

PENGEMBANGAN UJICEPAT METODE KOAGLUTINASI UNTUK MENDETEKSI ANTIGEN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* PENYEBAB PENYAKIT VIBRIOSIS PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*)

Yan Evan^{1*}, Agustin Indrawati², Fachriyan Hasmi Pasaribu²

¹Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan Serang Banten, Kementerian Kelautan dan Perikanan, Indonesia

²Institut Pertanian Bogor, Indonesia

*Cc: galah_van@yahoo.com

Abstrak

Vibrio parahaemolyticus merupakan salah satu agen penyebab penyakit vibriosis pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Untuk penanganan lebih dini serta mencegah tersebar luasnya penyakit ini, diperlukan metode uji yang cepat dan akurat. Tujuan penelitian adalah untuk membuat kit uji koaglutinasi yang dapat mendeteksi antigen bakteri *V. parahaemolyticus*. Antibodi poliklonal *V. parahaemolyticus* yang digunakan merupakan hasil imunisasi pada kelinci yang disuntikan antigen *V. parahaemolyticus* dengan dosis 3×10^8 cfu/ml sebanyak 1 mL. Penyuntikan antigen dilakukan sebanyak empat kali pada interval satu minggu melalui vena *auricularis*. Reagen koaglutinasi dibuat dengan cara melakukan pencampuran antara suspensi *S. aureus* yang memiliki protein A dan serum IgG *V. parahaemolyticus* hasil purifikasi dengan perbandingan 1:1 (v/v). Reagen koaglutinasi ini selanjutnya dipergunakan untuk pengujian terhadap sampel organ hepatopankreas, usus dan daging udang yang terinfeksi bakteri *V. parahaemolyticus* dan bakteri lain yaitu *V. harveyi* dan *V. alginolyticus* untuk pengujian reaksi silang. Hasil pengujian reaksi koaglutinasi positif hanya terjadi pada sampel organ yang terinfeksi bakteri *V. parahaemolyticus*, ini ditandai dengan terbentuknya aglutinat. Sedangkan hasil pengujian reaksi silang dengan menggunakan sampel organ yang terinfeksi bakteri *V. harveyi* dan *V. alginolyticus* menunjukkan hasil negatif, ditandai dengan suspensi tetap homogen tidak terbentuk aglutinat. Berdasarkan hasil pengujian koaglutinasi membuktikan bahwa reaksi reagen koaglutinasi bersifat spesifik, cepat dan akurat.

Kata kunci: *Vibrio parahaemolyticus*, udang vaname, *Litopenaeus vannamei*, koaglutinasi

Abstract

Vibrio parahaemolyticus is one of the agents that cause vibriosis in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). For early treatment and to prevent the spread of this disease, a fast and accurate test method is needed. The aim of this study is to create a coagglutination test kit that can detect bacterial antigen *V. Parahaemolyticus*. Antibodies. Polyclonal *V. parahaemolyticus* used is the result of immunization in rabbits that are injected with 1 mL of *V. parahaemolyticus* antigen at a dose of 3×10^8 cfu / ml. Antigen injection is carried out four times at one week intervals through the auricular vein. Coagglutination reagents are made by mixing the suspensions. *aureus* which has protein A and serum IgG *V. parahaemolyticus* purified with a ratio of 1: 1 (v / v). This coagglutination reagent is then used for testing on samples of hepatopancreatic organs, intestines and meat of shrimp infected with *V. parahaemolyticus* bacteria and bacteria. other ri, namely *V. harveyi* and *V. alginolyticus* for cross reaction testing. The positive coagglutination reaction test results only occurred in organ samples infected with *V. parahaemolyticus* bacteria, this was indicated by the formation of agglutinates. Meanwhile, the results of cross-reaction testing using samples of organs infected with *V. harveyi* and

V. alginolyticus bacteria showed negative results, indicated by the suspension remains homogeneous and no agglutinates are formed. Based on the results of the coagglutination test, it proves that the coagglutination reagent reaction is specific, fast and accurate.

Kata kunci: *Vibrio parahaemolyticus*, vaname shrimp, *Litopenaeus vannamei*, coagglutination

PENDAHULUAN

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu komoditas unggulan perikanan dalam program revitalisasi perikanan, disamping rumput laut dan tuna. Budidaya udang memberikan kontribusi yang besar bagi produksi sektor perikanan Indonesia. Berdasarkan data DJPB (2016), produksi budidaya udang vaname pada 2014 mencapai 442.380 ton dan meningkat pada 2015 sebanyak 505.549 ton.

Penyakit vibriosis merupakan salah satu masalah utama dalam budidaya udang vaname. Penyakit ini dapat menyebabkan kematian pada udang hingga 80–85% dari total populasi (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2013). Salah satu agen penyebab penyakit vibriosis adalah bakteri *V. parahaemolyticus*. Menurut Buller (2014) bahwa bakteri *V. parahaemolyticus* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang (*curved* atau *straight*), anaerob fakultatif, tidak membentuk spora, pleomorfik, bersifat motil dengan *single polar flagellum*, koloni pada media *Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose* (TCBS) berbentuk bulat berdiameter sekitar 1–4 mm dan berwarna hijau. Beberapa karakter *V. parahaemolyticus* yang membedakannya dengan spesies vibriolainnya diantaranya tidak memfermentasi sukrosa seperti *V. cholerae* dan *V. alginolyticus*.

Perkembangan penyakit udang saat ini membutuhkan adanya hasil pemeriksaan

laboratorium yang cepat dan akurat. Diagnosis cepat dan akurat adalah kunci penanganan yang efektif untuk meminimalisir kerugian yang disebabkan oleh penyakit udang. Berdasarkan kebutuhan tersebut, teknik deteksi cepat dan akurat dibutuhkan dalam mendiagnosis suatu penyakit pada udang. Koaglutinasi adalah salah satu alternatif metode diagnosis cepat yang merupakan pengembangan dari uji serologis aglutinasi. Teknik koaglutinasi bersifat sensitif, spesifik, sederhana, murah, cepat dan memberikan hasil yang akurat (Rocha *et al.*, 2014). Prinsip metode ini adalah dengan memanfaatkan bakteri *Staphylococcus aureus* yang memiliki protein A. Protein A merupakan protein yang dimiliki oleh bakteri *S. aureus* dan diketahui dapat berikatan dengan *fragment crystallizable* (Fc) immunoglobulin G (IgG) mamalia sehingga *fragment antibody binding* (Fab) dapat bereaksi dengan antigen spesifik (Foster *et al.*, 2014; Qtaishat *et al.*, 2013). Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Saharia dan Prasad (2001), telah berhasil mengembangkan metode koaglutinasi untuk mendeteksi antigen bakteri *Pseudomonas fluorescens* yang menginfeksi pada ikan lele. Metode ini memiliki beberapa kelebihan jika dibandingkan dengan metode konvensional biokimiawi dan molekuler, yaitu hanya memerlukan waktu pengujian satu hari, bahan dan peralatan yang digunakan sederhana dan murah, bersifat spesifik serta dapat

diaplikasikan dilapangan. Tujuan dari penelitian ini untuk membuat kit uji koaglutinasi yang dapat mendeteksi antigen bakteri *V. parahaemolyticus*.

METODE PENELITIAN

Reidentifikasi bakteri

Bakteri *V. parahaemolyticus* yang digunakan diisolasi dari udang vaname dan merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan Serang (LP2IL Serang), sedangkan bakteri *Staphylococcus aureus* Cowan 1 dan *Staphylococcus epidermidis* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bakteri diidentifikasi ulang secara biokimiawi menggunakan *vitex 2 compact*.

Deteksi protein A bakteri *S. aureus*

Deteksi *S. aureus* yang memiliki protein A dilakukan dengan metode *serum soft agar* (SSA) yang merujuk pada Wibawan *et al.* (2009). Bakteri *Staphylococcus aureus* ditumbuhkan pada media *brain heart infusion* (BHI) *broth* dan diinkubasikan pada 37 °C selama 24 jam. Setelah itu isolat dibiakkan pada media *soft agar* (SA) dan *serum soft agar* (SSA) dan diinkubasikan pada 37 °C selama 24 jam. Serum yang digunakan pada media SSA adalah serum kelinci dan serum ayam (Ningrum *et al.*, 2016). Prosedur untuk kontrol negatif dilakukan dengan cara yang sama, isolat bakteri diganti dengan bakteri *S. epidermidis*. Bakteri *S. aureus* yang memiliki protein A akan menunjukkan koloni kompak pada media SSA yang ditambahkan serum

kelinci, sedangkan bakteri yang negatif (tidak memiliki protein A) akan menunjukkan koloni difus pada media SA dan SSA.

Produksi antibodipoliklonal

Mengacu pada penelitian Saharia dan Prasad (2001), pembuatan antigen dilakukan dengan cara: bakteri *V. parahaemolyticus* dibiakkan pada media *trypticase soy agar* (TSA) lalu diinkubasikan pada suhu 28 °C selama 24 jam. Setelah bakteri tumbuh, dilakukan pemanenan biomassa bakteri dan dikumpulkan pada tabung steril. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan larutan fisiologis (0,85 % NaCl) sebanyak tiga kali, kemudian suspensi bakteri diinaktivasi dengan pemanasan menggunakan *waterbath* pada suhu 100 °C selama 30 menit dan dilakukan pengujian viabilitas bakteri. Apabila tidak terjadi pertumbuhan bakteri, suspensi bakteri tersebut disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 10–15 menit. Supernatan dibuang lalu biomassa bakteri ditambahkan larutan formalin fisiologis 0,3% dan selanjutnya antigen siap digunakan untuk penyuntikan.

Produksi poliklonal antibodi diperoleh dengan cara sebanyak 1 mL antigen *V. parahaemolyticus* konsentrasi 3×10^8 cfu/mL diinjeksikan pada kelinci dengan berat ± 2 kg melalui vena *auricularis*. Injeksi antigen dilakukan sebanyak empat kali dengan interval satu minggu. Penyuntikan secara intravena dilakukan agar antigen dapat dengan cepat memasuki aliran darah sehingga dapat langsung diabsorpsi oleh tubuh (Leenaars & Hendriksen, 2005). Pengukuran titer antibodi

dilakukan pada minggu ke-2 dan 4 yang mengacu pada Cappuccino dan Sherman (2005). Setelah dilakukan pengujian titer antibodi, darah kelinci dipanen masal menggunakan *sputid* dan dibiarkan sampai serum terpisah dari sel darah merahnya, kemudian serum diambil dan dimasukkan kedalam *microtube*. Serum yang telah dipanen diinaktivasi menggunakan *waterbath* pada suhu 56 °C selama 30 menit.

Purifikasi imunoglobulin G (IgG)

Merujuk pada Amanu *et al.* (2015), purifikasi IgG dilakukan dengan metode presipitasi amonium sulfat 50% (pH 8). Larutan amonium sulfat yang merupakan garam dengan muatan ion tinggi ditambahkan untuk mempresipitasi antibodi. Kemudian presipitat dipisahkan dari protein yang tidak terpresipitasi dengan cara disentrifugasi, pelet yang terbentuk disuspensikan sehingga diperoleh larutan kaya antibodi (Howard dan Kaser, 2013). Sebanyak 10 mL serum kelinci ditambahkan 10 mL amonium sulfat 50% (1:1) dengan cara diteteskan selama 30 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit. Setelah itu, supernatan dibuang dan endapan yang terbentuk ditambahkan *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,2 hingga mencapai volume asal. Proses presipitasi amonium sulfat 50% dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Selanjutnya dilakukan dialisis menggunakan membran dialisis dalam larutan PBS (pH 8) selama 48 jam pada suhu 4 °C dengan pergantian PBS setiap 12 jam. Tahap selanjutnya, serum hasil presipitasi amonium

sulfat dipurifikasi menggunakan *Melon Gel IgG Purification Kit* sesuai dengan protokol kit untuk menyaring protein-protein lain yang kemungkinan masih tertinggal selain IgG sehingga menghasilkan serum yang lebih murni. Pengukuran konsentrasi IgG dari hasil proses purifikasi dilakukan menggunakan alat Spektrofotometer Nanodrop™ ND2000 pada panjang gelombang 280nm.

Preparasi bakteri *Staphylococcus aureus*

Preparasi bakteri *S. aureus* yang memiliki protein A untuk pembuatan *reagen kit* mengacu pada metode Amanu *et al.* (2015) yaitu dengan dilakukan perbanyak bakteri *S. aureus* pada media TSA dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, bakteri *S. aureus* dipanen dan dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak tiga kali. Pada akhir pencucian, biomassa bakteri ditambahkan 2% formalin lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Setelah 24 jam dilakukan pencucian kembali sebanyak satu kali dan diresuspensikan kembali dengan PBS hingga mencapai volume awal. Suspensi bakteri kemudian dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 80°C selama 15 menit dan didinginkan. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit lalu supernatan dibuang kemudian biomassa bakteri ditambahkan PBS hingga mencapai volume awal.

Pembuatan *reagen koaglutinasi*

Pembuatan *reagen koaglutinasi* dilakukan dengan cara melakukan optimasi perbandingan antara IgG murni hasil purifikasi

dengan suspensi *S. aureus* hasil preparasi yang kaya protein A sehingga tidak terjadi *self agglutination*. Selanjutnya diinkubasi selama 2 jam dalam suhu kamar. Selama inkubasi suspensi dihomogenkan setiap 30 menit kemudian dilakukan pencucian sebanyak satu kali dan resuspensi pelet dengan PBS hingga mencapai volume awal. Selanjutnya *reagen* koaglutinasi dapat digunakan untuk pengujian pada sampel.

Infeksi buatan pada udang vaname

Bakteri yang digunakan pada pengujian infeksi buatan yaitu bakteri *V. parahaemolyticus* sebagai kontrol positif serta bakteri *V. harveyi* dan *V. alginolyticus* untuk pengujian reaksi silang. Masing-masing bakteri diperbanyak pada media TSA dan diinkubasikan pada suhu 30 °C selama 24 jam kemudian bakteri dipanen lalu dibuat suspensi bakteri. Selanjutnya suspensi bakteri tersebut dibuat konsentrasi 10⁶cfu/mL dan diinjeksikan secara *intramuscular* (IM) sebanyak 0,1 mL pada udang vaname dengan berat ±16.03 gram. Perlakuan infeksi buatan dibagi ke dalam empat kelompok dan masing-masing kelompok berisi 10 ekor udang vaname: kelompok pertama diinjeksi dengan bakteri *V. parahaemolyticus*, kelompok kedua diinjeksi dengan bakteri *V. harveyi*, kelompok ketiga diinjeksi dengan bakteri *V. alginolyticus* dan kelompok terakhir tanpa perlakuan infeksi (kontrol negatif) diinjeksi dengan PBS.

Setelah udang vaname menunjukkan gejala sakit dilakukan preparasi organ hepatopankreas, usus, dan daging. Selanjutnya ekstraksi masing-masing organ dengan cara

organ digerus kemudiandisuspensikan dalam PBS dengan perbandingan 1:1 (b/v). Suspensi organ dipanaskan pada suhu 100°C selama 30 menit lalu disentrifugasipada kecepatan 3.000 rpm selama 10menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung steril. Selanjutnya supernatantersebut digunakan sebagai sampel uji.

Pengujian sampel menggunakan reagenkoaglutinasi

Pengujian penggunaan *reagen* koaglutinasi dilakukan terhadap sampel hasil ekstraksi organ yang terinfeksi *V. parahaemolyticus* dan dua isolat bakteri lain yaitu *V. harveyi* dan *V. alginolyticus*. Sampel diteteskan pada gelas objek kemudian ditambahkan *reagen* uji koaglutinasi dengan volume yang sama 1:1 (v/v). Setelah itu, dihomogenkan dengan cara menggoyangkan gelas objek kemudian diinkubasi pada suhu kamar. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya butiran-butiran halus seperti pasir (aglutinat). Sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan cairan yang tampak homogen tanpa terbentukaglutinat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

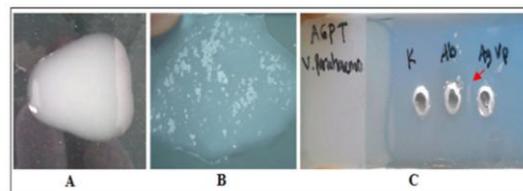
Penyakit vibriosis merupakan masalah serius dalam budidaya udang. Kualitas lingkungan perairan yang memburuk merupakan salah satu penyebab mewabahnya serangan penyakit vibriosis. Menurut Kharisma dan Manan(2012), budidaya udang vaname skala intensif menjadi salah satu faktor penyebab mudahnya bakteri patogen menyerang udang vaname. Hal tersebut

dikarenakan udang yang dibudidayakan mengalami *stress* akibat kepadatan populasi udang yang terlalu tinggi. Penyakit vibriosis dapat menyebabkan kematian pada udang hingga 80–85% dari total populasi (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2013). Salah satu uji serologis yang perlu dikembangkan khususnya untuk deteksi penyakit pada ikan dan udang yaitu uji koaglutinasi. Koaglutinasi adalah sebuah metode diagnosa cepat dan akurat yang memanfaatkan protein A bakteri *S. aureus*. Pada penelitian ini, dilakukan pengembangan metode koaglutinasi untuk mendeteksi antigen bakteri *V. parahaemolyticus* yang merupakan salah satu penyebab vibriosis pada udang vaname.

Reidentifikasi bakteri dan produksi antibodipoliklonal

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi koloni dan pengujian biokimiawi bakteri menggunakan alat identifikasi otomatis diketahui bahwa bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah positif bakteri *V. parahaemolyticus* (97%), *S. aureus*(99%), dan *S. epidermidis*(99%).

Hasil produksi poliklonal antibodi yang terbentuk pada kelinci setelah diimunisasi pada minggu ke-4 terhadap antigen *V. parahaemolyticus* terlihat pada hasil reaksi aglutinasi dan *agar gel precipitation test* (AGPT) positif (Gambar 1).



Gambar 1. Reaksi aglutinasi dan *agar gel precipitation test* (AGPT) : (A) reaksi negatif aglutinasi; (B) reaksi positif aglutinasi; (C) reaksi positif AGPT.

Reaksi spesifik antibodi poliklonal terhadap antigen *V. parahaemolyticus* terlihat pada Gambar 1B, yaitu terbentuknya butiran putih seperti pasir (aglutinat) karena terjadi ikatan antigen-antibodi kompleks. Sedangkan reaksi negatif ditunjukkan pada kontrol negatif yang direaksikan menggunakan bakteri lain yaitu bakteri *V. harveyi* (Gambar 1A). Ikatan spesifik antibodi terjadi pada satu sisi *fragment antigen binding* (Fab) terhadap satu jenis *epitope* pada antigen multivalen, sedangkan Fab yang lain berikatan dengan *epitope* yang lain pada antigen sehingga akan terbentuk ikatan antibodi-antigen yang kompleks (Coico & Sunshine, 2015). Ikatan kompleks antara antibodi dan antigen tersebut menyebabkan ukuran molekulnya menjadi semakin besar sehingga teramati seperti butiran-butiran halus pasir yang dapat dilihat secara langsung.

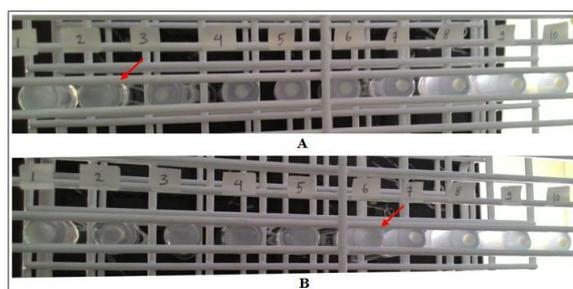
Reaksi positif juga ditunjukkan pada uji AGPT, hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya garis presipitasi, yang terlihat sebagai garis tipis berwarna putih diantara lubang yang diisi antigen dan antibodi. Pembentukan presipitasi diinisiasi oleh pembentukan kompleks molekul antigen-antibodi yang saling bereaksi diikuti dengan proses agregasi serta sedimentasi kompleks

tersebut. Presipitasi yang terbentuk mulai hitungan menit hingga jam terlihat sebagai suatu garis *opaque* dalam suatu media agar semisolid. Garis *opaque* yang terbentuk disebut sebagai garis presipitasi (Black, 2005).

Terbentuknya antibodi poliklonal dimulai dari paparan antigen ke dalam tubuh. Antigen dapat berupa protein, lemak, karbohidrat, asam nukleat, haptan, dan antigen juga bisa berupa komponen mikroorganisme (Delves *et al.*, 2011). Antigen tersebut akan ditangkap oleh sel dendrit dan dibawa ke jaringan lymphoid setempat (*lymph node*). Sel dendrit berfungsi sebagai *antigen presenting cell* (APC) yang telah memecah molekul-molekul antigen dan dipresentasikan pada permukaan sel APC. *T cell receptor* (TCR) pada permukaan sel T penolong (*T helper cell*) akan mengenali molekul-molekul tersebut dengan bantuan CD^{4+} (pada sisi sel T) dan *major histocompatibility complex* (MHC) II (pada sisi sel dendrit atau APC). Sel T penolong (CD^{4+} T cells) tipe 2 akan mensintesis sitokin (Interleukin IL-4, IL-5, IL-9, dan IL-13) untuk membantu sel B berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mampu mensekresi antibodi pada sistem kekebalan humoral. Pada saat yang sama, sel B juga berdiferensiasi menjadi sel B memori sehingga sistem kekebalan humoral mempunyai kemampuan untuk mengingat (Day & Schultz, 2014).

Pengukuran titer antibodi pada kelinci dilakukan pada minggu ke-2 dan 4 menggunakan metode serial dilusi yang mengacu pada Cappuccino dan Sherman (2005) dengan modifikasi. Nilai titer antibodi

diperoleh dari kebalikan pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan terjadinya aglutinasi pada dasar tabung reaksi. Dari hasil pengukuran titer antibodi pada Gambar 2 diketahui bahwa terjadi peningkatan nilai titer antibodi pada minggu ke-2 sebesar 20 menjadi 320 pada minggu ke-4. Pada minggu ke-2 aglutinasi terlihat masih terbentuk pada pengenceran kedua dan minggu ke-4 pada pengenceran keenam, sedangkan pengenceran selanjutnya tidak terbentuk aglutinasi ditandai titik putih yang merupakan endapan sel *V. parahaemolyticus* karena tidak terjadi aglutinasi.



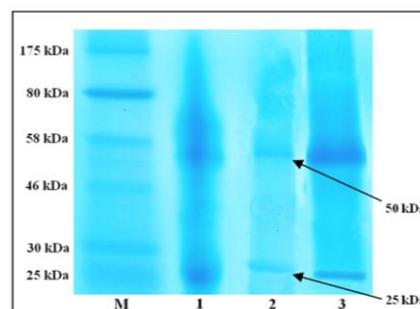
Gambar 2. Hasil pengukuran titer antibodi pada minggu ke-2 (A) dan minggu ke-4 (B)

Purifikasi imunoglobulin G (IgG)

Purifikasi IgG dalam penelitian ini dilakukan dengan dua metode berkelanjutan, yaitu presipitasi amonium sulfat (saturasi 50%) dan *melon gel IgG purification kit*. Presipitasi amonium sulfat adalah metode purifikasi IgG yang murah dan sangat populer (Cutler, 2004). Hasil pengukuran diperoleh konsentrasi IgG hasil purifikasi yaitu sebesar 14,7 mg/mL. Konsentrasi IgG ini yang digunakan pada tahapan selanjutnya.

Hasil uji *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) terhadap *whole serum* dan hasil

purifikasi IgG, terlihat pada sampel hasil purifikasi IgG memperlihatkan adanya dua pita besar yaitu rantai ringan dengan berat molekul sekitar 25 kDa dan pita rantai berat molekul sekitar 50 kDa (Gambar 3 lajur 2). Sedangkan pada *whole serum* (lajur 1) sebelum purifikasi terlihat masih terdapat protein-protein lain karena masih terdapat pita lainnya di lajur tersebut. Hal ini membuktikan bahwa purifikasi yang dilakukan dapat menghilangkan protein-protein selain IgG. Menurut Hu *et al.* (2015), purifikasi antibodi poliklonal menjadi salah satu langkah penting dalam keberhasilan ikatan antibodi poliklonal dengan reseptornya. Hal ini disebabkan oleh adanya protein lain yang tidak relevan bersirkulasi dalam serum dalam jumlah banyak yang dapat mengganggu afinitas reseptor antibodi jika antibodi tidak dipurifikasi. Immunoglobulin terdiri atas empat rantai protein *glycosylated* yang ditahan bersama oleh ikatan disulfida dalam konformasi berbentuk Y. Dua dari rantai adalah massa molekul yang lebih tinggi (rantai berat, sekitar 50 kD) dan dua rantai yang ukurannya lebih kecil (rantai ringan, sekitar 25 kD). Dalam hal struktur dan urutan asam amino, dua rantai berat pada satu immunoglobulin adalah identik satu sama lain, hal yang sama juga terjadi pada dua rantai ringan (Day & Schultz, 2014). Dua rantai dengan berat molekul yang sama juga terlihat dari antibodi komersial pada Gambar 3 lajur 3.



Gambar 3. Hasil SDS-PAGE serum.

Keterangan: *protein marker* (M), *whole serum* (1), hasil purifikasi serum (2) dan immunoglobulin G komersial (3).

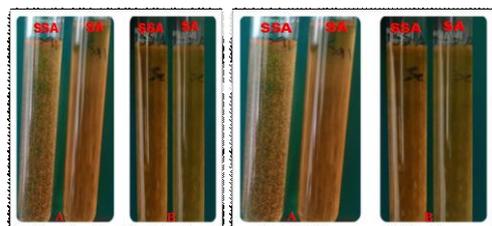
Deteksi protein A bakteri *S. aureus*

Pada penelitian ini untuk mengetahui keberadaan protein A dari *S. aureus* digunakan teknik sederhana, yaitu teknik *serum soft agar* (SSA) dan *soft agar* (SA). Teknik ini didasarkan atas kemampuan protein A berikatan dengan reseptor Fc IgG berbagai spesies mamalia. Protein A tidak dapat berikatan dengan bagian Fc immunoglobulin Y (IgY) pada ayam (Djannatun, 2002). Berdasarkan hasil pengujian (Tabel 1), isolat *S. aureus* Cowan 1 pada media pengujian SSA yang menggunakan serum normal kelinci menunjukkan koloni bakteri berbentuk kompak (Gambar 4A), sedangkan pada media pengujian SA dan SSA dengan serum normal ayam koloninya berbentuk difus. Pada hasil pengujian isolat *S. epidermidis* seluruh koloni berbentuk difus baik pada media pengujian SSA maupun SA (Gambar 4B).

Tabel 1. Bentuk koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* pada pengujian serum soft agar (SSA) dan soft agar (SA)

Isolat	Media pengujian		
	Soft agar (SA)	Serum soft agar (SSA)	
		Serum kelinci	Serum Ayam
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I	Difus	Kompak	Difus
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Difus	Difus	Difus

Hasil pengujian ini menunjukkan bahwa bakteri *S. aureus* Cowan 1 yang digunakan memiliki protein A. Koloni bakteri berbentuk kompak pada media SSA terjadi karena adanya interaksi antara protein A *S. aureus* dengan bagian Fc IgG serum kelinci yang mengakibatkan pertumbuhan koloni terhambat sehingga membentuk koloni kompak. Protein A merupakan protein yang dimiliki oleh bakteri *S. aureus* dan diketahui dapat berikatan dengan *fragment crystallizable* (Fc) IgG mamalia sehingga *fragment antibody binding* (Fab) dapat bereaksi dengan antigen spesifik (Foster *et al.*, 2014; Qtaishat *et al.*, 2013).



Gambar 4. Koloni *S. aureus* berbentuk kompak pada media SSA serum kelinci dan berbentuk difus/menyebar pada media SA (A); Koloni *S.*

epidermidis berbentuk difus pada media SSA dan SA(B).

Infeksi buatan pada udang vaname

Udang yang mengalami kematian pascapenyuntikan dengan bakteri penyebab vibriosis menunjukkan gejala klinis seperti: tubuh udang menjadi putih pucat dan terdapat bercak dan garis berwarna hitam (Gambar 5C). Menurut Longyant *et al.* (2007), vibriosis dapat menyerang udang vaname dewasa dengan gejala klinis yang lebih jelas. Gejala klinis pada udang vaname dewasa dengan berat 5–10 g yang terinfeksi vibriosis yaitu adanya bercak atau garis hitam di lateral *cephalothorax*, otot berwarna putih buram dan gejala yang lebih berat tubuh akan mengalami perubahan warna atau *smoky body coloration*. Penelitian Sari *et al.* (2015) mengenai gejala klinis yang ditimbulkan akibat infeksi bakteri vibriosis pada udang vaname dewasa (berat ± 5 g) adalah terjadi perubahan tingkah laku, morfologi dan mengalami penurunan respons pakan. Perubahan morfologi meliputi bagian tubuh, kaki renang, *telson*, dan *rostrum* memerah. Selanjutnya dilakukan preparasi dan ekstraksi organ terinfeksi untuk dilakukan pengujian koaglutinasi.



Gambar 5. Infeksi buatan pada udang vaname: (A) Kelompok perlakuan pada wadah akuarium; (B) Injeksi bakteri melalui

intramuscular; (C) Gejala klinis pada udang yang mengalami kematian.

Evaluasi pengujian *reagenkoaglutinasi*

Reagen koaglutinasi yang dibuat merupakan hasil *coupling* atau pengikatan antara suspensi *S. aureus* Cowan I hasil preparasi yang memiliki Protein A (sediaan A) dan IgG hasil purifikasi (sediaan B) dengan perbandingan tertentu sehingga diperoleh suatu suspensi yang tidak menunjukkan reaksi aglutinasi. Hasil optimasi *reagen* koaglutinasi diperoleh perbandingan optimal antara sediaan A dengan konsentrasi 10^9 cfu/mL dan sediaan B dengan konsentrasi 14,7 mg/mL yang tidak menimbulkan *self agglutination* yaitu 1:1 (v/v), perbandingan tersebut merupakan hasil optimal yang tidak menunjukkan adanya reaksi aglutinasi. Pengujian ini sangat penting dilakukan karena jika terjadi *self agglutination* maka akan mempengaruhi hasil pengujian yang mengarah pada positif palsu. *Self agglutination* dapat dipengaruhi oleh beberapa interaksi kimia yang terjadi diantara komponen-komponen kit. Interaksi tersebut antara lain interaksi hidrofobik, interaksi ion, dan ikatan kovalen diantara gugus sulfidril pada imunoglobulin (Rudolf *et al.*, 2009). Selain itu, *self agglutination* juga dapat dipengaruhi oleh pH dimana komponen utama reagen kit sebagian besar terdiri dari protein yang dapat mengalami penggumpalan pada pH tertentu yang dikenal dengan titik isoelektrik (Kiraga *et al.*, 2007; Alende *et al.*, 2011). *Reagen* koaglutinasi yang telah dibuat selanjutnya dipergunakan untuk pengujian

terhadap beberapa sampel organ udang yang terinfeksi bakteri *V. parahaemolyticus*.

Pengujian koaglutinasi dilakukan dengan cara mereaksikan reagen koaglutinasi dan sampel dengan perbandingan 1:1 (v/v). Sampel supernatan hasil ekstraksi organ diteteskan diatas gelas objek sebanyak 100 μ L dan ditambahkan 100 μ L reagen koaglutinasi. Hasil pengujian koaglutinasi terhadap sampel organ yang terinfeksi bakteri *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus* dan kontrol tanpa infeksi tersaji pada Tabel 2.

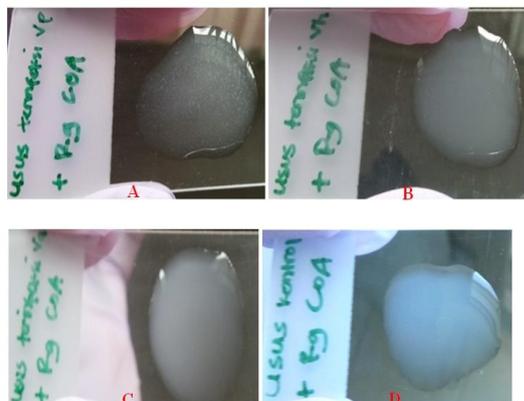
Tabel 2. Hasil pengujian koaglutinasi pada sampel organ udang vaname

Infeksi bakteri	Reaksi koaglutinasi pada organ terinfeksi		
	Hepatopankreas (HP)	Usus	Dagin
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+	+	+
<i>Vibrio harveyi</i>	-	-	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-
Kontrol tanpa infeksi	-	-	-

Keterangan : (+)Reaksi positif; (-) Reaksi negatif

Hasil pengujian reaksi koaglutinasi positif hanya terjadi pada sampel organ yang terinfeksi bakteri *V. parahaemolyticus*, ini ditandai dengan terbentuknya aglutinat yang terlihat seperti butiran-butiran halus pasir. Sedangkan hasil pengujian reaksi silang dengan menggunakan sampel organ yang terinfeksi bakteri *V. harveyi* dan *V.*

alginolyticus menunjukkan hasil negatif, ini ditandai dengan suspensi tetap homogen tidak terbentuk aglutinat sama halnya pada pengujian sampel kontrol negatif (Gambar 6).



Gambar 6. Keaksi pengujian koaglutinasi pada sampel organ udang : (A) organ usus terinfeksi *V. parahaemolyticus* (reaksi positif aglutinasi); (B) organ usus terinfeksi *V. harveyi* (reaksi negatif aglutinasi); (C) organ usus terinfeksi *V. alginolyticus* (reaksi negatif aglutinasi); (D) organ usus kontrol tanpa infeksi (reaksi negatif aglutinasi).

Berdasarkan hasil pengujian koaglutinasi membuktikan bahwa reaksi reagen koaglutinasi bersifat spesifik yang hanya bereaksi pada antigen target yaitu antigen *V. parahaemolyticus* dan tidak terjadi reaksi silang meskipun direaksikan dengan antigen bakteri yang masih dalam satu Genus *Vibrio*. Pada penelitian lain yang dilakukan Amanu *et al.* (2015), metode koaglutinasi yang memanfaatkan protein A bakteri *S. aureus* mampu mendeteksi antigen Iridovirus secara cepat pada organ usus dan ginjal ikan bawal bintang yang terinfeksi virus tersebut. Sedangkan pada penelitian lainnya yang dilakukan oleh Saharia dan Prasad (2001), telah berhasil mengembangkan metode koaglutinasi untuk mendeteksi antigen bakteri

Pseudomonas fluorescens yang menginfeksi ikan lele. Protein A merupakan protein yang disekresikan oleh bakteri *S. aureus* dan diketahui dapat berikatan dengan *fragment crystallizable* (Fc) *immunoglobulin G* (IgG) mamalia sehingga *fragment antibody binding* (Fab) dapat bereaksi dengan antigen spesifik (Foster *et al.*, 2014; Qtaishat *et al.*, 2013). Reaksi pengujian koaglutinasi juga hanya membutuhkan waktu sekitar satu menit, hal ini menunjukkan bahwa metode koaglutinasi yang dikembangkan dapat menjadi alternatif pilihan untuk mendeteksi keberadaan antigen bakteri *V. parahaemolyticus* pada udang dengan cepat dan akurat.

KESIMPULAN

Kit koaglutinasi yang telah dibuat mampu mendeteksi antigen bakteri *V. parahaemolyticus* pada udang vaname, sehingga metode koaglutinasi dapat menjadi alternatif pilihan sebagai metode diagnostik yang cepat dan akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Aguirre-Guzmán, G, López-Acevedo, E.A, Vázquez-Sauceda, M.D.L., 2013. *Vibrio harveyi* effect under survival of *Litopenaeus vannamei* larvae. *Scientia Agropecuaria*4:121–127.
- Alende, N, Nielsen, J.E, Shields, D.C, Khaldi, N., 2011. Evolution of the isoelectric point of mammalian proteins as a consequence of indels and adaptive evolution. *Proteins* 79: 1635-1648.
- Amanu, S, Rifai, A.B, Yulianah, L, Dwiwahyu, P., 2015. Evaluation of coagglutination test kit for read sea bream iridovirus. *Journal of Agricultural Science and Technology* 5 : 437–440.
- Black, J.G., 2005. *Microbiology: Principles and Explorations*. 6th Ed. Virginia: John Wiley

- & Sons, Inc.
- Buller, N.B., 2014. *Bacteria and Fungi from Fish and Other Aquatic Animals; A Practical Identification Manual*. 2nd Edition. Departement of Agriculture and Food Western Australia.
- Cappuccino, J.G, Sherman, N., 2005. *Microbiology A Laboratory Manual*. 7th Edition. San Francisco USA: Benjamin Cummings Publishing.
- Coico, R, Sunshine, G., 2015. *Immunology a Short Course*. USA: Wiley Blackwell.
- Qtaishat, N.M, Gussin, H.A, Peppergerg, D.R., 2013. ysteine-terminated B-domain of *Staphylococcus aureus* protein A as a scaffold for targeting GABA_A receptors. *Anal Biochem* 432:49-57.
- Cutler, P., 2004. *Method in Molecular Biology: Protein Purification Protocols*. Second edition. Totowa, New Jersey: Human Press.
- Day, J.M, Schultz, D.R., 2014. *Veterinary immunology principles and practice*. Second edition. London: CRC Press.
- Delves, J.P, Martin, J, Burton, R.D, Roitt, M.I., 2011. *Roitt's Essential Immunology*. USA: Willey-Blackwell.
- Djannatun, T., 2002. *Metode sederhana dan praktis pengujian keberadaan protein A Staphylococcus aureus isolate asal manusia dan sapi perah serta aplikasinya dalam pembuatan perangkat diagnostic*. disertasi. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, 2016. *Laporan Kinerja (LKj). Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Tahun 2015*. Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Foster, T.J, Geoghegan, J.A, Ganesh, V.K, Hook, M., 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology* 12: 49-62.
- Howard, C.G, Kaser, R.M., 2013. *Making and Using Antibodies : A Practical Handbook*. Second edition. Boca raton, USA: CRC Press.
- Hu, Z, Chen, Z, Huang, N, Teng, X, Zhang, J, Wang Z, Wei X, Qin K, Liu X, Wu X., 2015. Expression, purification of IL-38 in *Eschericia coli* and production of polyclonal antibodies. *Protein expression and purification* 107:76-82.
- Kharisma, A, Manan, A., 2012. Kelimpahan bakteri *Vibrio* sp. pada air pembesaran udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) sebagai deteksi dini serangan penyakit vibriosis. *Jurnal Ilmiah Perikanan Kelautan* 4 : 129-134.
- Kiraga, J, Mackiewicz, P, Mackiewicz, D, Kowalczyk, M, Biecek, P, Polak, N, Smolarczyk, K, Dudek, M.R, Cebrat, S., 2007. The relationships between the isoelectric point and length of proteins, taxonomy and ecology of organisms. *BMC Genomics* 8: 1-16.
- Leenaars, M, Hendriksen, C.F., 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR Journal* 46: 269-279.
- Longyant, S, Rukpratanporn, S, Chaivisuthangkura, P, Suksawad, P, Srisuk, C, Sithigorngul, W, Piyatiratitivoraku, I S, Sithigorngul, P., 2007. Identification of *Vibrio* spp. in vibriosis *Penaeus vannamei* using developed monoclonal antibodies. *Journal of invertebrate pathology* 98:63-68.
- Mattjik, A.A, Sumertajaya, I.M., 2002. *Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab Jilid I*. Bogor (ID): IPB Press.
- Ningrum, S.G, Arnafia, W, Oscarina, S, Soejoedono, R.D, Latif, H, Ashraf, M, Wibawan, I.W.T., 2016. Phenotypic and serotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strain from subclinical mastitis cattle. *Jurnal Veteriner* 17: 112-118.
- Rocha, L.B, Santos, A.R, Munhoz, D.D, Cardoso, L.T, Luz, D.E, Andrade, F.B, Horton, D.S, Elias, W.P, Piazza, R.M., 2014. Development of a rapid agglutination latex test for diagnosis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in developing world: defining the biomarker, antibody and method. *PLoS neglected tropical diseases* 8: e3150.
- Rudolf, J, Fuhrer, M, Galler, B, Ansari, P, Hasenhindl, C, Baumgartner, S., 2009. Differences in usability of rabbit iGg and chicken IgY after clean-up and impact on gold labelling properties. *Journal of immunological methods* 350: 79-88.
- Saharia, P.K, Prasad, K.P., 2001.

Development of co-agglutination kit for the diagnosis of *Pseudomonas fluorescens* infection in fishes. *Asian Fisheries Science* 14: 293-300.

- Sari, R.R/B, Sarjito, Haditomo, A.H.C., 2015. Pengaruh penambahan serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia*) dalam pakan terhadap kelulushidupan dan histopatologi hepatopankreas udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi*. *Journal of Aquaculture Management and Technology* 4:26-32.
- Wibawan, I.W.T, Halimah, L.S, Djannatun, T, Zarkasie, K., 2009. Develop of rapid agglutination test to detect chicken marek antibody. *Microbiology* 3: 79-83.