

Deteksi *Aeromonas hydrophila* pada Ginjal Mencit *Mus musculus* dengan Teknik Imunohistokimia

Detection of *Aeromonas hydrophila* in Kidney's Mice (*Mus musculus*) with Immunohistochemistry Technique

Intan Galuh Bintari*¹, M.Gandul Atik Yuliani²

¹Program Studi Penyuluhan Peternakan dan Kesejahteraan Hewan, Polbangtan Malang

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya

e-mail: *intangaluhb@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah *Aeromonas hydrophila* dapat dideteksi dengan menggunakan teknik imunohistokimia. Imunohistokimia adalah suatu proses untuk mendeteksi antigen (protein, karbohidrat, dll.) Terhadap sel jaringan dengan prinsip reaksi antibodi yang berikatan dengan antigen di dalam jaringan. Parameter penelitian ini adalah interaksi antigen dan antibodi yang divisualisasikan dengan munculnya warna coklat pada ginjal yang diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Mencit (*Mus musculus*) umur tiga bulan seberat 30 gram diinfeksi *Aeromonas hydrophila* dengan dosis 10^6 CFU / ml. Setelah seminggu, ginjal disiapkan untuk preparat histopatologi dengan pewarnaan imunohistokimia. Antibodi primer yang digunakan adalah antibodi kelinci (*New zealand white*) dengan dua perlakuan (P1 dan P2). P1 diinfeksi dengan menggunakan protein spesifik *Aeromonas hydrophila* 30 kDa dan P2 diinfeksi dengan menggunakan protein utuh *Aeromonas hydrophila*. Hasilnya ditunjukkan dengan membandingkan P1 dan P2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan warna coklat yang lebih banyak melalui P2 dibandingkan dengan P1.

Kata kunci—*Aeromonas hydrophila*, Mencit (*Mus musculus*), Antigen, Teknik Imunohistokimia.

ABSTRACT

*This research was aimed to determine whether the *Aeromonas hydrophila* can be detected by using immunohistochemistry technique. Immunohistochemistry was a process to detect antigens (proteins, carbohydrates, etc.) towards the cells of the tissues with antibodies reaction principle that binded to antigen in the tissues. The parameter of this research was an interaction between antigens and antibodies which were visualized by the appearance of brown color in the kidneys which were infected by *Aeromonas hydrophila*. The three-month old mice (*Mus musculus*) with 30 grams of weight were infected by *Aeromonas hydrophila* with 10^6 CFU/ml of doses. After a week, the kidneys were prepared for histopathology preparation by using immunohistochemistry staining. The primary antibodies used were rabbits' antibodies (*New zealand white*) with two treatments (P1 and P2). P1 was infected by using spesific proteins of *Aeromonas hydrophila* 30 kDa and P2 was infected by using the whole proteins of*

Aeromonas hydrophila. The results were showed by comparing P1 and P2. The results showed that there was a difference in the brown color which was more through in P2 compared to P1.

Keywords—*Aeromonas hydrophila*, Mice (*Mus Musculus*), Antigens, Immunohistochemistry Technique.

PENDAHULUAN

Sumber daya perikanan yang dimiliki oleh Indonesia sangat beragam dan memiliki banyak potensi. salah satunya budidaya laut dan tambak atau payau yang mengarah untuk kemajuan perekonomian Indonesia (Juanti dkk., 2014). Kegiatan budidaya ikan merupakan usaha manusia untuk mengelola faktor- faktor budidaya, hama, dan penyakit organisme (Reksono dkk., 2012). Menurut Wiyanto (2010), indikator keberhasilan dalam usaha budidaya ikan salah satunya adalah kesehatan ikan yang terkait dengan pemeliharaan lingkungan dan daya tahan terhadap serangan bakteri patogen. Salah satu bakteri yang umum dijumpai pada ekosistem perairan dan mempunyai peranan sebagai mikrobial flora bagi organisme air pada kondisi lingkungan yang stabil yaitu bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit yang berbahaya pada budidaya ikan air tawar. Bakteri tersebut banyak menyerang ikan mas yang merupakan salah satu komoditas unggulan air tawar dan dapat menginfeksi ikan pada semua ukuran yang dapat menyebabkan kematian hingga mencapai 80 %, sehingga mengakibatkan kerugian yang sangat besar dalam usaha budidaya ikan air tawar (Sanoesi, 2008).

Aeromonas hydrophila melimpah pada lingkungan air tawar terutama dengan kandungan bahan organik yang tinggi. Infeksi bakteri ini bersifat oportunistik, yaitu infeksi yang biasanya tidak menyebabkan penyakit pada hewan dengan sistem kekebalan tubuh yang normal, tetapi

dapat menyerang hewan dengan sistem kekebalan tubuh yang buruk. Infeksi *Aeromonas hydrophila* dapat dikenali karena adanya luka-luka eksternal (*ulcer*), terdapat bercak perdarahan pada daerah latero-ventral tubuh dan sirip serta sisik terkelupas (Wijyaning dan Wahyu, 2008).

Aeromonas hydrophila memiliki *Outer Membrane Protein* (OMP) yang merupakan protein pada bagian dinding sel bakteri gram negatif yang berhubungan dengan sifat virulensi dan bersifat imunogenik. *Outer Membrane Protein* (OMP) terletak pada lapisan paling luar bakteri yang penting untuk respon kekebalan bagi *host* dan sebagai target untuk obat terapi. Baru-baru ini, banyak perhatian mengenai OMP sebagai sebuah potensial yang sangat penting dalam komponen vaksin (Thangviji *et al.*, 2012).

Penelitian tentang *Outer Membrane Protein* (OMP) telah banyak diteliti dalam usaha mendapatkan antigen yang dapat diandalkan baik untuk diagnosis maupun untuk vaksin. Beberapa penelitian menggunakan hewan coba kelinci ataupun mencit. Digunakan hewan coba kelinci untuk memudahkan pengambilan darah dan pemeliharaan. Beberapa penelitian juga menggunakan organ ginjal sebagai sampel percobaan hal ini dikarenakan ginjal merupakan organ hematopoetik dan predileksi dari *Aeromonas hydrophila* pada hewan coba. Di dalam penelitian ini penulis ingin melakukan penelitian mengenai reaktivitas *Outer Membrane Protein* (OMP) *Aeromonas hydrophila* pada ginjal mencit (*Mus musculus*) dengan teknik Imunohistokimia untuk mengetahui adanya interaksi antigen dengan antibodi pada

ginjal mencit (*Mus musculus*) secara mikroskopis. Selain itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas teknik imunohistokimia dalam mendeteksi adanya *Aeromonas hydrophila* pada preparat histopatologi.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di kandang hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya untuk mengerjakan imunisasi maupun pemeliharaan mencit dan kelinci, Departemen Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya untuk mengerjakan teknik imunohistokimia. Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan dimulai bulan Agustus sampai Oktober 2015.

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi : protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila*, *whole protein Aeromonas hydrophila*, *Complete Freund's Adjuvant*, *Incomplete Freund's Adjuvant* (SIGMA F5506). Bahan yang digunakan untuk imunohistokimia adalah jaringan histopatologi ginjal mencit, xylol, alkohol 96%, 90%, 80%, dan 70%. Aquadest, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), formalin 10%. Hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%, antibodi primer (anti 30 kDa *Aeromonas hydrophila* dan anti *whole protein Aeromonas hydrophila*), antibodi sekunder berlabel SA-HRP (*Strep Avidin Horseradish Peroxidase*), dan 1% BSA. Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini terdiri dari : S spuit (*disposable*) untuk imunisasi dengan ukuran 3 ml. Sedangkan alat-alat yang digunakan untuk pewarnaan Imunohistokimia adalah pinset, pipet pasteur, pipet (mikropipet) original eppendorf (*made in Germany*), tabung eppendorf, mikrotom, inkubator dan mikroskop (Nikon H600L) dengan fasilitas

pendukung *Optilab* dengan pembesaran 100 dan 400 kali (Andonian *et al.*, 2001).

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 2 kelompok hewan percobaan. Kelompok pertama digunakan untuk produksi antibodi primer adalah kelinci jantan berumur lima bulan, berat badan 3 Kg, jenis *New Zealand White* yang belum mendapatkan vaksinasi, diperoleh dari salah satu tempat budidaya kelinci di Sidoarjo. Kelinci yang digunakan sebanyak tiga ekor yaitu satu ekor kelinci sebagai kontrol, satu ekor mendapat imunisasi protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila* dan satu ekor mendapat imunisasi *whole protein Aeromonas hydrophila*. Dipilih kelinci karena hewan ini mudah dipelihara, daya tahannya tinggi dan mudah diambil darahnya. Kelompok kedua digunakan untuk imunohistokimia yaitu 3 ekor mencit (*Mus musculus*) yang akan diinfeksi *Aeromonas hydrophila* 10^6 CFU/ml kemudian dipreparasi ginjalnya dan akan dilakukan pewarnaan imunohistokimia. Mencit (*Mus musculus*) diperoleh dari Pusat Veterania Farma (PUSVETMA) Surabaya berumur 3 bulan, berat badan 20-30 gr dan berjenis kelamin jantan.

Imunisasi pada kelinci dilakukan menggunakan protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila* dan *Whole protein Aeromonas hydrophila* yang telah berhasil diisolasi, sonikasi, dan elusi. Kemudian disuntikkan secara intramuskular pada kelinci galur *New Zealand White* yang berjenis kelamin jantan, berumur 5 bulan dan berat badan 3 kg. Kelinci yang diimunisasi sebanyak 2 ekor (P1 dan P2) dan 1 ekor sebagai kontrol (tanpa imunisasi). Sebelum dilakukan imunisasi kelinci diadaptasikan pakan, kandang dan lingkungan terlebih dahulu selama 7 hari. Kedua kelinci diimunisasi dengan menggunakan campuran antigen dengan *Complete Freund's Adjuvant*

(perbandingan 1:1). Imunisasi ke dua dilakukan setelah 14 hari berikutnya dengan campuran antigen dalam *Incomplete Freund's Adjuvant* (perbandingan 1:1). Imunisasi ke tiga dilakukan setelah 14 hari berikutnya dengan cara dan bahan yang sama seperti imunisasi ke dua dan seterusnya hingga imunisasi ke empat. Setiap sebelum melakukan *booster* dilakukan pengambilan darah melalui vena *auricularis* untuk mendapatkan antibodi primer.

Pengambilan sampel jaringan ginjal mencit dilakukan pada hari ke 7 setelah infeksi. Mencit di euthanasia dengan menggunakan kloroform kemudian dilakukan laparotomi untuk mengambil jaringan ginjal, dengan segera jaringan ginjal diletakkan pada toples/pot yang berisi larutan formalin 10% untuk kemudian dibuat preparat histopatologi ginjal dan dilakukan pewarnaan imunohistokimia.

Pewarnaan imunohistokimia dilakukan dengan cara : preparat histopatologi ginjal direndam dalam xylol sebanyak 2 kali, alkohol bertingkat secara berurutan (96%, 90%, 80%, 70%) untuk proses hidrasi. Dicuci dalam PBS pH 7,4 3 kali masing-masing selama 5 menit. Direndam dalam 3% hidrogen peroksida (dalam *destilate water*) selama 20 menit. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Direndam dalam 1% BSA selama 10-30 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan antibodi primer selama 1 jam pada suhu ruang. Lalu diinkubasi selama semalam.

Kemudian dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Kemudian ditambah antibodi sekunder berlabel *Strep avidin horseradish peroxidase* (SA-HRP) selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit.

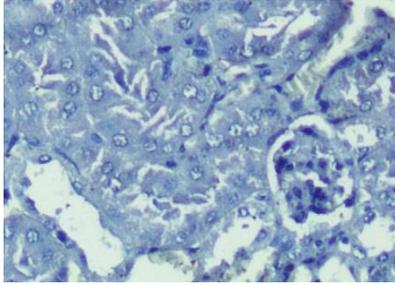
Preparat ditambahkan kromogen DAB (3,3-*diaminobenzidine tetrahydro chloride*)

selama 10-20 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam aquades selama 3x5 menit. Dilakukan *counterstain* dengan *hematoksilin* selama 5 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam aquades selama 3x5 menit. Dilakukan *mounting* dengan entellan. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop *optilab* pada pembesaran 100 dan 400 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan preparat histopatologi ginjal mencit dengan pewarnaan imunohistokimia dan diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x guna melihat adanya *Aeromonas hydrophila*. Pada pemeriksaan tersebut didapatkan bahwa pada perlakuan pertama (P1) dan perlakuan kedua (P2) dapat diidentifikasi adanya *Aeromonas hydrophila* pada histopatologi ginjal. Hal ini terlihat dengan adanya warna kecoklatan pada jaringan histopatologi ginjal mencit. Sedangkan pada perlakuan kontrol (P0) tidak terlihat adanya warna kecoklatan pada jaringan histopatologi ginjal.

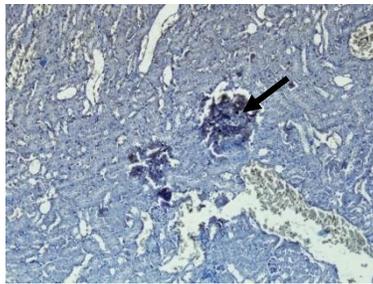
Hasil pada perlakuan pertama (P1) pada jaringan histopatologi terlihat adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan di glomerulus ginjal. Sedangkan pada perlakuan kedua (P2) hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan bahwa warna kecoklatan lebih banyak dan lebih menyebar, yaitu terdapat di glomerulus, capsula bowman maupun tubulus ginjal. Hasil ekspresi antigen *Aeromonas hydrophila* pada jaringan histologi ginjal mencit dapat dilihat pada Gambar dibawah ini.



Gambar 4.1 Glomerulus dan tubulus ginjal mencit kontrol pembesaran 400x dengan pewarnaan imunohistokimia.

Keterangan:

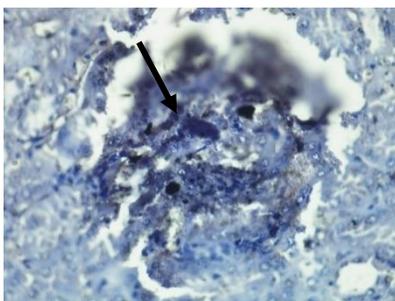
Glomerulus dan tubulus ginjal normal



Gambar 4.2 Glomerulus dan tubulus ginjal mencit perlakuan 1 (protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila*) pembesaran 100x dengan pewarnaan imunohistokimia.

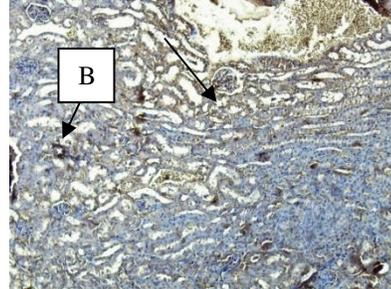
Keterangan:

Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada glomerulus ginjal mencit



Gambar 4.3 : Glomerulus ginjal mencit perlakuan 1 (protein spesifik 30 kDa *Aeromonas hydrophila*) pembesaran 400x dengan pewarnaan imunohistokimia.

Keterangan: Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna A klatan pada glomerulus ginjal mencit

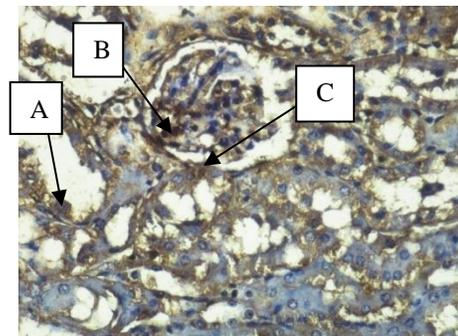


Gambar 4.4 : Glomerulus dan tubulus ginjal mencit perlakuan 2 (*whole protein*) pembesaran 100x dengan pewarnaan imunohistokimia.

Keterangan :

A: Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada glomerulus ginjal mencit.

B: Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada tubulus ginjal mencit.



Gambar 4.5 : Glomerulus dan tubulus ginjal mencit perlakuan 2 (*whole protein*) pembesaran 400x dengan pewarnaan imunohistokimia.

Keterangan :

A : Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada tubulus ginjal mencit.

B : Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada glomerulus ginjal mencit.

C : Adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada capsula bowman ginjal mencit.

Pada preparat histopatologi ginjal mencit jantan berumur 3 bulan dapat dilihat adanya *Aeromonas hydrophila* dengan metode imunohistokimia. Adanya *Aeromonas hydrophila* pada jaringan histopatologi ginjal mencit dapat divisualisasi dengan warna kecoklatan. Warna coklat merupakan hasil interaksi antara antigen yang berikatan dengan antibodi primer (anti 30 kDa dan anti *whole protein Aeromonas hydrophila*) dan antibodi sekundernya berupa *Streptavidin horseradish peroxidase* (SA-HRP) serta *substrate di amino benzidine* (DAB).

Kromogen DAB (*3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) ini telah mengandung peroksida H₂O₂ sebagai substansi penanda yang akan membentuk kompleks dengan enzim peroksidase dalam kompleks SA-HRP (*Streptavidin horseradish peroxidase*). Kompleks yang terbentuk dari kromogen DAB akan membentuk warna coklat gelap. Kromogen ini mempunyai ikatan yang sangat kuat dengan peroksida sehingga dengan proses dehidrasi dan *clearing* tidak akan mengalami perubahan warna.

Identifikasi adanya *Aeromonas hydrophila* pada jaringan ginjal mencit dengan menggunakan antibodi primer anti 30 kDa *Aeromonas hydrophila* menunjukkan adanya ikatan antara antigen dengan antibodi yang divisualisasi dengan warna kecoklatan di glomerulus ginjal. Sedangkan identifikasi pada jaringan ginjal mencit dengan menggunakan antibodi primer anti *whole protein Aeromonas hydrophila* menunjukkan bahwa warna kecoklatan lebih banyak dan lebih menyebar, yaitu terdapat di glomerulus, kapsula Bowman maupun tubulus ginjal. Hal ini terjadi karena pada antibodi primer anti *whole protein Aeromonas hydrophila* antigen yang diikat lebih banyak dibandingkan dengan antibodi primer anti 30 kDa *Aeromonas hydrophila*. Antibodi

primer anti 30 kDa *Aeromonas hydrophila* lebih spesifik hanya mengikat protein dengan berat molekul 30 kDa saja berbeda dengan antibodi primer anti *Whole protein Aeromonas hydrophila* yang dapat mengikat semua jenis protein yang berada pada bagian manapun dari bakteri *Aeromonas hydrophila*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa *Aeromonas hydrophila* dapat terdeteksi pada jaringan histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) yang ditunjukkan dengan adanya interaksi antara antigen dan antibodi dengan menggunakan teknik imunohistokimia yang divisualisasi dengan warna kecoklatan.

SARAN

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi dalam penelitian selanjutnya mengenai pembuatan vaksin *Aeromonas hydrophila*, perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan antibodi *Aeromonas hydrophila* untuk melakukan diagnosa penyakit pada ikan dan perlu adanya penelitian dengan menggunakan teknik yang sama guna melihat perubahan gambaran histopatologi pada organ yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Andonian, L., Mohammadi, A.A and Akbarzadeh, J., 2001, Preparation of HY Antibody in Female Mice as a Model for Sex Preselection, Iranian J. Publ. Health, 30(1-2).
- Juanti, F., Aisah dan Edy, 2014, Economic Landscape Sub Sektor Perikanan Pada Perekonomian Kabupaten Sidoarjo: Model Input Output Dan

- Analytical Hierarchy Process. e-Journal Ekonomi Bisnis dan Akuntansi, Universitas Jember, Vol.1.1, 42 -52.
- Reksono, B., Herman dan Yuniarti, 2012, Pengaruh Padat Penebaran *Grailaria sp.* Terhadap Pertumbuhan dan Kelangsungan Hidup Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) pada Budidaya Sistem Polikultur. Jurnal Perikanan dan Kelautan, Vol.3, no.3, Hal.41-49.
- Sanoesi, E, 2008, Penggunaan Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya Linn*) terhadap Jumlah Sel Makrofag pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio L*) yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*, Jurnal Penelitian Perikanan, Vol 11, No. 2, Desember 2008.
- Setijanto, H, 2002, Teknik Mempelajari Biologi Sel; Identifikasi Beberapa Substansi atau Senyawa Yang Terlibat Dalam Metabolisme Sel, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Sukadi, M, 2002, Peningkatan Teknologi Budidaya Perairan (*The Improvement of fish Culture Technology*), Direktur Jenderal Perikanan Budidaya. Departemen Kelautan dan Perikanan, Hal.16.
- Thangviji, V., Mariavincet, M., and Setty, B.A., Paramasamy and Thavasimuthu. 2012, Immunization with the *Aeromonas* OMP provides Protection against *Aeromonas hydrophila* in Goldfish (*Carassius auratus*). Centhe for Marine Science and Technology, Manonmaniam Sundaran University, India.
- Wijyaning, R., dan Wahyu, D, 2008, Daya Antibakterial Pigmen Pyocyanin dari Isolat (*Pseudomonas aeruginosa*) terhadap *Aeromonas hydrophila* secara IN VITRO, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Wiyanto, D.B., 2010, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak rumput laut *kappaphycus alvarezii* dan *Eucheuma denticullatum* terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio harveyii*. Jurnal Kelautan, Universitas Trunojoyo, Vol.3, no.1.

Deteksi *Aeromonas hydrophila* pada Ginjal Mencit *Mus musculus* dengan (Intan Galuh
Bintari, dkk)