

KARAKTERISASI PROTEIN ADHESIN OMP (OUTER MEMBRAN PROTEIN)

66,29 kDa *Aeromonas salmonicida* TERHADAP SEL EPITEL USUS IKAN MAS

(*Cyprinus carpio* L)

ARTIKEL SKRIPSI
MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
BUDIDAYA PERAIRAN

OLEH:

PARAHITA JAGA WIJAYANTI

NIM. 0410850060



UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

MALANG

2008

KARAKTERISASI PROTEIN ADHESIN OMP (OUTER MEMBRAN PROTEIN) 66,29 kDa

Aeromonas salmonicida TERHADAP SEL EPITEL USUS IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L)

Skripsi Sebagai Salah Satu Prasyarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang

OLEH:

PARAHITA JAGA WIJAYANTI

NIM.0410850060

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

(MAHENO SRI WIDODO, MS)
Tanggal :

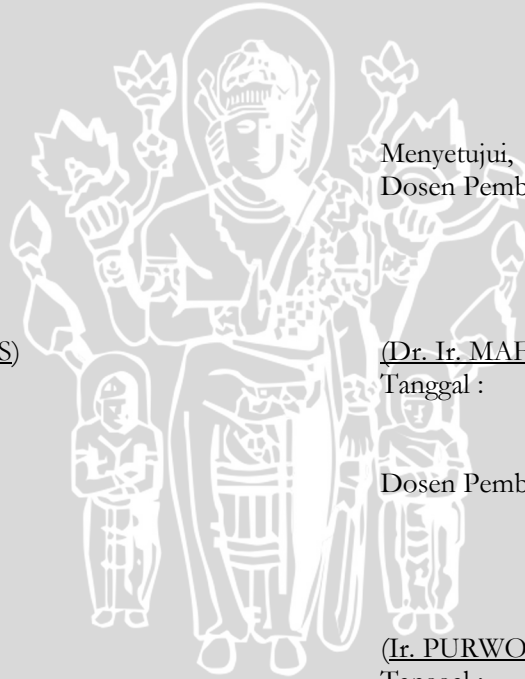
Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. MAFTUCH, MSi)
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

(Ir. PURWOHADIJANTO)
Tanggal :

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Karakterisasi Protein Adhesin OMP (*Outer Membran Protein*) 66,29 kDa *Aeromonas salmonicida* Terhadap Sel Epitel Usus Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L)

Parahita Jaga W¹, Maftuch², Purwohadijanto³
¹*Mahasiswa Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya*
^{2 dan 3}*Dosen Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya*

ABSTRAK

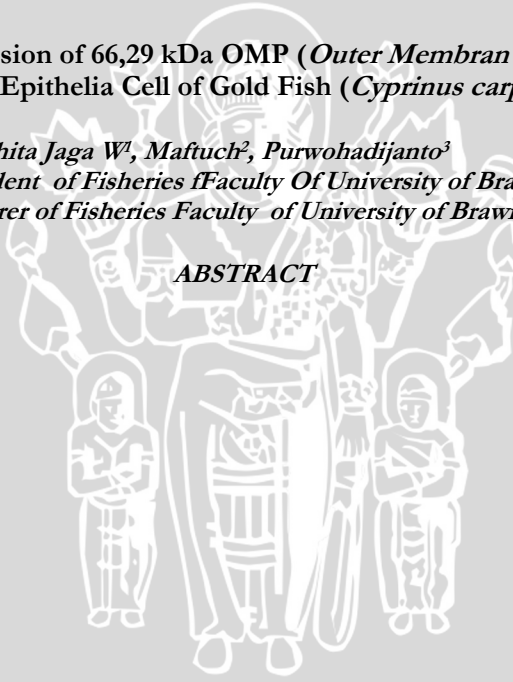
Aeromonas salmonicida merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit furunculosis pada ikan salmon maupun non salmon dan diperairan laut maupun tawar. Di Indonesia penyakit furunculosis ditemukan pada ikan mas, koi dan lele. Pada infeksi sistemik diawali dengan kemampuan adhesi, adhesi mempunyai peran lebih penting dari pada kemampuan invasi. Molekul adhesi merupakan salah satu faktor virulensi bakteri yang bertanggung jawab proses adhesi dan kolonisasi pada sel epitel. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui protein HA *Omp* BM 66,29 kDa *A. salmonicida* merupakan protein adhesi dan mampu menjadi *blocker* pada sel epitel usus ikan mas (*Cyprinus carpio*). Metode penelitian menggunakan uji adhesi protein HA *Omp* BM 66,29 kDa pada perlekatan *A. salmonicida* dengan sel epitel usus ikan mas, analisa ANOVA dan analisa regresi untuk mendapatkan indeks adhesi. Protein HA *Omp* BM 66,29 kDa berpengaruh sangat nyata terhadap indeks adhesi ditunjukkan dengan persamaan regresinya $y = 3,932 - 13,83x$ dan $R^2 = 0,7777$. Semakin besar konsentrasi protein HA *Omp* BM 66,29 kDa yang disalutkan pada sel epitel usus ikan mas maka dapat adhesi *A. salmonicida* semakin kecil.

Kata kunci: *Aeromonas salmonicida*, ikan mas, indeks adhesi

Characterization Adhesion of 66,29 kDa OMP (*Outer Membran Protein*) *Aeromonas salmonicida* In Epithelia Cell of Gold Fish (*Cyprinus carpio* L)

Parahita Jaga W¹, Maftuch², Purwohadijanto³
¹*College Student of Fisheries Faculty Of University of Brawijaya*
^{2 and 3}*Lecturer of Fisheries Faculty of University of Brawijaya*

ABSTRACT



1. Pendahuluan

Perkembangan usaha budidaya perikanan di Indonesia sudah maju sedemikian pesat, namun usaha budidaya dibatasi oleh tingginya angka mortalitas yang secara langsung berhubungan dengan masalah penyakit. Bila ditelusuri penyakit ikan yang terdapat di Indonesia nampaknya semakin kompleks dan timbul karena berbagai sebab sehingga sering membawa kerugian yang tidak sedikit. Serangan penyakit yang serius seperti furunculosis dapat menyerang ikan konsumsi maupun ikan hias (Irawan, 2000).

Furunculosis pada ikan yaitu pembengkakan di bawah kulit yang biasanya menjadi infeksi sistemik pada seluruh tubuh ikan ini disebabkan *Aeromonas salmonicida* (Anonymous, 2004). *A. salmonicida* dapat menginfeksi ikan salmon maupun non salmon dan diperairan laut maupun tawar (Austin dan Austin, 1987). *A. salmonicida* juga dapat menjadi patogen pada ikan non salmon seperti ikan mas, koi dan lele.

Menurut Wibawan (1998) dalam Wahyuni, Wibawan dan Wibowo (2005) menyatakan bahwa untuk pencegahan suatu penyakit perlu dipahami proses atau mekanisme infeksi dari penyakitnya. Mekanisme patogenesi bakteri merupakan suatu proses yang sangat kompleks, pada umumnya melibatkan beberapa mekanisme yaitu; perlekatan bakteri pada sel hospes dan multiplikasi bakteri didalamnya, mekanisme perolehan nutrisi pada sel inang, mekanisme menghambat proses fagosit, mekanisme menghindar dari respon imun hospes, serta mekanisme untuk menimbulkan kerusakan pada sel hospes (Howard, Keiser, Weissteld, Tiltor, 1994).

Pada dasarnya kebanyakan bakteri patogen mengadakan perlekatan pada mukosa dengan berbagai bentuk interaksi. Bakteri mungkin dapat mengekspresikan beberapa faktor adhesi yang masing-masing mempunyai spesifikasi terhadap satu molekul reseptor pada permukaan sel epitel. Sementara itu reseptor yang merupakan tempat terikatnya molekul adhesi bakteri juga dapat terdiri lebih dari satu tempat perlekatan yang spesifik untuk dua atau lebih faktor adhesi (Abraham, Sharon and Ofek, 1999).

Kemampuan bakteri untuk menempel atau adhesi pada sel inang diperantarai oleh komponen adhesi bakteri yang membantu perlekatan bakteri pada reseptor spesifik dari sel inang (Wahyuni *et.al*, 2005). Protein adhesi yang berperan adalah pili dan *Outer Membran Protein* (OMP).

Outer membran mempunyai peranan penting dalam virulensi (kemampuan untuk meminbulkan penyakit) dari bakteri gram negatif. *Outer membrane* merupakan lapisan seperti membrane sel yang terdiri dari lemak, protein dan polisakarida. Ada sedikit perbedaan dari struktur OMP jika dibandingkan dengan membran sitoplasma, komposisi dari OMP sangat kompleks. Porin merupakan bagian terpenting dari membran yang

berhubungan dengan permeabilitas sel. Porin merupakan protein yang berbentuk pori-pori di outer membran yang mengatur masuknya molekul-molekul hidrofilik kecil, porin ini mengatur perpindahan molekul tersebut ke dalam ruang periplasmik untuk transpor melalui membran sitoplasma. Fungsi outer membran adalah mengatur tekanan negatif pada sel, sebagai pori untuk masuknya molekul hidrofolik sebagai phage reseptor atau berhubungan dengan patogeitas bakteri, mengatur stabilitas sel dan mempertahankan enzim dalam periplasmik (Paustian, 1999).

Menurut Wizeman, Adomoum and Langermann (1999), penghalangan/*blocking* tahap awal infeksi merupakan strategi yang efektif untuk pencegahan terjadinya infeksi bakteri. Penghambatan terhadap infeksi bakteri *A. salmonicida* dapat dilakukan dengan memanfaatkan protein adhesi yang terdapat di dalam *Outer Membran Protein*. Dari penelitian sebelumnya telah mendapatkan isolasi protein HA yang berasal dari *Omp* bakteri *A. salmonicida* dengan berat molekul 66,29 kDa. Penelitian ini merupakan lanjutan untuk membuktikan protein HA *Omp* BM 66,29 kDa bakteri *A. salmonicida* adalah protein adhesi dan menguji kemampuannya sebagai *blocker*, maka dilakukan uji adhesi dan hambat adhesi untuk membuktikan.

Rumusan masalah penelitian ini adalah *A. salmonicida* yang merupakan HPIK gol II dan telah menyebar di wilayah Indonesia. Infeksi *A. salmonicida* perlu dihambat dengan adanya bahan alternatif yang lebih efektif dan ramah lingkungan seperti antigen. Antigen dapat diperoleh dari protein bakteri itu sendiri, seperti protein HA *Omp* BM 66,29 kDa. Namun perlu dibuktikan bahwa protein HA *Omp* BM 66,29 kDa merupakan protein adhesi dan mampu menjadi *blocker* adhesi *A. salmonicida*.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui protein HA *Omp* BM 66,29 kDa *A. salmonicida* merupakan protein adhesi pada sel epitel usus ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan mengetahui protein HA *Omp* BM 66,29 kDa *A. salmonicida* merupakan antigen yang mampu menjadi *blocker*.

Penelitian ini dilaksanakan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Mei 2008.

2. Materi dan Metode Penelitian

2.1 Materi Penelitian

Hewan uji penelitian ini menggunakan usus ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang berukuran 15-30 cm yang didapat dari BBI (Balai Benih Ikan) Puntan Batu-Malang.

Bakteri yang digunakan adalah bakteri *A. salmonicida* hasil isolasi media BHI yang didapatkan dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Peralatan yang digunakan pada penelitian sebagai berikut:

- | | |
|---------------------|---------------------|
| - Timbangan digital | - Pipet mikro |
| - Erlenmeyer | - Yellow Tip |
| - Petri disk | - Blue Tip |
| - Autoklaf | - White tip |
| - Eppendorf | - Shaker water bath |
| - Falkon 15 cc | - Mikroskop |
| - Falkon 50 cc | - Sentrifuge |
| - Vortex | - Sechio |
| - Stirrer | - Bunsen |
| - Magnetic | - Pipet tetes |
| - stirrer | |

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

2.2 Rancangan Percobaan

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah suatu metode dengan cara melakukan serangkaian percobaan untuk melihat suatu hasil. Hasil tersebut akan menjelaskan bagaimana kedudukan dan hubungan antara yang diselidiki (Surachmad, 1998). Menurut Nazir (1998), tujuan dari penelitian eksperimental ini adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimen.

Menurut Garperz (1991) rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan yang paling sederhana diantara rancangan-rancangan percobaan baku. RAL dipandang lebih berguna dalam percobaan laboratorium, dalam beberapa percobaan rumah kaca atau percobaan jenis bahan percobaan tertentu yang sifatnya relatif homogen. Adapun rumus dari RAL adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \pi + \epsilon_{ij}$$

Keterangan;

Y_{ij} : nilai pengamatan pada perlakuan dan ulangan

μ : nilai rata-rata harapan

π : pengaruh perlakuan ke- i (1,2,3,...)

ϵ_{ij} : pengaruh acak percobaan pada perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

Pada penelitian ini menggunakan 7 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan pemberian dosis pengenceran protein HA *Omp* 66,29 kDa yang berbeda pada sel epitel usus ikan mas dengan dosis 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 dan 0 merupakan kontrol.

2.2 Metode Isolasi Sel Epitel Usus Ikan

Isolasi sel epitel menggunakan cara Weisler yang diambil dari Nagayama (1995). Jaringan usus halus dibersihkan dari selaputnya dengan direndam pada larutan PBS pH 7,4 kemudian dimasukkan larutan A (PBS pH 7,4 yang mengandung *dithiothreitol* 1mM) lumen usus dibuka untuk

dibersihkan dan dipotong ukuran 5cm,. Setelah tampak bersih jaringan usus dimasukkan ke dalam falkon dan ditambah larutan B (1NaCl 0,0561 gr, Na₂HPO₄ 0,0795 gr, KH₂PO₄ 0,10887 gr, KCl 0,112 gr, Na-citra 0,79 gr). Diletakkan pada pemanas air (water bath) suhu 37°C digoyang 20 menit diambil cairannya untuk dicek perpecahan sel enterositnya lalu disentrifugasi 1000 rpm selama 5 menit kemudian cairan dibuang , jaringan usus dicuci PBS pH 7,4 disentrifugasi 1000 rpm, 5 menit suhu 4°C. Pencucian dilakukan 3 kali, jaringan usus ditambah PBS pH 7,4. sel epitel usus terdapat dicairan suspensi diperiksa dikamar hitung, konsentrasi sel epitel dibuat 10⁶ ml.

2.3 Uji Adhesi dan Hambat Adhesi

Modifikasi rujukan yang digunakan cara Favre-Bonte (1995). Diperiksakan bakteri *A. salmonicida* dan ditumbuhkan pada media *brain heart infusion broth*. Suhu 37°C sampai konsentrasi 10⁸ per ml. Dilakukan beberapa langkah sebagai berikut:

- Suspensi bakteri *A. salmonicida* ditambah PBS pH 7,4 disentrifugasi 6000 rmp, 4°C selama 5 menit. Untuk kontrol diambil 50 µl suspensi bakteri ditambah dengan 50 µl suspensi sel epitel diinkubasi pada shaker water bath suhu 37° C dengan goyangan pelan selama 30 menit. Diambil 20 µl pada slide dan diratakan lalu diviksasi, kemudian dicat dengan pewarnaan gram negatif dan diamati pada mikroskop dengan perbesaran 1000 kali.
- Untuk uji hambat dilakukan 6 macam inkubasi protein HA *Omp* 66,2 kDa pada sel epitel dengan dosis pengenceran 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, keenam perlakuan tersebut ditambah dengan suspensi sel epitel usus ikan mas 20 µl dan diinkubasi pada shaker water bath suhu 37° C dengan goyangan pelan selama 30 menit kemudian sel epitel usus ikan yang sudah dibalut dengan protein HA *Omp* 66,29 kDa ditambah dengan 50 µl suspensi *A. salmonicida*, diinkubasi lagi pada shaker water bath suhu 37° C dengan goyangan pelan selama 30 menit. Diambil 20µl pada slide dan diratakan lalu diviksasi, kemudian dicat dengan pewarnaan gram negatif dan diamati pada mikroskop dengan pebesaran 1000 kali.
- Pemeriksaan dengan mikroskop dengan pembesaran 1000 kali dihitung, jumlah sel bakteri yang melekat pada satu sel epitel usus halus ikan. Sel epitel yang diperiksa secara acak zig-zag sebanyak 100 sel. Sel epitel yang dipilih adalah yang single tidak dalam bentuk gerombolan.

2.4 Analisa Data

Analisa data yang digunakan adalah analisa data statistik, yaitu analisa sidik ragam (ANOVA), analisa data ini untuk menentukan masing-masing perlakuan memberikan pengaruh berbeda nyata pada indeks adhesi dan dilanjutkan dengan regresi. Analisa regresi digunakan untuk menentukan

adanya kecenderungan peningkatan pemberian protein HA *Omp* 66,29 kDa terhadap indeks adhesi *A.salmonicida*.

3 Hasil dan Pembahasan

Isolasi sel epitel usus ikan mas menunjukkan bentuk kepingan yang tak beraturan dan berwarna merah warna merah tersebut merupakan pewarna safranin sesuai dengan Maftuch (2006) bahwa bentuk dari sel epitel usus ikan berbentuk kepingan tidak beraturan. Kepingan tersebut diduga sel enterosit, sel enterosit merupakan sel epitel yang ada di lapisan permukaan sel sesuai dengan Fujaya (2004) bahwa enterosit merupakan bentuk dari epitel usus yang ada di permukaan sel yang mengarah ke rongga usus dan memiliki mikrovili yang berperan dalam penyerapan makanan. Sel eepitel ini akan digunakan dalam uji adhesi dan hambat adhesi.

Uji adhesi bertujuan untuk membuktikan bahwa protein OMP merupakan protein adhesin, sebagai faktor virulensi yang memiliki kemampuan untuk melekatkan bakteri *A. salmonicida* pada sel epitel usus ikan mas. Uji adhesi yang dilakukan antara *A.salmonicida* dengan sel enterosi terjadi perlekatan antara keduanya sesuai dengan pernyataan Sumarno (2005) pelekatan bakteri pada tahap awal tersebut pada epitel usus diperankan oleh protein bakteri yang dikenal sebagai *adbearent molecule* (molekul adesi) sedangkan tempat pelekatan pada sel epitel dikenal sebagai *receptor molecule* (molekul reseptor). Karakterisasi molekul adhesi bakteri terdapat pada dua tempat yaitu pada pili (pili) dan pada *Outer membrane protein* (OMP).

Jumlah bakteri *A.salmonicida* yang melekat pada satu sel enterosit tergantung pada jumlah dan kepadatan sel anterosit ikan mas. Menurut Yanuhar, Maftuch, Satuman, Sukoso dan Sumarno (2005) pola penyebaran adhesi bakteri memberikan pola menyebar (diffuse) dan beberapa diantaranya mengumpul membentuk susunan bertumpuk (agregasi) pada sekumpulan sel epitel akan tetapi pada sel epitel yang densitinya tidak padat, adhesi bakteri menunjukkan pola adhesinya yaitu tidak menyebar secara rata bahkan satu-satu.

Setelah itu dilakukan Uji hambat adhesi protein HA *Omp* 66,29 kDa *A.salmonicida* yang dilakukan ini bertujuan untuk membuktikan bahwa OMP merupakan protein adhesi yang berperan dalam virulensi *A.salmonicida*. Sesuai dengan pernyataan Paustian (1999) bahwa *outer membran* mempunyai peranan penting dalam virulensi (kemampuan untuk menimbulkan penyakit) dari bakteri gram negatif. Fungsi outer membran adalah mengatur tekanan negatif pada sel, sebagai pori untuk masuknya molekul hidrofolik sebagai phage reseptor atau berhubungan dengan patogeitas bakteri. Molekul adhesi bakteri gram negatif merupakan filament protein yang meluas seperti benang, yang merupakan faktor virulensi utama, memicu perlekatan dan proses invasi pada sel inang (Xiao Ziang, Inez, Tsui, Cecilia, Ada,

Danny, Wong, Xiaoyun, Yanhua, Jim and Christian, 2000).

Protein HA *Omp* 66,29 kDa pada setiap dosis pengenceran mampu berikatan dengan reseptor yaitu sel enterosit. *Adhesin* mengikat reseptor spesifik pada membran permukaan sel epitel (Bellanti, 1993). Preotein adhesi adalah protein yang mempunyai peranan penting dalam proses perekatan bakteri pada sel inang dan merupakan faktor virulensi bakteri yang mempunyai potensi imunogenik (Giannasca, 1996).

Protein HA *Omp* 66,29 kDa juga mampu menurunkan jumlah bakteri *A.salmonicida* yang menempel pada sel enterosit, hal ini disebabkan oleh protein HA *Omp* 66,29 kDa yang dapat menjenuhi sel enterosit sehingga membentuk *bocker*. Jumlah bakteri yang menempel pada sel enterosit dihitung dari 100 sel enterosit yang ditemplei bakteri *A.salmonicida* secara acak dan sel enterosit yang tidak bergerombol, seperti yang terlihat pada Tabel.

Hasil Perhitungan Indeks Adhesi Per Seratus Sel

Dosis	Ulangan			Total	Rataan
	1	2	3		
0	30,62	31,15	31,56	93,33	31,11
1/160	21,87	19,72	20,79	62,38	20,79
1/80	11,16	10,98	10,49	32,53	10,84
1/40	8,77	8,47	8,90	26,14	8,713
1/20	6,83	7,07	6,34	20,24	6,747
1/10	4,39	4,46	4,49	13,34	4,447
1/5	1,95	1,77	1,79	5,51	1,837
Total				253,47	84,49

Selanjutnya data tersebut dianalisa secara statistik seperti pada. Analisa tersebut menunjukkan bahwa perbedaan dosis pengenceran protein HA *Omp* 66,29 kDa berpengaruh sangat nyata terhadap indeks adhesi *A.salmonicida* pada sel epitel ikan mas, dimana 1/160 memberikan penghambatan terendah dan 1/5 memberikan hambat tertinggi pada adhesi *A.salmonicida* untuk dapat menempel pada sel inang. Hal itu juga ditunjuk dari hasil analisa grafik regresi seperti yang terlihat pada Gambar.

Grafik hubungan dosis HA *Omp* 66,29 kDa dengan indeks adhesi

Jumlah pemberian dosis protein HA *Omp* 66,29 kDa menyebabkan respon uji hambat adhesi berpola linier dengan persamaan $y = -13,83x + 18,63$ maka diketahui nilai $b = -13,83$ dimana $b =$ koefisien regresi. Nilai b bernilai negatif ini menunjukkan peubah yang satu akan bertambah besar dan peubah yang lain bertambah kecil, maka dapat disimpulkan bahwa semakin besar nilai dosis protein OMP semakin kecil nilai indeks adhesinya.

Penelitian ini telah dibuktikan bahwa protein *Omp* 66,29 kDa merupakan salah satu adhesin dari *A.salmonicida* maka dapat dimanfaatkan oleh bakteri *A.salmonisida* sebagai faktor virulensinya, sesuai dengan pernyataan Giannasca (1996) bahwa protein adhesi yang berperan adalah pili dan *Outer Membran Protein* (OMP), protein adhesi merupakan salah satu

faktor virulensi bakteri yang bertanggung jawab pada terjadinya kolonisasi untuk menimbulkan infeksi.

4 Kesimpulan dan Saran

4.1 Kesimpulan

- Protein HA *Omp* 66,29 kDa *A.salmonicida* merupakan protein adhesi dari bakteri *A.salmonicida* terbukti antara reseptor protein HA *Omp* 66,29 kDa sesuai dengan reseptor sel enterosit ikan mas.
- Protein HA *Omp* 66,29 kDa *A.salmonicida* sebagai protein adhesi yang mampu menghambat perlekatan bakteri *A.salmonicida* ini terbukti dengan sel enterosit yang disaluti dengan HA *Omp* 66,29 kDa *A.salmonicida* menunjukkan penurunan perlekatan bakteri *A.salmonicida*.

4.2 Saran

Perlu adanya penelitian lanjutan untuk membuktikan bahwa HA *Omp* 66,29 kDa *A.salmonicida* mempunyai sifat imunogenik terhadap bakteri *A.salmonicida* dan bakteri lain.

