# KARAKTERISTIK PROTEIN PLASMA DARAH IKAN MAS (Cyprinus carpio L) YANG DIINFEKSI BAKTERI Aeromonas hydrophila

### **SKRIPSI**

# MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN BUDIDAYA PERAIRAN

Oleh :
ASTRID INDRIATI
NIM. 0410850008



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

**MALANG** 

2009

### **KATA PENGANTAR**

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga Skripsi yang berjudul "Karakteristik Protein Plasma Darah Ikan Mas (Cyprinus carpio L) Yang Diinfeksi Bakteri Aeromonas hydrophila." ini dapat diselesaikan.

Dengan selesainya skripsi ini penulis mengucapkan terimakasih yang sebesarbesarnya kepada:

- Papa (Alm) dan Mama serta Kakak-kakak tercinta yang telah memberikan doa dan dukungan, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
- Dr. Ir. Sri Andayani, MS., selaku dosen pembimbing I.
- Ir. M. Rasyid Fadholi, MSi., selaku dosen pembimbing II
- Prof. Ir. Marsoedi, Phd., selaku dosen penguji I
- Ir. Soelistyowati, selaku dosen penguji II
- Mas Yudha atas bimbingan selama di laboratorium biomedik
- Seluruh anggota team penelitian, atas segala motivasi dan semangatnya.
- Semua teman, sahabat serta BP angkatan 2004, atas supportnya selama ini.

Penulis menyadari bahwa hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik dari semua pihak demi perbaikan skripsi ini. Harapan penulis semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, 16 Februari 2009

Penulis

### RINGKASAN

**ASTRID INDRIATI.** Karakteristik Protein Plasma Darah Ikan Mas (Cyprinus carpio L) Yang Diinfeksi Bakteri Aeromonas hydrophila (Di bawah bimbingan **Dr. Ir Sri Andayani, MS** dan **Ir. M. Rasyid Fadholi, MSi**).

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit & Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus – September 2008.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik gambaran dan jumlah protein plasma darah ikan mas yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* 

Kegunaan penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmu pengetahuan tentang karakteristik gambaran dan jumlah protein plasma darah ikan mas yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Metode yang digunakan adalah metode deskriptif dan metode eksperimen. Metode deskriptif adalah suatu metode dalam meneliti suatu objek, suatu kondisi, suatu sistem pemikiran, ataupun suatu kelas peristiwa pada masa sekarang Metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variabelvariabel yang diselidiki. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan dua kali ulangan. Perlakuan yang digunakan pada penelitian ini adalah perbedaan kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila*, yakni 10<sup>4</sup> sel/ml (perlakuan A), 10<sup>5</sup> sel/ml (perlakuan B), 10<sup>6</sup> sel/ml (perlakuan C) dan 10<sup>7</sup> sel/ml (perlakuan D).

Berdasarkan hasil uji elektroforesis SDS-PAGE ternyata bahwa protein plasma darah ikan mas yang terinfeksi memiliki kisaran berat molekul 121,76 kDa; 109,92 kDa;

104,44 k Da; 95,91 kDa; 86,58 kDa; 75,54 kDa; 68,20 kDa; 62,62 kDa; 55,58 kDa; 44,53 kDa; 26,70 kDa: 12,39 kDa; dan 10,45 kDa. Berdasarkan hasil uji dengan menggunakan spektrofotometer ternyata bahwa kadar protein ikan mas yang terinfeksi mengalami penurunan jumlah protein. Hal ini terbukti bahwa pada ikan yang diberi kepadatan bakteri yang tinggi, jumlah protein yang muncul lebih sedikit.

Sebagai tindak lanjut dari hasil penelitian ini, disarankan untuk perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut dengan menjadikan penelitian ini sebagai data awal bahwa protein dengan berat molekul 10,45 – 121,76 kDa, adalah berat molekul protein yang terkena infeksi bakteri Aeromonas hydrophila. Dan selanjutnya melakukan penelitian lebih lanjut tentang uji hemaglutinasi yang nantinya bisa dijadikan bahan imunostimulan bagi ikan mas yang terinfeksi bakteri Aeromonas hydrophila.

# DAFTAR ISI

Hala	man
RINGKASAN	. iii
KATA PENGANTAR	. v
DAFTAR ISI	. vi
DAFTAR TABEL	. ix
DAFTAR TABEL	. X
DAFTAR LAMPIRAN	. xi
1. PENDAHULUAN  1.1 Latar Belakang  1.2 Perumusan Masalah  1.3 Tujuan Penelitian  1.4 Kegunaan Penelitian  1.5 Hipotesis  1.6 Waktu dan Tempat	. 3 . 4 . 4
2.1 Biologi 1kan Mas (Cyprinus carpio)  2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi  2.1.1 Habitat Ikan Mas  2.1.3 Kebiasaan Makan  2.2 Bakteri Aeromonas hydrophila  2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi  2.2.2 Habitat dan Penyebaran  2.2.3 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan  2.2.4 Infeksi dan Tanda-tanda Penyerangan  2.3 Plasma Darah  2.4 Analisa Protein Plasma Darah  2.4.1 Elektroforesis SDS-PAGE  2.4.2 Spektrofotometri	. 5 . 6 . 7 . 7 . 8 8 . 8 . 9 . 11
2.5 Kualitas Air	. 14 . 14 . 14

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	
3.1.1 Bahan-bahan Penelitian	17
3.1.2 Alat-alat Penelitian	
3.2 Metode dan Rancangan Penelitian	19
3.2.1 Metode Penelitian	19
3.2.2 Rancangan Penelitian	19
3.3 Prosedur Penelitian	20
3.3.1 Persiapan Wadah Akuarium	21
3.3.2 Persiapan Ikan Uji	
3.3.3 Sterilisasi Alat	
3.3.4 Pembuatan Media	
a. TSA (Triptic Soya Agar) Untuk Kultur Bakteri	
b. Pembiakan Bakteri Aeromonas hydrophila	23
c. Pembuatan Bahan-bahan Elektroforesis SDS-PAGE	
3.3.5 Pelaksanaan Penelitian	
a. Paparan Bakteri	
b. Pengambilan Plasma Darah	
3.3.6 Pengamatan Protein Plasma Darah Ikan Mas	27
a. Elektroforesis SDS-PAGE	
b. Spektorfotometri	29
3.3.7 Pengamatan Kualitas Air	30
3.4 Parameter Uji	30
3.4.1 Parameter Utama	30
3.4.2 Parameter Penunjang	30
3.5 Analisa Data	31
4. HASIL DAN PEMBAHASAN 4.1 Hasil Kultur Bakteri	0.1
4.2 Karakteristik Profil Protein Plasma Darah Yang Terinfeksi Bakteri	
4.3 Karakteristik Kadar Protein plasma Darah Yang Terinfeksi Bakteri	
4.4 Analisa Kualitas Air	
4.4.1 Suhu	
4.4.2 Derajat Keasaman	
4.4.3 Oksigen Terlarut	43
5. KESIMPULAN DAN SARAN	45
5.1 Kesimpulan	
5.2 Saran	
DAFTAR PUSTAKA	47
T A MOID A N	5 1

### 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kegiatan budidaya ikan terutama budidaya ikan air tawar, dewasa ini semakin berkembang seiring dengan perkembangan ilmu dan teknologi. Hal ini juga seiring dengan tuntutan untuk memenuhi kebutuhan pasar yang semakin hari semakin meningkat. Berbagai jenis ikan air tawar telah dapat dibudidayakan dan salah satu diantaranya adalah ikan Mas (*Cyprinus carpio L*) yang mempunyai nilai ekonomis dan produksinya dapat mencapai di atas rata-rata ikan konsumsi lainnya. Ikan Mas termasuk yang paling banyak dibudidayakan oleh petani baik budidaya pembenihan, pembesaran di kolam pekarangan atau kolam air deras (Lingga, 1994).

Ikan Mas banyak dikonsumsi karena rasanya yang enak dan berprotein tinggi. Ikan Mas termasuk jenis ikan konsumsi yang tergolong mudah dalam pemeliharaannya karena cenderung bersifat adaptif (mudah menyesuaikan diri) terhadap lingkungannya (Bachtiar, 2002).

Masalah terbesar yang sering dianggap serius menjadi penghambat budidaya ikan adalah munculnya serangan penyakit. Serangan penyakit yang disertai gangguan hama dapat menyebabkan pertumbuhan ikan menjadi sangat lambat (kekerdilan), padat tebar sangat rendah, lebih lama, yang berarti meningkatnya biaya produksi dan pada tahap lanjut serangan penyakit dan gangguan hama tidak hanya menyebabkan menurunnya hasil panen (produksi) tetapi juga dapat menyebabkan kegagalan panen, yang juga berarti mengakibatkan kerugian ekonomi yang cukup besar (Kordi, 2004).

Menurut Sutjiati (1990), timbulnya penyakit ikan dapat disebabkan oleh fisika, kimiawi dan biologis. Penyakit yang timbul akibat penyebab fisik dan kimiawi pada

umumnya tidak menular (non infeksi). Sedangkan penyakit yang ditimbulkan oleh penyebab biologis kebanyakan menular, baik secara horizontal (dari individu ke individu lain) maupun secara vertikal (dari satu jenis ikan ke jenis ikan lain).

Bakteri adalah organisme bersel satu yang mempunyai dinding sel dan hanya dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop, bersifat motil berflagella, prokariotik dan umumnya berkembang dengan cara membelah diri (Pelczar dan Chan, 1986). Bakteri yang sering menyerang ikan Mas adalah *Aeromonas hydrophila*. Bakteri ini bersifat patogenik, umumnya menyebabkan infeksi pada seluruh tubuh dengan pendarahan pada organ dalam tubuh ikan. Bakteri ini menyebar secara cepat pada padat penebaran tinggi sehingga mengakibatkan kematian sampai 90 % (Kabata, 1985).

Sistem kekebalan tubuh pada ikan umumnya dideteksi melalui pemeriksaan darah. Beberapa komponen darah dapat diamati untuk mendeteksi adanya infeksi tertentu diantaranya plasma darah. Plasma sel ( yang sering disebut dengan sel plasma B atau plasmocyte) adalah sel yang termasuk dalam sistem kekebalan yang mampu mensekresi sejumlah besar antibodi (Anonymous, 2008<sup>a</sup>).

Oleh karena itu penelitian ini berupaya untuk melihat pengaruh pemberian bakteri *Aeromonas hydrophila* terhadap karakteristik protein plasma darah melalui pengamatan gambaran dan jumlah plasma proteinnya.

Widyarti (2006) menjelaskan bahwa, protein hasil sentrifugasi dapat dianalisa secara kuantitatif maupun kualitatif. Analisa kuantitatif protein biasanya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang tertentu tergantung pada jenis protein dan pereaksi yang dipakai, sedangkan analisa kualitatif protein dapat menggunakan elektroforesis. Dalam prakteknya, baik analisa kualitatif maupun analisa kuantitatif

dapat dipakai secara terpisah ataupun dipakai secara bersamaan dalam suatu rangkaian analisa.

### 1.2 Perumusan Masalah

Permasalahan yang sering timbul pada kegiatan budidaya ikan tawar terutama ikan Mas adalah adanya penyakit yang selalu menyerang ikan mas yang dibudidayakan terutama infeksi oleh bakteri. Hal ini dapat menyebabkan menurunnya produktifitas ikan mas karena dapat menyebabkan kematian. Tingginya infeksi oleh bakteri terhadap ikan budidaya khususnya ikan Mas, dikarenakan rendahnya kualitas media budidaya maupun kurangnya kekebalan tubuh ikan Mas dalam melawan serangan infeksi oleh bakteri.

Immunitas dari organisme dapat diketahui diantaranya dengan pemeriksaan darah. Diantara beberapa komponen penyusun darah terdapat plasma sel yang juga mampu unutuk mendeteksi adanya infeksi dari bahan asing yang masuk ke dalam tubuh. Plasma sel merupakan sel yang terdiri dari protein-protein yang mampu mendeteksi sejumlah besar antibodi dan merupakan salah satu sistem kekebalan dari tubuh organisme (Muray, et. Al, 2000).

Pemeriksaan darah ikan Mas pada penelitian ini dititikberatkan pada pemeriksaan gambaran dan jumlah protein pada plasma darah, sehingga dari penelitian ini diharapkan akan dapat menjawab tantangan dan hambatan dalam mengatasi masalah penyakit khususnya pada usaha budidaya ikan Mas.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik gambaran dan jumlah protein plasma darah ikan mas yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

### 1.4 Kegunaan Penelitian

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

- Lingkungan Akademik, sebagai tambahan ilmu pengetahuan tentang gambaran dan jumlah protein plasma darah ikan Mas yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.
- Lingkungan Pemerintah dan instansi yang terkait, sebagai masukan dalam pengambilan keputusan tentang penanggulangan hama dan penyakit ikan dengan mempertimbangkan hasil penelitian tentang gambaran dan jumlah protein plasma darah ikan Mas yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

### 1.5 Hipotesis

Ho: Diduga bahwa pemberian bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan kepadatan yang berbeda tidak berpengaruh terhadap protein plasma darah ikan Mas (*Cyprinus carpio L*)

H<sub>1</sub>: Diduga bahwa pemberian bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan kepadatan yang berbeda berpengaruh terhadap protein plasma darah ikan Mas (*Cyprinus carpio L*).

## 1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus – September 2008 di Laboratorium Parasit & Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Unversitas Brawijaya, Malang.

### 2 Tinjauan Pustaka

BRAWIUAL

### 2.1 Biologi Ikan Mas (Cyprinus carpio L)

### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi ikan Mas menurut Webb (1981) adalah sebagai berikut:

Phyllum : Chordata

Sub Class : Vertebrata

Class : Gnatostoma

Super Ordo : Teleostei

Ordo : Ostariophysi

Sub Ordo : Cyprinoidea

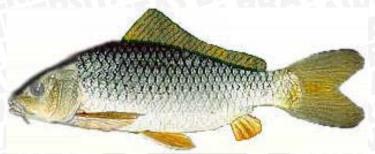
Family : Cyprinidae

Genus : Cyprinus

Spesies : Cyprinus carpio L

Ikan Mas (gambar 1) memiliki bentuk badan memanjang dan sedikit pipih ke samping (compresed). Mulutnya terletak di ujung tengah (terminal) dan dapat disembulkan (Susanto dan Rochdianto, 2000), memiliki kumis (barbel) 2 pasang (4 buah), kadang-kadang mempunyai 1 pasang (rudimenter)yang digunakan untuk membedakan ikan Mas (Cyprinus carpio L) dengan ikan Mas Koki (Carassius auratus) (Santoso, 1993).

Ikan Mas bersisik tipe *cycloid*. Usus umumnya tidak begitu panjang jika dibandingkan dengan hewan pemakan tumbuh-tumbuhan asli. Ikan Mas tidak mempunyai lambung, juga tidak bergigi, sehingga bila mencerna makanan sebagai pengganti penggerusnya adalah dengan pharing yang telah mengeras (Santoso, 1993).



Gambar 1. Ikan Mas (*Cyprinus carpio L*) (Anonymous,2008<sup>b</sup>)

### 2.1.2 Habitat Ikan Mas

Habitat asli ikan Mas di alam bebas meliputi sungai yang berarus tenang sampai sedang dan di area danau yang dangkal. Menyukai perairan hangat dengan warna air yang agak keruh serta banyak menyediakan pakan alami. Ikan Mas menyukai suatu tempat tertentu selain karena ketersediaan pakan alami tetapi juga adanya tanaman air yang berguna sebagai tempat pemijahan (Anonymous, 2007).

Menurut Santoso (1993), ikan Mas dapat tumbuh normal, jika lokasi pemeliharaan berada pada ketinggian antara 150-1.000 meter di atas permukaan laut, suhu air 20-25 °C dan pH air antara 7-8.

### 2.1.3 Kebiasaan Makan

Ikan Mas termasuk pemakan segala (*omnivora*). Pada umur muda (ukuran 10 cm), ikan Mas senang memakan jasad pakan hewan dan tumbuhan yang hidup di dasar perairan/kolam, misalnya *Chironomidae, Tubificidae, Epimidae, Molusca, Copepoda dan Cladocera*. Hewan-hewan kecil tersebut disedot bersama lumpurnya, diambil dan dimanfaatkan sedangkan sisanya dikeluarkan melalui mulut (Santoso, 1993).

Ikan Mas sering mencari sumber makanan di pematang. Cara makan ikan Mas cukup unik yakni dengan membuka mulutnya lebar-lebar dan kemudian menyedot makanannya seperti alat penghisap. Dengan cara makan seperti ini, maka ikan Mas

gemar mengaduk-aduk dasar air dengan mulut dan badannya sehingga menimbulkan bayang kecoklatan pada perairan. Aktivitas ini akan membantu kawanan benih mencari makanan, karena binatang di dasar kolam yang teraduk ke atas dapat menjadi makanan bagi benih (Susanto dan Rochdianto, 2000).

### 2.2 Bakteri Aeromonas hydrophila

### 2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Holt (1979) *dalam* Dwijoseputro (1987), klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah sebagai berikut :

Divisio : Protophyta

Class : Schizomycetes

Ordo : Pseudomonadales

Sub Ordo : Pseudomonadineae

Family : Vibrionaceae

Genus : Aeromonas

Spesies : Aeromonas hydrophila

Secara morfologis, bakteri ini (gambar 2) berbentuk batang pendek dengan ukuran 1,0 – 1,5 μm dan lebar 15,7 – 15,8 μm, termasuk bakteri gram negatif, bersifat motil dan bergerak dengan satu polar flagela, oksidatif fermentatif dan termasuk bakteri yang fakultatif anaerobik serta merupakan bakteri yang dapat menyebabkan penyakit *Haemorrhagic septicaemia* yaitu bakteri yang merusak jaringan dan organ pembuat sel darah (Kabata, 1985).



Gambar 2. Aeromonas hydrophila (Anonymous, 2009)

## 2.2.2 Habitat dan Penyebaran

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu spesies bakteri yang hidup di lingkungan perairan tawar dan perairan payau. Perairan yang mengandung bahan organik tinggi dan bersuhu 15 – 30 °C serta tingkat pH 5,5 – 9 menjadi tempat yang ideal bagi perkembangan dan pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* (Afrianto dan Liviawati, 1998).

Penyakit yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* ini banyak menyerang ikan di daerah tropis dibandingkan di daerah dingin. *Aeromonas* ini banyak ditemukan pada insang, kulit, hati, ginjal dan jantung (Kabata, 1985). Sifat serangan bakteri *Aeromonas hydrophila* terdapat di seluruh bagian tubuh seperti pada jantung, hati, ginjal, limfa atau bagian luar (ekstern), bakteri akan menyerang terutama ikan-ikan yang stress akibat perubahan lingkungan maupun setelah diangkut jauh. Biasanya menyerang dalam kurun waktu yang lama (kronis) (Susanto, 1988).

### 2.2.3 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Bakteri *Aeromonas hydrophila* bersifat fakultatif anaerob yaitu bakteri yang dapat hidup dengan atau tanpa adanya oksigen (Kabata, 1985) dan akan tumbuh tersebar di seluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair (Dwijoseputro, 1987). Dapat

tumbuh pada kisaran suhu 15 - 30 °C dengan pH 5,5 – 9. pembiakannya secara aseksual dengan memanjangkan sel diikuti pembelahan satu sel menjadi dua sel selama lebih kurang 10 menit (Volk dan Wheeler, 1993).

### 2.2.4 Infeksi dan Tanda-tanda Penyerangan

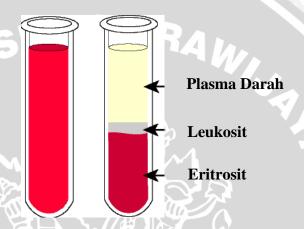
Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* bersifat oportunis yaitu mampu berkembangbiak menjadi ganas pada keadaan optimum (Sutjiati, 1990). Penularan penyakit ini dapat melalui kontak langsung dengan ikan sakit, melalui alat, penanganan, bagian sisa-sisa tubuh ikan, hewan atau tumbuhan air serta aliran air bekas ikan yang terserang. Menurut White (2006), tanda-tanda pada ikan yang terserang *Aeromonas hydrophila* adalah sebagai berikut:

- Warna tubuh berubah menjadi agak gelap, kulitnya menjadi kesat dan timbul pendarahan yang selanjutnya akan menjadi borok (*haemorrhagic*)
- Kemampuan berenangnya menurun dan sering berenang di permukaan air karena insangnya rusak sehingga sulit bernafas.
- Sering terjadi pendarahan pada organ bagian dalam seperti hati, ginjal maupun limfa. Seluruh siripnya rusak dan insangnya berwarna keputih-putihan.
- Kehilangan nafsu makan dan perut buncit diikuti mata menonjol.

### 2.3 Plasma Darah

Darah merupakan cairan yang memiliki fungsi membawa nutrien, transportasi oksigen dan karbon dioksida, menjaga keseimbangan suhu tubuh serta berperan penting dalam sistem pertahanan tubuh. Fungsi utama darah adalah untuk mensuplai nutrien seperti, glukosa dan elemen-elemen penting serta oksigen ke jaringan dan untuk

mengangkut hasil buangan metabolisme seperti karbon dioksida dan asam laktat. Darah terdiri dari beberapa jenis korpuskula yang membentuk 45% bagian dari darah. Bagian 55% yang lain berupa cairan kekuningan yang membentuk medium cairan darah yang disebut plasma darah (Wikipedia, 2008). Adapun susunan darah setelah disentrifugasi dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Susunan Darah Hasil Sentrifugasi (Anonymous, 2008<sup>B</sup>)

Plasma adalah larutan berair yang mengandung substansi dengan berat molekul kecil atau besar yang merupakan 10 % dari volumenya. Protein plasma merupakan 7 % dari volume dan garam anorganik 0,9 %, sisanya 10 % terdiri atas beberapa senyawa organik, asam amino, vitamin, homon, lipoprotein dan sebagainya dari sumber yang berbeda-beda (Junqueira, Carneiro dan Kelley, 1998).

Plasma darah terdiri dari air dan protein darah yaitu albumin, globulin dan fibrinogen. Plasma darah terdiri atas protein yang memiliki variasi berat molekul dan fungsi. Perbedaan tersebut tergantung dari individu dan lingkungan hidupnya, terutama tekanan osmotik koloid, suhu maupun pH. Plasma darah merupakan perantara untuk mentransfer copper, iron, iodine dan lipid (Fujaya, 2004).

Menurut Bijanti (2005), Plasma terdiri dari ± 90 % air dan 10 % komponen organik dan anorganik yang terlarut. Yang termasuk dalam komponen organik adalah protein yang sering dijumpai dalam bentuk globulin, albumin, antibody dan faktor-faktor pembekuan darah. Plasma darah pada ikan terdiri dari beberapa kompenen diantaranya adalah fibrinoogen, ceruloplasma, transferin, glikoprptein, lipoprotein, fosfolipid, dan Ian.

TAS BRAWWA albumin, imunoglobulin (antibodi) dan lain-lain (Fujaya, 2004).

### 2.4 Analisis Protein Plasma Darah

### 2.4.1 Elektroforesis SDS PAGE

Elektroforesis merupakan proses bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Dengan demikian elektroforesis dapat digunakan untuk separasi protein makromolekul (seperti protein dan asam nukleat). Posisi molekul yang terseparasi pada gel dapat dideteksi dengan pewarnaan atau autoradiografi, ataupun dilakukan kuantifikasi dengan densitometer (Mahardika dkk, 2008).

Pemisahan protein dengan metode SDS-PAGE bertujuan untuk memisahkan protein dalam sampel berdasarkan berat molekul. Prinsip dasar SDS-PAGE ini adalah denaturasi protein oleh sodium dodecyl sulphate yang dilanjutkan dengan pemisahan molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel, dalam hal ini digunakan polyacrylamide (Pasila, 2008).

Elektroforesis untuk makromolekul memerlukan matriks penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dari arus listrik yang digunakan. Gel poliakrilamid dan agarosa merupakan matriks penyangga yang banyak dipakai untuk

separasi protein dan asam nukleat elektroforesis yang dibahas di bawah ini menggunakan matriks berupa gel poliakrilamida (PAGE = poli-acrilamida gel electrophoresis) untuk separasi sampel protein (Anonymous, 2008<sup>c</sup>).

Menurut Widyarti (2006), pada saat elektroforesis berlangsung, protein akan bergerak dari elektroda negatif menuju elektroda positif sampai pada jarak tertentu pada gel poliakrilamid tergantung pada berat molekulnya. Semakin rendah berat molekulnya maka semakin jauh pula protein bergerak dengan kata lain mobilitasnya tinggi. Sebaliknya protein dengan berat molekul lebih besar akan bergerak pada jarak yang pendek dengan kata lain mobilitasnya rendah.

Pita-pita (band) pada lajur-lajur (lane) yang berbeda pada gel akan tampak setelah proses pewarnaan, satu lajur merupakan arah pergerakan sampel dari sumur gel. Pita-pita yang berjarak sama dari sumur gel pada akhir elektroforesis mengandung molekul-molekul yang bergerak di dalam gel selama elektroforesis dengan kecepatan yang sama, yang biasanya berarti bahwa molekul-molekul tersebut berukuran sama. "Marka" atau penanda (marker) yang merupakan campuran molekul dengan ukuran berbeda-beda dapat digunakan untuk menentukan ukuran molekul dalam pita sampel. Elektroforesis marka tersebut pada lajur di gel yang paralel dengan sampel. Pita-pita pada lajur marka tersebut dapat dibandingkan dengan pita sampel untuk menentukan ukurannya (Anonymous, 2008<sup>d</sup>).

# 2.4.2 Spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan suatu teknik analisa menggunakan alat spektrofotometer yang mekanisme kerjanya berdasarkan pada banyaknya cahaya yang diserap oleh suatu substansi dalam larutan. Cahaya disini bisa berupa cahaya tampak

 $(\lambda 400-700 \text{ nm})$  ataupun cahaya tidak tampak seperti UV  $(\lambda 200-100 \text{ nm})$ . Suatu substansi berwarna bisa dianalisa memakai spektrofotometer dengan panjang gelombang cahaya tampak, tetapi bila suatu substansi tidak berwarna dianalisa dengan spektrofotometer pada panjang gelombang cahaya UV (Widyarti, 2006).

Beberapa substansi organik tidak berwarna sehingga tidak menyerap cahaya pada gelombang cahaya tampak tetapi menyerap cahaya pada gelombang cahaya UV. Protein misalnya mempunyai absorbansi minimum sekitar 280 nm karena gugus asam amino tirosin dan triptofan. Substansi yang tidak berwarna tersebut jika direaksikan dengan suatu dye reagent dapat menghasilkan suatu substansi berwarna (Widyarti, 2006).

Spektrofotometri merupakan metode analisis berdasarkan pada interaksi molekul dengan sinar untuk mengukur energi secara relaitf sebagai fungsi panjang gelombang. Penyerapan sinar tampak dan ultra violet oleh suatu molekul akan menghasilkan transisi diantara tingkat energi elektronik molekul, yang disebut transisi elektronik. Disebut sebagai transisi elektronik karena terjadi sebagai hasil interaksi cahaya ultra ungu terhadap molekul yang mengakibatkan molekul tersebut mengalami transisi elektronik (Day dan Underwood, 1986).

Faktor-faktor yang mempengaruhi absorbansi meliputi jenis pelarut, suhu dan konsentrasi elektrolit yang tinggi. Keberhasilan dinding kuvet juga akan mempengaruhi absorbansi. Oleh karena itu bekas jari pada dinding kuvet harus dibersihkan dengan tissue dan hanya memegang bagian ujung atas tabung sebelum pengukuran. Larutan standar yang dipakai sebaiknya mempunyai komposisi cuplikan berada diantara konsentrasi larutan standar (Hendayana, 1994).

Menurut Suryadi (2005), metode spektrofotometri banyak digunakan untuk analisis kuantitatif senyawa dalam suatu sampel. Metode ini memiliki beberapa

keuntungan dibandingkan dengan metode gravimetri maupun volumetri. Beberapa keuntungan yang didapat antara lain : metode spektrofotometri merupakan metode yang sederhana, lebih cepat analisisnya dan sampel yang digunakan dalam jumlah kecil dapat ditentukan dengan metode ini.

### 2.5 Kualitas Air

Menurut Boyd (1982), kualitas air ditentukan oleh banyaknya variabel biologi, fisika dan kimia yang mempengaruhi keadaan air untuk penggunaan tertentu. Di dalam budidaya ikan, kualitas air pada umumnya didefinisikan sebagai keserasian antara air dan ikan untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan.

### 2.5.1 Suhu

Suhu mempengaruhi aktivitas metabolisme organisme, karena itu penyebaran organisme baik di lautan maupun perairan tawar dibatasi oleh suhu perairan tersebut. Secara umum laju pertumbuhan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu dan dapat menekan kehidupan hewan budidaya bahkan menyebabkan kematian bila peningkatan suhu sangat ekstrim (Kordi dan Andi, 2007).

Suhu air adalah salah satu sifat fisik yang dapat mempengaruhi nafsu makan dan pertumbuhan ikan. Menurut Boyd (1982), ikan-ikan tropis tumbuh dengan baik pada suhu 20-25 °C.

### 2.5.2 pH

pH adalah logaritma negatif yang diukur dari jumlah ion hidrogen menggunakan rumus umum pH = - Log (H $^+$ ). Skala pH mempunyai deret 0 – 14 dan pH 7 adalah netral berarti tidak bersifat asam atau basa. Apabila nilai pH di bawah 7 berarti air tersebut asam dan bila di atas 7 berarti basa (Boyd, 1982).

Menurut Cahyono (2004), pH air yang cocok untuk ikan mas adalah berkisar 7,5 – 8,5. Pengaruh derajat keasaman air (pH) terhadap kehidupan ikan dijelaskan Afrianto dan Liviawaty (1992) dan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Derajat Keasaman Air (pH) Terhadap Kehidupan Ikan

KISARAN pH	PENGARUH TERHADAP KEHIDUPAN IKAN
4-5	Tingkat keasaman yang mematikan dan tidak ada
TOTAL	reproduksi
4-6,5	Pertumbuhan lambat
6,5 – 9	Baik untuk reproduksi
> 11	Tingkat alkalinitas mematikan

# 2.5.3 Kandungan Oksigen Terlarut

Oksigen terlarut merupakan parameter kualitas air yang sangat penting dan menentukan dalam usaha budidaya ikan (Boyd, 1982). Biota air membutuhkan oksigen guna pembakaran bahan bakarnya (makanan) untuk menghasilkan aktifitas, seperti berenang, pertumbuhan dan reproduksi. Oleh karena itu, kekurangan oksigen dalam air dapat menggangu kehidupan biota air (Kordi dan Andi, 2007).

Kandungan oksigen terlarut 5-7 ppm dianggap paling ideal untuk tumbuh dan berkembangbiak ikan di dalam kolam (Cahyono, 2004).

Suatu perairan yang mengandung konsentrasi oksigen terlarut yang rendah akan mempengaruhi kesehatan ikan karena ikan lebih mudah terserang parasit dan penyakit. Bila konsentrasi oksigen terlarut di bawah 4 – 5 mg/liter maka ikan tidak mau makan dan tidak berkembang dengan baik. Bila konsentrasi oksigen terlarut tetap sebesar 3 atau 4 mg/liter untuk jangka waktu yang lama, maka ikan akan menghentikan makan dan pertumbuhannya terhenti (Boyd, 1982).

### 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

### 3.1 Materi Penelitian

### 3.1.1 Bahan-bahan Penelitian

- Ikan Mas dengan ukuran panjang total 9-12 cm sebanyak 72 ekor
- BRAWINAL - Biakan murni bakteri Aeromonas hydrophila
- Pakan buatan (pellet)
- TSA (Tryptic Soya Agar)
- NB (*Nutrient Broth*)
- Akuades
- Alkohol
- Desinfektan
- Tissue dan
- Kapas
- Na sitrat 3,8 %
- Aluminium foil
- Kertas label

# ▲ Bahan – bahan Elektroforesis (Lampiran 2)

- Main Gel 12,5 % (Lampiran 3)
- Stacking Gel 3 % (Lampiran 3)
- Running Buffer (Lampiran 3)
- Staining dan Destaining (Lampiran 3)
- RSB (Reduksi Sampel Buffer) (Lampiran 3)

- ▲ Bahan bahan Spektrofotometer (Lampiran 2)
  - Larutan Biuret (Lampiran 3)
  - Larutan Standar BSA (Lampiran 3)

### 3.1.2. Alat-alat Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk penelitian ini adalah:

- Akuarium 30x30x30 cm (10 buah)	- Gelas ukur	- Nampan
- Tabung reaksi	- Kulkas	- Kompor
- Magnetic Stirer (Lampiran 4)	- Inkubator	- Selang siphon
- Pipet Mikro (Lampiran 4)	- Aerator	- Pipet volume
- Ependorf (Lampiran 4)	- Bunsen	- Erlenmeyer
- Vortek (Lampiran 4)	- Jarum Ose	- Pipet tetes
- Shaker (Lampiran 4)	- Autoclave	- Spatula
- Stirer (Lampiran 4)	- Petri Disc	- Jarum suntik
- Sentifuge Dingin (Lampiran 4)	- Thermometer	- Oven
- Spektrofotometer (Lampiran 4)	- pH meter	- DO meter
- Timbangan digital (Lampiran 4)	- Hot Plate	- Beacker glass
- Elektroforesis kit (Lampiran 4)	- Kamera Digital	

## 3.2 Metode Penelitian dan Rancangan Percobaan

### 3.2.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode deskriptif dan metode eksperimen. Metode deskriptif adalah suatu metode dalam meneliti suatu objek, suatu kondisi, suatu sistem pemikiran, ataupun suatu kelas peristiwa pada masa sekarang. Tujuan dari penelitian deskriptif ini adalah untuk membuat deskripsi, gambaran atau lukisan secara sistematis,

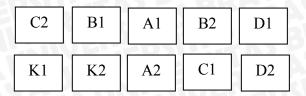
faktual dan akurat mengenai fakta, sifat-sifat serta hubungan antar fenomena yang diselidiki (Nazir, 2003).

Metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Tujuan eksperimen adalah untuk menemukan hubungan sebab dan akibat antara variabel. Hasil yang diperoleh menegaskan bagaimana hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki dan berapa besar hubungan sebab akibat tersebut, dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan. Teknik pengumpulan data dilakukan dengan observasi langsung atau dengan pengamatan secara langsung (Nazir, 1988).

### 3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena media yang digunakan homogen, artinya keragaman antara satuan percobaan tersebut terkecil, sehingga yang mempengaruhi hasil penelitian hanyalah perlakuan dan galat (Hanafiah, 1991).

Penelitian ini terdiri dari 4 perlakuan dan 1 kontrol serta 2 kali ulangan. Sebagai perlakuan adalah perbedaan kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* yaitu kepadatan bakteri 10<sup>4</sup> sel/ml (perlakuan A); 10<sup>5</sup> sel/ml (perlakuan B), 10<sup>6</sup> sel/ml (perlakuan C), 10<sup>7</sup> sel/ml (perlakuan D) (Lampiran 5). Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah penelitian seperti pada (Gambar 4).



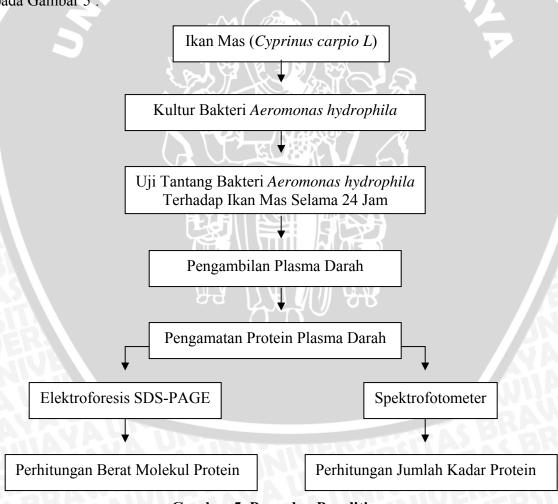
Gambar 4. Denah Percobaan

Keterangan: A, B, C, D: Perlakuan

1, 2 : Ulangan K : Kontrol

### 3.3. Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa perlakuan, untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 5 :



Gambar 5. Prosedur Penelitian

### 3.3.1 Persiapan Wadah Akuarium

Wadah yang digunakan berupa Akuarium 30x30x30 cm sebanyak 10 buah. Sebelum digunakan, wadah dicuci bersih, diberi desinfektan dan dikeringkan selama sehari. Kemudian diisi air bersih sebanyak 5 Liter dan dilengkapi dengan instalasi aerasi untuk menjaga ketersediaan oksigen.

### 3.3.2 Persiapan Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan yaitu ikan Mas yang diperoleh dari Balai Benih Ikan (BBI) Kepanjen . Dipilih ikan Mas yang sehat sebanyak 75 ekor dengan ukuran panjang total 9-12 cm kemudian dilakukan aklimatisasi selama 7 hari pada akuarium penampung. Hal ini dilakukan untuk membiasakan ikan pada kondisi di akuarium. Selama aklimatisasi ikan diberi pakan pellet secukupnya dan diberikan sebanyak 2 kali sehari yaitu pada pukul 09.00 WIB dan pukul 15.00 WIB, serta dilakukan penyiponan tiap pagi dan sore hari serta pergantian air sebanyak 25% tiap 2 hari sekali.

### 3.3.3 Sterilisasi Alat

Sterilisasi adalah suatu proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat dalam suatu benda. Ada 2 cara utama yang umum dipakai dalam metode sterilisasai, yaitu penggunaan panas dan penggunaan bahan kimia, pemilihan metode didasarkan pada sifat bahan yang akan disterilsasikan.

Sterilisasi alat dan bahan peneitian menggunakan autoklaf. Alat-alat yang akan disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas koran, kemudian di ikat dengan menggunakan benang. Air secukupnya dituang ke dalam autoklaf, kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan ke dalam autoklaf dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara silang. Lalu kompor pemanas dinyalakan, setelah beberapa saat manometer akan menunjukkan 1 atm, jika terjadi kelebihan tekanan kran udara

dibuka hingga menunjukkan angka 1 atm kembali. Ketika sampai suhu 121°C dan manometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit. Kemudian kompor dimatikan dan kran dibuka untuk mengurangi tekanan. Ditunggu beberapa saat sampai termometer dan monometer menunjukkan angka 0 (nol) lalu buka penutup autoklaf secara silang. Setelah selesai alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil kemudian simpan alat dalam inkubator.

### 3.3.4 Pembuatan Media (Irianto, 2006)

## a. TSA (Tryptic Soya Agar) untuk Kultur Bakteri

Media TSA ditimbang sebanyak 20 gram dan dilarutkan dengan 500 ml aquades steril dalam erlenmeyer, dan diaduk rata kemudian dididihkan di atas hot plate sambil terus diaduk hingga larut sempurna. Setelah itu larutan yang telah mendidih, ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121 <sup>o</sup>C selama 15 menit. Kemudian larutan dituangkan ke dalam petridisc steril setinggi 3 mm. Penuangan dilakukan di dekat bunsen, agar tidak terkontaminasi organisme lain dan tepi petridisc dipanaskan dengan bunsen setelah dituang larutan. Media dibiarkan mengeras kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu 30 <sup>o</sup>C dan dapat digunakan setelah 24 jam. Media yang tidak langsung digunakan, dapat disimpan di dalam kulkas/lemari pendingin, dibungkus satu-satu dengan kertas koran dan diletakkan dengan posisi tutup petridisc berada di bagian bawah untuk menghindari tetesan air kondensasi pada media. Media yang telah disimpan jika akan digunakan, terlebih dahulu diletakkan dalam inkubator agar suhu media sama dengan suhu lingkungan.

### - NB (Nutrient Broth)

NB ditimbang sebanyak 1,3 gram dan dilarutkan dengan 100 ml aquades steril dalam erlenmeyer dan diaduk hingga larut sempurna. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian media disterilkan dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media dibiarkan mendingin hingga bersuhu 30 °C. Inokulasi bakteri dilakukan dilakukan pada media yang dingin, karena bakteri akan mati jika terkena suhu yang panas. Media yang tidak langsung dipakai, dapat disimpan dalam kulkas/lemari pendingin agar bertahan lama.

### b. Pembiakan Bakteri Aeromonas hydrophila

Pada media TSA, bakteri dari biakan murni diambil dengan jarum ose yang sebelumnya dipijarkan dengan bunsen. Kemudian diinokulasikan pada media dengan metode goresan secara zig-zag. Media yang telah diinokulasikan bakteri, diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam. Pada media NB. Media dituangkan dalam tabung reaksi sebanyak 4 mm. Kemudian ditanamkan bakteri dari biakan murni sebanyak 5 ose dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam.

### c. Pembuatan Bahan-bahan Elektroforesis SDS-PAGE (Fakultas MIPA UB, 2006)

## ▲ Acrylamide 30 % (untuk 50mL)

Bahan-bahan ditimbang sebagai berikut: Acrylamide sebanyak 14,5 gr dan Bis Acrylamide sebanyak 0,25 gr lalu dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditambahkan aquades steril sebanyak 40 ml dan segera distirer, karena bahan ini sangat hidrokopis. Kemudian setelah terlarut sempurna ditambahkan aquades sampai volume 50 ml dan dilanjutkan lagi dengan stirer. Kemudian disaring dengan kertas saring dan dimasukkan dalam falcon 50 ml lalu disimpan dalam lemari pendingin 4°C.

### ▲ 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (untuk 50 ml)

Bahan ditimbang sebanyak 11,8230 gr dan dimasukkan dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan aquades steril sebanyak kurang dari 50 ml. Selanjutnya larutkan dengan menggunakan stirer kemudian di ukur dan di atur sehingga larutan mempunyai pH 8,8 dengan menambahkan NaOH atau HCl (jika kurang dari 8,8 ditambahkan NaOH dan jika pH lebih dari 8,8 ditambahkan HCl). Setelah pH larutan 8,8 ditambahkan lagi aquades steril sampai volume menjdi 50 ml dan distirer lagi. Kemudian tuang dalam falcon 50 ml dalam lemari pendingin 4°C.

### ▲ 1 M Tris-HCl pH 6,8 (untuk 20 ml)

Bahan ditimbang sebanyak 3,152 gr dan dimasukkan dalam erlenmeyer lalu ditambahkan aquades steril sebanyak kurang dari 20 ml. Selanjutnya larutkan dengan menggunakan stirer lalu diukur dan diatur dengan menggunakan pH meter sehingga larutan mempunyai nilai pH 6,8 dengan menambahkan NaOH atau HCl (jika kurang dari 6,8 ditambahkan NaOH dan jika pH lebih dari 6,8 ditambahkan HCl). Setelah pH larutan 6,8 ditambahkan lagi aquades steril sampai volume menjadi 20 ml dan distirer lagi. Setelah itu dituang dalam falcon 50 ml dan di simpan dalam lemari pendingin 4°C.

# ▲ SDS (Sodium Dedocyl Sulphate) 10 % (untuk 10 ml)

Bahan ditimbang sebanyak 1 gr lalu dimasukkan dalam falcon 15 ml dan ditambahkan aquades steril sebanyak 10 ml. Kemudian divortek sampai terlarut sempurna dan di simpan dalam lemari pendingin 4<sup>0</sup>C.

# ▲ APS (Ammonium Persulfat) 10 % (untuk 1 ml)

Bahan ditimbang sebanyak 0,1 gr lalu dimasukkan dalam eppendorf dan ditambahkan aquades steril sebanyak 1 ml. Kemudian divortek sampai terlarut sempurna dalam lemari pendingin 4<sup>0</sup>C.

### ▲ Running Buffer (untuk 1000 ml)

Bahan-bahan ditimbang sebagai berikut : glicyn 14,2 gr, Tris Base 3,03 gr kemudian dimasukkan erlenmeyer dan ditambahkan aquades steril sebanyak kurang dari 1000 ml. Setelah itu distirer sampai homogen lalu diukur dan diatur pH larutan dengan pH meter. Jika pH larutan belum 8,8 maka larutan ditambah dengan NaOH atau HCl (jika kurang dari 8,8 ditambahkan NaOH dan jika pH lebih dari 8,8 ditambahkan HCl). Selanjutnya ditambahkan aquades steril lagi sampai volume 1000 ml. Kemudian ditambahkan SDS 1,5 gr dan distirer lagi sampai terlarut sempurna.

### ▲ Staining Solution (untuk 100 ml)

Commasie briliant blue R 259 ditimbang sebanyak 0,1 gr dan dimasukkan dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan methanol 20 ml dan asam asetat glacial 10 ml serta aquades steril sampai volume larutan 100 ml. Selanjutnya dikocok sampai homogen dan disimpan dalam botol.

### ▲ Destaining (untuk 100 ml)

Dimasukkan methanol 20 ml dan asam asetat glacial 10 ml serta aquades steril sampai volume larutan 100 ml dalam erlenmeyer, kemudian kocok sampai homogen dan disimpan dalam botol.

# ▲ RSB (Reducing Sampel Buffer)

Bahan-bahan diambil sebagai berikut : Tris HCl pH 6,8 1 ml; gliserol 0,8 ml; SDS 10 % 1,6 ml; β mercaptoetanol 0,4 ml; Bronophenol Blue 0,2 ml; aquades steril 4 ml. Kemudian dimasukkan dalam falcon 15 ml dan divortek sampai terlarut sempurna dan disimpan dalam lemari pendingin.

### 3.3.5 Pelaksanaan Penelitian

### a. Paparan Bakteri

Pada saat penelitian, *Aeromonas hydrophilla* diinfeksikan ke tubuh ikan Mas. Masing-masing ikan diinfeksi dengan kepadatan yang berbeda-beda  $(10^4, 10^5, 10^6 \text{ dan } 10^7)$  dan kontrol (tanpa paparan bakteri).

Bakteri *Aeromonas hydrophilla* dipaparkan pada media pemeliharaan ikan mas selam 1x24 jam. Tetapi apabila belum sampai 1x24 jam ikan sudah ada yang mati maka keseluruhan ikan akan dipanen untuk mencegah terjadinya pembekuan darah yang nantinya akan digunakan untuk mengamati protein plasma darah. Volume suspensi bakteri yang akan dipaparkan pada media dihitung dengan menggunakan rumus pengenceran (Lampiran 5):

$$N1.V1 = N2.V2$$

### Dimana:

N1 : Kepadatan populasi bakteri dalam media NB (sel/ml)

N2 : Kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (sel/ml)

V1 : Volume suspensi bakteri dalam NB yang dibutuhkan (ml)

V2 : Volume media air dalam media pemeliharaan ikan (ml)

# b.Pengambilan Plasma Darah

Ikan Mas yang telah diinfeksikan *Aeromonas hydrophila* selanjutnya diambil sampel darahnya dengan menggunakan spuit dan dimasukkan pada ependorf. Kemudian dimasukkan ke dalam sentrifuge. Hal ini untuk memisahkan antara sel darah degnan plasmanya (Kono, Watamuler dan Sakai, 2001).

### 3.3.6 Pengamatan Protein Plasma Darah Ikan Mas

Setelah plasma darah terpisah dari sel darahnya maka plasma darah ini bisa diambil dari sentrifuge menggunakan micropipet dan dapat langsung dilakukan proses pengamatan. Pengamatan gambaran dan jumlah plasma pada sampel plasma ikan mas dilakukan dengan 2 cara yaitu elektroforesis dan spektorfotometer.

### a. Elektroforesis SDS-PAGE

Mekanisme dan tahap-tahap perlakuan Elektroforesis SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Elektroforesis) merujuk pada buku: "Pedoman Praktikum Isolasi Protein dan Elektroforesis untuk Fakultas Kedokteran" dan "Analisa Biologi Molekuler" (Widyarti, 2006). Elektroforesis SDS-PAGE ini bertujuan untuk mengetahui profil berat molekul protein plasma darah dari Ikan Mas (Cyprinus carpio L). Proses elektroforesis dapat dilihat pada lampiran 6.

### - Persiapan setting alat dan pembuatan gel

Alat elektroforesis Bio Rad Mini Protean disiapkan dan disetting sedemikian rupa sehingga tidak terjadi kebocoran dengan mengisi aquades steril pada bagian celah kedua kaca untuk mengetahui menguji kebocorannya. Setelah tidak terjadi kebocoran aquades tersebut dari bagian celah kedua kaca tersebut dikeluarkan. Kemudian dibuat Main Gel 12,5 % dengan komposisi sebagai berikut pada beaker glass kecil: Acrylamide 30 % 4126 μl; Tris HCl pH 8,8 2500 μl; Aquades 3270 μl; SDS 10 % 100 μl; APS 10 % 100 μl; dan Temed 20 μl. Bahan-bahan diatas dicampur secara berurutan. Kemudian setelah tercampur sempurna segera dimasukkan pada bagian celah kedua kaca tersebut sampai batas yang telah ditentukan. Setelah itu ditambahkan aquades steril pada bagian atas pada bahan-bahan Main Gel tersebut agar tidak kering sehingga Main Gel dan Stacking Gel dapat melekat sempurna dan ditunggu sampai bahan-bahan tersebut menjadi gel dan

mengeras. Selanjutnya dibuat juga Stacking Gel 12,5 % pada beaker glass kecil dengan bahan-bahan sebagi berikut: Acrylamide 30 % 515 μl; Tris HCl pH 6,8 625 μl; Aquades 1325 μl; SDS 10 % 25 μl; APS 10 % 7,5 μl; dan Temed 5 μl. Kemudian setelah bahan-bahan Main Gel sudah menjadi gel (mengeras), aquades yang berada diatas Main Gel tersebut dibuang dan diganti dengan Stacking gel dan segera dipasang sisir pada Stacking Gel tersebut sebelum mengeras menjadi gel. Sisir ini berguna untuk mencetak sumuran-sumuran. Kemudian setelah bahan-bahan tersebut mengeras menjadi gel maka sisir dilepas dan cetakan gel tersebut dipasang dan dimasukkan dalam *Chamber Bio Rad Mini Protean*. Selanjutnya ditambahkan running buffer pada *Chamber Bio Rad Mini Protean* tersebut. Kemudian sampel dimasukkan dalam setiap sumuran tersebut. Sumuran yang pertama diisi dengan marker sebagai penanda berat molekul.

### - Running Elektroforesis SDS-PAGE

Sampel disiapkan terlebih dahulu sebelum running dilakukan dengan cara sampel dimasukkan dalam ependorf dan ditambahkan RSB (*Reducing Sampel Buffer*) dengan perbandingan 1:1, kemudian di vortek lalu dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah dibuat sampel elektroforesis maka sampel ini dimasukkan dalam sumuran-sumuran sebanyak 20 µl pada cetakan gel yang telah dibuat tadi. Kemudian sampel elektroforesis siap dirunning dengan voltase 120 V selama 90 menit dengan arus menyesuaikan. Setelah 90 menit gel diangkat dan dimasukkan ke wadah kotak yang berisi larutan staining solution dan dilakukan shaker selama 30-60 menit. Kemudian gel dipindahkan pada larutan destaining solution dan dishaker lagi sampai gel terlihat bersih dan terlihat juga pita-pita protein.

### - Perhitungan Berat Molekul Protein

- (1) Pembuatan kurva standar berat molekul
  - Pergerakan masing-masing protein standar diukur dan dihitung nilai R<sub>f</sub>-nya.
    - R<sub>f</sub> = <u>Jarak pergerakan protein dari tepi awal (a)</u> X 100 % Jarak pergerakan akhir tracking dye (b)
  - Gambarkan kurva standar berat molekul yang diperoleh dengan mengeplotkan nilai R<sub>f</sub> pada sumbu X dan log berat molekul pada sumbu Y.
- (2) Pengukuran berat molekul protein sampel
  - Menghitung persamaan garis linier y = a + bx
  - Untuk setiap sampel protein diamati dahulu berapa jumlah band protein yang nampak.
  - Masing-masing pita protein dihitung nilai  $R_f$  nya.
  - Dari setiap nilai R<sub>f</sub> yang diperoleh dihitung berat molekulnya dengan bantuan persamaan garis linier dari kurva standar molekul.
  - Di catat hasil yang diperoleh dan dimasukkan ke dalam tabel.

### b. Spektrofotometer

Penentuan kadar protein menggunakan spektrofotometer: "Pedoman Praktikum Isolasi Protein dan Elektroforesis untuk Fakultas Kedokteran" dapat dilakukan dengan menggunakan metode biuret melalui beberapa tahap diantaranya (Lampiran 7):

### Pengukuran sampel

Diambil Sampel plasma darah masing-masing diambil 25 µl dari setiap sampel. Kemudian ditambahkan 975 µl pereaksi buret. Setelah itu divortek dan didiamkan 30

menit pada suhu ruang. Selanjutnya diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimum 540 nm untuk masing-masing larutan. Di dapatkan data absorbansi tiap-tiap sampel.

### Penghitungan kadar protein

- Pembuatan kurva baku bovin plasma protein dengan menggunakan larutan BSA standar.
- Dibuat persamaan regresi dan koefisien korelasi dan hasil pengukuran yang telah dilakukan sehingga kadar proteinnya dapat lebih mudah dianalisa.

### 3.3.7 Pengamatan Kualitas Air

Pengamatan kualtas air dilakukan selam penelitian dengan alat pengukur yang telah disiapkan. Masing-masing adalah : suhu dengan menggunakan termometer, oksigen terlarut (DO) dengan menggunakan DO meter, dan derajat keasaman (pH) dengan menggunakan pH meter.

### 3.4 Parameter Uji

### 3.4.1 Parameter Utama

Parameter utama penelitian ini menghitung besarnya jumlah protein plasma darah ikan mas yang terinfeksi *Aeromonas hydrophilla*. perhitungan dilakukan berdasarkan hasil pengamatan melalui metode elektroforessis.

### 3.4.2 Parameter Penunjang

Selama perlakuan, setiap hari dilakukan juga pengukuran kualitas air yang digunakan sebagai media pemeliharaan benih ikan mas yang meliputi suhu, pH (derajat keasaman), dan DO ( *Disolved oxygen* / kandungan oksigen terlarut dalam air).

## 3.5. Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan melalui metode elektroforesis dianalisa secara deskriptif. Sedangkan data yang diperoleh dari hasil pengamatan melalui metode spektrofotometer dianalisa secara statistik dengan menggunakan analisa keragaman sesuai dengan rancangan yang digunakan (RAL). Apabila dari data sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh beda nyata (significant) atau berbeda sangat nyata (highly significant), maka untuk membandingkan nilai antar perlakuan dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil). Dari uji ini dilanjutkan dengan analisa regresi yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan yang terbaik pada respon (Gomez, 1995).

#### 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

# 4.1 Hasil Kultur Bakteri Aeromonas hydrophila

Hasil kultur murni *Aeromonas hydrophila* dilakukan pada media TSA (Tryptic Soy Agar) dan NB (Nutrient Broth) selanjutnya diinkubasi selama 24 jam (Gambar 6). Untuk memperbanyak dan peremajaan kembali bakteri *Aeromonas hydrophila*, maka dilakukan inokulasi bakteri dengan melakukan pemindahan atau penanaman sampel dari satu biakan murni ke dalam media tumbuh secara aseptik untuk mencegah terjadinya kontaminasi.



Gambar 6. Kultur Bakteri Aeromonas hydrophila Pada Media TSA

Untuk mendapatkan deskripsi bakteri Aeromonas hydrophila dari media kultur bakteri dilakukan pengambilan sampel bakteri lalu diteteskan pada obyek glass dan dilanjutkan dengan pewarnaan gram, kemudian dilakukan pengamatan dengan mikroskop (Gambar 7). Didapatkan hasil bahwa bakteri Aeromonas hydrophila merupakan bakteri gram negatif. Menurut Hadioetomo (1985), dengan metode pewarnaan gram, bakteri dapat dipisahkan secara umum menjadi dua kelompok besar yaitu, organisme yang menahan kompleks pewarna primer ungu kristal iodium sampai pada akhir prosedur (sel-sel tampak biru gelap atau ungu), disebut gram positif dan organisme yang kehilangan kompleks warna ungu kristal pada waktu pembilasan dengan

alkohol namum kemudian terwarnai oleh pewarna tandingan safranin (sel-sel tampak merah muda), disebut gram negatif.



Gambar 7. Aeromonas hydrophila Dalam Pembesaran 1000 X Dengan Menggunakan Mikroskop

## 4. 2 Karakteristik Profil Protein Plasma Darah Ikan Mas Yang Terinfeksi Bakteri

Hasil pengujian profil protein dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE, menunjukkan jumlah profil dan gambaran profil dari protein pada tiap-tiap sampel plasma darah ikan mas. Hasil perhitungan berat molekul dengan menggunakan program Microsoft Excel dari elektroforesis SDS-PAGE marker dan sampel plasma darah ikan Mas dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil perhitungan Log BM dan  $R_{\rm f}$  protein marker standart low protein fermentas

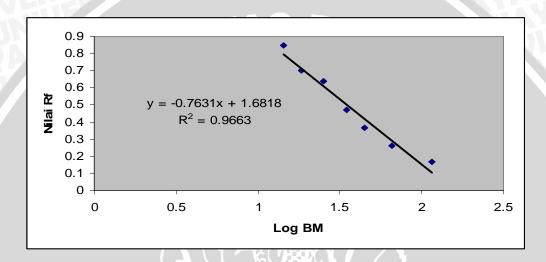
Jarak Pita	Jarak	BM (kDa)	Log BM	Nilai Rf	
	Tracking				
1,1	6,7	116	2,064457989	0,169542292	
1,7	6,7	66,2	1,820857989	0,259964848	
2,5	6,7	45	1.653212514	0,367341633	
3,1	6,7	35	1,544068044	0,469067009	
4,3	6,7	25	1,397940009	0,638609301	
4,7	6,7	18,4	1,264817823	0,700774808	
5,7	6,7	14,4	1,158362492	0,847711462	

Keterangan:

- ♦ Jarak pita adalah jarak antara batas atas main gel dengan pita yang tampak
- Jarak tracking adalah panjang main gel

- ♦ Nilai BM protein marker yang sudah diketahui
- ◆ Log BM adalah hasil dari BM yang di Log-kan (sumbu Y)
- ♦ Nilai R<sub>f</sub> adalah perbandingan antara jarak band dan jarak tracking (sumbu X)

Dari nilai  $R_{\rm f}$  dan nilai Log BM diatas dibuat suatu garis persamaan linear dengan menggunakan bantuan program Microsoft Excel, maka didapatkan hasil persamaan garis linear seperti pada Gambar 8.



Gambar 8. Persamaan garis linear nilai  $R_f$  dan nilai log BM  $(y = -0.7631 \ x + 1.6818)$ 

Garis persamaan linear di atas ( $y = -0.7631 \times + 1.6818$ ) selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai berat molekul protein plasma darah ikan Mas. Hasil perhitungan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil perhitungan BM protein plasma darah ikan Mas

Jarak pita	Jarak Tracking	Nilai Rf	Log BM	BM (kDa)
0,6	6,7	0,090422556	2,085520037	121,7643169
0,8	6,7	0,124331014	2,041096536	109,9250155
0,9	6,7	0,141285244	2,018884785	104,44431
1,1	6,7	0,169542292	1,981865201	95,91028923
1,4	6,7	0,203450751	1,937441699	86,58480825
1,7	6,7	0,248662029	1,878210365	75,54580695
1,9	6,7	0,282570487	1,833786863	68,20039082
2,1	6,7	0,310827536	1,796767279	62,62781774

2,3	6,7	0,350387404	1,744939861	55,58272836
2,8	6,7	0,423855731	1,648688942	44,53371666
4,0	6,7	0,593398023	1,426571436	26,70369972
5,7	6,7	0,847711462	1,093395177	12,39924315
6,1	6,7	0,904225559	1,019356008	10,45576968

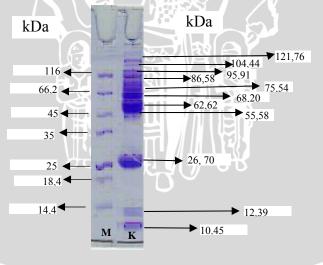
### Keterangan:

- Persamaan garis linear : y = -0.7631 x + 1.6818
- Nilai R<sub>f</sub> = Jarak band : Jarak tracking

$$\circ \text{ Log BM} = \frac{(\text{Nilai } R_f - 1,6818)}{-0,7631}$$

• BM = anti Log BM

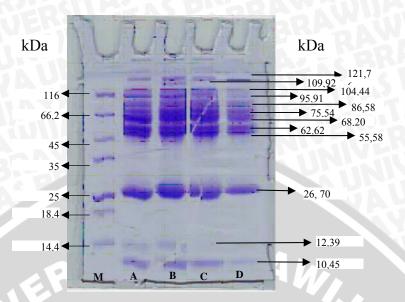
Hasil uji sampel dengan menggunakan gel elektroforesis SDS-PAGE protein yang sudah terseparasi (terpisah-pisah) berdasarkan berat molekulnya dan membentuk pitapita protein. Pita-pita protein tampak berwarna biru karena pita-pita protein tersebut mengikat coomasie blue. Profil atau pola pada protein dan jumlah berat molekul pada tiap-tiap sampel dapat dilihat pada Gambar 9 dan 10.



Gambar 9. Profil Berat Molekul Protein Plasma Ikan Tanpa penginfeksian (Kontrol).

Keterangan: Kolom M: Marker

Kolom K : Plasma ikan K (Kontrol)



Gambar 10. Profil Berat Molekul Protein Plasma Ikan Yang Diinfeksi Bakteri Dengan Kepadatan Berbeda

Keterangan: Kolom M: Marker

Kolom A: Plasma ikan A (10<sup>4</sup>) Kolom B: Plasma ikan B (10<sup>5</sup>) Kolom C: Plasma ikan C (10<sup>6</sup>) Kolom D: Plasma ikan D (10<sup>7</sup>)

Hasil uji sampel elektroforesis di atas, gambaran profil protein plasma darah antara ikan yang tanpa infeksi (kontrol) dan yang diinfeksi dengan kepadatan bakteri yang berbeda, dapat dilihat perbedaannya. Perbedaan tersebut dapat dilihat pada ketebaan maupun jumlah pita-pita protein yang muncul.

Pada sampel plasma ikan tanpa infeksi, mempunyai warna yang lebih tebal daripada sampel plasma ikan setelah infeksi. Pada sampel plasma ikan tanpa infeksi (ikan sehat), muncul 12 pita protein diantaranya dengan berat molekul 121,76 kDa; 109,92 kDa; 104,44 kDa; 95,91 kDa; 86,58 kDa; 75,54 kDa; 68,20 kDa; 62,62 kDa; 55,58 kDa; 26,70 kDa: 12,39 kDa; dan 10,45 kDa.

Pada sampel plasma darah yang diinfeksi bakteri, terdapat sejumlah pita protein yang sama yaitu sebanyak 12 pita meskipun dengan dosis kepadatan bakteri yang

berbeda, diantaranya yaitu protein 121,76 kDa; 109,92 kDa; 104,44 kDa; 95,91 kDa; 86,58 kDa; 75,54 kDa; 68,20 kDa; 62,62 kDa; 55,58 kDa; 26,70 kDa: 12,39 kDa; dan 10,45 kDa. Ke-12 protein ini muncul pada perlakuan A dan B. Walaupun sama jumlah proteinnya, tetapi karakteristik pada tiap pita protein yang muncul ini berbeda. Dalam hal ini tebal tipis dari pita. Sebagaimana dapat dilihat pada gambar 7, terlihat bahwa pada perlakuan A dan B berat molekul protein 12,39 kDa mempunyai pita yang sangat ttipis daripada ikan sehat (kontrol). Sedangkan pada perlakuan C dan D pada berat molekul 12.39 kDa, pita protein tidak muncul. Dan selanjutnya pada perlakuan D banyak protein tidak muncul atau hilang bila dibandingkan dengan ikan sehat. Adapun pita-pita protein yang tidak muncul atau hilang adalah : 121,7 kDa; 109,92 kDa dan 12,39 kDa.

Dari pita protein tersebut, menjelaskan bahwasannya protein imun terekspresikan pada plasma darah. Hal ini diperkuat dengan tebal tipisnya pita protein. Tebal atau tipisnya pita protein yang tercetak menggambarkan banyaknya protein yang terkandung dalam profil protein plasma darah (Bahri, 2008).

Menurut Mustafa (2002) dalam Kurniawan (2008), Elektroforesis SDS-PAGE dengan menggunakan gel polyacrilamid 10% dapat memisahkan protein dengan BM 20-200 kDa. Sedangkan menurut Widyarti dan Rahayu (2006), polyacrilamide akan memisahkan protein dengan kisaran 500-250000 Da. Protein terdiri dari rantai-rantai yang tersusun atas 20 asam amino berbeda yang dihubungkan oleh ikatan kovalen yang disebut ikatan peptida. Rantai berukuran lebih dari 5000 dalton umumnya disebut protein (Norhasanah, 2008).

Dalam plasma darah terdapat beberapa komponen yang berfungsi dalam sistem kekebalan tubuh. Menurut Guyton (1976), plasma merupakan bagian dari cairan ekstra

sel dari tubuh. Jenis-jenis Protein plasma salah satunya globulin, globulin dibagi menjadi tiga : globulin alfa, beta dan gamma. Globulin alfa dan beta berfungsi sebagai pembentukan zat dan mengangkut protein sendiri dari satu bagian ke bagian tubuh lain. Sedangkan globulin gamma berfungsi melindungi tubuh terhadap infeksi, karena globulin inilah yang merupakan antibodi utama yang melawan infeksi dan keracunan.

Menurut Muray *et. Al.*, (2000), adapun ukuran massa molekul protein plasma darah adalah Albumin 69 kDa, Globulin 90-156 kDa dan Fibrinogen 340 kDa. Tizard (1988) menyatakan bahwa semakin besar berat molekulnya, semakin imunogenik tetapi tidak menutup kemungkinan protein dengan berat molekul kecil dapat bertindak sebagai imunogen, walaupun molekul besar jauh lebih baik. Sedangkan Bratawidjaja (1993) menjelaskan bahwa molekul protein dengan massa molekul relatif lebih dari 10 KDa efektif sebagai imunogen.

# 4.3 Karakteristik Kadar Protein Plasma Darah Ikan Mas Yang Terinfeksi Bakteri

Kadar protein pada plasma darah ikan mas yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* yang diperoleh dari hasil pengukuran spektrofotometer (Lampiran 9) dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Data Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Mas

Perlakuan	Ulan	gan	Total	Rerata	
$(10^4 \text{ sel/ml})$	1	2	1000		
A (1)	15,44	14,83	30,27	15,135	
B (10)	13,61	13,61	27,22	13,61	
C (100)	12,40	11,79	24,19	12,095	
D (1000)	8,75	8,14	16,89	8,445	
Total		AYAJA	98,57	Varia	
K (0)	19,08	16,04	35,12	17,56	

Untuk mengetahui adanya pengaruh perbedaan kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* maka dilakukan penghitungan analisa sidik ragam. Analisa keragaman dapat dilihat pada Tabel 5. Adapun perhitungan sidik ragamnya dapat dilihat pada Lampiran 10.

Tabel 5. Sidik Ragam Kadar Protein Pada Plasma Darah Ikan Mas

Sumber Keragaman	Db	JK	КТ	F Hitung	F 5%	F 1%
1.perlakuan	3	49,30	16,43	121,70**	6,59	16,69
2. Acak	4	0,54	0,135			
Total	7	49,84		-	4	-

Ket:\*\* = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil sidik ragam uji F pada Tabel dapat disimpulkan bahwa pemberian bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan kepadatan yang berbeda-beda ternyata memberikan pengaruh yang nyata terhadap kadar protein dari sampel plasma darah ikan mas. Selanjutnya dicari dosis terbaik dari dosis tersebut dengan melakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Hasil uji BNT dapat dilihat sebagaimana pada tabel 6 berikut :

Tabel 6. Uji BNT Protein Pada Plasma Darah Ikan Mas

Rata-rata Perlakuan	A	$B \supset$		D	Notasi
A	-	-	-	-	a
В	1,525*	-	-	-	b
C	3,045**	1,52*	-	-	c
D	6,695**	5,17**	3,65**		d

Ket: \*\*= berbeda sangat nyata

\* = berbeda nyata

ns = tidak berbeda nyata

Dari hasil uji BNT dapat diketahui bahwa dari keempat perlakuan tersebut memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata. Dapat diketahui bahwa perlakuan terbaik untuk kadar protein plasma darah ikan adalah pada perlakuan  $10^4$  sel/ml (perlakuan A);  $10^5$  sel/ml (perlakuan B),  $10^6$  sel/ml (perlakuan C),  $10^7$  sel/ml (perlakuan D). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan D dengan kepadatan bakteri  $10^7$  mampu untuk menurunkan kadar protein pada plasma yang terendah apabila dibandingkan dengan pemberian kepadatan bakteri yang lain.

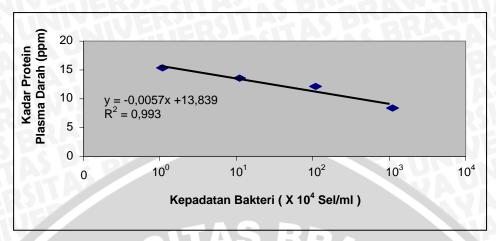
Setelah pengujian BNT diteruskan dengan analisis sidik ragam regresi (Tabel 7), adapun perhitungan regresinya dapat dilihat pada Lampiran 10.

Tabel 7. Sidik Ragam Regresi Protein Plasma Darah

Sumber	Db	JK/	KT		Uji F	
Keragaman				F Hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	3	49,30	W.J.J.			
- Linear	1	46,59	46,59	345,11**	7.71	21.20
- Kuadratik	1	2,25	2,25	16,67*	7.71	21.20
- Kubik	1	0,46	0,46	3,407 <sup>ns</sup>	7.71	21.20
2. Acak	4	0,54	0,54			
Total	7	(#7) \\\$	ÄM			

Ket: \*= berbeda nyata, ns = tidak berbeda nyata,

Berdasarkan analisa sidik ragam regresi didapatkan persamaan linear, yaitu Y = -0,0057X + 13,839 dengan koefisien determinasi (r) sebesar 0,993. Grafik hubungan kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* terhadap kadar protein plasma dapat dilihat sebagaimana Gambar 11.



Gambar 11. Grafik Hubungan Kepadatan Bakteri Dengan Kadar Protein Plasma Darah Ikan Mas

Berdasarkan Gambar 11 dapat diketahui pula bahwa pemberian kepadatan bakteri Aeromonas hydrophila memberikan pengaruh terhadap kadar protein plasma. Dengan pemberian kepadatan bakteri yang semakin meningkat maka kadar protein plasmanya mengalami penurunan. Berdasarkan grafik bahwa pada perlakuan D (kepadatan bakteri 10<sup>7</sup>) mengalami penurunan jumlah berat molekul hampir setengahnya. Dengan adaya penurunan kadar protein plasma ini ternyata setelah terjadinya infeksi oleh Aeromonas hydrophila maka sel-sel dalam darah baik itu sel darah maupun plasmanya akan mengalami kerusakan sehingga berat molekul protein plasmanya juga akan semakin menurun.

Kondisi ini sesuai dengan pendapat Sulistyaningsih, Sukanto dan Basar (2003), yang menyatakan bahwa semakin meningkatnya jumlah sel *Aeromonas hydrophila* akan mengakibatkan semakin meningkat pula patogenitas *Aeromonas hydrophila* tersebut. Dan berpengaruh pula terhadap terhadap jumlah protein dalam plasma darah. Hal ini disebabkan bakteri *Aeromonas hydrophila* mampu menginfeksi ikan Mas karena dapat mengenali dan berikatan dengan reseptor pada sel-sel tertentu, selanjutnya bakteri

tersebut mengurai sel inang dengan memproduksi enzim-enzim. Dan hasil penguraian sel inang selanjutnya digunakan sebagai nutrien untuk pertumbuhan bakteri.

Purnamasasi (2008) menjelaskan bahwa penurunan kadar protein di dalam sampel plasma darah ini nantinya akan berpengaruh untuk memacu kekebalan ikan. Sistem imun merupakan suatu kemampuan untuk mengenali suatu zat asing dan tubuh akan mengadakan tindakan dalam bentuk netralisasi, melenyapkan atau memasukkan dalam proses metabolisme dengan akibat menguntungkan dirinya atau menimbulkan kerusakan jaringan tubuh sendiri.

Setiap tubuh mempunyai kemampuan untuk melawan hampir semua jenis organisme atau toksin yang cenderung merusak jaringan dan organ tubuh. Kemampuan ini disebut dengan sistem kekebalan tubuh atau imunitas. (Guyton, 1979). Lebih lanjut Fujaya (2004) menyatakan bahwa sistem kekebalan (imunitas) dibagi menjadi dua yaitu imunitas bawaan dan imunitas didapat. Imunitas bawaan merupakan sistem pertahanan tubuh pertama kali dalam menghadapi serangan toksin, virus, atau bakteri yang melibatkan kulit, mukosa, asam lambung, enzim dan sel fagositik. Sedangkan imunitas didapat merupakan sistem pertahanan tubuh yang dihasilkan oleh sistem imun khusus yang membentuk antibodi dan mengaktifkan limfosit yang mampu menyerang dan menghancurkan toksin.

Menurut Volk and Wheeler (1993), mekanisme sistem pertahanan masuknya mikroorganisme ke dalam tubuh ikan ada 2 yaitu : *Pertahanan pertama*. Melalui kulit dan mukus yang merupakan alat adaptasi pertama terhadap pengaruh kimia maupun fisika. Kulit berperanan penting dalam sistem imun non spesifik dan merupakan penghalang mekanis yang mencegah masuknya jenis organisme. Sedangkan mukus berfungsi mencegah agar bakteri tidak menempel pada sel epitel. *Pertahanan kedua*.

Apabila bakteri dapat masuk ke dalam jaringan atau organ terjadi proses fagositosis yang diperankan oleh makrofag dan limfosit.

### 4.4 Analisa Kualitas Air

Kualitas air media memegang peranan yang sangat penting, karena timbulnya penyakit atau infeksi oleh bakteri salah satunya disebabkan karena kondisi lingkungan perairan yang tidak seimbang dan tidak menyediakan aspek higienis bagi ikan yang dibudidayakan.

## 4.4.1 Suhu

Selama penelitian kisaran suhu yang terjadi tidak mengalami fluktuasi yang terlalu tajam dan masih berada dalam kisaran yang layak bagi kelangsungan hidup ikan. Data yang diperoleh dari perhitungan (Lampiran 11) disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Sidik Ragam Suhu (<sup>0</sup>C)

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
1.perlakuan	3	0,19375	0,064583	4,69697 <sup>ns</sup>	6,59	16
2. Acak	4	0,055	0,01375			
Total	7	0,24875	M-M	157)-	-	-

Ket: ns = tidak berbeda nyata

Dari tabel 8 dapat dilihat bahwa nilai suhu penelitian tidak mengalami perubahan yang terlalu besar. Kisaran suhu selama penelitian adalah antara 23,4-23,9  $^{\circ}$ C. Menurut Cahyono (2004) Suhu yang paling ideal untuk pertumbuhan ikan Mas adalah 25-27  $^{\circ}$ C.

### 4.4.2 pH

Derajat keasaman (pH) air dapat mempengaruhi pertumbuhan ikan. Derajat keasaman air yang sangat rendah atau sangat asam dapat menyebabkan kematian ikan

dengan gejala gerakannya tidak teratur, tutup insang bergerak sangat akitf dan berenang sangat cepat di permukaan air (Cahyono, 2004).

Dari hasil perhitungan pada Lampiran 11 diperoleh sidik ragam yang disajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Sidik Ragan pH

Sumber Keragaman	db	JK	КТ	F Hitung	F 5%	F 1%
1.perlakuan	3	0.071138	0.023713	5.225895 <sup>ns</sup>	6,59	16
2. Acak	4	0.01815	0.004537			
Total	7	0.089288		-	4	-

Ket: ns = tidak berbeda nyata

pH air selama penelitian berlangsung berkisar 7.5 – 7.7. nilai tersebut masih layak bagi kelangsungan hidup ikan Mas karena pH untuk ikan Mas antara 6,5 – 8,5 (Bachtiar, 2002).

# 4.4.3 Kandungan Oksigen Terlarut

Oksigen sangat diperlukan untuk penafasan dan metabolisme ikan dan jasad – jasad renik dalam air. Kandungan oksigen yang tidak mencukupi kebutuhan ikan dan biota lainnya dapat menyebabkan penurunan daya hidup ikan.

Dari hasil perhitungan pada Lampiran 11 diperoleh sidik ragam yang disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Sidik Ragam Oksigen Terlarut

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
1.perlakuan	3	0,074	0,024	$0,727^{\text{ns}}$	6,59	16
2. Acak	4	0,135	0,033	EITHA		ILLA
Total	7	T. F. L.			VIEW	16.67

Ket: ns = tidak berbeda nyata

Pada saat dilaksanakan penelitian kandungan oksigen terlarut dalam akuarium penelitian berkisar antara 5,1-5,6 ppm . Menurut Bachtiar (2002), kandungan oksigen terlarut harus lebih besar dari 2 ppm.

Kualitas air merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan selama perlakuan berlangsung. Dari hasil pengukuran kualitas air ternyata perlakuan terhadap kulitas air menunjukkan hasil tidak berbeda nyata, yang berarti kualitas air media penelitian adalah relatif homogen dan masih berada dalam kisaran yang layak bagi kelangsungan hidup ikan Mas. Dikarenakan penelitian ini dilaksanakan di dalam laboratorium sehingga kualitas air selama penelitian dapat di pantau setiap hari. Selanjutnya selama penelitian akuarium-akuarium perlakuan diberi aerasi, dengan menggunakan aerator. Dalam hal ini penggunaan aerator berfungsi sebagai menstabilkan suhu karena akan mempengaruhi paramater DO dan pH. Apabila suhu selama penelitian relatif stabil maka kandungan oksigen terlarut juga akan stabil, hal ini juga akan berpengaruh pada pH perairan, pada pH basa kandungan oksigen terlarut akan meningkat (Ghufron dan Kordi, 2007).

#### **5 KESIMPULAN DAN SARAN**

## 5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik beberapa kesimpulan, diantaranya yaitu :

- Berdasarkan perhitungan hasil elektroforesis SDS PAGE berat molekul protein plasma darah adalah 121,76 kDa; 109,92 kDa; 104,44 k Da; 95,91 kDa; 86,58 kDa; 75,54 kDa; 68,20 kDa; 62,62 kDa; 55,58 kDa; 26,70 kDa: 12,39 kDa; dan 10,45 kDa.
- Pemberian bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan kepadatan yang berbeda-beda memberikan hasil yang berbeda sangat nyata terhadap jumlah kadar protein plasma darah ikan mas. Jumlah protein tertinggi adalah kepadatan  $10^4$  sel/ml (perlakuan A) sebesar 15,135 ppm; kepadatan  $10^5$  sel/ml (perlakuan B) sebesar 13,61 ppm, kepadatan  $10^6$  sel/ml (perlakuan C) sebesar 12,095 ppm dan kepadatan  $10^7$  sel/ml (perlakuan D) sebesar 8,445 ppm, memberikan hasil yang terendah. Persamaan linear hubungan kepadatan bakteri dengan kadar protein pada plasma ikan mas adalah : Y = -0,0057X + 13,839.
- Nilai kisaran kualitas air media pemeliharaan masih dalam batas kisaran toleransi ikan mas yaitu: suhu 23,4-23,9 °C; DO 5,1-5,6 ppm; dan pH 7,42-7,75.

#### 5.2 Saran

- Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut dengan menjadikan penelitian ini sebagai data awal bahwa protein dengan berat molekul 10,45 – 121,76 kDa, adalah berat molekul protein yang terkena infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* 

- Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut tentang uji hemaglutinasi yang nantinya bisa dijadikan bahan imnnostimulan bagi ikan mas yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* 



#### **DAFTAR PUSTAKA**

- Anonymous. 2008<sup>a</sup>. **Plasma Cell**. <a href="http://id.www.mcid.co.uk/20 cell">http://id.www.mcid.co.uk/20 cell</a>. diakses pada 15 Desember 2008.
- 2008<sup>b</sup>. *Cyprinus carpio*. <a href="http://www.mancing.info/biologi.htm#top">http://www.mancing.info/biologi.htm#top</a> [2 Agustus 2008].
- 2008°. Elektroforesis. <a href="http://www.medicafarma.blogspot.com/kedokteran">http://www.medicafarma.blogspot.com/kedokteran</a> [3 november 2008].
- 2008<sup>d</sup>. **Biologi Molekuler.** http://wikipedia.org/w/biologi\_molekuler [3 november 2008].
  - 2009. Aeromonas hydrophila.
  - http://www.nwfsc.noaa.gov/publications/issuepapers/cfmfiles/reut6205\_1\_img.jpg [12 Januari 2009].
- Afrianto, E dan E. Liviawati. 1998. **Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan**. Kanisius. Yogyakarta.
- Bahri, A. S. 2008. Pengaruh Respon Imun Terhadap Ekspresi Protein Organ Ginjal Ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus coioides*) Yang Dipapar Khamir Laut (*Marine Yeast*). Thesis. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Bachtiar, 2002. **Pembesaran Ikan Mas di Kolam Perkarangan**. PT. Agro Media. Jakarta.
- Bijanti, R. 2005. Hematologi **Ikan: Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan.** Bagian Ilmu Kedokteran Hewan Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Boyd, C.E., 1982. Water Quality Management for Pond Fish Culture in Aquaculture and Fish Science. Elsevier Scientific Publisher. USA.
- Baratawijaya, Karnen Garna. 2004. **Imunologi Dasar. Edisi Ke 6**. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Cahyono, B. 2000. **Budidaya Ikan Air Tawar.** Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Day R. A dan Underwood, A. L. 1986. **Quantitative Analysis.** Alih Bahasa : Aloysius Hadyana. Penerbit Erlangga. Jakarta.

- Dwidjoseputro, D. 1987. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Penerbit Djambatan. Malang.
- Fakultas MIPA, 2006. **Pedoman Praktikum Isolasi Protein dan Elektroforesis Untuk Fakultas Kedokteran.** Jurusan Biologi. Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya. Malang.
- Fujaya, Y. 2004. **Fisiologi Ikan. Dasar Pengembangan Teknik Perikanan**. Rineka Cipta. Jakarta.
- Ghufron, H. M. Dan Kordi K. 2004. **Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan.** Penerbit Rineka Cipta dan Bina Adiaksara. Jakarta.
- Gomez, K. A. 1995. **Prosedur Statistik Untuk Penelitian Pertanian**. Penerbit Uniiversitas Indonesia Press. Jakarta.
- Guyton, A.C. 1976. **Buku Teks Fisiologi Kedokteran.** Alih Bahasa : Adji Dharma dan P. Lukmanto. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Hanafiah, K. A. 1991. **Rancangan Percobaan, Teori dan Aplikasi**. Edisi Ke-3. Divisi Buku Perguruan Tinggi PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Hadioetomo, R. 1985. Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek. Pt. Gramedia. Jakarta.
- Hendayana. 1994. Kimia Analitik Instrumen. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Irianto, A. 2006. Mikrobiologi Dasar. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Junqueira, L. C, Carneiro dan J. Kelley, R. 1995. Histologi Dasar. Alih Bahasa : dr. Jan Tamboyang. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kabata, Z. 1985. **Parasites and Disease of Fish Cultured in the Tropics.** Taylor and Frandhis Ltd. London.
- Kordi K., M.G.H. 2004. **Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan.** Rineka Cipta dan Bina aksara. Jakarta.
- Kono, Watamuler dan Sakai. 2001. **The Activation Of Interleuki 1β In Seum Of** *Carp***,** *Cyprinus carpio***, Injected With Peptidoglycan.** United Graduate School Of Agricultural Sciences. Kagoshiwa University. Japan.
- Kurniawan, D. 2008. Karakteristik Protein Hemaglutinin Whole Cell Dan Pellet *Aeromonas salmonicida* Terhadap Eritrosit Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). Skripsi. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. (Tidak ditebitkan).
- Lingga, P. 1994. Ikan Mas Kolam Air Deras. Penebar Swadaya. Jakarta.

- Mahardika dkk. 2008. **Metode Analisa Dan Manajemen Laboratorium Metode Analisa Asam Amino Dengan Elektroforesi.** <a href="http://www.thp-faperik.metanal.com">http://www.thp-faperik.metanal.com</a> (2 september 2008).
- Murray, et. al. 2000. **Biokimia Harper edisi**. Matriks ekstrasel. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hal. 662-679.
- Nazir. 1988. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta Timur.
- Norhasanah, E. 2008. **Karakterisasi Protein Pada Berbagai Stadia Pertumbuhan Rumput Laut Family Gelidiaceae** (*ptilophora*). Tesis. Fakultas perikanan.
  Universitas Brawijaya. Malang. (Tidak diterbitkan).
- Pasila, A.R. 2008. Identifikasi Profil Protein Sekresi-Ekskresi Dari Haemonchus contortus Dewasa Dengan SDS-PAGE. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Pelczar, M. J. Dan E. C. S. Chan. 1988. **Dasar-dasar Mikrobiologi 2**. Penerbit Universitas Indonesia (UI Press). Jakarta.
- Purnamasasi, S. D. 2008. **Produksi Antibodi Anti Pili Aeromonas salmonicida Sebagai Rapid Diagnostik.** Thesis. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Santoso, B. 1993. Petunjuk Praktis Budidaya Ikan Mas. Kanisius. Yogyakarta.
- Sulistyaningsih, A, Sukanto, dan Basar, S. 2004. Patogenitas Aeromonas hydrophila Pada Kultur Ikan Gurami (Osphronemus gouramy Lac) Yang Diberi Bakteri Asam Laktat TE<sub>2</sub> Dengan Kepadatan Bebeda. Prosiding Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Purwokerto.
- Suryadi, A. 2005. Penentuan Nitrogen Dalam Pupuk Menggunakan Metode Difusi Gas Sistem Alir Kontinyu Secara Spektrofotometri. Skripsi. Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya. Malang. (Tidak diterbitkan).
- Susanto, H dan A. Rochdianto. 2000. **Kiat Budidaya Ikan Mas di Lahan Kritis**. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Sutjiati, M. 1990. **Diktat Kuliah Penyakit Ikan**. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Tizard, I. R. 1988. An Introduction of Veterinary Immunology. W. B. Saunders Company.
- Volk, W. A. And M. F. Wheeler. 1993. **Mikrobiologi Dasar.** Alih Bahasa: Markham. Edisi V. Penerbit Erlangga. Jakarta.

- Webb, J. E. 1981. Guide To Living Fisher. The Mac Millan Press. Ltd London.
- Wikipedia. 2007. **Darah**. Ensiklopedia Bebas Berbahasa Indonesia. <a href="http://id.wikipedia.org/wiki/darah">http://id.wikipedia.org/wiki/darah</a> (2 September 2008).
- White, R. 2006. **Diagnosis of** *Areomonas hydrophila* **Infection in Fish.** <a href="http://www.addl.purdue.edu/newsletters/1991/aeromonas.shtml">http://www.addl.purdue.edu/newsletters/1991/aeromonas.shtml</a>. Diakses 1 Agustus 2006.
- Widyarti, S. 2006. **Analisa Biologi Molekuler.** Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya. Malang. 88 hal.

