

Full Paper

ISOLASI, PURIFIKASI DAN IMMUNOGENITAS PROTEIN OUTER MEMBRAN *Vibrio alginolyticus* PADA IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus*)

ISOLATION, PURIFICATION AND IMMUNOGENICITY OF OUTER MEMBRAN PROTEIN OF *Vibrio alginolyticus* IN GROUPEL (*Epinephelus fuscoguttatus*)

Desrina^{1*)}, Arief Taslihan²⁾, Ambariyanto³⁾, Ervia Yudiati³⁾, Yulius Docang Casessar³⁾,
Raden Bagus Sugio Sumanta³⁾, Triyanto⁴⁾, Hotnida Junita Situmeang⁵⁾,
dan Langkah Sembiring⁵⁾

Abstract

The main objectives of this research were to isolate, purify and determine the immunogenicity of the outer membrane protein of *V. alginolyticus*. The outer membrane protein was isolated by sonication, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide agarose gel electrophoresis (SDS-PAGE) and purified by electroelution method. Four outer membrane proteins were obtained: namely 32.0; 37.83; 64.13 and 73.43 kDa. Its immunogenicity in grouper *Epinephelus fuscoguttatus* was compared to that of bacterin of the same isolate. The immunogenicity test was conducted by intra peritoneal injection method. Each protein was dissolved in sterile Phosphate Buffer Saline (PBS) and Freund's Complete Adjuvant (FCA) (1:1) and injected 5 µg/ fish (fish weight 10-15 g). Bacterin (10⁶, 10⁷ dan 10⁸ cells/ml) was prepared in the same manner and injected at dosage of 0,2 ml/fish. Control fish were injected with 0.2 ml sterile PBS (pH 7.2). Booster was done a week later by injecting protein or bacterin with the Freund's Incomplete Adjuvant (FIA). The agglutination test of antibody produced recognized cell surface protein of the whole cell of *V. alginolyticus*. Outer membrane protein 73.43 kDa was more immunogenic than the rest of proteins and bacterin, based on agglutinating antibody titer.

Key words: *Epinephelus fuscoguttatus*, immunogenicity, outer membrane protein, *Vibrio alginolyticus*

Pengantar

Vibrio alginolyticus adalah bakteri yang umum dijumpai di perairan laut tropis (Baumann *et al.*, 1984). Di Asia Tenggara, bakteri ini merupakan penyebab vibriosis pada ikan kerapu budidaya (Kanchana khan, 1996; Bondad-Reantaso *et al.*, 2000) dan paling sering diisolasi dari ikan kerapu macan dan kerapu tikus yang terserang vibriosis di Indonesia (Taslihan *et al.*, 2000; Nitimulyo *et al.*, 2005a). Niti-

mulyo *et al.* (2005a) juga melaporkan disamping *V. alginolyticus*, spesies *Vibrio* lain yang patogenik pada ikan kerapu adalah *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. metchnikovii*, *V. furnisii* dan *V. fluvialis*. Stoskopf (1993) mengemukakan *V. alginolyticus* umum diisolasi dari ikan karang yang sakit dengan gejala septisemia. Seperti yang dilaporkan oleh Nitimulyo *et al.* (2005a) gejala klinis ikan yang terinfeksi patogen ini adalah lesu,

¹⁾ Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNDIP Jl. Hayam Wuruk No. 4A Semarang. Telp/Fax : (024) 8311525.

²⁾ Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau, Jl. Pemandian Kartini PO BOX 1 Jepara

³⁾ Jurusan Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNDIP, Kampus Tembalang, Semarang.

⁴⁾ Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian UGM. Jl. Flora Bulaksumur, Yogyakarta.

⁵⁾ Jurusan Biologi Fakultas Biologi UGM . Jl. Tenika Selatan Sekip Utara , Yogyakarta.

^{*} Penulis untuk korespondensi: E-mail: desrina@alumni.undip.ac.id.

warna kulit gelap, sisik lepas, pendarahan pada rahang, abdomen, tutup insang, pangkal sirip, luka yang berkembang menjadi ulser pada tubuh, warna tubuh gelap atau terang, pendarahan pada organ dalam, hati dan ginjal bengkak.

Pengendalian vibriosis dengan menggunakan antibiotik belum memberikan hasil yang memuaskan. Penggunaan antibiotik untuk jangka lama mempunyai beberapa kelemahan yaitu menimbulkan resistensi pada bakteri, mencemari lingkungan dan meninggalkan residu di tubuh ikan. Vaksinasi merupakan alternatif yang menjanjikan untuk mengendalikan penyakit vibriosis pada ikan kerapu.

Penelitian vaksinasi ikan kerapu telah dilakukan oleh Nitimulyo *et al.* (2005b) dengan bakterin polivalen yang diberikan dengan cara suntikan intraperitoneal, rendam dan oral. Ikan yang divaksin mempunyai sintasan yang lebih tinggi dari ikan yang tidak divaksin, akan tetapi tidak ada perbedaan sintasan dari ketiga metode yang dicobakan. Dalam upaya memaksimalkan perlindungan suatu vaksin perlu diketahui komponen sel yang imunogenik. Pengalaman pada mamalia menunjukkan bahwa vaksin yang efisien dan efektif adalah yang mengandung antigen murni yang berasal dari komponen sel bakteri (Kuby, 1992) seperti yang dilakukan untuk vakasinas meningitis, tetanus dan difteri pada anak-anak.

Protein outer membran (POM) adalah bagian sel bakteri gram negatif yang khas yang mengandung LPS. Keduanya merupakan faktor virulensi pada bakteri dan bersifat "conserved" (lestari) pada spesies yang sama (Neidhardt *et al.*, 1990) dan imunogenik kuat (Salati, 1988; Esteve-Gassent & Amaro, 2004). Protein outer membran *Vibrio* yang telah teridentifikasi antara lain adalah porin (Finlay & Falkow, 1997; Davey *et al.*, 1998; van der Woude & Baumler 2004), side-

rofore (Tashima *et al.*, 1996; Deitsch *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 2005) dan adhesin. Hasil penelitian menunjukkan POM telah terbukti merupakan komponen vaksin yang potensial untuk mengendalikan penyakit ikan (Vinitnantharat *et al.*, 1993; Colquhoun & Sorum, 1998; Rahman & Kawai, 1999; Collado *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2002; Esteve-Gassent & Amaro, 2004). Hal ini karena menurut Finlay & Falkow (1997) bahwa banyak faktor virulensi dan kepatogenan dibuat kodenya di outer membran sehingga POM bersifat spesifik, lestari dan imunogenik kuat.

Penelitian ini bertujuan mengisolasi, mempurifikasi dan menguji imunogenisitas POM bakteri *V. alginolyticus* pada ikan kerapu macan dan membandingkannya dengan bakterin.

Bahan dan Metode

Isolasi Protein Outer Membran (POM)

Isolat *V.alginolyticus* 8 berasal dari ikan kerapu macan yang terserang vibriosis dan telah diidentifikasi secara biokimia (Bauman *et al.*, 1993; Barrow & Feltham, 1993) serta terbukti virulen pada uji virulensi. Isolasi Protein Outer Membran (POM) mengacu pada Sprott *et al.* (1994) dan Duncan *et al.* 1998). Bakteri dikultur dalam medium Trypticase Soy Broth (TSB) (Oxoid, England) kemudian dituangkan dalam media Trypticase Soy Agar (TSA) (Oxoid, England) dalam cawan petri besar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Sel dipanen, disuspensikan dalam Phosphate Buffer Saline (PBS) steril (pH 7,4) dan disentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pellet dicuci sebanyak 3 kali dalam PBS 0,01 M (pH 7,4) dengan 0,9% NaCl. Selanjutnya sel disuspensikan dengan PBS 0,01 M (pH 7,4) dan dipecahkan dengan sonikasi (6 x 30 detik, 50 Hz) (Labsonic). Hasilnya dicuci sebanyak 4 kali dengan PBS (pH 7,4) disentrifuse pada 14.000 g selama 15 menit dan supernatan diambil.

Protein yang diperoleh disuspensikan ke dalam campuran protease inhibitor (1 ml, 0,5% nonidet-P40 dan 1 mM Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) (Sigma) dan ditambahkan PBS seperlunya sesuai dengan banyaknya protein, diaduk pelan selama 2 jam pada 4°C, dan selanjutnya dipecahkan kembali dengan sonikasi 6 x 30 detik (sonikasi selama 30 detik istirahat 1 menit) dengan gelombang suara 159 Hz. Pelet disentrifuse 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan diambil dan didialisis selama 12 jam dalam PBS. Cairan yang mengandung protein outer membran disimpan pada suhu -20°C.

Protein outer membran pada supernatan dipresipitasi dengan menambahkan ammonium sulfat sampai kejenuhan 100% sambil terus diaduk pelan dan selanjutnya disentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Endapan yang diperoleh dilarutkan dalam PBS 0,01 M (pH 7,4) dan dilakukan dialisis dalam PBS 0,01 M (pH 7,4) pada suhu 4°C selama 24 jam.

SDS-PAGE outer membran

Profil POM yang diperoleh dipisahkan dengan metoda sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) menggunakan 12% (berat/vol) gel pemisah dan 5% (berat/vol) "stacking gel" pada 100 V. Berat molekul POM yang ditentukan dengan membandingkannya dengan berat molekul Sigmamarker (Sigma) dengan berat molekul 6,5 ; 14, 2; 20; 24; 29; 36; 45; 55; 66; 84; 97,4; 116; dan 205 kDa. Selanjutnya gel diwarnai dengan comassie blue 0,1% selama 18 jam dan didestaining dalam campuran metanol 50%, asam asetat 40% dan akuabides 40% (vol/vol) sampai latar belakang jernih. Gel disimpan dalam larutan asam asetat 10%.

Purifikasi POM

Band protein utama (32,0; 37,83; 64,13; dan 73,43 kDa) dimurnikan dengan metode elektroelusi. Gel yang berisi pro-

tein (dari SDS-PAGE) dicuci dengan akuabides dan band protein yang diinginkan dipotong dan dimasukkan ke dalam tabung dialisis yang berisi 3 ml larutan buffer TBE dan direndam secara horizontal dalam buffer TBE pH 8,0 dalam ruang elektroforesis. Elektroelusi dilakukan pada 100 V pada 10°C selama 18-24 jam. Protein yang terkumpul ditampung dalam tabung eppendorf dan dikeringkan dengan "freeze dryer". Konsentrasi protein diestimasi dengan Biorad Protein Assay (Bio-rad) dan dideteksi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Sebagai blanko digunakan campuran Biorad Protein Assay dan akuabides.

Ikan uji

Ikan kerapu macan (panjang 8-9 cm, berat 13-17 g) yang digunakan berasal dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Seminggu sebelum dilakukan uji immunogenik ikan didesinfeksi dengan merendam dalam larutan KMnO_4 1 ppm selama 15-30 menit untuk membunuh ektoparasit. Beberapa hari kemudian ikan juga diperiksa untuk memastikan bahwa ikan tidak terinfeksi parasit dan bakteri *Vibrio* dengan cara mengisolasi bakteri dari ginjal dan melakukan pemeriksaan eksternal yang menyeluruh pada 5 ekor ikan yang diambil secara acak dari populasi yang akan digunakan dalam uji. Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa ikan yang digunakan dalam penelitian ini tidak terinfeksi bakteri *Vibrio* maupun parasit dan sehat.

Pembuatan bakterin

Bakterin dibuat dengan menumbuhkan isolat *V. alginolyticus* 8 pada medium agar Nutrien Agar (NA) (Oxoid, England) + 2% NaCl dan dinkubasi pada 30°C selama 24 jam. Bakteri kemudian dipanen dan disuspensikan dalam PBS steril (pH 7,2) divortex, ditambahkan formalin 2% (v/v) (Nitimulyo *et al.*, 2005b) dan diletakkan dalam refrigerator selama 24 jam. Campuran bakteri formalin dicuci 4 kali untuk

menghilangkan formalin dengan PBS steril (pH 7,2) dengan kecepatan 8000 rpm suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan yang mengandung formalin dibuang dan pelet diresuspensikan dalam PBS steril dan disimpan dalam tabung reaksi steril di dalam refrigerator. Selanjutnya dilakukan uji viabilitas untuk memastikan tidak terjadi kontaminasi dan bakteri telah mati dengan cara menumbuhkan bakteri dalam media TCBSA dan NA. Uji viabilitas ini dilakukan secara berkala selama penelitian. Bakteri disimpan dalam refrigerator sampai digunakan.

Uji immunogenisitas

Langkah pertama adalah menentukan titer antibodi awal dengan mengambil darah dari 5 ekor ikan yang diambil secara acak dengan asumsi telah mewakili populasi ikan. POM yang digunakan berukuran 32,0 kDa (band A); 37,83 kDa (band B); 64,13 kDa (band C) dan 73,43 kDa (band D). Protein disuspensikan dalam PBS steril (pH 7,2) sebanyak 5 µg protein / 0,1 ml PBS dan dicampur dengan Freund's Complete Adjuvant (FCA) (Sigma) dengan jumlah yang sama (0,1 ml). Dosis yang disuntikkan ke ikan adalah 5 µg/ ekor ikan atau 0,2 ml campuran protein dan FCA/ ekor ikan. Jumlah ikan yang disuntik per band POM adalah 15 ekor dan 15 ekor ikan kontrol disuntik dengan 0,2 ml PBS. Sebelum disuntik, ikan dianestesi dengan memasukkannya ke dalam ember yang berisi air laut yang telah dicampur dengan minyak cengkeh (1ml/ 10 l air laut), dan selanjutnya ikan disuntik secara intraperitoneal. Ikan langsung dimasukkan kembali ke dalam akuarium dengan kepadatan 5 ekor/ akuarium. Se- minggu kemudian ikan kembali disuntik dengan POM ("booster") dengan dosis dan cara yang sama dengan suntikan pertama. Bedanya adalah pada penyuntikan booster ini POM dicampur dengan Freund's Incomplete adjuvant (FIA) (Sigma). Sebagai pembanding digunakan bakterin. Kepadatan bakterin yang digunakan adalah 10^6 , 10^7 dan 10^8 sel/ml.

Bakterin yang sudah disiapkan sesuai dosis dicampur dengan FCA dengan perbandingan 0,1 ml bakterin dan 0,1 ml FCA, divortex sampai homogen, dan kemudian disuntikkan ke ikan secara intraperitoneal dengan 0,2 ml campuran bakterin-FCA. Jumlah ikan yang disuntik per dosis bakterin adalah 15 ekor. Sebanyak 15 ekor ikan kontrol disuntik dengan 0,2 ml PBS steril. Seminggu kemudian ikan disuntik dengan campuran 0,1 bakterin dan 0,1 FIA dengan dosis 0,2 ml/ ekor ikan.

Pengambilan darah dan persiapan serum

Pengambilan darah untuk mengukur titer antibodi awal dilakukan sebelum ikan disuntik pertama kali. Sampling darah untuk mengukur efek immunogenik dilakukan seminggu setelah suntikan booster (2 minggu setelah suntikan pertama). Jumlah ikan yang dibunuh setiap sampling adalah 3 ekor (1 dari masing masing replikasi). Karena darah yang diperoleh dari satu ekor ikan sangat sedikit sehingga tidak memungkinkan untuk diperiksa secara individu, maka darah dari ke 3 ekor ikan yang berasal dari masing masing ulangan pada setiap band protein uji dikumpulkan menjadi satu. Darah diambil setiap minggu selama 5 minggu dan dilakukan pengukuran titer antibodi.

Ikan yang akan diambil darahnya dianestesi dengan minyak cengkeh seperti yang telah dijelaskan pada uji imunogenitas. Selanjutnya dipotong bagian ekornya dan darah ditampung dalam tabung eppendorf steril atau tabung hematokrit. Darah diletakkan dalam refrigerator selama 6-12 jam sampai serum keluar. Selanjutnya disentrifuse untuk memisahkan serum dari sel darah. Serum diambil dengan mikropipet dan dipindahkan ke mikrotiter plate dengan 96 sumur dan diukur titer antibodinya. Ikan yang mati selama penelitian diperiksa untuk menentukan penyebab kematiannya dan jika memungkinkan diambil darahnya.

Pengukuran titer antibodi

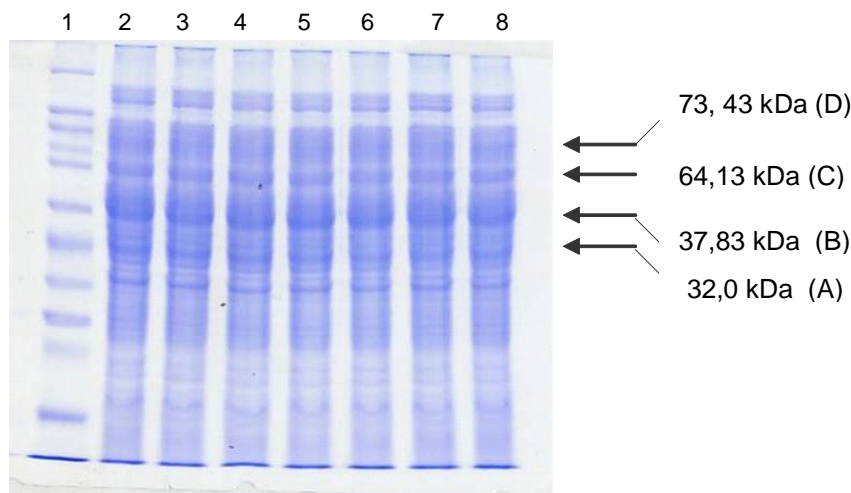
Pengukuran titer antibodi dilakukan dengan metoda mikrotiter plate menurut Shamsuddin (1994) sebagai berikut: sumuran pertama diisi dengan 25 µl serum selanjutnya pada sumuran ke 2 sampai 5 diisi dengan 25 µl bakterin (sebagai kontrol). Sumuran 6 dan seterusnya masing-masing diisi dengan 25 µl PBS steril (pH7,2). Selanjutnya pada sumuran 6 ditambahkan 25 µl serum dan dilakukan pengenceran berganda. Langkah berikutnya ke dalam sumuran 6 sampai 15 ditambahkan 25 µl bakterin dengan kepadatan 10⁴ sel/ml dan diinkubasi selama 6-12 jam. Aglutinasi ditandai dengan terbentuknya lapisan gumpalan merata di dasar sumuran. Untuk memastikan pembacaan hasil dibandingkan dengan lobang kontrol. Titer antibodi diukur sebagai pengenceran tertinggi yang masih memberikan aglutinasi.

Hasil dan Pembahasan

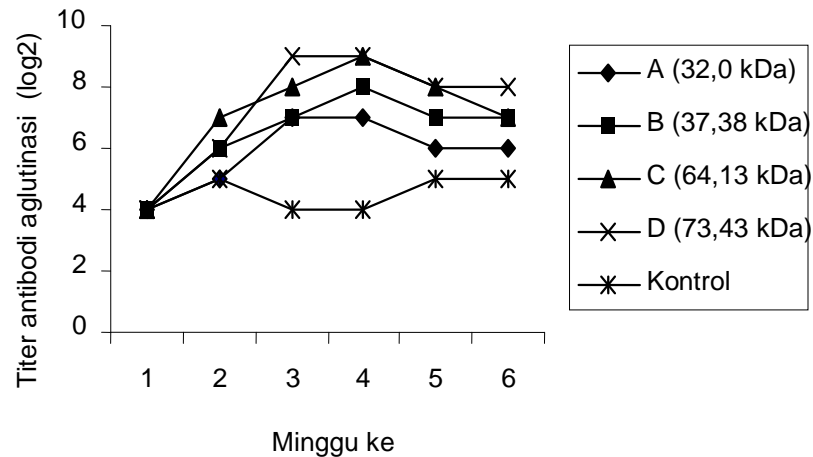
POM yang terdapat pada *V. alginolyticus* yang diamati dalam penelitian ini terdiri atas 4 protein dengan berat molekul rendah dan sedang dan 2 protein dengan berat molekul tinggi (Gambar 1).

Hasil yang hampir sama juga dilaporkan Vinitnantharat *et al.* (1993) pada bakteri *Edwarsiella ictaluri* dan Colquhoun & Sorum (1998) pada *V. salmonicida*. Kemungkinan protein dengan berat molekul tinggi yang ditemukan merupakan bagian dari sistem siderofor seperti yang dilaporkan Ahn *et al.* (2005) pada *V. fluvialis*. Outer membran merupakan bagian sel bakteri yang khas yang ditemukan pada bakteri gram negatif dan merupakan faktor patogenesis yang biasanya mengandung 3 atau 4 protein utama (Neidhardt *et al.*, 1990). Menurut Finlay & Falkow (1997) dan van der Woude & Bäumler (2004), banyak faktor virulensi dan patogenisitas dibuat kodenya di outer membran dan profil protein outer membran bervariasi menurut spesies, kondisi kultur dan frekuensi subkultur.

Antibodi yang dihasilkan ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) yang disuntik POM dan bakterin menunjukkan pola yang sama yaitu terjadi peningkatan titer antibodi yang stabil dari minggu pertama ke minggu kedua dan puncak titer terjadi pada minggu ketiga pasca injeksi booster. Selanjutnya produksi antibodi mulai menurun sampai akhir penelitian. Pola yang sama juga terjadi pada penelitian



Gambar 1. Protein outer membran *V. alginolyticus* 8. Lajur 1 marker. Lajur 2-8 protein outer membran *V. alginolyticus* 8.



Gambar 2. Titer antibodi ikan kerapu macan yang disuntik protein outer membran *V. alginolyticus* 8.

Vinitnantharat *et al.* (1993) pada ikan channel catfish (*Ictalurus punctatus*) yang disuntik protein outer membran bakteri *E. ictaluri*.

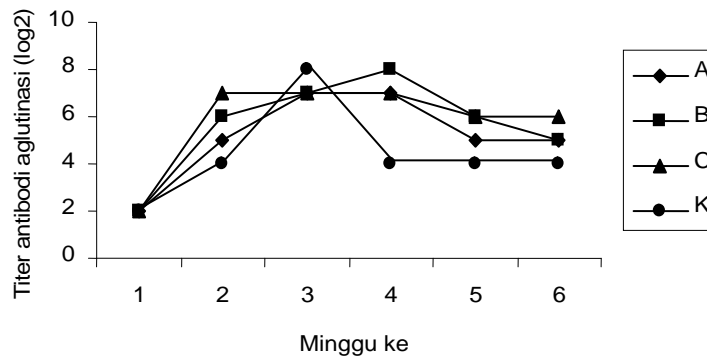
Keempat band POM dan bakterin *V. alginolyticus* 8 bersifat immunogenik pada ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) yang terlihat dari antibodi yang dihasilkan yang lebih tinggi dari ikan kontrol (Gambar 2).

Dari gambar 2 terlihat keempat protein merangsang respon kekebalan dalam tingkatan yang berbeda. Secara umum, ikan yang disuntik dengan band D menghasilkan antibodi yang relatif lebih tinggi dari band yang lain. Walaupun Band C juga mempunyai puncak titer antibodi yang sama dengan band D akan tetapi waktu yang dibutuhkan untuk mencapai puncak titer lebih lama dan band D masih mampu merangsang antibodi yang tertinggi sampai minggu ke lima pasca penyuntikan. Titer antibodi ikan yang disuntik dengan band B lebih rendah dari yang disuntik band C dan D, sedangkan ikan yang disuntik dengan band A mempunyai titer antibodi yang terendah selama penelitian. Data ini menunjukkan bahwa immunogenisitas POM berkaitan dengan ukuran molekul, dan POM dengan berat molekul yang lebih tinggi cenderung

lebih immunogen. Menurut Kuby (1992) salah satu faktor yang mempengaruhi immunogenisitas protein adalah berat molekulnya, dan immunogen yang terbaik cenderung mempunyai berat molekul 100 kDa. Terdeteksinya antibodi ikan kontrol menunjukkan ikan pernah terinfeksi sebelumnya walaupun pada waktu pemeriksaan sebelum penelitian tidak terisolasi bakteri dari ginjal ikan kerapu macan.

Produksi antibodi ikan kerapu macan (*E. fuscoguttatus*) yang disuntik bakterin lebih rendah dari yang diinjeksi protein outer membran (Gambar 3). Tiga dosis yang disuntikkan, dosis B (konsentrasi bakterin 10^7 sel/ml) menghasilkan titer antibodi tertinggi selama penelitian dan kedua dosis lainnya menghasilkan titer antibodi yang hampir sama.

Titer antibodi tertinggi ikan yang disuntik dengan POM sedikit lebih tinggi (2^9) dari bakterin (2^8) dan tetap tinggi sampai akhir pengamatan. Lebih lanjut, secara umum keempat band POM menghasilkan titer antibodi yang meningkat dengan stabil dan pada akhir penelitian tetap lebih tinggi dari bakterin. Hal ini menunjukkan bahwa POM bersifat lebih immunogenik dari bakterin dan potensial untuk memberikan perlindungan yang lebih baik jika dijadikan



Gambar 3. Titer antibodi ikan kerapu macan *E. fuscoguttatus* yang disuntik dengan bakterin *V. alginolyticus* 8 dengan konsentrasi yang berbeda. (A= bakterin 10⁶ sel/ml; B= bakterin 10⁷ sel/ml; C= B= bakterin 10⁸ sel/ml; K= kontrol)

vaksin. Hasil penelitian Rahman *et al.* (2002) menunjukkan bahwa vaksin yang terdiri dari fraksi protein outer membran bakteri *Flexibacter psychrophyla* memberikan titer antibodi dan kekebalan melindungi yang lebih tinggi dari vaksin bakterin pada ikan trout dan ayu. Hal ini karena outer membran mengandung protein yang penting dalam faktor virulensi dan LPS. Keduanya merupakan stimulator respon kekebalan ikan yang kuat (Salati, 1988; dan Esteve-Gassent & Amaro, 2004). Rahman & Kawai (2000) menemukan bahwa protein outer membran *Aeromonas hydrophila* mempunyai sifat imunogenisitas yang melindungi pada ikan mas koki (*Carassius auratus*). Dilaporkan juga kekebalan yang diberikan POM *Aeromonas hydrophila* yang dikultur *in vivo* tidak berbeda dengan yang dikultur *in vitro*. komponen imunogenik utama dari bakterin yang sekarang digunakan sebagai vaksin melawan *V. salmonicida* adalah protein OMP mengandung LPS yang berukuran 40 kDa.

Dalam penelitian ini keempat band POM yang diuji terbukti imunogenik dan mampu merangsang produksi antibodi tinggi dan stabil pada ikan kerapu macan. Lebih lanjut, antibodi yang dihasilkan mampu mengenali protein pada permukaan sel *V. alginolyticus* utuh. Dari keempat band POM *V. alginolyticus* 8 yang diuji, band D (berat molekul 73, 43 kDa) lebih bersifat

imunogenik dari band yang lain karena menghasilkan titer antibodi yang tertinggi dan masih tetap tinggi sampai akhir pengamatan.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih Dr. drh. Wayan Artama (Fakultas Kedokteran Hewan UGM) dan Arsiyah (Pusat Studi Bioteknologi UGM) yang telah membantu dalam isolasi POM. Penulis juga mengucapkan terima kasih pada Zariah dan Sri Murti Astuti yang telah membantu dalam uji imunogenik. Penelitian ini merupakan bagian dari Riset Unggulan Terpadu (RUT) yang dibiayai oleh Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Kementerian Negara Riset dan Teknologi.

Daftar Pustaka

- Ahn, S., J. Han, J. Lee, K. Park, and I. Kong. 2005. Identification of an iron regulated hemin-binding outer membrane protein Hup O in *Vibrio fluvialis*: Effects on hemolytic activity and the oxidative stress response. *Infection and Immunity*. 73 (2): 722-729.
- Barrow, G.I., and R.K.A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*.

- Cambridge University Press. Cambridge. 329 p.
- Baumann, P., A.L. Furniss, and J.V. Lee. 1984. Genus *Vibrio*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1. N.R. Krieg and J.G. Holt (Eds.). William and Wilkins, Baltimore. Maryland : 528-550.
- Bondad-Reantaso, M.G., S. Kanchana khan and S. Chinabut. 2000. Review of grouper diseases and health management strategies for grouper and other marine finfish diseases. Regional Workshop on Sustainable Seafarming and Grouper Aquaculture. Collaborate APEC Grouper Research and Development Network. FWG 01/99. 17-20 April 2000. Medan. Indonesia. 232 p.
- Casadevall, A., and L. Pirofski. 1999. Host-pathogen interaction: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*. 67 (8): 3703-3713.
- Colquhoun, D.J. and H. Sorum. 1998. Outer membrane protein expression during *in vivo* cultivation of *Vibrio salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology*. 8: 367-377.
- Davey, M.L., R.E.W. Hancock, and L.M. Mutharia. 1998. Influence of culture conditions on expression of the 40-kilodalton porin protein of *Vibrio anguillarum* serotype 02. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(1): 138-146.
- Deitsch, K.W., E.R. Moxon, and T.E. Wellems. 1997. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal and fungal infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61(3): 281-293.
- Esteve-Gassent, M.D. and C. Amaro. 2004. Immunogenic antigens of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* serovar E. *Fish and Shellfish Immunology*. 17: 277-291.
- Finlay, B. B. and S. Falkow. 1997. Common themes in microbial pathogenicity, revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61 (2): 136-169.
- Horne, M.T., and A.E. Ellis. 1988. Commercial production and licensing of vaccines for fish. In: *Fish Vaccination*. A.E.Ellis (Ed.). Academic Press Inc. Sandiego. CA.: 47-64
- Kanchanakhan, S. 1996. Diseases of cultured grouper. *AAHRI Newsletter Article*. 5 (2): 1-4.
- Kuby, J. 1992. *Immunology*. W.H Freeman and Company. New York. 585 p.
- Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, and M. Schaechter. 1990. *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 506 p.
- Nitimulyo, K.H., A. Isnansetyo, Triyanto, I. Istiqomah, dan M. Murdjani. 2005a. Isolasi , identifikasi dan karakterisasi *Vibrio* spp patogen penyebab vibriosis pada kerapu di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. *Jurnal Perikanan*. VII (2): 80-94.
- Nitimulyo, K.H., A. Isnansetyo, Triyanto, M. Murdjani, dan L. Solichah. 2005b. Efektifitas vaksin polivalen untuk pengendalian vibriosis pada kerapu tikus (*Cromoliptes altivelis*). *Jurnal Perikanan*. VII (2): 95-100.
- Rahman, M.H. and K. Kawai. 2000. Outer membrane proteins of *Aeromonas*

- hydrophila* induce protective immunity in goldfish. Fish and Shellfish Immunology. 10: 379-382.
- Rahman, M.H., A. Kuroda, J.M. Dijkstra, I. Kiryu, T. Nakanishi, and M. Ototake. 2002. The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. Fish and Shellfish Immunology. 12: 169-179.
- Salati, F. 1988. Vaccination against *Edwardsiella tarda*. In: Fish vaccination. A.E. Ellis (Ed.). Academic Press. San Diego. CA: 135-151.
- Shamsudin, M.N. 1994. Pathogenesis of *Flexybacter columnaris* and immunity in channel catfish. Dissertation. Departement of Fisheries and Allied Aquaculture. Auburn University, Auburn, Alabama. 207 p.
- Stoskopf, M.K. 1993. Bacterial diseases of marine tropical fish. In: Fish medicine. M.K. Stoskopf (Ed.). W.B. Saunders Company. Philadelphia, PA.: 635-639.
- Sprott, G.D., S.F.Koval, and C.A. Schnaitman. 1994. Cell fractionation. In: Methods for general and molecular microbiology. P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W. A.Wood and N.R. Krieg (Eds.). American Society for Microbiology. Washington D.C. 72-103
- Taslihan, A., M. Murdjani, C. Purbomartono, dan E. Kusnendar. 2000. Bakteri patogen penyebab penyakit mulut merah pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*). Jurnal Perikanan. II (2): 57-62.
- Van derWoude, M.W., and A.J. Bäumlner. 2004. Phase and antigenic variation in bacteria. Clinical Microbiology Review. 17 (3): 581-611.
- Vinitnantharat, S., J.A. Plumb and A.E. Brown. 1993. Isolation and purification of an outer membrane protein of *Edwardsiella ictaluri* and its antigenicity to channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Fish and Shellfish Immunology. 3: 401-409.