

## UJI *IN VITRO* DAN KARAKTER PROTEIN EKSTRASELULER (ECP) *Edwardsiella tarda* DENGAN KONSENTRASI ETHANOL BERBEDA

### *In Vitro Test and Character of Extracellular Protein (ECP) Edwardsiella tarda with Different Ethanol Concentration*

Cucun Herlina, Uun Yanuhar dan Maftuch  
Program Studi Magister Budidaya Perairan  
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya  
Jl. Veteran No. 16, Malang  
Email : [cucunherlina@yahoo.com](mailto:cucunherlina@yahoo.com), [uunyanuhar@yahoo.com](mailto:uunyanuhar@yahoo.com), [maftcuh@ub.ac.id](mailto:maftcuh@ub.ac.id)

Diserahkan tanggal 10 Mei 2019, Diterima tanggal 14 Oktober 2019

#### ABSTRAK

Protein ekstraseluler (ECP) bakteri memiliki kemampuan imunogenik dan dapat meningkatkan sistem imun tubuh inang. Komponen ECP diantaranya flagellin, protease dan metalloprotease mampu berdifusi pada sel inang untuk mengaktifkan respon imun. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui produksi protein ekstraseluler *E. tarda* dengan presipitasi ethanol pada konsentrasi berbeda sebagai potensi protein imunogenik secara *in vitro*. Metode penelitian yaitu kultur bakteri *E. tarda*, preparasi protein ekstraseluler, presipitasi protein, konsentrasi protein ditentukan dengan spektrofotometer dan SDS-PAGE, uji *in vitro* protein ECP *E. tarda*, dan uji nilai RPS. Hasil protein ekstraseluler yang diperoleh dengan presipitasi ethanol tertinggi pada konsentrasi 90% sebanyak 5,69 mg/ml dan terendah pada konsentrasi 80% sebanyak 4,81 mg/ml. Hasil karakterisasi protein dengan SDS-PAGE antara 30-60 kDa. Hasil uji *in vitro* vaksin *E. tarda* (presipitasi ethanol 100%) baik dari uji viabilitas maupun sterilitas menunjukkan tidak terdapat koloni yang tumbuh. Hasil nilai RPS pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) mencapai 100% dengan masa pemeliharaan 9 hari pasca imunisasi.

**Kata kunci:** *Edwardsiella tarda*; Ekstraseluler Protein (ECP); Presipitasi; SDS-PAGE

#### ABSTRACT

*ECP bacteria have immunogenic abilities and can increase the host's immune system. ECP components which are flagellin, protease, metalloprotease can diffuse to host cell for the activation immune response. The study aimed to determine the production of extracellular protein E. tarda with ethanol precipitation at different concentrations as a potential immunogenic protein by in vitro test. The research methods were E. tarda bacterial culture, extracellular protein preparation, protein precipitation, protein concentration determined by spectrophotometer and SDS-PAGE, in vitro ECP E. tarda protein test, and RPS value test. The results of extracellular protein obtained by the highest ethanol precipitation at a concentration of 90% as much as 5.69 mg/ml and the lowest at 80% concentration as much as 4.81 mg/ml. The results of the characterization of proteins with SDS-PAGE between 30-60 kDa. The results of the in vitro test of E. tarda vaccine (100% ethanol precipitation) from both the viability and sterility tests showed that there were no growing colonies. The results of the RPS in tilapia (Oreochromis niloticus) reach 100% with a maintenance period of 9 days after immunization.*

**Keywords:** *Edwardsiella tarda*; Extracellular Protein (ECP); Precipitation; SDS-PAGE

#### PENDAHULUAN

Salah satu kendala pada budidaya air tawar adalah infeksi penyakit Edwardsiellosis yang disebabkan bakteri *Edwardsiella tarda*. Bakteri ini mampu menginfeksi ikan air tawar dan laut seperti ikan mata sebelah, kelompok salmon, lele dan nila (Leung *et al.*, 2012). Infeksi ditandai dengan gejala asites, exophthalmia, dan luka pada organ internal (Mohanty dan Sahoo, 2007). Bakteri *E. tarda* merupakan salah satu jenis bakteri yang termasuk Bakteri Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) golongan II dan ditemukan pada ikan nila dari wilayah Yogyakarta, Ikan Mas dari wilayah Pontianak, Ikan Lele dari wilayah Sumatera dan Lumajang (Narwiyani dan Kurniasih, 2011). Secara alami, infeksi *E. tarda* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dapat terjadi pasca infeksi 3 hari

dan menyebabkan kematian 57,5% selama 2 minggu (Saleh, 2005). Pada penelitian ikan nila (*O. niloticus*) dengan infeksi *E. tarda* sebesar  $10^4$  cfu/ml menghasilkan nilai mortalitas sebesar 60% dan ditandai dengan gerakan lamban, pembengkakan daerah infeksi dan di dalam perut terdapat cairan berwarna kuning serta hemoragik pada ekor (Ibrahim *et al.*, 2011).

Strategi modern dengan langkah preventif seperti imunostimulan dan vaksin dapat mengurangi penggunaan obat-obatan. Upaya pencegahan penyakit ramah lingkungan diperlukan untuk keseimbangan ekosistem dan jaminan kesehatan baik untuk ikan maupun manusia sebagai konsumen (Bharadwaj *et al.*, 2013). Vaksin merupakan antigen atau bahan asing yang telah dilemahkan tingkat virulensinya (Wibawan dan Soejoedono, 2013). Tujuan utama vaksinasi adalah menentukan respon imun dengan memproduksi racun

tertentu yang akan menstimulasi dan dikenali oleh sel-sel imun sehingga terjadi peningkatan baik aspek respon imun bawaan dan adaptif (Cunningham *et al.*, 2016).

Vaksin akan dikenali oleh sistem imun sebagai antigen sehingga menginduksi makrofag untuk memecah antigen dan mengingatnya. Sistem imun menjalankan tugasnya dengan menetralkan bahan asing sebelum memasuki sel, dikenali oleh sel dan memecah atau menghancurkan sel antigen sebelum berkembang (Setiawan *et al.*, 2013). Antigen yang diperoleh dari patogen yang telah dihilangkan sifat patogenitasnya, dimatikan atau berupa ekstrak ke dalam tubuh ikan untuk merangsang sel-sel limfosit membentuk antibodi (Tizard, 1988). Sistem kekebalan vertebrata terdiri dari sistem imun bawaan dan adaptif. Sel-sel sistem imun adaptif merespon daerah-daerah tertentu dari agen infeksi yang dikenal sebagai epitop. Respon imun humoral bergantung pada aktivitas antibodi, mensekresikan glikoprotein dari sel B yang mengikat epitop spesifik. Setelah pengikatan reseptor sel B ke epitop yang sesuai, sel B dapat matang menjadi sel plasma dan mulai mengeluarkan antibodi spesifik. Aktivasi sel B mengalami proliferasi sebagai peningkatan perlindungan dari infeksi akan menghasilkan perkembangan memori imunologi. Sel-sel memori kekebalan khusus-antigen diaktifkan dan berproliferasi lebih cepat serta lebih besar sebagai respon dalam menghilangkan agen infeksi dan mitigasi penyakit. Respon memori yang kuat dan efektif dapat melindungi host terhadap infeksi berikutnya yang menyebabkan kekebalan seumur hidup sehingga hal tersebut merupakan ciri khas vaksin yang efektif (Zhang dan Nandakumar, 2018).

Perkembangan teknologi produk vaksin semakin meningkat, salah satunya dengan memanfaatkan produk ekstraseluler utuh mikroba. Produk ekstraseluler sebagai protein terlarut bersifat antigenik mampu berdifusi dan menyebabkan kerusakan struktural organisme lain pada satu bagian (Todar, 2012). Mekanisme patogenitas *E. tarda* dengan derivat ECP menggunakan sistem tipe III dan VI sekresi (T3SS dan T6SS) sehingga dapat menginduksi respon imunitas (Leung *et al.*, 2012). ADP-ribosylating toxin, AexT merupakan ECP sebagai faktor virulensi bakteri Gram-negatif. Sistem sekresi tipe III bertanggung jawab untuk sekresi dan translokasi dari ADP-ribosylating toksin, AexT ke dalam sitosol sel ikan budidaya. ECP sebagian besar terdiri dari protease yang berperan dalam penyebaran bakteri untuk merusak jaringan inang. Selain itu, produk ECP adalah metalloprotease bakteri (fragylisin, pseudolysin, dan vibriolysin) teridentifikasi sebagai faktor virulensi pada ikan (Hamed *et al.*, 2018). ECP yang disekresikan memiliki kemampuan adaptif terhadap lingkungan dan menghasilkan respon imun yang luas terhadap bermacam-macam isolat (Zhang *et al.*, 2014). Pengembangan vaksin dengan produk ekstraseluler (ECP) telah dilakukan oleh Amrullah *et al.* (2015) dengan menggunakan bakteri *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila (*O. niloticus*). Berdasarkan potensi ECP *E. tarda* tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui produksi protein ekstraseluler *E. tarda* dengan presipitasi ethanol pada konsentrasi berbeda sebagai potensi protein imunogenik melalui uji *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif kuantitatif yaitu menggambarkan pengaruh konsentrasi ethanol

yang berbeda (100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, dan 30%) dalam presipitasi protein ECP *E. tarda*. Parameter uji yaitu total konsentrasi protein ECP, profiling protein, uji *in vitro* protein ECP pada media spesifik, dan pengukuran nilai *Relative Percents Survival* (RPS). Protein ECP diinjeksi pada ikan nila (*O. niloticus*) panjang 5-7 cm, secara injeksi intraperitoneal (IP) 0,1 ml/ekor dan ikan kontrol diinjeksi dengan NaFis. Ikan nila diperoleh dari Unit Pengelola Budidaya Air Tawar Puntan Batu yang dipelihara selama 9 hari.

## Kultur Bakteri *E. tarda*

Isolat bakteri *E. tarda* murni dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara. Isolat murni tersebut dikultur kembali pada media Trypticase Soy Agar (TSA, Merck) dalam agar miring dengan menggunakan jarum ose yang diinkubasi ± 24 jam suhu 35°C (Rosidah dan Afizia, 2012).

## Preparasi Vaksin Ekstraseluler Protein

Bakteri ( $10^7$  cfu/ml) dikultur kembali pada media Luria Bertani (LB, Merck) sebanyak 500 ml pada suhu 26°C selama 18 jam dan diukur OD 600 nm. Setelah itu, suspensi bakteri disentrifugasi pada 3000 rpm selama 30 menit dan supernatan disaring dengan filter milipore 0,22µm. (Zhang *et al.* 2014 dan Putri *et al.*, 2013).

## Presipitasi Protein dengan Ethanol

Supernatan yang diperoleh kemudian dipresipitasi ethanol dengan metode El-Gayar (2015). Presipitasi protein ekstraseluler dengan ethanol (konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, dan 30%) dan diinkubasi semalam pada suhu 0°C. Setelah itu diambil pellet dengan sentrifus ulang (10.000 x g, suhu 4°C selama 15 menit). Pellet diresuspensi dengan 10ml PBS pH 7.4.

## Pengukuran Total Protein dengan Nanodrop Spektrofotometer

Larutan blanko menggunakan pelarut yang digunakan pada sampel awal yaitu PBS. Sampel ECP diambil sebanyak 10µL dengan WhiteTip. Kemudian sampel terdeteksi sebagai total protein dengan absorbansi 595 nm selama 2 menit. Hasil yang diperoleh merupakan total kasar protein produk ekstraseluler *E. tarda* dengan satuan mg/ml (Hardi *et al.*, 2011).

## Profiling Protein ECP *E. tarda* dengan SDS-PAGE

Elektroforesis mengikuti metode Bollag dan Edelstein (1991) dengan tahapan persiapan gel pemisah (10%): 3,34 mL larutan A {30% (b/v) akrilamid dan 0,8% (b/v) bis-akrilamid}, 2,5 mL larutan B (1,5 M Tris-Cl pH 8,8; 0,4% SDS) ditambah 50 µL APS 10% dan 5 µL TEMED dituangkan ke dalam cetakan gel. *Stacking* gel (5%): 0,67 mL larutan C (1 M Tris-Cl pH 6,8 dan 0,4% SDS), 2,3 mL akuades, 30 µL APS 10% dan 5 µL TEMED dituang diatas gel pemisah yang sudah beku kemudian dipasang sisir serta ditunggu hingga gel beku sempurna. Buffer elektroforesis berisi Tris 25 mM, glisin 192 mM, dan SDS 0,1%. Buffer diatur pada pH 8,3. Pemisahan protein dilakukan dengan cara protein sampel (20 µL) dicampur dengan 5 µL bufer sampel (60 mM Tris-Cl pH 6,8 25% gliserol; 2% SDS; 14,4 mM 2-merkaptotanol dan 0,1% bromfenol biru), dididihkan selama 2-3 menit dan dimasukkan ke dalam gel. Protein dipisahkan dengan memberikan aliran

listrik (125 mA dan 150 V). Gel kemudian diwarnai dengan perak nitrat.

Gel diangkat, direndam selama 30 menit di dalam larutan berisi 50% methanol dan 10% asam asetat kemudian dicuci selama 30 menit di dalam larutan berisi methanol 5% dan asam asetat 7%. Kemudian gel direndam di dalam 10% glutaraldehid selama 30 menit dan dibilas dengan akuades selama 1-2 jam (diganti setiap 30 menit). Selanjutnya gel direndam dalam larutan dithiothreitol (5 µg/mL) selama 30 menit, larutan dibuang dan diganti dengan larutan perak nitrat 0,1%. Gel kemudian dibilas dengan sedikit akuades, dibilas dua kali dengan sedikit larutan developer (50 µL formaldehid 37% di dalam sodium karbonat). Tahap akhir, gel direndam dalam larutan developer dan mencuci gel di dalam larutan asam sitrat 2,3 M.

#### Uji Keamanan Vaksin ECP *E. tarda*

Uji keamanan dilakukan dengan mengisolasi bakteri *E. tarda* dari ikan perlakuan vaksinasi (Anderson *et al.*, 1970). Setelah 9 hari masa pemeliharaan dilakukan isolasi bakteri untuk melihat koloni bakteri yang sama. Uji ini dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan dan aplikatif vaksin pada ikan. Kemudian dilakukan reisolasi bakteri untuk mengetahui apakah terdapat koloni yang tumbuh seperti isolat vaksin.

#### Uji Sterilitas Vaksin ECP *E. tarda*

Uji sterilitas digunakan untuk memastikan bakteri *E. tarda* tidak tumbuh pada media agar dan cair. Prosedur yang dilakukan dengan menginokulasi vaksin ECP pada media cair Luria Bertani (LB, Merck) dan media agar Trypticase Soy

Agar (TSA, Merck). Setelah itu, diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam (Aly 1981 and Trilia *et al.*, 2014).

#### Relative Percent Survival (RPS)

Tingkat efikasi vaksin ECP dihitung pada ikan normal dengan dibandingkan ikan yang telah diimunisasi. Rumus perhitungan RPS menurut Ellis (1988).

$$RPS = \left[ 1 - \left( \frac{\% \text{ Tingkat Mortalitas Ikan yang Divaksinasi}}{\% \text{ Tingkat Mortalitas Pada Kontrol}} \right) \right] \times 100 \quad \dots (1)$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Total Protein ECP *E. tarda*

Bakteri yang digunakan untuk mengisolasi metabolit sekunder yaitu *E. tarda* dengan kepadatan  $10^7$  cfu/ml. Hasil kultur diperoleh setelah inkubasi 18 jam yaitu pada saat fase eksponensial menuju stasioner. Hal tersebut dikarenakan keefektifan kemampuan bakteri berkoloni hidup dalam media tumbuh dan mensekresikan zat ekstraseluler ke dalam lingkungan. Hasil total protein ECP *E. tarda* tertinggi diperoleh dengan presipitasi ethanol konsentrasi 90% sebanyak 5,69 mg/ml dan terendah pada presipitasi ethanol konsentrasi 80% sebanyak 4,81 mg/ml (Tabel 1.). Tujuan presipitasi ethanol adalah untuk mengumpulkan protein dalam media (supernatan) sehingga diperoleh total protein murni hasil sekresi protein bakteri.

**Tabel 1.** Total Protein Pada Presipitasi Konsentrasi Ethanol yang Berbeda

Konsentrasi Ethanol (%)	Total Protein (mg/ml)	260/280 λ	A280 10mm
100	5,07	1,43	5.074
90	5,69**	1,44	5.693
80	4,81*	1,44	4.809
70	5,62	1,26	5.621
60	5,08	1,41	5.083
50	5,55	1,41	5.547
40	5,03	1,50	5.035
30	4,96	1,45	4.961

Keterangan: \*\* nilai tertinggi total protein, \* nilai terendah protein

Isolasi protein bakteri dapat dilakukan dengan metode ekstraksi baik secara fisik dan non-fisik. Salah satunya dengan penambahan zat pengendap untuk memisahkan dan mendapatkan konsentrasi protein. Ethanol merupakan larutan organik sebagai salah satu jenis pengendap yang paling umum. Ethanol lebih efisien untuk protein dengan permukaan yang didominasi rantai asam amino polar dan bersifat hidrofilik (El-Gayar, 2015). Kelarutan protein dalam larutan tergantung pada interaksi kompleks empat parameter yaitu sifat fisik (bentuk, fleksibilitas, berat molekul, dan titik isoelektrik), distribusi permukaan hidrofobik, hidrofilik dan bermuatan, suhu dan pH larutan, serta komposisi dan konsentrasi pelarut (Mirica *et al.*, 2012). Perbedaan konsentrasi berhubungan dengan sifat hidrofilik dari protein sehingga dapat diendapkan pada tingkat konsentrasi yang berbeda (Nooralabetu, 2014). Protein dalam proses presipitasi merespon dengan mengurangi luas permukaan untuk mengurangi kontak dengan pelarut sehingga

protein mengarah ke presipitasi. Keuntungan presipitasi dalam mengendapkan dan menguntungkan secara energi dalam proses isolasi protein (Wingfield, 2001). Proporsi masing-masing jenis asam amino dalam protein dengan spesies dan tanpa spesies bakteri yaitu Glu (6,32 vs 5,91%), Ile (5,58 vs 5,27%), Lys (4,50 vs 3,78%), Asn (3,47 vs 3,25%) dan lebih sedikit persentase dari Leu (9,56 vs 10,20%), Gln (4,47 vs 5,00%), Arg (6,18 vs 6,68%). Protein ini terdeteksi dengan hasil berat molekul pada SDS PAGE > 43kDa (Liu *et al.*, 2013).

Sekresi protein melalui sistem sekresi tergantung faktor lingkungan dalam supernatan kultur secara *in vitro* (Caldwell and Lattemann, 2004). Protein yang disekresikan diangkut dari sitoplasma bakteri ke lingkungan bakteri yang ditandai sinyal peptida dan *protein surface-associated* yang dilepaskan dalam media eksternal karena pergantian fisiologis dinding sel (Sanchez *et al.*, 2009). Protein yang dikeluarkan berhubungan dengan fungsi sistem sekresi bakteri untuk mengeluarkan

berbagai macam substrat. Pada bakteri Gram-Negatif mengandalkan sistem sekresi khusus untuk mengangkut protein virulensi. Sekresi protein ekstraseluler melewati dua membran fosfolipid. Sistem sekresi protein bakteri terdiri dari Tipe I sampai Tipe VI (Green and Meccas, 2016). Sistem sekresi tipe III (T3SS) adalah salah satu faktor virulensi penting untuk kelangsungan hidup dan replikasi *E. tarda* dan dapat memberikan efektor ke lingkungan sekitarnya atau langsung ke sel inang untuk mengganggu jalur seluler inang sebagai proses infeksi. Efektor yang diduga sebagai virulen tersebut ditargetkan pada kompartemen subselular tertentu, termasuk sitosol, plasma atau sistem endomembran dan nukleus sebagai tempat untuk replikasi bakteri (Fang *et al.*, 2016). T3SS merupakan proses penting dalam pengiriman protein langsung menuju sel target. Apabila protein dan efektor tipe III bergabung dapat memudahkan fusi kedalam sitosol sel inang (Bai *et al.*, 2018). T3SS membentuk struktur untuk membentuk pori-pori pada sel inang sehingga terjadi translokasi protein efektor. Efektivitas translokasi dapat memodulasi jalur sinyal sel inang dalam memicu sitotoksitas sel yang berinteraksi dengan reseptor inflammasome NLRC4 (Zhou *et al.*, 2016).

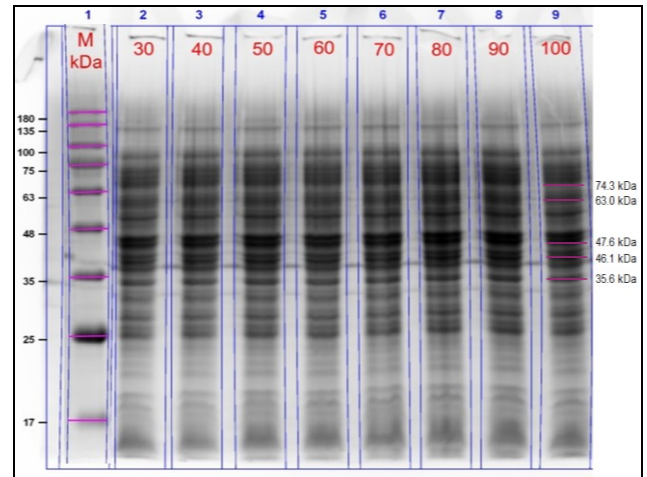
Protein ekstraseluler dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama terdiri dari protein yang mengandung sinyal peptida, terletak dibagian terminal-N untuk mengarahkan protein ke penghasil protein ekspor. Kelompok kedua termasuk protein dari permukaan bakteri karena pergantian dinding sel (Sanchez *et al.*, 2010). Protein seluler berperan dalam metabolisme anabolik dan katabolik, biosintesis, replikasi DNA dan sebagainya. Protein ekstraseluler yang disekresikan memediasi kontak sel, bersifat imunogenik dan melindungi dari infeksi bakteri. Selain itu, memiliki aktivitas anti-inflamasi, dapat menekan aktivitas makrofag dan menghambat infeksi patogen pada jalur komplemen dalam sistem imun (Ebner and Götz, 2019). Protein ekstraseluler yang disekresikan memiliki kemampuan sebagai sumber imunogenik dan dengan mudah dapat mengaktifkan respon imun pada inang (Song *et al.*, 2013).

### Profiling Protein ECP *E. tarda*

Profiling protein dengan SDS-PAGE menunjukkan karakter berat molekul yang sama antar protein dengan konsentrasi ethanol berbeda (Gambar 1.). Hasil berat molekul dengan pita yang paling tebal antara 30-60 kDa. Menurut Kumar *et al.* (2019) bahwa ekstraseluler protein yang teridentifikasi pada Gram-Negatif yaitu protein kemotaksis (60 kDa), flagellin (40 kDa), metalloprotease (PrtV protein, 62 kDa; VppC protein, 90 kDa dan VPM protein, 90 kDa), dan serin protease (VPP1, 43 kDa; VpSP37, 37 kDa, dan PrtA, 71 kDa) yang berperan penting sebagai virulensi bakteri. Secara signifikan, isolasi protein kandidat vaksin *E. tarda* dengan empat protein masing-masing FlgD (48 kDa), ETAE\_2088 (52 kDa), ETAE\_2130 (64,5 kDa) dan EseC (65 kDa) menginduksi respon imun yang sangat tinggi. Kemampuan imunogenik mencapai 50% dari protein ekstraseluler berasal dari protein flagel, protein pilus dan protein membran luar sehingga dapat dijadikan kandidat pengembangan vaksin subunit (Song *et al.*, 2013).

Produk ekstraseluler (ECP) merupakan metabolit yang disekresikan oleh patogen selama pertumbuhan dan pemuliaan dengan jenis dan jumlah tergantung pada lingkungan. Peran penting ECP yaitu menginvasi patogen ke sel inang, menyerap

nutrisi, menyebar luas invasi dan untuk meningkatkan respon sistem kekebalan inang. ECP mengandung banyak zat yang dapat memicu respon imun inang seperti lipase, amilase dan protease dan menunjukkan aktivitas hemolitik (Song *et al.*, 2018). Sedangkan ECP pada bakteri *Aeromonas* dapat menghasilkan jenis protease ekstraseluler seperti esterase, amilase, elastase, DNase, kitinase, peptidase dan lipase (Adriana *et al.*, 2016).



Gambar 1. Gambar Profiling Protein ECP *E. tarda* dengan SDS PAGE

Tabel 2. Hasil Uji *in vitro* Protein ECP (Presipitasi Ethanol 100%)

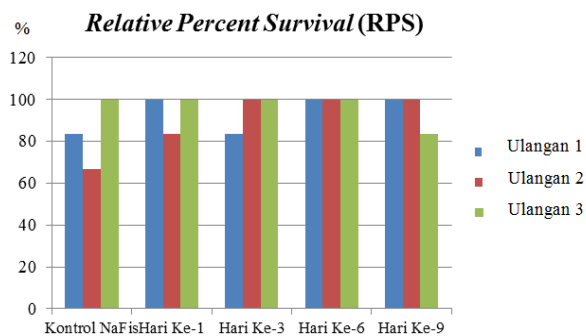
Media Uji	Kontrol (NaFis)	Uji Keamanan (Vaksin ECP)	Uji Sterilitas (Vaksin ECP)
TSA	Positif (+)	Negatif (-)	Negatif (-)
LB	Positif (+)	Negatif (-)	Negatif (-)

Keterangan: Negatif (-): tidak terdapat koloni bakteri, Positif (+): terdapat koloni bakteri

Uji ini untuk melihat kemungkinan bakteri dapat tumbuh kembali (Kamiso, 1990). Tes potensi non-viabilitas menggunakan media hidup bakteri bersifat selektif untuk mendukung pertumbuhan bakteri tertentu. Analisis sensitivitas bakteri dilakukan ketika telah diberi perlakuan dan dikultur tidak terdapat koloni tumbuh. Tes ini dapat digunakan untuk keamanan hasil pembuatan vaksin. Apabila tidak terdapat pertumbuhan bakteri inaktif maka produk lulus tes uji. Sedangkan apabila terdapat pertumbuhan koloni menunjukkan kegagalan mutu produk (Mohamed dan Soliman, 2013). Potensi sebagai vaksin subunit yang terdiri dari peptida, protein atau komponen non-protein dari patogen yang bersifat imunogenik harus mampu diserap dan dipresentasikan secara efektif menuju sistem imun inang. Secara umum, antigen ini akan dikenali oleh *antigen presenting cell* (APC) seperti sel dendritik melalui liposom yang mengelilingi antigen dan mengawasi pengiriman informasi didalam sel. Sistem imun dalam sel inang dimediasi oleh sel T dan peran sel B sebagai perlindungan dari patogen. Peran penting vaksin dalam sistem imun yaitu membuat memori yang tepat dan persisten untuk mengeliminasi patogen secara efektif dan aman dalam jangka panjang (Griffiths and Khader, 2014).

### Protein ECP terhadap Respon RPS

Keefektifan vaksin dapat diukur dan dilihat apabila nilai kelulushidupan tinggi pasca vaksinasi. Hal ini berkaitan dengan kemampuan inang dalam menerima antigen sebagai informasi untuk menginduksi respon imun. Artinya, apabila inang bertahan maka antigen yang diberikan diduga aman untuk diaplikasikan sebagai vaksin. Uji ini dilanjutkan setelah memperoleh hasil terbaik dari uji *in vitro*. Hasil RPS pasca vaksinasi ECP menunjukkan nilai tertinggi 100% dan terendah 83.33% dibandingkan dengan kontrol 66.67% (Gambar 2.). Hal ini sependapat dengan Ellis (1988) bahwa suatu vaksin disebut efektif apabila nilai RPS pasca imunisasi memiliki nilai >50%.



**Gambar 2.** Nilai RPS Pada Ikan Nila (*O. niloticus*) Pasca Vaksinasi ECP *E. tarda*

Produk ECP bakteri lainnya yaitu *Aeromonas hydrophilla* teridentifikasi pada berat molekul 66 kDa sebagai vaksin subunit yang memiliki kemampuan perlindungan mencapai 95% dari infeksi *A. hydrophilla* (Wu *et al.*, 2012). Penggunaan protein ekstraseluler sebagai vaksin rekombinan (53 kDa) menunjukkan nilai mortalitas kumulatif sebesar 27% (Jiao *et al.*, 2009). Keamanan ECP sebagai vaksin diduga dapat diserap cepat oleh tubuh sehingga informasi tersebut diteruskan dan mampu menginduksi respon imun inang. Antigen mengaktifkan dua sistem yaitu alami dan adaptif baik respon seluler dan humoral. Respon humoral alami terdiri dari lisozim, sistem komplemen, interferon, protein C reaktif, transferrin dan lektin serta respon adaptif terutama disebabkan oleh aktivasi limfosit B dan sel memori. Keefektifan vaksin dalam merangsang sistem imun inang terkait dengan cara pemberian dan kondisi dalam sistem budidaya (Silva *et al.*, 2009).

### KESIMPULAN

Tingkat konsentrasi ethanol 100% dalam presipitasi protein ekstraseluler *E. tarda* menghasilkan total protein sebanyak 5,07 mg/ml, berat molekul 40-60 kDa dengan hasil uji *in vitro* negative koloni pada media spesifik dan nilai RPS pada ikan nila (*O. niloticus*) mencapai 100% setelah vaksinasi 9 hari. Dengan demikian, protein ECP diduga dapat berpotensi sebagai potensi protein imunogenik.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih atas bantuan dan kerja sama kepada Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Laboratorium Biomedik, dan Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan Universitas Brawijaya.

### DAFTAR PUSTAKA

- Adriana, F., J. Koščová, D. Mudroňová. 2016 The use of probiotic bacteria against *Aeromonas*, infections in salmonid aquaculture. *Aquaculture*. 469 : 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.042>
- Aliffudin, M. 2002. Imunostimulan pada hewan akuatik. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 1 (2): 87-92. [10.19027/jai.1.87-92](https://doi.org/10.19027/jai.1.87-92)
- Aly, TM. 1981. *Studies on the Effect of Different Adjuvant on the Efficiency of FMD Vaccine in Farm Animal*. Ph. D. faculty of Vet. Med. Zagazig University - Egypt.
- Anderson DP, Capstiek PB, Mowat GN. 1970. In vitro method for safety of FMD. *J. Hyg. Camb.* 68: 159-172. [10.1017/S0022172400028643](https://doi.org/10.1017/S0022172400028643)
- Bai, F., Z. Li, A. Umezawa, N. Terada, S. Jin. 2018. Bacterial type III secretion system as a protein delivery tool for a broad range of biomedical applications. *Biotechnology Advances*. 36: 482–493. [10.1016/j.biotechadv.2018.01.016](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.016)
- Bharadwaj, A., T. J. Abraham, S. N. Jordar. 2013. Immune effector activities in challenged rohu, *Labeo rohita* after vaccinating with *Aeromonas bacterin*. *Aquaculture*. 392-395: 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.016>
- Bollag, D. M and S. J. Edelstein. 1991. *Protein Methods*. Department of Biochemistry University of Geneva - Switzerland: Wiley-Liss.
- Caldwell, R. B and C.T Lattemann. 2004. Simple and reliable method to precipitate proteins from bacterial culture supernatant. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (1): 610-612. [10.1128/AEM.70.1.610-612.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.610-612.2004)
- Cunningham, A. L., N. Gracon, O. Leo, L. R, Friedland, R. Strugnell, B. Laupeze, M. Doherty dan P. Stern. 2016. Vaccine development: From concept to early clinical testing. *Vaccine*. 10. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.016>
- Ebner, P. and F. Götz. 2019. Bacterial Excretion of Cytoplasmic Proteins (ECP): Occurrence, Mechanism, and Function. *Trends in Microbiology*. 27 ( 2): 176 - 187. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.006>
- El-Gayar, K. E. 2015. Principles of recombinant protein production, extraction and purification from bacterial strains. *International Journal of Microbiology and Allied Sciences (IJOMAS)*. 2(2): 18-33. [https://www.researchgate.net/publication/285926620\\_Principles\\_of\\_recombinant\\_protein\\_production\\_extraction\\_and\\_purification\\_from\\_bacterial\\_strains](https://www.researchgate.net/publication/285926620_Principles_of_recombinant_protein_production_extraction_and_purification_from_bacterial_strains)
- Ellis AE. 1988. General principles of fish vaccination. Di dalam: Ellis AE, editor. *Fish vaccination*. Academic Press, London, 1- 19 hal.
- Fang, S., L. Zhang, Y. Lou, D. Yang, Q. Wang, Y. Zhang, Q. Liu. 2016. Intracellular translocation and localization of *Edwardsiella tarda* type III secretion system effector EseG in host cells. *Microbial Pathogenesis*, 97: 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.008>
- Green, E. R. and J. Mecsas. 2016. Bacterial Secretion Systems. *Microbiol Spectr*, 4(1): 1-32. [10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015)
- Griffiths, K. L. and S. A. Khader. 2014. Novel vaccine approaches for protection against intracellular

- pathogens. *Curr Opin Immunol*, 0: 58–63. [10.1016/j.coi.2014.02.003](https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.02.003)
- Hamed, K. Y., B. A. Siame, B. J. Tenkink, R. J. Noort and Y. K. Mok. 2012. *Edwardsiella tarda*: Virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen. *Microbes and Infection*. 14 : 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.08.005>
- Hamed, S. B., M. J.T. R. Paiva, L. Tachibana, D. de C. Dias, C. M. Ishikawa and M. A. Esteban. 2018. Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish & Shellfish Immunology*. 80: 550-562. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.053>
- Hardi, E. H., Sukenda, E. Harris dan A. M. Lusiastuti. 2011. Toksisitas Produk Ekstraseluler (ECP) *Streptococcus agalactiae* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Natur Indonesia*. 13(3): 187-199. [://dx.doi.org/10.31258/jni.13.03.%25p](https://doi.org/10.31258/jni.13.03.%25p)
- Ibrahem, M. D., I.Shaheed, H. A. El-Yazeed and H. Korani. 2011. Assessment of the susceptibility of polyculture reared African Catfish and Nile tilapia to *Edwardsiella tarda*. *Journal of American Science*. 7(3): 779 – 786. [http://www.jofamericanscience.org/journals/am-sci/am0703/93\\_5084am0703\\_779\\_786](http://www.jofamericanscience.org/journals/am-sci/am0703/93_5084am0703_779_786).
- Jiao, X., W. Dang, Y. Hu, and L. Sun. 2009. Identification and immunoprotective analysis of an in vivo-induced *Edwardsiella tarda* antigen. *Fish & Shellfish Immunology*. 27: 633–638. [10.1016/j.fsi.2009.08.006](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.006)
- Kamiso, H. N. 1990. Pemvaksin Penyakit Bakteri pada Ikan. PAU – Bioteknologi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. 67-68 hlm.
- Kumar, V., D. V. Nguyen, K. Baruah, and P. Bossier. 2019. Probing the mechanism of VPAHPND extracellular proteins toxicity purified from *Vibrio parahaemolyticus* AHPND strain in germ-free *Artemia* test system. *Aquaculture*. 504: 414-419. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.029>
- Leung, K. Y., B. A. Siame, B. J. Tenkink, R. J. Noort and Y. K. Mok. 2012. *Edwardsiella tarda*: Virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen. *Microbes and Infection*. 14 : 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.08.005>
- Liu, X., L. Kang, Y. Liu, H. Li, X. Peng. 2013. Characterization of the *Edwardsiella tarda* proteome in response to different environmental stresses. *Journal Of Proteomics*. 8 : 320 – 333. [10.1016/j.jprot.2013.01.022](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.022)
- Mirica, K. A., M. R. Lockett, P. W. Snyder, N. D. Shapiro, E. T. Mack, S. Nam, and G. M. Whitesides. 2012. Selective Precipitation and Purification of Monovalent Proteins Using Oligovalent Ligands and Ammonium Sulfate. *Bioconjugate Chem*. 23: 293–299. [10.1021/bc200390q](https://doi.org/10.1021/bc200390q)
- Mohamed, L. A dan W. S. E. D. Soliman. 2013. Development and efficacy of fish vaccine used against some bacterial diseases in farmed tilapia. *Nature and Science*. 11 (6): 120-128. [http://www.sciencepub.net/nature/ns1106/014\\_18280ns1106\\_120\\_128.pdf](http://www.sciencepub.net/nature/ns1106/014_18280ns1106_120_128.pdf)
- Mohanty, B. R. and P. K. Sahoo. 2007. *Edwardsiellosis* in fish: a brief review. *J. Biosci*. 32 (7) : 1331–1344. [10.1007/s12038-007-0143-8](https://doi.org/10.1007/s12038-007-0143-8)
- Narwiyani, S dan Kurniasih. 2011. Perbandingan patogenesis, *Edwardsiella tarda* pada ikan mas koki (*Charassius auratus*) dan ikan celebes rainbow (*Telmatherina celebensis*). *Jurnal Ris. Akuakultur*. 6(2): 291-301. <http://dx.doi.org/10.15578/jra.6.2.2011.291-301>
- Nooralabetu, K. P.. 2014. Optimasitaion of ammonium sulfate precipitation method to achieve high throughput concentration of crude alkaline phosphatase from Brown shrimp (*Metapenaeus Monoceros*) hepatopancreas. *International Journal Ana Bio-Sci*, 2(1): 7- 16. <https://plaza.umin.ac.jp/~e-jabs/2/2.7.pdf>
- Putri, R. A., Wardiyanto dan A. Setyawan. 2013. Penyimpanan vaksin inaktif whole cell *Aeromonas salmonicida* dengan penambahan gliserol. *Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*, 1 (2): 79-86. <https://media.neliti.com/media/publications/233517-penyimpanan-vaksin-inaktif-whole-cell-ae-dcbdd020.pdf>
- Rosidah dan W. M. Afizia. 2012. Potensi ekstrak daun jambu biji sebagai antibakterial untuk menanggulangi serangan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan gurame (*Osphronemus Gouramy lacepede*). *Jurnal Akuatika*. III (1): 19-27. <http://jurnal.unpad.ac.id/akuatika/article/view/473>
- Saleh, W. D. 2005. Isolation and identification of *Edwardsiella tarda* from infected Nile tilapia fish. *Bull Fac Agric*. 56: 839-846. [https://www.researchgate.net/publication/265168496\\_Isolation\\_and\\_Identification\\_of\\_Edwardsiella\\_tarda\\_from\\_Infected\\_Nile\\_Tilapia\\_Fish\\_Oreochromis\\_niloticus](https://www.researchgate.net/publication/265168496_Isolation_and_Identification_of_Edwardsiella_tarda_from_Infected_Nile_Tilapia_Fish_Oreochromis_niloticus)
- Sanchez, B., M. C. Urdaci and A. Margolles. 2010. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa– bacteria interactions. *Microbiology*. 156: 3232–3242. [10.1099/mic.0.044057-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.044057-0)
- Sanchez, B., S. Chaignepain, J.Schmitter and M. C. Urdaci. 2009. A method for the identification of proteins secreted by lactic acid bacteria grown in complex media. *FEMS Microbiol Lett*. 295: 226-229. [10.1111/j.1574-6968.2009.01599.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01599.x)
- Setiawan Raden B., Dulm'iad., dan Rosidah. 2013. Efektivitas Vaksin dari Bakteri *Mycobacterium fortuitum* yang Diinaktivasi dengan Pemanasan untuk Pencegahan Penyakit *Mycobacteriosis* Pada Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*). *Jurnal Perikanan Dan Kelautan*. 3(1): 25-40. <http://jurnal.unpad.ac.id/jpk/article/view/3528>
- Silva, B. C., M. L. Martins, A. Jatobá, C. C. B. Neto, F. N. Vieira, G. V. Pereira, G. T. Jerônimo, W. Q. Seiffert and J. L. P. Mouriño. 2009. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesq. Vet. Bras*. 29(11): 874-880. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009001100002>
- Song, M., J. Xie, X. Peng, and H. Li. 2013. Identification of protective immunogens from extracellular secretome of *Edwardsiella tarda*. *Fish & Shellfish Immunology*. 35: 1932-1936. [10.1016/j.fsi.2013.09.033](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.033)
- Song, M., Y. Kang, D. Zhang, L. Chen, J. Bi, H. Zhang, L. Zhang, A. Qian, X. Shan. 2018. Immunogenicity of

- extracellular products from an inactivated vaccine against *Aeromonas veronii* TH0426 in koi, *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology*. 81:176–181. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.004>
- Sun, Y., C.Liu, and L. Sun. 2010. Identification of an *Edwardsiella tarda* surface antigen and analysis of its immunoprotective potential as a purified recombinant subunit vaccine and a surface-anchored subunit vaccine expressed by a fish commensal strain. *Vaccine*. 28: 6603–6608. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.050>
- Tizard, I. R. 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Terjemahan: Partadireja M. Surabaya: Airlangga University.
- Todar, K. 2012. Bacterial protein toxins. Todar's online textbook of bacteriology. Madison, Wisconsin.
- Trilia, N. A. O., A. Setyawan, Y. T. Adiputra dan Wardiyanto. 2014. Imunogenisitas kombinasi vaksin inaktif whole cell *Aeromonas salmonicida* dan jintan hitam (*Nigella sativa*) pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. (2): 249-257. <http://jurnal.fp.unila.ac.id/index.php/bdpi/article/view/396>
- Wibawan, I. W. T. dan R. D. Soejoedono. 2013. Intisari Immunologi medis. Fakultas Kedokteran Hewan, IPB. Bogor. 2-3 dan 26 hlm.
- Wingfield, P. T. 2001. Protein precipitation using ammonium sulfate. *Curr Protoc Protein Sci*. 1-9. [10.1002/0471140864.psa03fs84](https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs84)
- Wu, L., Y. Jiang, Q. Tang, H. Lin, C. Lu, and H. Yao. 2012. Development of an *Aeromonas hydrophila* recombinant extracellular protease vaccine. *Microbial Pathogenesis*. 53: 183-188. [10.1016/j.micpath.2012.07.007](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2012.07.007)
- Zhang, D., J. W. Pridgeon and P. H. Klesius. 2014. Vaccination of channel catfish with extracellular product of *Aeromonas hydrophila* provides protection against infection by the pathogen. *Fish and Shellfish Immunology*. 36: 270-275. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.11.015>
- Zhang, N and K. S. Nandakumar. 2018. Recent advances in the development of vaccines for chronic inflammatory autoimmune diseases. *Vaccine*. 36: 3208–3220. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.062>
- Zhou, Y., L. Y. Liua, T. T. He, Z. A. Laghari, P. Nie, Q. Gao, H. X. Xie. 2016. *Edwardsiella tarda* EsaE (Orf19 protein) is required for the secretion of type III substrates, and pathogenesis in fish. *Veterinary Microbiology*. 190: 12–18. [10.1016/j.vetmic.2016.05.003](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.003)