

**KARAKTERISASI PROTEIN *Lernaea cyprinacea* DENGAN
METODE ELEKTROFORESIS SDS-PAGE**

**CHARACTERIZATION OF PROTEIN *Lernaea cyprinacea* BY USING
SDS-PAGE ELECTROPHORESIS METHOD**

Gunanti Mahasri, Ulia Fajriah dan Sri Subekti

Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo - Surabaya, 60115 Telp. 031-5911451

Abstract

One of the diseases that often attack are fish is parasitic disease caused by *Lernaea cyprinacea*, called *Lernaeosis*. This ectoparasites could be detected on skin, gill, eyes, fin or inside of mouth and nostril of fishes. The aim of the study was to know the character is tic of *L. cyprinacea* protein based on molecular weight using SDS-PAGE. The results of this study were expected as *Lernaeosis* vaccine candidate. The experiment used SDS-PAGE with 12% separating gel, 3% stacking gel, voltage 110 volts 28 A and gel staining using coomassie blue. The result showed that, there were eight protein bands with molecular weight 82.3, 73.3, 66.6, 60.5, 54.9, 27.5, 23.1 and 19.8 kDa. Among them, the bands with molecular weight 27.5, 23.1 and 19.8 kDa were thicker and clearer than the others.

Key words: *Lernaeosis*, SDS-PAGE, protein

Pendahuluan

Serangan wabah dan hama penyakit ikan serta penurunan kualitas lingkungan budidaya merupakan faktor penyebab kegagalan usaha budidaya ikan dan udang (Achjar dan Rismunandar, 2003). *Lernaeosis* adalah penyakit *parasiter* pada ikan yang disebabkan oleh serangan ektoparasit copepoda dari genus *Lernaea*. Ektoparasit ini dapat ditemukan pada seluruh permukaan tubuh, rongga mulut dan insang ikan (de Magalhaes, 2006). Kabata (1985) menjelaskan bahwa lima spesies *Lernaea* ditemukan di Asia Tenggara dan *L. cyprinacea* (Linnaeus, 1758) merupakan jenis yang umum ditemukan, khususnya di daerah tropis seperti Indonesia.

Ektoparasit ini menyerang ikan liar, ikan budidaya, ikan hias bahkan dapat juga ditemukan pada amphibi seperti katak (Nagasawa *et al.*, 2007). Kematian pada ikan dapat disebabkan karena kekurangan darah dan infeksi sekunder oleh bakteri dan jamur (Perez-Bote, 2006).

Kejadian *lernaecosis* pada kolam budidaya di Indonesia perlu mendapatkan perhatian, karena kejadian *lernaecosis* sering menyerang ikan budidaya baik di kolam maupun keramba jaring apung (Karantina Ikan Ngurah Rai, 2004). Pos Karantina Ikan El Tari Kupang (2004) melaporkan bahwa kejadian *lernaecosis* di Kabupaten Kupang mencapai 33,33%, sedangkan pada karamba jaring apung ikan nila di Kabupaten Bangli mencapai 60% dalam kurun dua hari

(Karantina Ikan Ngurah Rai, 2004). Kejadian *lernaecosis* di perairan Bangka Belitung mencapai 33% (Karantina Ikan Pangkalpinang, 2004).

Pengendalian *lernaecosis* dengan menggunakan bahan kimia maupun antibiotik untuk menanggulangi infeksi sekunder yang sudah sering dilakukan selama ini belum dapat memenuhi target. Hal ini terbukti masih tingginya kejadian *lernaecosis* di kolam-kolam budidaya di Indonesia (Hardjamulia, 1976). Pengendalian penyakit selama ini menggunakan antiparasit yang dapat menimbulkan resistensi dan residu pada ikan sehingga diperlukan bahan biologis untuk pengendaliannya (Lastuti, dkk., 2006).

Berdasarkan permasalahan tersebut maka perlu dikembangkan cara pencegahan yang tepat dan akurat melalui penelitian awal dengan cara mengidentifikasi *whole* protein dari *Lernaea* dengan metode SDS-PAGE. Metode SDS-PAGE tersebut pada dasarnya digunakan untuk mengkarakterisasi protein dari ektoparasit yang mungkin terdapat di permukaan tubuh parasit ikan (Handajani dan Samsundari, 2005). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakter protein *L. cyprinacea* berdasarkan berat molekul dengan SDS-PAGE. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan acuan untuk penelitian lebih lanjut dalam pembuatan vaksin untuk menanggulangi *lernaecosis*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter protein *L. cyprinacea* dengan metode SDS-PAGE.

Materi dan Metode Penelitian

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Veteriner, Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Laboratorium Pendidikan Perikanan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang pada bulan September sampai dengan bulan Oktober 2008.

Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu nampan bedah, mikroskop cahaya, cawan Petri, pinset, tabung reaksi, pipet, mikropipet, *tip*, *object glass*, *cover glass*, *beaker glass*, kertas saring whatmann no. 1, mortar, tubes dan microtubes, sentrifus, peralatan electrophoresis (Merek Bio-Rad), *Chamber* untuk *running* SDS-PAGE (Merek Bio-Rad), *freezer* (-20°C), *waterbath shaker* (SibataWS120Japan).

Bahan Penelitian

L. cyprinacea yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) yang terinfeksi *Lernaea*. Bahan yang digunakan untuk isolasi *L. cyprinacea* yaitu *aquadest*, 1 x *Phosphate Buffered Saline Tween-20* (PBST), *Phenylmethylsulfonyl Fluoride* (PMSF), *Ethanol absolut*, *Buffer Tris-Cl*, *Phosphate Buffered Saline* (PBS).

Bahan yang digunakan untuk analisis protein dengan metode SDS-PAGE adalah *butanol*, *Acrylamide*, *bis Acrylamide*, *ammonium persulphate* (APS), *Tetra Methyl Diamine* (TEMED), *tris HCl*, *E buffer*, deterjen *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), *methanol*, asam asetat, *formaldehyde*, ddH₂O dan pewarna *Comassie Brilliant Blue*.

Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode deskriptif yaitu penelitian yang berusaha untuk menuturkan pemecahan masalah yang ada saat ini berdasarkan data, diharapkan penelitian ini dapat menjawab pertanyaan tentang bagaimana karakter protein parasit *L. cyprinacea* (Narbuko dan Achmadi, 2007).

Bahan utama dari penelitian ini adalah parasit *L. cyprinacea* stadia dewasa yang diperoleh dari ikan gurami yang terserang *lernaosis*. Ikan yang terserang *lernaosis* terlebih dahulu dibersihkan dengan menggunakan *aquadest* agar kotoran yang menempel di tubuh ikan hilang. Pengambilan *Lernaea* dilakukan secara manual dengan menggunakan pinset, dan diusahakan agar parasit secara utuh dapat tercabut. Identifikasi *Lernaea* dilakukan menurut kunci identifikasi dari Kabata (1985). *Lernaea* yang terkumpul dicuci dengan *aquadest* agar bebas dari kotoran dan lendir.

Untuk menentukan konsentrasi protein digunakan metode Bradford dengan kit *Bio-Rad Protein Assay* dan dibaca dengan menggunakan *spektrofotometer* UV-Visible dengan panjang gelombang 595 nm.

Analisis protein *L. cyprinacea* dilakukan dengan teknik SDS-PAGE dengan komposisi separating gel 12% dan stacking gel 3%. Larutan akrilamid 12% dimasukkan dalam *glass plate*, dilanjutkan dengan pemberian butanol diatas gel dan dibiarkan hingga mengeras. Butanol dibuang dan dikeringkan dengan menggunakan kertas saring *whatmann*. Larutan akrilamid 3% dituangkan diatas separating gel yang telah mengeras. Kemudian *comb* atau sisir dipasang pada gel dan biarkan beberapa menit hingga gel mengeras dan *comb* dilepas. Gel beserta platnya dipasangkan pada alat elektroforesis, kemudian dituangkan *running buffer* hingga gel terendam.

Sampel yang akan dielektroforesis terlebih dahulu diberi *laemmli buffer* dengan perbandingan 1 : 1, kemudian dipanaskan selama 3 – 5 menit. Sampel yang telah dipanaskan dimasukkan pada sumur-sumur yang terdapat pada gel yang telah direndam oleh *running buffer*. Sebagai marker, digunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 11 – 95 kDa (PeqGOLD, Peqlab Biotechnologie GmbH). Alat elektroforesis ditutup dan mesin dijalankan dengan tegangan listrik 110 volt dan 28 A. Setelah *running* selesai yang ditandai dengan warna biru yang diperoleh dari *laemmli buffer* telah bergerak ke bagian bawah gel, mesin dimatikan dan gel direndam dalam larutan pewarna (*Comassie Brilliant Blue*). Pewarnaan dengan *coomassie blue* dilakukan dengan perendaman gel hasil *running* dalam larutan *staining* sambil digoyang dengan shaker selama 30 menit.

Hasil pewarnaan direndam dalam 150 ml asam asetat, kemudian direndam dalam larutan *destaining* sambil digoyang selama 30 menit. Hasil rendaman kemudian dicuci dengan asam asetat sampai

digoyang dengan *shaker*. Hasil elektroforesis yang berupa *band* dapat dilakukan perhitungan Rf (*Retardation Factor*) dari masing-masing *band* dengan rumus (Rantam, 2003):

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Kemudian nilai Rf dimasukkan dalam persamaan regresi linear dengan rumus:

$$Y = a + bX$$

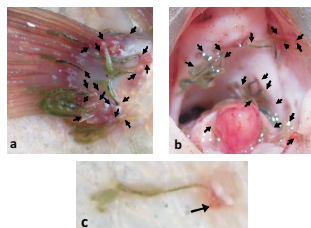
Keterangan: Y = berat molekul

X = nilai Rf sampel

Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini menggunakan sampel *Lernaea cyprinacea* yang diperoleh dari ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) pada Kolam Ikan Pendidikan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga. Secara makroskopis tubuh ikan gurami yang terserang *Lernaea* terdapat parasit menyerupai cacing bewarna putih yang menancap pada permukaan tubuh, sirip, insang dan bagian dalam mulut ikan. Ikan yang terserang *Lernaea* akan berenang ke permukaan kolam sambil menggosokkan diri pada pematang kolam maupun benda-benda asing disekitar kolam. Hal ini akan mengakibatkan luka pada seluruh tubuh ikan. Berat badan ikan akan menurun, anemia dan akhirnya ikan akan mati.

Berdasarkan hasil identifikasi menurut Kabata (1985) menunjukkan bahwa *Lernaea* yang ditemukan adalah *L. Cyprinacea*. Secara morfologi *Lernaea* yang ditemukan memiliki ciri-ciri yaitu berbentuk seperti cacing yang menancap pada permukaan tubuh ikan, tubuh *Lernaea* yang ditemukan tidak memiliki segmen, memiliki kantung telur berwarna hijau dibagian posterior tubuh. Jika *Lernaea* diambil dari tubuh ikan, pada bagian holdfast terdapat empat buah tanduk, dimana dua bagian tanduk lebih panjang dibandingkan dua bagian lainnya. Gambaran ikan gurami yang terserang oleh *L. cyprinacea* dapat dilihat pada Gambar 1.

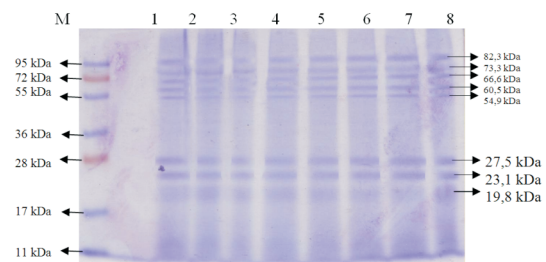


Gambar 1. Panah menunjukkan bagian tubuh yang terserang *Lernaea*

Keterangan: a. Bagian Sirip pectoral
b. Bagian rongga mulut
c. *Lernaea* yang menancap pada permukaan tubuh ikan

Karakterisasi protein *L. cyprinacea* yang dilakukan dengan teknik SDS-PAGE dengan separating gel 12% dan Stacking gel 3% dengan pewarnaan gel menggunakan *coomassie brilliant blue*. Proses elektroforesis menggunakan tegangan listrik 110 volt dengan 28 A. Gel hasil SDS-PAGE memperlihatkan adanya delapan pita (*band*) protein. Perhitungan berat molekul dari protein *Lernaea* yang diperoleh dapat dilakukan dengan menggunakan regresi linear. Hasil isolasi protein menunjukkan bahwa dari 694 *Lernaea* didapatkan *crude protein* berupa pelet yang disimpan dalam suhu -21°C dalam larutan Buffer Tris-Cl 20 mM.

Crude protein yang dihasilkan, kemudian diukur konsentrasinya dengan menggunakan *spektrofotometer* UV-Visible dengan panjang gelombang 595 nm. Setelah dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan *spektrofotometer* UV-Visible konsentrasi protein pada sampel *Lernaea* diperoleh hasil 10,6849; 12,4662 dan 11,3986 µg/ml.



Gambar 2. Hasil Karakterisasi Protein *L. cyprinacea* dengan SDS-PAGE

Keterangan: M = Marker, Lajur 1 – 8 = Protein *L. cyprinacea*

Perhitungan dilakukan pada marker dengan perhitungan nilai Rf (*Retardation Factor*). Nilai Rf diperoleh dengan pembagian jarak pergerakan protein dari tempat awal dengan jarak pergerakan warna dari tempat awal. Nilai Rf tersebut dan nilai log dari Berat Molekul (BM) marker kemudian dimasukkan pada rumus regresi linear dengan rumus $Y = a + bX$.

Berdasarkan hasil perhitungan Rf dan log BM pada marker protein diperoleh persamaan regresi linear yaitu: $Y = 2,0826 - 1,1199 X$. Pita Protein yang diperoleh dari hasil SDS-PAGE dihitung nilai Rf, kemudian dimasukkan pada persamaan regresi linear

Tabel 1. Perhitungan Rf dan Log BM

BM Marker (kDa)	Jarak Pergerakan Protein (mm)	Nilai Rf	Log BM
95	10	0,1492	1,9777
72	14	0,2090	1,8573
55	20	0,2985	1,7404
36	30	0,4478	1,5563
28	32,5	0,4851	1,4472
17	52,5	0,7836	1,2304
11	64	0,9552	1,0414

Keterangan: Panjang gel = 67 mm

Tabel 2. Perhitungan protein BM *L. cyprinacea*

Pita Protein	Jarak Pergerakan Protein (mm)	Nilai Rf	Nilai Y dari Regresi Linear	BM (kDa)
1	10	0,1492	1,9155	82,3
2	13	0,1940	1,8653	73,3
3	15,5	0,2313	1,8236	66,6
4	18	0,2686	1,7818	60,5
5	20,5	0,3060	1,7399	54,9
6	38,5	0,5476	1,4391	27,5
7	43	0,6418	1,3638	23,1
8	47	0,7015	1,2970	19,8

Keterangan: Panjang gel = 67 mm
 $Y = 2,0826 - 1,1199 X$

sehingga diperoleh nilai Y. Langkah selanjutnya dicari antilog dari nilai Y sehingga diperoleh Berat Molekul (BM) protein *L. cyprinacea* yang sebenarnya.

Karakterisasi protein *L. cyprinacea* yang dilakukan dengan teknik SDS-PAGE menunjukkan delapan pita (band) protein dengan Berat Molekul (BM) berturut-turut 82,3; 73,3; 66,6; 60,5; 54,9; 27,5; 23,1 dan 19,8 kDa. Hasil karakterisasi protein *L. cyprinacea* dengan SDS-PAGE dapat dilihat pada

Gambar 2. Diantara delapan pita protein tersebut pita protein dengan BM 27,5; 23,1 dan 19,8 kDa terlihat lebih tebal dibandingkan dengan pita protein yang lain.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, *lernaosis* dapat menyebabkan menurunnya kualitas dan kuantitas dari ikan gurami. Secara kualitatif *lernaosis* akan mengakibatkan penampilan dari ikan gurami tidak menarik karena terdapat banyak luka pada seluruh tubuh ikan. Hal ini akan berakibat menurunnya nilai ekonomis dari ikan gurami sebagai ikan konsumsi.

Sampel *L. cyprinacea* diperoleh dari ikan gurami (*O. gouramy*), yang merupakan jenis ikan air tawar mudah terinfeksi *Lernaea*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kabata (1985). Selanjutnya menurut de Magalhaes (2006), *lernaosis* dapat ditemukan pada seluruh permukaan tubuh, rongga mulut dan insang ikan. Dalam penelitian ini sampel *Lernaea* diperoleh dari seluruh permukaan tubuh, bagian rongga mulut dan insang ikan gurami.

Pengukuran kadar protein pada sampel *Lernaea* dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Rata-rata hasil perhitungan kadar protein yang diperoleh adalah 10,6849; 12,4662 dan 11,3986 µg/ml. Dari nilai konsentrasi protein tersebut sudah memenuhi syarat untuk dilakukan pemeriksaan BM dengan SDS-PAGE, sesuai dengan pernyataan dari Scope (1993) yang menyatakan bahwa konsentrasi protein terendah yang diperlukan untuk analisis protein yaitu sebesar 1,2 µg/ml.

Berdasarkan pita protein yang terlihat pada gel poliakrilamid dengan *separating* gel 12%, *stacking* gel 3%, tegangan listrik 110 volt 28 A dan elektroforegram pewarnaan gel dengan *coomasie blue* diperoleh delapan pita protein dengan berat molekul 82,3; 73,3; 66,6; 60,5; 54,9; 27,5; 23,1 dan 19,8 kDa. Untuk membedakan gel 12%, digunakan untuk memisahkan protein dengan berat molekul 14 – 66 kDa protein. Semakin kecil persentase gel yang akan digunakan, maka semakin besar berat molekul protein yang dapat dipisahkan. Kindmann and Valley (1991), menyebutkan bahwa tegangan pada elektroforesis mempunyai dua kelebihan yaitu memberikan gradien ruang gerak yang luas pada saat separasi. Sedangkan kondisi lingkungan elektrolit yang tinggi akan mempercepat migrasi partikel. Oleh sebab itu tegangan juga dapat mempengaruhi munculnya pita (*band*) protein yang dihasilkan.

Diantara delapan pita protein yang terbentuk, pita protein dengan BM 27,5, 23,1 dan 19,8 kDa terlihat pita protein yang terbentuk lebih tebal jika

dibandingkan dengan pita protein yang lain yang terlihat lebih tipis. Hal ini dijelaskan oleh Pasila (2008) dimana tebal tipisnya pita protein yang tercatat merupakan gambaran banyaknya protein yang terkandung dalam profil protein. Sedangkan menurut Tung *et al.* (1995) dalam Mahasri (2007) tebal tipisnya pita protein pada hasil SDS-PAGE disebabkan karena terdapat perbedaan secara genetik antara protein tersebut.

Sedangkan menurut Tizard (1987), protein yang imunogenik mempunyai berat molekul lebih dari 1000 Dalton. Bila dilihat dari berat molekul protein yang dihasilkan pada penelitian ini, maka protein yang diperoleh dianalisis lebih lanjut seperti melalui blotting untuk membuktikan protein tersebut termasuk protein imunogenik atau tidak. Akan tetapi untuk menentukan imunogenitas suatu protein masih banyak persyaratan lain. Persyaratan tersebut menurut Tizard (1987) antara lain adalah merupakan makromolekul, mempunyai struktur kimia yang kompleks dan memiliki sifat keasingan dimana sifat bahan tersebut dikenali sebagai bukan unsur tubuh normal.

Kesimpulan

Protein *L. cyprinacea* dapat dikarakterisasi menggunakan metode SDS-PAGE dan diperoleh delapan pita (*band*) protein dengan berat molekul yaitu 82,3; 73,3; 66,6; 60,5; 54,9; 27,5; 23,1 dan 19,8 kDa. Diantara delapan pita protein tersebut pita protein dengan berat molekul 27,5; 23,1 dan 19,8 kDa terlihat pita protein yang terbentuk lebih tebal dibandingkan dengan pita protein yang lain.

Dari pita (*band*) protein yang diperoleh melalui teknik SDS-PAGE diperlukan penelitian lebih lanjut agar nantinya dapat dijadikan sebagai bahan acuan dalam pembuatan vaksin yang akan digunakan dalam penanggulangan *lernaosis*.

Daftar Pustaka

- Achjar, M dan Rismunandar. 2003. Perikanan Darat. Bandung: Sinar Baru Algensindo. Hal 89 – 92.
- de Magalhaes, A.L.B., 2006. First Record of Lernaosis in a Native Fish Species from a Natural Environment in Minas Gerais State, Brazil. Pan-American Aquatic Scie., 1 (1): 8 – 10.
- Handajani, H. dan S. Samsundari. 2005. Parasit dan Penyakit Ikan. UMM Press. Malang. Hal 83 – 90, 191 – 195.
- Hardjamulia, A. 1976. Problem in Freshwater Fish Breeding and the Results of the Introduction of Improved Techniques in Indonesia. Research Institute for Inland Fisheries, Sukabumi, Indonesia. <http://www.apific.org/> Accessed April, 25, 2008. pp 313 – 324.
- Kabata, Z., 1985. Parasites and Diseases of Fish Cultured in the Tropics. London and Philadelphia: Taylor & Francis. Hal 227 – 242.
- Karantina Ikan Kupang. 2004a. Laporan Pemantauan Daerah Sebar Hama dan Penyakit Ikan Karantina Tahun Anggaran 2004 Lingkup Pos Karantina Ikan El Tari Kupang. Pos Karantina Ikan El Tari Kupang, Pusat Karantina Ikan Departemen Kelautan dan Perikanan. 26 hal.
- Karantina Ikan Ngurah Rai. 2004b. Laporan Pemantauan Hama dan Penyakit Ikan Karantina di Propinsi Bali Tahun Anggaran 2004. Stasiun Karantina Ikan Kelas I Ngurah Rai-Bali. 66 hal.
- Karantina Ikan Pangkalpinang. 2004c. Laporan Pemantauan Pos Karantina Ikan Pangkalpinang Tahun 2004. Pusat Karantina Ikan Departemen Kelautan dan Perikanan. 30 hal.
- Kindlmann, P.J. and R.A. Valley. 1991. High Voltage Electrophoresis Apparatus. Eastman Kodak Company (Rochester, NY). <http://www.free.patentsononline.com>. Accessed September, 2008. 5 pp.
- Lastuti, N.D.R., F.J. Wibisono dan R. Sidiq. 2006. Identifikasi Profil Protein Sarcptes scabiei pada Kambing dengan Analisis SDS-PAGE. Surabaya: universitas Airlangga. <http://www.jurnal.unair.ac.id>. 6 hal.
- Mahasri, G. 2007. Protein Membran Imunogenik *Zoothamnium penaei* sebagai Bahan Pengembangan Imunostimulan pada Udang Windu (*Penaeus monodon Fabricus*) terhadap *Zoothamniosis*. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Nagasawa, K., A. Inoue, Su Myat and T. Umino. 2007. New Host Records for *Lernaea cyprinacea* (Copepoda), a Parasite of Freshwater Fishes, with a Checklist of the Lernaidae in Japan (1915-2007). Japan: Hiroshima University, J. Grad. Sch. Biosp. Sci. 46: 21 – 33.
- Narbuko, C., dan A. Achmadi 2007. Metodologi Penelitian. Jakarta: Bumi Aksara. Hal 44.

- Perez-Bote, J. L., 2005. First Record of *Lernaea cyprinacea* (Copepoda: Cyclopoida) on the Allis Shad. *Folia boiologica (Krakow)* Spain, 53 (3–4): 197–198.
- Rantam, F. A. 2003. Metode Imunologi. Surabaya. Airlangga University Press.hal 145–162.
- Scopes, R. K. 1993. Protein Purification Principles and Practice, Third Edition. New York: Springer-vertag.
- Tizard, I. R. 1987. Pengantar Imunologi Veteriner. Penerjemah oleh: M. Partodiredjo. Airlangga University Press. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal. 237–255.
- Waluyo, J. 2004. Purifikasi dan Karakterisasi Protein Antibakteri dari Cacing Tanah. Desertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.