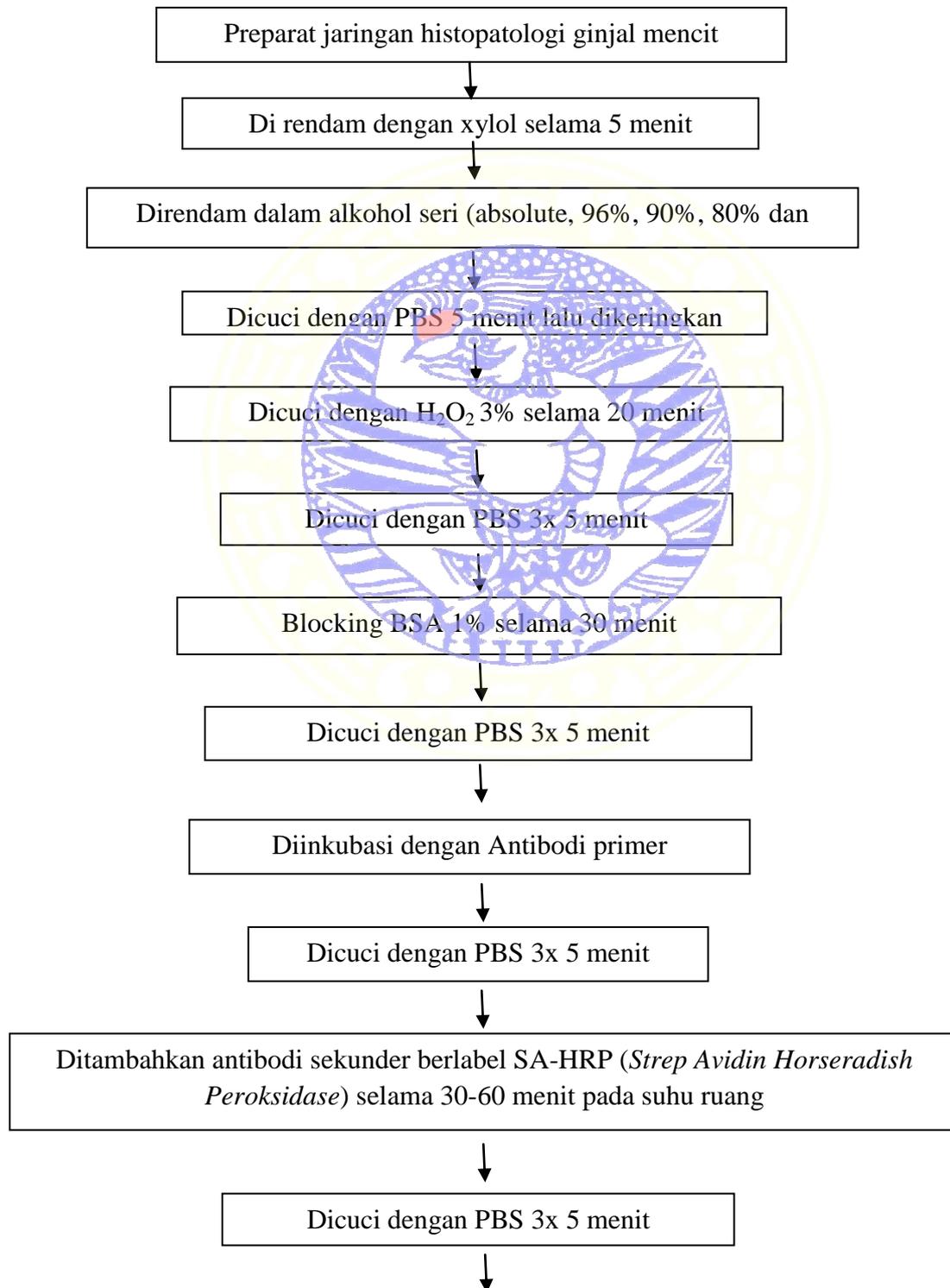
**Lampiran 2.** Pewarnaan imunohistokimia preparat histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*)

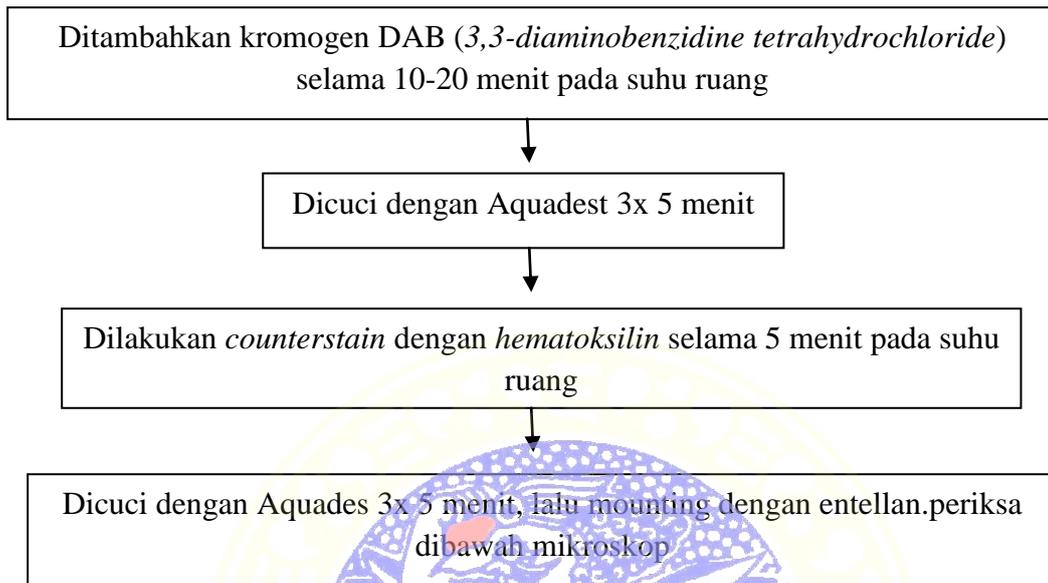
1. Imunohistokimia

Preparat dicelup dalam xylol sebanyak 2 kali, alkohol bertingkat secara berurutan (96%, 90%, 80%, 70%) untuk proses hidrasi. Dicuci dalam PBS pH 7,4 3 kali masing-masing selama 5 menit. Direndam dalam 3% hidrogen peroksida (dalam *destilate water*) selama 20 menit. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Direndam dalam 1% BSA selama 10-30 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan antibodi primer selama 1 jam pada suhu ruang. Lalu diinkubasi selama semalam.

Kemudian dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Kemudian ditambah antibodi sekunder berlabel *Strep avidin horseradish peroxidase* (SA-HRP) selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit.

Preparat ditambahkan kromogen DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) selama 10-20 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam aquades selama 3x5 menit. Dilakukan *counterstain* dengan *hematoksilin* selama 5 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam aquades selama 3x5 menit. Dilakukan *mounting* dengan entellan. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan fasilitas pendukung *optilab* pada pembesaran 100 dan 400 kali.

**Lampiran 3.** Prosedur teknik imunohistokimia



**Lampiran 4.** Gambar bahan dan alat Penelitian



1. Protein spesifik *Aeromonas hydrophila*.



2. *Complete Freund's adjuvant*



3. Alkohol, xylol, kapas dan spuit



4. *Incomplete Freund's Adjuvant*



5. Centrifuge



6. Vortexer

**Lampiran 5. Gambar penelitian**

1. Infeksi pada mencit (*Mus musculus*)    2. Pembedahan mencit (*Mus musculus*)



3. Imunisasi pada kelinci

4. Pengambilan darah pada kelinci