

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/btla>

UJI KADAR PROTEIN TERLARUT PADA VAKSIN *Aeromonas hydrophila* MENGGUNAKAN PIERCE™ BCA PROTEIN ASSAY KIT

Edy Farid Wadjdy dan Setiadi

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan

Jl. Sempur No. 1, Bogor 16129

E-mail: pelnisbpbpat@yahoo.com

ABSTRAK

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu bakteri patogen yang menyerang hampir seluruh jenis ikan air tawar sehingga perlu dibuat sediaan vaksinnya baik sediaan cair maupun kering beku yang memiliki protein antigenik antibodi sebagai pencegahan terhadap penyakit Aeromoniasis. Antigen vaksin pada proses kering beku perlu diketahui apakah masih ada protein yang terkandung di dalamnya, di mana protein tersebut nantinya berperan dalam pembentukan antibodi inang. Tujuan penulisan ini adalah untuk mengetahui kandungan protein dalam sediaan vaksin *Aeromonas hydrophila* dengan menggunakan metode Pierce™ BCA protein assay kit. Dalam pengujian ini terdiri atas tiga sampel yaitu 1 (VKB 100), 2 (VKB 50), dan 3 (vaksin cair). Hasil dari kegiatan ini menunjukkan bahwa vaksin *Aeromonas hydrophila* pada sampel-2 memiliki kandungan protein paling tinggi yaitu sebesar 2351.9508 µg/mL.

KATA KUNCI: metode Pierce™ BCA protein assay kit; *Aeromonas hydrophila*; vaksin

PENDAHULUAN

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu bakteri patogen yang menyerang hampir seluruh jenis ikan air tawar dan telah banyak dijadikan vaksin baik sediaan cair maupun kering beku. Vaksinasi merupakan salah satu cara untuk pencegahan penyakit infeksius pada budidaya ikan (Sugiani *et al.*, 2016).

Dalam pengujian konsentrasi total protein yang terkandung pada vaksin dapat dilakukan dengan berbagai metode antara lain kolonimetri, Lowry, Bradford, dan Pierce™ BCA protein assay kit. Metode Lowry merupakan pengembangan dari metode Biuret, tetapi lebih sensitif 100 kali lipat, sehingga sering muncul interferensi yang mengganggu hasilnya (Sudarmanto, 2008). Metode Bradford merupakan pengukuran konsentrasi protein total yang menggunakan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). Absorbansi protein diukur menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 465 sampai 595 nm (Caprette, 2005).

Uji Pierce™ BCA protein assay kit digunakan untuk menentukan konsentrasi protein total dalam kisaran 20-20.000 µg/mL yang ditunjukkan oleh perubahan warna larutan dari hijau menjadi ungu sebanding dengan konsentrasi yang kemudian dapat diukur absorbansi kuat pada 562 nm (Smith *et al.*, 1985). Kegiatan ini dilakukan dengan tujuan untuk

mengetahui kandungan protein dalam sediaan vaksin *Aeromonas hydrophila* dengan menggunakan metode Pierce™ BCA protein assay kit.

BAHAN DAN METODE

Pengujian protein pada vaksin ini dilakukan pada bulan September 2020, bertempat di Laboratorium Kesehatan Ikan, Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I), Depok, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan (BRPBATPP).

Bahan yang digunakan antara lain sampel vaksin *Aeromonas hydrophila*, Pierce™ BCA protein assay kit, saline 0,85%; *bovine serum albumin* (BSA). Sedangkan alat yang digunakan terdiri atas inkubator, *laminar flow*, *Elisa reader*, *pipet eppendorf* (1.000, 200, dan 100 µL), *vortex*, tabung *eppendorf*, botol plastik, dan *microplate well*.

Penyiapan Larutan Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

Menyiapkan tabung *eppendorf* bervolume 1,5 mL sebanyak sembilan buah dan diberi kode (A, B, C, D, E, F, G, H, dan I), dilanjutkan dengan membuat larutan BSA standar seperti pada Tabel 1.

Penyiapan Reagen Uji Protein

Reagen uji protein disiapkan dengan cara mencampurkan dua reagen yaitu reagen A dan B yang

Tabel 1. Larutan standar *bovine serum albumin*

Tabung <i>ependorf</i> volume 1,5 mL	Pengencer salin 0,85% (µL)	Volume BSA (µL)	Keterangan	Volume (µL)		Konsentrasi BSA (ug/mL)
				Awal	Akhir	
A	0	300	Dari stok	300	300	2,000
B	125	375	Dari stok	500	325	1,500
C	325	175	Dari stok	500	175	1,000
D	175	175	Dari tabung B	350	350	750
E	325	325	Dari tabung C	650	325	500
F	325	325	Dari tabung E	650	325	250
G	325	325	Dari tabung F	650	550	125
H	400	100	Dari tabung G	500	500	25
I	400	0	0	400	400	Blanko (0)

terdapat pada Pierce™ BCA protein *assay kit* dengan perbandingan sebanyak 50 mL *reagen* A dan 1 mL *reagen* B dan dikemas pada botol plastik steril volume 100 mL. Hasil pencampuran *reagen* menunjukkan warna indikator yaitu berwarna hijau (Gambar 1).

Pengujian Sampel

Setelah pembuatan *bovine serum albumin* (BSA) dalam tabung *ependorf* dari A sampai I, dilanjutkan dengan menyiapkan *microplate* yang berisi 96 well (sumuran), kemudian berturut-turut BSA dari tabung *ependorf* diambil sebanyak 25 µL dimasukkan pada tiap sumuran *microplate* dan ditambahkan *reagen* uji sebanyak 200 µL. Untuk tabung A ditempatkan pada sumur A1, tabung B pada sumur A2, tabung C pada sumur A3, dan seterusnya sampai tabung I ke sumur A9. Selanjutnya dilakukan pemindahan sampel vaksin ke dalam sumuran masing-masing sebanyak 25 µL dan dibuat tiga ulangan. Dalam pengujian ini terdiri atas tiga sampel yaitu 1 (VKB 100), 2 (VKB 50), dan 3 (vaksin cair), kemudian sampel ditempatkan pada sumur C1, D1, E1 dilakukan tiga ulangan. Sampel-

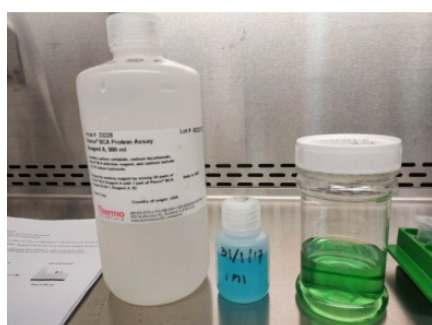
sampel tersebut selanjutnya di-*shaker* dengan kecepatan 60 rpm pada inkubator dengan suhu 37°C selama 30 menit, dan didinginkan selama 10-15 menit pada suhu ruang selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan *Elisa reader* dengan panjang gelombang 562 nm. Kegiatan tersebut disajikan pada (Gambar 2).

HASIL DAN BAHASAN

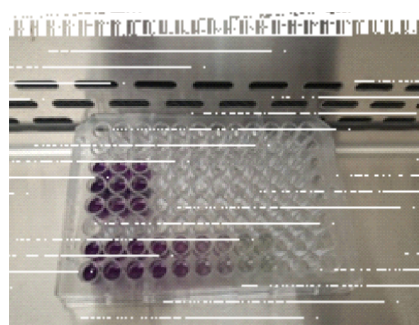
Prinsip metode Pierce™ BCA protein *assay kit* yaitu untuk pemeriksaan konsentrasi total protein pada sampel, baik menggunakan tabung maupun *microplate well* 96 dengan menggabungkan *reagen* uji protein (*working reagent*) dan sampel.

Banyaknya konsentrasi total protein ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari hijau menjadi ungu dengan membandingkan albumin standar dan dapat diukur menggunakan spektro seperti disajikan pada Tabel 2.

Nilai hasil pembacaan absorbansi BSA selanjutnya dimasukkan dalam program penghitungan persamaan regresi yaitu dengan menggunakan program minitab

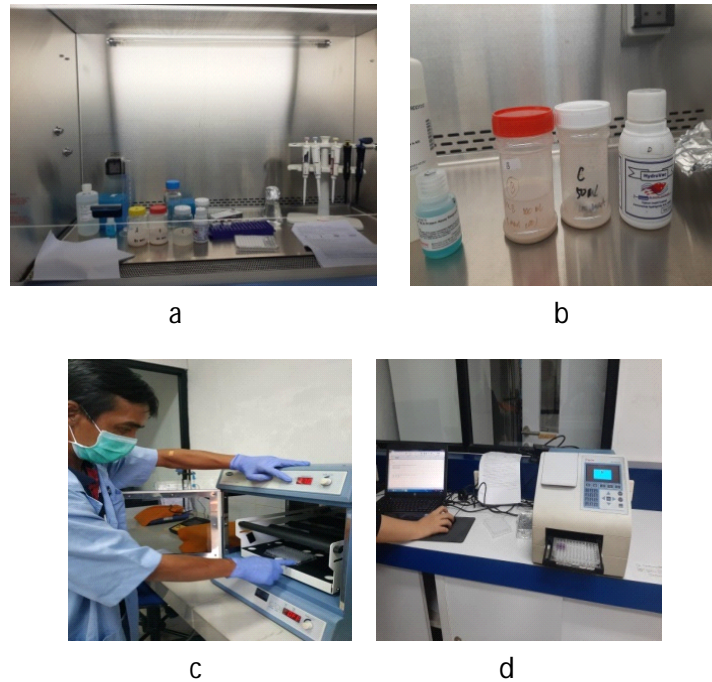


a



b

Gambar 1. *Reagen* uji protein (a); reaksi reagen dan sampel setelah pencampuran dan inkubasi (b).



Gambar 2. Bahan dan alat uji protein (a); sampel uji protein vaksin bakteri *A. hydrophila* (b); inkubator *shaker* (c); pembacaan absorbansi BSA standar dan sampel menggunakan *Elisa reader* (d).

Tabel 2. Hasil Pembacaan spektrofotometer dengan panjang gelombang 562 nm

Konsentrasi BSA	0	25	125	250	500	750	1.000	1.500	2.000
Hasil pembacaan	0,1448	0,1701	0,3106	0,4618	0,7805	1,0992	1,296	1,4958	1,8775
	0,1428	0,1684	0,3062	0,4658	0,7407	1,0718	1,2865	1,6164	2,0975
Rata-rata	0,1438	0,1693	0,3084	0,4638	0,7606	1,0855	1,2913	1,5561	1,9875

versi 17, yang mana sumbu X adalah konsentrasi BSA, sedangkan sumbu Y merupakan hasil pembacaan spektro dan diperoleh persamaan regresinya adalah $Y = 1055x - 227,7$ dengan $R = 0,977$, seperti yang tersaji pada Gambar 3.

Hasil pembacaan sampel-1, 2, dan 3 kemudian dirata-rata dan dimasukkan pada persamaan regresi. Persamaan regresi inilah yang kemudian digunakan untuk menghitung kandungan protein yang terdapat pada vaksin *A. hydrophila* yang ada dalam rumus persamaan berikut:

$$Y = 1055 X - 227,7 \text{ dan } R = 0,977$$

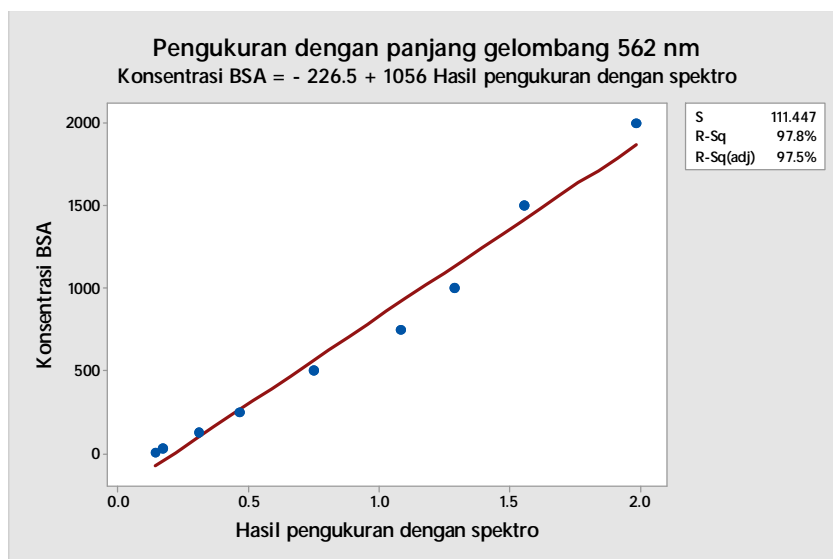
Contoh penghitungan pada sampel-1 yang memiliki nilai rata-rata 1,4486 maka berdasarkan penghitungan rumus tersebut diperoleh nilai protein sebagai berikut:

$$\begin{aligned} Y &= (1055 \times 1,4486) - 227,7 \\ &= 1528,273 - 227,7 \\ &= 1300,573 \text{ Ug/mL} \end{aligned}$$

Jadi jumlah protein sampel 1 adalah 1300,527 Ug/mL

Nilai konsentrasi protein yang terkandung pada sampel vaksin *A. hydrophila* yang diuji pada kegiatan ini disajikan pada Tabel 3.

Pada persamaan regresi, nilai X yang dimasukkan adalah nilai rata-rata sampel. Pada sampel-1 dan 2, terlihat kandungan proteinnya lebih tinggi daripada sampel-3. Hal ini disebabkan bahwa vaksin tersebut mengandung *chitosan* yang bisa melindungi protein antigen agar tetap utuh dan tidak mudah rusak dibandingkan dengan vaksin cair. Sedangkan pada sampel-2 proteinnya lebih tinggi daripada sampel-1,



Gambar 3. Nilai BSA standar.

Tabel 3. Nilai total protein yang terkandung dalam sampel vaksin *A. hydrophila* dengan metode Pierce™BCA Protein Assay kit

Sampel	Ulangan			Rata-rata	Jumlah protein (µg/mL)
	1	2	3		
1	1,5185	1,3066	1,5206	1,4486	1300,5378
2	2,7874	2,0586	2,4895	2,4452	2.351,9508
3	1,2221	1,0358	0,9521	1,07	901,15

karena sampel-2 dilarutkan dalam 50 mL sedangkan sampel-1 dilarutkan dalam 100 mL saline 0,85% sehingga sampel-2 menjadi lebih kental.

KESIMPULAN

Nilai tertinggi kandungan protein pada vaksin *A. hydrophila* sebesar 2.351,9508 ug/mL terdapat pada sampel-2 yaitu vaksin kering beku yang dilarutkan dalam 50 mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Dr. Angela Mariana Lusiastuti dan Dr. Nunak Nafiqoh yang telah memberikan dukungan dalam penulisan maupun kegiatan pengujian ini berlangsung. Kegiatan ini dibiayai dari anggaran DIPA Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan tahun 2020.

DAFTAR ACUAN

- Carpette. (2005). An introduction to practical biochemistry 100-101. Great Britany: Mc Graw Hill Book Company.
- Herupradoto, A., Bimo, Atik, Yuliani, & Gandul. (2010). Karakterisasi protein spesefik *Aeromonas hydrophila* penyebab penyakit ulser pada ikan mas. *Jurnal Veteriner*, (SI),v,11,n.3,sep.2010.ISSN 2477-5665. https://en.m.wikipedia.org/wiki/Bicinchoninic_acid_assy.
- Sugiani, D., Tauhid, Purwaningsih, U., & Lusiastuti, A.M. (2016). Vaksin kering beku sel utuh bakteri *Aeromonas hydrophila* untuk pencegahan penyakit motile *Aeromonads septicemia* pada ikan lele, nila, dan gurami. *Jurnal Riset Akuakultur*, 13(2), 159-167.
- Smith, P.K. *et al.* (1985). Measurement of protein using bicinchonimic acid. *Anal. Biochem.*, 150, 76-85.