

SKRIPSI

PERBANDINGAN TITER ANTIBODI AYAM RAS PETELUR PASCA PEMBERIAN VAKSIN PROTEIN *OUTER MEMBRANE PROTEIN* DENGAN *WHOLE BACTERIA Salmonella pullorum S-11*



Oleh :

SOFI MARATUS SHOLIHAH
SURABAYA – JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006**



SKRIPSI

**PERBANDINGAN TITER ANTIBODI AYAM RAS PETELUR PASCA
PEMBERIAN VAKSIN PROTEIN *OUTER MEMBRANE PROTEIN*
DENGAN *WHOLE BACTERIA Salmonella pullorum S-11***

Skripsi sebagai salah satu syarat memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh :

SOFI MARATUS SHOLIAH
NIM 060112908

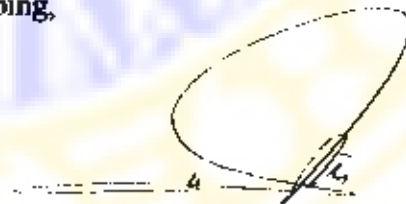
Menyetujui

Komisi Pembimbing.



(Dr. Susilohadi W.T, MS., Drh)

Pembimbing pertama



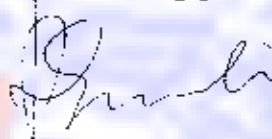
(Dr. Hardiyanto, M.S., Drh)

Pembimbing kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh - sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Menyetujui

Panitia Penguji,



Dr. Rahayu Ernawati, M.sc., Drh

Ketua



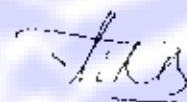
Julien Supraptini, SU., Drh

Sekretaris



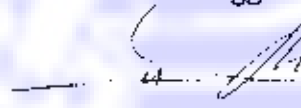
Dr. Susilohadi W.T, MS., Drh

Anggota



Wiwiek Tyasningsih, Mkes, Drh

Anggota



Dr. Hardiyanto, M.S., Drh

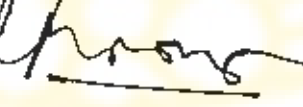
Anggota

Surabaya, Januari 2006

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh

NIP 130687297

**PERBANDINGAN TITER ANTIBODI AYAM RAS PETELUR PASCA
PEMBERIAN VAKSIN PROTEIN *OUTER MEMBRANE PROTEIN*
DENGAN *WHOLE BACTERIA Salmonella pullorum S-11***

Sofi Maratus Sholihah

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan guna mengetahui dan membandingkan titer antibodi yang dihasilkan ayam ras petelur pasca pemberian vaksin protein *Outer Membrane Protein* dan *whole bacteria Salmonella pullorum S-11*.

Sejumlah 15 ekor ayam ras betina tipe petelur galur CP 909 berumur delapan sampai sepuluh minggu. Selama percobaan ayam tersebut diberi formulasi pakan buatan sendiri. Data yang dihasilkan dianalisis dengan uji *t - test*.

Pada perlakuan K tanpa perlakuan (kontrol) hanya diinjeksi PZ steril. Perlakuan K₁ diinjeksi dengan *whole bacteria Salmonella pullorum S-11*. Perlakuan K₂ diinjeksi dengan vaksin protein *Outer Membrane Protein* dan di booster kembali pada minggu ke empat, kemudian pada minggu kelima diinjeksi kuman *Salmonella pullorum S-11*. Penyuntikan perlakuan dilakukan secara sub kutan daerah leher dengan dosis masing - masing satu milliliter setiap ekor. Pengukuran titer antibodi dilakukan pada hari ke 1 - 7 - 14 - 21 - 28- 35 dengan metode *indirect ELISA*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer antibodi yang dihasilkan ayam ras petelur pasca penyuntikan vaksin *Outer Membrane Protein* dengan satu kali booster belum menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan titer antibodi ayam ras petelur pasca penyuntikan *whole bacteria Salmonella pullorum S-11*. Hal ini menunjukkan bahwa protein *Outer Membrane Protein* dari kuman *Salmonella pullorum S-11* sebagai bahan dasar vaksin dengan pemberian satu kali booster bersifat kurang protektif, karena belum dapat menimbulkan antibodi dengan titer tinggi

Kata kunci : Protein OMP, *Salmonella pullorum S-11*, Titer Antibodi

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT saya ucapkan atas segala Rahmat- Karunia yang telah dilimpahkan selama ini sehubungan dengan terselesaikannya penelitian dan penulisan makalah skripsi ini yang berjudul : "Perbandingan titer antibodi ayam ras petelur pasca pemberian vaksin protein *Outer Membrane Protein* dengan *whole bacteria Salmonella pullorum S-11*."

Pada kesempatan ini juga saya sampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Dr. Fedik A.Rantam, drh selaku ketua bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan izin dan fasilitas dalam menyelesaikan penelitian. Dr. Susilohadi Widjajanto, MS., Drh selaku dosen pembimbing pertama dan Dr. Hardijanto, MS., Drh selaku pembimbing kedua skripsi yang telah memberikan saran, pendapat dan motivasi. drh Dharmawan, M.Kes dan drh Nana dari PUSVETMA yang telah menyediakan kuman *Salmonella pullorum S - 11*. Ayah, Ibu, Kaci, tata' iis, Mas Henry, angkatan 2001 khususnya danang, alm. Chuipit, tito and junkiest (thanks buat persahabatannya), Tiwul, anak Al - Hidayah atas dukungannya baik moril maupun materil. Dan yang terakhir kepada semua pihak yang telah membantu proses penyelesaian skripsi ini.

Karena terbatasnya waktu, sarana dan dana, saya sadar bahwa hasil penulisan ini masih jauh dari sempurna. Besar harapan penulis bisa memperoleh banyak kritik, koreksi dan saran demi penyempurnaan tulisan skripsi ini.

Dengan rendah hati, penulis berharap mudah – mudahan tulisan ini dapat memberikan sumbangan pemikiran di bidang kedokteran hewan di masa mendatang dan bermanfaat bagi insan keilmuan terkait.

Surabaya, Januari 2006

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Landasan Teori	5
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	7
1.6 Hipotesis	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pullorum	8
2.1.1 Sejarah Penyakit Pullorum	8
2.2 Etiologi Kuman <i>Salmonella pullorum</i>	9
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	9
2.2.2 Spesies yang terserang	9
2.2.3 Sifat Biokimiawi	10

2.2.4	Struktur dinding kuman	11
2.2.5	Struktur Antigen	12
2.2.6	Patogenesis	12
2.3	Diagnosa Penyakit	13
2.3.1	Gejala Klinis	13
2.3.2	Perubahan Patologi Anatomi	14
2.3.3	Isolasi – Identifikasi	14
2.3.4	Uji Serologis	15
2.4	Sistem Kekebalan Tubuh	15
2.4.1	Imunisasi	17
2.4.2	Antibodi dan antigen	17
2.4.3	Adjuvant	18
2.4.4	ELISA	19
 BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN		
3.1	Lokasi dan waktu penelitian	21
3.1.1	Lokasi Penelitian	21
3.1.2	Waktu Penelitian	21
3.2	Bahan dan materi penelitian	21
3.2.1	Bahan Penelitian	21
3.2.2	Alat Penelitian	22
3.2.3	Tehnik Pengambilan Sampel	23
3.2.4	Variabel Penelitian	23
3.2.5	Parameter dan Analisa Data	23

3.3	Metode penelitian	24
3.3.1	Pembuktian Isolat <i>Salmonella pullorum S-11</i>	24
3.3.2	Pembuatan suspensi <i>Whole bacteriy Salmonella pullorum S-11</i>	25
3.3.3	Pembuatan Vaksin protein OMP kuman	26
3.3.4	Perlakuan Penelitian	29
BAB IV	HASIL PENELITIAN	
4.1	Data penelitian	32
4.2	Hasil penelitian	33
4.2.1	Pembuktian Isolat <i>Salmonella pullorum S-11</i>	33
4.2.2	Pembuatan suspensi <i>whole bacteriy S.pullorum S-11</i>	38
4.2.3	Pembuatan vaksin protein OMP	39
4.2.4	Perlakuan penelitian	42
BAB V	PEMBAHASAN	
5.1	Pembahasan hasil penelitian	50
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1	Kesimpulan	58
6.2	Saran	58
	RINGKASAN	59
	DAFTAR PUSTAKA	62
	LAMPIRAN	66

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Skema pembuktian kuman <i>Salmonella pullorum</i> S-11	23
3.2 Perbandingan BaCl ₂ dan H ₂ SO ₄ untuk larutan Mc Farland	25
3.3 Skema kerja Isolasi protein OMP <i>S.pullorum</i> S-11	26
3.2 Cara kerja metode <i>indirect</i> ELISA	28
4.1 Hasil uji biokimiawi dan uji gula – gula kuman <i>S.pullorum</i> S-11	33
4.2 Nilai OD ELISA <i>indirect</i> antibodi ayam petelur pasca penyuntikan PZ steril	47
4.3 Nilai OD ELISA <i>indirect</i> antibodi ayam petelur pasca penyuntikan <i>Whole bacteriy Salmonella pullorum</i> S-11	48
4.4 Nilai OD ELISA <i>indirect</i> antibodi ayam petelur pasca penyuntikan vaksin protein OMP	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Perbedaan struktur dinding kuman gram negatif – positif	11
4.1 Kuman <i>Salmonella pullorum</i> S-11 dalam media NA	34
4.2 Kuman <i>Salmonella pullorum</i> S-11 dalam media SSA	35
4.3 Kuman <i>Salmonella pullorum</i> S-11 dalam media BSA	35
4.4 Hasil Uji biokimiawi <i>Salmonella pullorum</i> S-11	36
4.5 Hasil Uji gula – gula <i>Salmonella pullorum</i> S-11	37
4.6 Suspensi kuman <i>Salmonella pullorum</i> S-11 dan Mc Farland III	38
4.7 Sonikasi kuman untuk memecah membran luar	39
4.8 Rekaman hasil Spektrofotometer protein OMP	40
4.9 Vaksin protein OMP dan <i>Adjuvant Freund's complete</i>	41
4.10 Antigen pullorum	42
4.11 Hasil Uji RWBT	43
4.12 Kandang Perlakuan	43
4.13 ELISA washer	44
4.14 Hasil uji ELISA	45
4.15 ELISA reader	45
4.16 Grafik nilai OD ELISA pada kelompok K	47
4.17 Grafik nilai OD ELISA pada kelompok K ₁	48
4.18 Grafik nilai OD ELISA pada kelompok K ₂	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Formulasi pakan ayam petelur selama penelitian	66
2. Kerangka Operasional penelitian	68
3. Cara kerja <i>indirect</i> ELISA	69
4. Analisa data dengan uji <i>t - test</i>	71

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Ternak unggas khususnya ayam merupakan komoditas ternak yang cepat berproduksi dan banyak dipelihara karena relatif murah dan mudah pemeliharaannya dibandingkan ternak lainnya. Di Indonesia peternakan ayam terutama ayam ras petelur telah berkembang pesat. Pesatnya perkembangan peternakan ayam ini tidak hanya didorong oleh peluang pasar yang masih terbuka, tetapi juga oleh kebijaksanaan pemerintah (Sudaryani dan Santosa, 1997).

Majunya peternakan ayam diiringi juga dengan meningkatnya kesadaran masyarakat untuk mengkonsumsi produk hasil unggas, khususnya telur ayam. Telur ayam merupakan salah satu sumber bahan makanan bergizi sempurna dengan kandungan protein tinggi yang dibutuhkan untuk meningkatkan gizi sumber daya manusia Indonesia. (Sudaryani dan Santosa, 2003).

Dalam rangka meningkatkan produksi ternak ayam, dipersyaratkan pemanfaatan panca usaha ternak, yang terdiri dari masukan bibit yang baik dan terseleksi, makanan yang bergizi dan layak, pengelolaan yang efisien, pemasaran produksi dan yang terpenting adalah pengendalian dan penanganan penyakit. Pengendalian dan penanganan penyakit pada peternakan ayam sangat penting, karena penyakit dapat menimbulkan kerugian berupa kematian, gangguan pertumbuhan, produksi telur terhambat yang merupakan ancaman serius



bagi peternak dan penyakit merupakan salah satu kendala rendahnya produksi industri unggas nasional (Murtidjo, 1992).

Salah satu penyakit pada ayam yang sangat ditakuti para peternak unggas adalah penyakit pullorum. Sebab penyakit tersebut dapat menimbulkan kerugian ekonomi yang besar, dimana kerugian tersebut dapat berupa kematian anak ayam antara 40 -- 60%, sedangkan pada ayam dewasa menyebabkan penurunan produksi telur sampai 20% (Gordon dan Jordan, 1982).

Penyakit pullorum menyerang bangsa unggas termasuk ayam dan di Indonesia tersebar luas, dikenal sejak tahun 1950 dengan nama Penyakit Berak Kapur (*Bacillary White Diarrhoe*). Isolasi kuman penyebab penyakit ini pertama kali di Indonesia oleh Sri Purnomo pada tahun 1970 kemudian disebut kuman *Salmonella pullorum* (Anonimus, 1981).

Penularan penyakit pullorum dapat terjadi secara vertikal maupun horisontal. Penularan secara vertikal yaitu penularan dari induk penderita ke anak ayam melalui telur yang mengandung *Salmonella pullorum*. Penularan secara horisontal yaitu penularan dari hewan penderita ke hewan lainnya misalnya pada mesin tetas, melalui oral ataupun melalui peralatan, misalnya alat seksing dan alat pemotong paruh (Parkhust and Mounthey, 1988).

Kejadian pullorum pada anak ayam dalam perjalanan penyakitnya dapat menimbulkan kematian, tetapi bila anak ayam dapat bertahan hidup kemungkinan akan menjadi karier. Pullorum pada ayam dewasa pada umumnya tidak menimbulkan kematian tetapi menurunkan produksi telur dan ayam tersebut

menjadi karier. Ayam yang berstatus karier menghasilkan telur yang mengandung *Salmonella pullorum* dan menurunkan fertilitas telur (Hofstad *et al*, 1984).

Upaya pengobatan terhadap penyakit pullorum dengan antibiotika belum memuaskan hasilnya, sedangkan pencegahan dengan pemberian vaksin belum pernah dilakukan di Indonesia (Susilohadi, 2003).

Pernah dilakukan penelitian, vaksinasi pada ayam dengan pemberian bakterin *Salmonella pullorum* (in aktivasi kuman) dengan cara pemanasan 100° C selama 1 jam dan cara penambahan formalin 0,5 % ternyata hanya mampu memberikan perlindungan sebesar 20 % setelah ujiantang dan memiliki titer antibodi rendah (Handijatno,D, 1990).

Pembuatan bakterin dari kuman *Salmonella pullorum S-11* yang diberikan pada ayam umur 3 minggu didapatkan hasil titer antibodi yang optimum pada hari ke 21 tetapi menurun drastis pada hari ke 28. Kemudian disarankan untuk dilakukan penelitian dengan menggunakan sub unit protein *Salmonella pullorum* (Susilohadi, dkk, 2000).

Bahan sub unit protein yang bersifat imunogenik kuman ini dengan penambahan *Adjuvant Freund's Complete* sebagai adsorben dapat merangsang terbentuknya antibodi dengan titer tinggi dan dalam jangka waktu lama, oleh karena itu materi sub unit ini dapat berfungsi dalam penebalan tubuh dan proteksi tubuh sehingga kemungkinan dapat digunakan sebagai vaksin sub unit dan dimanfaatkan untuk pengendalian serta pencegahan terhadap penyakit pullorum (Susilohadi, 2003).

Berdasarkan atas uraian diatas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh protein *Outer Membrane Protein* dari *Salmonella pullorum S - 11* yang kemudian ditambah dengan *Adjuvant Freund's Complete* terhadap titer antibodi. Langkah awal dengan penyuntikkan vaksin protein *Outer Membrane Protein* pada ayam yang kemudian dibandingkan dengan ayam yang diinjeksi *whole bacteriy Salmonella pullorum S -11* dan ayam kontrol (tanpa perlakuan). Kemudian dilakukan pengujian secara *in vitro* yaitu dengan pengukuran titer antibodi yang dihasilkan pada hari pertama sebelum dilakukan perlakuan kemudian dilanjutkan pada hari ke tujuh, empat belas, dua puluh satu, dua puluh delapan dan yang terakhir hari ke tiga puluh lima.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut diatas, maka timbul permasalahan dengan rumusan sebagai berikut :

1. Apakah Protein *Outer Membrane Protein* dari kuman *Salmonella pullorum S - 11* sebagai bahan dasar vaksin dengan pemberian satu kali booster dapat menimbulkan titer antibodi yang tinggi terhadap ayam ras petelur ?
2. Apakah terdapat perbedaan titer antibodi pada kelompok ayam ras petelur pasca pemberian vaksin protein *Outer Membrane Protein* dengan *whole bacteriy Salmonella pullorum S -11* ?

1.3 Landasan Teori

Penyakit pullorum sering ditemukan pada ayam ras daripada ayam buras dan beberapa peneliti melaporkan bahwa persentase ayam betina yang memberikan reaksi positif terhadap uji pullorum lebih tinggi dibandingkan ayam jantan. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya infeksi lokal pada ovarium (Gordon and Jordan, 1982 dan Tabbu, 2000).

Salmonella pullorum menimbulkan penyakit yang akut dan dapat menyebabkan kematian pada anak ayam, sedangkan pada ayam dewasa penyakit yang ditimbulkan bersifat kronis dan merupakan karier (Murtidjo, 1992 dan Akoso, 1993).

Salmonella pullorum termasuk bakteri Gram negatif yang mempunyai struktur dinding sel yang lebih kompleks dari pada bakteri Gram positif, dinding sel bakteri Gram negatif ini terdiri dari *Outer Membrane* dan *Periplasmic Space*. Dalam *Outer Membrane* terdapat kandungan protein tinggi (Quinn, *et al*, 2002).

Susilohadi (2003) berpendapat bahwa sub unit protein *Outer Membrane Protein Salmonella pullorum S - 11* bersifat imunogenik yang apabila ditambahkan dengan *Adjuvant Freund's Complete* sebagai adsorben dan di booster dapat merangsang terbentuknya antibodi dengan titer tinggi dalam jangka waktu lama, oleh karena itu materi sub unit ini dapat berfungsi dalam penguatan tubuh dan proteksi tubuh sehingga dapat digunakan sebagai vaksin sub unit serta kemungkinan dapat dimanfaatkan untuk pengendalian dan pencegahan terhadap penyakit pullorum.

Selama ini berbagai jenis sulfonamid, nitrofuran, antibiotik dan antibakteri lainnya telah digunakan untuk mengobati *Salmonella pullorum* dengan hasil bervariasi dalam menekan mortalitas, tetapi tidak dapat membasmi pullorum secara tuntas. Penggunaan obat – obat tertentu yang berlebihan telah dilaporkan dapat menimbulkan resistensi pada ayam (Tabbu, 2000)

Salah satu uji serologis yang banyak dimanfaatkan untuk mengukur kuantitas antibodi adalah *Enzyme - Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dengan cara menilai absorpsi cahayanya melalui *Optical Density* (OD) serta dapat dipergunakan untuk mengevaluasi program vaksinasi (Rantam, dkk, 2003)

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui titer antibodi yang dihasilkan ayam ras petelur pasca pemberian protein *Outer Membrane Protein* dari *Salmonella pullorum* S -11 sebagai bahan dasar vaksin dengan pemberian satu kali booster.
2. Mengetahui perbedaan titer antibodi yang terbentuk antara kelompok ayam ras petelur pasca pemberian vaksin protein *Outer Membrane Protein* dengan *whole bacteriy Salmonella pullorum* S -11.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Dapat memberikan informasi ilmiah bagi ilmu pengetahuan di bidang bakteriologi khususnya *Salmonella pullorum*.
2. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan manfaat lebih lanjut tentang pencegahan dan pengendalian penyakit pullorum pada ternak unggas terutama ayam.

1.6 Hipotesis

Hipotesa dari penelitian ini adalah :

1. Terbentuk titer antibodi yang tinggi pada ayam ras petelur pasca pemberian protein *Outer Membrane Protein* dari kuman *Salmonella pullorum S -11* sebagai bahan dasar vaksin dengan pemberian satu kali booster.
2. Terdapat perbedaan titer antibodi yang terbentuk pada kelompok ayam ras petelur pasca pemberian vaksin protein *Outer Membrane Protein* dengan *whole bacteriy Salmonella pullorum S -11*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pullorum

2.1.1 Sejarah Penyakit

Agen penyebab dari penyakit pullorum ditemukan oleh Rettger pada tahun 1899 yang kemudian dinyatakan olehnya dengan "Fatal Septicemia pada anak ayam" di tahun 1900. Pada laporan berikutnya, Rettger menunjukkan sebagai "Diare Putih" (*white diarrhea*) yang tidak lama kemudian dikembangkan menjadi "*Bacillary White Diarrhea*" untuk membedakan dengan penyakit lain yang menyerang ayam kemungkinan diklasifikasikan dengan diare putih sesuai dengan laporan Jones tahun 1911 (Hofstad *et al*, 1984).

Penyakit pullorum telah menyebar luas di Amerika Serikat dan negara asing lainnya, dan menyebabkan peningkatan mortalitas kelompok ayam dengan angka kematian sampai 100% pada anak ayam sampai dengan umur 7 hari (Hofstad, *et al* 1984).

Distribusi penyakit pullorum ini menyebar luas, sampai sekarang masih menyerang berbagai wilayah, termasuk Meksiko, Amerika Tengah, Afrika, dan beberapa Negara di Asia (Darrel, 2001).

Penyakit pullorum di Indonesia dikenal sejak tahun 1950 dengan nama penyakit Berak Kapur dan diisolasi pertama kali oleh Sri Purnomo pada tahun 1970 kemudian diketahui penyebab kuman *Salmonella pullorum* (Anonimus, 1981).

2.2 Etiologi kuman *Salmonella pullorum*

2.2.1 Klasifikasi dan morfologi

Salmonella pullorum termasuk dalam family Enterobacteriaceae, termasuk dalam serogrup D berdasarkan skema *White Kauffmann*. Kuman ini berbentuk batang atau tangkai kecil yang panjang (0,3–0,5 x 1–2,5 μm) dengan ujung membulat (*slightly rounded ends*). Dapat tumbuh dalam media buatan dan membentuk koloni kecil, seperti tetes embun (*dew drop like*) (Hofstad *et al*, 1984, Gordon dan Jordan, 1982).

Salmonella pullorum termasuk kuman Gram negatif, non motil, non kromogenik, tidak berspora. *Salmonella pullorum* tumbuh pada suhu optimum 37° C, bersifat aerob sampai fakultatif anaerob serta dapat bertahan hidup selama beberapa bulan di luar induk semang (Hofstad, *et al*, 1984 dan Ay Ling, 1998)

Kuman ini mempunyai beberapa persamaan struktur antigenik dengan *Salmonella gallinarum* dan dapat mengalami aglutinasi silang diantara keduanya (Tabbu, 2000).

2.2.2 Spesies yang terserang

Ayam merupakan hospes alami *Salmonella pullorum* dan merupakan hospes yang penting, hal ini dikarenakan tingkat adaptasi yang tinggi dari kuman *Salmonella pullorum* tersebut pada ayam (Tabbu, 2000).

Selain ayam, kuman *Salmonella pullorum* juga menyerang kalkun, itik, burung gereja, angsa, burung puyuh, burung kenari, kutilang dan sejenis burung kakaktua. Mamalia yang dapat terinfeksi kuman *Salmonella pullorum* baik secara alami maupun secara eksperimental antara lain kelinci, babi, anak kucing, rubah, anjing, babi hutan, induk sapi dan tikus liar (Hofstad *et al*, 1984).

Pullorum juga dapat menular ke manusia melalui telur yang kurang masak dan dapat mengakibatkan *gastroenteritis* akut atau sakit perut yang terjadi beberapa hari kemudian (Parkhurst and Mouthney , 1988).

2.2.3 Sifat biokimia

Kuman ini dapat memfermentasi asam dan gas dari glukosa, mannososa, mannitol, dekstrosa dan galaktosa. Ornithine decarboxylase dan rhamnosa juga difermentasi oleh kuman *Salmonella pullorum*. Laktosa, sukrosa, dulcitol, gliserol, maltosa tidak difermentasi. Indol dan Acetilmethylcarbinol tidak ditemukan. Hidrogen Sulfida (H_2S) diproduksi lebih lambat dari kebanyakan jenis kuman *Salmonella sp* yang lain (Hofstad *et al*, 1984 dan Quinn *et al*, 2000).

Salmonella pullorum tidak mempunyai enzim urease dan mereduksi nitrat menjadi nitrit (Merchant and Parker, 1971).

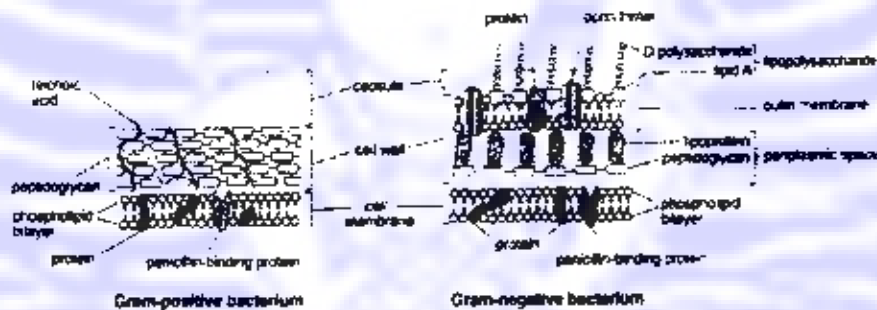
Kuman *Salmonella pullorum* dapat bertahan hidup dalam air mendidih selama 5 menit dan pada temperatur 2 - 33°C dengan kelembaban 75% dapat bertahan hidup sampai sekitar 30 hari (Hofstad *et al*, 1984).

Sedangkan pada kain kering dengan suhu kamar (37°C) , kuman tahan hidup sampai sekitar 8 bulan. Di tanah pada temperatur 26-30 °C dapat bertahan hidup 3 bulan sampai setahun (Hagans and Brunners, 1973).

2.2.4 Struktur Dinding Kuman

Salmonella pullorum termasuk bakteri Gram negatif, yang mempunyai susunan dinding sel yang berbeda dengan kuman Gram positif. Pada umumnya dinding sel bakteri Enterobacteriaceae memiliki komposisi yaitu peptidoglikan, lipoprotein, fosfolipid, protein dan lipopolisakarida (Wolfgang, 1992).

Hal ini lebih diperjelas dengan Gambar 2.1 mengenai struktur dinding kuman Gram positif dan Gram negatif sebagai berikut :



Gb. 2. 1 Struktur dinding kuman Gram negatif dan positif (Quinn *et al*, 2000)

Pada kuman Gram positif protein berada di bagian permukaan dinding peptidoglikan, sedangkan protein pada kuman Gram negatif berada pada membran luar (*Outer Membrane Protein*) yang tebal dan berhubungan dengan lapisan peptidoglikan (Quinn *et al*, 2000 dan Susilohadi, 2003).

2.2.5 Struktur Antigen

Kuman *Salmonella sp* secara antigenik mempunyai H (*flagellar*) antigen dan O (*somatic*) antigen. Tetapi khususnya pada kuman *Salmonella pullorum* tidak memiliki H antigen karena tidak mempunyai flagella dan hanya memiliki O antigen (Hofstad *et al*, 1984).

O antigen atau *somatic* antigen dibagi menjadi 3 tipe yaitu tipe standar, intermediet dan varian yang dapat dibedakan dengan tes sedimentasi ammonium sulfat. *Salmonella pullorum* dapat dibedakan dengan *Salmonella gallinarum* hanya dengan ornithin dekarboksilase tes (Darrel, 2001).

Somatik antigen (O antigen) pada kuman *Salmonella pullorum* adalah bagian dari sel kuman yang tahan terhadap pemanasan, alkohol dan asam (Merchant and Parker, 1971 dan Hofstad *et al*, 1984).

2.2.6 Patogenesis

Salmonella pullorum yang masuk mulut selanjutnya menuju alat pencernaan, menembus dinding usus halus dan masuk aliran darah sehingga mengakibatkan septikemia kemudian sampai dan menetap di ovarium yang selanjutnya akan keluar dari tubuh melalui telur (Hagans and Brnners, 1973).

Salmonella pullorum secara inhalasi menuju paru paru yang menyebabkan kerusakan jaringan paru - paru dan kesulitan bernafas, kemudian menuju aliran darah dan ovarium (Gordon and Jordan, 1982, Hofstad *et al*, 1984).

2.3 Diagnosa Penyakit

Diagnosa penyakit pullorum didasarkan atas sejarah kelompok, gejala penyakit, perubahan pasca mati, uji serologis dan isolasi – identifikasi kuman *Salmonella pullorum* di laboratorium (Anonimus, 1981).

2.3.1 Gejala Klinis

Ayam yang terinfeksi kuman *Salmonella pullorum* menunjukkan gejala selalu mengantuk, lesu, bergerombol dengan mata menutup dan bersuara terus – menerus (Gordon dan Jordan, 1982).

Ayam yang terserang juga menunjukkan gejala *anorexia*, sayap terkulai, diare, dehidrasi , terdapat eksreta seperti kapur-putih sekitar kloaka. Selain itu, pada penderita juga menunjukkan diare warna putih dan terdapat gumpalan warna putih seperti pasta di sekitar kloaka, terjadi kelemahan pada kaki, sayap menggantung dan sesak nafas. Sedangkan ayam yang tahan hidup mengalami hambatan dalam pertumbuhannya (Hagans and Brunners, 1973, Darrel, 2001).

Pada ayam dewasa yang terserang penyakit pullorum gejala klinis sulit terlihat karena merupakan gejala sub klinis. Hanya kadang – kadang terlihat hewan depresi, kekurusan, anemia, diare warna putih dan produksi telur menurun. Gejala yang spesifik adalah kematian pada anak ayam yang baru menetas atau setelah diturunkan dari mesin penetas (Hofstad *et al*, 1984).

2.3.2 Perubahan Patologi Anatomi

Perubahan patologi anatomi pada ayam dewasa yang paling penting adalah adanya folikel – folikel telur yang mengalami atrofi. Juga limpa dan hati sering membengkak, sedangkan *enteritis* sering terlihat (Ressang, 1984).

Ayam betina karier akan memperlihatkan kista ovarii, *peritonitis* dan *perikarditis* akut / kronis. Ovarium mengandung masa perkejuan dan menutupi kapsula, berwarna kuning sampai dengan merah gelap karena bercampur darah dengan folikel menutupi ovarium, tetapi seringkali menyembul dan melepaskan diri dari ovarium (Gordon and Jordan, 1982, Hofstad *et al* , 1984).

2.3.3 Isolasi – Identifikasi

Pertumbuhan *Salmonella pullorum* pada pembedihan *Beef Extract Agar* dengan pH 7-7,2 akan tampak sebagai koloni yang sendiri – sendiri, mengkilap dan tembus cahaya (Ay Ling, 1998).

Isolasi kuman *Salmonella pullorum* membutuhkan media selektif yaitu media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) atau *Bismuth Sulfit Agar* (BSA) tetapi dapat pula digunakan media *Mc Conkey Agar* (MCA) (Mustafa, 1992 , Cappucino and Natalie Sherman, 1985).

Pertumbuhan kuman pada media selektif menunjukkan koloni halus, bulat dengan tepi rata, tidak berwarna (*colorless*) dan tembus cahaya (Hitchner, 1980, Jackson and Simmons, 1981).

Salmonella pullorum pada media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) memberikan reaksi perubahan yaitu pada daerah permukaan yang miring berwarna merah (basa), pada daerah yang tegak berwarna kuning (asam), tampak pembentukan H₂S yang ditandai dengan adanya daerah berwarna hitam pada dasar tabung dan juga disertai pembentukan gas yang ditandai dengan pecahnya media / sedikit terangkatnya media pada dasar tabung. Gambaran *Salmonella pullorum* pada media *Sulfide Indol Motility* (SIM) berupa garis putih pada bekas tusukan (sifat non motil, terjadi pembentukan H₂S dan uji Indol hasilnya negatif) (Jackson and Simmons, 1981, Hofstad *et al*, 1984 dan Ay Ling, 1998).

2.3.4 Uji serologis

Beberapa uji serologis untuk mengetahui adanya reaktor penyakit pullorum antara lain : Uji Darah Cepat / *Rapid Whole Blood Test*, Uji Aglutinasi Tabung / *Tube Agglutination test*, Uji Cepat Aglutinasi Serum / *Rapid Serum Test* (Hagans and Brunners, 1973).

2.4 Sistem Kekebalan Tubuh

Imunitas dalam dunia kedokteran berarti resistensi relatif terhadap suatu mikroorganisme. Resistensi terbentuk berdasarkan respon imunologik. Respon imun mencakup pengertian pengenalan zat atau benda asing oleh suatu makhluk hidup dengan segala rangkaian kejadian yang melibatkan sistem limforetikuler (Gan dan Handoko, 1987).

Imunitas berasal dari kata latin yaitu *immunitas*. Secara umum imunitas merupakan respon molekuler maupun seluler yang mekanismenya terbagi menjadi dua, yaitu *innate immunity* dan *adaptive immunity*. *Innate immunity* adalah pertahanan tubuh yang bersifat tidak spesifik (mekanisme pertahanannya dapat digunakan sewaktu – waktu dan tidak ditujukan khusus untuk antigen tertentu) dan merupakan bagian sistem imun yang berfungsi sebagai barier terdepan pada awal terjadinya infeksi penyakit, oleh karena itu disebut *natural* atau *native immunity*. Yang termasuk *innate immunity* adalah makrofag, sel darah merah dan sel asesories. *Addative immunity* adalah merupakan sistem pertahanan tubuh lapis kedua, jika *innate immunity* tidak mampu mengeliminasi agen penyakit. *Adaptive immunity* bersifat spesifik sehingga mekanisme pertahanannya harus dirangsang terlebih dahulu dan sifat pertahannya sangat khusus terhadap antigen yang menginduksinya. (Bellanti, 1985, Indah, dkk, 1987 dan Rantam, 2003).

Dalam respon kekebalan dikenal dua jenis limfosit yang berperan, yaitu limfosit T berperan dalam kekebalan seluler yang perkembangannya dipengaruhi oleh timus dan limfosit B berperan dalam kekebalan humoral yang perkembangannya dipengaruhi oleh bursa fabrisius pada ayam. Mekanisme pembentukan antibodi menghendaki kerjasama erat antara limfosit T, limfosit B dan Makrofag (Jawetz *et al*, 1978).

2.4.1 Imunisasi

Imunisasi yang dapat menimbulkan respon kebal, dapat dibagi menjadi dua cara yaitu imunisasi aktif dan imunisasi pasif. Terdapat dua macam vaksin yang dapat digunakan dalam imunisasi aktif, yaitu vaksin hidup dan vaksin mati. Keduanya mempunyai kelebihan dan kekurangan. Vaksin hidup bersifat kuat, tidak memerlukan *adjuvant*, tidak stabil dalam penyimpanan, mampu bereplikasi di dalam sel tubuh. Sedangkan vaksin mati mantap dalam penyimpanan dan tidak mampu bereplikasi di dalam sel tubuh, sehingga cenderung menghasilkan tanggapan kebal yang lebih rendah daripada vaksin hidup. Imunisasi pasif bersifat sementara dengan memindahkan antibodi dari hewan resisten ke hewan rentan. Antibodi ini membentuk perlindungan yang cepat, tetapi cepat dikatabolisasi (Tizard, 1988)

Protein Outer Membrane Protein yang berasal dari *Salmonella pullorum S-11* sebagai bahan dasar vaksin, termasuk dalam vaksin mati. Oleh karena itu diperlukan suatu *adjuvant* untuk meningkatkan respon imun.

2.4.2 Antibodi dan Antigen

Antibodi adalah immunoglobulin yang dibentuk oleh tubuh (sel B) sebagai respon terhadap stimulasi antigenik. Semua molekul antibodi mempunyai 4 rantai polipeptida dasar yang terdiri dari dua rantai berat dan rantai ringan yang identik dan dihubungkan satu sama lain dengan ikatan disulfida (Quinn, *et al*, 2002).

Antibodi tertinggi terdapat dalam serum darah dan paling mudah diperoleh dalam jumlah banyak untuk dianalisis. Ada lima jenis immunoglobulin,

yaitu immunoglobulin G (Ig G), immunoglobulin M (Ig M), immunoglobulin A (Ig A), immunoglobulin D (Ig D) dan immunoglobulin E (Ig E) (Pelzar and Michael , 1988).

Sedangkan antigen adalah substansi yang dapat dikenali dan diikat dengan baik oleh sistem imun. Antigen dapat berasal dari organisme (bakteri, virus, jamur, parasit) atau molekul lain dalam tubuh. Tidak setiap antigen berinteraksi dengan molekul sistem imun. Bagian dari antigen yang secara langsung berkaitan dengan molekul reseptor (seperti antibodi) dikenal dengan nama epitop. Hal ini menandakan bahwa antigen mempunyai beberapa epitop (determinan antigen) (Rantan, 2003).

2.4.3 Adjuvant

Kebanyakan antigen yang digunakan untuk memproduksi antibodi tidak bersifat terlalu imunogenik, sehingga membutuhkan *adjuvant* untuk meningkatkan respon imun. *Adjuvant* adalah substansi tertentu yang dapat meningkatkan secara tidak spesifik efektivitas imunologis dari agen pengimunisasi. *Adjuvant* mempunyai sifat - sifat tertentu sebagai karakteristiknya terutama membuat depot antigen dan melepas antigen sedikit demi sedikit sehingga memperpanjang pemaparan antigen dengan sistem imun dan memacu sistem imun dengan afinitas tinggi (Baratawidjaja, 2002 dan Quinn *et al*, 2002).

Salah satu cara untuk membentuk depot adalah dengan menggabungkan antigen dalam emulsi air dan minyak. Kehadiran minyak mendorong terjadinya reaksi perdarahan lokal dan bentukan jaringan granuloma di sekitar tempat

suntikan, sedang antigen dilepaskan perlahan – lahan dari fase air dalam emulsi. Bila mikrobakteri yang tercampur emulsi air dalam minyak disebut *Freund's Complete Adjuvant* (CFA), suatu *adjuvant* yang sangat kuat. Bagian aktif dari mikrobakteri yang meningkatkan aktivitas ini dikenal sebagai muramil dipeptida (*n - acetyl - muramyl - l - alanyl - D- Isoglutamin*). *Adjuvant* ini terbaik diberikan melalui sub kutan atau intradermal dan peningkatan yang optimal diperoleh bila dosis antigen relatif rendah. Zat itu bertindak khusus untuk merangsang fungsi sel T. CFA meningkatkan produksi Ig G melebihi Ig M. (Tizard, 1988).

2.4.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Metode ELISA pertama kali diperkenalkan oleh Engvall and Perlmann (1971) dengan cara mengkonjugasikan enzim dalam *immunoassay*. ELISA terbagi menjadi dua sistem yaitu sistem homogen dan sistem heterogen. Sistem homogen dipengaruhi oleh aktivitas enzim dan tidak memerlukan pencucian dan reaksi secara bertahap. Kerugian dari sistem ini adalah tidak sensitif sehingga tidak digunakan untuk skrining. Sistem heterogen adalah sistem uji yang tidak dipengaruhi oleh aktivitas enzim, dalam sistem ini terdapat dua model yaitu kompetitif ELISA dan non - kompetitif ELISA. Kompetitif ELISA kebanyakan digunakan untuk pengukuran antigen melalui kompetitif antara antigen yang tidak berlabel dan yang berlabel pada antibodi yang dilapiskan pada *microplate polystyrol*. Sedang non kompetitif ELISA adalah sistem yang paling banyak digunakan dan dikembangkan karena lebih sensitif,

yang termasuk dalam sistem ini antara lain *direct* (antibodi pertama yang dilabel) ELISA, *indirect* (antibodi kedua yang dilabel) ELISA, jembatan antibodi (antibodi ketiga yang dilabel seperti *peroxidase anti peroksidase / PAP*) (Rantam, 2003).

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.1.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk pembuktian dan pembuatan suspensi kuman *Salmonella pullorum* S - 11 dan Tropical Disease Centre (TDC) Universitas Airlangga untuk pembuatan vaksin protein *Outer Membrane Protein* dan pengujian secara *in vitro*, sedangkan pemeliharaan dilakukan di Jl. Sidosermo PDK V Kav 6 Surabaya.

3.1.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei – Agustus 2005

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : 1) Ayam Ras Petelur Galur *Charoen Phokphand* (CP) 909 yang diperoleh dari Charoen Phokphand, Sidoarjo, 2) Kuman *Salmonella pullorum* S-11 (PUSVETMA) Surabaya, 3) Antigen Pullorum (PUSVETMA) Surabaya, 4) Media selektif

kuman SSA, BSA dan LBB serta PZ steril dan PBS steril (Lab bagian mikrobiologi), 5) Aquadest, kapas, Alkohol 70%, 6) Sub unit protein *Outer Membrane Protein* dan *Adjuvant Freund's Complete* (TDC UNAIR), 7) Bahan pemeriksaan kadar protein dengan *Spectrophotometer* (TDC UNAIR), 8) *Buffer carbonat bicarbonate* (*Buffer coating*), PBS TWEEN 20 (*Buffer washing*), *Buffer incubation*, *Conjugate Hrp - anti chicken Ig G*, Aquadest, substrat, protein *Outer Membrane Protein*, Serum antibodi merupakan bahan – bahan untuk pengukuran titer antibodi dengan metode *indirect ELISA* (TDC UNAIR)

3.2.2 Alat Penelitian

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : 1) Objek glass, ose yang diperlukan untuk pullorum test, 2) Isolasi, identifikasi kuman *Salmonella pullorum* merupakan alat – alat uji bakterologis (Lab Bagian Mikrobiologi), 3) *Shaker incubator* model VRN - 2000 (TDC UNAIR) 4) Isolasi sub unit protein dengan alat sonikator (*Ultrasonic homogenizer*) tipe 4710 series dan sentrifugasi dengan alat *Refrigerated Centrifuge* merek Hitachi, *micro cup*, tabung *ependorf* (TDC UNAIR) 5) Pengukuran kadar protein dengan alat *Spectrophotometer* merek Shimadzu tipe UV, 1601 dan pembuatan vaksin dengan alat *vortex mixer*, tabung *Eppendorf* (TDC UNAIR), 6) Penyuntikan pada ayam dilakukan dengan *spuilt needle 1 cc disposable*, 7) Pengambilan serum dilakukan dengan spuilt 3 cc, tabung reaksi, tabung *Eppendorf*, sentrifugasi 8) Peralatan uji ELISA seperti *Mikroplate*, *Mikropipet*, Timbangan digital, Tabung ukur, *ELISA plate washer*, *ELISA reader Immunommim NJ2300 Japan* (TDC UNAIR).

3.2.3 Teknik Pengambilan Sampel

Ayam ras petelur umur 8 - 10 minggu diambil secara acak sebanyak 15 ekor, masing – masing dilakukan pullorum test, yang menunjukkan hasil negatif dapat dipakai sebagai hewan coba. Selama penelitian pemberian pakan dilakukan secara *ad - libitum* dengan formulasi pakan buatan sendiri (formulasi pakan terdapat dalam lampiran 1).

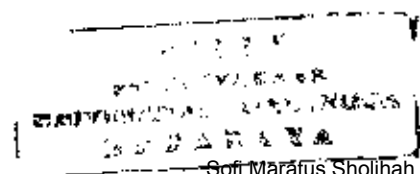
Untuk penelitian ini hewan coba dibagi atas 3 kelompok, masing – masing 5 ekor ayam pada setiap kelompoknya. Kelompok K yaitu kelompok ayam kontrol dengan PZ steril (tanpa perlakuan). Kelompok K₁ yaitu kelompok ayam yang telah diinjeksi oleh *whole bacteri Salmonella pullorum S-11*. Kelompok K₂ diinjeksi vaksin protein *Outer Membrane Protein Salmonella pullorum S-11* pada hari pertama, kemudian dibooster pada hari ke dua puluh satu serta diinjeksi suspensi kuman *Salmonella pullorum S-11* pada hari ke dua puluh delapan.

3.2.4 Variabel Penelitian

- Variabel bebas : hari / waktu pengambilan serum
- Variabel tidak bebas : hasil / jumlah titer antibodi

3.2.5 Parameter dan Analisa data

Pada pengujian secara *in vitro* parameter yang diukur adalah titer antibodi yang dihasilkan pasca pemberian vaksin protein *Outer Membrane Protein* dengan *whole bacteria Salmonella pullorum S-11*. Kemudian dilakukan analisis statistik dengan menggunakan Uji *t - test*.

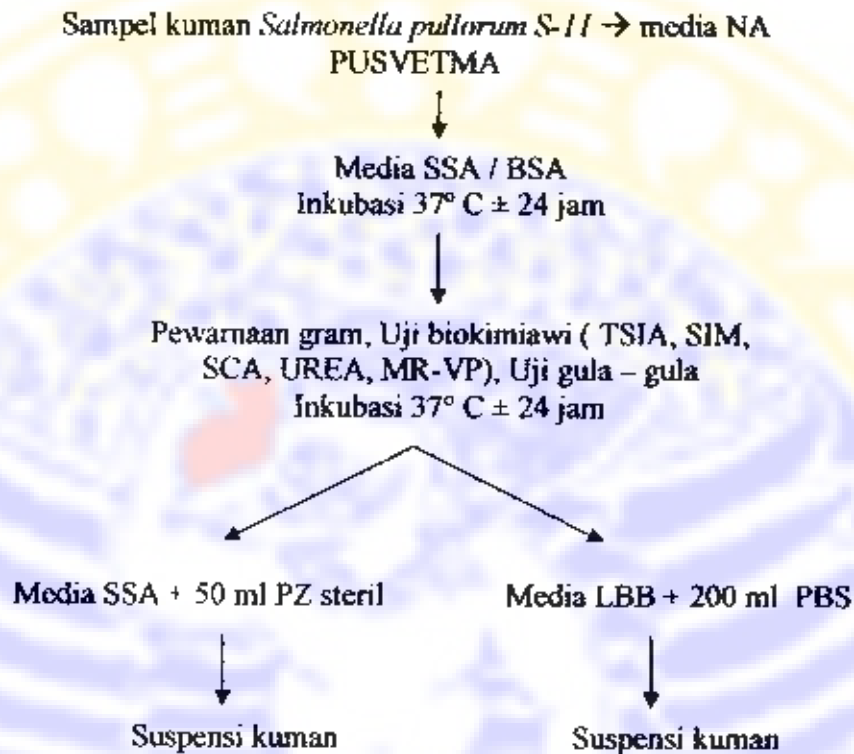


3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dirancang guna mengetahui dan membandingkan titer antibodi yang dihasilkan ayam pasca pemberian vaksin protein *Outer Membrane Protein* yang kemudian dibandingkan dengan ayam yang diinjeksi *whole bacteria Salmonella pullorum S-11*.

3.3.1 Pembuktian Isolat *Salmonella pullorum S-11*

Sampel kuman *Salmonella pullorum S-11* dalam media *Nutrient Agar* (NA) yang berasal dari PUSVETMA ditanam kembali dalam media selektif *Salmonella Shigella Agar* (SSA), dilakukan Pewarnaan Gram dan uji biokimiawi pada *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Sulfit Indol Motility* (SIM), *Urease test*, *Simmons Citrat Agar* (SCA), MR - VP, Uji gula - gula (Glukosa, Laktosa, Maltosa, Mannitol, Sukrosa, Dulsitol). Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada temperatur 37°C, selanjutnya diperiksa hasilnya. Apabila pada pengujian ini tidak menunjukkan penyimpangan dengan *Salmonella pullorum S-11*, maka dapat digunakan menjadi stok kuman dengan ditanam kembali dalam media SSA dan ditambahkan 50 ml PZ steril untuk suspensi kuman dan ditanam kembali dalam media LBB serta ditambahkan 200 ml PBS menjadi suspensi kuman kemudian diisolasi protein *Outer Membrane Protein*. Skema kerja pembuktian isolat kuman terdapat dalam tabel 3.1 berikut ini :

Tabel 3.1 Skema langkah kerja pembuktian kuman *S. pullorum* S-11

3.3.2 Pembuatan suspensi *whole bacteria Salmonella pullorum* S-11

Stok kuman dari media SSA ditambahkan 50 ml PZ steril. Yang kemudian ditera dengan larutan standar Mc Farland yang digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair untuk mengetahui jumlah bakteri permili liter medium dan diharapkan diperoleh kuman sesuai larutan standart Mc Farland 9×10^8 cel / ml.

Urutan kerja pembuatan larutan standar Mc Farland adalah sebagai berikut : Pertama – tama dibuat larutan *Barium Chloride* ($BaCl_2$) 1 % dalam aquades sebanyak 10 ml, kemudian dibuat larutan asam belerang (H_2SO_4) 1% dalam aquades sebanyak 100 ml, kedua larutan tersebut dicampur menjadi satu. Dijelaskan dalam tabel berikut ini pembuatan larutan $BaCl_2$ dan larutan H_2SO_4 dalam berbagai konsentrasi (Anas, 2001).

Tabel 3.2 Perbandingan $BaCl_2$ dan H_2SO_4 untuk mendapatkan larutan standar Mc Farland

Nomor Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$BaCl_2$ (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	0,1
H_2SO_4 (ml)	9,9	9,8	9,7	9,6	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1
Σ kuman /ml ($\times 10^6$)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

3.3.3 Pembuatan vaksin protein *Outer Membrane Protein*

1. Pembuatan suspensi kuman untuk vaksin *Outer Membrane Protein*

Stok kuman pada media SSA ditanamkan pada media *Luria Bethanical Broth* (LBB) yang kemudian ditambahkan *Phospat Buffer Saline* (PBS) dan diinkubasi pada *shaker incubator* pada suhu $37^\circ C$ selama \pm 6 - 7 jam. Kemudian dilakukan isolasi protein OMP dengan metode Matsuyama yang dimodifikasi.

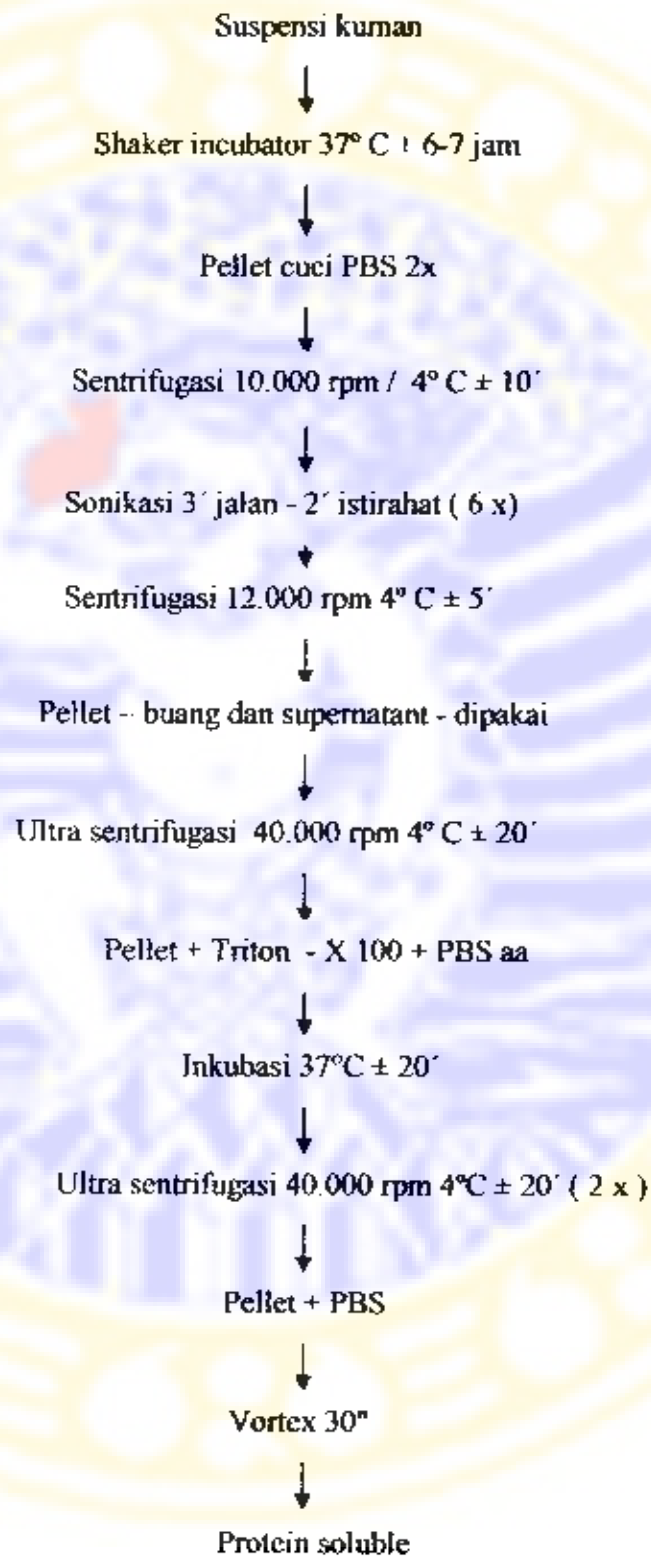
2. Isolasi protein *Outer Membrane Protein Salmonella pullorum S-11*

Isolasi protein *Outer Membrane Protein Salmonella pullorum S-11* dilakukan dengan modifikasi metode Matsujama (Susilohadi, 2003) dengan cara sebagai berikut :

Setelah suspensi kuman diinkubasi dalam *shaker incubator*, Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, endapan / pellet dicuci PBS dua kali dengan cara ditambahkan PBS 3 – 4 ml yang kemudian di vortex sampai pellet hancur atau larut dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000rpm selama 10 menit pada suhu 4°C sehingga didapatkan supernatan dan endapan yang mengandung protein soluble. Supernatan dibuang, endapan dilarutkan dalam 20 ml PBS untuk kemudian disonikasi. Pemakarian tiga menit jalan dan dua menit istirahat dan dilakukan tiga kali.

Setelah dilakukan sonikasi, dilanjutkan dengan sentrifugasi lagi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit dan akan diperoleh endapan (dibuang) dan supernatan, kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan 40.000 rpm selama 20 menit sehingga diperoleh endapan yang kemudian dilarutkan dengan 20 ml 2% *Triton X-100* ditambah PBS sama banyak dan diinkubasi 37°C selama 20 menit.

Kemudian dilakukan sentrifugasi lagi 2 kali dengan kecepatan 40.000 rpm dengan suhu 4°C selama 20 menit. Hasilnya supernatan dibuang, endapan dilarutkan dengan PBS dan dilakukan Vortex selama 30 detik. Larutan ini merupakan protein soluble yang kemudian diukur kadar proteinnya dengan alat spektrophotometer. Skema langkah kerja terdapat dalam tabel 3.3 berikut ini :

Tabel 3.3 Skema langkah kerja Isolasi protein OMP *S. pullorum* S - 11

3. Penambahan suspensi protein *Outer Membrane Protein* dengan *Adjuvant Freund's Complete*

Suspensi protein *Outer Membrane Protein* dicampur dengan *Adjuvant Freund's Complete* dengan perbandingan 1 : 2 yang kemudian di vortex sampai homogen dan menghasilkan vaksin berwarna putih

3.3.4 Perlakuan penelitian

Pengujian secara *in vivo* menggunakan hewan coba ayam yang sehat umur 8 – 10 minggu berjumlah 15 ekor dengan cara sebagai berikut:

1. Persiapan perlakuan

Sebelum perlakuan, hewan coba dilakukan pullorum test teknik *Rapid Whole Blood Test* (RWBT) untuk mendapatkan hewan coba yang negatif terhadap pullorum. Darah ayam diambil dari daerah sayap. Teknik RWBT adalah sebagai berikut :

Pada gelas objek ditetaskan satu tetes antigen dengan memegang pipet tegak lurus, kemudian darah ayam ditetaskan pada gelas obyek yang berisi antigen pullorum sebanyak satu tetes dan diaduk dengan pengaduk kaca sehingga keduanya tercampur sebaik – baiknya. Tunggu sampai dua menit, sambil digoyang – goyangkan secara perlahan – lahan. Penilaian hasil reaksi dimulai sejak selesainya mengaduk campuran serum darah dan antigen sampai dengan dua menit berikutnya. Reaksi negatif terlihat jika campuran tetap homogen, tidak terjadi gumpalan (aglutinasi) hingga waktu dua menit berlalu. Reaksi positif jika terjadi

gumpalan (aglutinasi) yang jelas dengan sekelilingnya bening dan terang maksimum dua menit setelah pengadukan. Reaksi dubius bila reaksi berada antara negatif dan positif, reaksi aglutinasi yang tidak spesifik dengan cairan di sekelilingnya yang tetap keruh (Hagans and Brunners, 1973).

2. Perlakuan Penelitian

a. Penyuntikan kelompok K

Pada kelompok K yang merupakan kelompok kontrol sejumlah 5 ekor ayam dilakukan penyuntikan PZ steril sebanyak 0,5 ml melalui sub kutan (leher).

b. Penyuntikan kelompok K₁

Kemudian dari semua hewan coba negatif pullorum sejumlah 5 ekor ayam (K₁) diinjeksi dengan *whole bacteria Salmonella pullorum S-11*. Injeksi dilakukan bersamaan dengan Kelompok K yaitu kelompok yang diinjeksi PZ steril (kontrol). Injeksi dilakukan melalui sub kutan dengan dosis penyuntikan 0,5 ml setiap ekornya.

c. Penyuntikan kelompok K₂

5 ekor ayam dengan pullorum test negatif (K₂) diinjeksi dengan vaksin protein *Outer Membrane Protein Salmonella pullorum S-11* dan di booster satu kali pada hari ke dua puluh satu, kemudian diinjeksi kuman *Salmonella pullorum S-11* pada hari ke

dua puluh delapan. Penyuntikan dilakukan melalui sub kutan dengan dosis 0,5 ml setiap ekornya.

Dari semua kelompok, dilakukan pengambilan darah melalui vena *axillaris* daerah sayap ayam sebanyak \pm 3 cc yang kemudian diambil serumnya pada hari pertama sebelum perlakuan. Pengambilan serum yang selanjutnya dilakukan pada hari ke tujuh, empat belas, dua puluh satu, dua puluh delapan dan hari ke tiga puluh lima kemudian diukur titer tibodinya dengan metode *indirect* ELISA. Kerangka operasional terdapat dalam lampiran 2 dan langkah kerja *indirect* ELISA terdapat dalam lampiran 3.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1 Data Penelitian

Pencatatan data dari hasil penelitian yang sudah dilakukan adalah sebagai berikut :

Langkah pertama adalah pembuktian kuman *Salmonella pullorum S-11* dengan melakukan pewarnaan Gram, kultur pada media selektif SSA, BSA, uji biokimiawi dan uji gula – gula. Data hasil pengujian sebagaimana Tabel 4.1. Setelah diketahui murni tanpa ada kontaminasi dilanjutkan dengan pembuatan suspensi kuman untuk perlakuan *whole bacteria Salmonella pullorum S-11*. Gambar – gambar media kuman dan uji biokimiawi serta uji gula – gula terdapat pada gambar 4.1 sampai 4.5.

Langkah kedua adalah pembuatan suspensi *whole bacteria Salmonella pullorum S-11* dengan cara kuman *Salmonella pullorum S-11* yang ditanam dalam media SSA ditambahkan 50 ml PZ steril yang kemudian ditera dengan larutan standar Mc Farland. Gambar penyetaraan bakteri *Salmonella pullorum S-11* dengan larutan standar Mc Farland terdapat dalam gambar 4.6.

Langkah ketiga adalah pembuatan suspensi kuman yang digunakan untuk pembuatan vaksin *Outer Membrane Protein* dengan cara kuman *Salmonella pullorum* dalam media SSA ditanamkan dalam media LBB yang kemudian ditambahkan 200 ml PBS dan diinkubasikan dalam *shaker inkubator* pada suhu 37 °C selama 6 – 7 jam. Kemudian dilakukan isolasi protein OMP dari kuman *Salmonella pullorum S - 11* dan pembuatan vaksin OMP *Salmonella*

pullorum S - 11. Diawali dengan memecahkan membran luar dengan sonikator, kemudian mengisolasi protein OMP dan diakhiri perhitungan kadar protein OMP dengan menggunakan alat spektrofotometer. Visualisasi data pada gambar 4.7 dan 4.8. Pada langkah ini diperoleh hasil protein OMP sebanyak 15 ml dengan kadar protein OMP sebanyak 1591,5492 mg / ml. Kemudian dicampur dengan *Adjuvant Freund's Complete* dan diaduk sampai homogen untuk mendapatkan vaksin protein OMP. Visualisasi data pada gambar 4. 9

Langkah kelima adalah pengujian protein spesifik tersebut secara *in vitro* dengan mengukur titer antibodi hewan coba ayam petelur warna coklat galur Charoen Phokpand 909 pasca pemberian vaksin OMP dengan *whole bacteri Salmonella pullorum S-11* menggunakan *indirect ELISA* . Visualisasi data dapat dilihat pada gambar 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 , 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18 dan tabel 4.2, 4.3, 4.4. Analisis data hasil penelitian terdapat dalam lampiran 4.

4.2 Hasil Penelitian

Sesuai dengan penjelasan diatas, maka analisis dan hasil penelitian diuraikan sebagai berikut :

4.2.1 Pembuktian Isolat *Salmonella pullorum S-11*

Untuk pembuktian isolat kuman *Salmonella pullorum S-11*, dilakukan dengan kultur kuman *Salmonella pullorum S-11* yang berasal dari media stok NA (PUSVETMA = Surabaya) kedalam kultur media selektif SSA dan BSA, pewarnaan Gram, juga dilakukan uji biokimiawi pada TSIA, SIM, SCA, Urea test, MR-VP dan uji gula – gula. Hasil pemurnian diuraikan dalam tabel 4.1 berikut ini

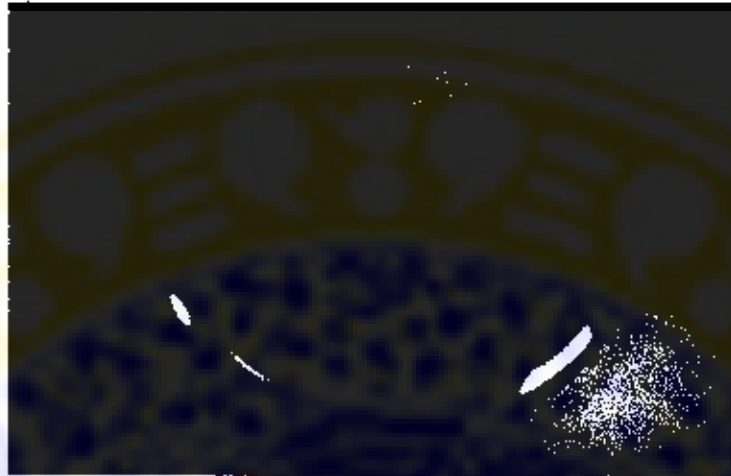
Tabel 4.1 Hasil uji Biokimiawi dan Uji Gula – gula kuman *Salmonella pullorum S-11*

UJI	HASIL
Pewarnaan Gram	Batang, Gram negatif
Media SSA / BSA	Koloni bulat, halus dan tepi rata, colorless, Tampak adanya black spot (sentral)
Uji biokimiawi :	
TSIA	Merah / kuning, ++ (B/A, gas +, H ₂ S +)
SIM	Non motil, Indol - H ₂ S +
Simmons Citrate Agar	Negatif
MR - VP	Negatif, negatif
Urea Test	Negatif
Uji gula - gula :	
Glukosa	Positif
Sukrosa	Negatif
Laktosa	Negatif
Maltosa	Positif
Mannitol, Dulsitol	Positif, Negatif

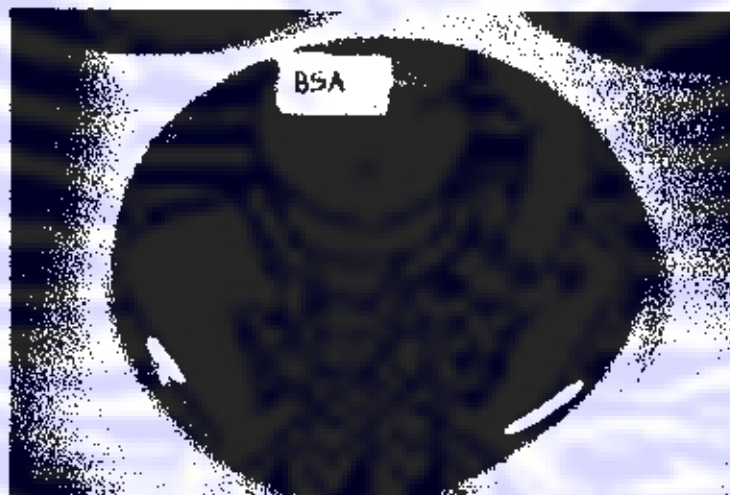


Gb. 4.1 Kuman *S. pullorum* S - 11 media NA (PUSVETMA)

Gambar 4.1 diatas menunjukkan kuman *Salmonella pullorum* S-11 dalam media *Nutrient Agar* yang berasal dari PUSVETMA. Kemudian dilakukan penanaman kembali pada media SSA dan BSA yang termasuk media selektif untuk mengisolasi kuman *Salmonella*. Dari hasil penelitian ini pada media SSA koloni kuman tidak terlihat dengan jelas karena koloni kuman masih kecil. Sedangkan pada media BSA dalam hasil penelitian ini koloni kuman tampak jelas sekali dan dilengkapi dengan adanya warna hitam pada bagian sentral (*black spot*). Hasil penanaman tersebut dapat dilihat dalam gambar 4.2 dan 4.3 berikut ini :



Gb. 4.2 Kuman *S. pullorum S-11* media SSA
(koloni kuman terlihat masih kecil)



Gb. 4.3 (Kuman *S. pullorum S-11* media BSA)

Black spot pada bagian sentral

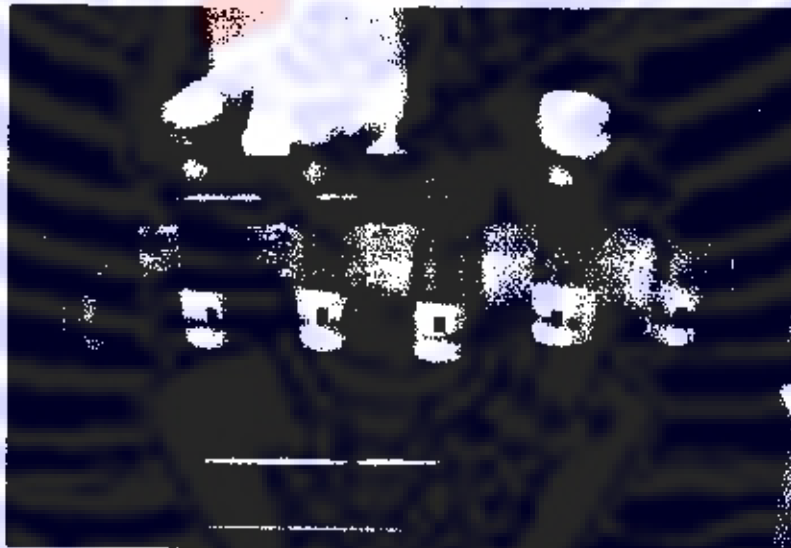
Kemudian dilakukan uji biokimiawi terhadap kuman *Salmonella pullorum* S-11 pada media padat TSIA diperoleh hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya warna merah / kuning dengan H₂S dan gas. Pada media SIM terlihat adanya warna hitam yang menandakan H₂S positif dan Indol negatif serta tidak terdapat pertumbuhan kuman pada tempat tusukan (non motil).

Pada media SCA diperoleh hasil negatif yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada medium. Pada media urea agar menunjukkan hasil negatif, terlihat dengan tidak adanya perubahan warna terhadap medium. Sedangkan pada media MR-VP menunjukkan hasil negatif. Hasil dari uji biokimiawi tersebut, dapat dilihat dalam gambar 4.4 berikut ini :



Gb. 4.4 Uji Biokimiawi *S. pullorum* S-11
(I) TSIA, (II) SIM, (III) SCA, (IV) UREA, (V) MR , (VI) VP

Selain uji biokimiawi , juga dilakukan uji gula – gula terhadap kuman *Salmonella pullorum S-11*. Pada media gula – gula menunjukkan adanya reaksi positif yang ditandai dengan perubahan warna merah menjadi warna kuning yang berarti gula difermentasi dengan menghasilkan asam terhadap glukosa, maltosa, mannitol, dan reaksi negatif yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna (warna merah) terhadap sukrosa dan laktosa. Gambar 4.5 berikut ini menunjukkan hasil uji gula – gula terhadap kuman *Salmonella pullorum S-11*.



Gb 4.5 Uji gula – gula *S. pullorum S-11*
(I) Glukosa, (II) Laktosa, (III) Maltosa, (IV) Mannitol, (V) Sukrosa (VI) Dulcitol

Berdasarkan atas hasil pengujian laboratorium tersebut diatas dapat ditarik kesimpulan bahwa kuman di dalam media tersebut adalah murni dan tidak ada kontaminasi kuman yang lainnya. Dari media SSA ini kemudian diambil koloni kuman murni *Salmonella pullorum S-11* untuk kemudian di kultur kembali pada -

media SSA murni dan dapat dipakai sebagai stok kuman. Hal ini bertujuan agar kuman tersebut benar – benar murni. Dari media stok kuman ini nantinya dibuat suspensi kuman dan digunakan dalam penelitian yang lebih lanjut.

4.2.2 Pembuatan suspensi *whole bacteri Salmonella pullorum S-11*

Hasil dari pembuatan suspensi *whole bacteri Salmonella pullorum S -11* sesuai dengan yang diharapkan yaitu standar Mc Farland III (9×10^8 sel / ml) dengan hasil sebagaimana gambar 4.6. dibawah ini :



Gb 4.6 (I) Standar Mc Farland III dan (II) Suspensi *whole bacteri S. pullorum S-11*

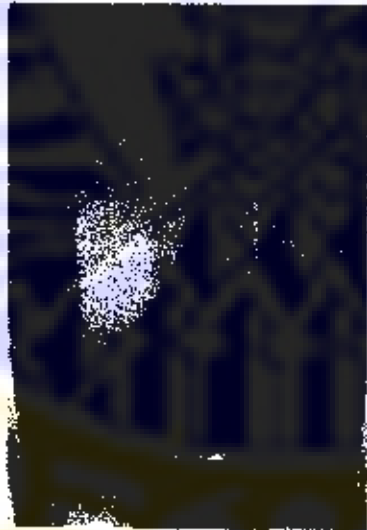
4.2.3 Pembuatan vaksin protein *Outer Membrane Protein*

1. Pembuatan suspensi kuman untuk pembuatan Vaksin OMP

Hasil akhir dari pembuatan suspensi kuman adalah sebanyak 250 ml yang kemudian akan diteruskan dengan mengisolasi protein *Outer Membrane Protein* dari kuman tersebut.

2. Isolasi protein *Outer Membrane Protein Salmonella pullorum S-11*

Dari 250 ml suspensi kuman yang dihasilkan, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada temperatur rendah (dingin) dan akan diperoleh endapan. Kemudian dilanjutkan dengan pemecahan membran melalui sonikasi. Sonikasi dilakukan 3 menit jalan dan 2 menit istirahat diulang sebanyak 6 kali, untuk memecah membran kuman, yang dapat dilihat pada gambar 4.7 berikut ini :



air, es, garam + kuman (tabung)

Gb. 4.7 Sonikasi suspensi kuman untuk memecah membran luar

Hasil analisa penentuan kadar protein OMP menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{Kadar protein / ml} &= \frac{\text{Nilai OD (adsorbent) sampel} \times \text{Konst. BSA}}{\text{Nilai OD standar}} \\ &= \frac{0,565 \times 400}{0,142} \\ &= 1591,5492 \text{ mg / ml} \end{aligned}$$

2. Penambahan suspensi protein *Outer Membrane Protein* dengan adjuvant Freund's complete

Suspensi protein spesifik dicampur dengan *Adjuvant Freund's Complete* dengan perbandingan 1 : 2 yang kemudian di vortex sampai homogen dan menghasilkan vaksin berwarna putih sebanyak 10 ml yang dapat dilihat pada gambar 4.9 berikut ini :



Gb. 4.9 (I) Vaksin OMP berwarna putih dan (II) *Complete Freund's Adjuvant*

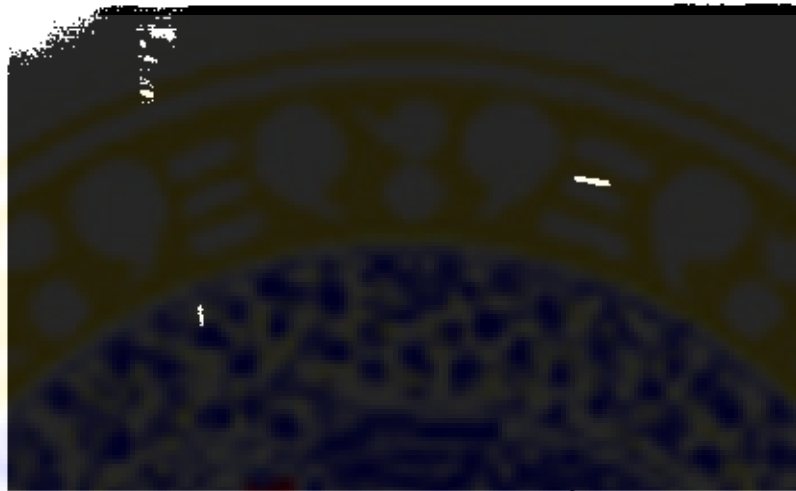
4.2.4 Perlakuan penelitian

Sebagaimana dijelaskan dalam metode penelitian, sebelum dilakukan pengujian pada hewan coba, dilakukan uji pullorum dengan menggunakan tes RWBT (*Rapid Whole Blood Test*). Untuk melaksanakan uji pullorum memerlukan antigen pullorum (*Polyvalent*) dengan komposisi suspensi kuman *Salmonella pullorum* yang diwarnai kristal violet. Penyimpanan antigen ini harus pada suhu 2°C - 8°C (lemari es) dan sebelum pemakaian harus dikocok sampai rata. Antigen pullorum tersebut dapat dilihat dalam gambar 4.11 di bawah ini :



Gb.4.11 Antigen Pullorum (PUSVETMA)

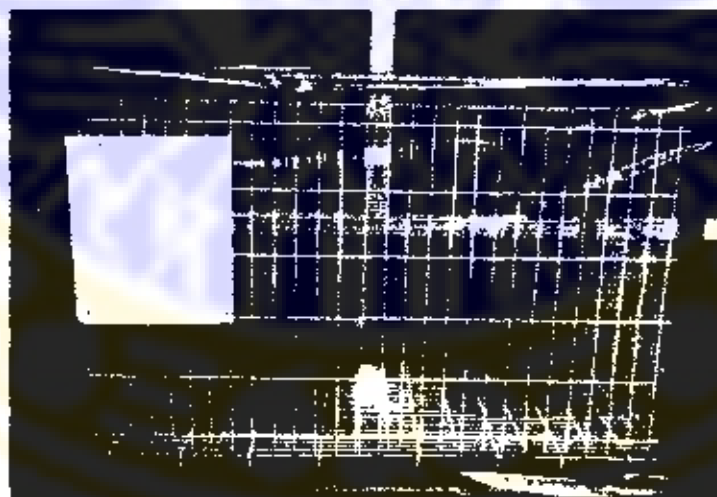
Uji pullorum ini bertujuan sebagai deteksi dini untuk mengetahui apakah ayam tersebut terinfeksi pullorum atau tidak. Dari Uji pullorum ini didapatkan semua hewan coba yang akan digunakan bebas pullorum. Di bawah ini terdapat gambar 4.10 yang menunjukkan hasil uji pullorum negatif :



Gb. 4.11 Uji RWBT

Negatif (tidak terjadi aglutinasi)

Setelah didapatkan hasil negatif dari semua hewan coba setelah uji pullorum, dilakukan penyuntikan pada masing – masing kelompok sesuai dengan yang dijelaskan dalam metode penelitian diatas. Selama perlakuan, hewan coba dipelihara dalam kandang yang dapat dilihat dalam gambar 4.12 di bawah ini :



Gb. 4.12 Salah satu kandang perlakuan (K)

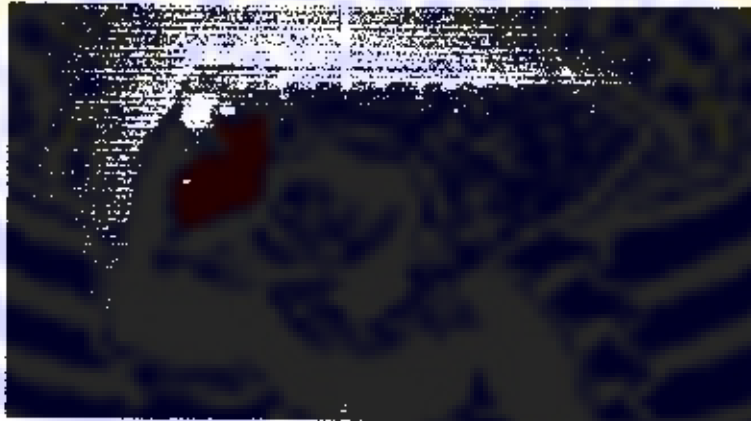
Dari semua perlakuan kemudian diambil serum darah dengan mengambil darah dengan spuit 3 cc setiap hewan coba melalui vena *axillaris* (daerah sayap) yang kemudian disentrifus dengan 1000 rpm atau dibiarkan dalam tabung reaksi dengan keadaan dimiringkan dalam lemari es, yang kemudian disaring serum darahnya dan disimpan dalam *freezer*. Serum diambil pada hari ke pertama sebelum perlakuan dan pada hari ke 7 – 14 – 21 – 28 dan 35 setelah perlakuan.

Kemudian serum tersebut ditera titer antibodinya dengan menggunakan metode *indirect* ELISA. Pada metode ini antibodi dapat dideteksi dengan cara antigen diikat dengan benda padat kemudian ditambahkan antibodi yang pertama yang dicari, kemudian ditambahkan antibodi yang kedua (*conjugate*), dan yang terakhir ditambahkan substrat. Setiap proses penambahan, dilakukan pencucian plat secara otomatis dengan alat plate washer dalam gambar 4.13 berikut ini :



Gb. 4.13 ELISA *plate washer*

Setelah dilakukan penambahan substrat akan menimbulkan warna, akibat bereaksi dengan enzim. Perubahan warna sesuai dengan jumlah enzim yang diikat dan kadar antibodi yang dicari. Gambar 4. 14 berikut ini menggambarkan hasil dari *indirect* ELISA sebelum ditera titer antibodinya.



Gb. 4.15 Hasil Uji *indirect* ELISA

Kemudian dilakukan peneraan kadar antibodi dengan membaca hasil akhir dari *indirect* ELISA menggunakan ELISA *reader* pada filter 405 nm yang dapat dilihat dalam gambar 4.14 berikut ini :



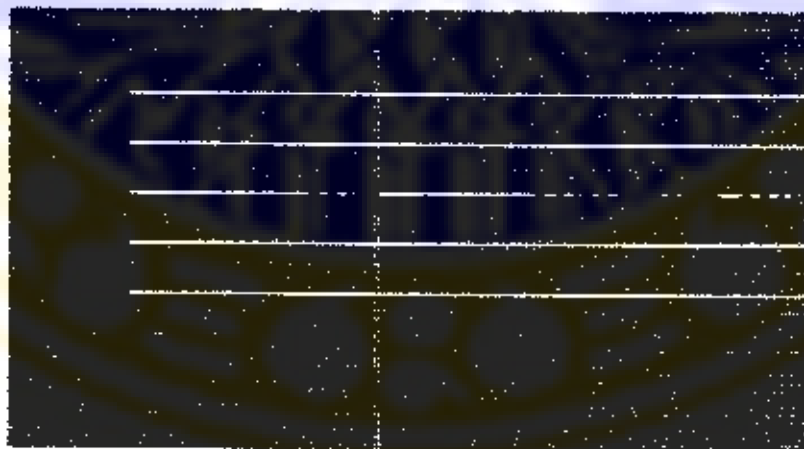
Gb. 4.14 ELISA *reader*

Setelah dilakukan pengukuran nilai OD pada uji *indirect* ELISA terhadap antibodi ayam ras petelur pada kelompok K hanyalah merupakan kelompok pengamatan sebagai pembanding saja terhadap sampel perlakuan. Oleh karena itu yang terlihat angkanya adalah tidak stabil dan tidak berpengaruh terhadap penganalisaan hasil perlakuan. Dapat diabaikan karena hanya sebagai pembanding. Visualisasi data dapat dilihat dalam tabel 4.2 di bawah ini :

Tabel 4.2 Nilai OD ELISA *indirect* antibodi ayam ras petelur pasca penyuntikan PZ steril (kontrol negatif)

Sampel	Titer Antibodi Minggu ke					
	1	2	3	4	5	6
1	0,116	0,125	0,137	0,146	0,142	0,155
2	0,145	0,153	0,143	0,131	0,157	0,134
3	0,127	0,125	0,121	0,149	0,167	0,157
4	0,162	0,181	0,171	0,165	0,143	0,148
5	0,136	0,142	0,135	0,127	0,139	0,127
Rataan	0,1372	0,1452	0,1414	0,1436	0,1496	0,1442

Kenaikan antibodi pada minggu kedua terlihat dengan jelas dalam gambar 4.16 berikut ini :

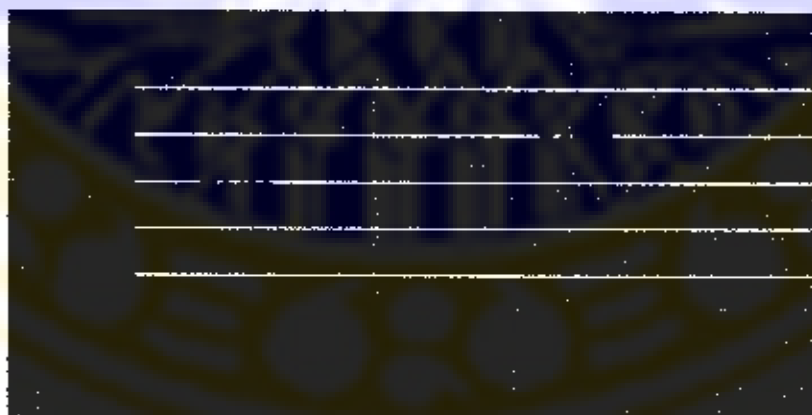


Gb. 4.16 Grafik nilai OD ELISA pada kelompok K

Berbeda dengan kelompok perlakuan yaitu kelompok K₁ dan Kelompok K₂ harus dilakukan analisis supaya dapat diketahui perbedaan titer antibodi yang dihasilkan keduanya. Untuk kelompok K₁ menunjukkan adanya peningkatan titer antibodi pada hari ke tujuh (minggu kedua) sampai dengan minggu keempat dari titer antibodi awal, kemudian terjadi penurunan secara pelan – pelan pada minggu lima dan minggu keenam. Visualisasi data pengukuran OD pada uji ELISA terhadap ayam ras petelur pasca penyuntikan *Whole bacteria Salmonella pullorum S-11* dapat dilihat dalam tabel 4.3 dan gambar 4.17 dibawah ini :

Tabel 4.3 Nilai OD ELISA *indirect* antibodi ayam ras petelur pasca penyuntikan *Whole bacteria Salmonella pullorum S-11*

Sampel	Titer Antibodi Minggu ke					
	1	2	3	4	5	6
1	0,127	0,179	0,189	0,188	0,179	0,178
2	0,139	0,191	0,197	0,2	0,185	0,184
3	0,165	0,184	0,186	0,192	0,181	0,174
4	0,175	0,198	0,199	0,201	0,194	0,181
5	0,108	0,186	0,191	0,195	0,187	0,172
Rataan	0,1428	0,1876	0,1924	0,1952	0,1852	0,1778



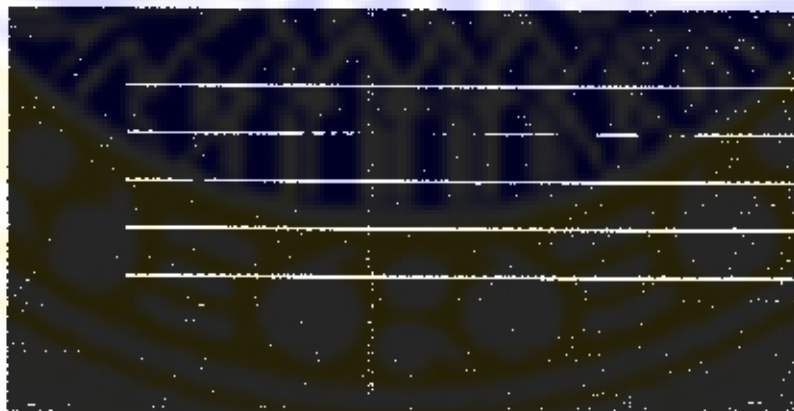
Gb. 4.17 Grafik nilai OD ELISA pada kelompok K₁

Pada kelompok K₂ menunjukkan adanya kenaikan titer antibodi pada hari ke tujuh (minggu kedua) dan minggu ketiga yang kemudian mengalami sedikit penurunan titer antibodi sebelum dilakukan booster pada minggu keempat. Setelah dilakukan booster terlihat sedikit peningkatan titer antibodi pada minggu kelima dan terus meningkat sampai minggu keenam. Visualisasi nilai OD pada uji ELISA terhadap ayam ras petelur pasca penyuntikan vaksin protein OMP dapat dilihat dalam tabel 4.4 berikut ini :

Tabel. 4.4 Nilai OD ELISA *indirect* antibodi ayam ras petelur pasca penyuntikan vaksin OMP

Sampel	Titer Antibodi Minggu ke					
	1	2	3	4	5	6
1	0,122	0,193	0,196	0,189	0,212	0,215
2	0,131	0,199	0,205	0,201	0,199	0,2
3	0,136	0,189	0,198	0,195	0,198	0,202
4	0,157	0,194	0,197	0,185	0,204	0,224
5	0,166	0,196	0,201	0,194	0,227	0,229
Rataan	0,1424	0,1942	0,1994	0,1928	0,208	0,214

Kenaikan antibodi pada minggu kedua terlihat dengan jelas dalam gambar 4.18 berikut ini :



Gb. 4.18 Grafik Nilai OD ELISA pada kelompok K₂

BAB V

PEMBAHASAN

Kuman yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur kuman *Salmonella pullorum S-11* yang diperoleh dari PUSVETMA Surabaya. Strain *Salmonella pullorum* yang dikenal di Indonesia khususnya Jawa Timur adalah strain AV dan strain 11. Menurut informasi dari PUSVETMA, strain AV merupakan strain *Salmonella pullorum* yang tidak ganas (avirulen) dan yang ganas untuk ayam adalah strain 11.

Kuman *Salmonella pullorum S-11* yang diperoleh dari PUSVETMA dalam media Nutrien Agar yang merupakan media sederhana untuk menumbuhkan berbagai kuman baik kuman Gram negatif maupun Gram positif. Untuk itu perlu ditanam kembali pada media selektif SSA selama 24 jam dan diinkubasi pada 37 °C untuk mengisolasi kuman *Salmonella pullorum* dan menghambat pertumbuhan kuman yang lain dengan koloni yang terbentuk halus, bulat, tepi rata dan tidak berwarna serta tembus cahaya (Hitchner, 1980 dan Jakckson dan Simmons, 1981). Sedangkan dalam media selektif BSA terdapat adanya warna hitam (*black spot*) pada bagian sentral (Ernie, dkk, 2002).

Kemudian dilakukan uji biokimiawi pada media TSIA, SIM, SCA, MR-VP dan Uji gula – gula bertujuan untuk mendapatkan kuman yang benar – benar murni karena akan digunakan dalam penelitian ini adalah *Outer Membrane Protein*, yang kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Pada media TSIA

untuk mengetahui apakah kuman tersebut termasuk dalam *family* Enterobacteriaceae yaitu dalam kemampuannya memfermentasi karbohidrat dengan membentuk asam, gas dan H₂S. Dalam penelitian terbukti bahwa *Salmonella pullorum S - 11* pada media TSIA memberikan reaksi perubahan yaitu pada daerah permukaan yang miring berwarna merah (basa), pada daerah yang tegak berwarna kuning (asam), tampak pembentukan H₂S yang ditandai dengan adanya daerah berwarna hitam pada dasar tabung dan juga disertai pembentukan gas yang ditandai dengan pecahnya media / sedikit terangkatnya media pada dasar tabung (Hofstad, *et al*, 1984).

Pada media SIM digunakan untuk mengetahui terbentuknya Sulfid, Indol dan pergerakan kuman. Pada penelitian terbukti terbentuk adanya H₂S dan tidak terdapat bentukan cincin merah pada lapisan atas media yang menandakan tidak terbentuknya indol. Serta tidak terdapat bentukan seperti pohon cemara terbalik, media tidak tampak berkabut yang menunjukkan bahwa kuman *Salmonella pullorum S - 11* non motil (Ernie, 2002). Sedangkan pada media SCA terbukti bahwa kuman tidak menggunakan natrium nitrat sebagai sumber karbon untuk keperluan hidupnya. Pada media urease juga terlihat kuman tidak menghasilkan enzim urease sehingga tidak mampu menguraikan urea.

Pada Uji gula – gula terbukti bahwa kuman dapat memfermentasi glukosa, maltosa dan mannitol sedangkan laktosa, sukrosa dan dulcitol tidak dapat difermentasi (Hagans, 1973).

Berdasarkan uji biokimiawi dan uji gula – gula yang dilakukan dalam penelitian ini tidak terdapat penyimpangan yang spesifik dan telah memenuhi syarat.

Kemudian dari kuman tersebut dipakai sebagai suspensi *whole bacteria Salmonella pullorum S-11*. Berdasarkan kekeruhan kuman yang didapatkan dari suspensi *whole bacteria Salmonella pullorum S-11* sesuai dengan larutan standar Mc Farland III (9×10^8) sel / ml yang merupakan jumlah minimal untuk menginfeksi hewan coba (Anas, 2001).

Pembuatan suspensi kuman yang digunakan untuk pembuatan vaksin *Outer Membrane Protein* ditanamkan dalam media LBB. Menurut Quinn et al, (2002) untuk penelitian di bidang molekuler sebaiknya kuman ditanam dalam media *Luria Brothanical Broth* (LBB).

Kultur kuman dalam PBS selama 7 jam tersebut adalah waktu pertumbuhan kuman yang merupakan faktor penting, karena pada saat tersebut kuman berada pada fase peningkatan pertumbuhan. Hal ini sesuai dengan pendapat Gam (1992) yang menyatakan bahwa pada fase pertumbuhan kondisi kuman baik dan dapat bertambah banyak.

Selain waktu pertumbuhan kuman, salah satu faktor terpenting yang mempengaruhi pertumbuhan kuman dalam media adalah temperatur. *Salmonella pullorum* termasuk bakteri patogen yang dapat tumbuh dengan baik di media buatan dengan suhu 37 °C atau mendekati suhu normal tubuh manusia (Quinn et al, 2002).

Proses selanjutnya sentrifugasi pada temperatur rendah (dingin), hal ini dilakukan untuk mendapatkan kuman yang banyak, setelah disentrifugasi akan diperoleh pellet yang merupakan endapan dari kuman yang kemudian dilakukan pemecahan membran dengan cara sonikasi.

Sonikasi dilakukan 3 menit jalan dan 2 menit istirahat diulang sebanyak 6 kali pada suhu dingin dan direndam dalam es batu dan garam. Pelaksanaan sonikasi memerlukan temperatur dingin karena efek ultrasonikasi menimbulkan panas yang akan berpengaruh terhadap kuman. Temperatur diatur sejak sebelum melakukan sonikasi dengan suhu inkubasi 37°C dan sonikasi antara 2 - 6 °C karena temperatur sangat berpengaruh terhadap kimia sel, membran lipid, lipopolisakarida dan protein membran luar serta virulensinya (Susana, 1992).

Untuk mendapatkan OMP yang benar benar murni dan bukan berasal dari protein sitoplasma kuman, perlu perhitungan cermat pada temperatur, pH dan yang paling penting adalah sentrifugasi dengan kecepatan tinggi (Susana, 1992).

Pada awal proses untuk mendapatkan protein OMP dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm selama 5 menit. Hal ini ditujukan untuk mendapatkan protein murni OMP. Karena berat molekul protein OMP kecil, maka yang dipakai adalah supernatan sedangkan bagian endapan (pellet) merupakan bagian kuman yang mempunyai molekul besar (dibuang) (Gam, 1992).

Hasil akhir dari proses ini adalah protein *Outer Membrane Protein* dalam bentuk suspensi sebanyak 20 ml dengan kadar protein 1591, 5492 mg / ml. Jumlah tersebut dianggap cukup untuk digunakan sebagai bahan dasar vaksin.

Dari suspensi protein OMP dihasilkan vaksin berwarna putih dengan tambahan *Adjuvant Freund's Complete*. Karena vaksin protein OMP merupakan vaksin mati, maka bersifat memerlukan *adjuvant*, mantap dalam penyimpanan tidak mampu bereplikasi di dalam sel tubuh, sehingga cenderung menghasilkan tanggap kebal yang lebih rendah daripada vaksin hidup. Dalam penelitian ini, digunakan *Adjuvant Freund's Complete* yang merupakan emulsi air dalam minyak dan mempunyai efek kuat karena mengandung *Mycobacterium tuberculosis* (Tizard, 1988).

Adjuvant ini berfungsi untuk meningkatkan kekebalan seluler dan humoral, dengan mengaktifasi sel T helper untuk merangsang sel B dalam menghasilkan antibodi (Tizard, 1988).

Perlakuan menggunakan dosis setengah milliliter melalui sub kutan karena sesuai dengan hasil penelitian Susilohadi (2000) bahwa titer antibodi yang dihasilkan pada dosis setengah milliliter tidak berbeda nyata dengan dosis satu milliliter. Dan cara yang terbaik dalam pemberian antigen dalam *Adjuvant Freund's Complete* adalah melalui sub kutan atau intradermal (Tizard, 1988).

Serum darah dari semua hewan coba ditera titer antibodinya dengan metode *indirect* ELISA karena merupakan metode yang sudah banyak digunakan dalam penelitian dan hasilnya lebih spesifik daripada metode *direct* ELISA (Rantam, 2003). Dalam penelitian ini yang dideteksi adalah immunoglobulin G (Ig G), oleh karena itu diperlukan konjugat fragmen immunoglobulin anti G yang disini digunakan konjugat Ig G - Hrp anti *chickens* (Rantam, 2003).

Titer antibodi yang dihasilkan dianalisis menggunakan uji *t - test* karena membandingkan antara dua kelompok dengan keadaan yang sama dan diambil secara acak (Bambang, 1997). Dalam penelitian ini yaitu membandingkan titer antibodi yang dihasilkan pasca pemberian vaksin protein OMP (kelompok K₂) dengan *whole bacteria Salmonella pullorum S-11* (Kelompok K₁). Pada kelompok K (kontrol) dapat diabaikan, karena hanya sebagai pembanding. Berdasarkan hasil analisis data, menunjukkan bahwa pada minggu pertama kelompok K₁ dan K₂ sebelum perlakuan belum menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Perbedaan mulai terlihat pada minggu kedua, tepatnya tujuh hari setelah perlakuan, namun perbedaan itu tidak begitu nyata (lebih kecil daripada tabel T_{0.01}). Kenaikan titer antibodi pada kelompok K₁ disebabkan adanya infeksi penyakit pullorum yang dapat merangsang reaksi tubuh dan memicu respon imun untuk membentuk antibodi (Rantam, 2003). Pada kelompok K₂ kenaikan titer antibodi disebabkan vaksinasi yang dapat menginduksi sel memori untuk membentuk respon imun (Efrizanti, 2004). Hal ini berarti juga terdapat proses pembentukan antibodi yang merupakan bagian respon imun dari ayam dalam menanggapi antigen yang diimunisasikan, dalam hal ini adalah protein OMP. Adapun proses diawali dengan penangkapan *Antigen Presenting Cell* (APC) yang merupakan bagian dari makrofag untuk dipresentasikan kepada sel limfosit dalam bentuk yang dikenalnya (Baratawidjaja, 2000). Hal ini dijelaskan juga oleh Samik (1993) bahwa antibodi dibentuk oleh tubuh sebagai respon terhadap antigen yang homolog dan

akan menjadi lebih banyak sesuai dengan rangsangan yang ditimbulkan oleh antigen. Perbedaan ini berlangsung sampai dengan minggu ketiga.

Pada minggu keempat tidak terdapat perbedaan nyata (lebih kecil dari t tabel $_{0,05}$ dan $_{0,01}$), karena pada kelompok K₂ titer antibodi sudah mengalami penurunan respon imun secara perlahan. Hal ini menandakan bahwa vaksin bekerja menstimulasi kekebalan dengan memproduksi antibodi sampai antigen yang berasal dari vaksin hilang dari dalam tubuh. Secara alami, antibodi akan turun seiring dengan waktu, dan karena itulah perlu dilakukan adanya booster / pengulangan vaksin (Efrizanti, 2004). Selain itu, sifat imunitas protein sangat berkaitan dengan tingkat keasingan protein terhadap hospes, kelarutan, berat molekul dan konsentrasi protein. Maka dari itu respon imun terhadap antigen juga sangat tergantung pada hal – hal tersebut diatas (Ilham, 2000).

Pada minggu kelima terdapat perbedaan nyata kembali (lebih besar dari Ttabel $_{0,05}$ dan $_{0,01}$), karena pada kelompok K₂ terjadi kenaikan titer antibodi, sebagai akibat adanya booster. Pemberian booster atau vaksinasi berulang pada waktu yang tepat digunakan untuk meningkatkan konsentrasi antibodi dengan segera, sehingga didapatkan *high level antibody* pada waktu yang cukup lama (Efrizanti, 2004). Imunisasi secara berulang dengan selang waktu tertentu akan meningkatkan respon imun suatu individu. Penyuntikan suatu molekul antigen berarti akan menstimulir sejumlah klon limfosit B yang spesifik terhadap antigen determinan dari molekul tersebut yang menyebabkan masing – masing sel akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi intunoblast dan

sentroblast. Imunoblast akan berkembang menjadi limfoblast dan determinasi menjadi sel plasma yang tidak membelah lagi sebagai pabrik antibodi. Sentroblast akan menjadi sel memori yang dapat meningkatkan respon imun pada kontak berikutnya dengan antigen yang sama (Baratawidjaja, 2000).

Pada minggu keenam, juga terdapat perbedaan yang nyata karena pada kelompok K₂ mengalami kenaikan titer antibodi sebagai akibat infeksi pullorum. Dijelaskan Efrizanti (2004) bahwa vaksinasi bekerja menginduksi sel memori sehingga respon imun akan bergerak naik dengan cepat jika terjadi kontak dengan agen infeksius.

Namun, protein *Outer Membrane Protein* dari kuman *Salmonella pullorum* S - 11 yang sebagai bahan dasar vaksin dengan pemberian satu kali booster kurang protektif karena belum dapat menimbulkan antibodi dengan titer tinggi. Menurut Harlow (1988) kenaikan titer antibodi dengan nilai 2,5 sampai 3 kali kontrol baru bisa dikatakan cukup baik titer antibodinya. Sedangkan dalam penelitian ini, kenaikan titer antibodi tidak sampai 1,5 kali dari kelompok kontrol maupun kelompok K₁. Faktor lain yang mempengaruhi titer antibodi diantaranya adalah kualitas antigen yang digunakan, rute aplikasi, dosis protein, jumlah dan interval imunisasi. Sehingga perlu diberi tambahan booster yang dapat meningkatkan titer antibodi lebih lama (Efrizanti, 2004).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan atas data hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Protein *Outer Membrane Protein* dari kuman *Salmonella pullorum S-11* yang sebagai bahan dasar vaksin dengan pemberian satu kali booster bersifat kurang protektif karena belum dapat menimbulkan antibodi dengan titer tinggi .
2. Perbandingan titer antibodi ayam pasca pemberian vaksin protein OMP dan *whole bacteria Salmonella pullorum S-11* belum memberikan perbedaan yang signifikan.

6.2 Saran

Sesuai dengan hasil penelitian dan kesimpulan atas penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disarankan sebagai berikut :

1. Pemberian protein OMP sebagai vaksin mungkin akan lebih baik jika dilakukan booster / pengulangan yang lebih dari dua kali. Dengan pemberian booster lebih dari dua kali diharapkan timbul respon imun dengan titer tinggi yang dapat bersifat protektif.

RINGKASAN

SOFI MARATUS SHOLJHAH. Penelitian dengan judul “Perbandingan titer antibodi ayam ras petelur pasca pemberian vaksin protein *Outer Membrane Protein* dengan *whole bacteria Salmonella pullorum S-11*” di bawah bimbingan Dr. Susilohadi Widjajanto, MS., Drh selaku dosen pembimbing pertama skripsi dan Dr. Hardijanto, MS., Drh selaku pembimbing kedua. Penelitian ini bertujuan guna mengetahui dan membandingkan titer antibodi yang terbentuk pada ayam ras petelur pasca pemberian vaksin protein *Outer Membrane Protein* dan *whole bacteria Salmonella pullorum S-11*.

Pullorum merupakan salah satu penyakit yang menyerang bangsa unggas termasuk ayam dan di Indonesia tersebar luas, dikenal sejak tahun 1950 dengan nama Penyakit Berak Kapur (*Bacillary White Diarrhoe*). Penularan penyakit pullorum dapat terjadi secara vertikal maupun horisontal. Penularan secara vertikal yaitu penularan dari induk penderita ke anak ayam melalui telur yang mengandung *Salmonella pullorum*. Penularan secara horisontal yaitu penularan dari hewan penderita ke hewan lainnya misalnya pada mesin tetas, melalui oral ataupun melalui peralatan, misalnya alat seksing dan alat pemotong paruh. Upaya pengobatan terhadap penyakit pullorum dengan antibiotika belum memuaskan hasilnya, sedangkan pencegahan dengan pemberian vaksin belum pernah dilakukan di Indonesia.

Penelitian menggunakan hewan percobaan sebanyak 15 ekor ayam ras betina tipe petelur galur CP 909 berumur delapan sampai sepuluh minggu dibagi menjadi tiga kelompok secara acak. Selama percobaan ayam tersebut diberi formulasi pakan buatan sendiri. Kelompok K tanpa perlakuan (kontrol) hanya diinjeksi PZ steril, Kelompok K₁ diinjeksi dengan *whole bacteria Salmonella pullorum S-11*, Kelompok K₂ diinjeksi dengan vaksin protein *Outer Membrane Protein* dan di booster kembali pada minggu ke tiga, kemudian pada minggu keempat diinjeksi kuman *Salmonella pullorum S-11*. Penyuntikan perlakuan dilakukan secara sub kutan daerah leher dengan dosis masing – masing satu milliliter setiap ekor. Pengukuran titer antibodi dilakukan pada hari ke pertama sebelum perlakuan, selanjutnya pada hari ke tujuh, empat belas, dua puluh satu, dua puluh delapan dan pada hari ke tiga puluh lima, dengan metode *indirect ELISA*. Penelitian ini dianalisis menggunakan Uji *t - test*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer antibodi yang dihasilkan ayam ras petelur pasca penyuntikan vaksin *Outer Membrane Protein* dengan satu kali booster belum menunjukkan perbedaan yang signifikan pada titer antibodi ayam ras petelur pasca penyuntikan *whole bacteria Salmonella pullorum S -11*. Hal ini menunjukkan protein *Outer Membrane Protein* dari kuman *Salmonella pullorum S - 11* yang sebagai bahan dasar vaksin dengan pemberian satu kali booster bersifat antigenik kurang protektif karena belum dapat menimbulkan antibodi dengan titer tinggi .

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka perlu dilakukan penelitian yang sama dengan booster lebih dari dua kali . Dengan pemberian booster lebih dari dua kali diharapkan timbul respon imun dengan titer tinggi yang dapat bersifat protektif.

DAFTAR PUSTAKA

- Anas.F. 2001. Uji Kemampuan Perasan Bawang Putih (*Allium Sativum*) dalam Menghambat dan Membunuh Bakteri *E.coli* Secara In Vitro. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Anonimus. 1981. Pedoman Pengendalian Penyakit Menular Jilid I. Cetakan 2 Dit.Kes.Wan. Direktorat Jendral Peternakan
- Ay Ling. 1998. Penentuan LD50 dan ID50 *Salmonella Pullorum* pada Anak Ayam Petelur yang Diinfeksi Secara Oral dan Pengaruhnya Terhadap Gambaran Patologi Anatomi. Skripsi . Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Akoso,B.T.1993. Manual Kesehatan Unggas Cetakan pertama. Kanisius. Yogyakarta
- Bambang,S. 1997. Statistik Terapan (Dalam Penelitian dan Pendidikan). PT.Rineka Cipta. Jakarta
- Baratawidjaja, G.K, 2002. Imunisasi Dasar. Edisi kelima. Balai penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Bellanti, 1985. Introduction to Immunology III. Shain Saunders Edition. Saunders company. Philadelphia. London
- Cappucino.J.G. and N. Sherman. 1985. Microbiology a Laboratory Manual. 2nd edition. Addison Wesley. Publishing Company. Inc. Canada.
- Darrel W.Trampel, D.V.M., 2001 Pullorum Disease. IOWA State University. Oktober 16, 2001. www. pullorum.com
- Efrizanti. 2004. Mengoptimalisasi Program Vaksinasi Poultry Indonesia edisi Maret 2004
- Ernie .S.I, Didik.H dan Wiwiek .T., 2002 Penuntun Praktikum Mikrobiologi Veteriner I. Program SI. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
- Gam Lay Harn.1992. Antibodi Respons to Bacterial Outer Membrane and Flagellar Protein in Typhoid Fever. Thesis Submitted to Institute of Advanced Studies. University of Malaya. Kuala Lumpur.

- Gan, V.H.S dan Handoko, T. 1987. *Imunosupresan dalam Farmakologi dan Terapi*. Edisi 3. Bagian Farmakologi UI. Jakarta.
- Gordon, R.F and Jordan, F.T. 1982, *Poultry disease 2nd ED*. The Animal Health Trust Balliere Tinddi London
- Hagans. W. and Bruners. D.W.1973. *Infectious Diseases of Domestic Animal 6. ED*. Comstock Publishing Associated Cornell University Press. Ithica. London
- Handijatno, D.1990. *Evaluasi Hasil Vaksinasi Salmonella pullorum pada Ayam*. Tesis . Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
- Harlow, E.D. and L.David. 1988. *Antibodies a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory. United State of America.
- Hitchner, S.B. Dommermeth. C.H, Purchase and Williams. J.E. 1980. *Isolation and Identifications Avian Pathogens*. Creative Printing Company, Inc Zoll and East Main Street. Endwell, New York.
- Hofstad, MS, B.W., C.P. Helmboh, W.M. Reid and Yonder. 1984. *Diseases of Poultry 8th edition*. The Jowa State University Press. Ames Jowa. USA
- Indah, Y.P, Liliana. K, Basundari, S.U dan Roswita . Z 1987. *Imunitas Seluler pada Neonatus dan Ibunya*. Medika 8
- Jakson. C.A.W and Simmons. G.C 1981. *Standard Diagnostic Tehnique for Pullorum Disease*. 1st Ed. The Australian Bureau of Animal Health Australia
- Jawetz. E., Melinck, J.L and Adeiberg, E.A. 1978. *Review of Medical Microbiology*. 14th Edition. Lange Medical Publications. Los Altas, California
- Merchant. I.A. and R.A. Packer. 1984. *Veterinary Bacteriology and Virology 14 th. Ed*. The Iowa State University Press. Ames Iowa. USA
- Ilham. A.M 2005. *Perbedaan Titer Antibodi Brucella abortus S-19 Inaktif dan Brucella abortus S-19 Aktif pada Mencit (Mus musculus) dengan Indirect ELISA*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Murtidjo, B.A, 1992. *Pengendalian Hama dan Penyakit Ayam*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta

- Mustafa, A. 1992. *Diagnosis of Avian Diseases*. Asean Poultry Diseases Research and Training Project. Veterinary Research Institute. Ipoh, Malaysia
- Parkhurst, C.R and Mouthney G.J, 1988 *Poultry Egg Production*. Chapman and all. New York.
- Quinn, P.J, B.K Markey., Mc, Carter, W.J. Dundly and F.C Leonard. 2002 *Veterinary Microbiology and Microbial disease* by Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company.
- Rantam, F.A, 2003. *Metode Immunologi*. Cetakan pertama. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Ressang, A.A. 1984. *Patologi Khusus Veterier*. Percetakan Bali. Denpasar.
- Samik, W.A. 1993. *Imunologi III*. Cetakan pertama. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Susana Merino, Silvia Camprubi and Juan M.Thomas. 1992. Effect of Growth Temperature on Outer Membrane Components and Virulence of *Aeromonas hydrophila* Strains of Serotype O : 34. *J infections and immunity*. Oct.
- Susilohadi W, Sadik, A dan F.A. Rantam. 2000. *Studi Awal Uji Laboratories Pembuatan Vaksin In Aktif *S.pullorum* dengan Pengukuran Titer Antibodi Post Vaksinal*. Laporan Penelitian Lembaga Penelitian Univrsitas Airlangga.
- Susilohadi, 2003. *Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunogenik *Salmonella pullorum* Sebagai Alternatif Bahan Vaksin Sub Unit*. Disertasi Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Sudaryani, T dan Santosa, H. 1997. *Pemeliharaan Ayam Ras Petelur Kandang Baterai*. Cetakan ketujuh. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Sudaryani, T dan Santosa, H. 2003. *Kualitas Telur*. Cetakan keempat, Penebar Swadaya Jakarta.
- Suwarno, Rahayu, E, Adi.P.R, Nanik, S, Jola.R, Rantam A.F 2003. *Prinsip Dasar, Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji ELISA*. Laboratorium Virologi dan Immunologi Fakultas Kedokteran Hewan.
- Tabbu, C.R. 2000. *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya – Volume 1*, Cetakan pertama. Kanisius. Yogyakarta.

Tizard.1988 Pengantar Immunology Veteriner, Edisi 2. Airlangga University Press. Surabaya.

Whiteman, C.E. and Bickford.A.A 1997. Avian Disease Manual. 3rd E American Association of Avian Pathologist. Kendall / Hunt Publishing Company. Iowa

Wolfgang, K.J, Willet H.P, Amos.D.D and Whilfeed C.M. 1992. Zinsser Microbiology. 19th Ed. Prentice Hall International Inc. Appleton and Lange. USA

LAMPIRAN

Lampiran 1.

FORMULASI PAKAN AYAM PETELUR

Formulasi pakan ayam petelur :

1. Konsentrat buatan sendiri 30%
2. Jagung giling 40%
3. Bekatul 30%

→ Konsentrat buatan sendiri terdiri dari :

1. Bungkil Kedelai 30%
2. Bungkil Kelapa 17,5%
3. Tepung daun lamtoro 1,1%
4. Tepung ikan 39,4%
5. Mineral mix 9,5%
6. Vitamin B-12 2,5%

Perhitungan	Kandungan protein	Jumlah bahan
Bungkil Kedelai	6,15	30
Bungkil Kelapa	5,19	17,5
Mineral Mix	-	9,5
Vitamin B-12	-	2,5
Jumlah	12,06	59,5

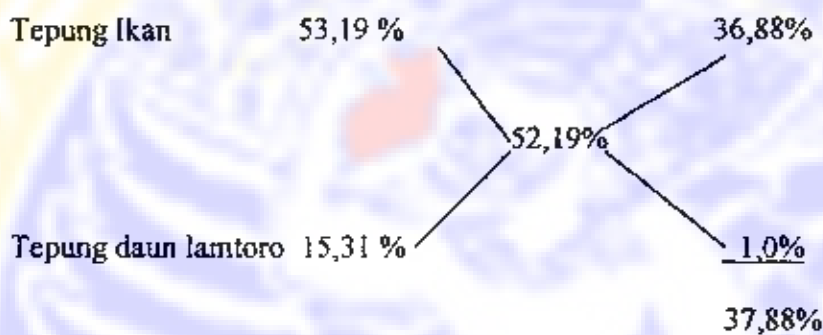
Dari hitungan tersebut diketahui kekurangan bahan :

$$\text{Kekurangan} = 100 - 59,5 = 40,5$$

$$\text{Kekurangan jumlah protein} = 33,2 - 12,06 = 21,14$$

$$\% \text{ Kekurangan} = \frac{21,14}{40,5} \times 100\% = 52,19\%$$

Kekurangan dipenuhi Tepung ikan dan Tepung daun lamtoro



Jadi :

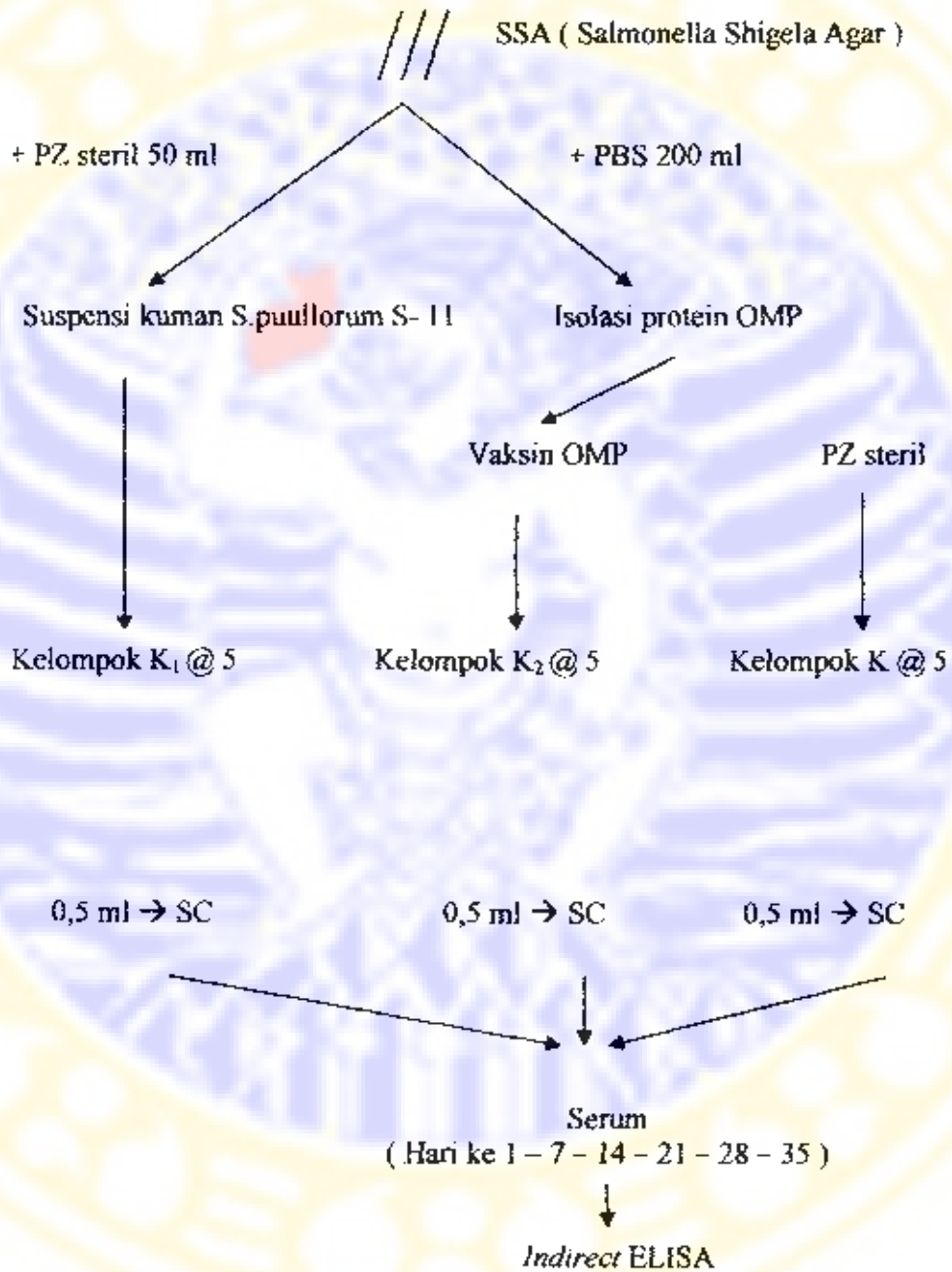
$$\text{Jumlah Tepung ikan yang dibutuhkan} = \frac{36,88}{37,88} \times 100\% = 39,4\%$$

$$\text{Tepung daun lamtoro yang dibutuhkan} = \frac{1,0}{37,88} \times 100\% = 1,1\%$$

Lampiran 2.

KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN

Perlakuan penelitian



Lampiran 3

Cara kerja *indirect* ELISA :

1. Koating antigen dengan cara menambahkan larutan antigen 100 ul (1 : 32 artinya 0,02 ul antigen diencerkan dengan 6,4 larutan *coating buffer* / plat).
Kedalam setiap lubang plat mulai lubang B2 sampai G11. Kocok dengan mikrosaker kemudian diinkubasi dengan keadaan dibungkus aluminium foil selama 24 jam temperatur 4°C.
2. Pencucian, plat dicuci 3 x dengan larutan PBS masing – masing 2 menit. Pencucian dapat dilakukan secara manual atau otomatis dengan alat *plate washer*.
3. Penambahan serum, serum diencerkan 1 : 20 dalam Pbuffer (5 ul serum diencerkan 100 ul PBS/ plat). Kemudian tambahkan kedalam setiap lubang (kecuali lubang kontrol) yang mengandung antigen. Kocok dengan *shaker* selama 30 detik dengan kecepatan 6,0 dan inkubasi selama 1 jam temperatur 37°C.
4. Blank, ditempatkan pada lubang nomor 1 yang diisi pelarut (PBS), konjugat dan substrat. Ini dilakukan untuk mengetahui apakah pengujian berjalan dengan baik.
5. Penambahan serum kontrol negatif dan positif, tambahkan 100 ul serum pengenceran 1 : 20 kedalam lubang B2; 1 :40 kedalam lubang C2; 1: 80 kedalam lubang D2; 1: 160 kedalam lubang E2; 1: 320 kedalam lubang F2. Sedangkan 1 : 640 dimasukkan dalam lubang G2, B3, C3 dan D4.

6. Pencucian, plat dicuci 3 x dengan larutan PBS dengan cara seperti diatas.
7. Penambahan konjugat IgG - HRP, tambahkan 50 ul konjugat (1: 3000) pada setiap lubang plat. Plat dikocok dengan *mikroshaker* selama 30 detik dengan kecepatan 6,0, kemudian diinkubasi selama 1 jam temperatur 37°C.
8. Pencucian, plat dicuci 3 x kali dengan cara seperti diatas.
9. Penambahan substrat, tambahkan 100 ul larutan substrat kedalam setiap lubang plat, dikocok 30 detik kecepatan 6,0 inkubasi 37°C.
10. Hasil reaksi diperiksa dengan ELISA *reader* menggunakan filter 405 nm.

Lampiran 4

Analisis data hasil penelitian dengan Uji T - test

1. Minggu pertama

Sampel	Titer Ab	Titer Ab	D	D ²
	K ₁	K ₂	Beda skor	Kuadrat beda skor
1	0,127	0,122	0,005	0,000025
2	0,139	0,131	0,008	0,000064
3	0,165	0,136	0,029	0,000841
4	0,175	0,157	0,018	0,000324
5	0,108	0,166	-0,058	0,003364
Total	0,714	0,712	0,002	0,0046
Rataan	0,1428	0,1424		

$$\text{Rata " K}_1 = 0,1428$$

$$\text{Rata " K}_2 = 0,1424$$

$$\Sigma D = 0,002$$

$$\Sigma D^2 = 0,0046$$

$$N = 5$$

$$t = \frac{K_1 - K_2}{\sqrt{\frac{\Sigma D - \Sigma D^2 / N}{N(N-1)}}$$

$$t = \frac{0,1428 - 0,1424}{\sqrt{\frac{0,0046 - (0,002)^2 / 5}{5(5-1)}}$$

$$t = \frac{0,0004}{0,015}$$

$$t = 0,03$$

Dengan $db = N - 1 = 5 - 1 = 4$

Dalam tabel t untuk taraf kepercayaan 95 % diperoleh 2,776 dan untuk selang taraf kepercayaan 99 % diperoleh 4,604. Jika hasil $t = 0,03$, maka harga t jauh lebih kecil daripada t tabel, maka hipotesisnya nihil diterima.

2. Minggu Kedua

Sampel	Titer Ab K1	Titer Ab K2	D Beda skor	D ² Kuadrat beda skor
1	0,179	0,193	-0,014	0,000196
2	0,191	0,199	-0,008	0,000064
3	0,184	0,189	-0,005	0,000025
4	0,190	0,194	-0,004	0,000016
5	0,186	0,196	-0,01	0,0001
Total	0,930	0,971	0,041	0,0004
Rataan	0,1860	0,1942		

$$\text{Rata " K}_1 = 0,1860$$

$$\text{Rata " K}_2 = 0,1942$$

$$\Sigma D = 0,041$$

$$\Sigma D^2 = 0,0004$$

$$N = 5$$

$$t = \frac{K_1 - K_2}{\sqrt{\frac{\Sigma D - \Sigma D^2 / N}{N(N-1)}}$$

$$t = \frac{0,1860 - 0,1942}{\sqrt{\frac{0,0004 - (0,041)^2 / 5}{5(5-1)}}$$

$$t = \frac{0,008}{0,002}$$

$$t = 4^*$$

Dengan $db = N - 1 = 5 - 1 = 4$

Dalam tabel t untuk taraf kepercayaan 95 % diperoleh 2,776 dan untuk selang taraf kepercayaan 99 % diperoleh 4,604. Jika hasil $t = 4$ maka harga t lebih besar daripada t tabel, maka hipotesisnya nihil ditolak.

3. Minggu ketiga

Sampel	Titer Ab	Titer Ab	D	D ²
	K1	K2	Beda skor	Kuadrat beda skor
1	0,189	0,196	-0,007	0,000049
2	0,197	0,205	-0,008	0,000064
3	0,186	0,198	-0,012	0,000144
4	0,199	0,197	0,002	0,000004
5	0,191	0,201	-0,01	0,0001
Total	0,962	0,997	0,035	0,00036
Rataan	0,1924	0,1994		

$$\text{Rata " } K_1 = 0,1924$$

$$\text{Rata " } K_2 = 0,1994$$

$$\Sigma D = 0,035$$

$$\Sigma D^2 = 0,00036$$

$$N = 5$$

$$t = \frac{K_1 - K_2}{\frac{\sqrt{\Sigma D - \Sigma D^2 / N}}{N(N-1)}}$$

$$t = \frac{0,1942 - 0,1994}{\frac{\sqrt{0,00036 - (0,035)^2/5}}{5(5-1)}}$$

$$t = \frac{0,007}{0,0024}$$

$$t = 2,9^*$$

Dengan $db = N - 1 = 5 - 1 = 4$

Dalam tabel t untuk taraf kepercayaan 95 % diperoleh 2,776 dan untuk selang taraf kepercayaan 99 % diperoleh 4,604. Jika hasil $t = 2,9$ maka harga t lebih kecil daripada t tabel, maka hipotesisnya nihil ditolak.

4. Minggu keempat

Sampel	Titer Ab	Titer Ab	D	D ²
	K1	K2	Beda skor	Kuadrat beda skor
1	188	0,189	-0,001	0,000001
2	0,2	0,201	-0,001	0,000001
3	0,192	0,195	-0,003	0,000009
4	0,201	0,185	0,016	0,000256
5	0,195	0,194	0,001	0,000001
Total	0,976	0,964	0,012	0,000258
Rataan	0,1952	0,1928		

$$\text{Rata " K}_1 = 0,1952$$

$$\text{Rata " K}_2 = 0,1928$$

$$\Sigma D = 0,012$$

$$\Sigma D^2 = 0,000258$$

$$N = 5$$

$$t = \frac{K_1 - K_2}{\sqrt{\frac{\sum D - \sum D^2 / N}{N(N-1)}}$$

$$t = \frac{0,1952 - 0,1928}{\sqrt{\frac{0,000258 - (0,012)^2/5}{5(5-1)}}$$

$$t = \frac{0,0024}{0,0035}$$

$$t = 0,7$$

Dengan db = N - 1 = 5-1 = 4

Dalam tabel t untuk taraf kepercayaan 95 % diperoleh 2,776 dan untuk selang taraf kepercayaan 99 % diperoleh 4,604. Jika hasil t = 0,7 maka harga t jauh lebih kecil daripada t tabel, maka hipotesisnya nihil diterima.

5. Minggu kelima

Sampel	Titer Ab	Titer Ab	D	D ²
	K1	K2	Beda skor	Kuadrat beda skor
1	0,179	0,212	-0,033	0,001
2	0,185	0,199	-0,014	0,000196
3	0,181	0,198	-0,017	0,000289
4	0,194	0,204	-0,01	0,0001
5	0,187	0,227	-0,04	0,0016
Total	0,926	1,04	0,114	0,0032
Rataan	0,1852	0,208		

Rata " K₁ = 0,1852

Rata " K₂ = 0,208

ΣD = 0,114

ΣD² = 0,0032

$$N = 5$$

$$t = \frac{K_1 - K_2}{\sqrt{\frac{\sum D - \sum D^2 / N}{N(N-1)}}$$

$$t = \frac{0,1852 - 0,208}{\sqrt{\frac{0,0032 - (0,114)^2/5}{5(5-1)}}$$

$$t = \frac{0,023}{0,0045}$$

$$t = 5,1^{**}$$

Dengan db = N - 1 = 5-1 = 4

Dalam tabel t untuk taraf kepercayaan 95 % diperoleh 2,776 dan untuk selang taraf kepercayaan 99 % diperoleh 4,604. Jika hasil t = 5,1 maka harga t jauh lebih besar daripada t tabel, maka hipotesisnya nihil ditolak.

6. Minggu keenam

Sampel	Titer Ab	Titer Ab	D	D ²
	K1	K2	Beda skor	Kuadrat beda skor
1	0,178	0,215	-0,037	0,001369
2	0,184	0,2	-0,016	0,000256
3	0,174	0,202	-0,028	0,000784
4	0,181	0,224	-0,043	0,001846
5	0,172	0,229	-0,057	0,003249
Total	0,889	1,07	0,181	0,0075
Rataan	0,1778	0,214		

$$\text{Rata " } K_1 = 0,1778$$

$$\text{Rata " } K_2 = 0,214$$

$$\Sigma D = 0,181$$

$$\Sigma D^2 = 0,0075$$

$$N = 5$$

$$t = \frac{K_1 - K_2}{\sqrt{\frac{\Sigma D - \Sigma D^2 / N}{N(N-1)}}$$

$$t = \frac{0,1778 - 0,214}{\sqrt{\frac{0,0075 - (0,181)^2/5}{5(5-1)}}$$

$$t = \frac{0,036}{0,007}$$

$$t = 5,14^{**}$$

Dengan db = N - 1 = 5 - 1 = 4

Dalam tabel t untuk taraf kepercayaan 95 % diperoleh 2,776 dan untuk selang taraf kepercayaan 99 % diperoleh 4,604. Jika hasil t = 5,1 maka harga t jauh lebih besar daripada t tabel, maka hipotesisnya nihil ditolak.