

**EKSPRESI INTERLEUKIN 6 (IL-6)
PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) YANG DI PAPAR
PROTEIN IMUNOGENIK *Vibrio parahaemolyticus***

**LAPORAN SKRIPSI
MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh :

TIFFANY RESTIA ROFIS

0610810071

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2010

LAPORAN SKRIPSI
EKSPRESI INTERLEUKIN 6 (IL-6)
PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*) YANG DI PAPAR
PROTEIN IMUNOGENIK *Vibrio parahaemolyticus*

Oleh :
TIFFANY RESTIA ROFIS
NIM. 0610810071

Dosen Penguji I

Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati., MS

NIP. 19591230-198503-2-002

Tanggal :

Dosen Penguji II

Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D

NIP. 19610523-198703-2-003

Tanggal:

Menyetujui,

Dosen pembimbing I

Asus Maizar S, S.Pi, MP

NIP. 19720529-200312-1-001

Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Dr.Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si

NIP. 19730404-200212-2-001

Tanggal :

Mengetahui,
Ketua Jurusan

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

NIP. 19600322-198601-1-001

Tanggal :

LEMBAR KHUSUS

“Penelitian ini merupakan sebagian dari Payung Riset Program L’Oreal Unesco Woman in Life Science dan Riset Unggulan Strategis dari Kementerian Negara Riset dan Teknologi Tahun 2009-2010”

Atas nama :

Dr. UUN YANUHAR S.Pi., M.Si

RINGKASAN

TIFFANY RESTIA ROFIS. Penelitian tentang ekspresi interleukin 6 (IL-6) pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang dipapar protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* (dibawah bimbingan **Asus Maizar S. H., S.Pi., MP** dan **Dr. UUN Yanuhar S.Pi., M.Si**).

Respon imun diklasifikasikan menjadi 2 kategori, yaitu respon imun spesifik dan non-spesifik (Panjaitan, 2009). Molekul MHC, TCR dan Ig merupakan reseptor-reseptor yang berperan dalam sistem pertahanan adaptif ikan. Antigen akan ditangkap oleh sel-sel APC (*antigen presenting cell*) untuk dipresentasikan kepada sel T CD4 melalui MHC kelas II. Sel T CD4 yang teraktivasi akan mensekresi sitokin-sitokin sebagai mediator kepada sel B untuk mengadakan proliferasi dan diferensiasi. Salah satu sitokin yang berperan dalam menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel B adalah interleukin 6 (IL-6) (Meager, 2007). Sehingga diperlukan penelitian untuk mengetahui ekspresi respon ekstraseluler ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang dipapar protein adhesin *Vibrio parahaemolyticus* dengan melihat ekspresi IL-6 melalui metode IHC (Imunohistokimia) agar dapat digunakan untuk berbagai kepentingan diantaranya adalah untuk deteksi penyakit tertentu.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bahwa protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* yang dipapar pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) berat molekul 19,13 kDa dapat mengekspresikan interleukin 6 (IL-6) pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Penelitian ini dilaksanakan bulan Januari 2010 sampai Juni 2010.

Prosedur penelitian meliputi isolasi protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus*, elektroforesis SDS-PAGE protein *Vibrio parahaemolyticus*, separasi protein dan pemotongan pita protein, elektroelusi dan dialisa, spektrofotometer nanodrop, uji klinis protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus*, dan selanjutnya pemeriksaan imunohistokimia untuk melihat ekspresi Interleukin 6 (IL-6) dengan menggunakan pelabelan *secondary antibody anti Il-6 conjugate biotin*.

Hasil penelitian Lestari (2009), menunjukkan bahwa pita protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* yang ditemukan bersifat imunogenik adalah dengan berat molekul 19,13 kDa. Hasil elektroforesis pita protein 19,13 kDa

akan dielektroelusi dari matriks gel untuk mendapatkan pita protein murni dan pita protein tersebut akan dijadikan sebagai bahan vaksin yang diberikan secara injeksi intraperitoneal pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) uji dengan dosis 33 µg / 150 g berat ikan. Ikan kerapu uji hasil perlakuan yang telah dipapar dengan protein imunogenik akan dilihat ekspresi Interleukin 6 (IL-6). Ekspresi IL-6 dideteksi dengan metode imunohistokimia. Ekspresi Interleukin 6 (IL-6) dideteksi dengan menggunakan pelabelan *secondary antibody anti IL-6 conjugate biotin*. Ekspresi IL-6 dapat dilihat pada struktur jaringan ikan kerapu yang telah diberi perlakuan protein imunogenik secara *invivo*, ekspresi ini ditunjukkan oleh adanya perubahan warna jaringan pada tingkat sel dan jaringan melalui pemeriksaan mikroskop. Ekspresi IL-6 yang kuat ditunjukkan oleh warna coklat keemasan pada bagian lisosom pada jaringan ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah pemberian protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* pada ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) secara *invivo* dapat memberikan warna coklat keemasan pada jaringan mata, otak dan ginjal karena jaringan tersebut mengekspresikan IL-6 dengan demikian dibutuhkan penelitian lanjutan untuk mengembangkan bahan diagnostik dari interleukin 6 (IL-6) untuk diagnosa spesifik *Vibrio Parahaemolyticus* dan bahan obat untuk memberantas serangan dari bakteri *Vibrio Parahaemolyticus*.



KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan hidayah-Nya penulisan laporan skripsi ini dapat terselesaikan. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya.

Atas terselesaikannya laporan skripsi ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Kedua orang tua atas do'a restunya.
2. Agus Maizar S, S.Pi. MP selaku dosen pembimbing I dan Dr. Uun Yanuhar S.Pi. Msi selaku dosen pembimbing II atas segala petunjuk dan bimbingannya sejak penyusunan usulan penelitian sampai dengan selesainya penyusunan laporan skripsi ini.
3. Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati., MS selaku dosen penguji I dan Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D selaku dosen penguji II atas saran dan bimbingannya dalam perbaikan laporan penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari kata sempurna, sehingga saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Akhirnya penulis berharap semoga karya tulis ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi semua pihak yang berminat dan memerlukan.

Malang, 16 Juli 2010

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	5
1.3. Tujuan	5
1.4. Kegunaan	6
1.4.1. Kegunaan Praktis	6
1.4.2. Kegunaan teoristis	6
1.5. Hipotesa	6
1.6. Waktu dan Tempat	6
1.7. Jadwal Pelaksanaan	7
2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>)	8
2.1.1. Klasifikasi	8
2.1.2. Morfologi	9
2.1.3. Habitat dan Penyebaran	10
2.1.4. Reproduksi	11
2.2. Penyakit Pada Ikan Kerapu	11
2.2.1. Penyakit Bakterial	12
2.3. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	19
2.4. Sistem Imun Pada Tubuh Ikan Laut	22
2.4.1. Respon Imun Non Spesifik atau Bawaan (<i>Innate</i>)	26
2.4.2. Respon imun spesifik (adaptif)	26
2.4.2.1. Antibodi atau Immunoglobulin (Ig)	27
2.4.2.2. Major histocompatibility complex (MHC)	30
2.4.2.3. Reseptor- Reseptor Sel T (<i>T-cell receptor</i> , TCR)	32
2.5. Sitokin dan IL-6	34
2.6. Antigen	34
2.7. Protein	34
2.8. Kualitas Air Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altiveis</i>)	35
2.8.1. Suhu	35
2.8.2. pH	36
2.8.3. Salinitas	37

3.	MATERI DAN METODE	38
3.1.	Materi Penelitian	38
3.2.	Metode Penelitian	38
3.3.	Alat dan Bahan	39
3.3.1.	Alat	39
3.3.2.	Bahan	39
3.4.	Metode	40
3.4.1.	Persiapan Wadah Pemeliharaan dan Aklimatisasi Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>)	40
3.4.2.	Kultur Bakteri <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	40
3.4.3.	Isolasi Crude protein Bakteri <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	41
3.4.5.	Fraksinasi Protein Dengan Sodium Dedosil Sulfate Polyacrilamid Gel Elektrophoresis (SDS-Page)	41
3.4.6.	Elektroelusi dan dialisa	43
3.4.7.	Pengukuran protein spesifik dengan Spektrofotometer	43
3.4.8.	Uji klinis protein imunogenik <i>Vibrio parahaemolyticus</i> pada ikan kerapu tikus	44
3.4.9.	Preparasi Jaringan Organ Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>) Setelah Dipapar Protein Imunogenik <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	45
3.4.10.	Pemeriksaan Ekspresi Reseptor Ikan Kerapu Dengan IHC (Imunohistokimia)	45
3.	HASIL DAN PEMBAHASAN	47
4.1.	Hasil penelitian	47
4.1.1.	Identifikasi Protein Bakteri <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	47
4.1.2.	Konsentrasi Protein Imunogenik	50
4.2.	Imunisasi Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>) secara invivo dengan Protein Imunogenik <i>Vibrio parahaemolyticus</i> berat molekul 19,13 kDa	51
4.3.	Ekspresi Interleukin 6 (IL-6) pada Jaringan dengan teknik IHC	53
4.3.1.	Ekspresi IL-6 pada Jaringan Otak Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>) dengan teknik Imunohistokimia	54
4.3.2.	Ekspresi IL-6 pada Jaringan Mata Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>) dengan teknik Imunohistokimia	56
4.3.3.	Ekspresi IL-6 pada Jaringan Ginjal Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>) dengan teknik Imunohistokimia	58
4.3.4.	Perbedaan antara ikan sehat dan ikan sakit	61
4.4.	Data Kualitas Air	62
4.4.1.	Parameter Suhu	64
4.4.2.	Parameter pH	65
4.4.3.	Parameter Salinitas	67
4.4.4.	Data Kualitas Air (Pada Saat Pemaparan ikan dengan protein Imuogenik)	68
4.	KESIMPULAN DAN SARAN	71
4.1.	Kesimpulan	71
4.2.	Saran	71
5.	DAFTAR PUSTAKA	72
6.	LAMPIRAN	75
7.	INDEX	

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Berat Molekul Protein <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	46
2. Rata- Rata Hasil Kualitas Air Selama Pemeliharaan	62

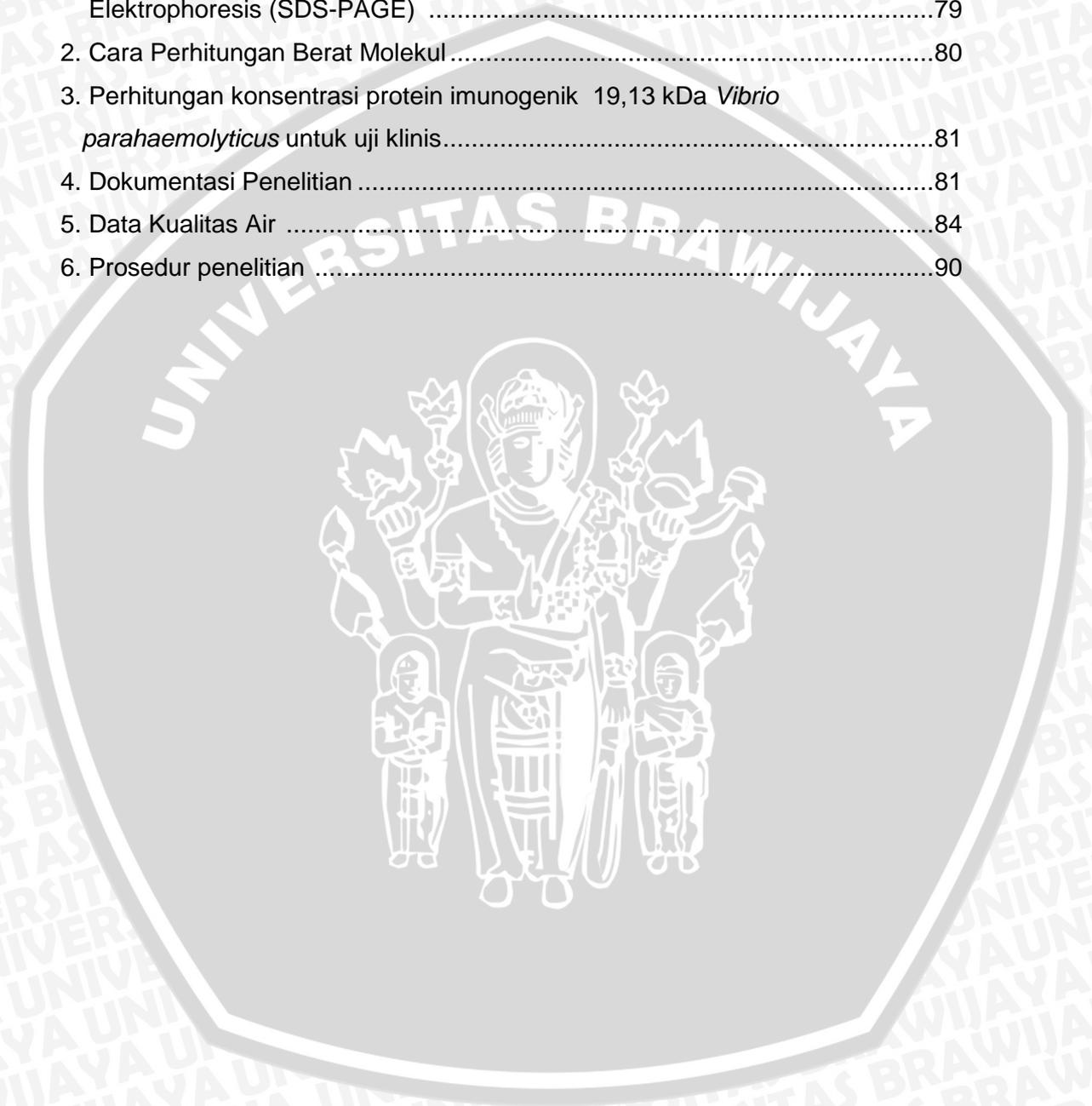


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Kerapu Tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>)	9
2. Struktur sel bakteri	13
3. Struktur dinding sel bakteri gram.....	14
4. <i>V. parahaemolyticus</i>	20
5. Sistem imun pada ikan dan fungsinya	23
6. Sel-sel yang terdapat dalam sistem imun	25
7. Struktur Antibodi	29
8. Mekanisme Pengikatan Antigen	32
9. Struktur TCR	33
10. Diagram proses penyuntikan ikan.....	44
11. Profil <i>Crude Protein V. parahaemolyticus</i> dengan SDS-PAGE	48
12. Foto mikroskop jaringan otak kerapu tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>)	55
13. Foto mikroskop jaringan mata kerapu tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>).....	56
14. Reaksi antigen-antibodi	57
15. Foto mikroskop jaringan ginjal kerapu tikus (<i>Cromileptes altivelis</i>)	59
16. Kondisi Ikan Kerapu tikus	61
17. Grafik Parameter Kualitas Air saat Aklimatisasi ikan	62
18. Grafik Parameter Suhu Selama Pemeliharaan Ikan Kerapu	64
19. Grafik Parameter pH Selama Pemeliharaan Ikan Kerapu	66
20. Grafik Parameter Salinitas Selama Pemeliharaan Ikan Kerapu	67
21. Grafik Parameter Suhu Selama Pemboosteran Ikan Kerapu	69
22. Grafik Parameter pH Selama Pemboosteran Ikan Kerapu	69
23. Grafik Parameter Salinitas Selama Pemboosteran Ikan Kerapu	70

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bahan Pembuatan Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Elektrophoresis (SDS-PAGE)	79
2. Cara Perhitungan Berat Molekul	80
3. Perhitungan konsentrasi protein imunogenik 19,13 kDa <i>Vibrio parahaemolyticus</i> untuk uji klinis.....	81
4. Dokumentasi Penelitian	81
5. Data Kualitas Air	84
6. Prosedur penelitian	90



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sumberdaya kelautan dan perikanan yang dimiliki oleh Indonesia sangat beragam, baik jenis dan potensinya. Dua pertiga wilayah Indonesia berupa laut dengan garis pantai sepanjang 81.000 Km yang terdiri dari sekitar 17.508 pulau. Potensi budidaya laut khususnya ikan dan moluska juga masih sangat besar. Luas lahan total perairan laut yang berpotensi untuk budidaya ikan (kakap, buronang, dan kerapu) sekitar 1.059.720 Ha, dan budidaya moluska (kerang-kerangan) dan teripang sekitar 720.500 Ha. Spesies-spesies utama dalam budidaya laut di Indonesia terdiri dari berbagai jenis ikan bersirip, kerang-kerangan, rumput laut dan spesies-spesies lainnya, termasuk teripang. Ikan bersirip seperti kakap laut, dan kerapu, dengan produksi mencapai 8,760 ton pada tahun 2002 (FAO, 2007).

Kerapu merupakan ikan-ikan yang hidup di terumbu karang, yang dalam dunia internasional dikenal dengan nama *groupers* atau *coral reef fishes*. Ikan-ikan ini memiliki nilai ekonomis tinggi dan sangat potensial untuk dikembangkan di Indonesia. Ikan kerapu diperdagangkan dalam keadaan hidup, dengan harga jual yang relatif tinggi. Harga ikan kerapu tikus ditingkat nelayan dapat mencapai US\$ 20 (Rp 200.000,-) untuk setiap kilogramnya. Ikan tersebut diekspor terutama ke Hongkong dengan harga jual yang berlipat kali. Pada tahun 2000, Hongkong mengimpor 9.827 ton ikan kerapu hidup, dengan pemasok utama China, Thailand, Philipina, Indonesia, Australia dan Malaysia. Pangsa Indonesia hanya sekitar 9,39% dari semua pemasok ikan kerapu ke Hongkong Muhtadi (2007).

Kerapu tikus salah satu jenis ikan laut komersial yang mulai dibudidayakan orang, baik untuk pembenihan maupun pembesarannya. Pemilihan lokasi yang sesuai sangat penting bagi kelangsungan usaha budidaya kerapu tikus. Beberapa faktor yang perlu dipertimbangkan di antaranya adalah gangguan alam, kualitas air, pencemaran, predator dan penyakit (Trubus, 2007). Fatonny (2006), Media budidaya ikan merupakan suatu tempat hidup bagi ikan untuk tumbuh dan berkembang yaitu air. Air yang dapat digunakan sebagai budidaya ikan harus mempunyai standar kuantitas dan kualitas yang sesuai dengan persyaratan hidup ikan.

Ikan kerapu tersebar luas di perairan pantai baik di daerah tropis maupun sub tropis, dan termasuk jenis ikan yang hidup di perairan berkarang sehingga sering dikenal sebagai ikan karang (*coral reef fish*). Beberapa jenis ikan kerapu yang banyak terdapat di Indonesia seperti kerapu bebek atau tikus (*Cromileptes altivelis*), kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), kerapu sunu (*Plectropomus leopardus*), kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*), kerapu malabar (*Epinephelus malabaricus*), dan kerapu bintik atau batik (*Epinephelus bleekeri*), merupakan komoditas andalan untuk dibudidayakan karena selain memiliki nilai jual yang tinggi juga dalam proses produksinya lebih banyak memanfaatkan sumber daya laut yang ada dan menggunakan komponen lokal cukup besar. Hasil dari usaha budidaya ikan kerapu mempunyai pangsa pasar yang luas sehingga sangat potensial untuk dikembangkan sehingga dapat meningkatkan devisa negara. Kerapu bebek termasuk satu diantara jenis kerapu yang paling banyak diminati konsumen baik sebagai ikan hias (pada ukuran juvenil 3-5 cm) yang dikenal dengan nama *Grace Kelly* atau *Polka dot Grouper*, maupun sebagai "sea food" pada ukuran konsumsi 400-800 gram (Prasetya *et al.*, 2008).

Widiyanti (2009) menyatakan Infeksi bakteri merupakan penyebab kematian masal pada benih ikan kerapu. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* ini merupakan masalah yang sangat serius dan umumnya menyerang ikan-ikan budidaya dari laut. Penularannya dapat melalui air atau kontak langsung antar ikan dan menyebar sangat cepat pada ikan-ikan yang dipelihara dengan kepadatan tinggi. Penelitian Wijayati dan Hamid (1997) dalam Widiyanti (2009), membuktikan bahwa bakteri yang menginfeksi ikan kerapu tikus stadia larva, *fingerling*, maupun induk adalah bakteri *Vibrio* dari jenis *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, dan *Vibrio marinus*.

Vibrio merupakan patogen oportunistik yang dalam keadaan normal ada dalam lingkungan pemeliharaan, kemudian berkembang dari sifat yang saprofitik menjadi patogenik jika kondisi lingkungannya memungkinkan. Bakteri *vibrio* yang patogen dapat hidup di bagian tubuh organisme lain baik di luar tubuh dengan jalan menempel, maupun pada organ tubuh bagian dalam seperti hati dan usus (Feliatra, 1999). Proses infeksi pada ikan oleh bakteri dapat menghasilkan zat beracun yang disebut toksin yang merupakan produk ekstraseluler yang berkaitan dengan antibiosis sehingga dapat mematikan organisme inang atau memudahkan bakteri masuk kedalam tubuh inang (Budiadi, 2006).

Proses infeksi bakteri diawali interaksi dengan perlekatan atau adhesi pada reseptor yang ada di permukaan sel inang. Reseptor merupakan molekul karbohidrat spesifik pada permukaan membran sitoplasma, yang diperankan oleh protein (Wikipedia^a, 2009). Makin meningkatnya jumlah bakteri yang menyerang ikan khususnya kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) maka perlu dikembangkan protein imunogenik dari *Vibrio parahaemolyticus* yang mampu membangkitkan sistem imun untuk kelangsungan hidup Ikan kerapu tikus. Diantaranya adalah peran ekspresi IL-6 sebagai sistem imun adaptif ikan untuk perlindungan kerapu tikus dari bakteri *Vibrio parahaemolyticus*.

Salah satu upaya tubuh untuk mempertahankan diri terhadap masuknya antigen adalah dengan cara meniadakan antigen tersebut, secara non spesifik yaitu dengan cara fagositosis. Respon imun diklasifikasikan menjadi 2 kategori, yaitu respon imun spesifik dan non-spesifik. Sel limfosit memegang peran penting dalam sistem imun spesifik. Limfosit mempunyai 2 populasi yaitu limfosit T (sel T), yang berperan dalam respon imun seluler, serta limfosit B (sel B) yang berperan dalam respon imun humoral (Panjaitan, 2009).

Makrofag bersifat fagositosis, menghancurkan sel lain dengan cara memakannya dan mempresentasikan antigen (*Antigen Presenting Cell*). Kemudian, pada semua limfosit dewasa, permukaannya terempel reseptor antigen yang hanya dapat mengenali satu antigen. Saat antigen memasuki sel tubuh, molekul tertentu mengikatkan diri pada antigen dan memunculkannya dihadapan limfosit. Molekul ini dikenal sebagai molekul MHC. MHC I menghadirkan antigen di hadapan limfosit T sitotoksik dan MHC II menghadirkan antigen ke hadapan limfosit T helper (Robbin *et., al* (2007).

Molekul MHC merupakan reseptor-reseptor yang berperan dalam sistem pertahanan adaptif ikan, karena terekspresinya molekul MHC mengindikasikan adanya pengenalan antigen oleh APC (Musdalifah, 2010). Antigen akan ditangkap oleh sel-sel APC (*antigen presenting cell*) untuk dipresentasikan kepada sel T CD4 melalui MHC kelas II. Sitokin menjadi salah satu parameter bahwa antigen telah dipresentasikan oleh MHC II. Sebab sel T CD4 yang teraktivasi akan mensekresi sitokin-sitokin sebagai mediator kepada sel B untuk mengadakan proliferasi dan diferensiasi. Salah satu sitokin yang berperan dalam menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel B adalah interleukin 6 (IL-6) (Meager, 2007).

IL-6 merupakan sitokin yang memiliki kemampuan multifungsi yang mengatur berbagai macam aktifitas sel imun. IL-6 juga memiliki peran dalam meningkatkan atau menahan pertumbuhan sel (diferensiasi sel) sesuai dengan tipe sel masing-masing. IL-6 terlibat dalam diferensiasi sel B, sel T dan makrofag. Pada penelitian Lestari (2009), telah didapatkan hasil bahwa protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* mempunyai berat molekul 19,13 kDa. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan pengamatan ekspresi IL-6 pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang dipapar protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* dengan berat molekul 19,13 kDa dengan metode IHC (Imunohistokimia) agar dapat digunakan untuk berbagai kepentingan diantaranya adalah untuk deteksi penyakit tertentu.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* yang dipapar pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) dengan berat molekul 19,13 kDa dapat mengekspresikan interleukin 6 (IL-6) pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*)?

1.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bahwa protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* yang dipapar pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) dengan berat molekul 19,13 kDa dapat mengekspresikan interleukin 6 (IL-6) pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*).

1.4. Kegunaan

1.4.1. Kegunaan Praktis

Diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai ekspresi Interleukin 6 (IL-6) pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang dipapar oleh protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus*

1.4.2. Kegunaan Teoritis

Diharapkan digunakan sebagai penelitian dasar untuk menghasilkan rekombinan peptida yang dapat dikembangkan sebagai bahan *diagnostik* dan bahan obat untuk *Vibrio parahaemolyticus*.

1.5. Hipotesa

- H_0 = diduga bahwa pemaparan protein imunogenik bakteri *Vibrio parahaemolyticus* tidak dapat mengekspresikan IL-6.
- H_1 = diduga bahwa pemaparan protein imunogenik bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dapat mengekspresikan IL-6.

1.6. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan pada akuarium percobaan di Laboratorium Ilmu – Ilmu Perairan dan Bioteknologi FPIK Universitas Brawijaya Malang, LSIH, Laboratorium Biomedik FK. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2010 sampai Juni 2010.

1.7 Jadwal Pelaksanaan

Jenis Kegiatan	Bulan												
	Januari- Februari	Maret				April				Mei	Juni	Juli	Agustus
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I-IV	I-II		
Persiapan													
- Adaptasi ikan	x												
Pelaksanaan													
- Isolasi bakteri	x												
- Isolasi crude protein	x												
- Fraksinasi Crude Protein		x											
- Pemotongan pita protein						x							
- Elektroelusi dan Dialisa								x					
- Pemboosteran I									x				
- Pemboosteran II										x			
- Pemboosteran III											x		
- Isolasi organ											x		
- Ekspresi protein												x	
Penyusunan Laporan													x
Seminar													x
Ujian													
													x

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

2.1.1. Klasifikasi

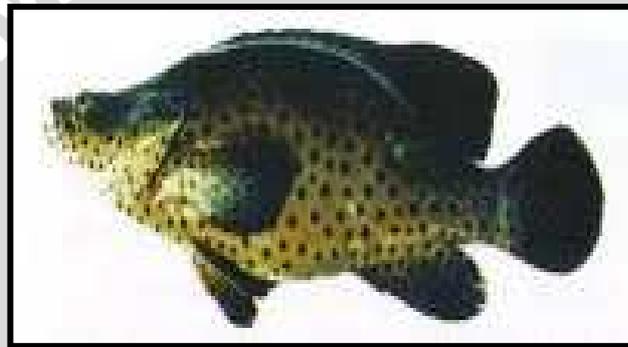
Sistematika kerapu bebek menurut Randall (1987) dalam Subyakto dan Sri (2005), sebagai berikut:

Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Osteichthyes
Subkelas	: Actinopterygi
Ordo	: Percomorphi
Subordo	: Perciodea
Famili	: Serranidae
Subfamili	: Epinephelinae
Genus	: <i>Cromileptes</i>
Spesies	: <i>Cromileptes altivelis</i> .

Menurut Randall (1993) dalam Murtidjo (2002), Kerapu bebek yang sering disebut sebagai kerapu tikus, karena bentuk moncongnya yang meruncing menyerupai moncong tikus, di pasaran internasional dikenal dengan nama *polka-dot grouper*. Namun, ada juga yang menyebutnya *hump-backed rocked*. Ikan kerapu bebek ini bertubuh agak pipih dan warna dasar kulit tubuhnya abu-abu dengan bintik-bintik hitam diseluruh permukaan tubuh. Kepala berukuran kecil dengan moncong agak meruncing. Karena kepalanya kecil dan menyerupai bebek, maka jenis ikan ini disebut sebagai kerapu bebek.

2.1.2. Morfologi

Menurut Perwira (2008), ikan kerapu tikus mempunyai ciri-ciri morfologi sirip punggung dengan 10 jari-jari sirip keras dan 18-19 jari-jari sirip lunak (D.X.18-19) yang semakin melebar ke belakang, sirip perut dengan 2 jari-jari sirip keras dan 10 jari-jari sirip lunak (V.II.10), sirip ekor dengan 1 jari-jari sirip keras dan 70 jari-jari sirip lunak (C.I.70), sirip anal dengan 3 jari-jari sirip keras dan 10 jari-jari sirip lunak (A.III.10), sirip pectoral berjumlah 17-18, sisik berbetuk sikloid, warna tubuh putih kadang kecokelatan dengan totol hitam pada badan, kepala dan sirip, seperti pada gambar 1.



Gambar 1. Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) (Swadaya, 2009).

Menurut Randall (1993), ikan kerapu dapat mencapai panjang 70 cm dan hidup di perairan terumbu karang. Ikan kerapu tikus, sering pula disebut sebagai ikan kerapu bebek atau *Phanter grouper* dengan tubuh yang unik yaitu menyerupai bebek dengan bintik-bintik hitam di seujur tubuh.

Menurut Heemstra dan Randall (1993) dalam Cholik *et al.*, (2006), ciri-ciri utama ikan kerapu tikus (*C. altivelis*) adalah: Tubuh pipih, tinggi tubuh lebih pendek dari panjang kepala, bentuk kepala bagian atas cekung, tubuh agak pucat berwarna coklat kehijauan bintik-bintik hitam bulat dan agak jarang pada kepala, badan maupun sirip, ujung semua sirip berbentuk bundar/busur.

2.1.3. Habitat dan Penyebaran

Di habitat aslinya kerapu tikus hidup di kawasan terumbu karang di perairan-perairan dangkal hingga 100 m di bawah permukaan laut. Selain perairan karang, lokasi kapal tenggelam juga menjadi rumpon yang nyaman. Ikan kerapu tikus berdiam di dalam lubang-lubang karang atau menempel pada dinding karang atau rumpon dengan aktivitas relatif rendah. Gerak ruayanya sempit dan biasanya membentuk gerombolan yang tidak terlalu besar. Daerah penyebarannya antara lain di wilayah perairan Pulau Sumatera, Kep. Riau, Jawa, Teluk Banten, Luwuk Banggai, Teluk Tomini, Ambon, Ternate, Kepulauan Seribu, Bangka, Lampung Selatan, dan beberapa kawasan terumbu karang lain (Trubus,2007).

Kerapu muda umumnya hidup di perairan karang pantai dengan kedalaman 0,5 m - 0,3 m. Habitat yang paling disukai adalah perairan dengan dasar pasir berkarang yang ditumbuhi padang lamun (seagrass). Setelah menginjak dewasa ikan kerapu tersebut akan bergerak ke perairan yang lebih dalam antara 7 m - 40 m. Perpindahan ini biasanya berlangsung siang dan sore hari (Murtidjo, 2002).

Parameter-parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu yaitu temperatur antara 24 – 31°C, salinitas antara 30 -33 ppt, kandungan oksigen terlarut > 3,5 ppm dan pH antara 7,8 – 8. Perairan dengan kondisi seperti ini, pada umumnya terdapat di perairan terumbu karang (Tim Peneliti Udana, 2009).

2.1.4. Reproduksi

Salah satu indikator untuk menentukan determinasi kelamin ikan kerapu tikus di alam adalah dengan menghubungkan antara panjang total tubuh dengan kematangan gonad jantan dan betina. Ukuran tubuh betina ikan kerapu tikus lebih kecil dibandingkan dengan jantan (Smith, 1982 dalam Budiadi 2008).

Ikan ini memiliki sifat *protogony hermaphrodite*, yaitu berubah kelamin dari betina menjadi jantan. Perubahan tersebut terjadi setelah berukuran di atas 2,5-3,0 kg. Seekor induk betina berukuran 3-4 kg dapat menghasilkan 200-300 ribu butir telur setiap kali memijah (Swadaya, 2009).

2.2 Penyakit Pada Ikan Kerapu

Penyakit diartikan sebagai suatu keadaan fisik, morfologi, dan atau fungsi yang mengalami perubahan dari kondisi normal karena beberapa penyebab, dan terbagi atas dua kelompok yaitu penyebab dari dalam (internal) dan luar (eksternal). Penyakit ikan umumnya adalah eksternal. Penyakit internal : genetik, imunodefisiensi, saraf dan metabolik. Penyakit eksternal : 1). Non pathogen; • Penyakit lingkungan : suhu dan kualitas air lainnya (pH, kelarutan gas, zat beracun). • Penyakit nutrisi : kekurangan nutrisi, gejala keracunan bahan pakan. 2). Patogen; bersifat parasit dan terdiri atas tiga kelompok yaitu : • Penyakit viral • Penyakit jamur • Penyakit bakterial. Gejala-gejala umum penyakit ikan yaitu; Warna kusam atau pucat, sirip rontok, sirip lepas dan kadang tidak rapi, luka, pendarahan, produksi lendir berlebihan/berkurang, tutup insang selalu terbuka, warna lembar insang pucat, terdapat benjolan pada insang/daging, mata menonjol, ukuran kepala dan badan tidak proporsional, kemungkinan terjadi kelainan bentuk lain (Anjarudin, 2007).

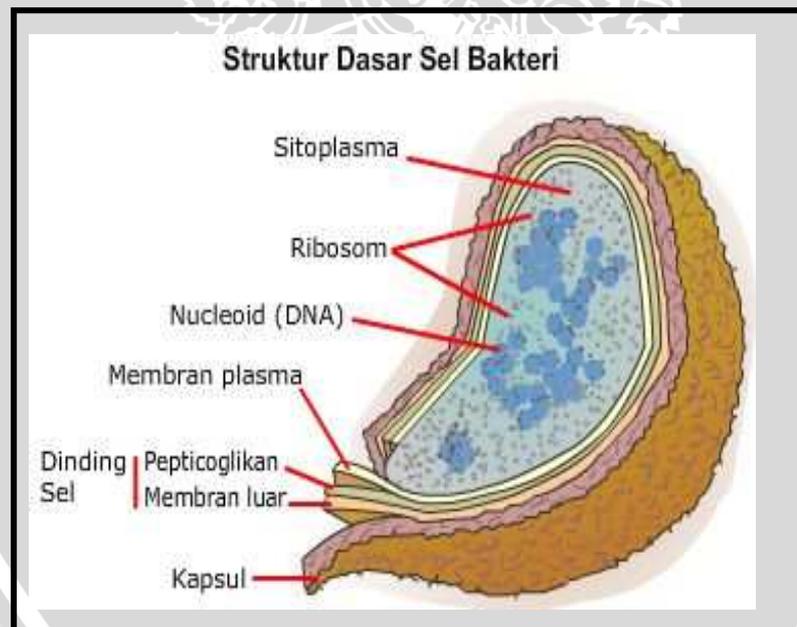
2.2.1. Penyakit Bakterial

Bakteri pertama ditemukan oleh Anthony van Leeuwenhoek pada 1674 dengan menggunakan mikroskop buatannya sendiri. Istilah *bacterium* diperkenalkan di kemudian hari oleh Ehrenberg pada tahun 1828, diambil dari kata Yunani *baktiopiov* yang memiliki arti "small stick". Bakteri adalah jasad renik yang merupakan tumbuh-tumbuhan yang terkecil, terdiri dari satu sel, hanya dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop (Hasanah, 2009).

Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat hidup di tempat yang tersebar di seluruh dunia. Untuk mengukur sel bakteri digunakan ukuran khusus yang disebut micrometer (1 mikron = 0,001 milimeter). Ukuran bakteri yang biasa diamati di laboratorium berukuran antara 0,15 sampai 1,5 μ lebar dan 1-5 μ panjang. Bakteri berkembang biak dengan cara membelah diri secara sederhana, setelah pembelahan sebagian bakteri berkumpul namun ada juga yang memisahkan diri dan membentuk rantai (Athiyatillah, 2009).

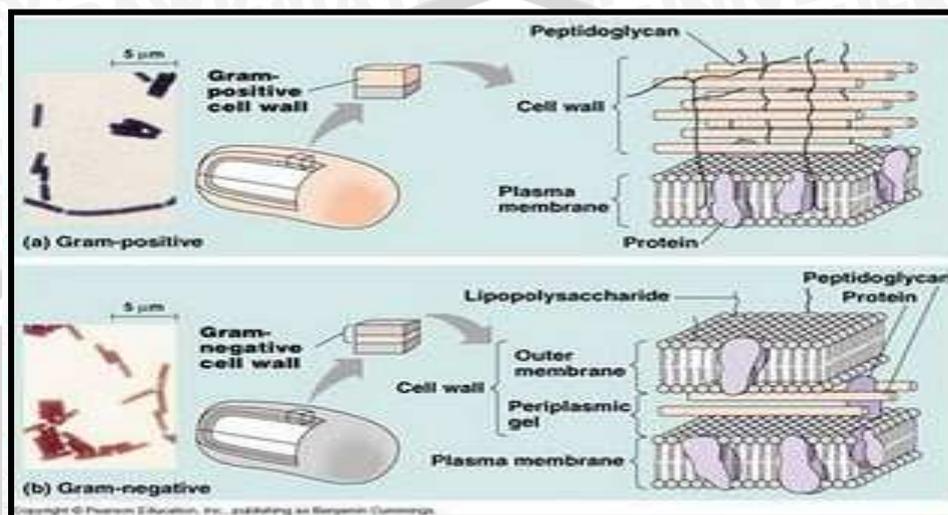
Bakteri adalah organisme bulat telur atau kebulat-bulatan yang terdiri dari sitoplasma yang berisi elemen penting dari struktur sel yang dikelilingi oleh membran sel. Membran sel sebaliknya ditutupi oleh dinding sel yang pada beberapa bakteri tertutup oleh kapsul. Dari sel yang dapat menjulur disebut flagela dan pili. Sitoplasma bakteri berisi campuran kompleks dari enzim dan nukleoprotein, banyak diantaranya bersifat antigenik. Tetapi, karena terbatas didalam organisme, bahan-bahan tersebut umumnya kurang penting dibandingkan dengan antigen permukaan dalam merangsang tanggapan kebal yang protektif. Tiga struktur antigen utama dari permukaan bakteri adalah dinding sel, kapsul dan flagela. Sebagian besar dinding sel bakteri gram positif adalah protein, sedang yang dari organisme gram negatif adalah polisakarida-lemak, protein. Antigen dinding sel organisme gram negatif bersifat toksik (Tizard, 1982).

Struktur sel bakteri meliputi : dinding sel, membran plasma, sitoplasma, ribosom, DNA, dan granula penyimpanan; Struktur tambahan (dimiliki oleh jenis bakteri tertentu), meliputi : kapsul, flagelum, pilus, fimbria, klorosom, vakuola gas dan endospora. Struktur dasar sel bakteri meliputi; Dinding sel tersusun dari peptidoglikan yaitu gabungan protein dan polisakarida (ketebalan peptidoglikan membagi bakteri menjadi bakteri gram positif bila peptidoglikannya tebal dan bakteri gram negatif bila peptidoglikannya tipis); Membran plasma adalah membran yang menyelubungi sitoplasma tersusun atas lapisan fosfolipid dan protein; Sitoplasma adalah cairan sel; Ribosom adalah organel yang tersebar dalam sitoplasma, tersusun atas protein dan RNA; Granula penyimpanan, karena bakteri menyimpan cadangan makanan yang dibutuhkan (Athiyatillah, 2009). Adapun struktur sel bakteri dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Struktur sel bakteri (Athiyatillah, 2009)

Menurut Martania (2005), berdasarkan hasil warna yang ditimbulkan dengan sistem pewarnaan gram, bakteri dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif seperti pada gambar 3.



Gambar 3. Struktur dinding sel bakteri gram (Athiyatillah ,2009).

Bakteri gram-negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan gram sehingga akan berwarna merah bila diamati dengan mikroskop. Disisi lain, bakteri gram-positif akan berwarna ungu. Perbedaan keduanya didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel yang berbeda dan dapat dinyatakan oleh prosedur pewarnaan gram (Wapedia, 2009).

Pewarnaan gram memilah antara bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Zat warna yang digunakan lebih dari 1 zat warna, yaitu safranin, kristal violet ditambah 1 macam larutan pencuci yaitu alkohol serta 1 larutan mordan untuk meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri. Ketika ditambahkan pewarnaan kristal violet maka dinding sel bakteri gram positif maupun gram negatif akan menyerap zat warna tersebut namun ketika diberi alkohol, kristal violet pada gram negatif akan luntur disebabkan struktur dinding selnya yang sebagian besar tersusun oleh lipid, sehingga ketika diberi safranin

(zat warna kedua) dinding sel bakteri gram negatif akan menyerapnya kembali sehingga hasil pewarnaan bakteri gram negatif akan berwarna merah, sedangkan bakteri gram positif akan tetap berwarna ungu walaupun diberi zat warna kedua, karena dinding selnya tersusun oleh lapisan peptidoglikan yang tebal sehingga tidak dapat dicuci oleh alkohol. Hal ini memberi hasil pewarnaan ungu pada bakteri gram positif (Athiyatillah, 2009).

Widiyanti (2009), menyatakan bahwa beberapa bakteri gram negatif bersifat patogenik yang dapat menyebabkan penyakit pada organisme hospes. Sifat patogenik meningkat bila terjadi asosiasi beberapa komponen dinding sel bakteri gram negatif khususnya lipopolisakarida (diketahui sebagai LPS atau endotoksin). Brooks (2001), endotoksin dihasilkan oleh bakteri gram negatif yang terdapat pada bagian terluar dari dinding sel dan baru dilepaskan apabila sel bakteri mengalami lisis. Membran luar bakteri terdiri dari lipoprotein, fosfolipid dan lipopolisakarida (LPS).

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri, merupakan penyakit yang paling umum menyerang ikan laut yang dibudidayakan. Bakteri merupakan jasad renik yang berukuran sangat kecil, yaitu sekitar dua puluh kali lebih kecil dari sel-sel jamur, protozoa, ataupun sel daging ikan. Sebenarnya, sebagian besar dari bakteri tersebut tidak menyebabkan penyakit. Namun, hanya karena bakteri mampu memperbanyak diri dengan sangat cepat, sehingga jika bakteri tersebut terdapat didalam tubuh ikan, maka dapat menyebabkan penyakit (Ghufran dan Kordi, 2001).

Menurut Muttaqin (2007), infeksi bakteri biasanya timbul apabila terjadi stres. Kematian banyak terjadi pada ikan yang menderita stres karena serangan bakteri yang menyebabkan infeksi. Penyakit bakteri merupakan jenis yang terbanyak didapati pada usaha budidaya ikan di laut. Di perairan terdapat 3 kelompok utama penyakit yang disebabkan oleh bakteri, yaitu: Pembusukan sirip/ekor, vibriosis dan *streptococcosis*.

- **Pembusukan sirip/ekor (Bakteri Fin Rot)**

Bakteri ini biasanya menyerang sirip-sirip, terutama sirip ekor, dapat mengakibatkan luka dan pengelupasan kulit. Ikan-ikan yang terserang penyakit ini akan mengalami luka/kerusakan pada bagian tepi sirip-siripnya, termasuk sirip ekor dan akan terkikis secara tidak teratur. Bahkan tidak jarang terjadi sirip yang terserang akan tinggal bagian pangkalnya saja. Jika diamati pada bagian yang terkena penyakit atau bagian yang luka, hanya sedikit terdapat protozoa, tetapi diketemukan banyak sekali populasi bakteri yang terdiri dari bakteri *Mycobacter sp.*, *Vibrio sp.*, jenis-jenis *Pseudomonas* dan *Cocci gram positif*. Diperkirakan bahwa kerusakan yang terjadi tersebut diakibatkan oleh serangan bakteri dengan populasi yang sangat padat. Bakteri ini mudah menular melalui luka-luka ikan yang lain akibat sentuhan ekor yang sakit. Bakteri yang paling dominan adalah *Vibrio sp* karena mempunyai kemampuan yang baik untuk hidup di air laut dan pertumbuhannya untuk membentuk koloni lebih cepat dibandingkan dengan bakteri yang lain. Pada dasarnya penyakit ini tidak begitu berbahaya, tetapi yang menjadi bahaya justru infeksi sekunder dari jenis bakteri lain yang dapat memperparah penyakit tersebut dan menyebabkan kematian ikan (Hamza, 2006).

- **Infeksi oleh Bakteri *Vibrio sp.* (Vibriosis)**

Bakteri adalah sel prokariotik yang khas, uniselular dan tidak mengandung struktur yang terbatas membran di dalam sitoplasmanya. Sel-selnya secara khas, berbentuk bola seperti batang atau spiral. Bakteri yang khas berdiameter sekitar 0,5 sampai 1,0 μm dan panjangnya 1,5 sampai 2,5 μm . Reproduksi terutama dengan pembelahan biner sederhana yaitu suatu proses aseksual. Beberapa dapat tumbuh pada suhu 0°C , ada yang tumbuh dengan baik pada sumber air panas yang suhunya 90°C atau lebih. Kebanyakan tumbuh pada berbagai suhu di antara kedua ekstrim ini. Bakteri menimbulkan berbagai perubahan kimiawi pada substansi yang ditumbuhinya, bakteri mampu menghancurkan banyak zat. Bakteri *Vibrio* sangat penting untuk memelihara lingkungan yaitu dengan menghancurkan bahan yang tertumpuk di atau dalam daratan dan lautan. Beberapa macam menimbulkan penyakit pada binatang (termasuk manusia), tumbuhan dan protista lainnya. Bakteri *Vibrio* sangat luas penyebarannya dalam dan pada permukaan bumi, di atmosfer, dan di lingkungan kehidupan manusia sehari-hari. Bakteri *Vibrio sp.* adalah jenis bakteri halofil yaitu bakteri yang dapat hidup pada salinitas tinggi (Pelezar dan Chan, 2005).

Bakteri *Vibrio sp.* mempunyai ciri-ciri antara lain berbentuk batang pendek, bersifat gram negatif, bergerak dengan flagellum polar, tidak berspora, tidak berkapsul, bersifat anaerob fakultatif dan berkembang biak dengan pembelahan biner. *Vibrio sp.* Merupakan bakteri patogen oportunistik, artinya bakteri ini dalam keadaan normal terdapat pada pemeliharaan dan akan berubah sifat dari saprofitik menjadi patogenik bila kondisi lingkungan menguntungkan (Austin (1989) dalam Budiadi (2008)).

Beberapa jenis *vibrio* yang bersifat patogen yaitu dengan mengeluarkan toksin ganas dan seringkali mengakibatkan kematian pada manusia dan hewan. *Vibrio cholera* yang berasal dari darat atau air tawar, sudah dikenal sebagai penyebab penyakit muntah berak di Indonesia. Jenis *vibrio* yang bersifat pada ikan dan invertebrata laut adalah *Vibrio alginolyticus*, *V. damsela*, *V. charchariae*, *V.anguillarum*, *V. ordalli*, *V. cholerae*, *V. salmonicida*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagia*, *V. splendida*, *V. fischeri* dan *V. harveyi* (Austin dan Austin (1993) dalam Feliatra (1999)).

Vibriosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio sp.* Bakteri *Vibrio sp* termasuk kelompok bakteri yang heterogen dan gram negatif. Ada 2 bakteri penting yang diketahui menyerang ikan laut yaitu : *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus*. Vibriosis merupakan penyakit sekunder, artinya penyakit ini muncul setelah adanya serangan penyakit yang lain misalnya protozoa atau penyakit lainnya. Dari percobaan yang dilakukan terhadap bakteri yang diisolasi dari ikan kerapu dan kakap putih yang sakit, ternyata bakteri ini tidak mampu membuat ikan menjadi sakit vibriosis setelah dilakukan penyuntikan dengan bakteri tersebut. Terkecuali apabila dosisnya tinggi. Ikan kerapu yang terkena Vibriosis akibat suntikan bakteri tersebut, akan mengalami perubahan warna kulit menjadi lebih gelap dan daerah bekas suntikan akan menjadi borok. Selanjutnya akan terjadi pendarahan pada bagian peritoneal dan ginjalnya akan rusak. Pengamatan di lapangan juga menunjukkan gejala ikan kurang nafsu makan, busuk sirip dan akumulasi cairan di bagian abdomen (Hamza, 2006).

- ***Streptococcus***

Bakteri dari genus *Streptococcus* ini kadang-kadang menyebabkan penyakit pada ikan laut yang dibudidayakan, seperti ikan kerapu merah dan ikan beronang. Tanda-tanda dari infeksi penyakit ini biasanya tidak jelas, namun ikan terkadang terlihat lesu, tidak sehat, berenang tidak teratur dan pendarahan pada cornea. Biasanya penyakit ini diamati lewat pemeriksaan laboratories. *Streptococcus sp* termasuk bakteri yang resisten terhadap berbagai antibiotik yang secara terus menerus dipergunakan untuk mengobati infeksi bakteri yang lain (Hamza, 2006).

2.3. *Vibrio parahaemolyticus*

Berdasarkan database dari *Gene Bank* (2003), taxonomi *V. parahaemolyticus* adalah:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Vibrionales
Famili	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Spesies	: <i>Vibrio parahaemolyticus</i>

Vibrio parahaemolyticus adalah bakteri halofilik gram negatif yang merupakan flora normal dari daerah estuaria dan pantai. Bakteri ini muncul secara musiman. Biasanya, pada musim panas *Vibrio parahaemolyticus* relatif mudah dideteksi pada air laut yang merupakan tempat hidupnya di ekosistem. (Charles-Hernández *et al.*, 2006). *Vibrio parahaemolyticus* biasanya muncul pada saat suhu lingkungan perairan di atas 15°C (McLaughlin *et al.*, 2005).

V. parahaemolyticus adalah bakteri halofilik gram negatif yang tersebar luas pada muara sungai dan perairan laut. Berbentuk batang, bersifat motil dengan satu flagela. Bersifat oksidase positif, fakultatif aerobik, dan tidak membentuk spora (Wikipedia^b, 2009).

V. parahaemolyticus mempunyai ciri-ciri sebagai berikut: berwarna biru sampai hijau, diameter 3-5 μm , dipusat koloni berwarna hijau tua. Karakteristik secara fisika-biokimia adalah pewarnaan gram negatif, dan mempunyai sifat fermentatif, katalase, oksidase, glukosa, laktosa, galaktosa dan manitol positif. Sedangkan sellobiosa, fruktosa, methyl red dan H_2S bersifat negatif (theenvironmentalblog, 2010). Gambar *V. parahaemolyticus* tersaji pada Gambar 4.



Gambar 4. *V. parahaemolyticus* (theenvironmentalblog, 2010)

Bakteri *V. parahaemolyticus* tumbuh pada kadar garam optimum 3%, dengan kisaran suhu 5-43°C, pH antara 4,8 – 11 dan pada suhu 37°C akan terjadi pertumbuhan yang cepat dengan waktu generasi hanya 9-10 menit. *Vibrio parahaemolyticus* lebih menyukai kondisi lingkungan anaerob untuk pertumbuhannya, tetapi juga dapat tumbuh pada kondisi aerob. Strain *V. parahaemolyticus* merupakan penyebab penyakit gastroenteritis yang disebabkan oleh produk hasil laut (seafood) bila dimakan mentah, dimasak tidak sempurna atau terkontaminasi dengan seafood mentah setelah pemasakan (Syamsir, 2007).

Faktor virulensi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* ini tergantung pada adanya gen *tdh* yang mengkode TDH (thermostable direct haemolysin) atau gen TRH yang mengkode TRH (TDH related haemolysin), atau juga keduanya (Shirai *et al.*, 1990). Bakteri *V. parahaemolyticus* ini menghasilkan beta hemolisis pada agar darah yang disebut Kanagawa-phenomenon (KP) yang berhubungan dengan produksi TDH (thermostable direct hemolysin). TDH ini akan menghasilkan toksin yang mengubah keseimbangan ion sel tubuh. Keberadaan gen *tdh* digunakan sebagai alat untuk mengidentifikasi patogenitas bakteri *V. parahaemolyticus* (Boyd *et al.*, 2008).

Menurut Lestari (2009), Bakteri yang dikultur tersebut adalah bakteri *V. parahaemolyticus* yang tergolong bakteri gram negatif berbentuk batang. Violi (2010) menyatakan *Vibrio* memiliki satu buah flagel (monotrik) dan dapat bergerak sangat aktif (motil), tetapi tidak berspora dan tidak berselubung. Berdasarkan pewarnaan gram *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio vulnificus*, dan *Vibrio parahaemolyticus* tergolong bakteri gram negatif dengan morfologi batang bengkok. Menurut Ahyari (2010), *Vibrio parahaemolyticus*, secara umum bakteri batang bengkok gerakannya sangat aktif dengan adanya flagel monotrik, tidak mempunyai spora dan dikelompokkan dalam gram negatif. InfoPOM (2008), menyebutkan bahwa *Vibrio parahaemolyticus* bersifat koloni, berbentuk bulat, berdiameter 2-3 mm dengan pusat warna hijau atau biru dan tergolong bakteri gram negatif. Menurut Trihendrokesowo (1978), *Vibrio parahaemolyticus* termasuk gram negatif, berbentuk batang bengkok dengan satu flagel di ujung. Berdasarkan penelitian sebelumnya dan dari uraian literatur tersebut maka *Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri gram negatif.

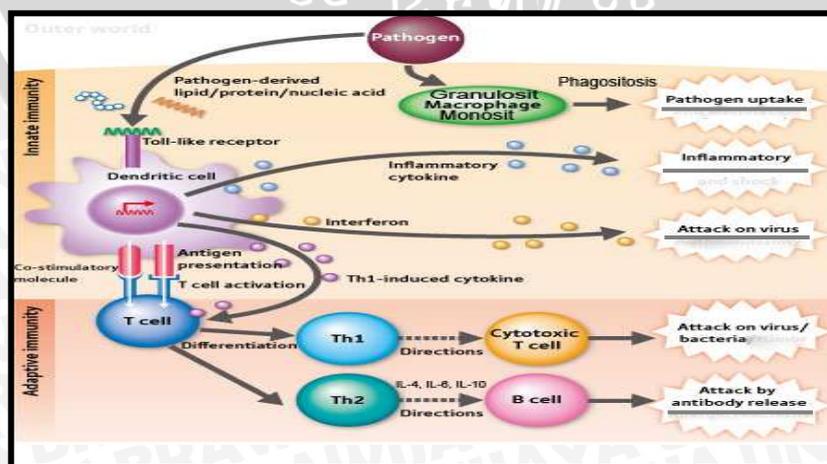
2.4 Sistem Imun Pada Tubuh Ikan Laut

Ikan seperti hewan pada umumnya, memiliki mekanisme pertahanan diri terhadap patogen. Sistem pertahanan tersebut terdiri dari sistem pertahanan konstitutif dan yang diinduksi (inducible). Sistem pertahanan konstitutif menjalankan perlindungan secara umum terhadap invasi flora normal, kolonisasi, infeksi dan penyakit infeksi yang disebabkan oleh patogen. Sistem pertahanan konstitutif dikenal pula sebagai sistem pertahanan innate (bawaan atau alami). Adapun sistem pertahanan yang diinduksi atau didapatkan (acquired), maka untuk berfungsi dengan baik harus diinduksi antara lain dengan pemaparan patogen atau produk-produk yang berasal dari patogen (misalnya: LPS, vaksin). Pada ikan teleostei terdapat dua macam sistem imun yaitu sistem imun bawaan atau alamiah (innate) dan didapatkan (acquired) (Irianto, 2005).

Sistem kekebalan tubuh melindungi organisme dari infeksi dengan lapisan pelindung kekhususan yang meningkat. Pelindung fisik mencegah patogen seperti bakteri dan virus memasuki tubuh. Jika patogen melewati pelindung tersebut, sistem imun bawaan menyediakan perlindungan dengan segera, tetapi respon tidak-spesifik. Sistem imun bawaan ditemukan pada semua jenis tumbuhan dan binatang. Namun, jika patogen berhasil melewati respon bawaan, vertebrata memasuki perlindungan lapisan ketiga, yaitu sistem imun adaptif yang diaktivasi oleh respon bawaan. Disini, sistem imun mengadaptasi respon tersebut selama infeksi untuk menambah kesadaran patogen tersebut. Respon ini lalu ditahan setelah patogen dihabiskan pada bentuk memori imunologikal dan menyebabkan sistem imun adaptif untuk memasang lebih cepat dan serangan yang lebih kuat setiap patogen tersebut ditemukan (Wikipedia^o, 2009).

Apabila sistem imun terpapar pada zat yang dianggap asing, maka ada dua jenis respons imun yang mungkin terjadi, yaitu respons imun nonspesifik dan respons imun spesifik. Respons imun nonspesifik umumnya merupakan imunitas bawaan (innate immunity) dalam arti bahwa respons terhadap zat asing dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar pada zat tersebut, sedangkan respon imun spesifik merupakan respons didapat (acquired) yang timbul terhadap antigen tertentu, karena tubuh pernah terpapar sebelumnya (Wajizah, 2004).

Respon imun innate dan adaptif merupakan komponen-komponen dalam sebuah sistem yang saling berintegrasi dalam pertahanan inang dimana peran dari sejumlah sel dan molekul saling bekerjasama. Mekanisme pertahanan innate memberikan pertahanan yang efektif terhadap infeksi. Namun, banyak mikroba patogen memiliki kemampuan untuk lolos dari pertahanan innate dan untuk mengeliminasinya membutuhkan mekanisme yang lebih kuat yang dimiliki pertahanan adaptif. Ada dua hubungan yang penting antara pertahanan innate dan adaptif yaitu (1) respon imun innate menstimulasi respon imun adaptif dan mempengaruhi sifat pertahanan adaptif; (2) respon imun adaptif menggunakan banyak mekanisme efektor dari pertahanan innate untuk mengeliminasi mikroba (Abbas and Lichtman, 2005). Sistem imun dapat dilihat pada gambar 5.



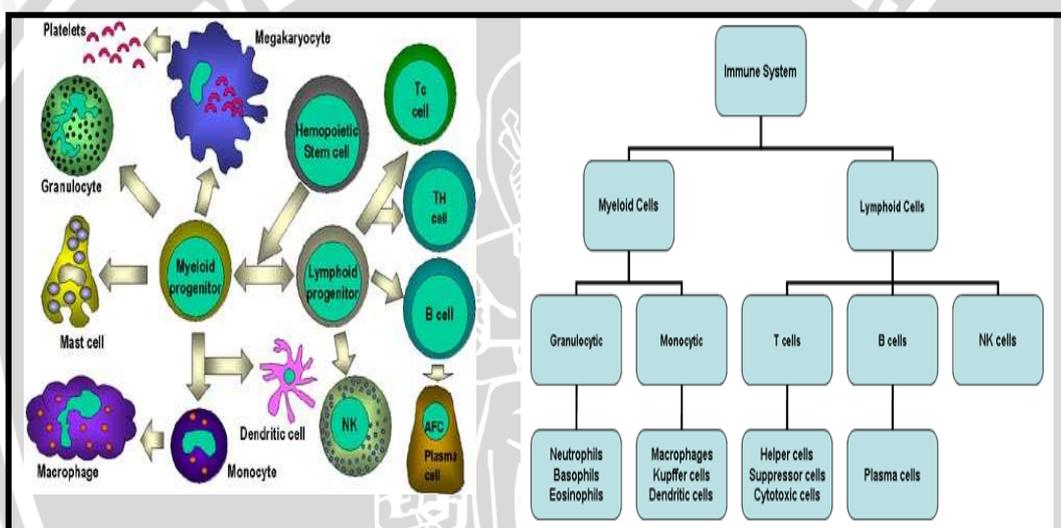
Gambar 5. Sistem imun pada ikan dan fungsinya (Jimeno, 2008)

Menurut Jimeno (2008), imunitas bawaan menjaga pertahanan tubuh dimulai dari kulit, membrane mukosa, adanya inflamasi dan kerja dari sel *Natural Killer* (sel NK). Sel-sel yang termasuk pada imunitas bawaan tidak memiliki spesifitas seperti pada imunitas adaptif. Karena imunitas bawaan tidak didesign untuk memiliki sel memori. Sel-sel tersebut akan langsung melawan agen asing yang telah masuk ke dalam tubuh (kulit). Imunitas spesifik merupakan sistem imun yang sangat kuat untuk melawan agen penyerang yang mematikan seperti bakteri, virus, toksin, dan jaringan asing lainnya. Imunitas adaptif dibagi menjadi dua tipe yaitu tipe yang pertama disebut sebagai imunitas humoral yang berfungsi membentuk antibodi dan mampu menyerang agen asing. Sedangkan tipe yang kedua disebut sebagai imunitas seluler yang berfungsi dalam penghancuran agen asing.

Menurut Baratawidjaja (1996), yang berperan dalam sistem imun spesifik humoral adalah limfosit B atau sel B. Sel B tersebut berasal dari proliferasi dan diferensiasi dari sel limfosit. Bila sel B dirangsang oleh benda asing, maka sel tersebut akan berproliferasi menjadi sel plasma yang membentuk antibodi. Antibodi yang dilepas dapat ditemukan didalam serum. Fungsi utama antibodi ini ialah pertahanan terhadap infeksi ekstraseluler virus dan bakteri serta menetralkan toksin. Sedangkan yang berperan dalam sistem imun spesifik seluler adalah limfosit T atau sel T.

Menurut Kresno (2001), respon imun sangat bergantung pada kemampuan sistem imun untuk mengenali molekul asing (antigen) yang terdapat pada patogen potensial dan kemudian membangkitkan reaksi yang tepat untuk menyingkirkan antigen bersangkutan.

Menurut Elisa (2009), sel-sel yang terdapat dalam sistem imun terdiri dari: Neutrofil yang berperan sebagai sel fagositosis dan menstimulasi inflamasi, Eosinofil berfungsi untuk menyingkirkan antigen, Makrofag merupakan sel utama fagositosis. Terdiri dari 2 macam : makrofag bebas dan makrofag fiksasi (tinggal di organ). Sel makrofag sebagai sel APC (Antigen Presenting Cell) yang mempunyai molekul MHC. MHC kelas I akan mengaktivasi sel Tc, MHC kelas II mengaktivasi sel Th, MHC kelas III menstimulasi sistem komplemen. Di dalam sistem imun juga terdapat sel – sel lain : Sel dendritik berfungsi untuk menyajikan antigen yang terikat protein MHC kelas II.



Gambar 6. Sel-sel yang terdapat dalam sistem imun ([Pathmicro](#), 2010)

Sistem pertahanan tubuh bawaan terhadap penyakit adalah kekebalan alami. Sistem kekebalan terdiri dari limfosit dan myeloid. Limfosit meliputi: limfosit T (sel T helper, sel T cytotoxic), limfosit B (sel plasma), pembunuh alami (NK). Sedangkan myeloid terdiri dari: Granulosit (Netrofil, basofil, eosinofil) dan monosit (makrofag dan sel dendrite) yang bersifat fagositik ([Pathmicro](#), 2010).

2.4.1 Respon Imun Non Spesifik atau Bawaan (*Innate*)

Respon imun non spesifik disebut juga komponen non adaptif atau innate, atau imunitas alamiah, artinya mekanisme pertahanan yang tidak ditujukan hanya untuk satu jenis antigen, tetapi untuk berbagai macam antigen. Imunitas alamiah sudah ada sejak individu dilahirkan dan terdiri atas berbagai macam elemen non spesifik. Respon imun non spesifik bukan merupakan pertahanan khusus untuk antigen tertentu. Dilihat dari caranya diperoleh, respon imun non spesifik disebut juga respon imun alamiah (Judarwanto, 2009).

Abbas and Lichtman (2005) menyatakan, komponen-komponen utama dalam pertahanan innate antara lain : (1) barrier (penghalang) fisik dan kimia seperti sel-sel epitel dan senyawa-senyawa antimikrobia yang terdapat di permukaan sel epitel; (2) sel-sel fagositik (neutrofil, makrofag) dan sel NK (*natural killer*); (3) protein-protein darah, meliputi anggota dari sistem komplemen dan mediator lainnya pada inflamasi; (4) sitokin yaitu protein-protein yang mengatur dan mengkoordinasi banyak aktifitas dari sel-sel pada pertahanan innate.

2.4.2 Respon imun spesifik (*adaptif*)

Respon imun spesifik atau disebut juga komponen adaptif atau imunitas didapat adalah mekanisme pertahanan yang ditujukan khusus terhadap satu jenis antigen, karena itu tidak dapat berperan terhadap antigen jenis lain (Judarwanto, 2009).

Menurut Abbas and Lichtman (2005), respon imun adaptif terhadap bakteri berbeda dengan respon imun innate. Respon imun adaptif membutuhkan pengenalan spesifik antigen (Ag) asing. Respon imun adaptif sering disebut juga dengan istilah pertahanan spesifik dan kadang juga disebut dengan istilah *acquired immunity* (pertahanan dapatan). Hal ini berkaitan dengan karakteristik

yang dimiliki dalam sistem pertahanan adaptif antara lain : (1) spesifitas, yaitu kemampuan untuk mengenali antigen baik dari jenis mikrobia maupun antigen yang bukan dari jenis mikrobia secara spesifik sehingga mampu membedakan molekul yang satu dengan yang lainnya; (2) memiliki diversitas yang tinggi, artinya mampu untuk mengenali senyawa dari mikroba maupun nonmikroba dalam jumlah besar; (3) memori, yaitu kemampuan untuk “mengingat” antigen yang pernah dikenali dan akan merespon dengan lebih cepat antigen-antigen tersebut pada pengenalan berikutnya.

Bila respon imun non spesifik tidak dapat mengatasi invasi mikroorganisme maka imunitas spesifik akan terangsang (Albert, 2002). Imunitas spesifik hanya ditujukan terhadap antigen tertentu yaitu antigen yang merupakan ligannya. Pada respon imun spesifik akan terbentuk antibodi dan limfosit efektor yang spesifik terhadap antigen yang merangsangnya, sehingga terjadi eliminasi antigen. Sel yang berperan dalam respon imun ini adalah sel yang mempresentasikan antigen (APC = antigen presenting cell = makrofag), sel limfosit T dan sel limfosit B. Sel limfosit T dan limfosit B masing-masing berperan pada imunitas selular dan imunitas humoral. Sel limfosit T akan mengatur respon imun dan melisis sel target yang dihuni antigen. Sel limfosit B akan berdiferensiasi menjadi sel plasma dan memproduksi antibodi yang akan menetralkan atau meningkatkan fagositosis antigen dan lisis antigen oleh komplemen, serta meningkatkan sitotoksitas sel yang mengandung antigen yang dinamakan proses antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) (Judarwanto, 2009).

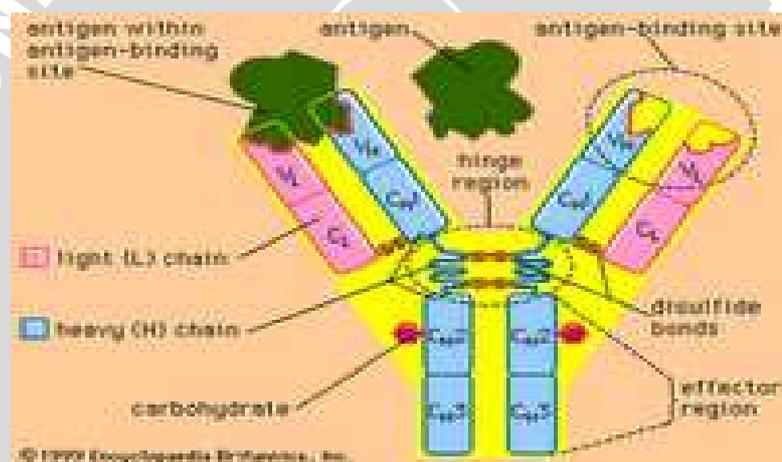
Respon imun spesifik dapat dibagi menjadi dua yaitu (1) pertahanan seluler, yaitu mekanisme pertahanan yang diperantarai sel yang terfokus khususnya pada aktivasi sel T dan mekanisme efektor dan (2) pertahanan humoral yang terdiri dari pematangan sel B dan produksi antibodi. (Collin and Kaufmann (2002) dalam Setyawan (2009)).

Sistem pertahanan adaptif memiliki molekul-molekul reseptor yang unik yang ditemukan hanya pada vertebrata. Molekul-molekul tersebut antara lain : immunoglobulin (Ig), Major histocompatibility complex (MHC) kelas I dan kelas II, dan reseptor-reseptor sel T (*T-cell receptor*, TCR) (Hughes, 2002).

2.4.2.1 Antibodi atau Immunoglobulin (Ig)

Antibodi adalah molekul yang terbentuk dalam tubuh hewan sebagai tanggapan terhadap adanya antigen. Antibodi hanya diproduksi oleh limfosit B dan disebarkan keseluruh tubuh secara eksositosis dalam bentuk plasma dan cairan sekresi. Antibodi juga ditemukan dalam cairan sekresi seperti mukus. Pada dasarnya satu unit struktur antibodi terdiri dari empat rantai polipeptida. Semua antibodi mempunyai bentuk struktur yang sama yaitu dua rantai pendek (VL) dan dua rantai panjang (VH). Setiap rantai pendek (VL) berat molekulnya sekitar 25.000 dalton sedangkan rantai panjang (VH) mempunyai berat molekul sekitar 50.000 dalton, yang terdiri dari daerah variabel (V) dan konstan (C). Daerah antara CH1 dan CH2 disebut daerah hinge (engsel), yang memudahkan pergerakan / fleksibilitas dari lengan Fab dari bentuk Y molekul antibodi tersebut. Hal itu menyebabkan lengan tersebut dapat membuka atau menutup untuk dapat mengikat dua antigen determinan yang terpisahkan oleh jarak diantar kedua lengan tersebut (Elisa, 2009).

Antibodi merupakan molekul yang tersusun dari protein dan dibentuk untuk melawan sel-sel asing yang masuk ke tubuh. Molekul ini diproduksi oleh sel-sel B dalam sistem kekebalan. Antibodi akan menghancurkan antigen yang masuk. Antibodi mempunyai dua fungsi, pertama untuk mengikat diri kepada sel-sel musuh, yaitu antigen. Fungsi kedua adalah membusukkan struktur biologi antigen tersebut lalu menghancurkannya. Antibodi berada dalam aliran darah, antibodi mengikat diri pada bakteri dan virus penyebab penyakit. Antibodi menandai molekul-molekul asing tempat mereka mengikat diri. Dengan demikian sel tubuh dapat membedakan sekaligus menghancurkan antigen (Filza, 2008). Struktur antibodi seperti gambar 7.



Gambar 7. Struktur Antibodi (Judarwanto,2009)

Imunoglobulin atau antibodi adalah sekelompok glikoprotein yang terdapat dalam serum atau cairan tubuh pada hampir semua hewan. Imunoglobulin terdiri dari 82-96% polipeptida dan 4-18% karbohidrat. Komponen polipeptida membawa sifat biologik molekul antibodi tersebut. Molekul antibodi mempunyai fungsi yaitu mengikat antigen secara spesifik. Sebuah antibodi terbuat dari dua rantai berat dan dua rantai ringan. Variasi tersebut menyebabkan antibodi (imunoglobulin) mengenali antigen yang sesuai (cocok) dengan bentuknya (Judarwanto, 2009).

2.4.2.2 Major histocompatibility complex (MHC)

Menurut Baratawidjaja (1996), *Mayor Histo Compatibility* (MHC) adalah suatu kelompok atau kompleks gen yang berperan dalam pengenalan dan pemberian sinyal di antara sel-sel imun. Berdasarkan rumus bangunnya, molekul MHC dapat dibagi menjadi 3 golongan

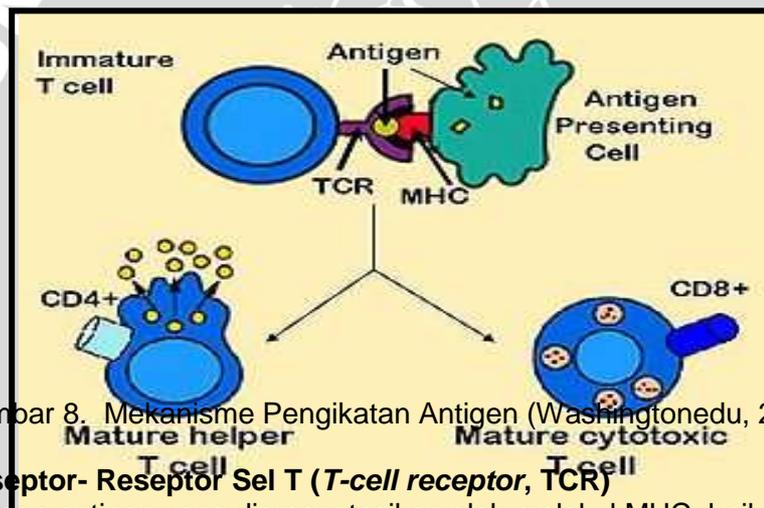
- molekul MHC kelas I ; yang menetapkan ekspresi atau antigen permukaan yang dikenal sebagai sel kelas I yaitu yang berupa protein pada membran permukaan semua sel tubuh yang memiliki nukleus dan trombosit. MHC kelas I mengikat peptida molekul lain yang diproduksi dalam sel dan mentranspornya ke permukaan sel, sehingga kompleks MHC kelas I dan peptida tersebut dapat dikenal oleh sel CD8⁺ yang sitotoksik. Janeway Jr (2001) dalam Setyawan (2009)) MHC kelas I berperan dalam mempresentasikan antigen intraseluler dalam sitosol kepada sel T cytotoxic (sel Tc) yang biasanya berupa asam nukleat dari virus maupun infeksi bakteri yang bersifat intraseluler.
- Molekul MHC Kelas II ; menetapkan ekspresi atau antigen permukaan sel-sel tertentu yang dikenal sebagai sel kelas II yang imuno-kompeten seperti sel B, monosit, makrofag, antigen presenting cells (APC) dan sel T (hanya yang diaktifkan). Molekul MHC kelas II mengikat molekul peptida yang sudah diproses sel APC dan dibawa kepermukaan selnya sehingga dapat dikenal oleh sel CD4⁺. Presentasi antigen serta rangsangan sel T CD 4⁺ merupakan permulaan respons imun dan juga untuk sebagian ikut menentukan jenis respon yang terjadi. Menurut Madigan et al., (2003) dalam Setyawan (2009). MHC kelas II hanya ditemukan pada APC (sel dendrit, makrofag, maupun sel B) dan berperan dalam mempresentasikan antigen-antigen ekstraseluler kepada sel T helper2 (sel Th2).

- Molekul MHC kelas III ; Pembentukan beberapa komponen komplemen, beberapa sitokin dan molekul lain ditentukan oleh MHC yang tergolong molekul MHC kelas III. Letak MHC yang menentukan molekul kelas III ini terletak di dalam kompleks MHC yang menentukan molekul MHC kelas I dan kelas II.

Menurut Pandey (2007), adapun ketika terjadi infeksi ekstraseluler (umumnya dari jenis bakteri), patogen-patogen tersebut akan difagositosis oleh makrofag. Namun, peran makrofag ternyata tidak hanya untuk memfagositosis saja tetapi juga berperan sebagai sel yang bertugas mempresentasikan antigen (antigen presenting cells, APC). Sel-sel lain yang termasuk sebagai APC adalah sel dendrite dan sel B. Antigen akan dipotong-potong menjadi peptide-peptide dengan ukuran 15-23 asam amino yang selanjutnya berasosiasi di dalam sitoplasma dengan molekul MHC kelas II yang baru disintesis. Tempat pengikatan antigen (groove antigen binding) molekul MHC kelas II lebih besar dibanding MHC kelas I sehingga mampu mengakomodasi peptide yang jauh lebih besar. Komplek MHC II dan peptide antigen selanjutnya dibawa dari sitoplasma menuju membran sel. Asosiasi MHC II-peptida antigen dapat dikenali oleh CD4⁺ sel T helper melalui TCR.

Antigen Presenting cell menstimulasi sel T untuk menjadi baik "sitotoksik" CD8⁺ atau sel "pembantu" CD4⁺. Sel T sitotoksik (juga dikenal sebagai TC, CTL, T-Killer sel atau sel T pembunuh) milik kelompok sub-T limfosit (sejenis sel darah putih) yang mampu membunuh sel yang terinfeksi virus (atau patogen lainnya), atau mungkin rusak atau disfungsi. Sebagian besar sel T sitotoksik mengekspresikan reseptor sel T (TcRs) yang bisa mengenali peptida antigenik tertentu terikat molekul MHC kelas I, hadir pada semua sel nukleasi, dan glikoprotein yang disebut CD8⁺, yang tertarik pada bagian non-variabel Kelas I molekul MHC. Afinitas antara CD8⁺ dan molekul MHC TC menjaga sel-sel target

dan terikat erat bersama-sama selama aktivasi antigen-spesifik. $CD8^+$ T sel diakui sebagai sel TC setelah mereka menjadi aktif dan secara umum diklasifikasikan sebagai sitotoksik memiliki peran yang telah ditetapkan dalam sistem kekebalan tubuh. Sel T helper (sel T pembantu atau Th) berfungsi untuk merespon antigen ekstraseluler berupa bakteri. Antigen ekstraseluler dipresentasikan oleh APC (Antigen Presenting Cell) ke limfosit T melalui MHC II, antigen tersebut diterima oleh TCR. TCR selain berfungsi sebagai reseptor sel T tetapi juga berfungsi sebagai penginducer terbentuknya $CD4^+$ dan $CD8^+$. $CD4^+$ berperan dalam pematangan sel T helper, sehingga sel ini akan teraktivasi dan akan merespon terbentuknya antibody, seperti pada gambar 7 (Washingtonedu, 2009).



Gambar 8. Mekanisme Pengikatan Antigen (Washingtonedu, 2009)

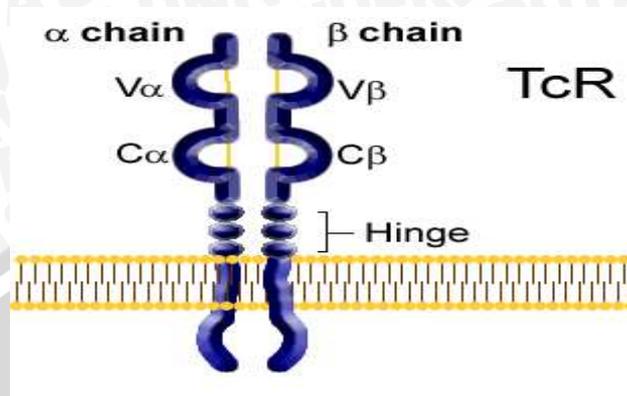
2.4.2.3 Reseptor- Reseptor Sel T (*T-cell receptor, TCR*)

Antigen-antigen yang dipresentasikan oleh molekul MHC, baik MHC kelas I maupun MHC kelas II, kepada sel T diikat oleh sebuah reseptor yang terletak pada permukaan sel T yang disebut dengan TCR. TCR secara spesifik mengikat antigen asing yang melekat pada molekul MHC pada permukaan APC. Jadi, TCR mengikat kedua-duanya, protein MHC itu sendiri dan peptide asing (antigen). (Abbas and Lichtman, 2005).

Reseptor sel T adalah heterodimer terdiri dari alpha dan beta. Setiap rantai memiliki domain daerah variabel dan domain daerah konstan (yang ditunjuk dan $C\alpha$ $V\alpha$, $V\beta$ dan $C\beta$ dll). Domain daerah variabel alpha & beta datang



bersama untuk mengikat antigen (Annualreviews, 2000). Struktur TCR seperti pada gambar 9.



Gambar 9. Struktur TCR (Annualreviews, 2000).

2.5 Sitokin dan IL-6

Sitokin adalah protein mediator terlarut (kadang terikat dalam membran sel) yang mengikat reseptor pada sel target dan memicu, mengatur, atau menghambat fungsi-fungsi seluler. Kebanyakan sitokin diproduksi oleh sel-sel imun dan berperan dalam sel-sel imun, tetapi ada juga sitokin yang diproduksi oleh sejumlah tipe sel dan berperan pada berbagai macam sel, sehingga sitokin menampakkan kisaran aktifitas yang sangat luas (Cavaillon, 2007).

Salah satu jenis sitokin yang berperan dalam proliferasi dan diferensiasi sel B adalah interleukin 6 (IL-6). Interleukin merupakan salah satu sitokin yang beraksi diantara leukosit dan tipe sel lainnya yang memiliki bermacam-macam aktifitas stimulator yang mengatur respon imun, inflamatory, dan hematopoietic (Meager, 2007).

Interleukin 6 (IL-6) merupakan protein yang memiliki struktur α -helik dengan berat 22-28 kD yang disekresi oleh berbagai macam sel meliputi monosit, sel B dan sel T (Iliev *et al.*, 2006). Pada mamalia, IL-6 berperan penting dalam berbagai fungsi seluler meliputi regulasi berbagai proses imun seperti

mengatur produksi antibodi, differensiasi limfosit B dan limfosit T, dan migrasi leukosit menuju tempat inflamasi (Aoki, 2008).

2.6 Antigen

Antigen merupakan bahan asing yang dikenal dan merupakan target yang akan dihancurkan oleh sistem imun. Antigen ditemukan pada permukaan seluruh sel. Akan tetapi dalam keadaan normal, sistem imun tubuh tidak bereaksi terhadap selnya sendiri. Sehingga dapat dikatakan antigen merupakan sebuah zat yang menstimulasi tanggapan imun, terutama dalam produksi antibodi. Antigen berupa protein atau polisakarida, tetapi dapat juga berupa molekul lainnya, termasuk molekul kecil (hapten) yang dipasangkan ke protein-pembawa (Filza, 2008).

Pembagian antigen menurut ketergantungan terhadap sel T dapat dibedakan menjadi 2; Antigen T *dependent* (memerlukan pengenalan oleh sel T dan sel B terlebih dahulu untuk dapat menimbulkan respon antibodi); antigen T *independent* (dapat merangsang sel B tanpa bantuan sel T untuk membentuk antibodi) (Baratawidjaya, 1996).

2.7 Protein

Protein (akar kata protos dari bahasa Yunani yang berarti "yang paling utama") adalah senyawa organik kompleks yang merupakan polimer dari monomer-monomer asam amino yang dihubungkan satu sama lain dengan ikatan peptida. Molekul protein mengandung karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen dan kadang kala sulfur serta fosfor (C, H, O, N, S P). Protein berperan penting dalam struktur dan fungsi semua sel makhluk hidup dan virus. Protein terlibat dalam sistem kekebalan (imun) sebagai antibodi, sistem kendali dalam bentuk hormon, sebagai komponen penyimpanan (dalam biji) dan juga dalam transportasi hara. Sebagai salah satu sumber gizi, protein berperan sebagai

sumber asam amino bagi organisme yang tidak mampu membentuk asam amino tersebut (heterotrof) (Wikipedia^d, 2009).

Protein merupakan polimer biologis yang mengekspresikan fungsi dari suatu sel. Protein tersusun dari suatu monomer yang disebut dengan asam amino. Asam amino ini akan saling berikatan membentuk suatu rantai polipeptida, di mana rantai polipeptida ini nantinya akan menyusun protein sehingga protein terlihat seperti memiliki bentuk 3 dimensi. Struktur molekul protein sangat beragam, tetapi pada dasarnya protein merupakan polimer dari 20 asam amino. Polimer asam amino disebut polipeptida. Suatu protein terdiri dari satu atau lebih polipeptida yang terlipat dan terbelit membentuk suatu kesesuaian yang spesifik dengan fungsinya. Bentuk tiga dimensi atau konformasi protein ditentukan oleh urutan asam amino pada suatu polipeptida penyusun protein tersebut (Clark dan Russel (2005) dalam Rizki (2008)). Martini (2006), asam amino mempunyai dua komponen utama, yaitu asam organik (-COOH) dan gugus amino (-NH₂).

2.9 Kualitas Air Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altiveis*)

2.9.1 Suhu

Suhu adalah besaran yang menyatakan derajat panas dingin suatu benda dan alat yang digunakan untuk mengukur suhu adalah thermometer (Alljabar, 2008). Tim Peneliti Udana (2009), Parameter-parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu yaitu temperatur antara 24 – 31^oC.

Menurut Mahasri (1999) temperatur perairan akan berpengaruh pada metabolisme perairan, dimana; Semakin tinggi temperatur maka metabolisme organisme juga tinggi, sehingga konsumsi O₂ akan naik dan antara *demand suplay* tidak seimbang. Hal ini akan mengakibatkan ikan-ikan yang hidup di perairan itu menjadi stress. Dan apabila temperatur tinggi, maka kelarutan

oksigen akan menurun (kecil) sehingga ikan akan menjadi stress, karena kekurangan oksigen.

Suhu tinggi tidak selalu berakibat mematikan tetapi dapat menyebabkan gangguan status kesehatan untuk jangka panjang, misalnya stres yang ditandai dengan tubuh lemah, kurus, dan tingkah laku abnormal. Pada suhu rendah, akibat yang ditimbulkan antara lain ikan menjadi lebih rentan terhadap infeksi fungi dan bakteri patogen akibat melemahnya sistem imun. Pada dasarnya suhu rendah memungkinkan air mengandung oksigen lebih tinggi, tetapi suhu rendah menyebabkan stres pernafasan pada ikan berupa menurunnya laju pernafasan dan denyut jantung sehingga dapat berlanjut dengan pingsannya ikan-ikan akibat kekurangan oksigen (Irianto, 2005).

2.9.2 pH

pH adalah merupakan istilah yang digunakan untuk menyatakan intensitas keadaan asam atau basa sesuatu larutan. pH merupakan salah satu cara untuk menyatakan konsentrasi H^+ . Yang sangat penting untuk diketahui yakni bahwa konsentrasi OH^- suatu larutan tak akan dapat diturunkan sampai nol, bagaimanapun asamnya larutan, dan bahwa konsentrasi H^+ tak akan dapat diturunkan sampai nol, bagaimanapun basanya larutan (Sutrisno dan Eny, 1991). Menurut Tim Peneliti Udana (2009), Parameter-parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu yaitu pH antara 7,8 – 8.

Menurut Andayani (2005), nilai pH terletak antara 1-14 dengan pH= 7 sebagai nilai netral. Air laut biasa bersifat alkalis dengan pH lebih dari 7. pH antara 7-9 sangat memadai bagi kehidupan ikan. Dalam keadaan normal pH terletak antara 7-10 karena air laut merupakan buffer yang baik.

Menurut Leivestad (1982), jaringan insang adalah organ target utama dari stress asam. Ketika ikan diletakkan pada pH rendah, jumlah mucus pada permukaan insang akan meningkat. Mukus yang berlebihan mengganggu pertukaran gas respirasi dan ion pada insang. Sehingga kegagalan keseimbangan asam-basa darah mengakibatkan stress respirasi dan penurunan tekanan darah yang menyebabkan gangguan osmotik yang merupakan gejala-gejala fisiologis dari stres asam.

2.9.3 Salinitas

Menurut Nybakken (1992) dalam Fuadi (2008), salinitas adalah banyaknya zat terlarut. Zat padat terlarut meliputi garam-garam anorganik, senyawa-senyawa organik yang berasal dari organisme hidup, dan gas-gas terlarut. Menurut Nontji (1986) dalam Fuadi (2008), Ciri paling khas pada air laut yang diketahui oleh semua orang ialah rasanya yang asin. Ini disebabkan karena didalam air laut terlarut garam-garam yang paling utama adalah natrium klorida (NaCl) yang sering disebut garam dapur. Selain NaCl, di dalam air laut terdapat pula $MgCl_2$, kalium, kalsium dan sebagainya. Salinitas adalah jumlah berat semua garam (dalam gram) yang terlarut dalam satu liter air, biasanya dinyatakan dengan satuan ‰ (permil, gram per liter). Menurut Tim Peneliti Udana (2009), Parameter-parameter ekologis yang cocok untuk pertumbuhan ikan kerapu yaitu salinitas antara 30 – 33 ppt.

3. MATERI DAN METODE

3.1 Materi Penelitian

Materi dalam penelitian ini adalah ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*), protein imunogenik bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan anti interleukin-6 (IL-6). Bakteri yang digunakan telah di kultur di Laboratoruim Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang digunakan berukuran 10-15 cm sebanyak 12 ekor berasal dari BPAP Situbondo.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen atau percobaan. Menurut Hasan (2002), metode eksperimen merupakan metode penelitian yang memungkinkan peneliti memanipulasi variable dan meneliti akibat-akibatnya. Pada metode ini, variabel-variabel dikontrol sedemikian rupa sehingga variabel luar yang mungkin mempengaruhi dapat dihilangkan. Metode eksperimen ditujukan untuk mencari hubungan sebab akibat dengan memanipulasikan satu atau lebih variabel pada satu (atau lebih) kelompok eksperimen, dan membandingkan hasilnya dengan kelompok kontrol yang tidak mengalami manipulasi. Manipulasi berarti mengubah secara sistematis sifat-sifat (nilai-nilai) variabel bebas. Metode eksperimen memiliki tiga ciri yaitu sebagai berikut; 1). Manipulasi, yaitu mengubah secara sistematis keadaan tertentu; 2). Observasi, yaitu mengamati dan mengukur hasil manipulasi; 3). Kontrol, yaitu mengendalikan kondisi-kondisi penelitian ketika berlangsungnya manipulasi.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Autoklaf, inkubator, timbangan analitik, tabung reaksi, cawan petri, magnetik stirrer, dissecting set, jarum ose, pembakar bunsen, pipet tetes, beaker glass, erlenmeyer, pH meter, mortar, laminary air flow, sentrifuge suhu ruang, sentrifuge 4⁰C, eppendorf 1,5 ml, falcon 15 ml dan 50 ml, mikropipet 2 µl, 20 µl, 200 µl dan 1000 µl, blue tip, yellow tip, white tip, seperangkat elektroforesis vertikal (SDS-PAGE), Deckglass, coverglass, nanodrop spektrofotometer, shaker inkubator, freezer -20, refrigerator 4⁰C, spuit 1 cc ½"X26G, sarung tangan karet (gloves), masker, aluminium foil, hot stirer plate, aquarium, heater, seperangkat aerasi, baki/nampan, pH meter, refraktometer.

3.3.2 Bahan

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut Brain Heart Infusion (BHI), poliakrilamide, Phosphate Buffer Saline (PBS), separating gel 12,5 % dan stacking gel 4 %, running buffer, staining (Commassie brilliant blue) dan destaining (methanol: asam asetat glasial: aquades 1:2:7), Reduction Sample Buffer (RSB), Ethylenediamine tetra-acetate (EDTA), nitrocelulosa (membran selovan) dan larutan PBS, aquadest, alkohol 70%, PFA 4% , DEPC, DEPC-sukrose 20%, Tris-HCl, es batu, buffer ekstrak, Marker (PRO-STAIN™ Prestained Protein Marker), *Peroxidase blocking solution (H2O2)*, *antibodi monoklonal IL-6*, *Secondary antibody anti IL-6 konjugat biotin anti mouse*, *Trekavidin-HRP*, *DAB chromogen*, *Mayer hematoxilen*, *Xylol*.

3.4 Metode

3.4.1 Persiapan Wadah Pemeliharaan dan Aklimatisasi Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

Ikan uji yang digunakan yaitu ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang didapatkan dari Balai Pembenihan Air Payau (BPAP) di Situbondo. Ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang digunakan berukuran antara 10-15 cm. Benih ikan kerapu tikus yang baru datang tidak langsung diberikan pakan, karena benih ikan kerapu tikus memerlukan adaptasi terhadap media pemeliharaannya yang baru. Adaptasi ini dibutuhkan selama 12 jam, pakan diberikan setelah ikan terlihat sehat dan agresif. Pakan yang digunakan berupa ikan rucah segar. Pemberian pakan dilakukan sebanyak dua kali per hari, yaitu pada jam 08.00 dan 15.00 WIB. Dan parameter kualitas air diukur setiap hari pada pagi dan sore untuk menjaga agar parameter kualitas air tetap normal.

3.4.2 Kultur Bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

Isolasi Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Bakteri dikultur pada medium BHI. Menurut Budiadi (2008), yang telah melakukan prosedur isolasi bakteri, tahapan dalam melakukan kultur yaitu Kultur ini menggunakan media TCBS (uji konfirmasi), media BHI (uji protein). *Vibrio* ditanam pada media TCBS selama 24 jam pada suhu 24°C. Hasil dari biakan diambil dengan cara kerokan yang sebelumnya dituang PBS steril pH 7,4 secukupnya. Suspensi bakteri kemudian dimasukkan dalam botol yang berisi 500 ml Brain Heart Infusion (BHI), kemudian digoyang kuat selama 30 menit pada pemanas air suhu 37°C. selanjutnya suspensi bakteri sebanyak 250 ml dimasukkan dalam setiap botol yang mengandung media LB disimpan pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam.

3.4.3 Isolasi Crude protein Bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

Hasil dari kultur bakteri *Vibrio parahaemolyticus* tersebut disentrifuge pada kecepatan 4500 rpm pada suhu ruang untuk mendapatkan pellet yang merupakan sel utuh (*whole cell*) bakteri. Crude protein *Vibrio parahaemolyticus* diisolasi dengan menambahkan buffer ekstrak (1:2w/v) kemudian dipipeting, dimasukkan kedalam mortar dan digerus sampai larut. Setelah itu diambil pakai pipet dan dimasukkan kedalam ependorf, kemudian dihomogenkan dengan sentrifuge kecepatan 15000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil sebagai crude protein dan pellet diambil untuk diisolasi lagi.

3.4.5 Fraksinasi Protein Dengan Sodium Dedosil Sulfate Polyacrilamid Gel Elektrophoresis (SDS-Page)

Untuk fraksinasi protein dilakukan metode elektroforesis menggunakan SDS-PAGE (Biorad). Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai media pemisah protein (*Separating gel*) dan gel-gel pengumpul sampel (*stacking gel*) dengan prosentase bahan 12,5%. Dalam *separating gel* komposisi yang dipakai akrilamid 30%, Tris HCL 1,5 M pH 8,8, dH₂O, SDS (Sodium Dedosil Sulfate) 10%, APS (Ammonium Persulfat) 10%, TEMED (tetra ethylene diamine). Sedangkan dalam *stacking gel* akrilamid 30%, Tris HCL 1,5 m pH 6,8, dH₂O, SDS (Sodium Dedosil Sulfate) 10%, APS (Ammonium Persulfat) 10%, TEMED (tetra ethylene diamine).

Larutan *separating gel* dituangkan kedalam *plate* pembentuk gel menggunakan pipet (dijaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai tiga perempat tinggi *plate*. Perlahan dituangkan air diatas larutan gel agar permukaan gel tidak bergelombang. Dibiarkan memadat selama kurang lebih 30 menit. Setelah itu air yang menutup *separating gel* dibuang. Selama menunggu *separating gel* memadat, *stacking gel* disiapkan kedalam erlenmeyer. Selanjutnya segera dituangkan larutan kedalam *plate* pembentuk gel

menggunakan pipet sampai *plate* penuh. Perlahan diselipkan sisir pembentuk sumur sampel kedalam *stacking gel* segera setelah dituang. Setelah gel memadat sekitar 30 menit, sisir diangkat.

Sampel protein dipanaskan 100°C selama 5 menit, sebagai bahan warna adalah RSB dengan perbandingan 1:1. Sampel dimasukkan sumuran gel menggunakan pipet persumuran 18 µl. Dipilih 12,5% gel, voltase yang digunakan 90V, 400 amp dengan waktu selama 100 menit. Gel diangkat dari *Chamber*, pewarnaan dilakukan dengan merendam dalam *staining solution* selama 30 menit sambil *dishaker*, setelah itu dihentikan pewarnaan dengan *destaining solution*.

Gel hasil SDS Page dianalisa dengan cara menghitung band yang muncul. Dari hasil pewarnaan gel akan diperoleh hasil berupa pita-pita protein. Pita protein dari crude protein *Vibrio parahaemolyticus* discan di komputer kemudian dihitung melalui penghitungan jarak protein (Rf) menggunakan regresi untuk menentukan bobot molekul dari pita-pita protein, untuk mendapatkan bobot protein imunogenik sebesar 19,13 kDa (penelitian sebelumnya). Setelah mendapatkan bobot molekul yang diinginkan kemudian dilakukan pemotongan pita protein menggunakan pemotong gel, gel yang dipotong adalah gel yang mempunyai pita protein paling tebal dan jelas diantara pita-pita protein yang lain. Gel yang telah dipotong disimpan dalam larutan running buffer untuk dilakukan elusi.

3.4.6 Elektroelusi dan dialisa

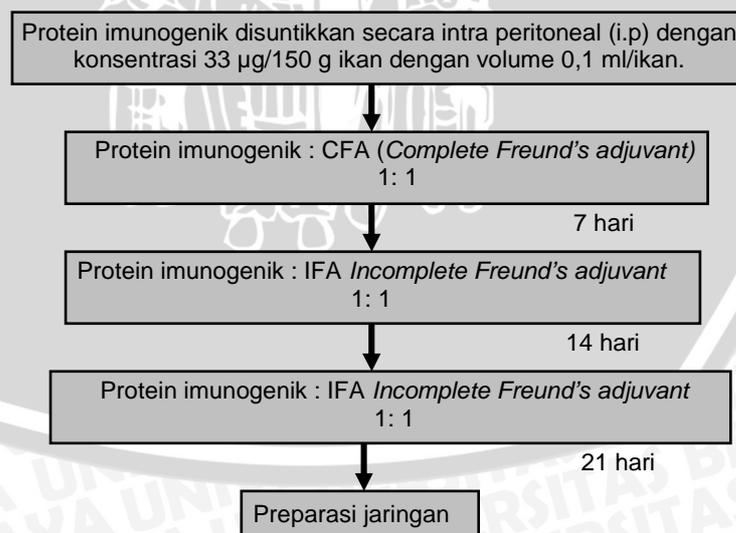
Kandidat protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* pada pita protein dipisahkan dengan metode elektroelusi menggunakan horisontal elektroforesis (Biorad). Potongan-potongan gel dari masing-masing kandidat protein imunogenik dimasukkan dalam membran selofan kemudian dielektroforesis pada 120 V, 400 mA selama 60 menit. Protein selanjutnya didialisa dalam larutan PBS pH 7,4 pada suhu 4 °C selama 48 jam. Cairan dalam kantung selofan selanjutnya diambil dan dimasukkan dalam mikrotube dan dipresipitasi dengan menginkubasi pada larutan acetone (1:1 v/v) semalam pada suhu 4 °C. Campuran protein dan acetone selanjutnya disentrifus pada 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Protein didapatkan dalam bentuk pellet, dikeringanginkan dan dilarutkan dalam 100 µl tris HCl 0,5 M, pH 8,6. Selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi protein menggunakan Nanodrop Spectrophotometry ND 1000 dengan Absorbansi 1 pada 280 nm.

3.4.7 Pengukuran protein spesifik dengan Spektrofotometer

Protein spesifik hasil dialisa dilakukan pengukuran kuantitasnya menggunakan spektrofotometer nanodrop. Prosedur pengukuran protein ini dilakukan dengan cara mengkalibrasi spektrofotometer dengan menggunakan blanko yaitu berupa buffer ekstrak 2 µl dimasukkan dalam *hole* sampel dalam spektrofotometer, kemudian dikondisikan ukuran blanko sama dengan nol. Setelah blanko terbaca, *hole* sampel dibersihkan dengan aquadest dan dikeringkan dengan tisu. Sampel berupa protein imunogenik hasil dialisa dimasukkan dalam *hole* sampel kemudian ditutup dan dibaca pada komputer. Pembacaan kuantifikasi protein dilakukan pada panjang gelombang 280λ, posisi dimana protein dapat terbaca (Absorbansi 1 = 1mg/ml protein).

3.4.8 Uji klinis protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* pada ikan kerapu tikus

Protein imunogenik 19,13 kDa (penelitian sebelumnya) dari *Vibrio parahaemolyticus* selanjutnya dilakukan uji klinis pada ikan kerapu untuk mengetahui kemampuan protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* 19,13 kDa dalam merangsang sel-sel imun sehingga dapat mengekspresikan sel IL-6. Sebelum perlakuan injeksi, ikan diaklimatisasi terlebih dahulu selama 1 minggu. Protein imunogenik dari sampel disuntikkan secara intra peritoneal (i.p) dengan konsentrasi 33 µg/150 g ikan dengan volume 0,1 ml/ikan. Penyuntikan dilakukan dengan mencampurkan protein adhesin dengan *Complete Freund's adjuvant* (CFA) (1:1 v/v). Tujuh hari setelah penyuntikan pertama dilakukan penyuntikan kedua (*booster*) dengan volume dan konsentrasi protein yang sama dengan penambahan *Incomplete Freund's adjuvant* (IFA). Empat belas hari setelah penyuntikan kedua maka dilakukan penyuntikan ke tiga Ikan dengan volume dan konsentrasi protein yang sama untuk memperoleh respon imun adaptif yang optimal. Ikan dipelihara selama 21 hari dengan pemberian pakan menggunakan ikan rucah hingga kenyang (*ad libitum*) dengan aerasi dan pergantian air /hari.



Gambar 10. Diagram proses penyuntikan ikan

3.4.9 Preparasi Jaringan Organ Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Setelah Dipapar Protein Immunogenik *Vibrio parahaemolyticus*

Preparasi jaringan ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang terinfeksi *Vibrio Parahaemolyticus* untuk mendeteksi IL-6 diperlakukan dengan menggunakan PFA 4% dan dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak 3 kali menggunakan DEPC dan secara steril, kemudian dilanjutkan dengan inkubasi pada larutan DEPC-sukrose 20%, agar protein yang terekspresi tidak terkontaminasi, selanjutnya sampel siap dipotong dengan mikrotom dan diletakan pada preparat, dan penyimpanan dilakukan pada -20 derajat Celsius hingga sampel digunakan dengan teknik imunohistokimia.

3.4.10 Pemeriksaan Ekspresi Reseptor Ikan Kerapu Dengan IHC (Imunohistokimia)

Uji Imunohistokimia untuk deteksi antigen pada *head squash* (apusan sel/jaringan). Preparat *head squash* (apusan sel/jaringan) difiksasi dengan methanol dingin 3-5 menit, selanjutnya ditetesi *Peroxidase blocking solution* (H_2O_2) 10 menit. Diberi *prediluted blocking serum* (protein blocker) 15 menit, kemudian dikeringkan. Dan inkubasi dengan Antibodi primer (antibodi monoklonal IL-6) semalam pada 4°C. Selanjutnya cuci dengan PBS (*phospat buffer saline*) segar 3x masing-masing 2 menit kemudian keringkan dengan tisu langsung tungkan objek glass ke atas tisu. Diinkubasi lagi dengan *Biotinylated universal secondary antibody* (*Secondary antibody* anti IL-6 konjugat biotin anti *mouse*) 20 menit pada suhu ruang, selanjutnya cuci dengan PBS segar 3x masing-masing 2 menit kemudian keringkan, ditetesi dengan *Trekavidin*-HRP 10 menit. Cuci dengan PBS segar 3x masing-masing 2 menit kemudian keringkan selama 3 menit. Siapkan betazoid DAB chromogen solution dengan mencampur 1 µl DAB chromogen dengan substrat buffer 100 µl kemudian teteskan pada preparat selama 5 menit cuci dibawah air kran, kemudian keringkan selama 3

menit. Tetesi dengan *Mayer hematoxilen* 1 menit sebagai counter stain inti berwarna biru. cuci dibawah air kran, selanjutnya dehidrasi dengan ethanol 100 % sekali, clearing dengan Xylen atau Xylol sekali. Tetesi dengan entelan sebagai *Mounting media*, tutup dengan *cover slip*, periksa dibawah mikroskop cahaya perbesaran lemah, sedang dan kuat.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

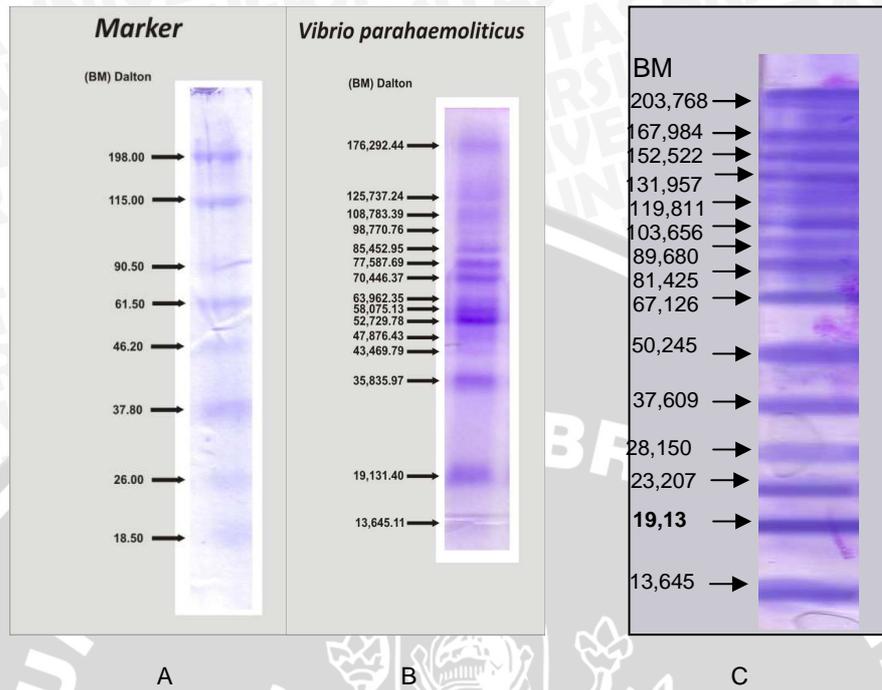
4.1 Hasil penelitian

4.1.1 Identifikasi Protein Bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

Hasil pemisahan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dari medium BHI kemudian diisolasi untuk mendapatkan crude protein bakteri. Wikipedia^e (2010), menyebutkan crude protein adalah antigen dari bakteri yang berfungsi sebagai faktor penting dalam proses infeksi bakteri pada hospes. Crude protein tersebut berupa protein imunogenik, yang kemudian dipakai untuk sampel dalam elektroforesis SDS PAGE.

Hasil elektroforesis SDS PAGE dengan menggunakan gel poliakrilamid 12,5% terhadap crude protein *V. parahaemolyticus* memberikan gambaran pita protein terdiri dari lima belas (15) pita protein dengan berat molekul masing-masing yaitu 203,768 kDa, 167,984 kDa, 152,522 kDa, 131,957 kDa, 119,811 kDa, 103,656 kDa, 89,680 kDa, 81,425 kDa, 67,126 kDa, 50,245 kDa, 37,609 kDa, 28,150 kDa, 23,207 kDa, 19,13 kDa dan 13,645 kDa (seperti pada gambar 11 dan tabel 1). Gambar 11.a menunjukkan suatu marker yang digunakan untuk membandingkan pita protein yang muncul dan dihitung bobot molekulnya melalui regresi korelasi sehingga dapat digunakan sebagai acuan untuk menghitung berat molekul pita protein.

Berdasarkan penelitian Lestari (2009) gambar 11. b menunjukkan pita protein imunogenik mempunyai berat molekul 19,13 kDa, penentuan pita imunogenik tersebut berdasarkan uji hemaglutinasi protein *Vibrio parahaemolyticus* terhadap eritrosit ikan kerapu tikus normal. Reaksi dikatakan positif apabila terjadi aglutinat yaitu terjadi ikatan antara antigen dan eritrosit sehingga tidak meninggalkan gumpalan eritrosit dan negatif apabila terjadi endapan karena tidak terjadi ikatan.



Keterangan :

- A. Marker Pro STAIN™
- B. Berat molekul (BM) crude protein *V. Parahaemolyticus* (Lestari, 2009)
- C. Berat molekul (BM) protein imunogenik *V. Parahaemolyticus*

Gambar 11. Profil *Crude Protein V. parahaemolyticus* dengan SDS-PAGE

Salah satu hasil SDS Page (gambar 11.c) juga didapatkan 15 pita protein dan salah satu dari pita protein tersebut merupakan protein imunogenik dengan berat molekul 19,13 kDa, karena berdasarkan penelitian Lestari (2009) melalui uji hemaglutinasi didapatkan bahwa pita protein dengan berat molekul 19,13 kDa adalah pita protein imunogenik karena pada berat molekul 19,13 kDa mempunyai kemampuan mengaglutinasi eritrosit ikan kerapu paling tinggi selain itu protein ini mempunyai berat molekul diatas 10.000 Da sehingga protein dari *Vibrio parahaemolyticus* ini termasuk dalam protein imunogenik. Hal ini sesuai dengan pernyataan Harlow dan Lane (1998) bahwa protein imunogenik adalah protein yang terutama mempunyai berat molekul antara 20.000-100.000 Da

sedang apabila berat molekulnya kurang dari 10.000 Da, biasanya tidak bersifat imunogenik (Parslow, 1997). (Pertiwi *et. al* (2009)) pemanfaatan elektroforesis dengan metode SDS PAGE dapat diketahui profil pita protein yang muncul pada protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus*. Pita protein yang muncul dihitung berat molekulnya melalui regresi-korelasi yang dibandingkan dengan protein petanda Marker Pro STAIN™. Adapun hasil perhitungan berat molekul profil pita protein dari salah satu hasil SDS PAGE, seperti disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Berat Molekul Protein *Vibrio parahaemolyticus*

Berat Molekul (kDa)		
	MARKER	CRUDE PROTEIN
Pita 1	198	203.768
Pita 2	115	167.984
Pita 3	90,5	152.522
Pita 4	61,5	131.957
Pita 5	46,2	119.811
Pita 6	37,8	103.656
Pita 7	26	89.680
Pita 8	18,5	81.425
Pita 9	-	67.126
Pita 10	-	50.245
Pita 11	-	37.609
Pita 12	-	28.150
Pita 13	-	23.207
Pita 14	-	19.131
Pita 15	-	13.645

Pita protein 19,13 kDa tersebut dipotong untuk dilakukan elektroelusi yang bertujuan memisahkan protein dari matriks gel. Protein yang telah dipisahkan dari matriks gel didialisa untuk pencucian dengan PBS dan dipresipitasi dengan acetone. Protein didapatkan dalam bentuk pellet, kemudian dikeringanginkan dan dilarutkan dalam 100 µl tris HCl 0,5 M, pH 8,6. Selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi dan volume protein imunogenik menggunakan Nanodrop Spectrophotometry ND 1000 dengan Absorbansi 1 pada 280 nm. Protein imunogenik dari *Vibrio parahaemolyticus* digunakan untuk pembosteran ikan Kerapu Tikus.

4.1.2. Konsentrasi Protein Immunogenik

Hasil dari elektroelusi dan dialisa protein immunogenik dihitung dengan menggunakan Nanodrop Spectrophotometry ND 1000 dengan Absorbansi 1 pada 280 nm. Hasil pengukuran konsentrasi protein immunogenik 19,13 kDa adalah 3,27 mg/ml. Konsentrasi ini akan digunakan dalam pembosteran ikan kerapu tikus. Berdasarkan Ott and Van Nest (2007), protein immunogenik dari sampel disuntikkan secara intraperitoneal (i.p) dengan konsentrasi 33 µg/150 g ikan dengan volume 0,1 ml/ikan. Berdasarkan konsentrasi protein immunogenik sebesar 3,27 mg/ml maka protein immunogenik *Vibrio parahaemolyticus* yang diambil untuk pengenceran sebesar 10,09 µl.

Penggunaan ikan kerapu tikus dengan ukuran 10-15 cm dengan berat tubuh sekitar 150 g dalam uji klinis dimaksudkan untuk memudahkan dalam pengambilan jaringan organ, yaitu mata, otak, dan ginjal. Diharapkan bahwa ikan pada ukuran tersebut tergolong dewasa dan telah memiliki sistem imun yang sempurna, sehingga produksi sel-sel dan molekul-molekul yang berperan dalam sistem imun ikan kerapu tikus dapat dilakukan secara optimal.

Irianto (2005), berpendapat bahwa pada ikan, respon imun baru terbentuk sempurna apabila ikan sudah dewasa. Meskipun pada larva atau ikan muda sudah terbentuk respon imun tetapi kerjanya kurang efisien, sehingga rentan terhadap penyakit. Kemampuan imun, yang ditunjukkan sebagai kehadiran antibodi, pada ikan salmonid berkembang pada masa empat hari setelah menetas. Kompetensi imun alamiah sudah mulai terbentuk dalam masa dua belas hari sebelum menetas, atau bervariasi tergantung pada suhu. Meskipun demikian Pada ikan teleostei terdapat dua macam sistem imun yaitu sistem imun bawaan atau alamiah (innate) dan sistem imun dapatan (acquired).

4.2 Imunisasi Ikan Kerapu Tikus secara *invivo* dengan Protein Imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* dengan berat molekul 19,13 kDa.

Proses penyuntikan ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) dengan menggunakan konsentrasi 33 µg/150 gram ikan dalam 0,1 ml/ikan. Dalam 150 gram ikan diberi konsentrasi protein imunogenik 33 µg dengan volume penyuntikan 0,1 ml/ikan. Berdasarkan Setyawan (2009) yang mengacu Ott and Van Nest (2007) ikan diinjeksi dibagian intraperitoneal dengan konsentrasi 200 µg per 800-900 g, sedangkan pada penelitian ini menggunakan ikan berukuran 150 gram sehingga konsentrasi protein ditentukan sebagai berikut:

$$900 \text{ gr} = 200 \mu\text{g}$$

$$150 \text{ gr} = a$$

$$\frac{150}{900} \times 200 = 30.000 = \dots = 33,3 \mu\text{g}/150 \text{ gram dalam } 0,1 \text{ ml}$$

Protein imunogenik dari *Vibrio parahaemolyticus* disuntikkan secara intra peritoneal (i.p) dengan konsentrasi 33 µg/150 g ikan dengan volume 0,1 ml/ikan. Penyuntikan dilakukan dengan mencampurkan protein imunogenik dengan *Complete Freund's adjuvant* (CFA) (1:1 v/v) dan dilakukan pengenceran dengan tris HCL sehingga volume masing-masing adalah protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* (10,09 µl + tris HCL 39,91 µl) : 50 µl CFA. Tujuh hari setelah penyuntikan pertama dilakukan penyuntikan kedua (*booster*) dengan volume dan konsentrasi protein yang sama dengan penambahan *Incomplete Freund's adjuvant* (IFA) (1:1 v/v) sehingga volume masing-masing adalah protein (10,09 µl + tris HCL 39,91 µl) : 50 µl IFA. 14 hari setelah penyuntikan kedua maka dilakukan penyuntikan ketiga dengan volume dan konsentrasi protein yang sama pada penyuntikan kedua. Ikan dipelihara selama 21 hari dengan pemberian pakan menggunakan ikan rucah hingga kenyang (*ad libitum*) dengan aerasi dan pergantian air sekitar 200 %/hari. Sehingga dapat merangsang terespresinya IL-6 pada sistem imun ikan. Diagram penyuntikan dapat dilihat pada gambar 10.

Penyuntikan pada ikan kerapu tikus dilakukan 3 kali karena diharapkan pada penyuntikan sebanyak 3 kali tersebut akan dapat merespon sistem imun secara optimal sehingga dapat mengekspresikan IL-6. Penyuntikan pertama menggunakan protein imunogenik dan adjuvan CFA (*Complete Freund's adjuvant*) yang berfungsi sebagai imunisasi primer untuk merangsang respon imun innate, penyuntikan kedua dan ketiga menggunakan protein imunogenik dan adjuvan IFA (*Incomplete Freund's adjuvant*) yang berfungsi untuk menstimulasi respon imun adaptif secara optimal sehingga dapat mengaktivasi sel T dan berproliferasi serta berdiferensiasi menjadi sel Th2 kemudian sel Th 2 akan memproduksi sitokin berupa IL-6. Adapun mekanisme terbentuknya IL-6 menurut Kresno (1996) sebagai berikut: respon imun dimulai dengan aktivitas antigen presenting cell (APC) yang memproses antigen sehingga menimbulkan interaksi dengan sel-sel sistem imun. Sel-sel ini berfungsi menyajikan antigen kepada sel limfoid yang merespon. Sel APC dipresentasikan bersama Mayor Histocompatibility Complex (MHC) kelas II agar antigen dikenali oleh limfosit T. Antigen ini akan diterima TCR, kemudian TCR akan menginduksi sel CD4⁺ sehingga sel Th "matur" dan berdiferensiasi serta berproliferasi menjadi Th1 dan Th2. Th 1 memproduksi IL-2, IFN- γ , sedangkan sel Th 2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 dan IL-13. Menurut Virrela (2007), IL-6 berperan dalam menginduksi pengaktifan sel B untuk mengadakan proliferasi dan diferensiasi.

Lycke (2007) dalam Setyawan (2009) menyatakan bahwa, pemberian adjuvant dimaksudkan untuk membantu menstimulasi respon imun. Hal ini disebabkan kebanyakan antigen berupa material yang tidak hidup dan tidak mampu untuk menstimulasi respon imun secara signifikan. Pemberian adjuvant juga dapat bertanggung jawab terhadap kerusakan jaringan, rasa sakit dan tidak stres pada hewan uji. Prinsip mekanisme adjuvant dalam menstimulasi respon imun yaitu prinsipnya, adjuvant dapat memanfaatkan tiga tipe dari pengaruh

modulator respon imun innate yang nantinya berpengaruh terhadap respon imun adaptif dan dapat memperbaiki imunogenisitas suatu antigen. Tiga modulator respon innate antara lain yaitu PRR (*pattern recognize receptors*), reseptor-reseptor lain selain PRR, dan antibodi. Pemilihan CFA (*Complete Freund's adjuvant*) dan IFA (*Incomplete Freund's adjuvant*) dikarenakan adjuvant tersebut telah terbukti mampu meningkatkan respon imun pada beberapa vaksin yang pernah diuji cobakan yaitu vaksin polio dan influenza (Ott and Van Nest, 2007).

4.3. Ekspresi Interleukin (IL-6) pada Jaringan dengan teknik IHC

Preparasi jaringan ikan kerapu tikus yang terinfeksi *Vibrio Parahaemolyticus* untuk mendeteksi IL-6 diperlakukan dengan menggunakan PFA 4%. Pertama pencucian dengan PBS sebanyak 3 kali menggunakan DEPC dan secara steril. Kedua inkubasi pada larutan DEPC-sukrose 20%, agar protein yang terekspresi tidak terkontaminasi. Selanjutnya sampel siap dipotong dengan mikrotom dan diletakan pada preparat, langkah berikutnya disimpan pada suhu -20 derajat Celsius hingga sampel digunakan dengan teknik imunohistokimia.

Menurut Agung (2008), imunohistokimia merupakan suatu teknik penentuan keberadaan (lokasi) antigen (protein target) dalam jaringan atau sel menggunakan reaksi antigen-antibodi. Teknik ini diawali dengan prosedur histoteknik yaitu prosedur pembuatan irisan jaringan (histologi) untuk diamati di bawah mikroskop. Irisan jaringan yang didapat kemudian memasuki prosedur imunohistokimia dengan melihat reaksi antara antigen dan antibodi. Jaringan yang akan dideteksi IL-6 nya pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang dipapar protein imunogenik bakteri *Vibrio Parahaemolyticus* yaitu jaringan otak, mata, dan ginjal.

4.3.1 Ekspresi IL-6 pada Jaringan Otak Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) dengan Teknik Imunohistokimia

Hasil penelitian jaringan otak pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) dengan teknik imunohistokimia dapat diketahui bahwa jaringan yang dipapar protein imunogenik *Vibrio parahemolyticus* tersebut dapat mengekspresikan IL-6. Hal ini ditunjukkan oleh adanya ikatan antigen (yakni protein imunogenik BM 19,13 kDa dari *Vibrio parahemolyticus*). Antibodi yang digunakan adalah antibodi yang berasal dari *mouse* (tikus) karena mempunyai kekerabatan yang sama antara tikus dan ikan, sehingga antibodi tersebut bisa direaksikan dengan ikan. Antibodi yang digunakan adalah antibodi monoklonal IL-6 dari *mouse* dan *secondary antibody* anti IL-6 konjugat biotin anti *mouse*. Hasil ekspresi ini menunjukkan bahwa epitop dari protein imunogenik BM 19,13 kDa *Vibrio parahemolyticus* mampu menginduksi sel-sel imun sehingga sel-sel imun ini mampu mensekresikan IL-6 pada ikan kerapu tikus. Antibodi IL-6 juga memiliki kesamaan dengan antibodi yang dikenali oleh *mouse*. Pada jaringan otak tidak dipapar oleh protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* sehingga tidak terjadi ikatan antara antigen dan antibodi sehingga tidak mampu mengekspresikan IL-6.

Jaringan otak yang terekspresi IL-6 ditandai dengan warna cokelat keemasan (gambar 12.b) pada bagian jaringan tersebut. Warna cokelat keemasan tersebut ditimbulkan karena adanya ikatan antara antigen, antibodi monoklonal IL-6 dari *mouse* dan *secondary antibody* anti IL-6 konjugat biotin anti *mouse* yang menyebabkan terjadinya ikatan antara enzim (horseradish peroksidase) dengan substrat (DAB kromogen) sehingga muncul warna cokelat keemasan. Berbeda dengan jaringan yang tidak dipapar oleh protein imunogenik (gambar 12.a), jaringan ini tidak mampu mengekspresikan IL-6 karena tidak ada antigen yang merangsang terbentuknya IL-6, sehingga ketika diberi antibodi

monoklonal IL-6 dari mouse dan *secondary antibody* anti IL-6 konjugat biotin anti mouse tidak terjadi ikatan sehingga enzim (horseradish peroksidase) dengan substrat (DAB) tidak bereaksi dan tidak muncul warna cokelat keemasan.

Ambari (2003), menyatakan bahwa enzim yang digunakan dalam teknik imunohistokimia ini adalah horseradish peroksidase. Molekul ini kecil (berat molekulnya kira-kira 40 kDa). Substrat yang paling sering digunakan mengandung diaminobenzidine (DAB) dan hidrogen peroksida. Pewarnaan tergantung dari substrat yang digunakan. DAB merupakan bahan karsinogenik, apabila diberi enzim peroksidase, akan berwarna cokelat apabila terdapat ikatan antara antigen dan antibodi.



Berdasarkan hasil imunohistokimia, bahwa protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* dengan berat molekul 19,13 kDa mampu merangsang sel-sel imun sehingga IL-6 dapat terekspresi pada jaringan otak. Nurmayaty (2008), menyatakan bahwa organ otak ikan terdiri dari 5 bagian utama yaitu lobus olfaktorius (olfactory bulb), Otak kecil (cerebrum), optik lobe, otak besar (cerebellum), dan medulla oblongata. Bakteri *vibrio* menyerang bagian CNS (Central Nervous System) atau sistem saraf pusat sehingga gejala berupa *wierling* terjadi. Bakteri masuk dengan cara : 1. Invasi (penembusan) melawan penghalang anatomi berupa epitelium luar dan dalam yang dikenal dengan kulit. 2. Transpor axonal oleh neuron dari bagian perifer. 3. Masuk melalui saluran

pernafasan atas kemudian melalui epitel olfaktorius menuju ke lobus olfaktorius. Selanjutnya bakteri mengadakan multiplikasi dengan bantuan dari unsur-unsur bakteri sendiri dan unsur dari host berupa biokimia untuk pertahanan, interaksi antara keduanya akan bersifat toksik bagi inang. CNS tersebut tersusun atas neuron dan sel glia.

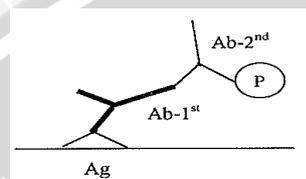
4.3.2 Ekspresi IL-6 pada Jaringan Mata Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) dengan Teknik Imunohistokimia

Hasil penelitian pada jaringan mata ikan kerapu tikus (*cromileptes altivelis*) dengan teknik imunohistokimia dapat dilihat ekspresi IL-6 melalui pewarnaan yang timbul pada jaringan, diketahui bahwa jaringan yang dipapar protein imunogenik *Vibrio parahemolyticus* dengan berat molekul 19,13 kDa tersebut dapat mengekspresikan IL-6, hal ini ditunjukkan oleh adanya ikatan antigen dan antibodi. Antigen diperankan protein imunogenik BM 19,13 kDa *Vibrio parahemolyticus*, sedangkan antibodi diperankan oleh antibodi monoklonal IL-6 dari mouse dan *secondary antibody* anti IL-6 konjugat biotin anti mouse.

Jaringan mata yang berwarna coklat keemasan (gambar 13.b) merupakan jaringan yang terekspresikan IL-6. Sedangkan jaringan mata yang tidak mengekspresikan IL-6 tidak berwarna coklat keemasan (gambar 13.a), karena pada jaringan ini tidak dipapar oleh protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* sehingga sel-sel imun yang ada dalam tubuh tidak terangsang dan tidak muncul respon imun karena tidak ada antigen yang merangsangnya sehingga IL-6 tidak terekspresi pada jaringan.



Teknik imunohistokimia ini berdasarkan reaksi antigen dan antibodi seperti pendapat Noor (2001), teknik imunohistokimia ini menggunakan dua antibodi, yaitu antibodi primer ($Ab-1^{st}$) yang diperankan oleh antibodi monoklonal IL-6 dari mouse dan antibodi sekunder ($Ab-2^{nd}$) diperankan oleh *secondary antibody* anti IL-6 konjugat biotin anti mouse yang telah dikonjugasikan dengan peroksidase. Reaksi antigen-antibodi tersebut digambarkan seperti berikut:



Keterangan:

Ag : antigen

$Ab-1^{st}$: antibodi primer

$Ab-2^{nd}$: antibody sekunder

Gambar 14. Reaksi antigen-antibodi

Untuk mendeteksi peroksidase, ditambahkan suatu kromogen yang dapat menghasilkan endapan berwarna (Kromogranin) pada suatu reaksi sehingga produk dapat terlihat. Kromogen yang biasa digunakan pada reaksi yang mengandung peroksidase adalah diaminobenzidin (DAB). Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Penambahan DAB tidak akan menghasilkan kromogranin tanpa adanya H_2O_2 dan peroksidase. Didalam jaringan, antibodi primer akan bereaksi/berikatan dengan antigen (molekul) jaringan yang dideteksi, selanjutnya antibodi yang dilabel dengan peroksidase akan bereaksi dengan antibodi primer tersebut. Sehingga keberadaan enzim peroksidase ini melambangkan adanya kompleks antigen-antibodi.

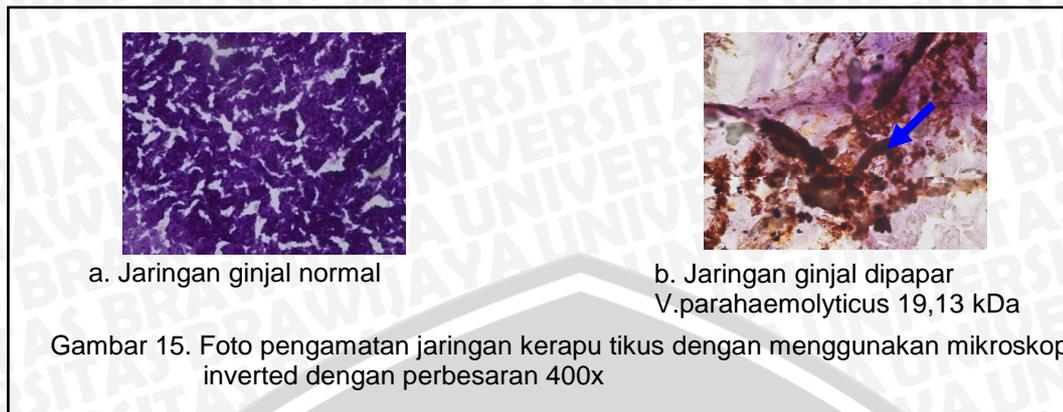
Ekspresi IL-6 pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang diuji klinis dengan protein 19,13 kDa *Vibrio Parahaemolyticus* menunjukkan molekul IL-6 terekspresi pada mata. Libby *et., al* (2000) menyatakan pada mata, terjadi interaksi reseptor yang diperankan oleh Laminin. Laminin ditemukan pada

permukaan ephitelia dan di retina. Laminin adalah komponen ECM yang termasuk kelompok glikoprotein yang menjadi komponen utama dari semua Basement Membrane (BM) (Colognato dan Yurchenco, 2000). Matrik ekstraseluler adalah suatu matrik di luar sel yang berbatasan dengan membran plasma, berperan dalam menentukan bentuk dan aktivitas sel. Yang pada akhirnya terjadi exophthalmia (Austin, 2008).

4.3.3 Ekspresi IL-6 pada Jaringan Ginjal Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) dengan Teknik Imunohistokimia

Ekspresi IL-6 pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang diuji klinis dengan protein 19,13 kDa *Vibrio Parahaemolyticus* menunjukkan molekul IL-6 terekspresi pada ginjal. Hal ini ditunjukkan dari hasil uji imunohistokimia melalui pelabelan *secondary antibody* anti IL-6 konjugat biotin anti mouse pada jaringan ikan yang telah dipapar protein imunogenik *Vibrio Parahaemolyticus* secara *invivo*.

Hasil ekspresi IL-6 yang telah dipapar protein imunogenik *Vibrio Parahaemolyticus* secara *invivo* dengan berat molekul 19,13 kDa, menunjukkan adanya reaksi silang antara protein imunogenik *Vibrio Parahaemolyticus* dengan antibodi yang digunakan sebagai alat diagnostik. Hal ini ditunjukkan pada gambar 15 bahwa terdapat perbedaan warna antara jaringan normal ikan kerapu tikus (gambar 15. a) dan jaringan yang dipapar dengan protein imunogenik *Vibrio Parahaemolyticus* 19,13 kDa (gambar 15.b). Organ yang berwarna cokelat keemasan tersebut pada gambar 15.b menunjukkan bahwa organ ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) mampu mengekspresikan IL-6 dengan pemaparan protein imunogenik atau pemberian antigen.



Berbeda dengan organ Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang tidak dipapar protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* (gambar 15. a) tampak berwarna biru. Hal ini karena sel-sel imun ikan kontrol tersebut tidak mengekspresikan IL-6. Sel imun tersebut akan teraktivasi apabila ada bahan asing yang masuk. Setiap antigen ekstraseluler yang masuk ke dalam tubuh akan ditangkap oleh APC (*Antigen Presenting cell*) yang selanjutnya antigen tersebut dipecah menjadi molekul-molekul yang lebih kecil. Molekul-molekul tersebut selanjutnya diekspresikan oleh molekul MHC II ke permukaan sel APC untuk dipresentasikan kepada sel Th2. Selanjutnya sel Th2 yang teraktivasi akan memproduksi sitokin-sitokin untuk dijadikan sebagai sinyal kepada sel B diantaranya IL-2, IL-4, IL6 dan IL-10. Sel B yang teraktivasi oleh sitokin-sitokin tersebut selanjutnya akan mengadakan proliferasi dan diferensiasi menjadi sel B plasma dan sel B memori. Sel plasma akan berperan untuk mensekresi antibodi yang spesifik terhadap antigen yang masuk (Protein 19,13 kDa) sedangkan sel B memori akan mengekspresikan reseptor-reseptor yang spesifik terhadap antigen tersebut dipermukaannya yang berperan untuk lebih mengenali antigen pada infeksi berikutnya (Abbas and Lichtman, 2005).

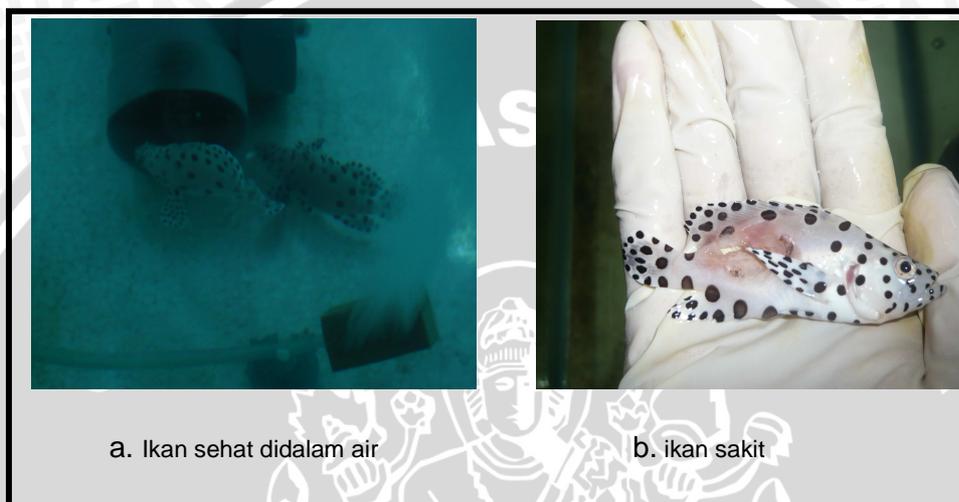
Berdasarkan mekanisme molekulernya ekspresi IL-6 ditunjukkan bahwa reaksi antara IL-6 dengan antibodinya (anti IL-6) dapat dilihat pada gambar 15.b menunjukkan reaksi yang kuat dengan warna yang muncul secara kualitatif pada bagian struktur sel yakni lisosom. Berdasarkan reaksi secara biokimia pewarnaan ini menunjukkan tingkat spesifitas enzim (Horseradish peroksidase dengan DAB kromogen) sehingga ketika diberikan antibodi, ikatan enzim dengan substratnya mampu memunculkan warna yang spesifik dari antibodi yaitu anti IL-6 yang digunakan. Ekspresi IL-6 juga ditandai dengan adanya perubahan struktur sel yang ditunjukkan melalui hasil pelabelan enzim. Sel ikan yang terdeteksi IL-6 mengalami hemorrage yaitu terjadi inflamasi atau meradang (Marsetyawan, 2009).

Anatomi ginjal ikan secara keseluruhan bervariasi pada setiap spesies. Ginjal ikan terdiri dari dua bagian yang terpisah secara jelas yaitu ginjal cranial (*anterior*) dan ginjal caudal (*posterior*). Struktur *excretory* ginjal bergantung pada habitat ikan yaitu air tawar atau laut. Ginjal spesies air tawar, menghasilkan banyak urin yang cair, memiliki banyak glomeruli yang besar dan aktif mengabsorpsi kembali ion. Sedangkan pada ginjal spesies ikan laut, memproduksi sejumlah kecil urin kental, memiliki sedikit atau tidak memiliki glomeruli, dan aktif mensekresi ion (Fujaya, 2004).

Ginjal cranial (*head kidney*) berisi jaringan *hematopoetic*, *lymphoid* dan *endocrine*. Ginjal cranial merupakan organ immunologis, yang menghasilkan sel-sel dan substansi yang melawan penyakit. Ginjal caudal terdiri atas nephron yang dilingkupi oleh jaringan hematopoetic dan lymphoid yang tersebar diseluruh ginjal (Reimschuessel (2001) dalam Dominius (2009)).

4.3.4 Perbedaan antara ikan sehat dan ikan yang terinfeksi *Vibrio parahaemolyticus*

Ikan sehat mempunyai pergerakan aktif dan tidak terdapat tanda-tanda luka ditubuhnya (gambar 16.a), sedangkan ikan yang terkena penyakit tampak terdapat borok pada kulit sehingga menyebabkan kematian pada ikan (gambar 16.b).



Gambar 16. Kondisi Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)

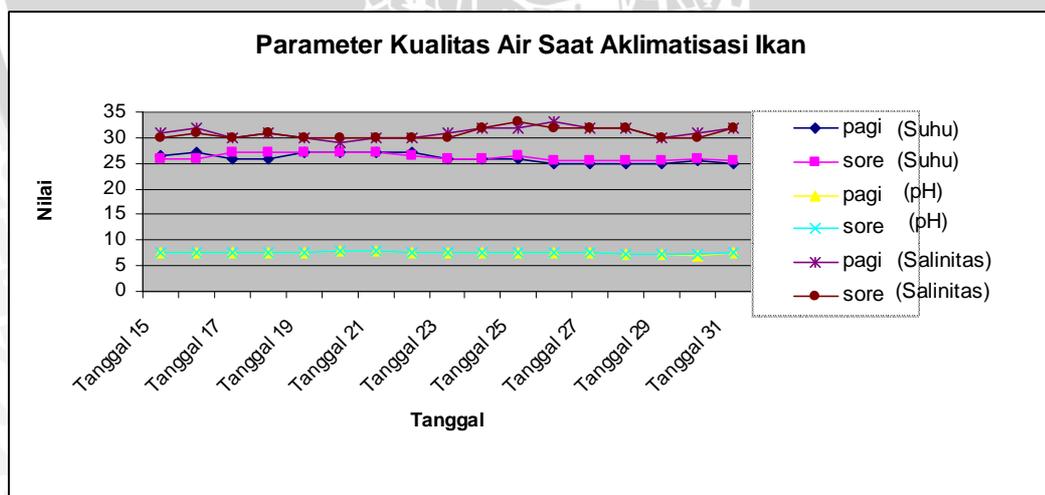
Ikan yang sakit tersebut seperti pada gambar 16.b terdapat borok pada kulitnya, borok tersebut timbul sebagai akibat serangan dari *vibrio parahaemolyticus*. Gejala pada ikan yang terinfeksi bakteri *Vibrio* ditunjukkan oleh ciri-ciri seperti warna tubuh kegelapan, nafsu makan berkurang, perut menggebu dan mata menonjol (exophthalmia), terjadi perubahan perilaku, gerakan lamban, timbul borok pada kulit, keseimbangan terganggu dan berputar-putar (whirling) (Murdjani, 2002). Hasil pengamatan yang dilakukan oleh Wijayanti dan Hamid (1997), ikan yang terinfeksi umumnya menunjukkan gejala klinis yang ditandai dengan memburuknya kondisi tubuh dan memproduksi lendir yang berlebihan.

4.4 Kualitas Air

Pada penelitian ini diperlukan pengukuran kualitas air setiap hari pada pagi dan sore selama pemeliharaan ikan kerapu tikus (*Cromyleptes altivelis*) agar kondisi ikan selalu stabil dan ikan tidak mengalami stres. Pengukuran kualitas air tersebut sangat penting untuk menjaga parameter-parameter kualitas air agar tidak terjadi perubahan yang drastis, apabila parameter tersebut mengalami sedikit perubahan maka akan dikondisikan agar kembali normal.

Pencegahan stres dapat dilakukan melalui manajemen yang baik, yaitu meliputi menjaga kualitas air dan nutrisi yang baik. Kualitas air yang baik adalah menjaga pH dan suhu pada kisaran yang dibutuhkan oleh ikan. Kualitas air yang buruk merupakan *stressor* utama pada ikan (Irianto, 2005).

Pengukuran kualitas air dilakukan selama 6 bulan dan sebelumnya dilakukan aklimatisasi ikan selama 17 hari agar kondisi ikan stabil dan mampu beradaptasi di lingkungan yang baru. Adapun rata-rata hasil kualitas air selama aklimatisasi yaitu seperti pada gambar 17.



Gambar 17. Grafik Parameter Kualitas Air saat Aklimatisasi ikan

Aklimatisasi dilakukan karena adanya perbedaan suhu, pH dan salinitas antara daerah asal ikan atau media transportasi dengan kondisi air tempat pemeliharaan (Ajiekumoro, 2009). Berdasarkan gambar 17 dapat diketahui bahwa nilai parameter baik suhu, pH dan salinitas antara pagi dan sore tidak jauh berbeda bahkan hampir sama. Parameter-parameter kualitas air yang sesuai untuk kehidupan kerapu tikus adalah; suhu antara 24-32⁰C, salinitas 30-33 ppt dan pH antara 7,8-8. Parameter-parameter kualitas air tersebut mempengaruhi pertumbuhan dan ketahanan tubuh ikan kerapu tikus (*Cromyleptes altivelis*) terhadap penyakit (Subyakto dan Sri, 2005).

Setelah proses aklimatisasi maka ikan dipelihara dengan melakukan pengontrolan kualitas air meliputi suhu, pH, dan salinitas setiap hari pada pagi dan sore. Hasil pengukuran kualitas air selama pemeliharaan ikan kerapu tikus (*Cromyleptes altivelis*) pada setiap parameter dirata-rata perbulan, adapun data hasil rata-rata perbulan seperti pada tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata hasil Kualitas Air Selama Pemeliharaan

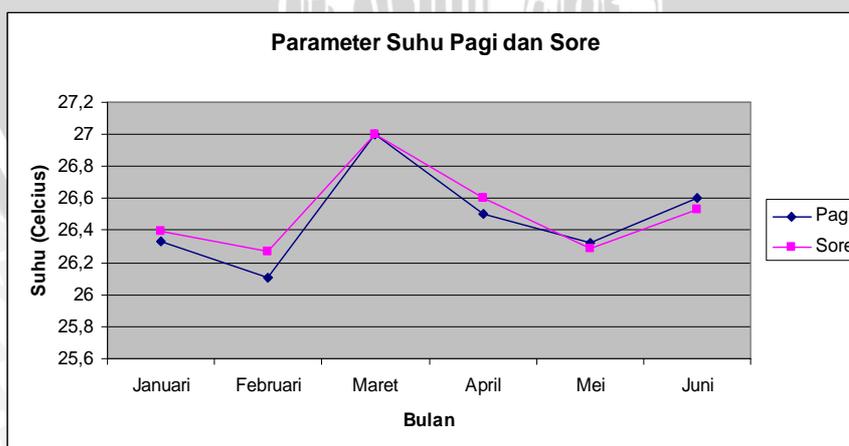
BULAN	Nilai	PARAMETER KUALITAS AIR					
		SUHU (°C)		pH		SALINITAS	
		PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE
Januari	Rata-rata	26,33	26,4	5,2	5,67	31,67	31,71
Februari	Rata-rata	26,11	26,27	7	6	30,5	30,7
Maret	Rata-rata	27	27	5,5	5,7	33	30,7
April	Rata-rata	26,5	26,6	5,7	5,7	31	31
Mei	Rata-rata	26,32	26,29	6,02	6,09	29,87	29,97
Juni	Rata-rata	26,6	26,53	5,85	5,89	30,53	30,57

Parameter suhu, pH, dan salinitas selama pemeliharaan antara pagi dan sore terjadi perubahan yang relatif kecil sehingga dapat dikatakan bahwa kondisi kualitas airnya stabil dan sesuai dengan kehidupan ikan kerapu tikus .

4.4.1 Parameter Suhu

Perbedaan suhu antara siang dan sore hari sangat kecil karena perubahannya terjadi secara stabil dan tidak mengalami perubahan secara drastis, sehingga kondisi ikan stabil. Kisaran suhu tersebut menunjang sistem imun yang ada dalam tubuh ikan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Putra (2008), Suhu mempengaruhi aktivitas metabolisme ikan kerapu tikus, apabila suhu terlalu tinggi maka jumlah oksigen akan menurun sehingga nafsu makan ikan berkurang, kemudian ikan akan mengalami stres dan mudah terserang penyakit karena sistem imun yang ada didalam tubuh menurun. Secara umum imun sistem dari ikan akan optimum pada suhu diatas 15 °C.

Parameter suhu yang diukur pada pagi dan sore hari yang dilakukan rutin setiap hari. Perubahan suhu terjadi secara stabil tiap bulan, suhu tertinggi pada pagi hari terjadi pada bulan Maret yaitu sebesar 27°C, sedangkan suhu terendah terjadi pada bulan Februari yaitu 26,11°C. Hal ini juga terjadi pada pengukuran parameter kualitas air sore hari, suhu berubah secara stabil dalam setiap bulan, suhu tertinggi pada bulan Maret sebesar 27°C dan suhu terendah terjadi pada bulan Februari sebesar 26,27°C. Hal ini dapat dilihat pada gambar 18.



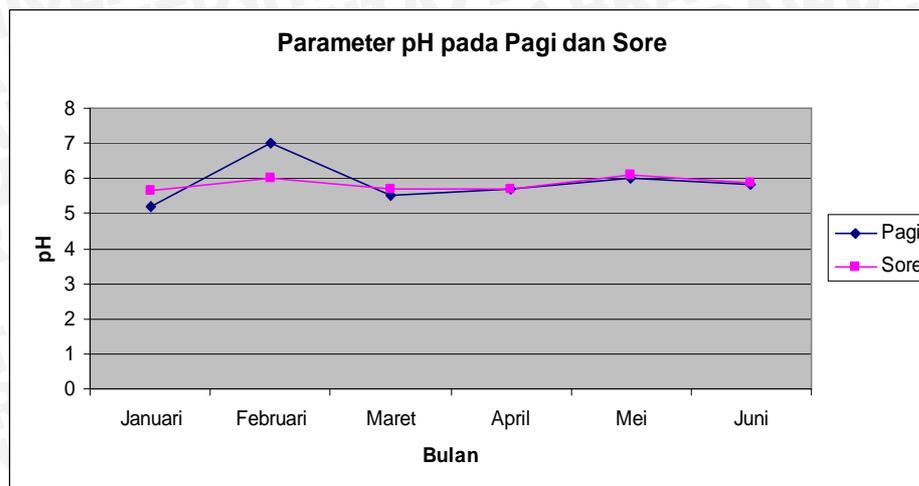
Gambar 18. Grafik Parameter Suhu Selama Pemeliharaan Ikan Kerapu

Suhu tinggi tidak selalu berakibat mematikan tetapi dapat menyebabkan gangguan status kesehatan untuk jangka panjang, misalnya stres yang ditandai dengan tubuh lemah, kurus, dan tingkah laku abnormal. Pada suhu rendah, akibat yang ditimbulkan antara lain ikan menjadi lebih rentan terhadap infeksi fungi dan bakteri patogen akibat melemahnya sistem imun. Pada dasarnya suhu rendah memungkinkan air mengandung oksigen lebih tinggi, tetapi suhu rendah menyebabkan stres pernafasan pada ikan berupa menurunnya laju pernafasan dan denyut jantung sehingga dapat berlanjut dengan pingsannya ikan-ikan akibat kekurangan oksigen (Irianto, 2005).

Suhu mempengaruhi aktivitas metabolisme organisme, karena itu penyebaran organisme baik di lautan maupun di perairan air tawar dibatasi oleh suhu perairan tersebut. Secara umum laju pertumbuhan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu, dapat menekan kehidupan biota bahkan dapat menyebabkan kematian bila peningkatan suhu sampai ekstrim (drastis). Suhu optimal untuk pertumbuhan kerapu tikus adalah 27°C-29°C.

4.4.2 Parameter pH

Rata-rata parameter pH yang diukur pada pagi dan sore hari yang dilakukan rutin setiap hari selama pemeliharaan ikan Kerapu Tikus (*Cromyleptes altivelis*). Perubahan pH terjadi secara stabil tiap bulan, pH tertinggi pada pagi hari terjadi pada bulan Februari yaitu sebesar 7, sedangkan pH terendah terjadi pada bulan Januari yaitu 5,2. Kondisi pH dalam 6 bulan ini mempunyai nilai rata-rata 5,87 nilai pH ini tergolong rendah. Hal ini dipengaruhi oleh pakan yang diberikan kepada ikan kerapu, sehingga menyebabkan air cenderung asam, sehingga mempengaruhi kondisi ikan kerapu tikus. Grafik pH dapat dilihat pada gambar 19.



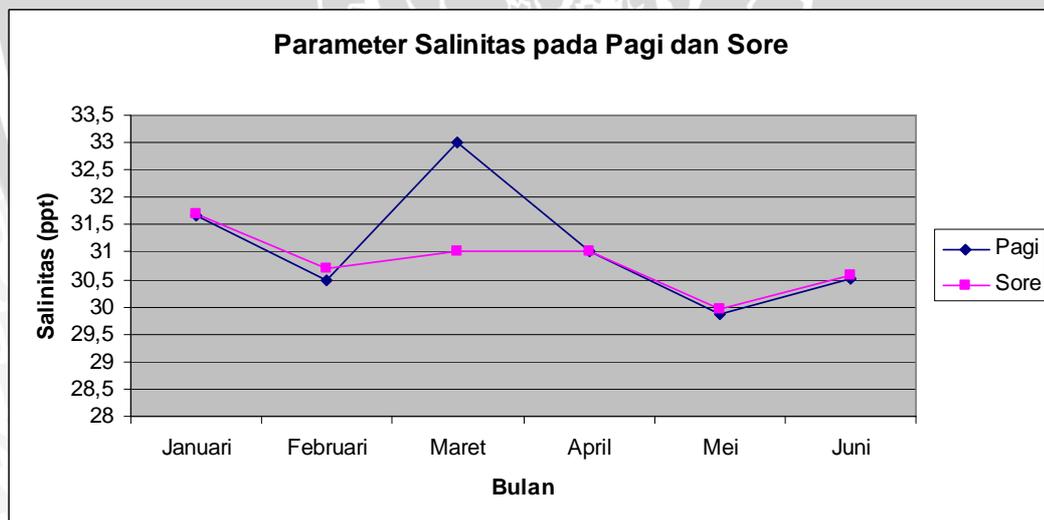
Gambar 19. Grafik Parameter pH Selama Pemeliharaan Ikan Kerapu

Kondisi rata-rata pH pada sore hari selama pemeliharaan ikan kerapu tikus adalah 5,84. Kondisi pH pada sore hari ini tergolong rendah. Hasil pengukuran pH pada pagi hari dan sore hari selama 6 bulan hampir sama. Walaupun nilai rata-rata pH tergolong rendah tetapi perubahan pH terjadi secara setabil dan tidak pernah mengalami penurunan yang drastis maupun sebaliknya. Rendahnya nilai pH dapat mempengaruhi kehidupan ikan kerapu tikus. Karena pH rendah kandungan oksigen terlarut akan berkurang, sebagai akibatnya konsumsi oksigen menurun, aktifitas pernapasan naik dan selera makan akan berkurang. Kerapu tikus sangat baik bila dipelihara pada air laut dengan pH 7-9. Apabila pH air < 4,5 maka air bersifat racun bagi ikan; pH 5-6,5 maka Pertumbuhan ikan terhambat dan ikan sangat sensitif terhadap bakteri dan parasit sehingga system imun ikan menurun; pH 6,5 - 9,0 maka ikan mengalami pertumbuhan yang optimal; pH >9,0 maka pertumbuhan ikan akan terhambat (Perwira, 2008).

4.4.3 Parameter Salinitas

Data kualitas air pada penelitian yang telah dilakukan, didapatkan data parameter salinitas yang diukur pada pagi dan sore hari selama 6 bulan. Perubahan salinitas terjadi secara stabil tiap bulan, nilai rata-rata salinitas tertinggi pada pagi hari terjadi pada bulan Maret yaitu sebesar 33 ppt, sedangkan nilai rata-rata salinitas terendah terjadi pada bulan Mei yaitu 29,87 ppt.

Nilai rata-rata salinitas tertinggi pada bulan Januari (sore hari) yaitu 31,71 ppt dan terendah pada bulan Mei yaitu 29,97 ppt. Kisaran salinitas antara pagi hari dan sore hari hampir sama dan tidak terjadi kenaikan atau penurunan salinitas secara drastis. Kisaran salinitas tersebut cocok untuk kehidupan ikan kerapu tikus hal ini sesuai dengan pernyataan Perwira (2008), Salinitas yang ideal untuk pembesaran ikan kerapu tikus adalah 30-33 ppt. Perubahan salinitas secara drastis akan menyebabkan ikan stres dan nafsu makan menghilang, sehingga mudah terserang penyakit.



Gambar 20. Grafik Parameter Suhu Selama Pemeliharaan Ikan Kerapu

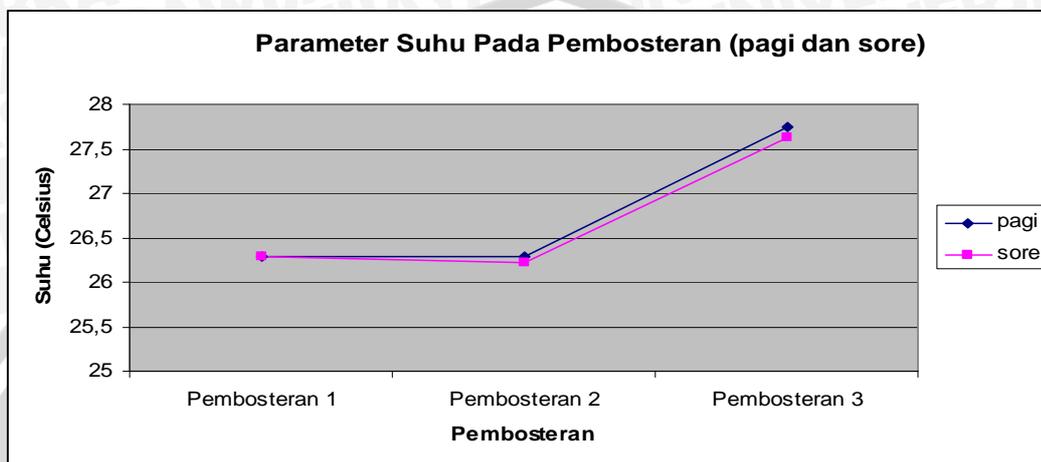
4.4.4 Data Kualitas Air Pada Saat Pemaparan Ikan Kerapu Tikus dengan protein Imunogenik *Vibrio Parahaemolyticus*

Secara keseluruhan suhu, pH, dan salinitas pagi dan sore hari tidak terjadi perubahan yang mencolok. Perubahan terjadi secara stabil sehingga tidak menyebabkan ikan mengalami stres. Karena pada saat pembosteran ikan kerapu baik pada saat pembosteran pertama, kedua, dan ketiga ikan harus dalam kondisi sehat dan tidak stres agar respon yang ditimbulkan tersebut benar-benar respon dari pemaparan protein imunogenik dan bukan merupakan respon dari keadaan stres ikan.

Irianto (2005), Stres juga akan mempengaruhi faktor perlindungan alami ikan seperti mukus, sisik, kulit dan reaksi inflamasi. Stres berpengaruh terhadap system perlindungan tubuh inang yaitu mukus. Stress juga dapat menyebabkan iritasi atau peradangan (inflamasi). Stres yang lama akan semakin menurunkan efektivitas system imun sehingga kemungkinan mudah terserang penyakit.

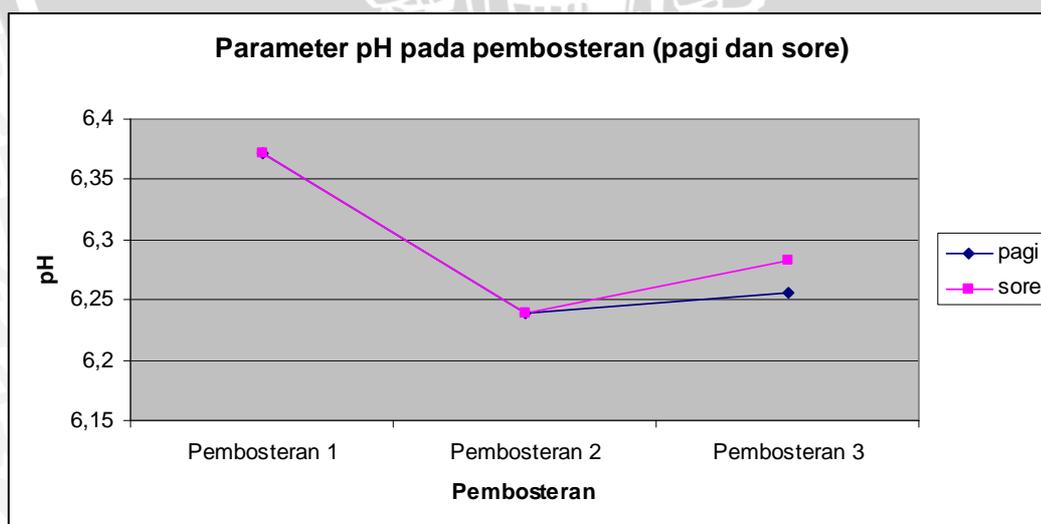
Perubahan parameter kualitas air baik suhu, pH, dan salinitas pada pembosteran pertama ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) oleh protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* terjadi secara stabil, setelah 7 hari penyuntikan kondisi parameter kualitas air juga tidak terjadi perubahan yang mencolok. Kemudian dilanjutkan pembosteran kedua, dalam selang waktu 14 hari kondisi perairan juga tetap stabil antara suhu, pH, dan salinitas. Setelah pembosteran kedua maka pembosteran ketiga dilakukan setelah pembosteran ketiga kondisi perairan tetap tidak ada perubahan yang mencolok. Sehingga dalam kegiatan pembosteran pada ikan kerapu tidak berpengaruh pada perubahan kualitas air, tetapi pembosteran ikan kerapu tikus itu bergantung pada kondisi kualitas air, karena parameter kualitas air yang buruk merupakan stressor pada ikan.

Suhu pada pemboosteran 1, 2, dan 3 tidak terjadi perubahan yang mencolok. Antara pemboosteran pertama, kedua dan ketiga pada pagi dan sore tidak berpengaruh, suhu tetap stabil antara pagi dan sore. Seperti pada Gambar 21.



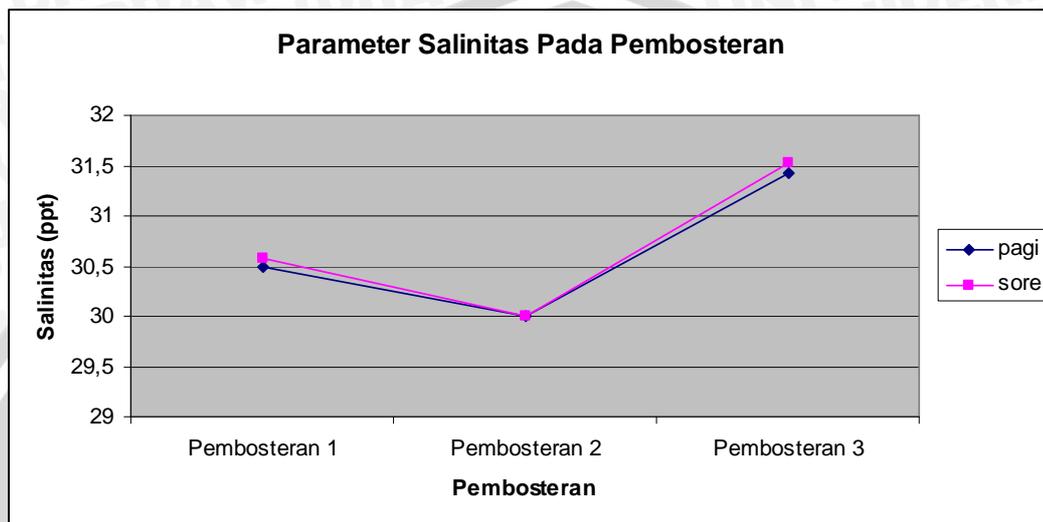
Gambar 21. Grafik Parameter Suhu Selama Pemboosteran Ikan Kerapu

pH pada pemboosteran 1, 2, dan 3 tidak terjadi perubahan pH yang mencolok. Antara pemboosteran pertama, kedua dan ketiga pada pagi dan sore tidak berpengaruh, pH tetap stabil antara pagi dan sore. Seperti pada Gambar 22.



Gambar 22. Grafik Parameter pH Selama Pemboosteran Ikan Kerapu

Salinitas pada pemboosteran 1, 2, dan 3 tidak terjadi perubahan yang mencolok. Antara pemboosteran pertama, kedua dan ketiga pada pagi dan sore tidak berpengaruh, salinitas tetap stabil antara pagi dan sore. Seperti pada gambar 23.



Gambar 23. Grafik Parameter Salinitas Selama Pemboosteran Ikan Kerapu

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Protein imunogenik *Vibrio Parahaemolyticus* dengan berat molekul 19,13 kDa yang dipapar pada ikan kerapu tikus dapat meningkatkan ekspresi IL-6 yang ditunjukkan dengan pelabelan *secondary antibody anti IL-6 conjugate biotin* pada Jaringan otak, mata dan ginjal.

5.2 Saran

Diperlukan penelitian lanjutan untuk mengembangkan bahan diagnostik dari sel imun (molekul IL-6) untuk diagnosa spesifik *Vibrio Parahaemolyticus* dan bahan obat untuk *Vibrio Parahaemolyticus*.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K. and A. H. Lichtman. 2005. **Cellular and Molecular Immunology**, fifth edition, updated edition. Elsevier saunders, Pennsylvania.
- Agung, Batur. 2008. **Imunohistokimia**. http://www.oefy_malhikdua.com//. Diakses tanggal 17 Mei 2010 pukul 13.45 WIB.
- Ahyari. 2010. **Gram Negatif Berbentuk Batang**. [http:// Blog_kita.com//](http://Blog_kita.com//). Diakses tanggal 19 Januari 2010 pukul 16.45 WIB.
- Ajikumoro. 2009. **Teknik Budidaya Kakap putih**. <http://Wordpress.comweblog//>. Diakses tanggal 1 Juni 2010, pukul 15.30 WIB
- Albert, B. D.Bray: J. Lewis, M. Raff. 2002. **Molecular Biology of The Cell**. Garland Science: New York.
- Aljabar. 2008. **Pengertian Suhu**. [http:// www.aljabar_email.com//](http://www.aljabar_email.com//) diakses tanggal 23 Oktober 2008 pukul 13.00 WIB.
- Ambari, Ediwibowo. 2003. **Deteksi Atigen Toksoplasma Dengan Teknik Imunohistokimia Pada Abortus Spontan**. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Andayani, Sri. 2005. **Manajemen Kualitas Air Untuk Budidaya Perikanan**. Manajemen Sumberdaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Anjarudin. 2007.**Dasar-Dasar Aquakultur Hama dan Penyakit Pada Pembudidayaan Ikan**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Hasanudin. Makasar.
- Annualreviews .2000. **T-Cell Reseptor**. <http://www.Annualreviews.com>. Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.
- Aoki,Takasi.Tomokazu Takano, Mudjekeewis D. Santos, Hidehiro Kondo and Ikuo Hirono. 2008. **Molecular Innate Immunity in Teleost Fish: Review and Future Perspectives**. **Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress 2008**, pp. 263–276.
- Athiyatillah. 2009. **Isolasi dan Identifikasi Bakteri**. <http://athiyatillah.blogspot.com>. Diakses tanggal 23 Oktober 2009 pukul 13.00 WIB.
- Austin B and D. A. Austin, 2008. **Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish .Fourth Edition**. Springer Dordrecht Berlin Heidelberg New York.
- Baratawidjaya Karnen Gerna. 1996. **Imunologi Dasar**. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta

Bihl, M, Karl Heinman, Jochen J, Oliver Elckerberg, Andre AP, Michael Tamam and Michel coth. 2002. **Identification of a Novel IL-6 Isoform Binding to The Endogenous IL-6 Receptor**. Am J Respir. Cell. Mol. Biol.

Boy, West Borneo. 2010. **Pertumbuhan Ikan**. http://Westborneo_Boys.com// Diakses tanggal 1 Juni 2010, pukul 15.30 WIB

Boyd, E. F., A.L Cohen, L. M Naughton, D. W Ussery, T. T.Binnewies, O C Stine, and M. A Parent. 2008. **Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus***. BMC Microbiology. 8:110

Budiadi, Eko. 2008. **Karakterisasi Ekspresi Protein Reseptor Pada Organ Mata Ikan kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang terinfeksi *Vibrio Alginolyticus***. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Brooks, G. F., J.S., Butel, and S.A. Morse., 2001. **Mikrobiologi Kedokteran**. Penerjemahan : Eddy, M., Kuntaman, Eddy Bagus, W, Ni Made, M., Setio., Lidawati. A. Salemba Medika. Jakarta. 528 hal

Cavaillon, Jean-Marc. 2007. Molecular Mediators : Cytokines. In: Meyers (ed.). **Immunology: from cell biology to disease**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p: 137-166.

Charles-Hernández, G.L., E. Cifuentes, S.J. Rothenberg. 2006. **Environmental factors associated with the presence of *Vibrio parahaemolyticus* in sea products and the risk of food poisoning in communities bordering the Gulf of Mexico**. Journal of Environmental Health Research, Vol. 5 issue 2

Cholik F. Jagatraya A.G. Poernomo dan Jawzi A. 2006. **Aquakultur Tumpua Harapan Masa Depan Bangsa**. Masyarakat Perikanan Nusantara dengan Taman Aquarium Air Tawar. Jakarta

Colognato, H., and P.D. Yurchenco. 2000. **Form and Function: The Laminin Family of heterotrimers**. Dev Dyn. 218:213-34.

Dominius. 2009. **Identifikasi Dan Ekspresi Protein Reseptor Organ Ginjal Ikan Kerapu Tikus Yang mengenali Infeksi Vibriosis**. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Elisa, Tety. 2009. **Imunologi**. http://Tety_Elisa's_blog.htm// Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.

Feliatra. 1999. **Identifikasi Bakteri Patogen (*Vibrio sp*) di Peraian Nongsa Batam**. Pakultas perikanan. Universitas Riau. Jurnal Natur Indonesia II (1);28-33 (1999).

FAO. 2007. **National Aquaculture Sector**. Overview -Indonesia. [http:// www.FAO.org/ index in. htm](http://www.FAO.org/index_in.htm).

Fatonny, Adi. 2006. **Media Budidaya Ikan**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Hasanudin. Makasar.

Filza. 2008. **Antigen Dan Atibodi**. [http:// Filzahazni.wordpress.com/](http://Filzahazni.wordpress.com/). Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.

Fuadi. 2009. **Faktor Fisika Kimia Air_Lets Belajar Blogspot**. <http://www.adprima.com/studyout.htm>. Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.

Fujaya. 2004. **Fisiologi Ikan**. Kanisus. Yogyakarta.

Gene Bank.2003. **Classification of Vibrio Parahaemolyticus**.

Ghufran dan Kordi. 2001. **Pembesaran Kerapu Bebek di KJA**. Kanisus. Yogyakarta.

Hamza. 2006. **Jenis Penyakit dan Cara Penanggulangannya Pada Budidaya Ikan Laut**. <http://www.Hamza@yahoo.com/> Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.

Harlow dan Lane D. 1998. **Antibodies: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbour Laboratory.

Hasan. 2002. **Pokok-Pokok Materi Metodologi Penelitian dan Aplikasinya**. Ghalia Indonesia. Jakarta.

Hasanah. 2009. **Bakteri**. [http:// hasanah619'sblogs.struktur dasar bakteri.htm/](http://hasanah619'sblogs.strukturdasarbakteri.htm/) diakses tanggal 18 Desember 2009.

Hughes. 2002. **Evolution Of The Host Defense System In Immunology of Infectious Disease**. Edited by Kaufman S. H. E. Asher And R. Ahmed ASM Press Washington DC p; 67-75

Illev D.B., esteBan B.C., MaCkenzle s., Planas J.v. & F.W. Goetz. 2006. **Cloning and expression analysis of an Il-6 homolog in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)**, Mol. Immunol., 44: 1814-1818.

InfoPom. 2008. **Pengujian Mikrobiologi Pangan**. Jakarta.

Irianto, A. 2005. **Patologi Ikan Teleostei**. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.

Jimeno, Carment Donate. 2008. **A Transcriptomic Approach Toward Understanding PAMP-Drien Macrophage Activation And Dietary Immunostimulan In Fish**. Universitat de Barcelona.

Judarwanto. 2009. **Respon Imun**. [http://Precadet.com/ health issues/Leraning by doing. Htm](http://Precadet.com/healthissues/Leraningbydoing.htm). Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.

Kresno, Siti Boedina. 2001. **Imunologi; Diagnosis dan Prosedur Laboratorium**. Balai Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.

Leivestad. 1982. **Water Quality Management**. Elvesier Published. Amsterdam.

Lestari, Febrika. 2009. **Patogenesis Molekuler Infeksi Vibrio parahaemolyticus Pada ikan kerapu tikus (Cromileptes altivelis)**. Fakultas perikanan dan ilmu kelautan. Universitas brawijaya. Malang.

Libby, R.T., M.F. Champlaud, T. Claudepierre, Y. Xu, E.P. Gibbons, M. Koch, R.E. Burgeson, D.D. Hunter, and W.J. Brunken. 2000. **Laminin Expression In Adult And Developing Retinae: Evidence Of Two Novel Cns Laminins**. J Neurosci. 20:6517-28.

Madigan, M.T., J.M. Martinko, dan J. Parker. 2003. **Brock Biology of Microorganisms, Tenth edition**. Prentice Hall, Pearson education, Inc., New Jersey. 1019p.

Mahasri, G. 1999. **Manajemen Kualitas Air**. Fakultas Kedokteran hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

Marsetyawan. 2009. **Basic Concep of Immunity Celluler**. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Martania. 2005. **Bakteri Gram Negatif dan Positif**. <http://Martiana.blogspot.com/> diakses tanggal 18 Desember 2009.

McLaughlin, J.B., A. DePaola, C.A. Bopp, K.A. Martinek, N.P. Napolilli, C.G. Allison, S.L. Murray, E.C. Thompson, M.M. Bird, and J.P. Middaugh. 2005. **Outbreak of Vibrio parahaemolyticus Gastroenteritis Associated with Alaskan Oysters**. The new england journal of medicine 353;14 www.nejm.org October 6

Meager. Anthony. 2007. **Interleukin In Immunology From Cell Biology To Disease**. Meyers (ed) Wiley – VCH verlag gmbh & Co kGaA Weinheim p:167-204.

Muhtadi. 2007. **Riset Unggulan Strategis Nasional Peningkatan Produk Pakan Hewani**. Deputi Bidang Pengembangan SIPTEKNAS. Kementerian Negara Riset dan Teknologi republik Indonesia. Jakarta.

Murtidjo. 2002. **Budidaya Kerapu dalam Tambak. Kanisus**. Yogyakarta.

Muttaqin, A. 2007. **Pedoman Teknik Penanggulangan Penyakit Budidaya Ikan Air Laut**. PT Sambe Farma. Divisi Veteriner dan Aqukultur.

Musdalifah. 2010. **Ekspresi Molekul Major Histocompatibility Complex (MHC) Pada Ikan Kerapu Tikus Cromileptes altivelis Yang Terinfeksi Vibrio alginolyticus**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Noor, Khalida. 2001. **Studi Imunohistokimia Antioksidan Cooper Zinc Superoxide Dismutase (Cu,Zn,SOD) Pada Monyet Ekor Panjang Diabetik Eksperimental**. Institut pertanian Bogor. Bogor

- Nurmawaty, T., 2008. **Perubahan jumlah sel neuron dan microglia pada kultur neuron yang dipapar dengan Lipopolysacharida (LPS) dan alfa pinen.** Thesis program studi Biomedik. Kekhususan farmakologi. Universitas Brawijaya. Malang.
- Ott, G and G. Van Nest. 2007. **Development of Vaccine Adjuvants: A Historical Perspective.** In: Manmohan Singh (Editor). *Vaccine Adjuvants and Delivery System.* John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA. p :1-32
- Pandey, J.P. 2007b. **Genetics of Immunoglobulins In Virella, G. (Ed).** Medical Immunology sixth edition. Informa Healthcare, New York. p: 73-82
- Panjaitan, Sita. 2009. **Sistem Imun Pada Tubuh.** Fakultas Kedokteran. UNAIR. [http:// sitapajatan_webblogs//](http://sitapajatan_webblogs//). Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.
- Parslow TG. 1997. **Imunogen, Antigen And Vaccine.**In: Stites DP, Terr AI, Parslow Tg Medical Immunology 9th ed USA. Applenton And Lange
- Pathmicro . 2010. **Sel-Sel Sistem Imun.** [http://www. www.pathmicro.com](http://www.pathmicro.com). diakses tanggal 18 Desember 2009.
- Pelezar dan Chan. 2005. **Dasar-Dasar Mikrobiologi.** Mc.graw-Hill Book Company.
- Pertiwi. Wara, Sartono Teguh, Siswanto Adi. 2009. **Sensitifitas dan Spesifitas Metode Dot Blot Menggunakan Antigen Outer Membran Protein Klebsiella pneumoniae Yang Di Respon Sekretori Immunoglobulin A. Sputum Penderita Terinfeksi Klebsiella pneumoniae.** Universitas Brawijaya. Malang.
- Perwira. 2008. **Budidaya Ikan Kerapu Tikus.**http://www.perwira_octopus39//. Diakses tanggal 19 Januari 2010 pukul 16.45 WIB.
- Putra, Nennas. 2008. **Manajemen Kualitas Air Dan Tanah.** Departemen Kelautan Dan Perikanan. Direktorat Jenderal Perikanan Balai Budidaya Air Payau. Takalan.
- Prasetya, Samet dan Titik. 2008. **Aplikasi Budidaya Kerapu Bebek (*Cromileptes altivelis*) di Telik Ekas Kabupaten Lombok Timur.** Badan RISTEK Kelautan dan perikanan. Jakarta.
- Randall, John E. Phillip C. Heemstra. 1993. **FAO Species Catalogue : vol 16, Groupers Of The World.** Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Roma
- Riski. 2008. **Protein.** [http:// Riski_com/blogger.htm](http://Riski_com/blogger.htm). Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.
- Robbin SL, Kumar V, Cotran R.S. 2007. **Buku Ajar Patologi 7th ed.** Jakarta.

Setyawan, Agus. 2009. **Ekspresi interleukin 6 (il-6), cd4 dan cd8 pada organ spesifik ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) terhadap infeksi vibrio spp. Dan VNN (VIRAL NERVOUS NECROSIS).**Thesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Shirai, H., H. Ito, T. Hirayama, Y. Nakamoto, N. Nakabayashi, K. Kumagai, Y. Takeda, and M. Nishibuchi. 1990. **Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis.** Infection and Immunity 58, 3568–3573

Subyakto dan Sri. 2005. **Pembenihan kerapu Skala Rumah Tangga.** Agromedia Pustaka. Jakarta.

Sutrisno dan Eni Suciastuti. 1991. **Teknologi Penyediaan Air bersih.** Rineka Cipta. Jakarta.

Swadaya. 2009. **Kerapu Bebek: Protogony Hermaprodhit.** <http://budidaya.ikan.fish.blog.htm>. Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.

Syamsir, E. 2007. **Kasus- *Vibrio Parahaemolyticus* Di Dalam Seafood.** <http://ilmupangan.blogspot.com/2008/04/>

Theenvironmentalblog. 2010. Karakteristik *Vibrio parahaemolyticus*. <http://www.theenvironmentalblog.org>. Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.

TIM UDANA. 2006. **Analisis Komoditas Unggulan dan Peluang Usaha (Budidaya Ikan Kerapu).** Universitas Nusa Cendana Kupang. Kupang. diakses tanggal 18 Desember 2009.

Tizard, Ian. 1982. **Pengantar Immunologi Veteriner.** Airlangga University Press. Surabaya.

Trihendrokesowo. 1978. ***Vibrio Parahaemolyticus* Di Yogyakarta.** Fakultas Kedokteran. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Trubus. 2007. **Pembesaran Kerapu Bebek.** <http://www.trubus.com/> diakses tanggal 18 Desember 2009. pukul 14.30 WIB.

Violy, Agita. 2010. ***Vibrio*.** <http://ranger.getha.co.uk/> diakses tanggal 13 Januari 2010 pukul 14.30 WIB.

Virella, Gabriel. 2007. **Basic Immunology** In Virella, G. (Ed). *Medical Immunology sixth edition.* Informa Healthcare, New York. p: 1-8

Wajizah, Sitti. 2004. **Perspektif Minyak Ikan Sebagai Imunonutrisi.** Institut Pertanian Bogor. Bogor

Washingtonedu. 2009. **Antigen Presenting Cell.** <http://www.Washingtonedu.com>. diakses tanggal 18 Januari 2010. pukul 15.23 WIB.

Widiyanti, Luluk. 2009. **Patogenesis Molekuler Infeksi Bakteri Vibrio Alginolyticus Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Bawijaya. Malang.

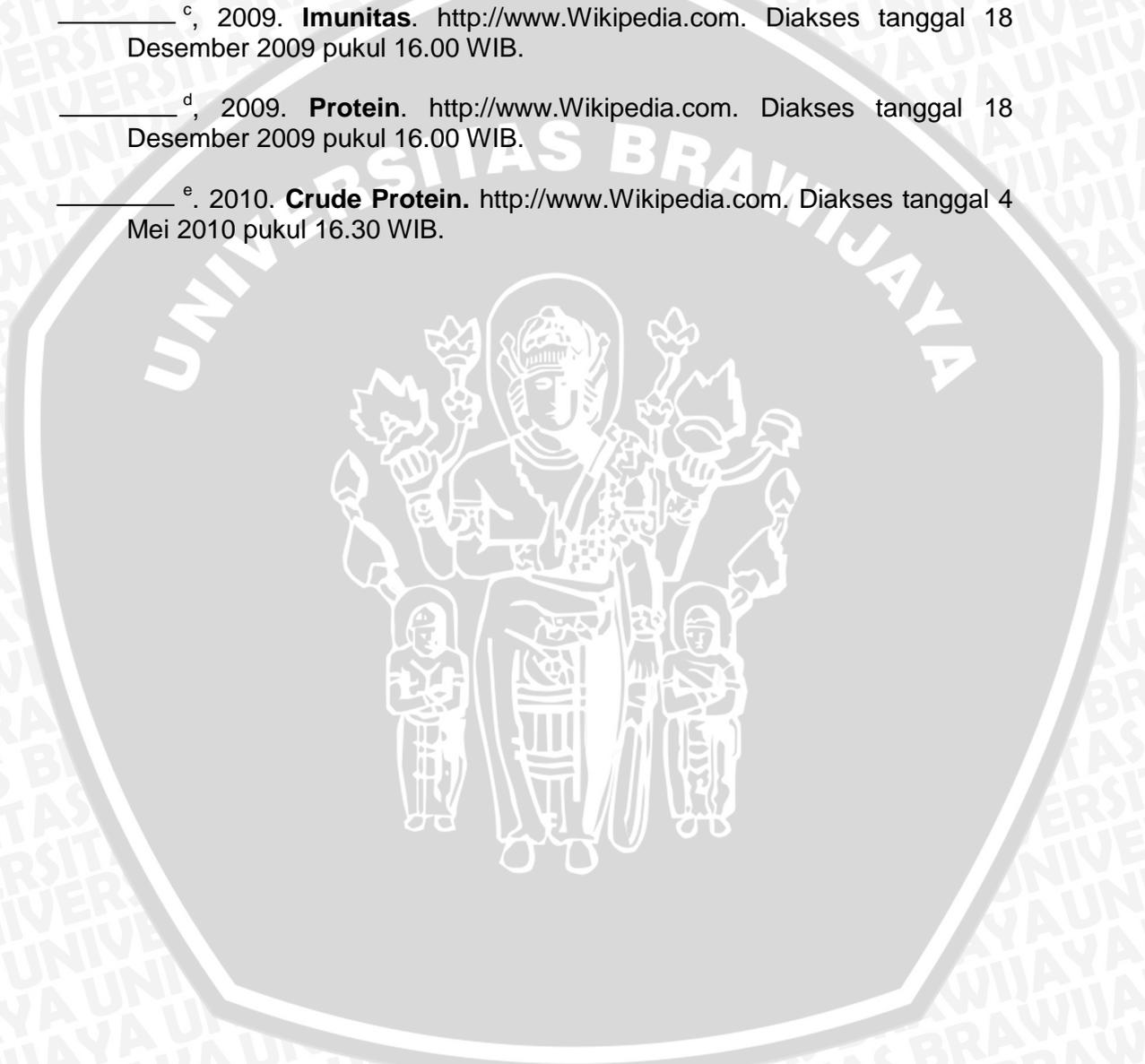
Wikipedia ^a, 2009. **Reseptor**. <http://www.Wikipedia.com>. Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.

_____ ^b, 2009. **Vibrio parahaemolyticus**. <http://www.Wikipedia.com>. Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.

_____ ^c, 2009. **Imunitas**. <http://www.Wikipedia.com>. Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.

_____ ^d, 2009. **Protein**. <http://www.Wikipedia.com>. Diakses tanggal 18 Desember 2009 pukul 16.00 WIB.

_____ ^e. 2010. **Crude Protein**. <http://www.Wikipedia.com>. Diakses tanggal 4 Mei 2010 pukul 16.30 WIB.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Bahan Pembuatan Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Elektrophoresis (SDS-PAGE)

- (1). *Acrylamide* 30%
 - Acrylamide : 14.5 g
 - Bis-acrylamide : 0.25 g
 - dH2O : 30 ml
- (2). *Tris HCL* (BM : 157.64) 1.5 M pH 8.8
 - Tris HCL : 11.82 g
 - dH2O : 50 ml
 - Adjust pH harus tepat
- (3). *Tris HCL* 1 M pH 6.8
 - Tris HCL : 3.152 g
 - dH2O : 20 ml
- (4). *SDS* 10%
 - SDS : 1 g
 - dH2O : 10 ml
- (5). *APS* 10%
 - APS : 0.1 g
 - dH2O : 1 ml
- (6). *Running Buffer* pH 8.8
 - Tris base : 3.03 g
 - Gliserine : 14.2 g
 - SDS : 1 g
 - dH2O : 100 ml
 - Pemakaian RB maksimal 4X
- (7). *Staining Solution*
 - Comasive Brilliant Blue : 3.03 g
 - Methanol : 40 g
 - Asam asetat glasial : 10 %
 - dH2O add 100 ml add 500 ml
- (8). *Destaining Solution*
 - Methanol 20% : 100 g
 - As.asetat glasial 10% : 50 %
 - dH2O add : 500 ml
- (9). *RSB*
 - Tris HCL pH 6.8 : 1 g
 - Gliserol 100% : 0.8 ml
 - SDS 10% : 1.6 ml
 - β mercapto etanol : 0.4 ml
 - Bromophenol Blue 1 % : 0.2 ml
 - Aquadest : 4 ml **Total 8 ml**
- 10). *PBS*
 - Dengan NaCl
 - NaCl : 8.473 g
 - Na2HPO4 : 1.779 g
 - NaH2PO4 : 1.379 g
 - Aquades : 1000 ml
 - pH 7.4

Pembuatan *Elektroforesis* Gel 12.5%

Lower	1 Slab (µl)
Acryl 30%	2063
Tris HCL 1.5 M, pH 8.8	1250
dH2O	1637
SDS 10%	50
APS 10%	50
Temed	10

Upper	1 Slab (µl)
Acryl 30%	257.5
Tris HCL 1.5 M, pH 8.8	312.5
dH2O	662.5
SDS 10%	12.5
APS 10%	3.75
Temed	2.5

Lampiran 2. Cara Perhitungan Berat Molekul

- Menghitung panjang separating gel (cm)
- Menghitung jarak pita-pita protein marker dari separating gel (cm)
- Menghitung pergerakan masing-masing pita protein marker (Rf) sebagai X dengan rumus :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pita protein}}{\text{Panjang separating gel}}$$

- Mencari logaritma dari berat molekul protein (Y) dalam marker

Panjang separating gel 7,1 cm
MARKER PRO STAIN™

No	panjang band (cm)	Rf (x)	BM (dalton)	log BM (y)
1	0.7	0.098592	198000	5.29666519
2	1.3	0.183099	115000	5.06069784
3	2.3	0.323944	90500	4.95664858
4	2.75	0.387324	61500	4.78887512
5	3.35	0.471831	46200	4.66464198
6	4.2	0.591549	37800	4.5774918
7	5.15	0.725352	26000	4.41497335
8	5.95	0.838028	18500	4.26717173

- Mencari persamaan dari X dan Y
 $Y=5.35106922 - 1.3209278X$
- Menghitung Rf untuk masing-masing pita protein sampel
- Mencari Y (log BM sampel) dari persamaan di atas
- Mencari BM sampel dengan rumus 10^Y .

Tabel data berat protein CP *Vibrio parahaemolyticus*
Panjang separating 6,3 cm

No	panjang band (cm)	Rf (x)	log BM (Y)	BM (dalton)
1	0,2	0,031746	5,309135	203.768
2	0,6	0,095238	5,225267	167.984
3	0,8	0,126984	5,183332	152.522
4	1,1	0,174603	5,120431	131.957
5	1,3	0,206349	5,078497	119.811
6	1,6	0,253968	5,015596	103.656
7	1,9	0,301587	4,952694	89.680
8	2,1	0,333333	4,91076	81.425
9	2,5	0,396825	4,826892	67.126
10	3,1	0,492063	4,701089	50.245
11	3,7	0,587302	4,575287	37.609
12	4,3	0,68254	4,449484	28.150
13	4,7	0,746032	4,365616	23.207
14	5,1	0,809524	4,281747	19.131
15	5,8	0,920635	4,134978	13.645

Lampiran 3. Perhitungan konsentrasi protein imunogenik 19,13 kDa *Vibrio parahaemolyticus* untuk uji klinis

a. Konsentrasi protein imunogenik 19,13 kDa *Vibrio parahaemolyticus*

Protein imunogenik	Absorbasnsi	Konsentrasi (mg/ml)
19,13 kDa <i>V parahemolyticus</i>	3,27	3,27

→ Konsentrasi protein imunogenik 3,27 mg/ml = 3270 µg/ml

a. Dosis penyuntikan dalam uji klinis adalah 33,3 µg/ 150 g ikan

b. Mencari pengenceran masing-masing protein imunogenik hingga didapatkan konsentrasi 33,3 µg dalam 0,1 ml, protein diencerkan dalam Tris HCl 0,5 N pH 8,6.

→ Jika 0,1 ml/ikan = 33 µg

→ maka 1 ml/ ikan = a

→ sehingga 1/0,1 = a/33

$$\begin{aligned} a &= 10 \times 33 \\ &= 330 \mu\text{g} / \text{ml} \end{aligned}$$

Jika volume yang dibuat = 100 µl = 0,1 ml maka protein imunogeniknya:

$$3270 \mu\text{g/ml} * \alpha = 0,1 \text{ ml} * 330 \mu\text{g/ml}$$

$$\begin{aligned} \alpha &= \frac{33 \mu\text{g}}{3270 \mu\text{g/ml}} \\ &= 0,01009 \text{ ml} \\ &= 10,09 \mu\text{l} \end{aligned}$$

c. Pada pembosteran pertama perbandingan protein imunogenik dengan Adjuvan CFA mempunyai perbandingan 1:1 dan pada pembosteran kedua perbandingan protein imunogenik dengan Adjuvan IFA mempunyai perbandingan 1:1.

Protein 10,09 µl + tris HCL 39,91 : 50 µl CFA

Protein 10,09 µl + tris HCL 39,91 : 50 µl IFA

Protein 10,09 µl + tris HCL 39,91 : 50 µl IFA

Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian



Isolasi Protein V. parahaemolyticus



homogenisasi Protein V. parahaemolyticus



Pembuatan gel lower dan Upper



Pengisian sample CP V. parahaemolyticus



Dialirkan Tegangan listrik



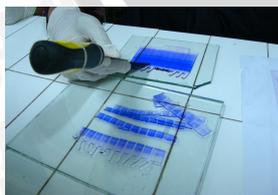
gel diambil dari plate



Staining solution



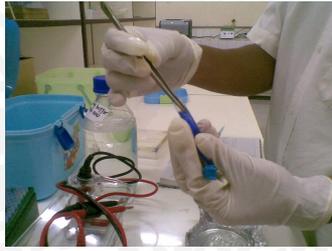
destaining solution



Pemotongan pita protein



Pengisian potongan pita gel ke falcon



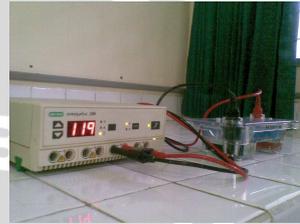
Pemasukan potongan pita ke membrane selofan



Penjepitan membrane selofan



Dimasukkan ke dalam chamber



dialirkan ke tegangan listrik



Sample setelah dilisa dikeringanginkan



Alat Nanodrop spektrofotometer ND 1000



Pengamatan jaringan



Lampiran 4. Data Kualitas Air

DATA KUALITAS AIR KETIKA AKLIMATISASI

BULAN	HARI	PARAMETER KUALITAS AIR					
		SUHU (°C)		pH		SALINITAS	
		PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE
DESEMBER MINGGU KE- 2	15	26,5	26	7,7	7,7	31	30
	16	27	26	7,7	7,6	32	31
	17	26	27	7,7	7,7	30	30
	18	26	27	7,7	7,6	31	31
	19	27	27	7,7	7,6	30	30
	20	27	27	7,9	7,9	29	30
	21	27	27	7,9	7,8	30	30
	22	27	26,5	7,6	7,7	30	30
	23	26	26	7,7	7,6	31	30
	24	26	26	7,7	7,6	32	32
	25	26	26,5	7,7	7,6	32	33
	26	25	25,5	7,5	7,5	33	32
	27	25	25,5	7,6	7,6	32	32
	28	25	25,5	7,3	7,4	32	32
	29	25	25,5	7,2	7,1	30	30
	30	25,5	26	6,8	7,2	31	30
31	25	25,5	7,6	7,6	32	32	
RATA-RATA		26	26,21	7,58	7,58	31,06	30,88

Data Kualitas Air Bulan Januari

BULAN	HARI	PARAMETER KUALITAS AIR					
		SUHU (°C)		pH		SALINITAS	
		PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE
JANUARI	1	26	26	6,2	6,3	32	32
	2	26,5	26,5	6,4	6,3	33	33
	3	28	26	6,8	6,3	32	32
	4	26,5	26,5	6,6	6,5	32	32
	5	26,5	26,5	6,6	6,5	32	32
	6	27	27	5,7	5,5	32,5	32
	7	27,5	27,5	5,7	6	32	32
	8	26,5	26,5	5,7	6,3	31	32
	9	27	27	5,5	5	33	32
	10	27	27	5,9	5,9	32	32
	11	27	27,5	5	4,8	32	33
	12	27,5	27,5	5,3	5,4	34	32
	13	27	27,5	5	5,1	33	33
	14	27,5	27,5	5,5	5,1	31	32
	15	27,5	27,5	5,7	5,9	31	31
	16	27,5	27,5	5,5	5,6	31	32
	17	27,5	28	5,8	5,8	32	30
	18	27,5	27	5,3	5,7	32	31
	19	26	27	5	5,3	31	30
	20	26	26	5,5	5,8	31	31
	21	26	26	6,2	5,3	33	32
	22	25	26	6,5	6,3	31	31
	23	26	26	6,3	6,1	32	32
	24	26	26	6	6,1	30	30
	25	26	26	6,3	6,1	32	32
	26	27	25,5	5,3	5,2	31	33
	27	25	25	5	5,1	32	32
	28	26	25,5	5,1	6	32	33
	29	26	25,5	5,9	6,5	30	32
	30	25,5	25,5	5,8	5,9	30	30
	31	25,5	25,5	6,4	6,1	30	30
RATA-RATA		26,33	26,4	5,2	5,67	31,67	31,71

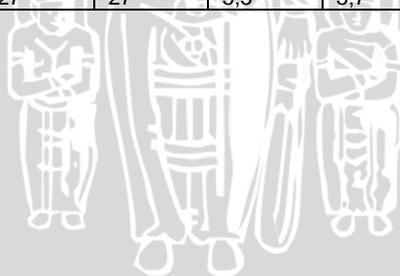
Data Kualitas Air Bulan Februari

BULAN	HARI	PARAMETER KUALITAS AIR					
		SUHU (°C)		pH		SALINITAS	
		PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE
FEBRUARI	1	25,5	25,5	6,1	6,3	30	31
	2	26	26,5	6,4	6,3	31	33
	3	27	26	6,8	6,3	32	32
	4	26	26,5	6,5	6,5	32	32
	5	26	26,5	6,7	5,7	29	30
	6	26	26	6,3	6,2	30	31
	7	27,5	27,5	5,7	6	32	32
	8	26	26,5	7	5,9	30	30
	9	26	27	6,3	5	31	32
	10	26	26	6,7	6,1	29	29
	11	26	26	6,6	6,4	29	30
	12	26,5	26,5	6,2	6	32	30
	13	26,5	26	6,4	6,1	29	31
	14	26	26	5,8	6,3	31	31
	15	26	26	5,7	5,7	30	30
	16	26	26	5,7	5,8	30	33
	17	26,5	26	6,2	5,8	32	30
	18	26,5	26,5	5,8	6,8	30	30
	19	26	26,5	5,7	7	30	30
	20	25	26,5	6,4	7,2	30	30
	21	26	26	7,2	6,9	30	30
	22	26	26,5	6,9	6,8	30	30
	23	26,5	27	6,5	5,6	31	29
	24	27	27	5,7	5,9	30	30
	25	26,5	26	6,8	6,7	31	31,5
	26	26,5	27	6,7	6,1	30	31
	27	27	26,5	6,3	6,1	32	32
	28	27,5	26,5	6,7	6,7	31	30
RATA-RATA		26,11	26,27	7	6	30,5	30,7



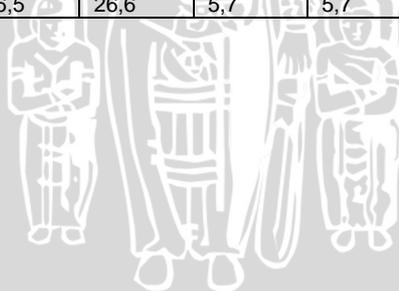
Data Kualitas Air Bulan Maret

BULAN	HARI	PARAMETER KUALITAS AIR					
		SUHU (°C)		pH		SALINITAS	
		PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE
MARET	1	27	27	6,0	5,2	30	29
	2	28	27	6,1	6,0	30	30
	3	28	27	6,6	5,6	30	30
	4	26,5	27	5,2	6,0	31	31
	5	26,5	27	5,5	6,0	31	31
	6	27	27,5	5,4	5,3	30	31
	7	27	27,5	5,2	5,3	31	31
	8	27,5	27,5	5,5	5,3	31	31
	9	27	27	5,5	5	33	32
	10	26,5	28	5,6	5,1	30	32
	11	26,5	27,5	6,0	6,0	32	31
	12	28	27	5,4	6,8	32	31
	13	27	27	6,6	6,0	31	31
	14	28	27	6,0	6,0	32	34
	15	27	27	5,4	5,2	32	34
	16	27,5	27,5	5,5	5,6	31	32
	17	28	28	5,8	5,8	32	34
	18	27	27	5,3	5,2	34	35
	19	27,5	27	5,2	5,2	35	35
	20	26	26	5,5	5,8	33	33
	21	26	26	5,2	5,3	33	32
	22	25	26	5,5	5,3	31	31
	23	28	28	5,2	5,3	33	32
	24	28	28	5,4	5,1	31	31
	25	27	27,5	5,3	5,1	32	32
	26	28	28	5,3	5,2	34	33
	27	27	27	5,4	5,3	32	32
	28	27	27	5,1	5,4	32	33
	29	28	27	5,3	5,2	32	33
	30	27	28	5,2	5,3	33	30
	31	27,5	27	5,4	5,7	30	31
	RATA-RATA	27	27	5,5	5,7	33	31



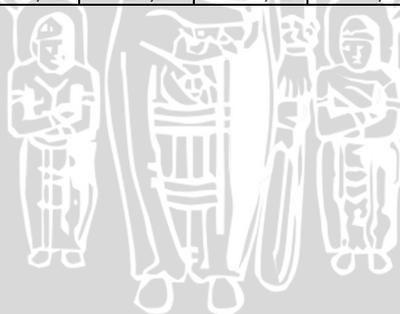
Data Kualitas Air Bulan April

BULAN	HARI	PARAMETER KUALITAS AIR					
		SUHU (°C)		pH		SALINITAS	
		PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE
APRIL	1	26	26	5,5	5,8	33	33
	2	26	26	5,2	5,3	33	32
	3	25	26	5,5	5,3	31	31
	4	28	28	5,2	5,3	33	32
	5	28	28	5,4	5,1	31	31
	6	27	27,5	5,3	5,1	32	32
	7	28	28	5,3	5,2	34	33
	8	27	27	5,4	5,3	32	32
	9	27	27	5,1	5,4	32	33
	10	28	27	5,3	5,2	32	33
	11	27,5	27,5	5,7	5,9	31	31
	12	27,5	27,5	5,5	5,6	31	32
	13	27,5	28	5,8	5,8	32	30
	14	25,5	25,5	5,8	5,9	30	30
	15	25,5	25,5	5,9	5,8	30	30
	16	26	26,5	5,5	5,5	31	31
	17	24	25	5,0	5,2	30	30
	18	25,5	25	5,0	5,1	30	30
	19	26,5	26,5	5,2	5,0	30	30
	20	27	26,5	5,5	5,5	31	31
	21	26	26	5,4	5,4	31	31
	22	26	26,5	5,7	5,8	31	31
	23	26,5	27	6,0	5,9	31	31
	24	26	26	6,0	6,2	31	31
	25	26,5	26	6,1	6,0	31	31
	26	26,5	26	6,2	6,1	30	31
	27	27	26,5	6,3	6,5	31	31
	28	26	26,5	6,7	6,6	31	30
	29	26	26	6,6	6,4	30	30
	30	26	27	6,7	6,8	29,5	30
RATA-RATA		26,5	26,6	5,7	5,7	31	31



Data Kualitas Air Bulan Mei

BULAN	HARI	PARAMETER KUALITAS AIR					
		SUHU (°C)		pH		SALINITAS	
		PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE
Mei	1	26,5	26	6,62	6,7	30	30
	2	26	26,5	6,6	6,61	30	30
	3	26,5	26	6,7	6,6	30	30
	4	26	26,5	6,7	6,78	30	30
	5	26	26	6,64	6,5	30	30
	6	26,5	26	6,7	6,9	30	30
	7	26	26,5	6,00	6,02	30	30
	8	26,5	26	6,04	6,02	30	30
	9	26,5	26,5	5,7	6,2	30	30
	10	26	26,5	6,00	6,02	30	30
	11	26,5	26	5,9	6,00	30	30
	12	26,5	26	6,04	6,02	30	30
	13	26	26	6,00	6,02	30	30
	14	26,5	26,5	5,7	6,2	30	29
	15	26	26,5	5,8	6,01	30	30
	16	26,5	26	5,55	5,6	30	30
	17	26	26	6,00	6,02	30	30
	18	26,5	26	6,01	6,03	30	30
	19	26	26,5	6,02	6,03	30	30
	20	27	27	5,5	5,6	29	30
	21	26	26	5,4	5,46	29	30
	22	26,5	26	5,21	5,1	29	30
	23	26	26	5,4	5,46	29	30
	24	26,5	27	5,21	5,4	30	30
	25	27	26,5	5,14	5,3	30	30
	26	26,5	26	6,3	6,3	30	30
	27	26,5	26	6,3	6,2	30	30
	28	27	27	6,4	6,5	30	30
	29	26	26,5	6,3	6,35	30	30
	30	26	27	6,3	6,4	30	30
	31	26	26	6,3	6,35	30	30
RATA-RATA		26,32	26,29	6,02	6,09	29,87	29,97



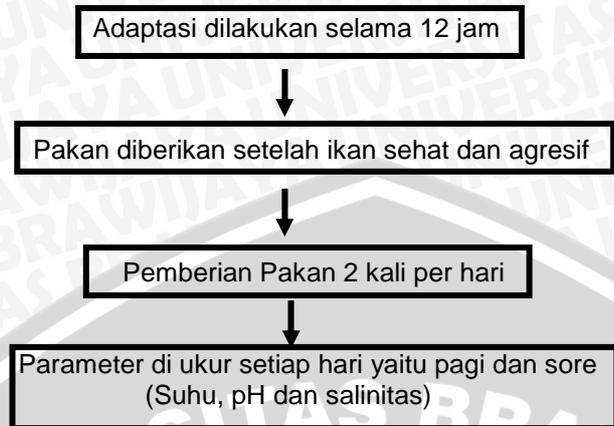
Data Kualitas Air Bulan Juni

BULAN	HARI	PARAMETER KUALITAS AIR					
		SUHU (°C)		pH		SALINITAS	
		PAGI	SORE	PAGI	SORE	PAGI	SORE
Juni	1	26,5	26	6,75	6,3	31	30
	2	27	26,5	6,25	6,3	31	30
	3	27	26	6,24	6,44	31	30
	4	26	26,5	6,5	6,4	30	31
	5	28	27	6,5	6,4	31	31
	6	27	26,5	6,5	6,3	30	31
	7	28	27	6,35	6,4	30	30
	8	26	27	6,43	6,5	31	31
	9	27	27	5,54	5,4	31	31
	10	26	27	5,54	5,4	31	31
	11	26	27	5,6	5,9	31	31
	12	27	27	6,00	6,2	30	30
	13	27	27	6,00	6,10	30	30
	14	27	27	6,00	6,2	30	30
	15	26	26,5	6,01	6,1	30	30
	16	26	26,5	6,2	6,3	30	30
	17	27	26,5	6,01	5,9	30	30
	18	26	26,5	5,5	5,6	31	31
	19	27	26	5,5	5,5	31	31
	20	26	26,5	5,5	5,6	31	31
	21	26	26,5	5,4	5,5	31	31
	22	26	25	5,00	5,7	31	30
	23	27	26	5,5	5,5	31	31
	24	26	26	5,5	5,5	30	31
	25	26,5	26	5,5	5,6	30	31
	26	27	26	5,5	5,5	30	30
	27	26	27	5,5	5,6	31	31
	28	27	27	5,6	5,5	30	31
	29	26	26,5	5,5	5,5	30	30
	30	27	27	5,6	5,7	31	31
RATA-RATA		26,6	26,53	5,85	5,89	30,53	30,57

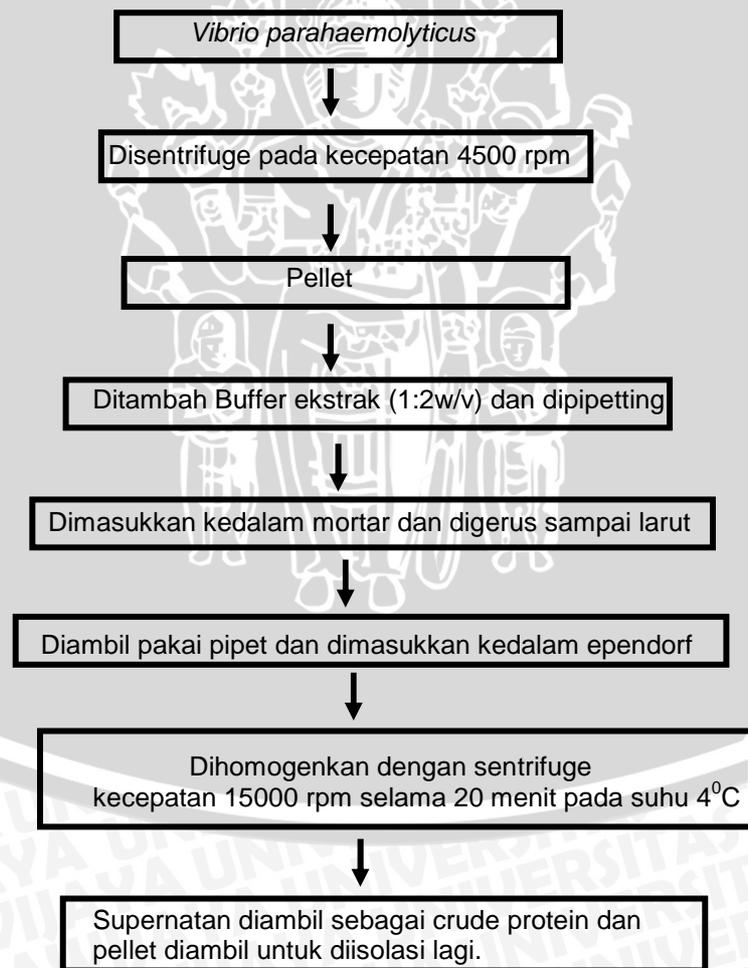


LAMPIRAN 5. Prosedur Penelitian

1. Aklimatisasi ikan



2. Isolasi Crude Protein *Vibrio parahaemolyticus*

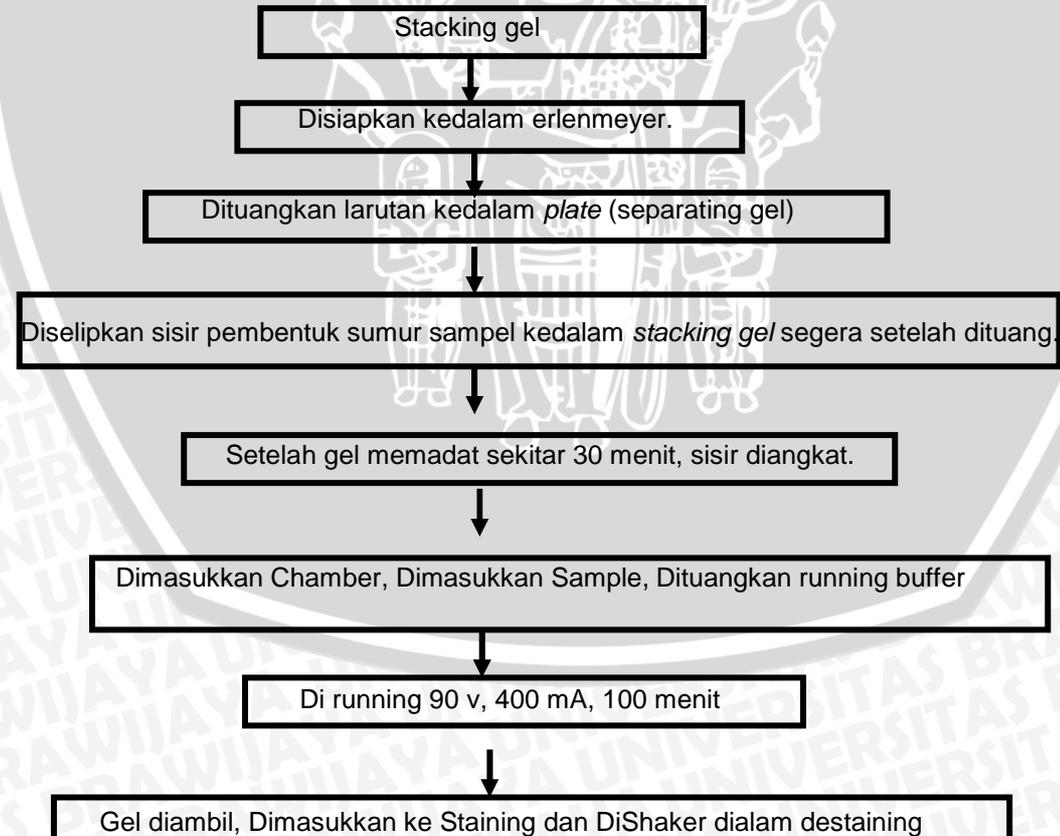


3. Fraksinasi Protein Dengan Sodium Dedosil Sulfate Polyacrilamid Gel Elektrophoresis (SDS-Page)

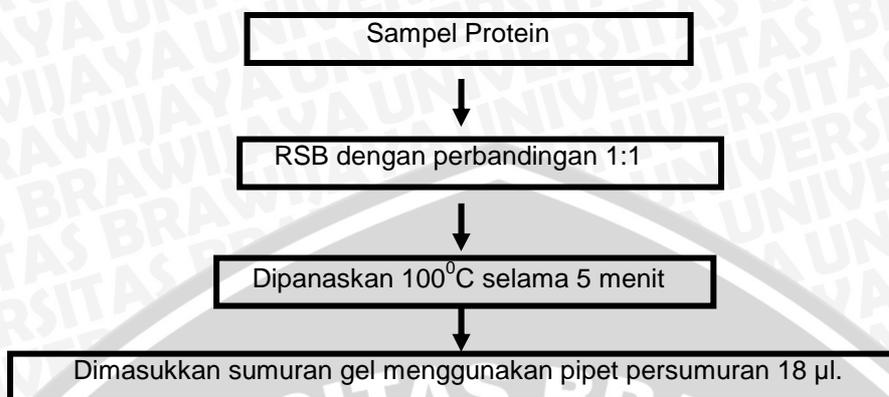
Membuat Separating Gel



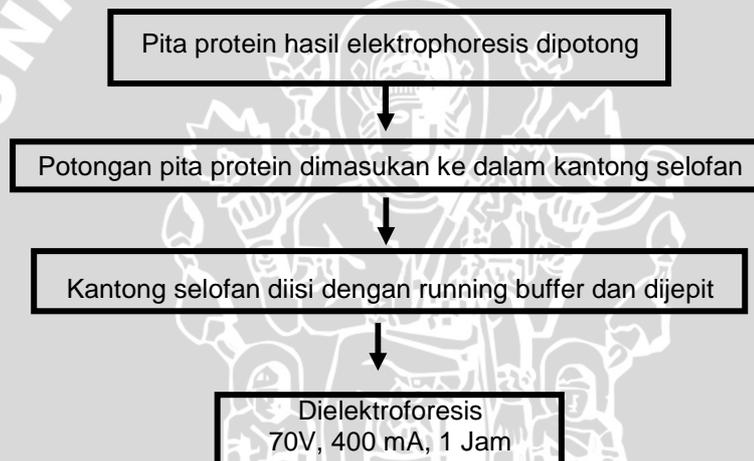
Membuat Stacking Gel



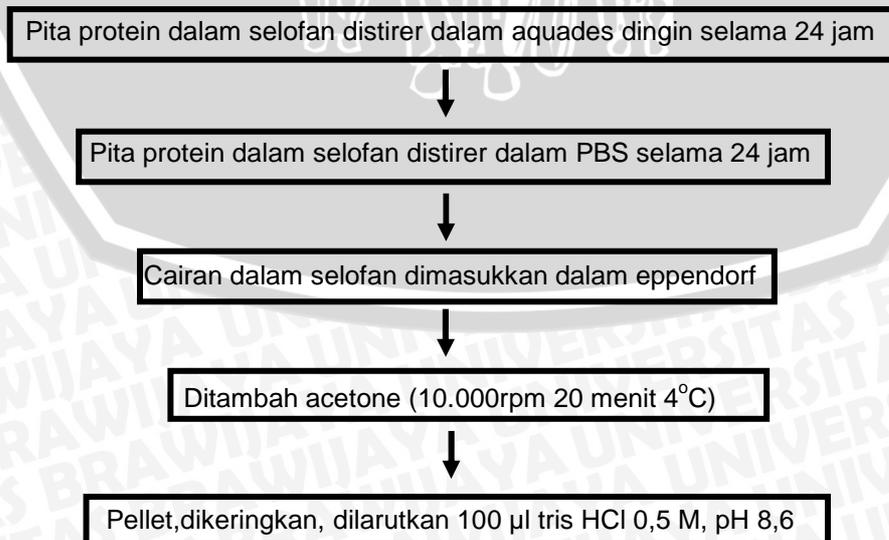
Pembuatan Sampel



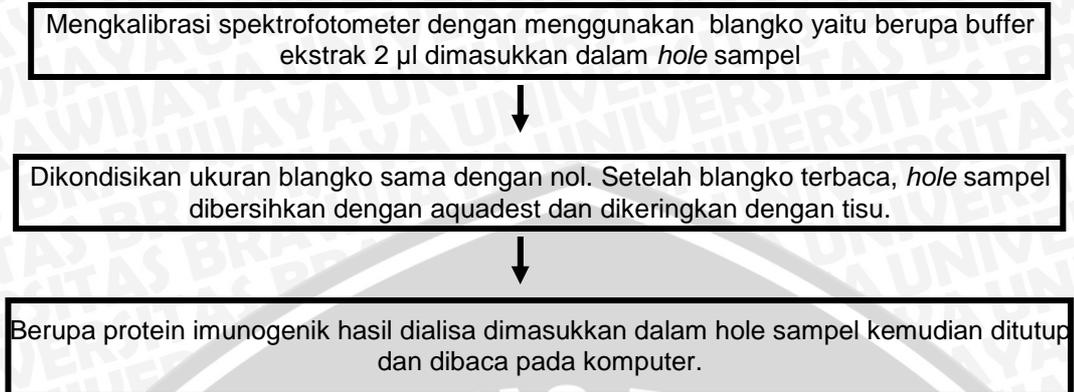
4. Elektroelusi



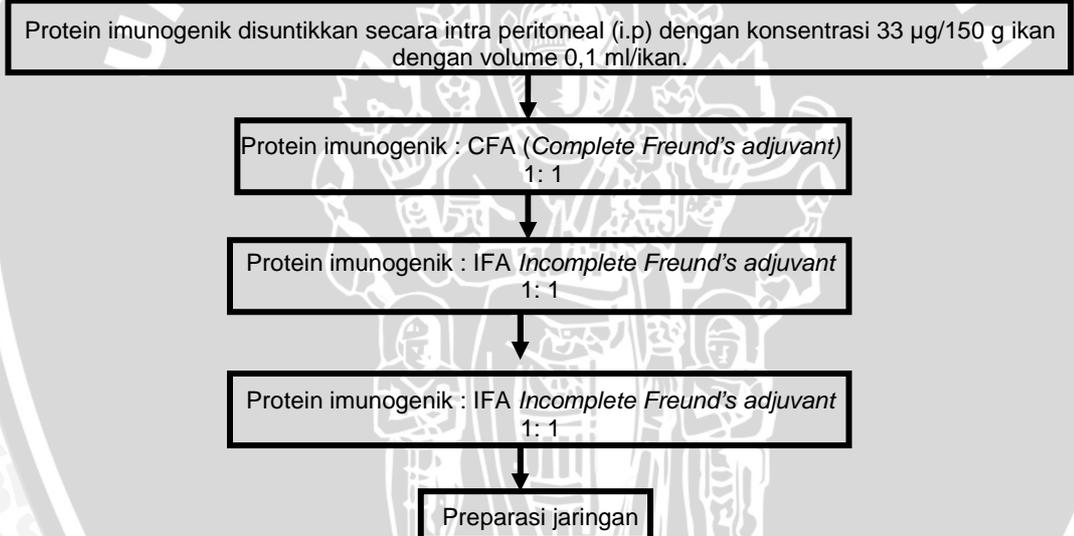
5. Dialisa



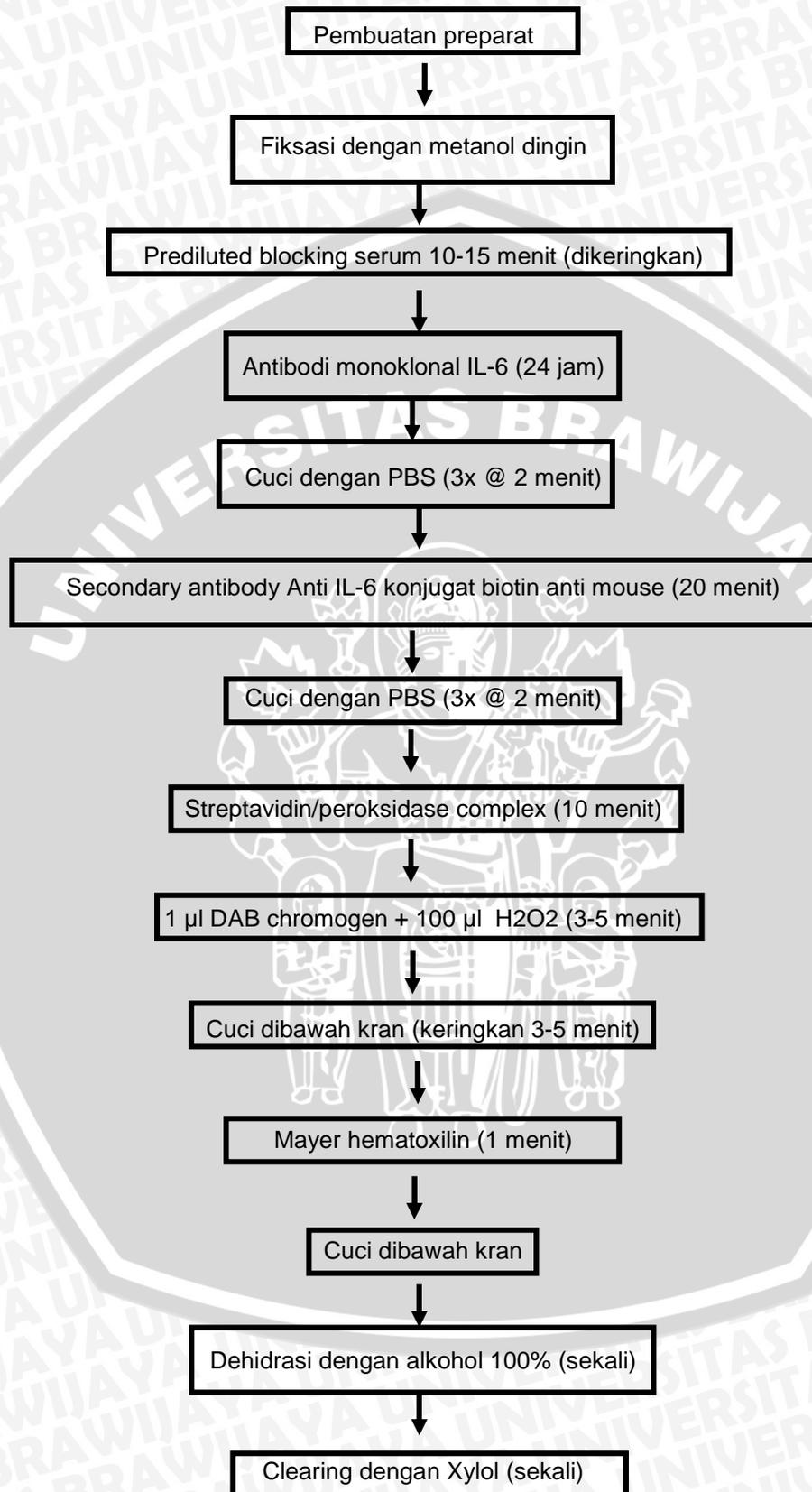
6. Spektrofotometer Nanodrop



7. Uji klinis protein imunogenik *Vibrio parahaemolyticus* pada ikan kerapu tikus



8. Imunohistokimia



Lanjutan lampiran 8

Tetesi dengan entelan



Tutup dengan cover slip



Periksa dimikroskop

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

