

repository.ub.ac

**KARAKTERISASI ADESI PROTEIN PILI 9,08 kDa *Aeromonas salmonicida***

**TERHADAP SEL EPITEL USUS IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)**

**SKRIPSI**

**MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**BUDIDAYA PERAIRAN**

**OLEH :**

**HENNY PURWITASARI**

**NIM. 0410850041**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2008**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**KARAKTERISASI ADESI PROTEIN PILI 9,08 kDa *Aeromonas salmonicida*  
TERHADAP SEL EPITEL USUS IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)**

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

Oleh :

**HENNY PURWITASARI**

**NIM. 0410850041**

**DOSEN PENGUJI I**

**(Prof. Ir. MARSOEDI, Ph.D)**  
NIP. 130 368 776  
TANGGAL :

**DOSEN PENGUJI II**

**(Ir. M. RASYID FADHOLI, MS)**  
NIP. 130 819 394  
TANGGAL :

**DOSEN PEMBIMBING I**

**(Dr. Ir. MAFTUCH, MSi)**  
NIP. 131 994 338  
TANGGAL :

**DOSEN PEMBIMBING II**

**(Ir. ELLANA SANOESI, MSi)**  
NIP. 131 206 307  
TANGGAL :

**MENGETAHUI,  
KETUA JURUSAN**

**(Ir. MAHENO SRI WIDODO, MS)**  
NIP. 131 471 522  
TANGGAL :



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS PERIKANAN & ILMU KELAUTAN**

Jl. Mayjen Haryono 161 Tlp. 551611 Pes. 216, Fax. 0341-553512 Malang 65145

**DAFTAR REVISI  
LAPORAN SKRIPSI**

**Nama : HENNY PURWITASARI**

**NIM : 0410850041**

**Prodi : BUDIDAYA PERAIRAN**

**Judul : KARAKTERISASI ADESI PROTEIN PILI 9,08 kDa *Aeromonas salmonicida*  
TERHADAP SEL EPITEL USUS IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)**

**Tanggal Ujian : 25 SEPTEMBER 2008**

Bab	Hal.	Sebelum Revisi	Sesudah Revisi	Keterangan
Ringkasan	iii	<i>Cyprinus Carpio</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Sudah diperbaiki
	iii	$Y = -0,1199 x^3 + 1,7631 x^2 - 11,025 x + 39,9193$	$y = -0,1199 x^3 + 1,7631 x^2 - 11,025 x + 39,9193$	Sudah diperbaiki
Daftar gambar	viii	Gambaran organel gram negatif	Gambaran organel bakteri gram negatif	Sudah diperbaiki
	viii	Sel enterosit ikan mas normal	Gambaran sel enterosit ikan mas normal	Sudah diperbaiki
	viii	Adesi <i>A. salmonicida</i> pada enterosit ikan mas	Gambaran adesi <i>A. salmonicida</i> pada enterosit ikan mas	Sudah diperbaiki
Daftar lampiran	ix	Data perhitungan indeks adesi	Data dan perhitungan indeks adesi	Sudah diperbaiki
Bab 1	4	Bagaimana mekanisme perlekatan...	Bagaimana pola perlekatan ....	Sudah diperbaiki
	4	...protein adesi pada perlekatan...	...protein adesi yang mampu menghambat perlekatan...	Sudah diperbaiki
	5	Tujuan penelitian belum disesuaikan rumusan masalah	Tujuan penelitian sudah disesuaikan rumusan masalah	Sudah diperbaiki
	6	...9,08 kDa tidak sebagai protein adesi pada perlekatan...	...9,08 kDa bukan merupakan protein adesi yang mampu menghambat pelekatan...	Sudah diperbaiki
Bab 2	10	melempuh	melepuh	Sudah diperbaiki
	12	<i>Salmo trutta</i>	<i>Salmo trutta</i>	Sudah diperbaiki
	28	Menurut Evans, Evans Jr., Mouldes dan Foriestier (1988)	Menurut Evans, Evans Jr., Mouldes dan Graham (1988)	Sudah diperbaiki

Bab 3	35	Nagayama (1995)	Nagayama, Oguchi, Arita dan Honda (1995)	Sudah diperbaiki
	36	Favre-Bonte (1995)	Favre-Bonte, Darfeuille-Michaud dan Foriestier (1995)	Sudah diperbaiki
Bab 4	49	Wizzeman (1999)	Wizzeman <i>et al.</i> (1999)	Sudah diperbaiki
	51	$Y = -0,1199 x^3 + 1,7631 x^2 - 11,025 x + 39,9193.$	$y = -0,1199 x^3 + 1,7631 x^2 - 11,025 x + 39,9193.$	Sudah diperbaiki
Daftar pustaka	54	Freeman B. A., Burrows. 1985	Freeman B. A., and Burrows. 1985	Sudah diperbaiki
	55	Leeson, C. Roland, Thomas S.L., dan Anthony A. P. 1995	Leeson, C. R., S.L. Thomas, dan A. P. Anthony. 1995	Sudah diperbaiki
	55	Livingstone C. 1989	Livingstone, C. 1989	Sudah diperbaiki
	56	Mc. Garey D. J. and Alred D. R., 1994	Mc. Garey D. J. and D. R. Alred. 1994	Sudah diperbaiki
	57	Sukoso, dan Yanuhar, U. 2006	Sukoso, dan U. Yanuhar. 2006	Sudah diperbaiki
	57	Tandya, Sugiharta. 2006	Tandya, S. 2006	Sudah diperbaiki
Lampiran	61	Lampiran 2. Lanjutan	Lampiran 2. (Lanjutan)	Sudah diperbaiki
	63	Lampiran 3. Lanjutan	Lampiran 3. (Lanjutan)	Sudah diperbaiki
	66,67	Lampiran 5. Lanjutan	Lampiran 5. (Lanjutan)	Sudah diperbaiki
	68	Data Perhitungan Indeks Adesi	Data dan Perhitungan Indeks Adesi	Sudah diperbaiki
	69,70	Lampiran 6. Lanjutan	Lampiran 6. (Lanjutan)	Sudah diperbaiki

**DOSEN PENGUJI I**

**(Prof. Ir. MARSOEDI, Ph.D)**  
NIP. 130 368 776

**DOSEN PENGUJI II**

**(Ir. M. RASYID FADHOLI, MS)**  
NIP. 130 819 394

Menyetujui,

**DOSEN PEMBIMBING I**

**(Dr. Ir. MAFTUCH, MSi)**  
NIP. 131 994 338

**DOSEN PEMBIMBING II**

**(Ir. ELLANA SANOESI, MSi)**  
NIP. 131 206 307

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang dengan rahmat dan hidayah-Nya penulisan laporan Skripsi yang berjudul “Karakterisasi Adesi Protein Pili 9,08 kDa *Aeromonas salmonicida* Terhadap Sel Epitel Usus Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)” dapat terselesaikan dengan baik. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Atas terselesaikannya laporan ini penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada:

1. Bapak Dr. Ir. Maftuch, MSi, selaku Dosen Pembimbing I.
2. Ibu Ir. Ellana Sanoesi, MSi, selaku Dosen Pembimbing II.
3. Bapak Prof. Ir. Marsoedi, Ph.D, selaku Dosen Penguji I.
4. Bapak Ir. M. Rasyid Fadholi, MS, selaku Dosen Penguji II.
5. Semua pihak yang telah membantu dan mendorong penulis dalam penyelesaian laporan ini.

Disadari bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna dan banyak kekurangannya, maka penulis mengharapkan kritik maupun saran yang bersifat membangun guna lebih sempurnanya penulisan laporan ini. Selanjutnya harapan penulis semoga dengan tersusunnya laporan ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca pada umumnya.

Malang, Oktober 2008

Penulis

## RINGKASAN

**HENNY PURWITASARI.** Skripsi tentang Karakterisasi Adesi Protein Pili 9,08 kDa *Aeromonas salmonicida* Terhadap Sel Epitel Usus Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) (Di bawah bimbingan **Dr. Ir Maftuch, MSi** dan **Ir. Ellana Sanoesi, MSi**).

---

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

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan apakah protein hemaglutinin pili *Aeromonas salmonicida* BM 9,08 kDa berfungsi sebagai protein adesi pada perlekatan *A. salmonicida* terhadap reseptor sel epitel usus ikan mas.

Kegunaan penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang protein hemaglutinin pili *A. salmonicida* sebagai protein adesi yang bisa menambah penjelasan tentang patogenisitas dari pili bakteri *A. salmonicida* dan diharapkan sebagai bahan untuk pengembangan vaksin.

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen, yaitu suatu metode mengadakan kegiatan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Tujuan eksperimen adalah untuk menemukan hubungan sebab dan akibat antara variabel. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol. Perlakuan dimulai dari isolasi enterosit ikan mas, preparasi sel bakteri, uji adesi dan hambat adesi.

Penelitian diawali dengan isolasi sel enterosit yang memperlihatkan struktur bulat dengan ukuran sekitar 4 – 10  $\mu\text{m}$ . Hasil uji adesi menunjukkan adanya perlekatan bakteri pada enterosit. Dengan pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa pola adesi *A. salmonicida* terhadap sel epitel ikan mas adalah adanya pola adesi yang lokal pada permukaan sel epitel dan pola diffuse atau menyebar pada semua membran sel epitel. Berdasarkan hasil uji hambat adesi dilakukan pengenceran dosis penyalut antigen sebanyak 8 perlakuan konsentrasi diantaranya: 0 (kontrol), 1,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$ ,  $\frac{1}{64}$  dengan pengulangan masing-masing 3 kali. Hasil perhitungan indeks adesi menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi protein hemaglutinin yang diberikan akan menurunkan indeks adesi. Hal ini dibuktikan dengan dosis pengenceran protein hemaglutinin pili 9,08 kDa *A. salmonicida* terakhir yaitu pengenceran  $\frac{1}{64}$  menunjukkan gambaran perlekatan *A. salmonicida* pada enterosit semakin banyak. Hasil analisa regresi antara indeks adesi dengan berbagai dosis pengenceran protein hemaglutinin pili BM 9,08 kDa *A. salmonicida* menunjukkan bahwa nilai regresi  $R^2 = 0,993$  dengan persamaan  $y = -0,1199 x^3 + 1,7631 x^2 - 11,025 x + 39,9193$ .

Penelitian ini memberikan kesimpulan, bahwa protein hemaglutinin pili 9,08 kDa *A. salmonicida* merupakan protein adesi pili (AdhF 9,08 kDa) yang merupakan faktor virulensi yang mampu melekatkan bakteri *A. salmonicida* terhadap sel hospes. Sebagai tindak lanjut dari hasil penelitian ini, disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan untuk membuktikan bahwa protein AdhF 9,08 kDa *A. salmonicida* merupakan protein imunogenik. Sehingga dapat menambah penjelasan tentang patogenisitas dari *A. salmonicida* dan dapat digunakan sebagai bahan pengembangan vaksin.

**DAFTAR ISI**

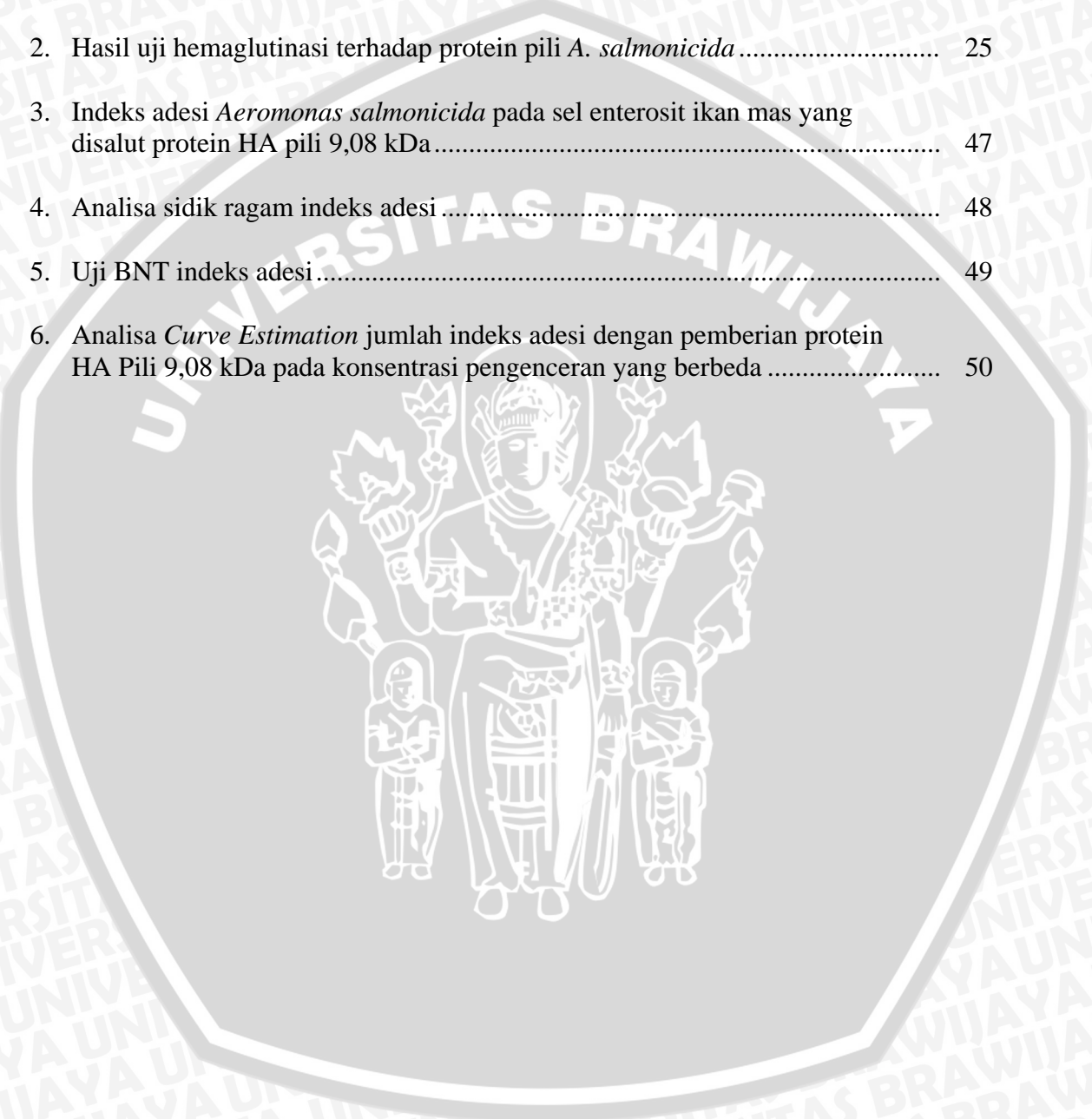
	Halaman
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Kegunaan Penelitian .....	5
1.5 Hipotesis.....	6
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian .....	6
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>7</b>
2.1 Ikan Mas ( <i>Cyprinus carpio</i> L.) .....	7
2.1.1 Klasifikasi .....	7
2.1.2 Morfologi .....	7
2.1.3 Habitat dan Penyebarannya.....	8
2.1.4 Penyakit.....	9
2.1.5 Sel Epitel Usus .....	10
2.2 <i>Aeromonas salmonicida</i> .....	10
2.2.1 Klasifikasi .....	10
2.2.2 Morfologi .....	11
2.2.3 Daerah Penyebarannya.....	12
2.2.4 Patogenitas .....	12
2.2.5 Faktor Virulensi .....	14

2.3 Pili .....	16
2.4 Protein Hemaglutinin .....	19
2.5 Molekul Adesi Bakteri .....	26
2.6 Mekanisme Perlekatan (Adesi) Bakteri .....	29
<b>3. MATERI DAN METODE PENELITIAN .....</b>	<b>31</b>
3.1 Materi Penelitian .....	31
3.1.1 Hewan Uji .....	31
3.1.2 Bakteri <i>A. salmonicida</i> .....	31
3.1.3 Peralatan Penelitian .....	31
3.1.4 Bahan Penelitian .....	32
3.2 Metode Penelitian .....	33
3.3 Rancangan Percobaan .....	33
3.4 Prosedur Penelitian .....	34
3.4.1 Persiapan Penelitian .....	34
3.4.2 Pelaksanaan Penelitian .....	35
3.5 Parameter Penelitian .....	38
3.6 Analisa Data .....	38
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>39</b>
4.1 Gambaran Sel Enterosit .....	39
4.2 Indeks Adesi .....	47
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>53</b>
5.1 Kesimpulan .....	53
5.2 Saran .....	53
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>54</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>59</b>



**DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
1. Hasil uji hemaglutinasi terhadap <i>Whole Cell A. salmonicida</i> .....	22
2. Hasil uji hemaglutinasi terhadap protein pili <i>A. salmonicida</i> .....	25
3. Indeks adesi <i>Aeromonas salmonicida</i> pada sel enterosit ikan mas yang disalut protein HA pili 9,08 kDa .....	47
4. Analisa sidik ragam indeks adesi .....	48
5. Uji BNT indeks adesi .....	49
6. Analisa <i>Curve Estimation</i> jumlah indeks adesi dengan pemberian protein HA Pili 9,08 kDa pada konsentrasi pengenceran yang berbeda .....	50

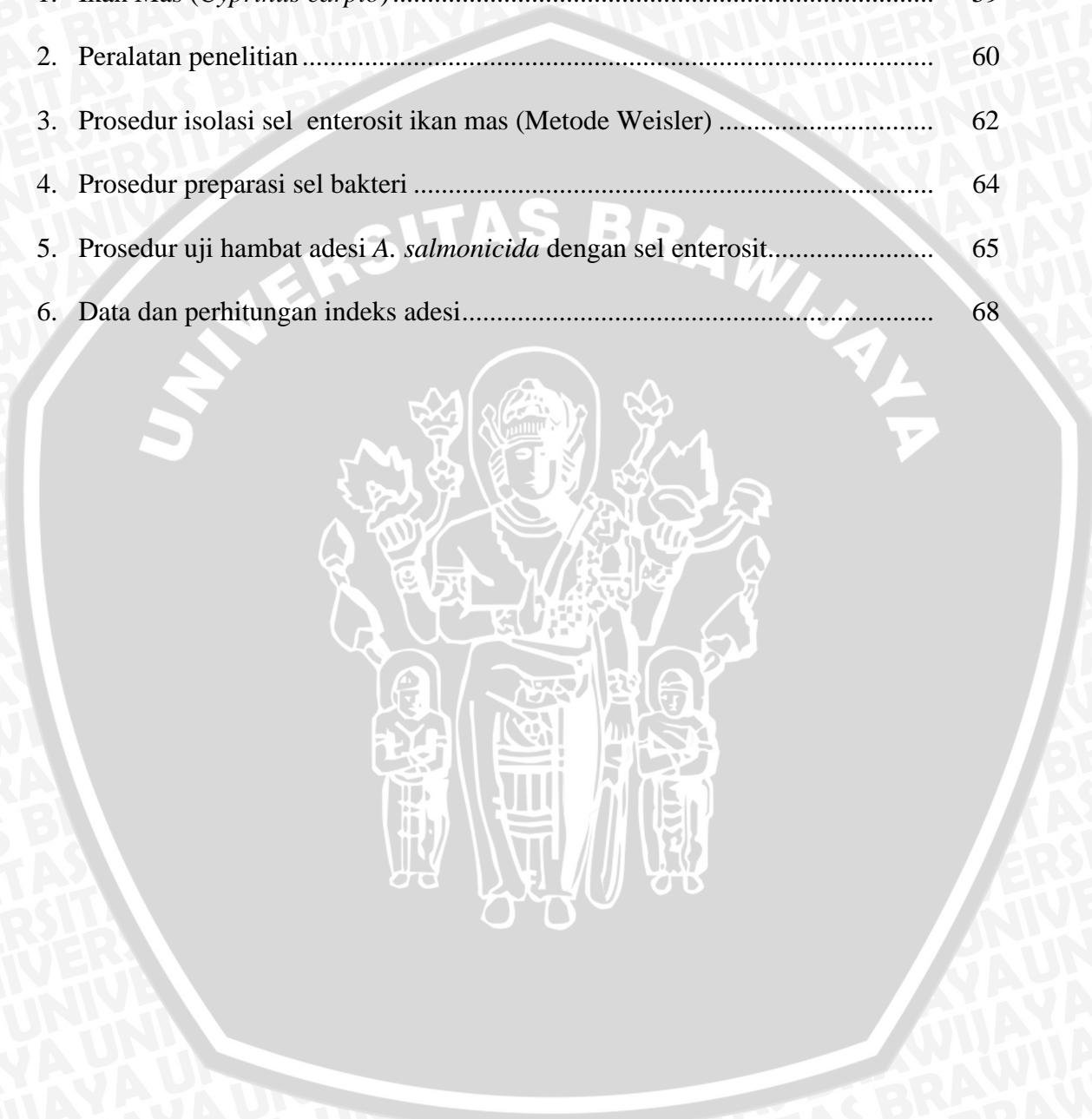


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....	12
2. Gambaran organel bakteri gram negatif.....	14
3. Perlekatan pili pada sel epitel.....	15
4. Struktur pili .....	17
5. Hasil uji hemaglutinasi terhadap <i>Whole Cell A. salmonicida</i> .....	22
6. Hasil elektroforesis dari pili <i>A. salmonicida</i> .....	23
7. Hasil uji hemaglutinasi terhadap protein pili <i>A. salmonicida</i> .....	25
8. Faktor perlekatan bakteri.....	27
9. Mekanisme perlekatan bakteri .....	29
10. Histologi jaringan usus ikan mas .....	39
11. Gambaran sel enterosit ikan mas normal .....	40
12. Gambaran adesi <i>A. salmonicida</i> pada enterosit ikan mas .....	41
13. Hasil uji hambat adesi sel enterosit ikan mas dan protein hemaglutinin pili 9,08 kDa <i>A. salmonicida</i> dengan konsentrasi 1 .....	42
14. Hasil uji hambat adesi sel enterosit ikan mas dan protein hemaglutinin pili 9,08 kDa <i>A. salmonicida</i> dengan konsentrasi pengenceran 1:2 dan 1: 4 .....	43
15. Hasil uji hambat adesi sel enterosit ikan mas dan protein hemaglutinin pili 9,08 kDa <i>A. salmonicida</i> dengan konsentrasi pengenceran 1:8 dan 1: 16 .....	44
16. Hasil uji hambat adesi sel enterosit ikan mas dan protein hemaglutinin pili 9,08 kDa <i>A. salmonicida</i> dengan konsentrasi pengenceran 1:16 dan 1: 32 .....	45
17. Hasil analisa regresi antara indeks adesi dengan berbagai dosis pengenceran protein hemaglutinin pili BM 9,08 kDa <i>A. salmonicida</i> .....	51

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Ikan Mas ( <i>Cyprinus carpio</i> ).....	59
2. Peralatan penelitian.....	60
3. Prosedur isolasi sel enterosit ikan mas (Metode Weisler) .....	62
4. Prosedur preparasi sel bakteri .....	64
5. Prosedur uji hambat adesi <i>A. salmonicida</i> dengan sel enterosit.....	65
6. Data dan perhitungan indeks adesi.....	68



# 1. PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Kendala utama dalam usaha budidaya ikan adalah terserangnya penyakit. Timbulnya penyakit dalam tubuh ikan merupakan suatu hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, lingkungan dan patogen. Selain itu timbulnya penyakit juga dipengaruhi oleh kondisi ikan dan cara penyerangan dari organisme penyebab penyakit. Penyakit ikan dapat disebabkan oleh virus, bakteri, parasit atau zat-zat kimia pencemar yang mengganggu proses metabolisme di dalam tubuh ikan. Beberapa jenis penyakit yang menyerang, penyakit bakterial merupakan penyakit yang banyak menyebabkan kegagalan panen (Prajitno, 2007).

Salah satu penyakit bakterial yang menyerang ikan mas (*Cyprinus carpio*) adalah bakteri *Aeromonas salmonicida*. Serangan penyakit ini mempunyai dampak negatif yang segera dapat dirasakan, seperti misalnya kerugian ekonomi yang tinggi. Pada akhir tahun 1980, di Indonesia terjadi kematian sebanyak 125 ribu ekor ikan mas dan 30 % induk ikan pada daerah budidaya di Jawa Barat. Kejadian ini disebabkan oleh serangan bakteri *Aeromonas* spp. antara lain *A. salmonicida* yang mengakibatkan penurunan produksi dan kerugian kira-kira 4 milyar rupiah (Anonymous, 2007<sup>a</sup>).

*A. salmonicida* merupakan bakteri gram negatif, tidak bergerak, tidak membentuk spora maupun kapsul, bersifat aerob dan menyebabkan terjadinya furunculosis pada ikan yaitu pembengkakan di bawah kulit yang biasanya menjadi infeksi sistemik pada seluruh tubuh ikan (Anonymous, 2007<sup>a</sup>).

*A. salmonicida* masuk dalam daftar Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK) Golongan II dalam SK Menteri Kelautan dan Perikanan No: KEP. 17/MEN/2006 yang belum ada upaya pencegahannya (Laminem, 2007). Upaya pencegahan dapat dilakukan melalui karantina, vaksinasi dan desinfeksi (Prajitno, 2007).

Bahan pengendali yang tidak merusak lingkungan dan sering digunakan di bidang perikanan adalah vaksin, probiotik dan bahan aktif lainnya (Austin, 2004; Elis, 1988 *dalam* Maftuch, 2006<sup>a</sup>). Vaksin dapat dibuat dari bakteri yang dilemahkan atau toksin bakteri, atau dari bahan antigen yang merupakan faktor virulensi bakteri (Anderson, 1974; Naim, 1996 *dalam* Maftuch, 2006<sup>a</sup>).

Infeksi mikroorganisme melibatkan beberapa tahap, yaitu diawali dengan perlekatan protein atau adesi pada permukaan inang yang dapat diikuti dengan masuknya bakteri ke dalam sel host, diikuti oleh tahap invasi dan penyebaran lokal atau sistemik dalam tubuh inang (multiplikasi). Tahap terakhir adalah pengeluaran dari tubuh inang. Mulai dari tahap perlekatan hingga tahap pengrusakkan inang, mikroorganisme menggunakan faktor virulensi antara lain oleh *pili* yang mengakibatkan mikroba dapat bertahan dalam tubuh inang dan menimbulkan kerusakan (Riani, 2004 *dalam* Yanuhar, Maftuch, Satuman, Sukoso dan Sumarno, 2004).

Pili adalah komponen bakteri yang mempunyai struktur berbentuk batang merupakan tonjolan protein yang keluar dari permukaan bakteri dan dapat berikatan dengan molekul permukaan hospes (Salyers and Whitt, 2002 *dalam* Rahmawati, 2008). Bagian pili yang terletak diujung telah diketahui berfungsi untuk memperantarai perlekatan (adesi) bakteri. Perlekatan ini diperantarai oleh kesesuaian pili dan reseptor sel inang (Schuch dan Muray, 2000 *dalam* Maftuch, Yanuhar, Satuman Sukoso dan Sumarno, 2004).

Pengkajian terhadap sistem infeksi yang perlu dipahami bahwa proses infeksi melibatkan 'ikatan membran' yang diperankan oleh protein *pili* biasanya diikuti kolonisasi invasi pada reseptor sel inang, *Omp* (*Outer membran protein*), dan protein reseptornya. Reseptor inang umumnya adalah residu karbohidrat glikoprotein atau glikolipid. Pengikatan *pili* terhadap target sel inang cukup spesifik, spesifitas ini penting karena ketersediaan reseptor yang cocok seringkali menentukan bagian tubuh yang diinfeksi oleh bakteri (Yanuhar *et al*, 2004).

Adesi bakteri gram negatif, kebanyakan diperankan oleh suatu protein yang mampu mengaglutinasi eritrosit mamalia tertentu yang disebut protein hemaglutinin (HA). Kemampuan mengaglutinasi ini dikaitkan dengan adanya homologi reseptor protein HA pada sel eritrosit dengan reseptor protein adesi pada sel inang mamalia. Beberapa penelitian membuktikan bahwa protein HA bakteri adalah identik dengan protein adesi (Nagayama, 1995 dalam Rahmawati, 2008).

Penelitian pendahuluan didapatkan isolasi protein HA yang berasal dari *pili* bakteri *A. salmonicida* BM 9,08 kDa yang mempunyai titer positif tertinggi sampai pengenceran 1/16. Hal tersebut menunjukkan bahwa protein pada BM 9,08 kDa merupakan protein hemaglutinin, dimana protein pada BM 9,08 kDa dapat menggumpalkan sel darah merah sampai pengenceran tertinggi yaitu 1/16. Penggumpalan sel darah merah ini disebabkan oleh adanya ikatan antara antigen dengan reseptornya (Rahmawati, 2008). Setelah ditemukannya protein hemaglutinin *pili*, maka penelitian dilanjutkan untuk mengetahui apakah protein *pili* BM 9,08 kDa merupakan protein adesi imunogenik yang mampu meningkatkan respon imun pasca imunisasi protein adesi *pili* dan uji tantangan *A. salmonicida*.

Penelitian ini akan mengarah pada karakterisasi protein adesi yang paling virulen dari protein pili *A. salmonicida* pada reseptor sel epitel usus ikan mas guna memberikan informasi tentang manfaat penggunaan molekul adesi dalam pencegahan penyakit bakterial *A. salmonicida*.

## 1.2 Perumusan Masalah

Salah satu cara untuk meningkatkan produktifitas dan mengendalikan penyakit yang disebabkan bakteri *A. salmonicida* pada ikan mas di perairan adalah pembuatan vaksin. Vaksin dapat dibuat dari bakteri yang dilemahkan atau toksin bakteri, atau dari bahan antigen yang merupakan faktor virulensi bakteri (Anderson, 1974; Ellis, 1988 dalam Maftuch, 2006<sup>a</sup>). Salah satu bahan antigen yang dapat digunakan untuk pengembangan vaksin adalah pili. Pili adalah komponen bakteri yang merupakan salah satu faktor virulensi berbasis adesi dan berperan dalam proses perlekatan bakteri pada sel hospes (Schuch dan Muray, 2000 dalam Maftuch *et al*, 2004).

Penelitian ini mengambil topik karakterisasi adesi protein HA pili *A. salmonicida* BM 9,08 kDa sebagai kandidat bahan vaksin. *A. salmonicida* mengandung protein hemagglutinin, protein hemagglutinin identik dengan protein adesi. Sampai saat ini belum diketahui pola perlekatan *A. salmonicida* pada sel epitel usus ikan mas, selain itu untuk membuktikan apakah protein HA pili *A. salmonicida* BM 9,08 kDa merupakan protein adesi. Oleh karena itu rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Bagaimana pola perlekatan *A. salmonicida* pada sel epitel usus ikan mas?
- Apakah protein HA pili *A. salmonicida* BM 9,08 kDa merupakan protein adesi yang mampu menghambat perlekatan *A. salmonicida* pada reseptor sel epitel usus ikan mas?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui pola perlekatan *A. salmonicida* pada sel epitel usus ikan mas
2. Mengetahui protein HA pili *A. salmonicida* BM 9,08 kDa merupakan protein adesi yang mampu menghambat perlekatan *A. salmonicida* pada reseptor sel epitel usus ikan mas

### 1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi untuk beberapa pihak, diantaranya :

- Lingkungan akademik, dapat dijadikan sebagai tambahan ilmu pengetahuan dan informasi tentang mekanisme perlekatan (adesi) *A. salmonicida* pada sel epitel usus ikan mas. Selain itu merupakan indikasi apakah protein HA pili *A. salmonicida* BM 9,08 kDa tersebut merupakan protein adesi pada perlekatan *A. salmonicida* terhadap reseptor sel epitel usus ikan mas, sehingga akan dapat menambah penjelasan tentang patogenisitas dari pili bakteri *A. salmonicida* dan diharapkan sebagai bahan untuk pengembangan vaksin.
- Pemerintah dan Instansi yang terkait, sebagai masukan dalam mengambil kebijakan-kebijakan tentang penanggulangan penyakit ikan melalui pengembangan vaksin dengan mempertimbangkan hasil penelitian karakterisasi adesi protein pili 9,08 kDa *A. salmonicida* terhadap sel epitel usus ikan mas. Dengan terbuktinya protein pili *A. salmonicida* sebagai protein adesi, maka akan didapatkan protein virulen yang dapat digunakan sebagai bahan pengendali penyakit *A. salmonicida* di perairan Indonesia.



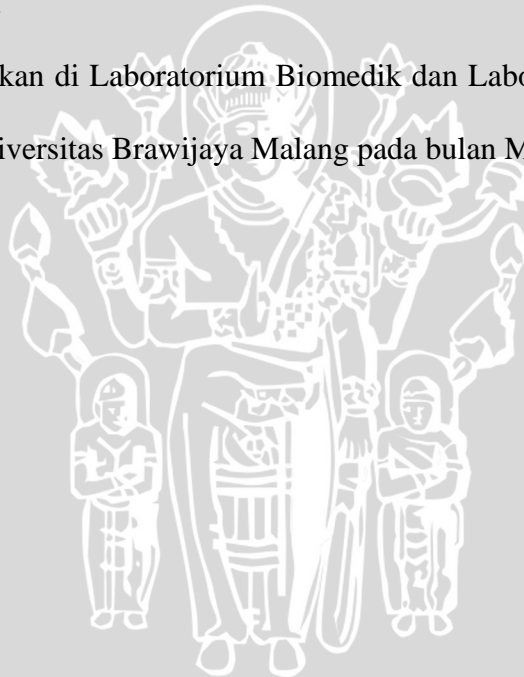
### 1.5 Hipotesis

$H_0$  : Diduga protein HA pili *A. salmonicida* BM 9,08 kDa bukan merupakan protein adesi yang mampu menghambat perlekatan *A. salmonicida* terhadap reseptor sel epitel usus ikan mas (*Cyprinus carpio*).

$H_1$  : Diduga protein HA pili *A. salmonicida* BM 9,08 kDa merupakan protein adesi yang mampu menghambat perlekatan *A. salmonicida* terhadap reseptor sel epitel usus ikan mas (*Cyprinus carpio*).

### 1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Mei 2008.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

#### 2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) menurut Cholik, Jagatraya, Poernomo dan Jauzi (2005) adalah sebagai berikut:

Filum	: Chordata
Sub Filum	: Vertebrata
Super Kelas	: Pisces
Kelas	: Osteichtyes
Sub Kelas	: Actinopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Sub ordo	: Cyprinoidea
Famili	: Cyprinidae
Genus	: <i>Cyprinus</i>
Spesies	: <i>Cyprinus carpio</i> L.

#### 2.1.2 Morfologi

Morfologi adalah ciri-ciri yang menunjukkan bentuk dan struktur suatu organisme. Secara umum, karakteristik ikan mas memiliki bentuk tubuh yang agak memanjang dan sedikit memipih ke samping (*compressed*). Sebagian besar tubuh ikan mas ditutupi oleh sisik kecuali pada beberapa *strain* yang memiliki sedikit sisik. Mulutnya terletak di ujung tengah (*terminal*) dan dapat disembulkan (*protaktil*). Pada bibirnya yang lunak terdapat dua pasang sungut (*babel*) dan tidak bergerigi. Pada bagian

dalam mulut terdapat gigi kerongkongan (*pharyngeal teeth*) sebanyak tiga baris berbentuk geraham (Susanto dan Rochdianto, 2002).

Sirip punggung ikan mas memanjang dan bagian permukaannya terletak berseberangan dengan permukaan sirip perut (*ventral*). Sirip punggungnya (*dorsal*) berjari-jari keras, sedangkan di bagian akhir bergerigi. Seperti halnya sirip punggung, bagian belakang sirip dubur (*anal*) ikan mas berjari-jari keras dan bergerigi pada ujungnya. Sirip ekornya menyerupai tiang memanjang simetris. Sisik ikan mas relatif besar dengan tipe sisik lingkaran (*cycloid*) yang terletak beraturan. Garis rusuk atau gurat sisi (*linea lateralis*) yang lengkap terletak di tengah tubuh dengan posisi melintang dari tutup insang sampai ke ujung belakang pangkal ekor (Susanto dan Rochdianto, 2002).

### 2.1.3 Habitat dan Penyebarannya

Ikan mas hidup di perairan tawar di dataran rendah sampai tinggi. Suhu air optimum bagi hidupnya berkisar antara 26-28 °C, sedangkan pH air antara 6-8 dan membutuhkan kadar oksigen 4-5 ppm. Ikan ini hidup di air tawar, walaupun dapat juga hidup di lingkungan payau berkadar garam rendah, kurang 5 ppt (Cholik *et al*, 2005). Ikan mas termasuk ikan thermophile yang mampu beradaptasi atau toleran terhadap perubahan temperatur air antara 4-30 °C. Ikan ini juga mampu menyesuaikan diri terhadap perubahan kandungan oksigen terlarut dalam perairan. Ikan mas menyukai tempat di dasar perairan atau kolam dengan banyak tumbuhan dan suka hidup bergerombol (Djarajah, 2001).

Ikan mas sering ditemui di pinggiran sungai, danau atau perairan tawar lainnya yang airnya tidak terlalu dalam dan alirannya tidak terlalu deras. Bila ditelusuri

sejarahnya, ikan mas berasal dari Cina dan Rusia. Dari negeri asalnya ikan mas menyebar ke daerah Eropa, Asia Timur dan Asia Selatan. Di daerah baru ini, perkembangan ikan mas semakin pesat, terutama dalam teknik pemeliharaan dan perkembangbiakannya. Keadaan seperti itu juga terjadi di Indonesia sejak pertengahan abad ke-19. Akibat perkembangannya yang pesat menjadikan ikan ini semakin populer dan memiliki banyak varietas (Susanto dan Rochdianto, 2002).

#### 2.1.4 Penyakit

Penyakit pada ikan dapat menyebabkan terjadinya penurunan produksi pada budidaya. Banyak kerugian yang ditimbulkan oleh adanya penyakit pada ikan. Penyakit pada ikan timbul karena adanya ketidakseimbangan interaksi antara ketiga faktor yaitu inang (hospes), lingkungan dan patogen. Apabila lingkungan berubah secara drastis maka akan menyebabkan ikan menjadi stres, sehingga daya tahan tubuh ikan menjadi lemah dan mudah terserang penyakit serta dapat menyebabkan kematian (Zonneveld, Huisman dan Boon, 1991). Agensia penyebab penyakit dapat dikelompokkan sebagai parasit, bakteri, fungi dan virus (Irianto, 2003).

Penyakit yang sering menyerang ikan mas antara lain: infeksi bakterial seperti *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *Flexibacter columnaris*, *Pseudomonas fluorescens* dan *Myxobacterium* sp.; infeksi jamur *Saprolegnia* sp. dan *Branchiomyces* sp.; infeksi protozoa seperti: *Ichthyophthirius multifiliis*, *Myxobolus* sp., *Trichodina* sp. dan *Costia* sp.; infeksi cacing *Dactylogyrus* sp. dan *Gyrodactylus* sp.; serta infeksi yang disebabkan oleh Copepoda yaitu *Argulus* sp. dan *Lernaea cyprinaceae* (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

### 2.1.5 Sel Epitel Usus

Usus merupakan segmen yang terpanjang dari saluran pencernaan. Lapisan mukosa usus tersusun oleh selapis epithelium dengan bentuk prisma. Pada lapisan ini terdapat tonjolan-tonjolan (*villi*) membentuk sarang tawon. Bentuk sel yang umum ditemukan pada epitelium usus adalah enterosit dan mukosit (Fujaya,2004).

Jaringan epitel tersusun oleh sel-sel berisi dan bersudut banyak (poligonal) yang berhimpit padat. Epitel dapat berupa membran dan dapat berupa kelenjar (Leeson, Thomas dan Anthony, 1995). Pada epitel dan jaringan lainnya terdapat adesi antar sel yaitu pada sel yang dapat menahan tenaga mekanik yang besar yang dapat memisahkannya. Celah antar sel epitel sangat sempit sekitar 15-20 nm (150-200 Å) dan celah ini terisi glikokaliks dari sel-sel yang berdekatan. Sifat mengikat karbohidrat pada glikoprotein ini ikut membantu adesi. Bahan ini mengandung kation, khususnya kalsium yang juga penting untuk adesi sel (Leeson *et al*, 1995).

## 2.2 *Aeromonas salmonicida*

*Aeromonas salmonicida* dapat menginfeksi ikan di perairan tawar. Gejala eksternal yang ditimbulkan oleh bakteri *A. salmonicida* diantaranya *furuncle* (melempuh), *haemorrhage* (kemerahan pada kulit) dan *ulcer* (borok pada stadium parah) (Zonneveld *et al*, 1991).

### 2.2.1 Klasifikasi

Klasifikasi bakteri *A. salmonicida* menurut Buchanan dan Gibbons (1974) dalam Anonymous (2007<sup>b</sup>) adalah sebagai berikut:

Superkingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

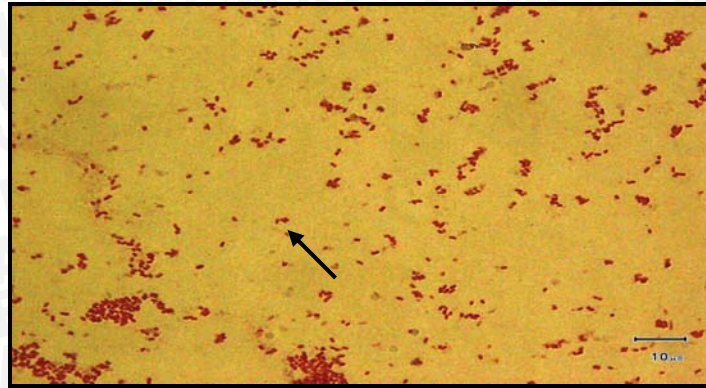
Class : Gammaproteobacteria  
Ordo : Aeromonadales  
Famili : Aeromonadaceae  
Genus : Aeromonas  
Spesies : *Aeromonas salmonicida*

Genus *Aeromonas* merupakan patogen penyebab timbulnya penyakit pada ikan, dan merupakan penyakit bakteri pada perairan tawar (Williamson, 1929 dalam Laminem, 2007) dan *A. salmonicida* diketahui menginfeksi beberapa suku terutama dari Osteichthyes meliputi *Cyprinidae*, *Serranidae* dan *Anoplomatidae* (Hamman, 1968 dalam Austin dan Austin, 1987).

### 2.2.2 Morfologi

*A. salmonicida* adalah bakteri yang berbentuk batang pendek dengan ukuran 1,3-2,0 x 0,8-1,3  $\mu\text{m}$ , bersifat gram negatif, tidak bergerak, tidak membentuk spora maupun kapsul dan bersifat aerob. Bakteri ini tidak dapat hidup lama tanpa inangnya dan suhu optimal bagi pertumbuhannya antara 22-28  $^{\circ}\text{C}$ , sedangkan pada suhu 35  $^{\circ}\text{C}$  pertumbuhannya terhambat. Bakteri ini dapat dijumpai di lingkungan air tawar dan dikenal sebagai penyebab penyakit furunculosis (Anonymous, 2007<sup>a</sup>).

Berdasarkan morfologi koloni, *A. salmonicida* tumbuh baik di media *Triptic Soy Agar* (TSA), mempunyai bentuk koloni kecil, batang pendek, cembung, utuh dan berwarna putih tulang. Bila ditanam pada media kandungan asam amino kadar tinggi akan menghasilkan pigmen lebih cepat dan jelas pada umur biakan 48 jam (Laminem, 2007). Bakteri *A. salmonicida* dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1. Bakteri *Aeromonas salmonicida***

### 2.2.3 Daerah Penyebarannya

*A. salmonicida* merupakan salah satu jenis penyakit yang tertua yang menginfeksi pada ikan *Brown Trout* yang berasal dari hatchery di Jerman yang awalnya dikenal penyakit “Bacilus”. Kemudian berkembang di USA, Jepang, Inggris pada tahun 1900-an, Furunculosis di temukan di berbagai negara Eropa menginfeksi ikan *Brown Trout* (*Salmo trutta*) yang diimpor dari North America (McCarthy, 1975 dalam Laminem, 2007).

*A. salmonicida* juga menginfeksi ikan non Salmonidae yaitu ikan air tawar. Di Indonesia *A. salmonicida* sudah ada di Jawa dan Aceh yang termasuk bakteri Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK) sehingga dicegah penyebarannya (Laminem, 2007).

*A. salmonicida* banyak terdapat di daerah budidaya Salmonid Amerika Serikat, Jepang, Eropa, Australia kecuali di Tasmania dan Selandia Baru sedangkan di Indonesia dijumpai di Jawa, Aceh Tengah, dan Kalimantan Barat (Anonymous, 2007<sup>b</sup>).

### 2.2.4 Patogenisitas

Patogenisitas adalah kemampuan bakteri untuk menimbulkan suatu penyakit. Sifat patogenisitas bakteri salah satunya tergantung dari fungsi adesi yang merupakan

mediator perlekatan bakteri dengan sel hospes (Greenwood, Sleck, dan Reutherer, 1992).

Patogenisitas bakteri umumnya ditentukan pada beberapa faktor, antara lain: toksigenisitas bakteri berupa eksotoksin dan endotoksin, kemampuan bakteri untuk menginvasi hospes dan bermultiplikasi di dalamnya. Peran kapsul sebagai penghalang proses fagositosis, enzim yang dikeluarkan bakteri tertentu untuk mempermudah invasi, afinitas terhadap organ spesifik (*organotropis*), virulensi bakteri, dan faktor hospes (Jawetz, Melnick dan Adelberg's, 1991).

Beberapa faktor yang mempengaruhi patogenisitas dan patologi suatu bakteri adalah kemampuan untuk memproduksi enzim, mengatasi ketahanan inang dan kecepatan berkembang biak (Nabib dan Fachriyan, 1989). Bentuk-bentuk penyerangan yang ditimbulkan *A. salmonicida* sebagai berikut:

1. Bentuk sub-akut atau kronis

Biasa ditemui pada ikan dewasa yang ditandai aktivitas renang berkurang, sedikit eksophthalmia, kongesti pada sirip, dan pendarahan pada insang. Secara internal dapat ditemui haemoeragi pada hati, pembengkakan limpa dan nekrosis pada ginjal. Furunculosis sub-akut hanya menyebabkan tingkat kematian rendah.

2. Bentuk akut

Biasanya terjadi pada ikan muda dan dewasa, septisemia, warna tubuh ikan menjadi lebih gelap, berkurangnya nafsu makan, gerakan renang berkurang, dan haemoragi kecil di pangkal sirip. Secara internal bakteri dapat ditemukan dalam darah, seluruh jaringan, haemoragi pada dinding abdominal, viscera dan jantung serta limpa yang membengkak. Penyakit akut biasanya muncul tiba-tiba, gejala eksternal sedikit atau tidak ada, terjadi dalam waktu singkat dan biasanya ikan mati dalam 2-3 hari.

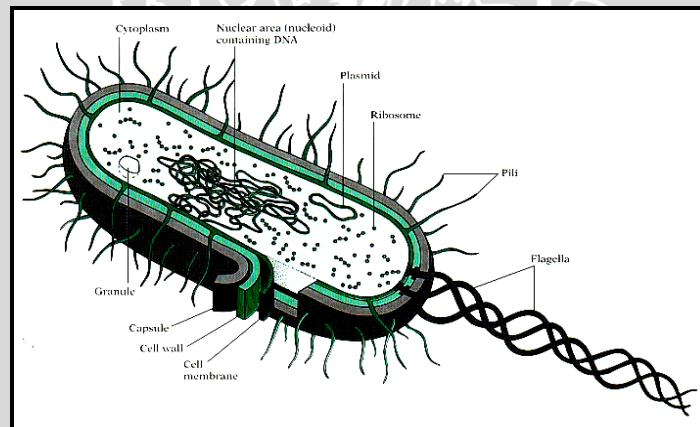


### 3. Bentuk per-akut

Biasanya terjadi pada ikan seukuran jari ditandai dengan warna tubuh yang menggelap dan ikan mati dengan cepat tanpa gejala eksternal yang berarti, biasanya mata sedikit eksophthalmia dan ekor kemerahan. Bentuk per-akut dapat menimbulkan kerugian yang sangat tinggi (Anonymous, 2007<sup>b</sup>).

#### 2.2.5 Faktor Virulensi

Bakteri gram negatif memproduksi sejumlah toksin-toksin dan faktor-faktor virulensi ekstracelluler yang membuatnya menjadi sebuah patogen yang infeksiif ketika sistem immune dirusak (Kaufman, *et.al.*, 2002 dalam Maftuch, 2006<sup>a</sup>). Gambaran organel gram negatif dapat dilihat pada Gambar 2.



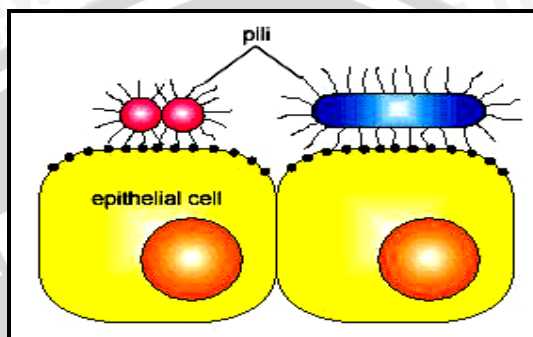
**Gambar 2. Gambaran Organel Bakteri Gram Negatif (Karp, 1996 dalam Yanuhar, 2006)**

Menurut Bellanti (1993), virulensi bakteri atau kemampuan untuk menyebabkan infeksi dan penyakit ditentukan oleh banyak faktor, diantaranya adalah:

#### (a) Perlekatan (adesi) pada permukaan sel epitel

Mikroorganisme dapat menimbulkan infeksi, awalnya mikroorganisme menembus garis pertahanan primer yaitu kulit atau membran mukosa dan kemudian melekat pada permukaan sel epitel kulit, traktus respiratorius, traktus gastrointestinal, traktus

genitourinarius, atau mata. *Adesi* merupakan produk mikroba yang sering ada dalam beberapa bakteri sebagai tonjolan-tonjolan filamen yang disebut pili atau *fimbriae*. *Adesi* ini mengikat reseptor spesifik pada membran permukaan sel epitel (Gambar 3).



**Gambar 3. Perlekatan *Pili* Pada Sel Epitel**

**(b) Penembusan dan invasi jaringan**

Setelah terjadi pertemuan patogen dengan hospes yang rentan diperlukan invasi untuk menimbulkan penyakit. Faktor-faktor yang menambah virulensi berbeda pada berbagai macam organisme. Pada infeksi bakteri akut, faktor-faktor ini terdiri dari pembentukan kapsul dan produksi enzim yang mempermudah invasi.

**(c) Produksi bahan-bahan toksik (toksin)**

Bila organisme telah berhasil menginvasi hospes, bahan toksik dapat dihasilkan oleh organisme. Ada 2 jenis toksin, yaitu eksotoksin dan endotoksin. Eksotoksin merupakan protein yang dihasilkan oleh bakteri sebagai produk ekstraseluler yang mempunyai kemampuan bekerja sebagai racun sel, sedangkan endotoksin tersusun dari kompleks lipida-polikasarida.

**(d) Kemampuan mengadakan perubahan genetik**

Faktor yang membantu pemeliharaan virulensi suatu organisme pada populasi adalah kemampuan patogen tertentu untuk melakukan mutasi secara periodik. Mutasi

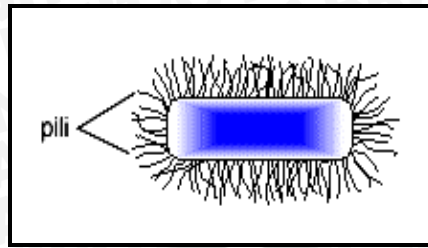
patogen ini bertanggung jawab pada gelombang baru epidemi, karena populasi rentan lagi. Mutasi yang serupa antara patogen lain memungkinkan pemeliharaan strain virulen dalam alam.

Mikroorganisme mempunyai kemampuan dalam meningkatkan kemampuannya untuk menginvasi sel non fagositik. Infeksi bakteri diawali dengan interaksi patogen dengan mengadakan perlekatan dan kolonisasi pada jaringan target dari hospes dengan suatu bagian sel yang spesifik. Sekali bakteri mencapai permukaan hospes, bakteri tersebut harus melekat pada sel hospes untuk mengadakan kolonisasi. Hal ini terutama penting pada daerah permukaan mukosa yang mengandung cairan, misalnya pada usus halus (Tandya, 2006).

### 2.3 Pili

Pili atau fimbriae adalah protein berbentuk filament yang terletak pada permukaan sel bakteri (Ryan, 1994). Pili mempunyai struktur yang lebih pendek dan lebih tipis daripada flagella, berjumlah sekitar 100-500 buah yang tersebar di seluruh permukaan tubuh bakteri. Pili diperkirakan memiliki struktur antigen yang kompleks karena memiliki kesatuan sub unit protein struktural (pilin) yang tersusun teratur secara heliks (Greenwood *et al*, 1992).

Pili merupakan struktur protein berbentuk batang yang terdapat pada permukaan bakteri dan mengikat molekul permukaan sel hospes, biasanya berupa molekul karbohidrat (Gambar 4). Morfologi pili menyerupai rambut dengan tebal 5–25 nm dan panjang 1–2 nm (Tandya, 2006).



**Gambar 4. Struktur Pili**

Berdasarkan fungsinya, pili dapat dibedakan menjadi 2 bentuk, yaitu sex pili yang bertanggung jawab dalam proses perlekatan sel donor dan sel resipien pada proses konjugasi bakteri, dan common pili yang berperan dalam proses perlekatan bakteri pada sel host (sebagai faktor adesi) (Virella, 1997).

Selain dengan mikroskop elektron, pembuktian adanya pili dapat dilakukan dengan pengujian hemaglutinasi (Gupte, 1990 dalam Maftuch, 2006<sup>a</sup>). Karakterisasi molekul adesi diketahui melalui adanya kemampuan untuk menggumpalkan sel darah merah mamalia yang dimiliki oleh protein adesi tersebut. Fenomena ini belum jelas namun diperkirakan adanya kemiripan struktur biologi antara permukaan sel darah merah dan sel epitel reseptor. Protein hemaglutinin yang mempunyai kemampuan menggumpalkan sel darah merah dan terletak pada bagian pili (Tandya, 2006).

Fimbriae merupakan bagian dari sel bakteri gram negatif yang telah diteliti memiliki fungsi sebagai adesi. Kebanyakan dari fimbriae tersebut mempunyai seperangkat struktur adesi yang bisa memfasilitasi proses perlekatan dengan bagian-bagian lain dari sel seperti eritrosit, leukosit dan sel mucus, proses inilah nanti yang akan berperan pada reaksi hemaglutinasi (Freeman dan Burrows, 1985). Kemampuan bakteri mengaglutinasi eritrosit dapat dijadikan petunjuk bahwa bakteri tersebut memiliki substansi protein yang diduga dapat memperantarai terjadinya perlekatan bakteri pada sel host yang terjadi karena eritrosit mempunyai reseptor permukaan sel

yang secara umum dapat mewakili reseptor sel epitel dalam tubuh host (Maloy, Stewart dan Taylor, 1996). Jadi dapat disimpulkan bahwa hemaglutinin juga berperan dalam proses adesi (Freeman dan Burrows, 1985).

Menurut Greenwood *et al* (1992), berdasarkan kemampuan adesi dan hemaglutinasi, fimbriae diklasifikasikan menjadi 4 tipe, yaitu:

- a. Tipe I, merupakan tipe fimbriae yang mampu melakukan adesi dan hemaglutinasi pada sel eritrosit dan bersifat mannose sensitive. Adesi dan hemaglutinasi tersebut dapat dihambat secara spesifik dengan mannose. Tipe ini terdapat pada *Eucheria*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Salmonella* dan *Shigella*. Fimbriae ini memiliki lebar 8 mm.
- b. Tipe II, merupakan tipe fimbriae yang tidak mampu melakukan adesi dan hemaglutinasi pada sel eritrosit. Tipe ini terdapat pada *Salmonella gulinarum* dan *Salmonella pullonum*.
- c. Tipe III, merupakan tipe fimbriae yang tidak mampu melakukan hemaglutinasi pada sel eritrosit, kecuali jika sebelumnya sel eritrosit tersebut dipanaskan dan sifat adesinya dipengaruhi oleh mannose. Fimbriae ini memiliki lebar 5 mm. Tipe ini dijumpai pada beberapa *Klebsiella* dan *Serratia*.
- d. Tipe IV, merupakan tipe fimbriae yang mampu melakukan adesi dan hemaglutinasi pada sel eritrosit dan bersifat mannose resisten.

Secara umum dikenal enam jenis pili: Jenis 1: pili yang relatif tebal dan berpengaruh terhadap aktivitas hemaglutinasi serta peka terhadap manosa. Jenis 2: pili yang tidak menggumpalkan sel darah merah. Jenis 3: pili yang lebih tipis, kebal terhadap manosa dapat mengubah aktivitas hemaglutinasi pada sel darah merah segar. Jenis 4: pili yang lebih tipis dari jenis 3, kebal terhadap manosa dengan aktivitas hemaglutinasi pada sel darah merah segar. Jenis 5: pili monopolar yang hanya ditemukan pada satu jenis

pseudomonas. Jenis 6: pili yang sangat panjang seperti pada *Klebsiella*. Sedangkan fungsinya sebagai alat perlekatan, hemaglutinasi, tabung konjugasi sebagai alat penyalur materi genetik dari sel donor kepada sel penerima, bersifat antigenik dan aglutinasi (Gupte, 1990 dalam Maftuch, 2006<sup>a</sup>).

#### 2.4 Protein Hemagglutinin

Hemagglutinin adalah suatu substansi (protein atau antigen) yang memiliki kemampuan untuk mengaglutinasikan sel darah merah (Livingstone, 1989). Uji yang dilakukan untuk mendeteksi adanya ikatan antigen dengan reseptor yang biasanya menggunakan sel darah merah dan bertujuan untuk menentukan protein hemagglutinin disebut uji hemaglutinasi. Karakterisasi molekul antigen dapat diketahui dengan adanya kemampuan menggumpalkan sel darah merah (Jawetz *et al*, 1991). Protein hemagglutinin merupakan protein yang mampu menimbulkan reaksi penggumpalan pada eritrosit (Sumarno, 2000).

Antigen yang digunakan sehubungan dengan reaksi aglutinasi, tidak hanya ditunjukkan pada organisme atau sel-sel lain yang menyebabkan produksi antibodi tetapi lebih sering menyatukan suspensi sel-sel yang digunakan sebagai reagen dalam tes aglutinasi. Antigen-antigen bakteri secara umum merupakan suspensi dari bakteri-bakteri yang tidak dimatikan dalam solusi 0,9% NaCl. Banyak teknik yang membutuhkan plasma sentrifugasi dan standarisasi suspensi eritrosit dengan teliti (Merchant and Parcker, 1980 dalam Saputra, 2002).

Reaksi aglutinasi digunakan untuk identifikasi kuman, biasanya menggunakan sel darah merah sebagai reseptornya. Karena kepekaannya dan mudahnya, maka tes

aglutinasi telah diperluas untuk identifikasi antibodi terhadap antigen-antigen yang dapat larut (Roitt, 1990).

Menurut Jawetz *et al* (1991), aglutinin adalah antibodi yang menggumpalkan sel-sel, membentuk gumpalan. Aglutinin hanya dapat diperlihatkan bila antigen merupakan suatu butiran atau bila Ag (antigen) teradsorpsi pada permukaan suatu butiran yang memiliki ukuran seragam misalnya sel darah merah. Bila dicampur dengan serum antispesifik, sel-sel atau butiran-butiran ini akan menggumpal, gumpalan akan bersatu dan akhirnya mengendap sebagai gumpalan-gumpalan besar dan mudah terlihat, dan cairan di atasnya akan tetap jernih.

Bakteri atau sel-sel yang lain sesuai dengan antigen untuk reaksi aglutinasi harus mampu tetap berada dalam suspensi yang seragam untuk sebuah periode dengan sedikit atau tanpa kecenderungan untuk berpisah. Sel-sel dalam suspensi dijaga terpisah karena sifat-sifat serupa mereka akan menimbulkan aliran listrik tolak menolak. Ketika antibodi dan antigen sel dicampur dengan sel dalam suspensi, antibodi akan menyatu dengan antigen-antigen tersebut pada permukaan sel. Jika sel-sel yang berdekatan berhubungan/kontak satu sama lain, mereka akan terangkai bersama, lebih banyak lagi sel-sel terangkai bersama akan terbentuk gumpalan besar sel-sel. Agitasi atau sentrifugasi campuran sel dan antibodi akan menambah laju kontak antara sel-sel yang akan mempercepat aglutinasi (Merchant and Parcker, 1980 *dalam* Saputra, 2002).

Dalam penelitian pendahuluan yang dilakukan Rahmawati (2008) dapat diisolasi protein HA yang berasal dari pili bakteri *A. salmonicida* BM 9,08 kDa yang mempunyai titer positif tertinggi. Untuk memperoleh protein hemaglutinin pili 9,08 kDa dilakukan serangkaian tahapan diantaranya:

**(a) Kultur *A. salmonicida***

Kultur *A. salmonicida* dilakukan pada beberapa media untuk melihat morfologi bakteri. *A. salmonicida* yang digunakan adalah hasil isolasi dari ikan mas yang terinfeksi oleh bakteri tersebut. Kultur *A. salmonicida* dilakukan pada beberapa media kultur yaitu pada media TSA (*Tryptic Soy Agar*) yang merupakan media selektif untuk pertumbuhan *Aeromonas*, kemudian dilakukan perbanyakan pada media BHI (*Brain Heart Infusion*). Untuk media penumbuh pili dilakukan kultur *A. salmonicida* pada media TCG (*Thiaproline Carbonate Glutamat*) (Rahmawati, 2008).

Isolat bakteri *A. salmonicida* yang telah ditumbuhkan pada media BHI dan TCG, dipanen dan ditambahkan TCA (*Tri Chloro Asetic acid*) sebanyak 3%. Hal ini dikarenakan TCA mempunyai kemampuan mengendapkan protein dan senyawa tersebut digunakan untuk membantu pemutusan pili dari permukaan sel bakteri (Mustafa, 2002 dalam Rahmawati, 2008). Kemudian dilakukan pencukuran atau pemotongan pili menggunakan omnimixer dengan kecepatan 6.000 rpm selama 30 detik pada kondisi 40 C. Pencukuran pili dilakukan beberapa kali sampai supernatan terlihat bening. Dari hasil pencukuran pili dilakukan 5 kali pencukuran sehingga didapatkan isolat pili cukuran ke-1, 2, 3, 4 dan 5.

**(b) Uji Hemaglutinasi Whole Cell *A. salmonicida***

*Whole Cell A. salmonicida* merupakan bakteri yang masih utuh belum dilakukan pencukuran pili dan isolasi *outer membrane protein* (omp). Uji hemaglutinasi digunakan untuk mendeteksi adanya ikatan antigen dengan reseptornya yang biasanya menggunakan sel darah merah sebagai reseptornya. Uji hemaglutinasi ini bertujuan untuk menentukan protein hemaglutinin. Karakterisasi protein ini dapat diketahui dengan adanya kemampuan menggumpalkan sel darah merah ikan mas. Dengan melakukan uji



ini dapat ditentukan titer tertinggi dari suatu antigen secara berseri. Interpretasi hemaglutinasi adalah sebagai berikut: bila antigen tersebut dapat menggumpalkan sel darah merah ikan mas berarti reaksi hemaglutinasi tersebut positif (aglutinasi positif) dan apabila antigen tersebut tidak dapat menggumpalkan sel darah merah ikan mas berarti reaksi hemaglutinasi negatif (aglutinasi negatif) (Sumarno, 2000).

Dalam penelitian Rahmawati (2008), hasil uji hemaglutinasi pada *whole cell* terhadap sel darah merah ikan mas tampak pada Gambar 5 dan Tabel 1 di bawah:



**Gambar 5. Hasil Uji Hemaglutinasi Terhadap *Whole Cell A. salmonicida***

**Tabel 1. Hasil uji hemaglutinasi *Whole Cell A. salmonicida* pada eritrosit ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan berbagai dosis pengenceran.**

Sampel	K+	Dosis Pengenceran Protein <i>Whole Cell</i>									K-
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	
Whole Cell	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan :

K+ : Kontrol Positif berisi sampel dan eritrosit

K- : Kontrol Negatif berisi eritrosit dan Na-fis

*Whole Cell* : Dosis pengenceran sampai 1/2

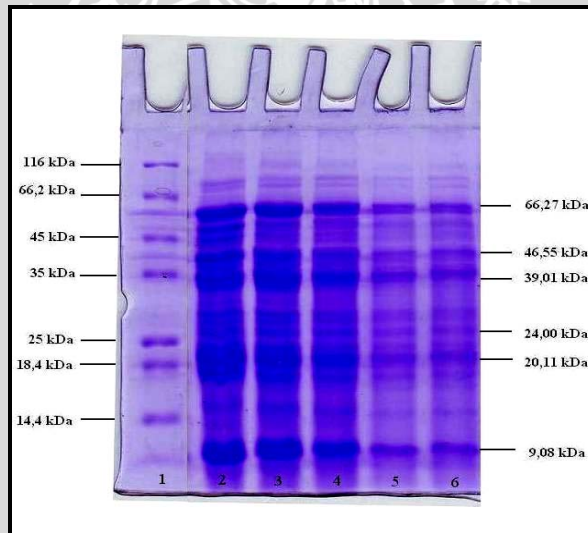
Berdasarkan hasil uji hemaglutinasi di atas diketahui titer positif tertinggi *whole cell* ditunjukkan pada pengenceran 1/2. Hal ini menunjukkan bahwa *whole cell* merupakan protein hemaglutinin yaitu dengan adanya aglutinasi positif. Selain itu dari hasil uji hemaglutinasi tersebut dapat diketahui bahwa *A. salmonicida* mengandung protein hemaglutinin (Rahmawati, 2008).

**(c) Elektroforesis SDS-PAGE**

Menurut Titrawani (1996) dalam Rahmawati (2008), elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein

bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul. SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Elektrophoresis*) merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran berat molekulnya dengan menggunakan media peyangga berupa gel polyakrilamid. Prinsip kerja SDS PAGE adalah molekul bergerak ke arah elektroda dengan muatan yang berlawanan (Anonymous, 2003).

Hasil pengujian profil protein dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE yang dilakukan Rahmawati (2008), menunjukkan gambaran profil dan jumlah berat molekul dari protein pada tiap-tiap sampel pili hasil cukuran. Hasil elektroforesis pili *A. salmonicida* dengan gel poliakrilamid tampak pada Gambar 6.



**Gambar 6. Hasil elektroforesis dari pili *A. salmonicida***

Keterangan :

Lajur 1 : Protein perunut Low marker merk Fermentas, BM 116 kDa; 66,2 kDa, 45 kDa, 35 kDa; 25 kDa; 18,4 kDa dan 14,4 kDa

Lajur 2 : Pita protein pili cukuran ke-1

Lajur 3 : Pita protein pili cukuran ke-2

Lajur 4 : Pita protein pili cukuran ke-3

Lajur 5 : Pita protein pili cukuran ke-4

Lajur 6 : Pita protein pili cukuran ke-5 dengan BM 66,27 kDa; 46,55 kDa, 39,01 kDa; 24,00 kDa, 20,11 kDa; 9,08 kDa

#### **(d) Pemurnian Protein**

##### **- Elektroelusi**

Elektroelusi adalah cara yang digunakan untuk memecah bahan nucleic atau contoh protein dari gel elektroforesis dengan memberikan arus negatif pada ukuran terkecil dari gel, membentuk permukaan makromolekul. Tujuan dilakukannya elektroelusi ini adalah untuk mengeluarkan protein dari gel polyakrilamid.

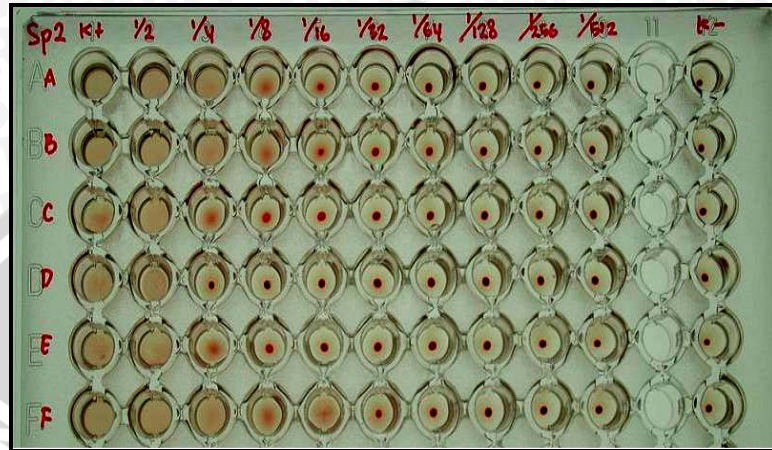
##### **- Dialisa**

Material dengan berat molekul rendah seperti garam dan beberapa material biologi seperti asam amino, karbohidrat berat molekul rendah dapat dipisahkan dari material makromolekul seperti protein dan polisakarida dengan dialisa. Dialisa merupakan proses pemisahan molekul yang lebih kecil dari molekul yang lebih besar dalam larutan, dengan menggunakan membran semipermeabel yang hanya dapat dilalui molekul yang lebih kecil (Robyt dan White, 1987 dalam Rahmawati, 2008). Tujuan dilakukannya dialisa ini adalah untuk mendapatkan protein murni. Protein hasil dialisa inilah yang selanjutnya digunakan untuk uji hemaglutinasi.

#### **(e) Uji Hemaglutinasi Protein Pili *A. salmonicida***

Uji hemaglutinasi ini bertujuan untuk mengamati pola hemaglutinasi protein terhadap eritrosit ikan mas. Dalam hal ini uji hemaglutinasi digunakan untuk mendeteksi adanya ikatan antigen dan reseptornya (Maftuch, 2006<sup>b</sup>). Dengan melakukan uji hemaglutinasi dapat ditentukan titer tertinggi dari suatu antigen sebagai molekul hemaglutinin untuk itu dilakukan pengenceran antigen secara berseri. Pengenceran juga bertujuan untuk mengatasi kelebihan antigen agar aglutinat lebih optimal (Rahmawati, 2008).

Hasil uji hemaglutinasi protein pili *A. salmonicida* BM 66,27 kDa; 46,55 kDa; 39,01 kDa; 24,00 kDa; 20,11 kDa dan 9,08 kDa dalam penelitian Rahmawati (2008) dapat dilihat pada Gambar 7 dan Tabel 2.



**Gambar 7. Hasil Uji hemaglutinasi terhadap protein pili *A. salmonicida***

Keterangan :

K+ : Kontrol Positif berisi Sampel dan Eritrosit

K- : Kontrol Negatif berisi Eritrosit dan Na-fis

A : Protein pili BM 66,27 kDa dosis pengenceran sampai 1/8

B : Protein pili BM 46,55 kDa dosis pengenceran sampai 1/8

C : Protein pili BM 39,01 kDa dosis pengenceran sampai 1/4

D : Protein pili BM 24,00 kDa dosis pengenceran sampai 1/2

E : Protein pili BM 20,11 kDa dosis pengenceran sampai 1/4

F : Protein pili BM 9,08 kDa dosis pengenceran sampai 1/16

**Tabel 2. Hasil uji hemaglutinasi protein pili *A. salmonicida* pada eritrosit ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan berbagai dosis pengenceran.**

Sampel	K+	Dosis Pengenceran Protein Pili										K-
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512		
A. BM 66,27 kDa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B. BM 46,55 kDa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C. BM 39,01 kDa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D. BM 24,00 kDa	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. BM 20,11 kDa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. BM 9,08 kDa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Hasil uji hemaglutinasi, didapat protein HA yang berasal dari pili bakteri *A. salmonicida* BM 9,08 kDa yang mempunyai titer positif tertinggi sampai pengenceran 1/16. Hal tersebut menunjukkan bahwa protein pada BM 9,08 kDa merupakan protein hemaglutinin. Protein pada BM 9,08 kDa dapat menggumpalkan sel darah merah sampai pengenceran tertinggi yaitu 1/16. Penggumpalan sel darah merah ini disebabkan oleh adanya ikatan antara antigen dengan reseptornya (Rahmawati, 2008).

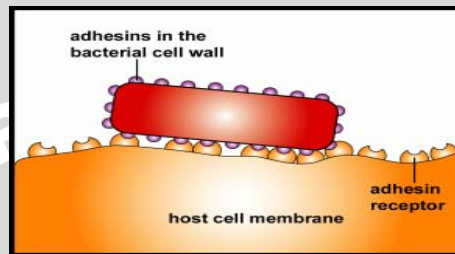
## 2.5 Molekul Adesi Bakteri

Beberapa komponen penting struktur sel bakteri gram negatif yang berfungsi untuk adesi, kolonisasi dan invasi sel inang adalah flagellum, pili, outer membrane (Gupte, 1990 dalam Maftuch, 2006<sup>b</sup>).

Salah satu karakteristik bakteri yang menentukan patogenisitas adalah adherence atau adesi. Adesi adalah suatu proses menempelnya bakteri pada permukaan sel hospes. Adesi merupakan tahap awal dalam proses infeksi. Kontak langsung antara agen infeksi dengan sel hospes diawali dengan proses adesi. Adesi ini berperan penting dalam proses kolonisasi serta invasi kuman pada sel hospes (Jawetz *et al*, 1991).

Protein adesi dicirikan ke dalam dua kelompok, yakni fimbrial dan afimbrial. Fimbriae (disebut juga pili) adalah tonjolan struktur seperti rambut dari permukaan bakteri yang terdiri atas protein-protein dan menyerupai suatu silinder. Suatu protein biasanya bertindak sebagai subunit fimbrial utama. Ujung fimbrial sering juga berfungsi untuk mengikat sel hospes yang peka rangsangan. Afimbrial adesi mengacu pada protein yang bertindak sebagai faktor perlekatan, tetapi tidak memanjang dan strukturnya seperti fimbrial (Merz, 2000).

Adesi bakteri pada sel eukariotik atau permukaan jaringan dibutuhkan dua faktor yaitu reseptor dan adesi (Gambar 8). Reseptor biasanya berupa spesifik karbohidrat pada permukaan sel eukariotik. Sebagai mediator perlekatan kuman atau adesi ini adalah adesi. Adesi bakterial adalah komponen makromolekular dari permukaan sel bakteri yang berinteraksi dengan reseptor sel hospes (Todar, 1999).



**Gambar 8. Faktor Perlekatan Bakteri (Sumber: Todar, 1999)**

Adesi bakterial biasanya merupakan suatu lektin, yaitu protein yang mempunyai afinitas tinggi untuk berikatan secara spesifik dengan karbohidrat pada reseptor sel hospes (Mc Garey dan Alred, 1994). Adesi dapat berupa protein yang terdapat pada dinding sel atau berupa bagian dari struktur yang dibentuk dari permukaan sel misalnya fimbriae atau pili (Maggs, 1996).

Adesi bakteri gram negatif, kebanyakan diperankan oleh suatu protein yang mampu mengaglutinasi eritrosit mamalia tertentu yang disebut protein hemaglutinin (HA), misalnya protein adesi pili *V. cholerae* 01 M094V diperankan oleh protein hemaglutinin sub unit pili dengan bobot molekul 37,8 kDa (Sumarno, 2000). Kemampuan mengaglutinasi ini dikaitkan dengan adanya homologi reseptor protein HA pada sel eritrosit dengan reseptor protein adesi pada sel inang mamalia. Beberapa penelitian membuktikan bahwa protein HA bakteri adalah identik dengan protein adesi (Nagayama, 1995 dalam Rahmawati, 2008).

Untuk membuktikan bahwa suatu protein merupakan protein adesi maka protein hemaglutinin yang diisolasi selanjutnya dilakukan uji adesi. Protein yang diduga sebagai protein hemaglutinin disalutkan pada sel hospes dengan konsentrasi yang semakin meningkat. Penyalutan protein ini dimaksudkan untuk menjenuhkan reseptor yang terlibat dalam proses perlekatan (Wizzeman, Adomoum dan Langermann, 1999).

Menurut Todar (2002), perlekatan bakteri pada permukaan sel hospes dapat dihambat oleh protein adesi atau protein reseptor yang telah diisolasi, antibodi yang spesifik terhadap permukaan (seperti adesi atau reseptor). Penemuan bahwa adesi sebagai tahap awal dalam proses infeksi pada kebanyakan bakteri, menunjukkan bahwa protein adesi tersebut sangat mungkin digunakan sebagai komponen vaksin yang baik, sebagai contoh Fim H Vaccine yang sedang dikembangkan untuk mencegah infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh *E. coli* (Wizzeman *et al*, 1999).

Adesi pili memegang peranan penting dalam mengawali proses kolonisasi bakteri (sebagai antigen kolonisasi) pada sel host, sehingga ikut menentukan patogenisitas dan virulensi bakteri (Velden, Baumler, Tsolis dan Heffron, 1998). Menurut Evans, Evans Jr., Mouldes dan Graham (1988), secara morfologi ada 3 macam model adesi yaitu :

1. *Localize adhearant* (adesi lokal)

Adesi lokal yaitu gambaran koloni bakteri dalam formasi bergerombol pada permukaan sel reseptor

2. *Diffuse adhearant* (adesi difusi)

Model adesi difusi terlihat dalam paparan yang merata hanya pada permukaan reseptor

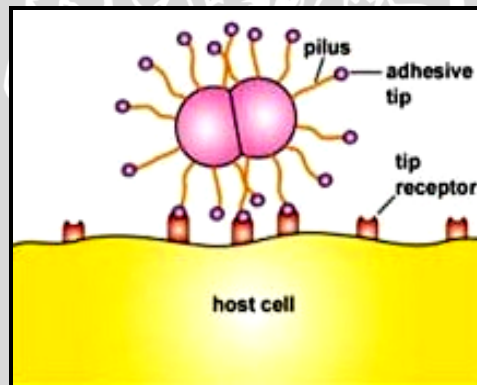
### 3. *Aggregat adhearant* (adesi agregasi)

Tanda dari model adesi agregasi adalah ditemukan gambaran sel bakteri berbentuk seperti *stacked-brick* (susunan tumpukan batu bata) yang terdapat dalam reseptor sel maupun di luar sel reseptor.

## 2.6 Mekanisme Perlekatan (Adesi) Bakteri

Mekanisme perlekatan yang banyak di pelajari adalah perlekatan struktur protein yang terdapat pada pili atau fimbrial. Ujung pili telah diketahui berfungsi sebagai perlekatan bakteri dengan molekul pada permukaan sel hospes. Peristiwa pengikatan spesifik antara ujung pili dan permukaan sel hospes di kenal dengan adesi (Todar, 2002).

Mekanisme perlekatan bakteri dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 9. Mekanisme Perlekatan Bakteri**  
(Sumber: Kaiser, 2001 dalam Yanuhar, 2006)

Mekanisme infeksi melalui proses adesi terhadap sel hospes adalah merupakan bagian awal untuk melakukan infeksi, dengan melibatkan beberapa tahap; tahap perlekatan (*adesi*) pada permukaan hospes, secara bersama masuknya bakteri kedalam sel hospes, dan diikuti tahap invasi serta penyebaran lokal atau sistemik dalam tubuh hospes. *Multiimplikasi*, tahap ini biasanya terjadi kerusakan pada hospes, tahap terakhir



bakteri akan keluar dari tubuh hospes, dan memulai tahap perlekatan lagi hingga terjadi kerusakan/kematian (Riani, 2004 *dalam* Yanuhar *et al*, 2004)

Mekanisme perlekatan bakteri (adesi) dapat terdiri dari dua langkah yaitu perlekatan yang reversibel pada sel eukariotik (disebut “*docking*”) dan perlekatan yang tidak reversibel dari mikroorganisme terhadap suatu permukaan (disebut “*anchoring*”) (Todar, 1999).

*Docking* dapat terjadi tanpa diikuti *anchoring*, tapi hal ini tidak terjadi pada proses adesi yang spesifik. *Docking* meliputi gaya tarik yang tidak spesifik dari bakteri pada permukaan sel eukariotik. Interaksi ini mungkin diperantarai oleh interaksi hidrofobik, gaya tarik listrik, gerakan Brown, rekrutmen dan tropping pada biofilm polimer yang berinteraksi dengan glikokaliks (kapsul) dari bakteri (Todar, 1999).

Selanjutnya perlekatan reversibel ini dapat diikuti oleh ikatan permanen (*anchoring*) yang berupa ikatan gembok dan kunci (*lock and key*) antara molekul komplemen pada masing-masing permukaan. Reseptor komplementari dan molekul adesi harus ada dan sesuai satu sama lainnya. Sekali keduanya berikatan maka ikatan ini menjadi irreversibel (Todar, 1999).

### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang berukuran 15-30 cm yang didapat dari BBI (Balai Benih Ikan) Punten Malang (Lampiran 1).

##### 3.1.2 Bakteri *A. salmonicida*

Bakteri yang digunakan adalah bakteri *A. salmonicida* hasil isolasi dari ikan mas yang telah dilakukan pembiakan dalam media BHI. Bakteri ini didapat dari PUSKARI (Pusat Karantina Ikan) Jakarta yang dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

##### 3.1.3 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian (Lampiran 2) diantaranya sebagai berikut:

- Pipet mikro
- *Tips*
- Tabung sentrifus / falkon
- Alat-alat gelas
- Vortex
- Mikroskop
- *Magnetic stirrer*
- Inkubator
- *Alumunium foil*
- Timbangan analitik
- Autoklaf
- *Refrigerated centrifuge*
- *Shaker incubator*
- *Homogenizer*
- pH meter
- Slide
- Bunsen
- Alat sectio

### 3.1.4 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- *Enterocyte* (sel epitel usus halus) ikan mas
- Bakteri *Aeromonas salmonicida*
- Protein hemaglutinin pili *A. salmonicida* BM 9,08 kDa
- Larutan NaOH
- Larutan HCl
- Larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*):
  - 0,6 gram  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
  - 0,3 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
  - 0,175 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - 1,7 gram KCl
  - 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$  steril
- Larutan A:
  - 0,8 gram NaCl
  - 0,115 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
  - 0,02 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - 0,02 gram KCl
  - 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  steril
  - 0,01542 gram *dithiothreitol*
- Larutan B:
  - 0,02805 gram NaCl
  - 0,03974 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
  - 0,054435 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

- 0,0056 gram KCl
- 0,0397 gram Na citrat
- 50 ml H<sub>2</sub>O steril
- Pewarnaan gram:
  - Larutan kristal violet
  - Larutan lugol
  - Larutan alkohol 96 %
- Pewarna safranin
- Pewarna HE (Hemaktosilin Eusin)

### 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen, yaitu suatu metode mengadakan kegiatan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Tujuan eksperimen adalah untuk menemukan hubungan sebab dan akibat antara variabel (Muhammad, 1992). Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003).

### 3.3 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu rancangan yang digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen.

Menurut Surakhmad (1980), model umum untuk RAL adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij} ; i = 1, 2,..t$$
$$j = 1, 2,..t$$

Keterangan :

$Y_{ij}$  = respon atau nilai hasil pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.

$\mu$  = nilai tengah umum

$T_i$  = pengaruh perlakuan ke-i

$\epsilon_{ij}$  = pengaruh galat dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Persiapan Penelitian

- **Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat-alat yang akan disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen atau kertas koran, kemudian dibungkus dengan menggunakan benang. Air secukupnya dituang ke dalam autoklaf, kemudian alat yang telah dibungkus kertas perkamen dimasukkan ke dalam autoklaf dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara silang. Kompor pemanas dinyalakan, setelah beberapa saat monometer akan menunjukkan angka 1 atm, jika terjadi kelebihan tekanan buka kran udara hingga monometer menunjukkan angka 1 atm kembali. Ketika sampai suhu  $121^{\circ} \text{C}$  dan monometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit. Kompor dimatikan dan kran dibuka untuk mengurangi tekanan. Tunggu beberapa saat sampai termometer dan monometer menunjukkan angka 0 (nol) lalu buka penutup autoklaf secara silang. Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil. Alat yang telah disterilkan disimpan dalam inkubator, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

- **Pembuatan Larutan**

Dalam pembuatan larutan PBS, larutan A dan larutan B masing-masing bahan ditimbang dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Bahan dilarutkan dengan aquades steril tidak sampai penuh. Kemudian dimasukkan magnetic stirer dan diletakkan di stirer dilihat sampai bercampur rata (homogen). Setelah homogen diukur pH-nya. Untuk larutan PBS dan larutan A menghendaki pH 7,4 sedangkan larutan B menghendaki pH 7,3. Pada saat pengukuran pH, apabila pH kurang dari yang dikehendaki maka ditambahkan larutan NaOH dan apabila pH lebih maka ditambahkan larutan HCl. Jika pH sudah cocok maka ditambahkan aquades steril lagi sampai penuh sesuai ukuran dan distirer. Kemudian disterilisasi dalam autoklaf, didinginkan dalam suhu ruang lalu disimpan dalam suhu dingin (4 °C).

### 3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

- **Metode Isolasi Enterocyte Ikan Mas**

Isolasi enterocytes menggunakan cara Weisler yang diambil dari Nagayama, Oguchi, Arita dan Honda (1995). Jaringan usus diambil dari jaringan usus ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan dipisahkan dari jaringan sekitarnya dan dipotong ukuran 5 cm, kemudian lumen usus dibuka dengan cara memotong melintang. Isinya dibersihkan dengan cairan PBS pH 7,4. Setelah jaringan usus tampak bersih dimasukkan larutan A. Digoyang pelan agar selaput yang menempel di jaringan usus lepas. Pencucian dengan larutan A dilakukan sebanyak 2 kali. Cairan dibuang kemudian jaringan usus dimasukkan ke dalam falcon 50 ml dan direndam dengan larutan B sebanyak 20 ml. Kemudian digoyang pada *shaker water bath* selama 15 menit dengan suhu 37 °C. Lalu diamati perpecahan sel enterositnya di bawah mikroskop. Jika sel enterosit belum

terpisah, digoyang lagi untuk 15 menit kedua dengan suhu 37 °C selanjutnya disentrifugasi kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Cairan supernatannya dibuang dan disisakan peletnya. Pelet jaringan usus dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 5 ml selanjutnya disentrifugasi kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Pencucian dilakukan sampai 3 kali. Kemudian jaringan usus disuspensikan dengan PBS pH 7,4. cairan diambil dengan mengocok jaringan usus pelan-pelan disimpan dalam wadah steril. Kemudian sel epitel usus yang terdapat pada cairan suspensi diperiksa pada mikroskop. Cara isolasi enterosit ikan mas disajikan pada Lampiran 3.

#### ➤ **Prosedur Preparasi Sel Bakteri**

Dipersiapkan bakteri *A. salmonicida* dan ditumbuhkan pada media *brain heart infusion broth* (BHI) dengan konsentrasi  $10^6$  sel per ml. Sampel bakteri *A. salmonicida* dipindahkan ke dalam falcon 15 cc dengan cara penuangan. Proses penuangan ini dilakukan di atas api bunsen kemudian dilakukan sentrifugasi 3500 rpm selama 10 menit. Dibuang supernatan dan disisakan pelet pada dasar falcon, selanjutnya ditambahkan PBS pH 7,4 sampai 5 cc dan disentrifugasi 3500 rpm selama 10 menit untuk pencucian. Kemudian dibuang supernatannya lagi, pelet ditambahkan PBS pH 7,4 sampai ukuran 1 cc dan bakteri siap digunakan. Cara preparasi sel bakteri *A. salmonicida* disajikan pada Lampiran 4.

#### ➤ **Uji Adesi dan Hambat Adesi**

Suatu protein merupakan protein adesi dibuktikan dengan cara uji hambat adesi. Modifikasi rujukan yang digunakan adalah cara Favre-Bonte, Darfeuille-Michaud dan Foriestier (1995). Dilakukan 3 macam eksperimen:

- Bakteri *A. salmonicida* sebanyak 20 µl ditambahkan 50 µl suspensi sel epitel usus halus ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang telah dipersiapkan sebagai kontrol. Inkubasi

pada penangas air/*shaker waterbath* dengan goyangan pelan selama 30 menit. Setelah inkubasi cukup, ditetaskan pada *slide* kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 1000 kali dan pewarnaan yang dipilih adalah gram.

- Seperti pada eksperimen no. 1. Perbedaannya sebelum ditambah *Aeromonas salmonicida*, sel epitel usus halus ikan mas (*Cyprinus carpio*) dilapisi protein hemaglutinin pili 9,08 kDa *Aeromonas salmonicida*.
- Pada setiap eksperimen dilakukan replikasi 3 kali. Dosis protein penyalut antigen diturunkan 0,5 nya secara seri. Pemeriksaan dengan mikroskop dihitung jumlah sel bakteri yang melekat pada satu sel epitel usus halus ikan. Sel epitel yang diperiksa secara acak zig-zag sebanyak 100 sel. Sel epitel yang dipilih adalah yang single tidak dalam bentuk gerombolan. Cara pemeriksaan tersebut untuk analisa regresi. Prosedur uji adesi dan hambat adesi disajikan pada Lampiran 5.

Perlakuan pengenceran dosis penyalut antigen dilakukan 8 perlakuan dan diberi ulangan sebanyak 3 kali. Perlakuan dosis penyalut antigen sebagai berikut:

Perlakuan K = Kontrol/ tanpa pemberian antigen

Perlakuan A = Konsentrasi 1

Perlakuan B = Konsentrasi pengenceran  $\frac{1}{2}$

Perlakuan C = Konsentrasi pengenceran  $\frac{1}{4}$

Perlakuan D = Konsentrasi pengenceran  $\frac{1}{8}$

Perlakuan E = Konsentrasi pengenceran  $\frac{1}{16}$

Perlakuan F = Konsentrasi pengenceran  $\frac{1}{32}$

Perlakuan G = Konsentrasi pengenceran  $\frac{1}{64}$



### 3.5 Parameter Penelitian

Parameter uji yang dilakukan pada penelitian ini meliputi:

- Pola adesi/ perlekatan antara bakteri *A. salmonicida* dengan sel enterosit ikan mas.
- Perbedaan titer pengenceran protein hemaglutinin pili 9,08 kDa *A. salmonicida* yang disalutkan ke sel enterosit untuk mengetahui jumlah indeks adesi.

### 3.6 Analisis Data

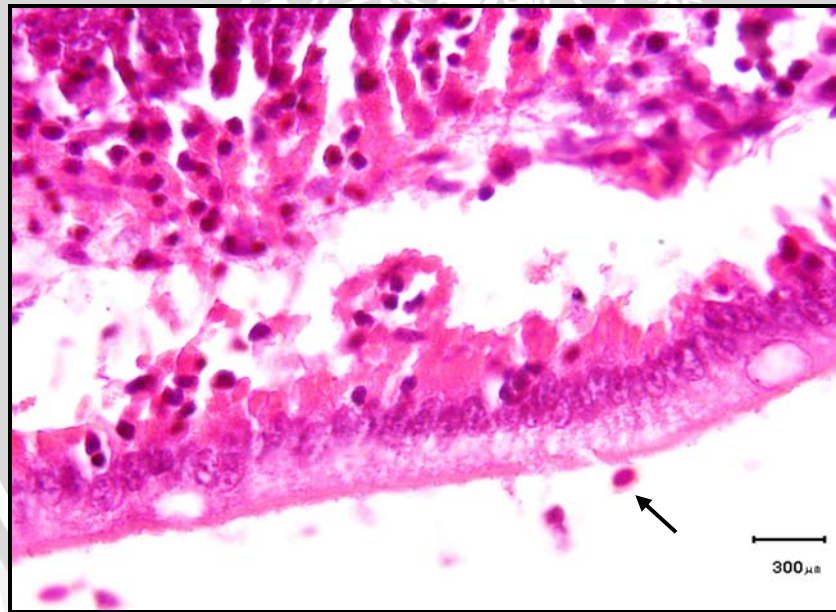
Analisis data hasil penelitian dilakukan secara statistik dengan menggunakan analisa keragaman (ANOVA) SPSS 16.0 *for windows* sesuai dengan rancangan yang digunakan, yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Uji ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan dosis terhadap indeks adesi. Jika dari analisa sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata (*significant*) atau berbeda sangat nyata (*highly significant*), maka untuk membandingkan nilai dilanjutkan dengan uji Berbeda Nyata Terkecil (BNT) dengan tingkat kepercayaan 95% (Yitnosoemarto, 1995). Selanjutnya dilakukan analisis regresi. Analisis regresi dan korelasi untuk mengetahui keeratan hubungan antara dosis protein dengan nilai indeks adesi. Cara perhitungan data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 6.

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Gambaran Sel Enterosit

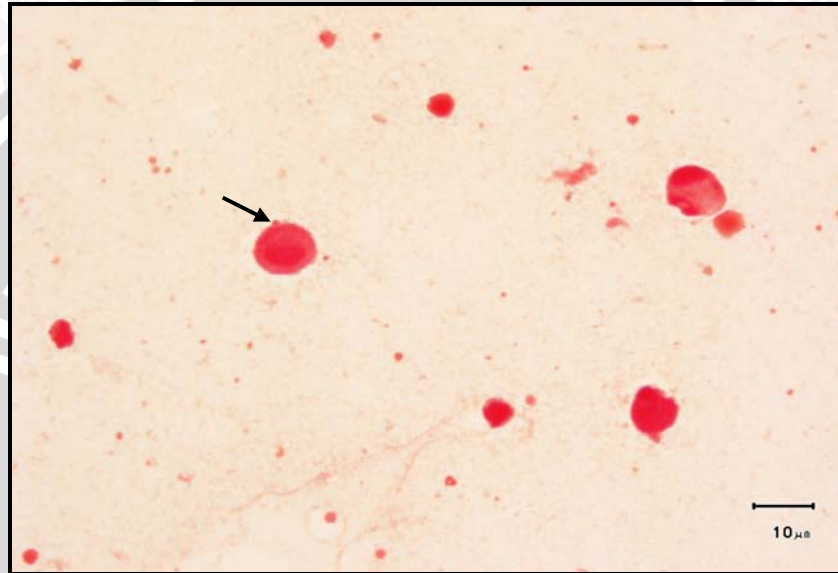
Protein adesi adalah suatu protein yang berperan pada patogenesis bakteri pada tahap awal. Protein adesi merupakan komponen permukaan bakteri yang berikatan dengan reseptor permukaan sel hospes. Untuk membuktikan suatu protein adalah protein adesi, dilakukan uji adesi dan uji hambat adesi (Tandya, 2006).

Dalam uji adesi digunakan sel enterosit/sel epitel usus ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang merupakan reseptor *A. salmonicida* untuk mengetahui patogenesis bakteri. Sel enterosit diambil dari bagian paling dalam jaringan usus. Histologi jaringan usus ikan mas dapat dilihat pada Gambar 10.



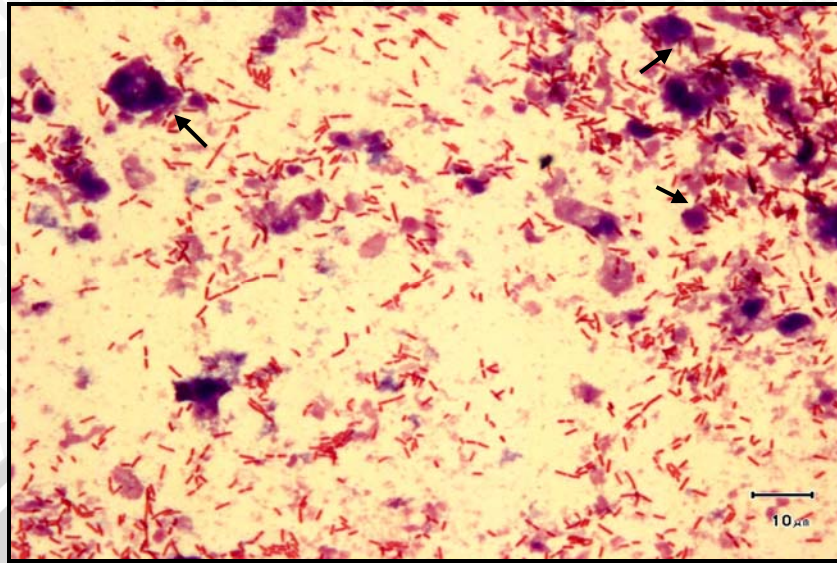
**Gambar 10.** Histologi jaringan usus ikan mas. Tanda panah hitam menunjukkan sel enterosit yang terletak di bagian paling dalam jaringan usus. Sel enterosit tampak sudah keluar dari jaringan epitel. Warna sel enterosit merah keunguan dengan pengecatan HE (Hemaktosilin Eusin), direkam dengan fotomikroskop Olympus, pembesaran 1000x. 1 BAR = 300 μm

Morfologi sel enterosit yang diisolasi dari usus ikan mas (*Cyprinus carpio*) dapat dilihat pada Gambar 11. Tampak inti sel yang terlihat jelas dengan warna merah bulat yang menonjol dan pada isolat tidak ditemukan adanya bakteri. Di bagian tepi sel terdapat *pilus* yang berperan dalam penyerapan makanan. Sel enterosit berukuran sekitar 4 – 10  $\mu\text{m}$ .



**Gambar 11. Gambaran sel enterosit ikan mas normal berbentuk bulat dan berwarna merah dan dibagian pinggir sel terdapat pilus (tanda panah hitam) yang berperan dalam penyerapan makanan dengan pengecatan safranin, direkam dengan fotomikroskop Olympus, pembesaran 1000x.  
1 BAR = 10  $\mu\text{m}$**

Hasil adesi bakteri *A. salmonicida* terhadap sel enterosit pada kondisi normal dengan pengamatan mikroskop terlihat pada Gambar 12. Pada perlakuan kontrol ini sel enterosit langsung diinfeksi dengan bakteri *A. salmonicida*. Pada gambar ini tampak sel enterosit berwarna ungu tua dikelilingi dan ditempeli bakteri *A. salmonicida* yang berwarna merah.

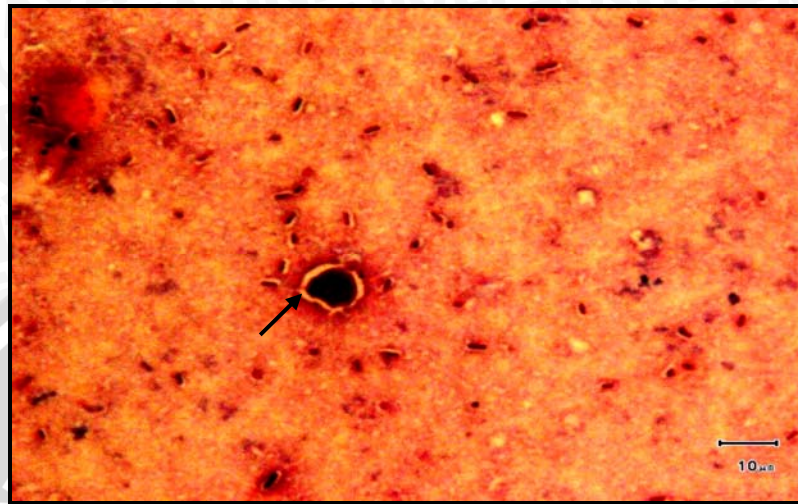


**Gambar 12. Gambaran adesi *A. salmonicida* pada sel enterosit ikan mas (tanda panah hitam) yang menunjukkan adanya perlekatan bakteri terhadap sel enterosit dengan tipe adesi lokal. Warna ungu tua adalah sel enterosit sedangkan warna merah adalah bakteri *A. salmonicida* dengan pengecatan gram, direkam dengan fotomikroskop Olympus, pembesaran 1000x.  
1 BAR = 10  $\mu\text{m}$**

Hasil uji adesi menunjukkan adanya perlekatan bakteri pada enterosit yang tipe perlekatan adalah lokal, yaitu menggerombol pada permukaan sel reseptor. Selanjutnya, hasil uji adesi di atas dibandingkan dengan hasil uji hambat adesi.

Dalam uji hambat adesi ini, berbagai dosis pengenceran protein hemaglutinin pili 9,08 kDa *A. salmonicida* disalutkan pada sel enterosit. Enterosit yang telah disalut selanjutnya diinfeksi dengan bakteri *A. salmonicida*. Setelah diinfeksi kemudian dilihat gambaran sel enterositnya dan dihitung indeks adesinya, yaitu bakteri yang melekat pada satu sel enterosit. Dosis protein pili 9,08 kDa dibuat 7 macam konsentrasi pengenceran diantaranya: 1,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$ ,  $\frac{1}{64}$  dengan pengulangan masing-masing 3 kali. Perbandingan konsentrasi ini digunakan untuk mengetahui sejauh mana konsentrasi tertinggi dosis protein adesi yang dapat menghambat penempelan bakteri pada setiap sel reseptor. Untuk melihat gambaran sel enterosit dan menghitung indeks

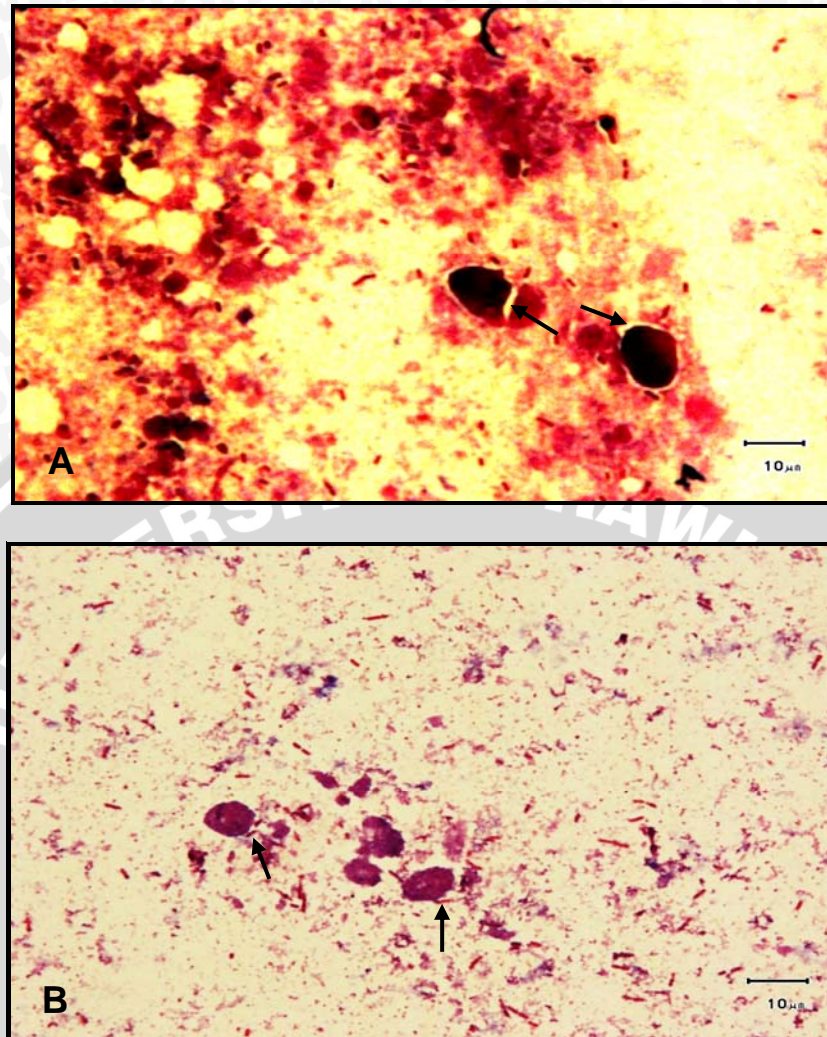
adesi ini diperlukan pewarnaan sediaan yaitu pewarnaan gram. Hasil uji hambat adesi dengan konsentrasi 1 dapat dilihat pada Gambar 13.



**Gambar 13.** Hasil uji hambat adesi sel enterosit ikan mas dan protein hemaglutinin pili 9,08 kDa *A. salmonicida* dengan konsentrasi 1. Tanda panah hitam menunjukkan telah terbentuknya bloker yang melapisi sel enterosit sehingga dapat menghambat penempelan bakteri. Pewarnaan yang digunakan adalah pewarnaan gram, direkam dengan fotomikroskop Olympus, pembesaran 1000x. 1 BAR = 10 μm

Hasil pengamatan mikroskopis terhadap gambaran adesi *A. salmonicida* pada sel enterosit ikan mas dengan pewarnaan gram menunjukkan peran protein reseptor pada sel enterosit ikan mas. Hal ini ditunjukkan oleh pola perlekatan bakteri *A. salmonicida* yang terlokalisasi pada permukaan membran sel enterosit. Gambar 13 di atas menunjukkan adanya bloker pada sel enterosit sehingga dapat menghalangi perlekatan antara *A. salmonicida* dengan sel enterosit ikan mas. Pemberian protein hemaglutinin pili 9,08 kDa *A. salmonicida* dengan konsentrasi 1 menyebabkan banyak bakteri tidak melekat pada sel enterosit.

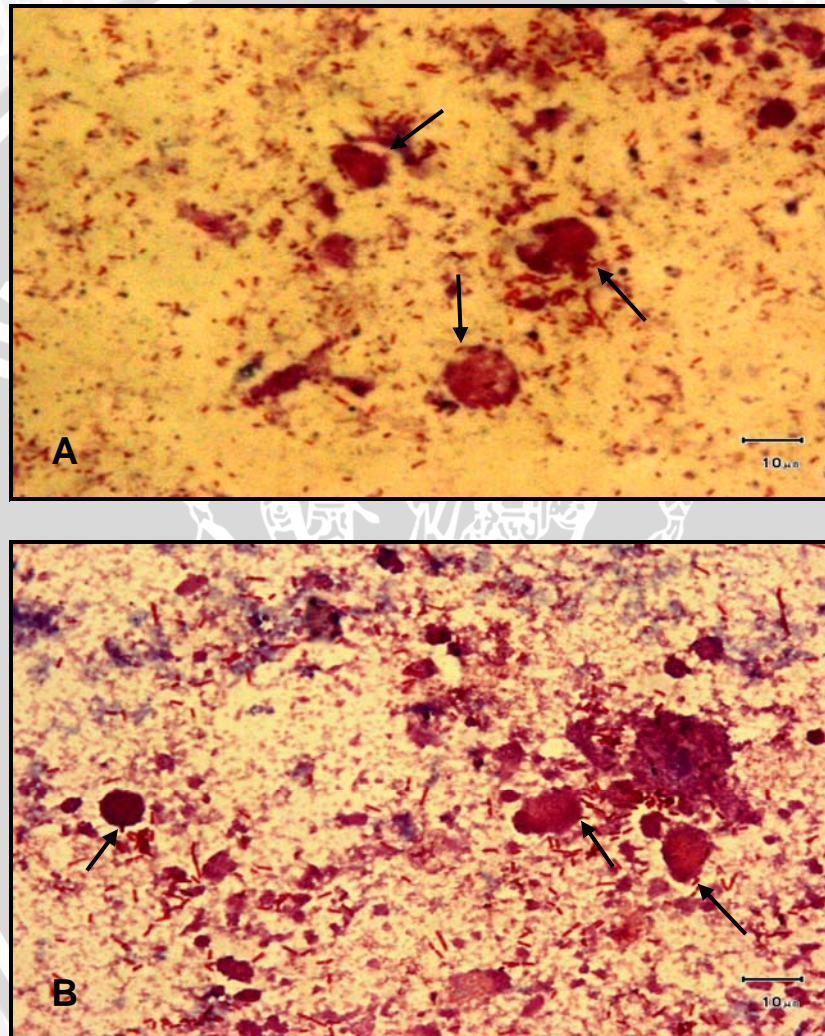
Pemberian dosis protein hemaglutinin selanjutnya diperkecil dengan menggunakan konsentrasi pengenceran 1 : 2 dan 1 : 4. Hasilnya tampak pada Gambar 14.



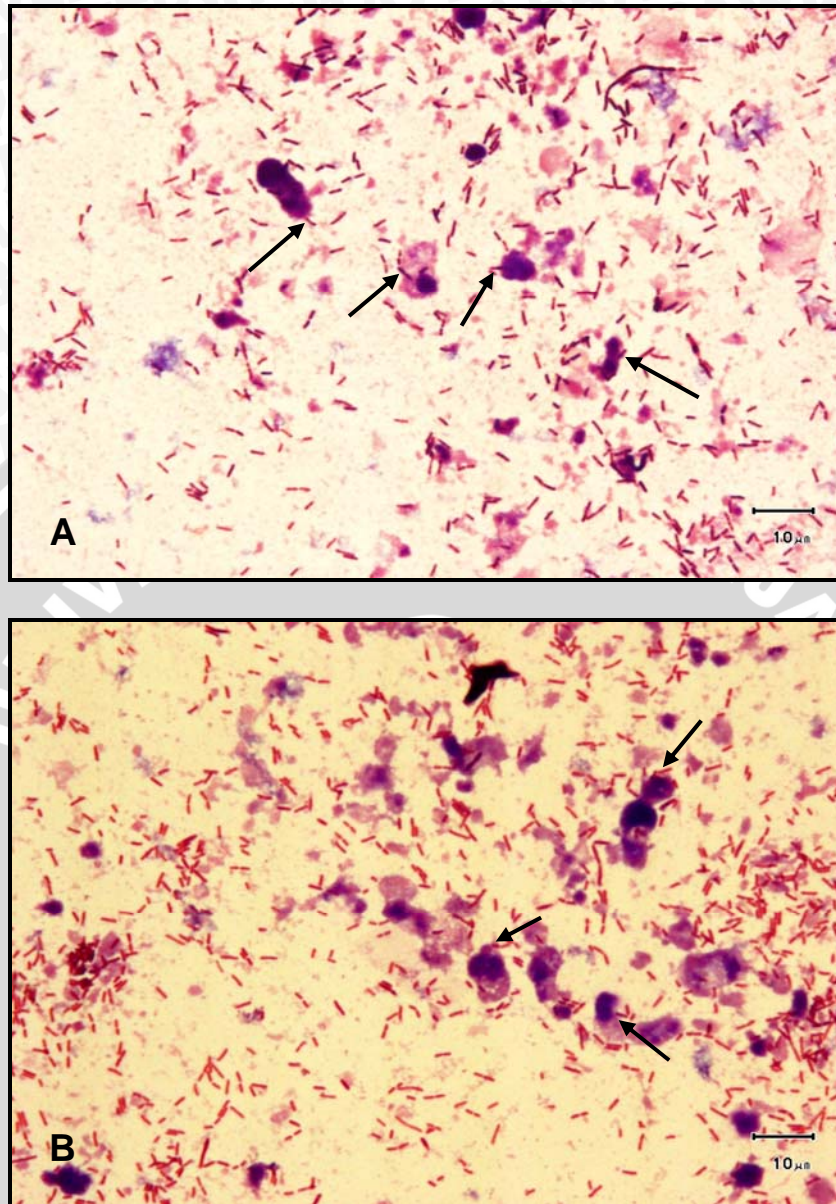
**Gambar 14.** Hasil uji hambat adesi sel enterosit ikan mas dan protein hemaglutinin pili 9,08 kDa *A. salmonicida* dengan konsentrasi pengenceran 1 : 2 (A) dan 1 : 4 (B). Tanda panah hitam pada gambar A menunjukkan mulai terbentuknya bloker yang melapisi sel enterosit sedangkan gambar B menunjukkan penempelan bakteri di sel enterosit. Pewarnaan yang digunakan adalah pewarnaan gram, direkam dengan fotomikroskop Olympus, pembesaran 1000x.  
1 BAR = 10 µm

Berdasarkan Gambar 14 tampak adanya penempelan *A. salmonicida* pada enterosit pada konsentrasi pengenceran 1 : 2 (A) dan 1 : 4 (B). Pada gambar A menunjukkan mulai terbentuknya bloker yang melapisi sel enterosit sehingga dapat menghambat penempelan bakteri. Pada gambar B menunjukkan belum terbentuknya

bloker pada sel enterosit sehingga bakteri bisa menempel di sel enterosit. Pengenceran protein hemaglutinin yang semakin tinggi, maka jumlah *A. salmonicida* yang melekat akan semakin banyak. Perlekatan *A. salmonicida* pada enterosit menunjukkan peningkatan jumlah dengan makin tingginya pengenceran protein hemaglutinin pili BM 9,08 kDa *A. salmonicida* seperti terlihat pada Gambar 15 dan Gambar 16.



**Gambar 15.** Hasil uji hambat adesi sel enterosit ikan mas dan protein hemaglutinin pili 9,08 kDa *A. salmonicida* dengan konsentrasi pengenceran 1 : 8 (A) dan 1 : 16 (B). Tanda panah hitam pada gambar A dan B menunjukkan penempelan bakteri di sel enterosit. Pewarnaan yang digunakan adalah pewarnaan gram, direkam dengan fotomikroskop Olympus, pembesaran 1000x.  
1 BAR = 10 µm



**Gambar 16.** Hasil uji hambat adesi sel enterosit ikan mas dan protein hemaglutinin pili 9,08 kDa *A. salmonicida* dengan konsentrasi pengenceran 1 : 32 (A) dan 1 : 64 (B). Tanda panah hitam pada gambar A dan B menunjukkan penempelan bakteri di sel enterosit. *A. salmonicida* yang melekat pada B lebih banyak dibandingkan dengan A. Pewarnaan yang digunakan adalah pewarnaan gram, direkam dengan fotomikroskop Olympus, pembesaran 1000x.  
1 BAR = 10  $\mu$ m

Peran protein adesi dan reseptor adalah merupakan langkah awal yang penting dalam mekanisme infeksi bakteri pada sel hospes. Adesi atau perlekatan bakteri terhadap



sel epitel ikan mas merupakan langkah awal yang efektif untuk terjadinya infeksi *A. salmonicida*.

Pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa pola adesi *A. salmonicida* terhadap sel enterosit ikan mas adalah adanya pola adesi yang lokal pada permukaan sel enterosit dan pola diffuse atau menyebar pada membran sel enterosit. Menurut Giri-Rahman (2004) dalam Sukoso dan Yanuhar (2006), pola tersebut merupakan tipe perlekatan bakteri dalam mengadakan proses infeksi terhadap sel inang dalam mekanisme infeksi bakteri.

Dijelaskan oleh Todar (2002) dalam Sukoso dan Yanuhar (2006) bahwa mekanisme infeksi bakteri juga melalui suatu mekanisme yang dinamakan *forced fagositosis*. *Forced fagositosis* pada bakteri patogen terhadap sel inang/hospes adalah merupakan proses adesi bakteri yang mulai menginfeksi sel, pada sel epitel melalui *gill bladder* pada ujung sel epitel biasanya bakteri menempel dan melakukan invasi untuk membentuk koloni dan selanjutnya mengeluarkan toksin. Mekanisme ini tidak terlepas dari fungsi kedua protein adesi maupun reseptornya saja tetapi secara lebih kompleks juga melibatkan unit-unit lain dalam mekanisme infeksi seperti sifat dan karakter molekuler dari kedua protein tersebut seperti jenis proteinnnya.

Mekanisme infeksi bakteri melalui proses adesi terhadap sel inang/hospes merupakan bagian awal untuk mengadakan interaksi dengan sel inang meliputi beberapa tahap, yaitu perlekatan atau adesi (*attachment*) pada permukaan inang, secara bersamaan diikuti masuknya bakteri ke dalam sel inang, dan diikuti tahap *invasi* serta penyebaran lokal atau sistemik dalam tubuh inang, *multiplikasi*, pada tahap ini biasanya terjadi kerusakan inang. Tahapan terakhir yaitu bakteri keluar dari tubuh inang dan mulai terjadi tahap perlekatan hingga tahap kerusakan inang. Dalam proses ini bakteri akan

menggunakan faktor virulensinya antara lain *pili* untuk mengadakan ikatan dengan reseptornya sehingga dapat bertahan dalam tubuh inang untuk melakukan proses infeksi lebih lanjut (Yanuhar, 2006).

#### 4.2 Indeks Adesi

Perlakuan beda konsentrasi pengenceran protein *pili* yang disalutkan pada sel enterosit ikan mas yang diinfeksi dengan bakteri *A. salmonicida* memberikan hasil yang berbeda terhadap jumlah indeks adesi. Pada perhitungan indeks adesi, yang dihitung adalah banyaknya bakteri yang menempel pada permukaan setiap sel enterosit, dihitung sampai seratus sel enterosit dan dibuat reratanya. Hasil perhitungan indeks adesi dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Indeks Adesi *Aeromonas salmonicida* Pada Sel Enterosit Ikan Mas Yang Disalut Protein HA *Pili* 9,08 kDa**

Konsentrasi	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
0	30,62	31,15	31,56	93,33	31,11
1/64	22,7	22,39	22,29	67,38	22,46
1/32	20,41	19,87	20,57	60,85	20,28
1/16	17,09	16,97	16,72	50,78	16,93
1/8	13,26	13,65	13,53	40,44	13,48
¼	11,85	11,34	11,27	34,46	11,49
½	7,64	7,57	7,42	22,63	7,54
1	3,32	3,42	3,47	10,21	3,40
<b>Total</b>	<b>126,89</b>	<b>126,36</b>	<b>126,83</b>	<b>380,08</b>	<b>126,69</b>

Berdasarkan hasil perhitungan indeks adesi dengan berbagai konsentrasi pengenceran dan berbagai ulangan tersebut memberikan gambaran bahwa semakin kecil konsentrasi protein adesi bobot molekul 9,08 kDa yang disalutkan pada sel enterosit ikan mas terhadap adesi *A. salmonicida* maka indeks adesinya semakin besar. Hal ini

dibuktikan dengan konsentrasi pengenceran  $1/64$  menunjukkan gambaran perlekatan *A. salmonicida* pada enterosit semakin banyak. Turunnya indeks adesi pada konsentrasi protein yang besar yakni konsentrasi 1 diindikasikan telah terbentuk *bloker* yang melapisi sel enterosit sehingga bakteri tidak mampu menginfeksi sel enterosit.

Untuk menentukan besarnya peningkatan konsentrasi protein hemaglutinin terhadap indeks adesi tersebut selanjutnya dilakukan analisa sidik ragam. Analisa tersebut untuk menentukan bahwa masing-masing perlakuan memberikan perbedaan nyata dengan taraf signifikansi 5 %. Analisa lebih lanjut yaitu dengan analisa regresi. Analisa regresi digunakan untuk menentukan adanya kecenderungan peningkatan pemberian protein hemaglutinin terhadap indeks adesi *A. salmonicida* (Lampiran 6). Perhitungan dilakukan dengan menggunakan SPSS 16.0 *for windows* pada derajat kepercayaan 95%. Hasil uji sidik ragam indeks adesi *A. salmonicida* pada sel enterosit ikan mas yang disalut protein HA pili 9,08 kDa seperti terlihat pada Tabel 4.

**Tabel 4. Analisa Sidik Ragam Indeks Adesi**

	Jumlah Kuadrat (JK)	db	Kuadrat Tengah (KT)	F	Sig.
Perlakuan	1637,843	7	233,978	3137,656*	0,000
Acak	1,193	16	0,075		
Total	1639,036	23			

Ket : \* Berbeda nyata

Tabel 4 menunjukkan bahwa nilai signifikansi (sig.) adalah kurang dari 0,05 sehingga dapat dikatakan bahwa perlakuan pemberian protein pili yang berbeda konsentrasi pengencerannya berpengaruh secara nyata terhadap jumlah indeks adesi.

Untuk mengetahui respon terbaik dari perlakuan, digunakan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%). Hasil penghitungan uji BNT indeks adesi dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5. Uji BNT Indeks Adesi**

Dosis	N	Notasi								
		a	b	c	d	e	f	g	h	
Tukey	1	3	3,4033							
LSD(a)	1/2	3		7,5433						
	1/4	3			11,4867					
	1/8	3				13,4800				
	1/16	3					16,9267			
	1/32	3						20,2833		
	1/64	3							22,4600	
	0	3								31,110
Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabel 5 menunjukkan bahwa masing-masing perlakuan berbeda nyata terhadap perlakuan yang lain. Pernyataan tersebut menunjukkan semakin kecil konsentrasi protein yang disalutkan maka indeks adesi semakin meningkat. Semakin besar konsentrasi protein yang disalutkan yakni konsentrasi 1 mampu memberikan tingkat penghambatan tertinggi pada *A. salmonicida* untuk dapat menempel pada sel inangnya. Hal ini semakin membuktikan peran protein HA pili 9,08 kDa yang fungsinya sebagai protein “blocker” mampu menjenuhkan reseptor epitel ikan mas sehingga proses perlekatan *A. salmonicida* terhadap sel epitel dapat dikurangi.

Menurut Wizzeman *et al.* (1999), protein yang diduga sebagai protein hemaglutinin disalutkan pada sel hospes dengan konsentrasi yang semakin meningkat. Penyalutan protein ini dimaksudkan untuk menjenuhkan reseptor yang terlibat dalam proses perlekatan. Ujung pili telah diketahui berfungsi sebagai perlekatan bakteri dengan

molekul pada permukaan sel hospes. Perlekatan bakteri pada permukaan sel hospes dapat dihambat oleh protein adesi atau protein reseptor yang telah diisolasi. Penemuan bahwa adesi sebagai tahap awal dalam proses infeksi pada kebanyakan bakteri, menunjukkan bahwa protein adesi tersebut sangat mungkin digunakan sebagai komponen vaksin yang baik (Todar, 2002).

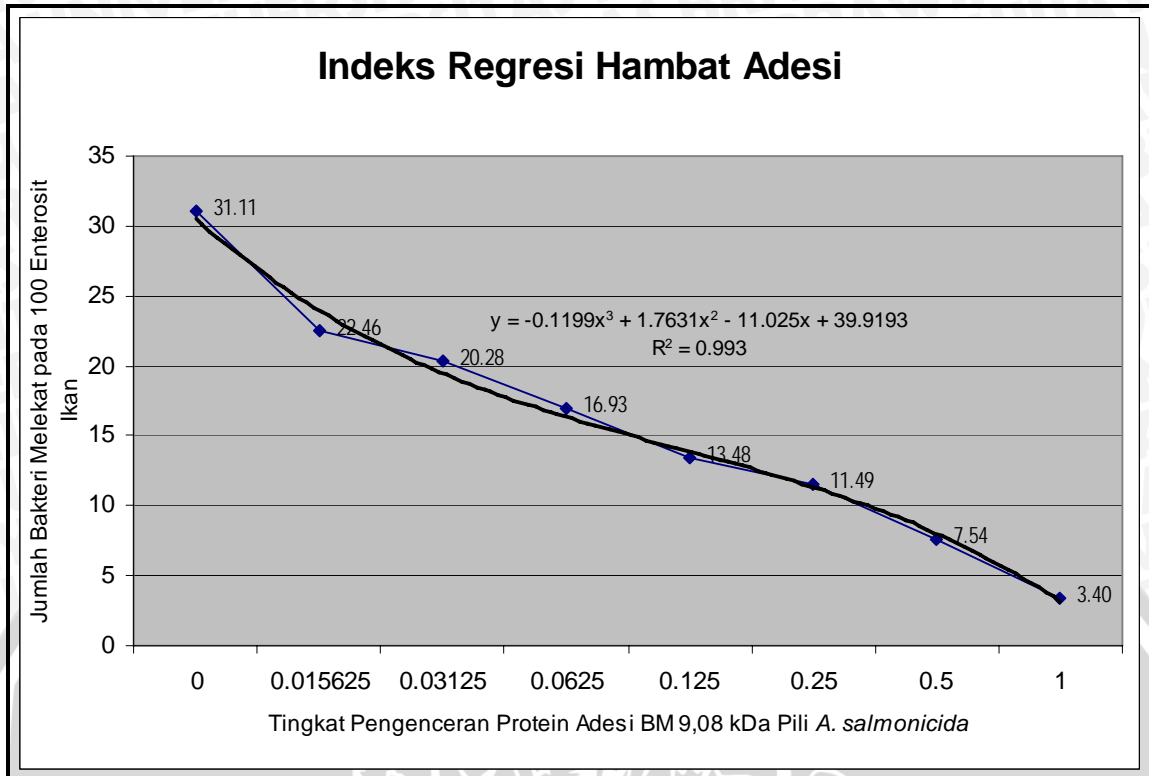
Dalam mengetahui hubungan antara pemberian protein pili dengan konsentrasi pengenceran yang berbeda terhadap jumlah indeks adesi antara sel enterosit ikan mas dalam menghadapi serangan bakteri *A. salmonicida*, dilakukan analisa *curve estimation* dengan menggunakan SPSS 16.0 *for windows*. Hasil penghitungan penentuan model regresi dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6. Analisa Curve Estimation Jumlah Indeks Adesi dengan Pemberian Protein HA Pili 9,08 kDa pada Konsentrasi Pengenceran yang Berbeda**

Regresi	Ringkasan Model				Estimasi Parameter			
	R kuadrat	r	F	Sig.	Konstan	b1	b2	b3
Linier	0,971	0,985	198,06*	0,000	31,8214	-3,5523		
Kuadratik	0,977	0,988	106,13*	0,000	33,9830	-4,8492	0,1441	
Kubik	0,993	0,996	179,63*	0,000	39,9193	-11,025	1,7631	-0,1199

Ket : \* Berbeda nyata

Tabel 6 terlihat bahwa nilai signifikansi regresi linier, kuadratik dan kubik besarnya sama yaitu 0,000. Sedangkan untuk nilai R kuadrat, model kubik memberikan nilai R kuadrat yang lebih besar dibandingkan regresi linier dan kuadratik. Sehingga model regresi kubik lebih sesuai digunakan sebagai penduga hubungan pemberian protein HA pili 9,08 kDa dengan konsentrasi pengenceran yang berbeda terhadap jumlah indeks adesi (Gambar 17).



**Gambar 17. Hasil analisa regresi antara indeks adesi dengan berbagai dosis pengenceran protein hemaglutinin pili BM 9,08 kDa *A. salmonicida***

Hasil perhitungan indeks adesi *A. salmonicida* terhadap sel enterosit ikan mas dari berbagai dosis pengenceran protein adesi yang ditentukan yaitu bobot molekul 9,08 kDa dengan analisa regresi menunjukkan bahwa nilai regresi  $R^2 = 0,993$  dengan persamaan  $y = -0,1199 x^3 + 1,7631 x^2 - 11,025 x + 39,9193$ . Berdasarkan hasil analisa regresi tampak bahwa dosis pengenceran protein hemaglutinin berpengaruh sangat nyata terhadap indeks adesi *A. salmonicida* pada sel epitel dengan tingkat kepercayaan 95% dengan  $R^2 = 0,993$ . Hal ini menunjukkan bahwa masing-masing dosis pengenceran bila dibandingkan memberikan hasil berbeda secara signifikan dengan tingkat kepercayaan 95%.

Gambar 17 menunjukkan bahwa semakin besar tingkat pengenceran protein pili 9,08 kDa maka jumlah bakteri yang melekat pada 100 sel enterosit ikan mas semakin

menurun. Titer pengenceran protein pili tertinggi (konsentrasi  $1/64$ ) menunjukkan adesi *A. salmonicida* pada sel enterosit yang meningkat bila dibandingkan dengan konsentrasi 1 dan konsentrasi pengenceran  $1/2$ ,  $1/4$ ,  $1/8$ ,  $1/16$  dan  $1/32$ . Dengan demikian menunjukkan bahwa pemberian protein hemagglutinin pili 9,08 kDa dapat menurunkan indeks adesi. Hasil ini memberi bukti bahwa semakin besar konsentrasi protein pili 9,08 kDa yang disalut pada sel epitel ikan mas menurunkan indeks adesi bakteri *A. salmonicida*. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa protein HA pili 9,08 kDa merupakan protein adesi pili 9,08 kDa (AdhF 9,08 kDa).

Berdasarkan kajian literatur, protein adesi adalah protein yang mempunyai peran penting dalam proses perlekatan bakteri pada sel inang, dan merupakan faktor virulensi bakteri yang mempunyai potensi imunogenik (Giannasca, 1996 dalam Maftuch, 2006<sup>a</sup>). Oleh karena itu perlu dilakukan kajian tentang potensi imunogenik protein AdhF 9,08 kDa untuk membuktikan imunogenisitasnya.

## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

- Pola perlekatan bakteri *A. salmonicida* pada sel enterosit ikan mas adalah pola adesi lokal yang menggerombol pada permukaan sel enterosit dan pola diffuse yang terlihat dalam paparan yang merata pada membran sel enterosit.
- Protein hemaglutinin pili BM 9,08 kDa merupakan protein adesi (AdhF) karena mampu menghambat perlekatan *A. salmonicida* pada reseptor sel enterosit ikan mas. Dalam uji hambat adesi, semakin tinggi konsentrasi protein hemaglutinin pili 9,08 kDa yang disalutkan pada sel reseptor akan menurunkan indeks adesi *A. salmonicida* pada sel enterosit ikan mas.

### 5.2 Saran

Berdasarkan uraian hasil penelitian dan kesimpulan, maka dapat disarankan penelitian lebih lanjut untuk meneliti protein AdhF 9,08 kDa *A. salmonicida* merupakan protein imunogenik sehingga dapat menambah penjelasan tentang patogenesis dari *A. salmonicida*.



## DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2003. **Pedoman Praktikum Isolasi Protein dan Elektroforesis**. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang. 22 hal.
- \_\_\_\_\_. 2007<sup>a</sup>. **Penyakit Ikan Karantina Golongan Bakteri**. <http://www.dkp.go.id/content.php>. Diakses Tanggal 20 April 2008, pukul 15.00.
- \_\_\_\_\_. 2007<sup>b</sup>. **Metode Standar Pemeriksaan HPIK Golongan Bakteri**. Departemen Kelautan dan Perikanan. Pusat Karantina Ikan.
- Afrianto E. dan E. Liviawaty. 1992. **Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan**. Kanisius. Yogyakarta. 89 hal.
- Austin, B., and D.A. Austin. 1987. **Bacterial Fish Pathogen: Disease in Farmed and Wild Fish**. John Wiley and Sons. USA. 364 hal.
- Bellanti, J. A. 1993. **Imunologi III**. Alih bahasa; A. S. Wahab. Gadjah Mada Press. Yogyakarta. 647 hal.
- Cholik, F., A.G. Jagatraya, R.R. Poernomo dan A. Jauzi. 2005. **Akuakultur, Tumpuan Harapan Masa Depan Bangsa**. Masyarakat Perikanan Nusantara. Jakarta. 415 hal
- Djarajah, A.S. 2001. **Pembenihan Ikan Mas**. Kanisius. Yogyakarta. 87 hal.
- Evans D., D. Jr. Evans, J. J. Mouldes dan D. Y. Graham. 1988. **N-acetylneuraminyllactose – Binding Fibrillar of Campilobacter Pylori : Putative Colonization Factor Antigen**. Infectior and Immunity. Page 2890-2896.
- Favre-Bonte, S., Darfeuille-Michaud, and C. Foriestier. 1995. **Aggregatve Adherence of Klebsiella Pneumoniae to Human Intetine-407**. Infect Immune. 63: 1318-1328.
- Freeman B. A., and Burrows. 1985. **Textbook of Microbiology**, 27<sup>th</sup> Edition. Saunders Company. America. 1038 p.
- Fujaya Y. 2004. **Fisiologi Ikan**. Penerbit Rineka Cipta. Jakarta. 179 hal.

- Greenwood D., R. C. B. Sleek dan J. F. Reutherer. 1992. **Medical Microbiology**. Edisi 14<sup>th</sup>. London: Lagman Group Ltd. 827 p.
- Irianto, A. 2003. **Probiotik Akuakultur**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 125 hal.
- Jawetz E., J. L. Melnick and E. A. Adelberg's. 1991. **Medical Microbiology**, 19<sup>th</sup> Edition. Appleton and Lange. USA. 593 p.
- Laminem. 2007. **Kajian Efektifitas Ciprofloxacin Terhadap Infeksi *Aeromonas salmonicida* Pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)**. Tesis. Program Magister Budidaya Perairan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 74 hal.
- Leeson, C. R., S.L. Thomas, dan A. P. Anthony. 1995. **Textbook of Histology**. Diterjemahkan oleh dr. S. Koesparto Siswodo, dkk. Kedokteran EGC. Jakarta. 622 hal.
- Livingstone, C. 1989. **Churchill's Medical Dictionary**. New York. 183 p.
- Maags A. 1996. **Bacterial Pathogenesis**. Review. Departement of Microbiology and Immunology. New York. 5 p.
- Maftuch. 2006<sup>a</sup>. **Outer Membran Protein (Omp) *Vibrio alginolyticus* Sebagai Vaksin Untuk Mengendalikan Penyakit Vibriosis yang Disebabkan *V. alginolyticus* Pada Ikan Kerapu Tikus Di Perairan**. Disertasi. Universitas Brawijaya Program Pasca Sarjana. Malang. 174 hal.
- \_\_\_\_\_. 2006<sup>b</sup>. **Adesi Protein Omp 42,95 kDa Pada Perlekatan *Vibrio alginolyticus* Sel Epitel Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)**. Jurnal Penelitian Perikanan. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 9: 183-187.
- \_\_\_\_\_, U. Yanuhar, Satuman, Sukoso, Sumarno. 2004. **Karakterisasi Pili *Vibrio alginolyticus* Sebagai Faktor Virulensi Bakteri Patogen**. Prosiding Pengendalian Penyakit Pada Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity. Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Purwokerto. Hal 128-134.
- Maloy S. R., V. J. Stewart, R. K. Taylor. 1996. **Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria, A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 28 p.

- Mc. Garey D. J. and D. R. Alred. 1994. **Characterization of Hemagglutinating Components on The Anaplama Marginale Initial Ody Surface and Identification of Possible Adhesin**, Infection and Immunity, Oktober 1994, 4587-4593.
- Merz, A. 2000. **Interactions of Pathogenic Neisseriae With Epithelial Cell Membranes**. Annu Rev Cell Dev Biol. 16: 23-57.
- Muhammad, S., 1992. **Diktat Kuliah Dasar - Dasar Metodologi Penelitian Dan Rancangan Percobaan**. LUW/UNIBRAW FISH Fisheries Project. Malang. 87 hal.
- Nabib R. dan H. P. Fachriyan. 1989. **Patologi dan Penyakit Ikan**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi dan Institut Pertanian Bogor. Bogor. 158 hal.
- Nagayama K., T. Oguchi, M. Arita dan T. Honda. 1995. **Purification and Characterization of A Cell-Associated Hemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus***. Infection and Immunity. 63 (5): 1987-1992.
- Nazir, M. 2003. **Metode Penelitian**. Ghalia Indonesia. Jakarta. 544 hal.
- Prajitno, A. 2007. **Penyakit Ikan-Udang: Bakteri**. Cetakan I. Universitas Negeri Malang. Malang. 115 hal.
- Rahmawati, A. 2008. **Karakterisasi Protein Hemagglutinin Pili *Aeromonas salmonicida* Terhadap Eritrosit Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)**. Skripsi. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 63 hal.
- Roitt, I. M. 1990. **Pokok-Pokok Ilmu Kekebalan**. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 362 hal.
- Ryan K. J. 1994. **Sherris Medical Microbiology an Introduction to Infectious Disease (3<sup>rd</sup> ed)**. Appleton and Lange. USA. Page 332-338.
- Saputra, I. N. 2002. **Deteksi Hemagglutinin, Tipe Adhesi dan Indeks Adhesi *Pseudomonas Aeruginosa* Dari 3 Spesimen Yang Berbeda**. Skripsi. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Malang. 93 hal.
- Sumarno. 2000. **Karakterisasi Molekuler Protein Adhesi *Vibrio Cholerae* 01 M094V dan Protein Reseptornya Pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih (Wistar). Studi Patogenesis *Vibrio Cholerae* 01 M094V**. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya. 203 hal.

- Sukoso, dan U. Yanuhar. 2006. **Peran Protein Reseptor Sel Epitel Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Terhadap Adesi Bakteri *Vibrio alginolyticus*.** Jurnal Penelitian Perikanan. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 9: 176-182.
- Surakhmad, W. 1980. **Pengantar Penelitian Ilmiah: Dasar, Metode dan Teknik.** Tarsito. Bandung. 338 hal.
- Susanto H. dan Rochdianto. 2002. **Kiat Budidaya Ikan Mas di Lahan Kritis.** Penebar Swadaya. Jakarta. 129 hal.
- Tandya, S. 2006. **Peran Protein Ahesin *Mycobacterium tuberculosis* Dalam Menginduksi *Secretory Immunoglobulin A* Mukosa Usus dan Bronkiolus Mencit BALB/c Upaya Memperoleh Bahan Dasar Vaksin Oral Tuberkulosis.** Disertasi. Program Doktor Ilmu Kedokteran Minat Biomedik. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang. 190 hal.
- Todar K. 1999. **Colonization and Invation.** Page 1-5. <http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/disease/colonize.html>. Diakses Tanggal 20 April 2008, pukul 14.00.
- \_\_\_\_\_. 2002. **Structure and Function of Procaryotic Cells.** **Todar's Online Textbook of Bacteriology.** University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net /structure.html> . Diakses pada tanggal 20 April 2008.
- Velden A. M. W., A. J. Baumler, R. M. Tsolis, F. Heffron. 1998. **Multiple Fimbrial Adhesins are Required for Virulence of *Salmonella typhimurrium* in Mice.** Infection and Immunity. 66 (6): 2803-2808.
- Virella G. 1997. **Microbiology and Infectious Disease (3<sup>rd</sup> ed).** Baltimore: William and Wilkins a Waverly Company. Page 148-151.
- Wizemann, T.M., J. E. Adomoum, and S. Langermann. 1999. **Adhesin as a Target for Vaccine Development.** Centre for Disease Control and Prevention. USA. Page 1-5
- Yanuhar, U. 2006. **Karakterisasi dan Identifikasi Molekuler Prorein Adesi Pili *Vibrio alginolyticus* dan Reseptornya Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*).** Disertasi. PPS-UNIBRAW. 183 hal.

\_\_\_\_\_, Maftuch, Satuman, Sukoso, Sumarno. 2004. **Karakterisasi Molekul Adesi Protein Pili *Vibrio parahaemolyticus* Pada Sel Epitel Ikan Kerapu Tikus *Cromileptes altivelis***. Prosiding Pengendalian Penyakit Pada Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity. Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Purwokerto. Hal 25-32.

Yitnosumarto, S., 1995. **Dasar-dasar Statistika : Percobaan, Perencanaan. Analisa dan Interpretasinya**. PT Gramedia Pustaka Umum. Jakarta. 404 hal.

Zonneveld N., E. A. Huisman dan J. H. Boon. 1991. **Prinsip-Prinsip Budidaya Ikan**. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 301 hal.

Zubay, G. L. 1989. **Biochemistry 2<sup>nd</sup> Edition**. Mcmillan Publishing Cooperation. New York. 1266 hal.



Lampiran 1. Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)



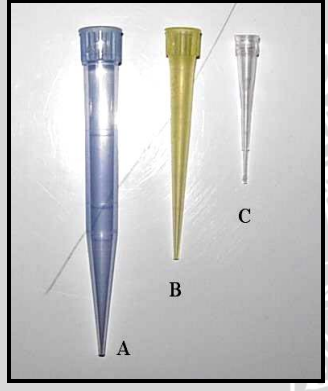
### Lampiran 2. Peralatan Penelitian

#### - Pipet Mikro



A. Pipet Mikro 1000 µl  
B. Pipet Mikro 200 µl  
C. Pipet Mikro 50 µl

#### - Tips



A. Blue tip  
B. Yellow tip  
C. White tip

#### - Vortex



#### - Falkon dan Eppendorf



A. Falkon 15 cc  
B. Eppendorf

#### Magnetic stirrer



#### - Inkubator



Lampiran 2 (Lanjutan).

- Timbangan analitik



- Refrigerated centrifuge



- Autoklaf



- Alat-alat Gelas



- Shaker incubator



- Mikroskop



- Bunsen





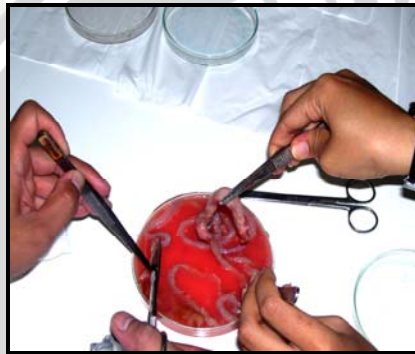
### Lampiran 3. Prosedur Isolasi Sel Enterosit



Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)



Ditusuk medulla oblongata dan dibedah



Cuci dengan PBS (pH 7.4) sampai bersih



Diambil jaringan usus dan dipotong ukuran 5 cm. Buka lumen usus dengan cara dipotong melintang.



Cuci dengan larutan A sebanyak 2 kali sampai bersih

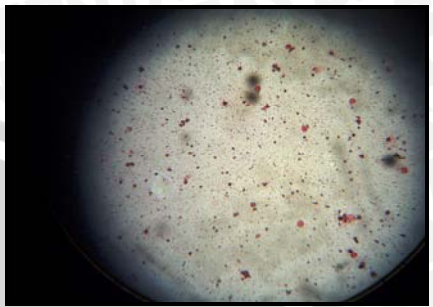


Digoyang pelan agar selaput yang menempel di jaringan usus lepas. Setelah dicuci, jaringan usus dimasukkan ke dalam falkon 50 ml dan rendam dengan 20 ml larutan B.

Lampiran 3 (Lanjutan).



Digoyang pada *shaker waterbath* dengan suhu 37 °C selama 15'.



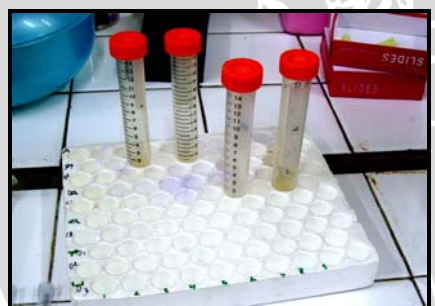
Diamati di bawah mikroskop perpecahan sel enterositnya



Sentrifugasi 1000 rpm selama 5'



Digoyang lagi untuk 15' kedua



Buang supernatan, sisakan pelet. Pelet dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 5 ml.



Sentrifugasi 1000 rpm selama 5'. Pencucian dengan PBS dilakukan sebanyak 3 kali.



Diinkubasi pada suhu 37 °C.



Dimasukkan dalam eppendorf



### Lampiran 4. Prosedur Preparasi Sel Bakteri

**Bakteri**  
*Aeromonas salmonicida*



10 ml sampel bakteri *A. salmonicida*  $10^6$  sel/ml dipindah ke falkon 15 cc. Pemandahan dilakukan dengan cara dituang di atas api bunsen



Bakteri *A. salmonicida* dalam falkon



Sentrifuge pada 3500 rpm selama 10 menit.

Buang supernatan, sisahkan pelet pada dasar falkon



Ditambahkan PBS pH 7,4 sampai ukuran 5 cc & di vortex

Buang supernatan, pelet tambahkan PBS pH 7,4 sampai ukuran 1 cc



Sentrifuge 3500, 10 menit untuk pencucian

## Lampiran 5. Prosedur Uji Hambat Adesi *A. salmonicida* Dengan Sel Enterosit

(Metode Nagayama)

Sebelum melakukan prosedur hambat adesi *A. salmonicida* dengan sel enterosit dilakukan terlebih dahulu pengenceran antigen.

### Pengenceran antigen :

Perlakuan K = Tanpa pemberian antigen

Perlakuan A = Konsentrasi 1 (Ambil 50  $\mu$ l antigen dan masukkan pada epp 1)

Perlakuan B = Konsentrasi pengenceran  $1/2$  (Ambil 50  $\mu$ l antigen dan 50  $\mu$ l PBS, masukkan pada epp  $1/2$  dan dipipeting)

Perlakuan C = Konsentrasi pengenceran  $1/4$  (Ambil 50  $\mu$ l dari epp  $1/2$  dan 50  $\mu$ l PBS, masukkan pada epp  $1/4$  dan dipipeting)

Perlakuan D = Konsentrasi pengenceran  $1/8$  (Ambil 50  $\mu$ l dari epp  $1/4$  dan 50  $\mu$ l PBS, masukkan pada epp  $1/8$  dan dipipeting)

Perlakuan E = Konsentrasi pengenceran  $1/16$  (Ambil 50  $\mu$ l dari epp  $1/8$  dan 50  $\mu$ l PBS, masukkan pada epp  $1/16$  dan dipipeting)

Perlakuan F = Konsentrasi pengenceran  $1/32$  (Ambil 50  $\mu$ l dari epp  $1/16$  dan 50  $\mu$ l PBS, masukkan pada epp  $1/32$  dan dipipeting)

Perlakuan G = Konsentrasi pengenceran  $1/64$  (Ambil 50  $\mu$ l dari epp  $1/32$  dan 50  $\mu$ l PBS, masukkan pada epp  $1/64$  dan dipipeting)

Lampiran 5 (Lanjutan).

Eppendof masing-masing perlakuan



Tambahkan sel enterosit masing-masing epp sebanyak 50  $\mu$ l



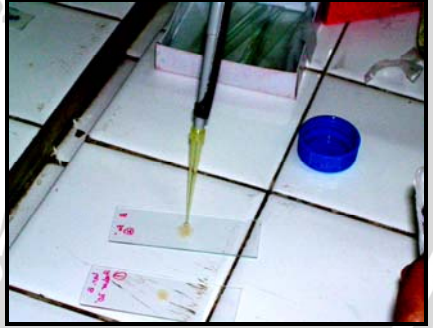
Angkat & tambahkan sel bakteri *A. salmonicida* masing-masing epp sebanyak 20  $\mu$ l



Digoyang pada *shaker waterbath* suhu 37  $^{\circ}$ C, selama 30 menit



Digoyang lagi pada *shaker waterbath* suhu 37  $^{\circ}$ C, selama 30 menit



Ambil & tetesi pada obyek glass. Buat hapusan pada obyek glass.

Lampiran 5 (Lanjutan).



Dikeringanginkan/ difiksasi di atas bunsen



Pengecatan gram



Amati dengan mikroskop dengan pembesaran 1000x dan hitung indeks adesi.



Dikeringanginkan

**Lampiran 6. Data dan Perhitungan Indeks Adesi**

Konsentrasi	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
0	30,62	31,15	31,56	93,33	31,11
1/64	22,7	22,39	22,29	67,38	22,46
1/32	20,41	19,87	20,57	60,85	20,28
1/16	17,09	16,97	16,72	50,78	16,93
1/8	13,26	13,65	13,53	40,44	13,48
1/4	11,85	11,34	11,27	34,46	11,49
1/2	7,64	7,57	7,42	22,63	7,54
1	3,32	3,42	3,47	10,21	3,40
<b>Total</b>	<b>126,89</b>	<b>126,36</b>	<b>126,83</b>	<b>380,08</b>	<b>126,69</b>

**Deskriptif**

Dosis	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error	Selang kepercayaan 95%		Minimum	Maksimum
					Batas bawah	Batas atas		
0	3	31,1100	0,47127	0,27209	29,9393	32,2807	30,62	31,56
1/64	3	22,4600	0,21378	0,12342	21,9290	22,9910	22,29	22,70
1/32	3	20,2833	0,36679	0,21177	19,3722	21,1945	19,87	20,57
1/16	3	16,9267	0,18877	0,10899	16,4577	17,3956	16,72	17,09
1/8	3	13,4800	0,19975	0,11533	12,9838	13,9762	13,26	13,65
1/4	3	11,4867	0,31660	0,18279	10,7002	12,2731	11,27	11,85
1/2	3	7,5433	0,11240	0,06489	7,2641	7,8225	7,42	7,64
1	3	3,4033	0,07638	0,04410	3,2136	3,5931	3,32	3,47
Total	24	15,8367	8,44171	1,72316	12,2720	19,4013	3,32	31,56

Keterangan : Standart deviasi adalah indeks bias antara data dengan grafik regresi  
Standart error adalah indeks kesalahan dalam menentukan hipotesis

**Test Homogenitas Variansi**

rerata

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,785	7	16	0,160

Test Homogeneity of Variences menunjukkan bahwa analisa ini bisa diterima dengan menggunakan rancangan RAL karena sig. > 0,05

**Lampiran 6 (Lanjutan).**

**ANOVA**

	<b>Jumlah Kuadrat (JK)</b>	<b>db</b>	<b>Kuadrat Tengah (KT)</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Perlakuan	1637,843	7	233,978	3137,656	0,000
Acak	1,193	16	0,075		
Total	1639,036	23			

Dari uji ANOVA, didapat F hitung adalah 3137,656 dengan tingkat signifikansi 0,000. Hal ini menunjukkan pengaruh jumlah indeks adesi secara keseluruhan sudah signifikan.

**Uji Beda Nyata Terkecil**

<b>Dosis</b>	<b>N</b>	<b>Notasi</b>								
		<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>	<b>h</b>	
Tukey	1	3	3,4033							
LSD(a)	1/2	3		7,5433						
	1/4	3			11,4867					
	1/8	3				13,4800				
	1/16	3					16,9267			
	1/32	3						20,2833		
	1/64	3							22,4600	
	0	3								31,110
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Dari uji beda nyata terkecil, menunjukkan bahwa kedelapan perlakuan mempunyai perbedaan yang nyata dalam jumlah indeks adesi.

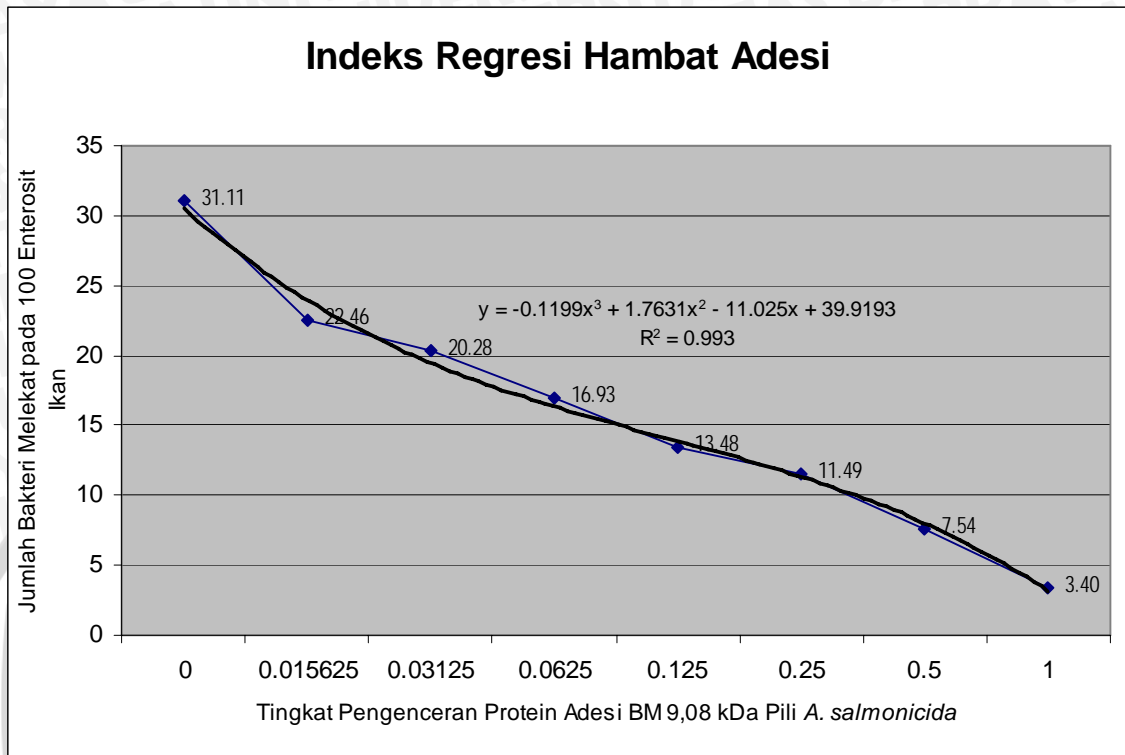
**Ringkasan Model dan Estimasi Parameter**

<b>Regresi</b>	<b>Ringkasan Model</b>				<b>Estimasi Parameter</b>			
	<b>R kuadrat</b>	<b>r</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>	<b>Konstan</b>	<b>b1</b>	<b>b2</b>	<b>b3</b>
Linier	0,971	0,985	198,06*	0,000	31,8214	-3,5523		
Kuadratik	0,977	0,988	106,13*	0,000	33,9830	-4,8492	0,1441	
Kubik	0,993	0,996	179,63*	0,000	39,9193	-11,025	1,7631	-0,1199

Ket : \* Berbeda nyata



Lampiran 6 (Lanjutan).



Grafik Hubungan Tingkat Pengenceran Protein Adesi BM 9,08 kDa Pili *A. salmonicida* dengan Jumlah Bakteri yang Melekat pada 100 Enterosit Ikan Mas

