

TESIS

PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL TERHADAP KOMPONEN PROTEIN SPESIFIK *STREPTOCOCCUS MUTANS 1 SEROTIPE C* PADA KELINCI

Suatu Penelitian Observasional Laboratorik



Oleh:

INDAH LISTIANA KRISWANDINI
NIM: 099712510 M

ILMU KEDOKTERAN DASAR
PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000

PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL TERHADAP
KOMPONEN PROTEIN SPESIFIK
STREPTOCOCCUS MUTANS 1 SEROTIPE C
PADA KELINCI

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Pada Program Pasca-sarjana Universitas Airlangga



Oleh

INDAH LISTIANA KRISWANDINI
NIM.09971510-M

PROGRAM PASCA-SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000

Lembar Pengesahan

**Tesis ini telah disetujui
pada tanggal 20 Januari 2000**

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Tien Soesmiati Soerodjo, drg.

Pembimbing



**Prof. Atasiati Idajadi, dr., SpMK.
NIP. 130 128 215**

Mengetahui

**Ketua Program Studi Ilmu kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**Soetjipto, dr.,MS.,PhD
NIP. 130 687 606**

**Tesis ini telah diuji
pada tanggal 10 Februari 2000**

Panitia Penguji Tesis

Ketua : Dr. Eddy Bagus Wasito, dr. SpMK, M.S.
Anggota : 1. Prof. Dr. Tien Soesmiati Soerodjo S, drg.
2. Prof. Atasiati Idajadi S, dr., SpMK.
3. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
4. Rahayu Ernawati, drh, M.S.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah yang Maha Rahman dan Rahim, yang telah memberikan karunia kepada saya sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini.

Saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia c.q. Menteri Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memberikan bantuan bea siswa BPPS sehingga dapat membantu meringankan beban penelitian saya.

Dengan ini pula perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

- Rektor Universitas Airlangga yang dijabat oleh Prof. dr. H. Soedarto DTMH yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada saya untuk dapat mengikuti Pendidikan Program Pascasarjana ini.
- Prof. Dr. H. Soedijono, dr., selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang memberikan fasilitas kepada saya dalam menjalankan dan menyelesaikan tugas belajar saya.
- Dr. Boedihardjo, drg., MSc., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberikan izin kepada saya untuk dapat mengikuti Pendidikan Program Pascasarjana.

- Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar yang semula dijabat oleh Prof. Dr. Yuliati Hood A., dr, MS., DSPA., FIAC dan kemudian dijabat oleh Dr. Soetjipto., dr., MS yang telah membantu dalam kelancaran untuk menyelesaikan tugas-tugas saya.

Saya ucapkan terima kasih yang setinggi-tingginya dan tak ternilai saya tujukan kepada :

- Prof. Dr. H. Tien Soesmiati Soerodjo , drg., selaku pembimbing Utama dan Principal Investigator pada Proyek URGE yang telah membantu dalam bidang moril maupun materiil dalam terselenggaranya Pendidikan Program Pascasarjana saya ini.
- Prof. Atasiati Idajadi , dr. , SpMK , selaku pembimbing yang Dengan penuh perhatian dan telaten telah memberikan bimbingan dan dorongan kepada saya sehingga saya dapat menyelesaikan Pendidikan saya.
- Dr.Fedik Abdul Rantam, drh., sebagai instruktur dalam penelitian saya yang telah banyak menyita waktu dalam membantu dan membimbing pelaksanaan penelitian maupun dalam pembuatan dokumentasi penelitian.

Terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya ucapkan kepada:

- drh. Rahaju Ernawati, MS selaku ketua lab. Virologi dan

Imunologi FKH Unair yang telah memberikan izin kepada saya dalam menjalankan penelitian saya di lab. tersebut.

- Teman-teman staf Lab.Virologi dan Imunologi FKH Unair yang banyak membantu dalam pengoperasian alat-alat penelitian, terutama sdr. Soewarno, drh.,M.I yang telah membantu dalam pengerjaan ELISA.
- Dr. Ketut Sudiana, drs., MI, yang telah sudi memberikan penjelasan Pelaksanaan penelitian saya.
- Teman-teman sejawat di Lab. Biologi Oral (Mikrobiologi) FKG Unair yang telah memberikan dorongan dan semangat dalam menyelesaikan Pendidikan saya.
- Mas Heri Lab.Virologi dan Imunologi FKH Unair, Mas Heri Sumantoro Lab. Biokimia Unair, mbak Farida dan mbak Sumilah Lab.Mikrobiologi FKG Unair yang membantu dalam penelitian saya.
- Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu yang berperan sehingga terlaksananya Pendidikan saya ini.

Dan yang tidak kalah pentingnya saya ucapkan terima kasih kepada orang tua dan anak saya tercinta semata wayang **Galang Tatit Nusantara** yang selama ini lebih banyak saya tinggalkan guna menyelesaikan studi saya ini.

Semoga Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang membalas segala budi baik dan pengorbanannya, Amin.

RINGKASAN

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk membuat antibodi poliklonal dari protein spesifik *S.m1(c) lokal* yang disuntikkan pada kelinci. Antiserum kelinci hasil dari penyuntikan dengan *S.m1(c)lokal* tersebut kemudian dilakukan uji secara *in vitro* dengan melihat pengaruhnya terhadap pertumbuhan kolonisasi *S. m (c)1 lokal*.

Untuk melakukan pelaksanaan penelitian ini dimulai dari penanaman *S.m1(c) lokal* pada medium TYC padat, untuk memperoleh koloni-koloni dari *S. mutans* tersebut. Koloni - koloni ini kemudian dilakukan ekstraksi dinding selnya (untuk mendapat protein yang spesifik dan kariogenik terhadap gigi manusia).

Dari hasil fraksinasi protein-protein tersebut kemudian dilakukan elektroforesis untuk menentukan berat molekul yang paling dominan.

Dari pekerjaan tersebut diperoleh hasil bahwa protein dengan berat molekul 67 K Da adalah protein yang dominan dan spesifik yang terdapat pada dinding sel *S. m 1(c) lokal*.

Protein ini kemudian dilakukan uji Western blot, yang mana telah ditentukan antibodi spesifiknya yaitu, antibodi pertama yang berasal dari anti serum kelinci yang telah disuntik dengan sel utuh *S. m1(c)lokal* yang telah dimatikan. Sedang antibodi keduanya adalah konjugat *Fragment Ig G goat anti rabbit*.

Dari hasil uji tersebut dapat dinyatakan bahwa protein 67 k Da adalah protein yang spesifik terhadap antibodi tersebut (antiserum kelinci yang disuntik dengan sel utuh *S. mutans*).

Protein 67 k Da ini kemudian dilakukan purifikasi, kemudian dilakukan pemeriksaan kandungan/ kadar proteinnya.

Protein 67 k Da yang diuji dengan spektrophotometer ini menunjukkan hasil dengan kadar protein 1,27 g%.

Protein ini kemudian dipersiapkan untuk divaksinasi (disuntikkan) ke hewan coba kelinci. Setelah dilakukan booster tiga kali baru dilakukan pemanenan antibodi poliklonal hasil vaksinasi tersebut.

Oleh karena penelitian ini bermaksud untuk pembuatan produk antibodi poliklonal dengan melihat kenaikan titer antiserum (antibodi poliklonal) yang terbentuk mulai dilakukan vaksinasi hingga booster III, maka pengkoleksian sampel (darah) diambil dua minggu setelah dilakukan vaksinasi hingga dua minggu setelah booster terakhir.

Pengujian titer antibodi dilakukan dengan cara ELISA dan ternyata menunjukkan kenaikan titer, dengan hasil titer tertinggi 1/240.000.

Produk antibodi poliklonal ini dilakukan uji secara in vitro untuk menentukan potensinya terhadap kolonisasi *S. ml(c) lokal*.

Dari hasil penelitian yang didapat diharapkan antibodi poliklonal ini dapat dikemas dan dipakai sebagai bahan aplikasi pencegahan karies gigi secara topikal.

ABSTRACT

Key words : *Local S. m 1(c)* (Surabaya, Indonesia)

SDS-PAGE, 67 k Da molecular weight Protein

Polyclonal Antibody from the rabbit

Titer of Immune serum 1/240.000

The major object of this research was: The Production of Polyclonal Antibody from rabbit that was immunized with *local specific protein S.m 1(c)*. The production of polyclonal antibody was tested against *local S. m 1 (c)* colonization (in vitro).

Methods, the cell wall *local S.m 1(c)* was fractinated by sonication to extract the protein.

The protein molecular weight was determined by electrophoresis (SDS-PAGE).

The specific protein was further checked by Western blotting. The first antibody used was rabbit antiserum from rabbit that was immunized with *local S. m 1 (c)*. The second antibody used was fragment IgG goat anti rabbit conjugate.

The immunoblotting resulted to get the most characteristic protein of *local S. m1(c)*; 67 k Da molecule in weight.

This protein was further processed by purification to produce a vaccine to be injected in the rabbit (800 µg/ ml per injection)

After three boosters injection, serum was collected from rabbit that reached a peak of titer 1/240.000.

Polyclonal antibodies against the antigenic protein of *local S. m1(c)* was tested in vitro using the modified *cylinder and well methode* (Wistreich & Leichtman, 1980)

DAFTAR ISI

	Halaman
Daftar Isi	i
Daftar Tabel	v
Daftar Gambar	vi
Daftar Lampiran	vii
1. Pendahuluan	1
1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.1. Tujuan Umum	5
1.3.2. Tujuan Khusus	5
1.4. Manfaat Penelitian	5
2. Tinjauan Pustaka	6
2.1. Karies Gigi	6
2.1.1. Faktor Penyebab Karies Gigi	6
2.1.2. Proses Pembentukan Karies Gigi	9
2.2. Respons Imun	10
2.2.1 Pengertian Respons Imun dan Imuno genitas	10
2.2.2. Determinan Antigenik/ Epitop	12
2.3. Immunologi Karies Gigi	13
2.3.1. Struktur Antigenik S. mutans.....	13

2.3.2. Peran Antibodi dalam Karies Gigi...	14
2.4. Proses Pembentukan Antibodi	15
2.5. Imunoprofilaksi	17
2.6. Uji Laboratorium.....	18
2.6.1. Elektroforesis	18
2.6.2. ELISA	20
2.6.3. Immunoblotting	21
3. Kerangka Konseptual dan Hipotesis Penelitian	22
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	22
3.2. Hipotesis Penelitian	24
4. Metode Penelitian	25
4.1. Rancangan Penelitian	25
4.2. Populasi dan Sampel	25
4.2.1. Populasi.....	25
4.2.2. Sampel	25
4.2.3. Besar Sampel dan Subyek Penelitian	26
4.2.4. Unit Analisis	26
4.3. Variabel Penelitian	27
4.3.1. Identifikasi Variabel	27
4.3.2. Batasan Operasional	28
4.4. Bahan (Materi) Penelitian	28
4.4.1. Bahan Untuk Proses Vaksinasi Hewan coba	28

4.4.2. Bahan Untuk Proses ELISA	29
4.5. Alat (Instrumen) Penelitian	29
4.5.1. Alat Untuk Proses Vaksinasi hewan Coba dan Panen Antibodi Poliklonal .	29
4.5.2. Alat Untuk Proses ELISA	29
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian	30
4.6.1. Tempat Penelitian	30
4.6.2. Waktu Peneltian	31
4.7. Prosedur Pelaksanaan	31
4.7.1. Pemecahan Sel dan dinding Sel S. mutans	32
4.7.2. Penyuntikan (Vaksinasi) Hewan coba	32
4.7.3. Booster	32
4.7.4. Pengujian titer Antiserum (anti bodi poliklonal) terhadap Ig G antibodi	33
4.7.5. Pemanenan antibodi poliklonal	35
4.7.4. Uji In Vitro	36
5. Hasil Penelitian dan Analisis Hasil.....	40
5.1. Hasil Penelitian	40
5.1.1. Hasil Pemecahan Sel dan dinding sel S. mutans.....	40
5.1.2. Hasil Elektroforesis dan Pewarna an Silver	41

5.1.3. Hasil Immunobloting	43
5.1.4. Hasil Purifikasi dan Pooling Protein	44
5.1.5. Hasil Vaksinasi dan Booster Pada Ke linci	45
5.1.6. Uji in Vitro Hasil Produksi Antibodi Poliklonal	49
5.2. Analisis Hasil Penelitian	51
5.2.1. Analisa Hasil Pembuatan Protein	51
5.2.2. Analisa Hasil Pembuatan Vaksin dan Vaksinasi pada Hewan Coba	52
5.2.3. Analisa Hasil Uji ELISA	53
6. Pembahasan	55
6.1. Proses Isolasi Protein	55
6.1.1. Proses Elektroforesis	55
6.1.2. Proses Purifikasi dan Pooling Protein	59
6.2. Pemilihan Hewan coba, Pembuatan Vaksin dan Vaksinasi Hewan coba	61
6.3. Uji Titrasi dengan ELISA	63
6.4. Produksi Antibodi Poliklonal	66
7. Kesimpulan dan Saran	69
7.1. Kesimpulan	69
7.2. Saran	70
Daftar Pustaka	71

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Nilai rata-rata absorban Uji Standardisasi ELISA dari Protein 67 k Da S.m 1(c) lokal terhadap antibodi Ig G	45
Tabel 5.2 Nilai titer antibodi poliklonal dari Kelinci yang disuntik dengan Protein 67 k Da S. m 1 (c) lokal	46
Tabel 5.3 Nilai absorban dari Penipisan Booster III Kelinci Yang disuntik dengan Protein 67 k Da S.m 1 (c) lokal	48

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Antigenik <i>S. mutans</i>	14
Gambar 4.1 Skema Prosedur Pelaksanaan Penelitian	38
Gambar 4.2 Proses Pembuatan Protein Spesifik	39
Gambar 5.1 Hasil Supernatan Pemecahan Sel dan dinding Sel <i>S.m</i> 1 (c) lokal Dengan sonikasi yang telah dilakukan pemusingan	41
Gambar 5.2 Pita-pita Protein dari hasil Elektroforesis yang telah diwarnai dengan Silver	42
Gambar 5.3 Lembar nitroselulose yang diwarnai dengan fast red	43
Gambar 5.4 Protein murni (67 k Da) yang diperbanyak	44
Gambar 5.5 Hasil Uji ELISA dari Anti serum Kelinci	49
Gambar 5.6 Uji in vitro dengan modifikasi <u>Cylinder & Well method</u>	50
Grafik 5.1 Kenaikan Titer Antibodi Kelinci yang disuntik dengan Protein 67 k Da	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Bahan dan Alat Pekerjaan SDS-PAGE	76
Lampiran 2 : Proses Denaturasi Protein	79
Lampiran 3 : Formula Separating gel dan Stacking gel	80
Lampiran 4 : Proses SDS-PAGE	81
Lampiran 5 : Proses Pencucian gel	83
Lampiran 6 :Pengecatan Silver	84
Lampiran 7 : Proses Immunobloting	86
Lampiran 8 : Cara Pembuatan Fast Red	88
Lampiran 9 : Reagen pada Immunobloting	89

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Dental caries atau secara umum lebih dikenal dengan nama karies gigi merupakan suatu penyakit infeksi bakteri yang menyerang jaringan keras gigi, yang telah dikenal berabad abad yang lalu (Rosen, 1991).

Banyak teori tentang karies gigi telah diungkap, tetapi teori "Chemoparasitic" yang dikemukakan oleh Miller merupakan teori yang paling banyak dianut. Pada penelitian ini digambarkan bahwa karies gigi merupakan proses dekalsifikasi email yang disebabkan oleh produksi asam yang berasal dari hasil fermentasi bakteri terhadap diet karbohidrat (Roeslan dan Sadono, 1997).

Setelah terjadinya dekalsifikasi email oleh asam, kerusakan akan berlanjut dengan diproduksi enzim proteolitik dari bakteri yang menyebabkan terjadinya demineralisasi dari tubuli-tubuli dan merusak matrik organik dari dentin (Roth and Calmes, 1981)

Penelitian tentang karies gigi ini pertama kali dikerjakan oleh Clark pada tahun 1924. Dalam penelitian ini Clark melakukan isolasi *Streptococcus mutans* yang berasal dari lesi karies manusia. Dalam penelitian tersebut juga dikatakan bahwa bakteri tersebut mempunyai sifat asidogenik dan asidurik yang sangat potensial menyebabkan terjadinya kerusakan gigi. Penelitian tersebut



kemudian dilanjutkan oleh Keyes dan Fitzgerald yang menggunakan hewan coba hamster. Hamster yang mulanya bebas karies dapat menunjukkan terjadi lesi karies bila disuntikkan *Streptococcus mutans* yang kariogenik ke dalam rongga mulut hewan tersebut (Mc. Ghee and Michalek, 1981).

Kasus penyakit karies gigi yang ada di Indonesia cukup tinggi prevalensinya, hal ini pernah dilaporkan oleh Nuraini (1993) bahwa pada anak-anak pra sekolah angka kariesnya mencapai 85,17% dengan rata-rata def-t 6,04. Sedangkan prevalensi karies gigi di Taman Kanak-kanak daerah Kotamadya Surabaya mencapai 92,1%.

Berdasar prevalensi angka karies gigi yang cukup tinggi tersebut, maka perlu adanya upaya pencegahan yang efektif. Untuk hal itu Soerodjo pada tahun 1989 melakukan suatu penelitian yang dituliskan dalam disertasinya tentang isolasi *S. mutans* sebagai kuman penyebab utama terjadinya karies gigi pada anak-anak pra sekolah yang menderita karies aktif. Kuman tersebut termasuk dalam serotipe c dengan subtipe 1 dan 3.

Dengan diketemukannya kuman *S. mutans* yang spesifik untuk wilayah Indonesia (Surabaya pada khususnya), maka bagian yang antigenik dari kuman ini dapat dipergunakan untuk pembuatan vaksin karies gigi, misalnya protein dari dinding selnya yang kariogenik.

Banyak penelitian yang menuliskan bahwa *S. mutans serotipe c* ini mempunyai struktur sel dengan bagian-bagian antigeniknya

yang terdapat pada dinding selnya (surface antigen) yaitu antara lain berupa antigen I/II,I,II,III, antigen A,B,C,D,PI, SpaA dan lain sebagainya yang mempunyai efek memberikan respons kekebalan terhadap karies gigi (Bachtiar, 1997).

Oleh karena itu protein-protein ini digunakan untuk merangsang terbentuknya antibodi yang dapat memproteksi terhadap *S. mutans* penyebab karies gigi (Lapolla et al., 1991).

Challacombe dan Lehner (Challacombe and Shirlaw, 1994), di Inggris juga pernah melakukan penelitian dengan memberikan vaksinasi pada sejenis kera dengan bahan yang diperoleh dari komponen protein *S. mutans*, yang hasilnya memberikan respons pembentukan antibodi yang positif. Dimana hasil yang positif ini nanti dapat dilakukan pada manusia.

Russell, Lehner dan Caldwell pada tahun 1980, pernah melakukan imunisasi dari bahan antigen protein *S. mutans* terhadap kera-kera rhesus yang diberikan secara subkutan dengan menambahkan ajuvan, dan ternyata hasilnya dapat menurunkan angka terjadinya karies gigi $\pm 70\%$ yang ditandai dengan penurunan jumlah *S. mutans* dalam plak gigi kera rhesus tersebut.

Zanders dan Lehner pada tahun 1980 juga menyebutkan bahwa proteksi yang efektif terhadap karies gigi pada kera rhesus diperoleh dengan melakukan imunisasi dari bahan antigen yang potensial yang masih kompleks. Bila salah satu dari bahan antigen

ini dapat dipisahkan dan diidentifikasi, maka antigen tersebut akan sangat berguna untuk pembuatan bahan proteksi terhadap *S. mutans*.

Berdasarkan penelitian dari Soerodjo (1989) yang telah disebut diatas, maka dapat diisolasi kuman penyebab karies gigi pada anak-anak pra sekolah yang dominan di Kotamadya Surabaya. Kuman ini akan dilakukan ekstraksi protein kariogeniknya dan digunakan untuk pembuatan antibodi poliklonal terhadap *S. mutans* di Indonesia. Fraksi protein yang dipilih adalah protein dan imunogenik dalam pemisahannya. Protein terpilih akan disuntikkan pada hewan coba (kelinci) dan dilakukan pemanenan antiserumnya (antibodi poliklonal). Antibodi poliklonal inilah yang nantinya akan diteliti dan dibuat kemasan serta dipakai untuk aplikasi topikal pada gigi, untuk pencegahan karies gigi.

1.2. Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah diuraikan di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

Apakah antibodi poliklonal yang diperoleh dari penyuntikan dengan protein spesifik dan imunogenik pada hewan coba kelinci merupakan antibodi yang spesifik dan dapat menghambat pertumbuhan *S. mutans 1 serotipe c* (pada uji *in vitro*) yang selanjutnya ditulis dengan *S.m 1(c) lokal*.

1.3. Tujuan penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk pembuatan antibodi poliklonal dari protein spesifik yang diisolasi dari *S. m 1(c) lokal* yang disuntikkan pada hewan coba kelinci.

1.3.2 Tujuan Khusus

- Untuk menentukan protein imunogenik
- Untuk menguji antibodi poliklonal yang terbentuk dan pengaruhnya terhadap kolonisasi *S. m 1(c) lokal*.

1.4 Manfaat Penelitian

- Memperoleh protein spesifik dan imunogenik dari *S.m1(c) lokal* sebagai bahan pembuatan antibodi poliklonal untuk usaha prevensi karies gigi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karies Gigi

2.1.1. Faktor Penyebab karies gigi

Karies gigi merupakan penyakit multifaktorial, seperti yang disebutkan oleh Keyes bahwa ada 3 faktor yang berpengaruh dalam pembentukan terjadinya karies gigi yaitu: *faktor host* (tuan rumah), *faktor substrat dan bakteri spesifik* penyebab karies gigi (Willet, White and Rosen, 1991).

Faktor host. Dalam hal ini yang berperan adalah gigi dan saliva.

Gigi terdiri dari beberapa lapis.

Lapis terluar dari gigi adalah email (enamel) yang merupakan lapisan yang paling kuat membungkus gigi. Lapisan ini terdiri dari komponen organik dan anorganik.

Komponen anorganik mempunyai prosentase yang terbesar pada gigi. Lapisan ini berbentuk kristal-kristal hidroksi apatit yang mempunyai formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dan akan berikatan dengan asam yang dihasilkan oleh bakteri-bakteri kariogenik yang berada pada plak gigi, sehingga dapat menyebabkan terjadinya karies.

Komponen organik mempunyai prosentase yang lebih kecil mengandung protein dan sitrat yang berperan dalam proses mineralisasi gigi karena mampu mengikat ion Ca^{++} .

Saliva mempunyai dua fungsi penting pada gigi. Fungsi pertama, saliva mampu membantu membersihkan gigi secara mekanis sehingga dapat menyangga perubahan derajat keasaman (pH). Pada pH yang optimum, kalsium (yang terdapat pada gigi) dan fosfat (yang terdapat dalam saliva) akan terpresipitasi pada permukaan gigi.

Bila terdapat unsur fluor dalam rongga mulut, maka akan membentuk fluor apatit yang stabil dan tahan asam (Roeslan dan Sadono, 1997).

Faktor substrat. Bahan ini yang mempunyai sifat kariogenisitas tinggi adalah karbohidrat, terutama sukrosa. Sukrosa ini dikatalisis oleh glukosiltransferase dari *S. mutans* menjadi glukosil ekstraseluler. Glukosil yang mempunyai ikatan (1→3) yang tidak larut dalam air serta bersifat lengket (melekat erat) ini berperan dalam proses pembentukan plak gigi. Faktor lain yang berperan dalam proses remineralisasi email adalah asam laktat, yang merupakan hasil produksi dari metabolisme karbohidrat oleh bakteri *S. mutans*. Berbagai macam karbohidrat yang difermentir oleh bakteri dalam rongga mulut sebenarnya dapat menghasilkan asam laktat semuanya. Akan tetapi asam laktat yang kariogenik ditentukan oleh adanya 3 faktor yaitu: jumlah kadar karbohidrat yang banyak dalam diet, jenis karbohidrat yang sulit dibersihkan dari gigi serta mudah dan cepatnya karbohidrat tersebut diragikan oleh bakteri (Roeslan dan Sadono, 1997).

Faktor bakteri. Pada zaman dahulu bakteri penyebab karies gigi yang paling banyak dianut adalah *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus casei*, selain itu juga *Actinomyces viscosus* dan *Actinomyces naeslundii* yang dipercaya sebagai penyebab penunjang. Tetapi setelah Fitzgerald dan Keyes (1960) melakukan penelitian yang sangat mendukung penemuan Clarke, maka mulai saat itu *S. mutans* banyak dianut sebagai penyebab utama terjadinya karies gigi. *S. mutans* ini mampu memproduksi asam (asidogenik) dan dapat bertahan hidup dalam suasana asam (asidurik), (Lehner, 1992).

Grup *S. mutans*. *Streptococcus mutans* yang dikenal sebagai penyebab utama karies gigi ini mempunyai heterogenitas dalam genetiknya (terdapat 5 spesies dalam grup ini), yaitu *S. cricetus*, *S. ferus*, *S. mutans*, *S. rattus* dan *S. sobrinus*.

Diameter sel *S. mutans* berukuran 0,5-0,75 μm , dengan bentuk kokus berdua atau bisa juga kokus dengan membentuk rantai pendek.

Bila ditumbuhkan pada agar darah mempunyai karakteristik sebagai berikut: diameter koloni 0,5-1 mm, dengan warna abu-abu "translucent" hingga berwarna putih, tepi koloni sirkular dan tidak teratur, permukaan koloni yang kasar dan melekat erat pada permukaan agar.

Pada medium yang mengandung sukrosa *S. mutans* menghasilkan ekstra seluler polisakarida dengan karakteristik

koloni: "opaque", kasar, berwarna putih dan biasanya tidak melekat erat pada agar, kadang-kadang pada medium disekitarnya dibasahi dengan polimer glukon.

S. mutans ini termasuk anaerob fakultatif, tetapi sering dapat tumbuh optimal dalam keadaan anaerob.

Media selektif untuk kuman ini biasanya yang sering digunakan adalah MSA (*Mitis Salivarius Agar*) dan TYC agar (*Trypton Yeast Cystine Agar*) yang mengandung 5% sukrosa.

Secara serologis *S. mutans* dibedakan dari spesies-spesies lain lain yang berhubungan dekat, dengan cara membedakan profil protein dari sel utuh dan resistensi terhadap basitrasin (Maiden et. all, 1992).

2.1.2. Proses Pembentukan Karies Gigi

Proses pembentukan karies gigi dimulai dari terbentuknya plak gigi. Plak gigi merupakan kumpulan dari massa bakteri dalam matrik organik yang banyak mengandung protein dan polisakarida, yang sebagian massanya tersusun dari saliva dan polisakarida sedang sebagian lain tersusun dari plak yang diproduksi oleh mikroorganisme yang menempel sangat kuat pada permukaan gigi (Melville and Russell, 1981).

Plak yang diproduksi dari bahan mikroorganisme (bakteri) ini dihasilkan oleh bakteri yang kariogenik, bakteri ini mempunyai sistem enzim yang dapat mengkatalisasi polisakarida ekstraseluler.

Bakteri yang memenuhi kriteria tersebut adalah *S. mutans*, yang mempunyai enzim glukosiltransferase (G Tase/GTS) serta dapat mensintesa glukukan dan dekstran. Sukrosa disintesa oleh G Tase menjadi dekstran dengan melepaskan fruktosa. Aktivitas dari enzim ini dirangsang oleh adanya dekstran. Fruktosiltransferase mensintesa fruktan dan levan yang merupakan sumber energi dari *S. mutans*. Bakteri ini juga memiliki enzim endohidrolitik dekstranase yang dapat memecah dekstran ikatan (1→6) menjadi dekstran ikatan (1→3) (mutan) yang tidak larut dalam air. Karena tidak larut dalam air, maka bahan ini akan melekat lebih kuat pada permukaan gigi. Dengan adanya bahan tersebut dalam waktu yang lama pada permukaan gigi, maka akan dapat menurunkan pH saliva yang akan membantu dalam meragikan permukaan gigi (Melville and Russell, 1981).

2.2. Respons Imun

2.2.1. Pengertian Respons Imun dan Imunogenitas

Respons Imun merupakan reaksi tubuh terhadap paparan antigen yang melibatkan sel-sel retikuloendothelial.

Respons primer dari tubuh hospes dapat terjadi karena paparan imunogen yang akan menghasilkan antibodi spesifik yang berada dalam serum beberapa lama setelah pemaparan berlangsung. Sedang respons sekunder terjadi setelah beberapa minggu, bulan atau beberapa tahun setelah pemaparan ulangan terhadap imunogen yang

sama dan dikarakterisasi dengan adanya sel-sel imunokompeten dan terjadinya pembentukan antibodi yang lebih cepat (Herscowitz, 1993).

Jackson (1993) juga menuliskan bahwa respons imun dari hospes dapat diperkuat dengan cara menyuntikkan ajuvan bersama-sama dengan imunogen. Ajuvan tersebut akan dapat menambah area permukaan antigen atau memperlama penyimpanan antigen serta memberi kesempatan sistem limfoid untuk mengenali antigen.

Ajuvan ini berupa substansi yang dapat menaikkan respons imun terhadap antigen secara non spesifik. Ajuvan bekerja dalam berbagai variasi. Pertama, antigen yang berbentuk emulsi akan bertahan dalam penyebaran sehingga dapat berfungsi sebagai depot untuk memperpanjang stimulasi antigen. Kedua, antigen yang berupa produksi bakteri (mikroba) akan mengaktifkan makrofag, juga dapat melanjutkan produksi faktor antigen non spesifik yang dapat menaikkan respons. Ketiga, kemungkinan bahwa antigen mempergunakan T-sel pada diferensiasi B-sel yang akan berlanjut dengan terjadinya maturasi (Roitt, Brostoff and Male, 1985).

Imunogenitas merupakan suatu potensi dari zat-zat yang dapat menyebabkan induksi suatu respons imun oleh tubuh, bila zat tersebut bertemu dengan tubuh hewan atau manusia (Subowo, 1993).

Menurut Jackson (1993) imunogenitas adalah sebagai sifat suatu zat imunogen yang mempunyai kemampuan untuk membangkitkan respons imun spesifik, baik kemampuan

pembentukan antibodi dan atau kemampuan pengembangan imunitas seluler.

Harlow dan Lane pada tahun 1988 memberikan definisi yang agak berbeda, dituliskan bahwa imunogenitas adalah merupakan kemampuan dari sebuah molekul untuk menyebabkan respons imun yang ditentukan baik oleh struktur kimia intrinsik dari molekul yang disuntikkan maupun oleh pengenalan diri dari inang terhadap bahan tersebut.



2.2.2. Determinan Antigenik/ Epitop

Determinan antigenik merupakan unit paling kecil dari antigen yang mampu membangkitkan antibodi spesifik dan mampu berikatan dengan antibodi. Antigen makromolekul biasanya mengandung beberapa epitop yang berbeda yang mampu bereaksi dengan komponen-komponen respons imun sehingga dapat melibatkan produksi antibodi atau menghasilkan generasi sel-sel dengan spesifisitas langsung terhadap seluruh epitop-epitop. Sebaliknya komponen-komponen imun, baik itu selnya atau antibodinya dapat bereaksi dengan epitop-epitop yang sama dari molekul berbeda yang akan dapat menyebabkan terjadinya reaksi silang (Benjamin and Leskowitz, 1993).

Antigen yang mempunyai beberapa epitop dalam permukaan selnya akan menghasilkan produksi antibodi poliklonal yang mempunyai variasi dalam spesifisitasnya (Paul, 1993).

2.3. Imunologi Karies Gigi

2.3.1. Struktur Antigenik *S. mutans*

Struktur antigenik dari *S. mutans* banyak terdapat pada permukaan dinding sel.

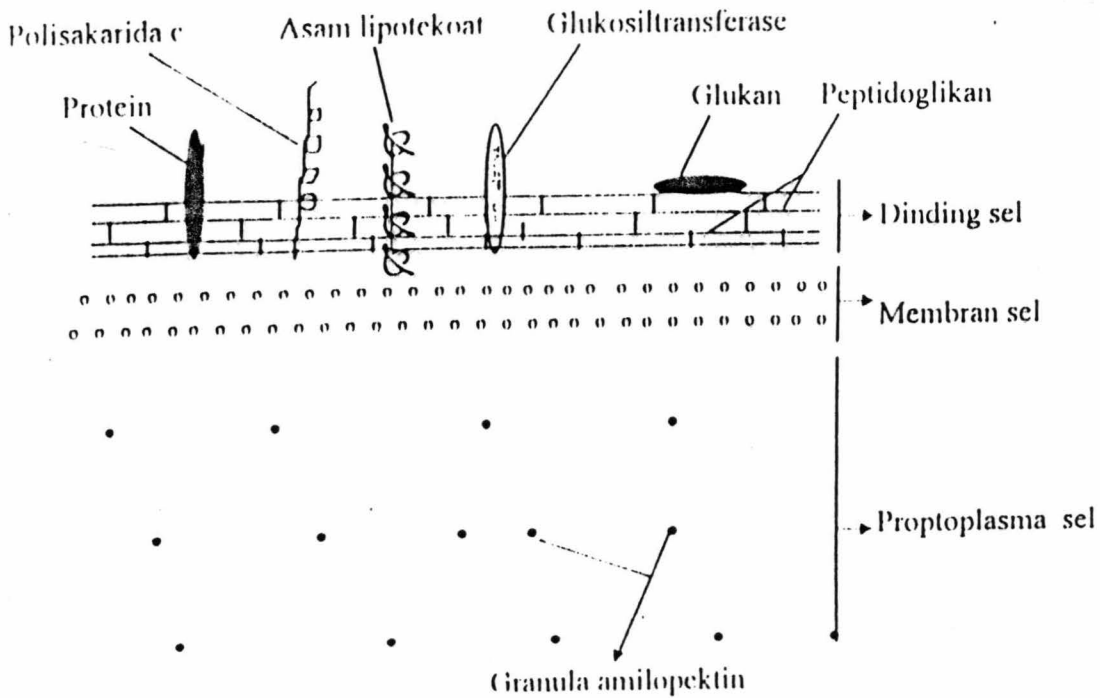
Matriks dinding sel ini terdiri dari ikatan silang peptidoglikan yang komposisinya adalah gula N-asetil amino, asam N-asetilmuramik dan sejumlah peptida-peptida.

Struktur antigen paling penting pada kuman ini adalah:

Protein, yang mengandung enzim glukosiltransferase yang dapat mengubah sukrose menjadi dekstran (glukan).

Struktur antigen lainnya yang penting adalah **Polisakarida**, yang terdiri dari glukan (yang disintesis oleh glukosiltransferase dari bahan sukrosa) dan fruktan (disintesa oleh fruktosiltransferase).

Asam lipoteikoat, merupakan turunan dari membran protoplasma yang mengadakan penetrasi ke dinding sel dan berfungsi sebagai komponen permukaan (Lehner, 1992).



Gambar 2.1. Struktur Antigenik *S. mutans*. Sumber : Bachtiar E.W (1997).

2.3.2. Peran Antibodi dalam Karies Gigi

Kenaikan antibodi dapat terjadi setelah proses penyembuhan karena infeksi karies gigi (karies terawat). Antibodi akan menetap di tubuh dalam waktu, beberapa bulan hingga beberapa tahun dalam serum (Taubman, 1992).

Terjadi kenaikan titer serum Ig G yang lebih tinggi terhadap sel yang utuh *S. mutans* maupun antigen protein I/II pada orang yang bebas karies dibandingkan dengan penderita karies aktif. Hal ini dapat diimplikasikan bahwa bakteri *S. mutans* sangat berperan dalam patogenesis terjadinya karies gigi (Challacombe, 1980).

Aktifitas IgA antibodi baik yang terdapat pada orang dewasa maupun pada anak-anak, mendukung tingkat kenaikan s Ig A

antibodi terhadap *S. mutans* ataupun antigen lain yang terdapat pada penderita rendah karies maupun bebas karies. Tetapi ada juga yang berpendapat bahwa tingkat kenaikan s. Ig A antibodi secara konsisten hanya akan terjadi pada penderita karies aktif saja (Taubman, 1991).

Pada glandula saliva palatina minor lebih banyak ditemukan Ig M antibodi dibanding pada glandula saliva lainnya. Ig M antibodi ini dapat terbentuk dengan adanya antigen yang terdapat pada lingkungannya atau karena terjadinya imunodefisiensi Ig A yang selektif. Pada penderita imunodefisiensi Ig A selektif ini tidak mempunyai imunosit Ig A dalam mukosanya hal ini akan dikompensasi dengan adanya produksi Ig M lokal pada individu tersebut (Smith, 1992)

2.4. Proses Pembentukan Antibodi

Dalam melakukan pemaparan antigen pada tubuh inang, terdapat proses pembentukan antibodi yang dibagi dalam periode induktif (laten) dan periode biosintesa.

Periode induktif adalah periode dimana terjadi pembentukan antibodi setelah terjadi pemaparan primer.

Lama periode ini bergantung pada :imunogenitas, kualitas, bentuk dan kelarutan dari stimulan; spesies binatang yang disuntik; cara

imunisasi; sensitifitas alat yang digunakan untuk mendeteksi antibodi yang terbentuk.

Periode biosintesis. Pada periode ini dibagi dalam 3 fase:

Fase logaritmik. Pada fase ini konsentrasi antibodi bertambah secara logaritmik selama 4 -10 hari. "Doubling time"(waktu yang diperlukan untuk mencapai kenaikan kadar antibodi dua kali lipat) berkisar 5-8 jam.

Fase plateau (stadium mantap). Kadar antibodi serum pada fase ini adalah konstan, karena angka sintesis antibodi sama dengan angka katabolik dari antibodi.

Fase penurunan. Pada fase ini kadar antibodi yang terbentuk mengalami penurunan jumlah, karena angka katabolik antibodi lebih besar dari angka sintesis.

Fase negatif yang terjadi setelah inang mendapat respons sekunder.

Pada reaksi ini imunogen yang disuntikkan akan berikatan dengan antibodi yang terbentuk sebelumnya pada respons primer sehingga membentuk kompleks antigen-antibodi.

Pada respons sekunder imunogen yang disuntikkan harus cukup sehingga zat-zat yang tersisa setelah terjadinya pembentukan kompleks antigen-antibodi dapat merangsang sistem imun dan akan

tercetus respons sekunder (memenuhi prinsip booster) (Hercowitz, 1993).

2.5. Imunoprofilaksi

Vaksinasi pada manusia maupun hewan biasanya dilakukan pada penyuntikan intra muskuler ataupun pada sub kutan. Vaksin yang disuntikkan pada area yang disuntik akan menimbulkan resiko jejas pada jaringan yang paling ringan. Dengan melakukan suntikan ini mempunyai resiko terbawanya mikroorganisme yang tidak diinginkan masuk dalam tubuh individu dan juga menimbulkan rasa sakit. Oleh karena itu dianjurkan pemakaian "jet injector" dengan tekanan tinggi supaya dapat mengurangi rasa sakit (Tizard, 1995).

Vaksinasi ini dimaksudkan untuk mencegah suatu penyakit infeksi dengan menyuntikkan bahan dari organisme penyebab penyakit infeksi tersebut yang diinaktifkan/dilemahkan atau produk-produk yang dihasilkan oleh organisme tersebut yang dipergunakan untuk menambah daya tahan tubuh inang terhadap infeksi penyakit tertentu (Fudenberg, 1978).

Imunisasi aktif mempunyai keuntungan yang lebih banyak dibanding dengan imunisasi pasif, karena lama waktu proteksi serta "boosting and recall" dari respons proteksi ini dapat dilakukan dengan memberikan suntikan pengulangan antigen. Bahan vaksin diperoleh dari material hidup maupun mati, material (antigen) yang tidak hidup (non viabel) biasanya diperoleh dari komponen

organisme penginfeksi yang dapat menyebabkan pembentukan antibodi untuk pencegahan atau dari produk bakteri yang telah dilakukan detoksifikasi (toksoid) yang dapat menstimulasi terbentuknya antitoksin (Fudenberg, Stites and Caldwell, 1978 ; Tizard, 1995).

Benjamin dan Leskowitz (1993) menyatakan bahwa, imunisasi pasif dilakukan dengan mentransfer antibodi atau sel yang imun dari satu individu ke individu lain.

Tizard (1995) juga menuliskan bahwa imunisasi pasif dapat dilaksanakan pada pasien yang peka terhadap penyakit untuk memberikan proses kekebalan sementara yang bersifat segera. Disebutkan juga bahwa pemindahan antibodi pada imunisasi pasif akan memberikan proteksi yang semakin lama semakin menurun. Resipien nantinya akan menjadi peka kembali terhadap infeksi tersebut.

2.6 Uji Laboratorium

2.6.1 Elektroforesis

Proses elektroforesis adalah suatu proses pemisahan partikel-partikel berdasar muatan listriknya. Di laboratorium klinik, partikel / senyawa itu dapat berupa protein atau asam-asam polinukleat yang berasal dari darah, cairan-cairan biologis ataupun berasal dari jaringan lunak.

Perangkat elektroforesis terdiri dari serangkaian sirkuit listrik dengan bahan-bahan berupa air dan garam-garam yang mudah diuraikan. Garam-garam tersebut misalnya sodium klorida, yang mana garam ini di dalam air dapat terurai membentuk ion sodium yang bermuatan positif tunggal dan ion klorida yang bermuatan negatif tunggal.

Dalam larutan ditempatkan elektroda-elektroda yang dihubungkan dengan sumber energi seperti baterai. Salah satunya menarik ion bermuatan negatif yang dinamakan anion dan yang lainnya menarik ion-ion positif yang dinamakan kation (Schoeff and Williams, 1993).

Sedang menurut Nowotny (1979), fenomena elektroforesis ini merupakan perpindahan muatan-muatan positif/ negatif dari suatu senyawa ke muatan yang berlawanan dalam area elektrik .

Garfin (1990), menyatakan dalam tulisannya bahwa, metode elektroforesis atau SDS-PAGE ini merupakan metode yang paling baik untuk mengidentifikasi dan mengumpulkan protein dengan cara memurnikan dan memperkirakan homogenitas kemurnian fraksi-fraksi protein. Metode ini secara rutin digunakan untuk memperkirakan berat molekul protein dan mempersiapkan untuk pemrosesan protein lebih lanjut. Dengan metode ini pula protein dapat terfraksinasi berdasarkan ukuran, bentuk dan muatan-muatan protein makromolekul.

2.6.2 ELISA (Enzyme - linked immunosorbent assay) tidak langsung

Cara ini digunakan secara luas untuk mendeteksi dan juga dapat untuk melakukan titrasi antibodi spesifik dari sampel berupa serum. Dengan uji ELISA ini akan diperoleh metode sensitifitas dengan ketepatan yang tinggi untuk memperkirakan parameter-parameter biologis dengan jumlah sampel yang cukup besar dan cepat dilakukan analisa.

Uji ini dalam pelaksanaan digunakan untuk: mendeteksi dan mengidentifikasi agen penyakit, membedakan sub-tipe agen penyakit, pengukuran agen penyakit (misal: memperkirakan berat molekul protein imunogenik pada vaksin), mengidentifikasi antibodi spesifik dan mengukur isotope antibodi spesifik (Crowther, 1995).

Liddell and Cryer (1991), menekankan pada perangkat keras (phase solid) dari pengerjaan ELISA sangat mempengaruhi hasil pembacaan. Dituliskan bahwa di dalam pelaksanaan proses ELISA bentuk dan komposisi phase solid yang digunakan pada pekerjaan ini sangat bervariasi. Tetapi yang paling baik adalah bentuk plat mikro dengan dasar datar yang terbuat dari bahan *polystyrene* atau *polyvinylchloride* yang dibuat secara komersial.

Kualitas daya serap dari plat ini sangat bervariasi antara plat yang satu dengan lainnya, walaupun pabrik sudah berupaya memperbaiki kualitas dari tahun ke tahun.

2.6.3 Immunoblotting (Western blots)

Dengan metode ini dapat diketahui kespesifikan suatu protein dengan antibodi yang telah diketahui. Caranya dengan proses transfer protein dari matrik gel ke lembar nitroselulose (Artama, dkk, 1991).

Sampel protein yang berasal dari elektroforesis biasanya mengandung beberapa protein yang berbeda, sehingga perlu dilakukan pengujian secara kimia untuk memperoleh protein tunggal yang spesifik. Uji yang biasa digunakan untuk maksud diatas adalah *Western blot (immunoblotting)*.

Western blotting dilakukan untuk proses transfer dan imunodeteksi protein dari gel. Uji ini digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen dengan berat molekulnya, untuk membandingkan reaksi silang imunologis diantara protein-protein dan mempelajari modifikasi protein-protein selama proses sintesis seluler (Goers, 1993).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian.

Karies gigi adalah penyakit yang infeksius, hal ini dikarenakan spesies *Streptococcus mutans* dianggap sebagai penyebab utama terjadinya penyakit ini. Kuman ini termasuk dalam famili *Streptococcaceae* dan genus *Streptococcus*. Menurut pembagian grup Lancefield, *Streptococcus oral* ini termasuk dalam grup *Viridans* (Melville and Russell, 1981).

Sampai saat ini di Indonesia penanganan penyakit karies gigi masih dalam tahap yang konservatif. Pasien yang telah terkena karies gigi akan dilakukan perawatan dengan cara menumpat kavitasnya, sedangkan pada penderita yang belum terkena karies (terutama anak-anak) dilakukan aplikasi seperti "fissure sealant" atau fluoridasi. Sedangkan pencegahan terjadinya karies gigi yang lebih spesifik untuk mencegah terjadi kerusakan gigi ini (misalnya, imunisasi) di Indonesia masih belum pernah dilakukan.

Dengan adanya pengakuan bahwa *S. mutans* sebagai penyebab utama karies gigi secara spesifik yang telah dipostulatkan, maka hal ini mendorong para peneliti untuk membuat vaksin untuk penyakit ini. Pada penelitian yang dilakukan oleh Lehner, Caldwell dan Russell (1980) yang menggunakan hewan coba kera rhesus dan dilakukan vaksinasi dengan bahan imunogen dari protein *S. mutans* dapat mencegah terjadinya karies

gigi. *S. mutans* mempunyai bermacam-macam komponen imunogenik pada permukaan selnya. Komponen-komponen imunogenik tersebut antara lain berupa protein antigen, polisakarida yang berasal dari dekstran, levan dan amilopektin (Lehner, 1992).

Protein-protein imunogenik tersebut oleh para peneliti dilakukan purifikasi dan dipergunakan sebagai bahan pembuatan vaksin. Pemilihan fraksi-fraksi protein imunogenik perlu dipertimbangkan, untuk menghindari hal-hal yang mengakibatkan kerusakan fatal pada tubuh inang bila dibuat bahan vaksin. Ada beberapa fraksi protein *S. mutans* yang dapat menghasilkan reaksi silang dengan organ tubuh manusia. Hal



3.2. Hipotesis Penelitian

Antibodi poliklonal yang terbentuk dari penyuntikan protein spesifik *S.m 1(c) lokal* pada hewan coba kelinci merupakan antibodi yang spesifik terhadap *S. m 1 (c) lokal* dan dapat mencegah pertumbuhan *S.m1(c)lokal* (pada uji in vitro).

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah Observasional Laboratorik, karena perlakuan yang diberikan berupa penyuntikan protein spesifik pada hewan coba dimaksudkan untuk memperoleh hasil berupa antibodi poliklonal yang akan digunakan untuk bahan imunisasi pasif secara topikal pada manusia di kemudian hari.

4.2. Populasi dan Sampel

4.2.1. Populasi

Populasi penelitian adalah hewan coba kelinci jenis *New Zealand White*

4.2.2. Sampel

Sampel yang digunakan sejumlah 4 ekor kelinci *New Zealand White* dengan kriteria sebagai berikut:

- Umur kelinci : \pm 4-6 bulan
- Berat badan kelinci : 4,5 - 5 kg
- Jenis kelamin : betina

- Kelinci belum pernah dilakukan vaksinasi (terutama terhadap *S. mutans*).

4.2.3 Besar sampel dan Subyek Penelitian

Besar sampel yang digunakan adalah 4 ekor kelinci yang dibagi dalam 2 kelompok yaitu : kelompok uji dan kelompok kontrol.

- Kelompok Uji : adalah kelompok kelinci yang disuntik dengan antigen protein spesifik pada daerah subkutan.

Kelompok kontrol : adalah kelompok tanpa perlakuan (tanpa diberi suntikan / vaksinasi).

Kedua kelompok tersebut dilakukan uji titrasi anti serum terhadap pembentukan antibodi Ig G dengan ELISA.

4.2.4 Unit Analisis

Serum (darah) dari kelinci (subyek) baik kelinci pada kelompok uji maupun kelompok kontrol.

Penyuntikan (vaksinasi) pada kelompok uji dilakukan secara sub kutan. Sedangkan pengambilan sampel berupa darah dilakukan sebelum atau sesudah vaksinasi.

Pengambilan darah dimaksudkan untuk uji titrasi anti serum terhadap pembentukan antibodi Ig G mulai booster I hingga booster III.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Devijanti (1996), titer anti serum dari kelinci yang disuntik dengan sel utuh *S. mutans* mencapai 1/1024.

Pada uji ini akan digunakan protein spesifik dari *S. mutans* sebagai bahan antigen yang disuntikkan pada kelinci, dan titer anti serum dari penelitian ini diharapkan dapat mencapai nilai $> 1/1024$.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Identifikasi Variabel

Variabel pada penelitian ini terdiri dari:

- Variabel independent: 1. Protein spesifik dari *S. m1(c)lokal* (berkaitan dengan tujuan umum).
2. Antibodi Poliklonal (berkaitan dengan tujuan khusus).
- Variabel dependent : 1. Produksi antibodi Poliklonal (berkaitan dengan tujuan umum).
2. Pertumbuhan *S. mutans 1* pada lempeng agar (berkaitan dengan tujuan khusus).
- Variabel kendali :
 - umur kelinci
 - berat badan kelinci
 - jenis kelinci
 - jenis kelamin kelinci
 - metode vaksinasi

4.3.2 Batasan Operasional

- **Komponen imunogenik** : komponen-komponen yang terdapat pada sel *S. mutans* yang dapat menimbulkan reaksi imunologis pada tubuh inang.
- **Fraksi Protein** : fraksi/ bagian dari protein permukaan sel.
- **Antibodi poliklonal** : antibodi yang dapat mengenali beberapa macam determinan antigenik.
- **Determinan antigenik/ Protein antigen** : unit terkecil dari antigen yang mampu berikatan dengan antibodi.
- **Protein spesifik** : protein yang dominan dan imunogenik yang terdapat pada dinding sel *S.m 1(c) lokal* dengan berat molekul 67 k Da.
- **S.m 1(c) lokal** : Streptococcus mutans subtipe 1, serotipe c yang diisolasi dari penderita karies gigi anak-anak di Surabaya
- **S. mutans** : Streptococcus mutans penyebab utama karies gigi yang secara umum terdapat dimana saja.

4.4 Bahan (Materi) Penelitian

4.4.1 Bahan untuk Proses Vaksinasi hewan coba

- Protein spesifik *S. m1(c) lokal* (Kriswandini, 1998).
- *Complete & Incomplete Freund Adjuvant*
- *PBS (Phosphat Buffer Saline)*
- Kelinci

4.4.2 Bahan untuk Proses ELISA

- Serum kelinci dari hewan coba yang telah dilakukan vaksinasi
- Konjugat *fragment goat anti rabbit (anti Ig G)*
- Protein non spesifik BSA
- Substrat enzim 4-NPP
- Triton X-100
- Protein spesifik dari *S. mutans* yang telah terukur kadarnya.
- Larutan dapar substrat
- Larutan dapar untuk *blocking*
- Larutan dapar Karbonat
- Larutan dapar pencuci

4.5 Alat (Instrumen) Penelitian

4.5.1 Alat untuk Proses Vaksinasi Hewan coba dan Pemanenan

Antibodi Poliklonal

- *Dissposable syringe* ukuran 1 cc
- *Dissposable syringe* ukuran 5 cc
- Papan kekang
- Tabung ukuran 10 cc untuk mengumpulkan darah
- Vaseline

4.5.2 Alat untuk Proses ELISA

- Pipet Eppendorf dengan tipnya

- *Microtube 1,5 cc*
- Tabung reaksi 10 cc
- *Becker glass*
- *Stirer*
- *Inkubator*
- Plat mikrotiter berdasar datar (Nunc)
- *ELISA reader*

4.6 Tempat dan waktu Penelitian

4.6.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di tiga tempat, yaitu:

- **Laboratorium Mikrobiologi FKG Unair:**

Tempat melakukan kultur, penanaman isolat *Streptococcus mutans* dan uji in vitro dari produk Antibodi Poliklonal.

- **Laboratorium Virologi dan Imunologi FKH Unair:**

Tempat melakukan karakterisasi protein (Elektroforesis, Immunobloting), Pembuatan Vaksin dan Uji ELISA

- **Laboratorium Biokimia FK Unair:**

Tempat pemeliharaan hewan coba dan melakukan Vaksinasi hewan coba.

4.6.2 Waktu Penelitian

- Penelitian tentang karakterisasi yang meliputi Elektroforesis, Immunobloting, Purifikasi Protein serta dialisis dilakukan mulai bulan November 1998 hingga bulan Agustus 1999.
- Penyuntikan (vaksinasi) pada hewan coba dilakukan pada bulan September sampai November 1999.
- Uji ELISA dan Pemanenan Antibodi Poliklonal dilakukan pada bulan September sampai November 1999.
- Uji In vitro dilakukan pada bulan November 1999.

4.7 Prosedur Pelaksanaan

Penelitian ini dibagi dalam tahap- tahap sebagai berikut untuk mencapai hasil penelitian yang dimaksud:

- Persiapan penentuan protein spesifik dari dinding sel *S.m 1(c) lokal* untuk bahan vaksinasi hewan coba.
- Penyuntikan (vaksinasi) hewan coba
- Booster
- Pengujian titer anti serum (antibodi poliklonal) terhadap Ig G.
- Pemanenan Antibodi Poliklonal
- Uji in vitro

4.7.1 Pemecahan Sel dan dinding sel *S. mutans*

Pembuatan protein spesifik dilakukan melalui tahap-tahap: Isolasi kuman *S.m1(c) lokal* pada TYC medium; kemudian koloni yang terbentuk dilakukan fraksinasi dengan proses sonikasi dan denaturasi protein dengan pemanasan pada *water bath*; lalu dilakukan elektroforesis; pengecatan gel dengan pengecatan silver; imunobloting; purifikasi.

4.7.2 Penyuntikan (Vaksinasi) Hewan coba

Vaksinasi hewan coba dilakukan dengan menggunakan bahan protein spesifik dari *S. m1(c) lokal* dengan perbandingan 800 µg (dosis maksimum pada kelinci 5-1000 Ug, Harlow and Lane, 1988) protein dalam 0,25-0,5 ml larutan PBS yang diemulsikan dengan *Complete adjuvant* sebanyak 0,25-0,5 ml (dosis optimum penyuntikan bahan antigen untuk hewan coba kelinci adalah 50 – 1000 µg). Penyuntikan dilakukan dengan volume 0,5 ml pada area subkutan pada sisi kiri dan 0,5 ml pada sisi kanan.

4.7.3 Booster

Booster dilakukan 14 hari setelah vaksinasi hewan coba dengan menggunakan bahan 800 µg protein spesifik *S. mutans* dalam 0,25-0,5 ml larutan PBS yang diemulsikan dengan 0,25-0,5 ml *Incomplete adjuvant*.

Penyuntikan dilakukan dengan volume 0,5 ml pada area subkutan pada sisi kiri dan 0,5 ml pada sisi kanan.

Booster dilakukan 3 X dengan interval penyuntikan 2 minggu sekali. Pengambilan darah dilakukan sebelum dilakukan booster untuk diuji kenaikan titer anti serum terhadap Ig G. (Weir, 1986; Harlow and Lane, 1988).

4.7.4 Pengujian titer anti serum (Antibodi Poliklonal) terhadap Antibodi Ig G.

Pengujian titer antiserum dilakukan 2 minggu setelah booster (setiap akan dilakukan booster selanjutnya) dengan mengambil darah pada setiap kelinci yang di booster pada daerah cuping telinga sebanyak ± 2 ml dan dilakukan uji ELISA.

Pengambilan darah dilakukan pada kelompok uji maupun kelompok kontrol.

Cara Pengujian ELISA

Untuk mengukur titer antiserum dari darah kelinci baik yang telah dilakukan vaksinasi maupun yang tidak dilakukan vaksinasi digunakan tehnik ELISA tidak langsung, yaitu dengan cara:

- Setiap sumuran dari lempeng (plat)mikro titer dilapisi dengan antigen (protein spesifik) yang diencerkan dengan larutan dapar karbonat. Kemudian dilakukan inkubasi satu malam

pada temperatur - 4°C.

- Hari berikutnya dilakukan pencucian dengan larutan dapar pencuci 3x1 menit.
- Kemudian pada tiap sumuran dimasukkan larutan dapar untuk *blocking* dengan BSA 1% dengan volume 150 µl tiap sumuran dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
- Setelah itu dilakukan pencucian dengan larutan dapar pencuci sebanyak 3 X dengan volume 150 µl tiap sumuran.
- Lalu dimasukkan antiserum yang telah diencerkan dengan larutan dapar untuk *blocking*, dan diisikan pada tiap sumuran dengan volume 100 µl dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C.
- Dilakukan pencucian lagi seperti proses diatas.
- Kemudian pada tiap sumuran dimasukkan konjugat *fragment goat anti rabbit (anti IgG)* yang telah diencerkan dengan larutan dapar untuk *blocking* dengan perbandingan 1:1000, kemudian diinkubasikan selama 1jam pada suhu 37°C.
- Dicuci dengan larutan dapar pencuci sebanyak 3X.
- Pada setiap sumuran dimasukkan enzim substrat (4-NPP) dalam larutan dapar substrat (10µg enzim substrat dalam 10ml larutan dapar substrat) dengan volume 100µl.

- Setelah 30 menit reaksi enzim dihentikan dengan menambahkan NaOH pekat dengan ukuran 50 μ l pada tiap sumuran.
- Dengan adanya perubahan warna, maka dibaca pada *Elisa reader* dengan panjang gelombang (OD) 405 nm (Bergmeyer, 1986).

Cara Pengujian Titrasi dengan ELISA

Cara pengujian titrasi dengan ELISA hampir sama dengan cara standarisasi ELISA (Papan Catur) seperti diatas, hanya bedanya pada : Antiserum yang akan dilakukan inkubasi terlebih dahulu dilakukan penipisan dengan larutan dapar untuk *blocking* mulai 1/100 hingga 1/300.000. Kemudian masing masing penipisan tersebut dimasukkan dalam sumuran sebanyak 100 μ l dan dilakukan inkubasi seperti cara di atas dan seterusnya (Crowther, 1995).

4.7.5 Pemanenan Antibodi Poliklonal

Pemanenan dilakukan setelah booster III yang telah mencapai titer tinggi, yaitu dengan mengambil \pm 10 ml pada tiap kelinci setiap kali panen.

Bila akan dipanen lagi dapat dilakukan booster ulang (hingga mencapai titer tertinggi seperti diatas).

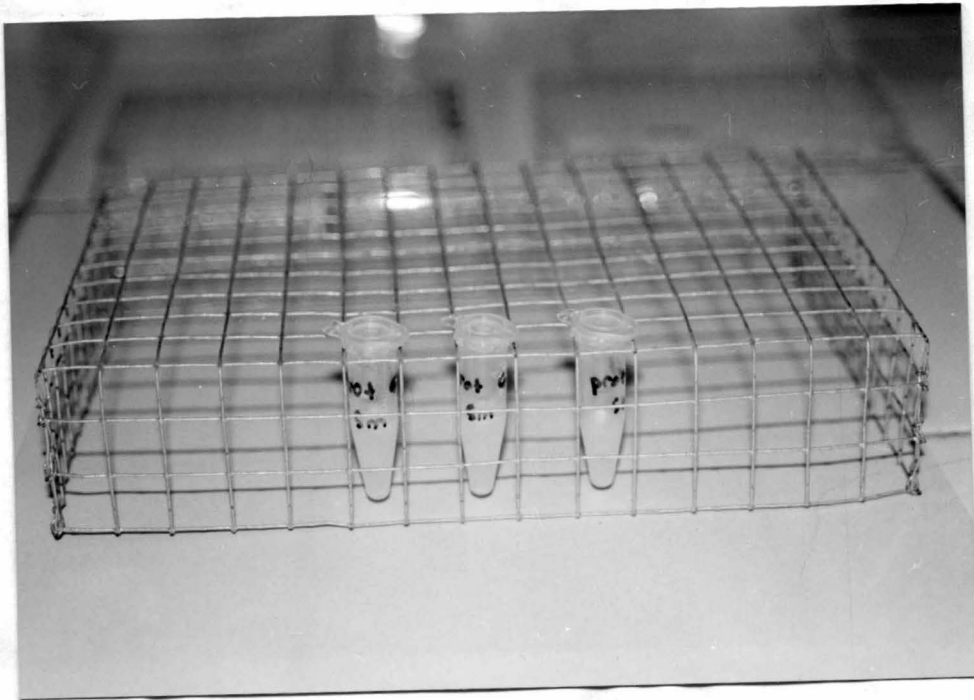
Pengambilan darah bisa dilakukan melalui cuping telinga.

5.1.4 Hasil Purifikasi dan Pooling Protein

Supernatan dari suspensi *S. m(c)1 lokal* dari hasil pemecahan protein diatas diperbanyak dengan cara dilakukan elektroforesis sehingga banyak dihasilkan gel-gel elektroforesis.

Pada setiap gel tersebut kita potong pada area berat molekul yang dikehendaki (67 k Da) dan dilakukan homogenisasi dengan bahan-bahan kimia (detergen 10%, NaH_2PO_4 , NaCl 10%, Tris HCl) sehingga dihasilkan protein yang dimaksud dan dilakukan dialisis.

Protein yang telah murni tersebut dilakukan pengujian kadar protein yang terbentuk, yang hasilnya mempunyai kadar 1,27 g%.



Gambar 5.4 Protein murni yang telah diperbanyak (67 k Da) dari hasil elektroforesis dengan memotong gel-gel dari protein pada area berat molekul 67 k Da yang kemudian dilakukan pemusingan dengan kecepatan tinggi yang berulang-ulang .

5.1.5 Hasil Vaksinasi dan Booster pada Kelinci

Protein yang telah jadi dibuat vaksin dan booster untuk disuntikkan pada kelinci dengan menambahkan *complete* dan *incomplete Freund's Adjuvant* dengan perbandingan tertentu.

Setelah disuntikkan pada kelinci hingga booster III pada masing-masing penyuntikan kelinci diambil darahnya untuk dilakukan uji titrasi terhadap antiserum (antibodi poliklonal) yang terbentuk dengan uji ELISA tidak langsung.

Langkah pertama untuk uji ELISA adalah pembuatan standarisasi kadar protein dalam $\mu\text{g/ml}$ yang paling sesuai terhadap antibodi Ig G

Tabel 5.1 Nilai Rata-rata Absorban Uji Standardisasi ELISA dari Protein 67 kDa S. m 1(c) lokal terhadap antibodi IgG

Kadar Protein 67 kDa (dalam $\mu\text{g/ml}$)	Nilai rata-rata absorban Serum kelinci pada pengenceran		
	1/10	1/100	1/200
10 μg	0,5818	0,5643	0,471
8 μg	1,1895	0,5565	0,3725
7 μg	1,8228	0,7553	0,4828
6 μg	0,5033	0,4633	0,4698
5 μg	1,364	0,4783	0,4108
4 μg	0,7655	0,5723	0,4048
3 μg	1,1635	0,5855	0,437
2 μg	0,3888	0,5065	0,5025

Dari tabel diatas dapat ditentukan kadar protein yang paling sesuai untuk penentuan titer dengan uji ELISA, kemudian dilakukan uji penentuan titer antiserum kelinci dari hasil booster.

Setelah dilakukan penentuan titer diperoleh hasil seperti terlihat pada tabel 5.2 dan tergambar pada grafik 5.1

Tabel 5.2 Nilai titer Antibodi Poliklonal dari Kelinci yang disuntik dengan Protein 67 k Da *S. m 1(c) lokal*

PENYUNTIKAN	NILAI TITER
Tanpa Vaksinasi	1/60
Vaksinasi	1/30.000
Booster I	1/70.000
Booster II	1/140.000
Booster III	1/240.000

Keterangan:

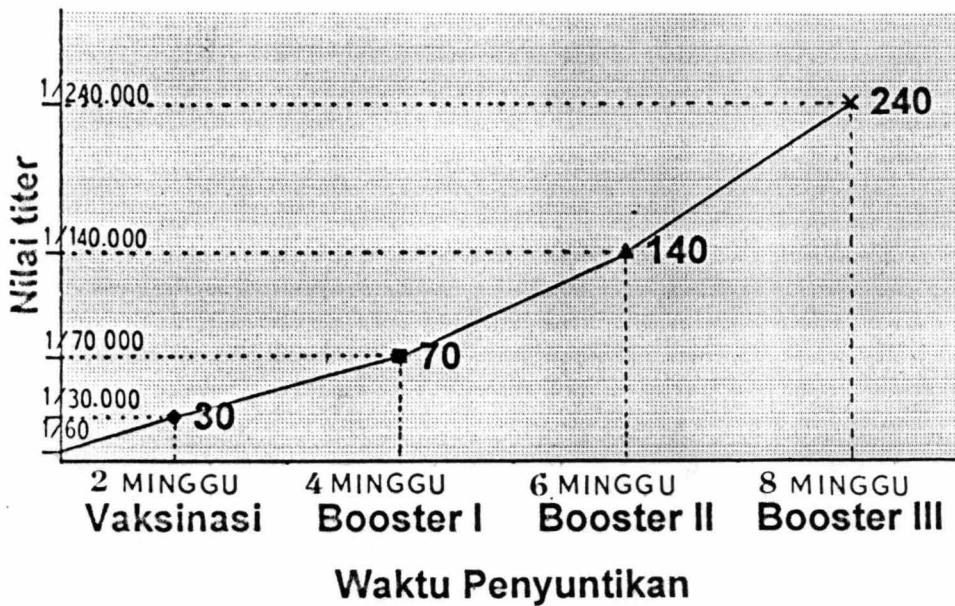
Tanpa vaksinasi = dilakukan pengambilan darah / serum sebelum dilakukan vaksinasi.

Vaksinasi = dilakukan pengambilan darah 2 minggu setelah dilakukan vaksinasi.

Booster I = dilakukan pengambilan darah 2 minggu setelah dilakukan booster I.

Booster II = dilakukan pengambilan darah 2 minggu setelah dilakukan booster II.

Booster III = dilakukan pengambilan darah 2 minggu setelah booster III.



Grafik 5.1 Kenaikan titer antibodi Kelinci yang disuntik dengan Protein 67 kDa dan dilakukan booster setiap 2 minggu sekali dengan dosis yang sama. Pengambilan sampel darah untuk pengukuran dilakukan 2 minggu setelah penyuntikan.

Keterangan:

Nilai titer pada grafik dalam satu per ribuan

Tabel 5.3. Nilai Absorban dari Penipisan Booster III Kelinci yang disuntik dengan Protein 67 kDa *S. m 1(c) lokal*

Booster III	
Penipisan	Nilai absorban
1/100.000	0,2103
1/120.000	0,2393
1/140.000	0,2463
1/160.000	0,2673
1/180.000	0,2778
1/200.000	0,2803
1/220.000	0,2901
1/240.000	0,3123
1/260.000	0,3333
1/280.000	0,3437
1/300.000	0,3473
1/320.000	0,4147

Keterangan :

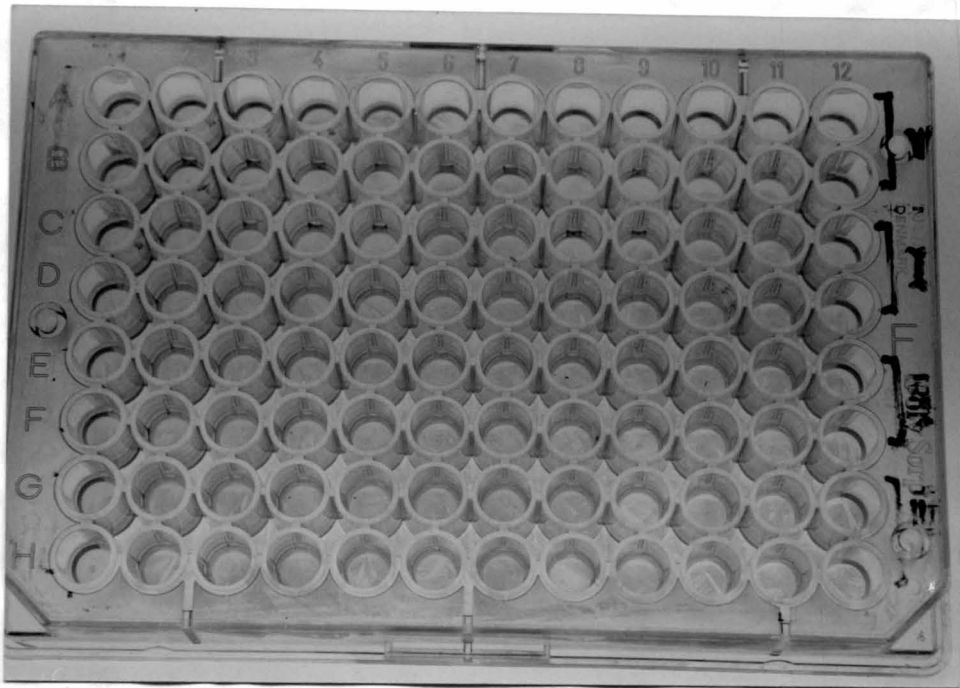
Nilai rata-rata kontrol = 0,2055

Cut of value = 1,5 x rata-rata kontrol

= 0,30825

Nilai pada absorban unit yang memenuhi cut of value adalah pada penipisan 1/240.000.

Jadi penipisan tertinggi pada Booster III adalah 1/240.000



Gambar 5.5. Hasil Uji ELISA dari anti serum kelinci dua minggu setelah Vaksinasi (V), booster I(I), booster II(II), booster III (III). ditandai dengan perubahan warna kuning secara fisik terlihat penipisan semakin tinggi dengan penambahan dilakukannya booster.

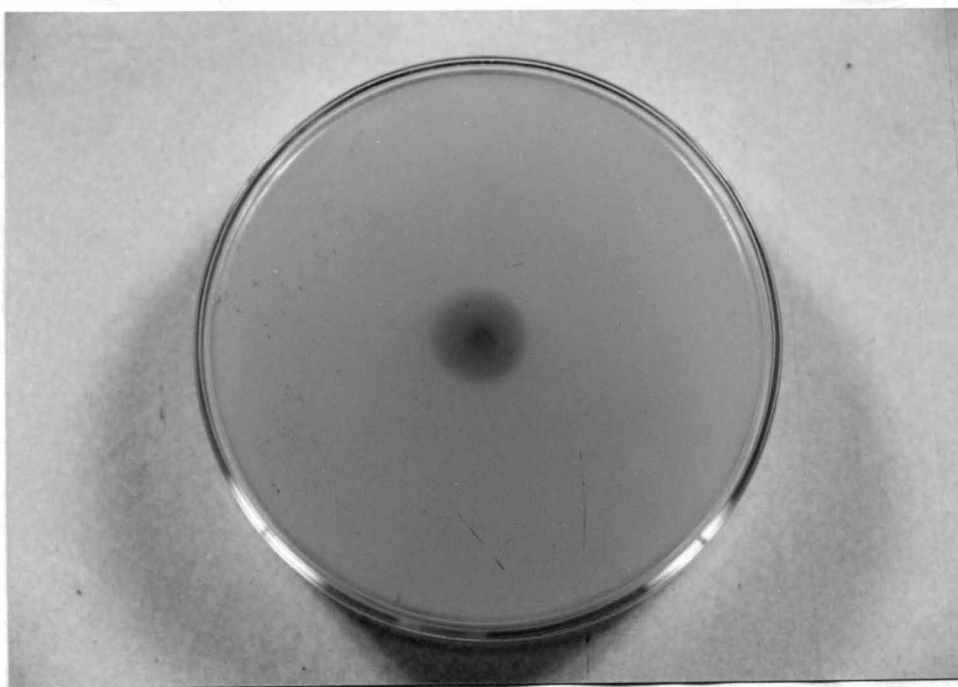
5.1.6 Uji In Vitro hasil Produksi Antibodi Poliklonal

Pada uji in vitro ini diperoleh hasil seperti yang tercantum pada gambar 5.5. Antiserum (antibodi poliklonal) yang dihasilkan dapat menghambat pertumbuhan kuman *S. ml(c) lokal*.

Uji in vitro ini dilakukan dengan modifikasi metode *Cylinder & well* (Wistreich & Leichtman, 1980), yang dikerjakan secara poured plate

Uji *in vitro* ini dilakukan dengan modifikasi metode *Cylinder & well* (Wistreich and Leichtman, 1980), yang dikerjakan secara poured plate pada medium TYC padat. Pada uji ini digunakan koloni *S.m1(c) lokal* sebagai antigen, sedang antibodinya adalah antibodi poliklonal hasil dari penyuntikan kelinci terhadap protein 67 k Da.

Pada uji ini plat (cawan) TYC medium yang telah ditanami kuman *S.m1(c) lokal* dan ditambahkan antibodi poliklonal ditengahnya diinkubasikan pada kondisi anaerob. Setelah 2x24 jam hasilnya terlihat bahwa disekitar lubang sumuran yang diisi dengan antibodi poliklonal terjadi suatu bentuk zona yang buram mengelilingi sumuran tersebut. Pada daerah (zona) buram tersebut setelah dilakukan kultur ulang ternyata tidak didapat pertumbuhan kuman. Hal ini bisa diartikan bahwa pada zona tersebut terjadi proses presipitasi dari antibodi poliklonal yang dapat menghambat pertumbuhan dari kuman *S.m1(c) lokal*.



Gambar 5.6 Uji in vitro dengan modifikasi dari *Cylinder & well Methode* (Wistreich and Leichtman, 1980) untuk melihat potensi dari antiserum yang terbentuk terhadap pertumbuhan kuman *S. ml(c) lokal*.

Pada uji ini terjadi proses presipitasi anti serum (antibodi poliklonal), sehingga pertumbuhan kuman *S.m l (c) lokal* terhambat.

5.2 Analisa Hasil Penelitian

5.2.1 Analisa hasil Pembuatan Protein

Pada isolasi protein yang peneliti lakukan menghasilkan protein dengan berat molekul 67 k Da yang dominan, walaupun ada juga beberapa protein dengan berat molekul yang lebih rendah ditemukan. Protein lain selain 67 k Da ini tidak dominan karena di dalam pewarnaan Silver hanya terlihat sangat tipis, oleh karena itu tidak

dilakukan uji imunobloting. Dengan demikian protein lain selain 67 k Da tersebut belum diketahui apakah imunogenik atau tidak.

Pada pemotongan gel dari hasil elektroforesis dilakukan dengan cara memotong gel pada area protein berat molekul 67 k Da. Cara ini merupakan estimasi berdasarkan pengukuran letak protein.

Akan tetapi setelah dilakukan proses purifikasi dan dilakukan uji ulang elektroforesis dan uji imunobloting, maka bisa diyakini bahwa protein tersebut benar-benar mempunyai berat molekul 67 k Da.

Pengukuran kadar protein yang terbentuk dari hasil purifikasi (dengan cara pemotongan gel seperti diatas) dan setelah dilakukan dialisis juga cukup tinggi yaitu 1,27 g%. Hasil tersebut diperoleh dari uji dengan spektrofotometer dengan metode Lowry.

5.2.2 Analisa hasil Pembuatan Vaksin dan Vaksinasi pada hewan coba.

Dalam pembuatan vaksin kadar protein yang diberikan / dibuat mempunyai kadar yang maksimum untuk kelinci yaitu 800 µg.

Dengan demikian diharapkan nantinya dapat menghasilkan antiserum dengan titer yang tinggi pula.

Pemberian ajuvan diharapkan dapat memperbesar respons imun, menambah area permukaan antigen dan memperlama penyimpanan antigen (protein 67 k Da) dalam tubuh.

Metode penyuntikan (vaksinasi) pada kelinci dilakukan dengan cara subkutan. Hal ini dilakukan karena cara ini mempunyai kelebihan yaitu bahan antigen dapat bertahan lebih lama berada dalam tubuh sehingga dapat memberi waktu pembentukan antibodi baik yang dari kelenjar getah bening maupun dari limfe dan tidak mudah memberikan efek toksis dibanding dengan cara intravenus.

Selang waktu pemberian booster dua minggu adalah masa pembentukan antibodi dalam fase *plateau* dimana jumlah antibodi yang terbentuk dan yang diurai mengalami jumlah yang stabil, sehingga bila diberikan booster dalam jumlah yang cukup, maka antibodi yang ada dapat mengikat antigen yang diberikan dan sisa antigen yang belum berikatan dengan antibodi akan merangsang pembentukan antibodi.

5.2.3 Analisa hasil Uji ELISA

Ada dua tahap yang dilakukan dalam uji ELISA yaitu uji standarisasi untuk menentukan kadar antigen (protein 67 k Da) yang sesuai terhadap antibodi IgG dengan uji papan catur. Sedang uji yang lain adalah uji ELISA untuk menentukan titer dari antiserum kelinci (produk antibodi poliklonal) yang dihasilkan baik pada waktu dilakukan vaksinasi, booster I, booster III ataupun booster III sehingga didapat kurva kenaikan titernya.

Pada Uji standarisasi menentukan kadar protein 67 k Da dengan uji papan catur ternyata hasilnya (pada tabel 5.1) dapat disimpulkan

bahwa jumlah kadar protein yang paling sesuai terhadap antibodi Ig G adalah 7 μ g.

Sedangkan pada uji titrasi dari pembentukan antibodi poliklonal memberikan hasil kenaikan yang berarti dari pemberian vaksinasi hingga pemberian booster terakhir.

Pembacaan hasil nilai absorban pada uji ELISA ini sangat relatif dan dapat berubah dari pembacaan satu plat mikro dengan plat mikro lainnya walaupun diberikan bahan yang sama. Untuk itu perlu dalam setiap pembacaan pada satu plat mikro dibuat kontrol tersendiri. Hal ini dimaksudkan untuk menghindari kekeliruan interpretasi pembacaan hasil.

Dalam menentukan nilai titer dari anti serum ini memerlukan banyak sekali pengenceran, sehingga digunakan plat mikro yang berlainan pada pembacaanya. Tetapi hal ini dapat diantisipasi dengan mencantumkan pembuatan kontrol pada setiap plat mikro.

Nilai pembacaan interpretasi minimal adalah satu setengah kali dari nilai kontrol pada absorban yang terbaca.

Nilai pembacaan dari ELISA reader pada absorban dari masing-masing antiserum yang diperoleh dibandingkan dengan nilai kontrol dan ternyata memberikan hasil seperti yang tercantum pada tabel 5.2., yaitu titer dari antibodi poliklonal mengalami kenaikan.

- Setelah 30 menit reaksi enzim dihentikan dengan menambahkan NaOH pekat dengan ukuran 50 μ l pada tiap sumuran.
- Dengan adanya perubahan warna, maka dibaca pada *Elisa reader* dengan panjang gelombang (OD) 405 nm (Bergmeyer, 1986).

Cara Pengujian Titrasi dengan ELISA

Cara pengujian titrasi dengan ELISA hampir sama dengan cara standarisasi ELISA (Papan Catur) seperti diatas, hanya bedanya pada : Antiserum yang akan dilakukan inkubasi terlebih dahulu dilakukan penipisan dengan larutan dapar untuk *blocking* mulai 1/100 hingga 1/300.000. Kemudian masing masing penipisan tersebut dimasukkan dalam sumuran sebanyak 100 μ l dan dilakukan inkubasi seperti cara di atas dan seterusnya (Crowther, 1995).

4.7.5 Pemanenan Antibodi Poliklonal

Pemanenan dilakukan setelah booster III yang telah mencapai titer tinggi, yaitu dengan mengambil \pm 10 ml pada tiap kelinci setiap kali panen.

Bila akan dipanen lagi dapat dilakukan booster ulang (hingga mencapai titer tertinggi seperti diatas).

Pengambilan darah bisa dilakukan melalui cuping telinga.

4.7.6 Uji In vitro

Uji in vitro dilakukan pada lempeng agar TYC dengan ketebalan 3-5mm.

Lempeng agar TYC (poured plate) tersebut dibuat sumuran dengan diameter \pm 3-5 mm dan diisi dengan anti serum (antibodi polikonal). Di atas antiserum ditutup lagi dengan agar yang masih cair (suhu 50°C) dan dibiarkan mengeras. Kemudian diinkubasikan selama 2x24 jam. Setelah itu dilakukan pembacaan lebar zone (modifikasi *Cylinder and well methode*, Wistreich and Lechtman, 1980).

Adapun caranya adalah sebagai berikut:

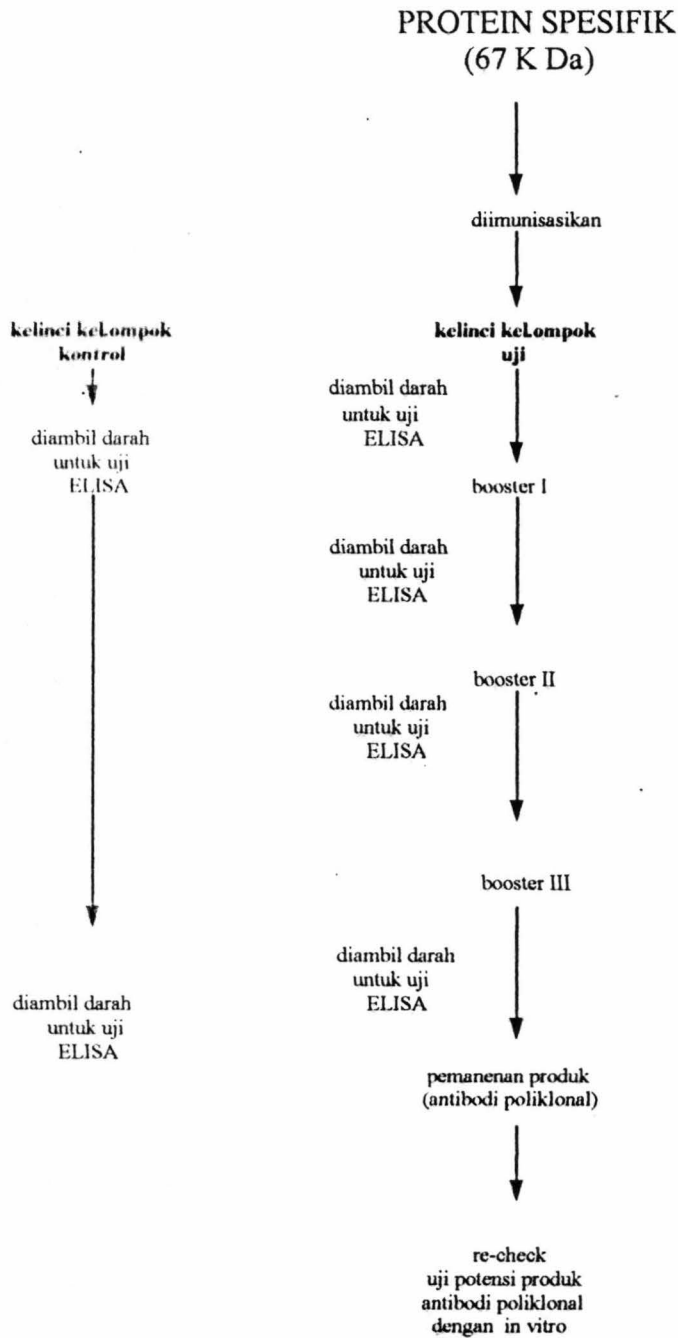
Dibuat agar cair dari agar TYC dengan volume 30 ml, suhu agar didinginkan hingga mencapai 50°C. Kemudian ditambahkan kultur *S. mutans* yang berusia 18-24 jam sebanyak 3 ml, dicampur hingga homogen. Setelah homogen dituang pada cawan petri dan dibiarkan memadat. Lempeng agar tersebut dibuat sumuran dengan diameter \pm 3-5 mm. Pada lubang sumuran tersebut ditutup dengan TYC cair sebanyak \pm satu tetes pipet pastur dan ditunggu hingga memadat. Setelah memadat diisi \pm 10 μ l anti serum kelinci (antibodi poliklonal), hingga volume kira-kira mencapai ketinggian $\frac{3}{4}$ tinggi lubang sumuran. Kemudian diatas lempeng tersebut dituangkan suspensi dari agar TYC cair dan kuman *S. ml(c) lokal* dengan suhu \pm 50°C dan dibiarkan memadat.

Kemudian lempeng diinkubasikan pada suasana *anaerob* pada suhu 37°C selama 2X24jam (modifikasi *Cylinder and well methode*, Wistreich and Leichtman, 1980).

Bila disekitar sumuran tidak ditumbuhi kuman tersebut (zona agak berkabut), berarti antibodi poliklonal tersebut memang efektif untuk mencegah kolonisasi *S. ml(c) lokal*.

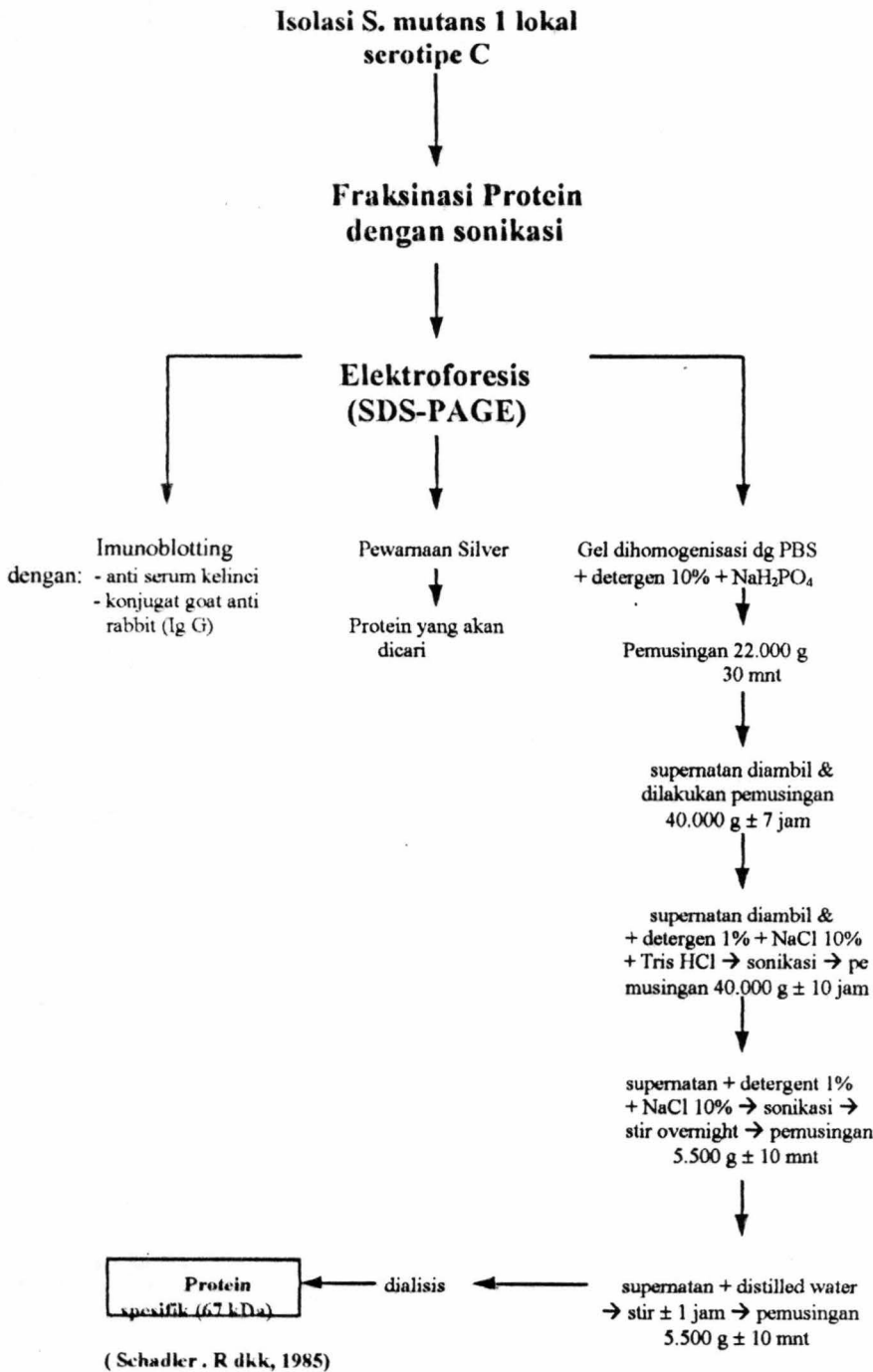
Daerah berkabut disekitar sumuran diuji pertumbuhan kumannya dengan kultur ulang untuk memastikan ada atau tidaknya pertumbuhan kuman tersebut.

PROSEDUR PELAKSANAAN PENELITIAN



gambar 4.1 Skema Prosedur Pelaksanaan Penelitian

PROSES PENENTUAN / PURIFIKASI PROTEIN SPESIFIK
DARI *S.m 1 (c) LOKAL*



gambar 4.2 Proses Penentuan Protein Spesifik.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Pemecahan Sel dan dinding sel *S. mutans*

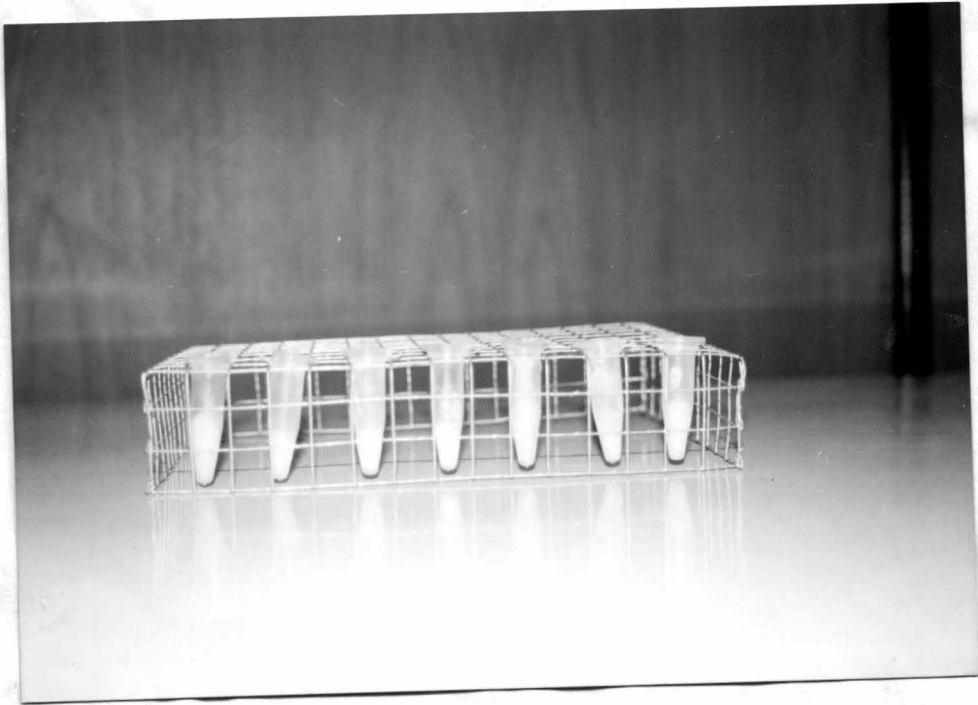
Untuk mendapatkan protein pada dinding sel *S. ml(c) lokal* perlu dilakukan pemecahan pada dinding selnya.

Pada dinding sel ini terdapat protein imunogenik yang mampu menyebabkan kerusakan gigi (seperti yang telah dituliskan di depan bahwa bakteri *S. mutans* adalah sebagai bakteri penyebab utama terjadinya karies gigi).

Koloni-koloni *S. mutans* yang diambil dari pertumbuhan pada media padat TYC dibuat suspensi dengan PBS dan dimasukkan dalam *microtube* (dengan ukuran kira-kira jumlah koloni *S. mutans* yang tumbuh pada satu cawan petri ditambah dengan 0,5 ml PBS).

Suspensi tersebut dilakukan sonikasi (untuk dilakukan pemecahan dinding sel) dengan kecepatan getar 30 getar/ detik.

Suspensi *S. mutans* dilakukan pemusingan dan diambil supernatannya (gambar 5.1)



Gambar 5.1^o Supernatan hasil pemecahan sel dan dinding sel *S. ml(c) lokal* dengan sonikasi (kecepatan getar 30/det) yang telah dilakukan pemusingan (7000 rpm selama 10 menit)

5.1.2 Hasil Elektroforesis dan Pewarnaan Silver

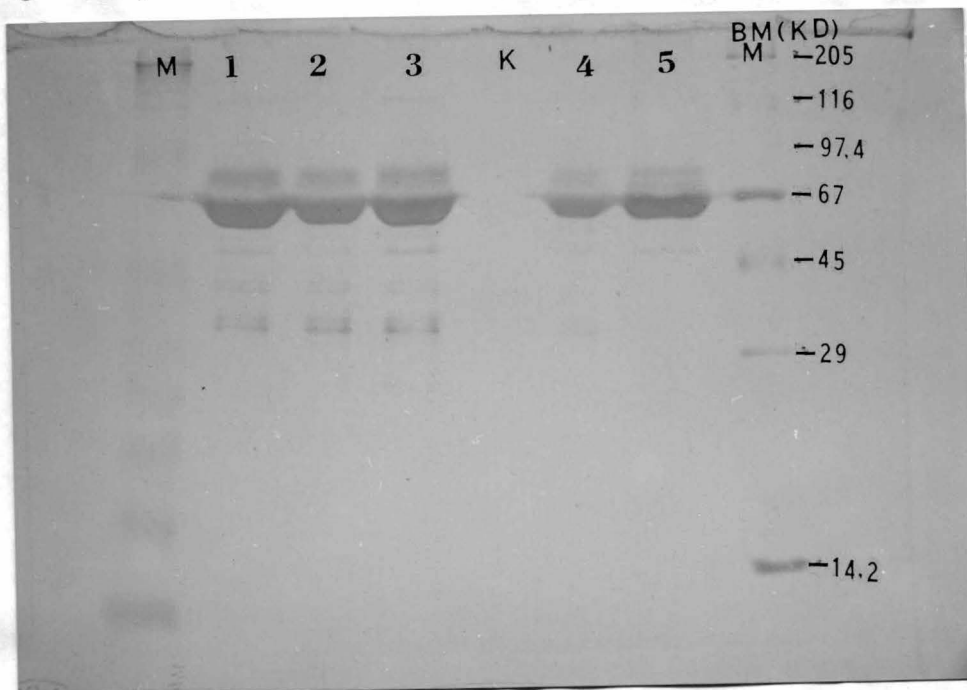
Supernatan hasil pemusingan suspensi *S. mutans* yang telah terlepas dinding selnya dilakukan elektroforesis untuk memisahkan fraksi-fraksi protein yang terdapat pada dinding sel berdasar berat molekul.



Fraksi protein dengan berat molekul besar akan terhenti pada lajur paling atas. Sedangkan berat molekul yang lebih kecil, letak proteinnnya pada lajur gel elektroforesis lebih rendah. Dengan pewarnaan Silver, protein terlihat membentuk pita-pita berwarna coklat tua.

Dari hasil supernatan pemecahan dinding sel *S.m 1 (c) lokal* setelah diwarnai, maka diperoleh protein yang dominan adalah protein dengan berat molekul 67 k Da.

Kecuali berat molekul diatas pada lajur-lajur tersebut juga terwarnai pita-pita protein kira-kira dengan berat molekul 55 k Da, 40 k Da dan 35 k Da yang sangat tipis (dibandingkan dengan *marker* NEN pada lajur paling kanan).



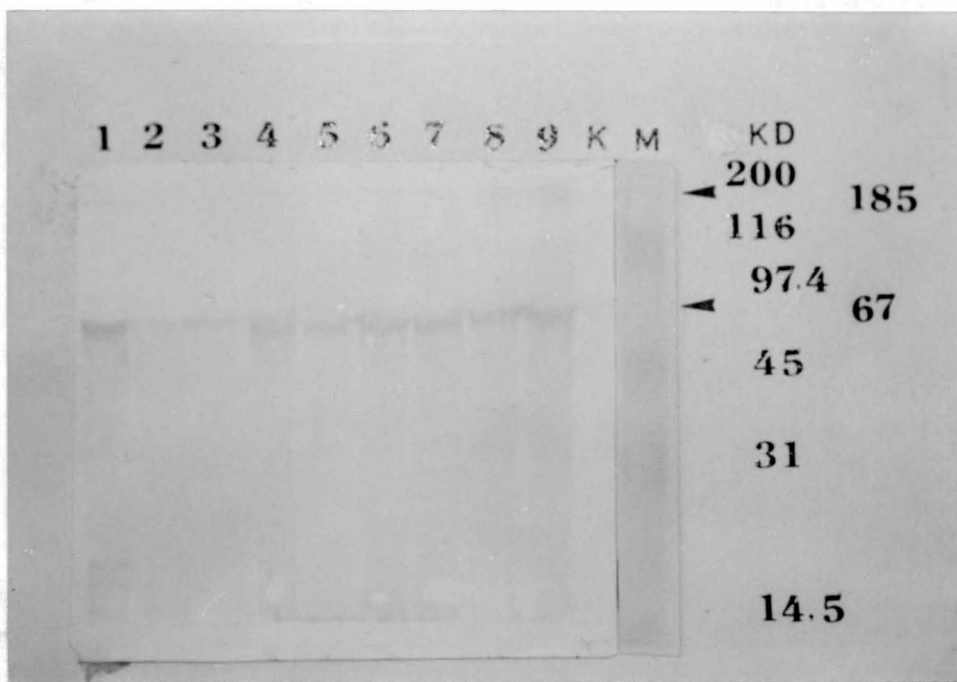
Gambar 5.2 Pita-pita Protein dari hasil elektroforesis supernatan pemecahan dinding sel *S.m 1(c) lokal* yang telah diwarnai dengan Silver. Pita yang dominan pada hasil tersebut adalah protein dengan berat molekul 67 k Da, sedang pita-pita dengan berat molekul yang lainnya terwarnai sangat tipis.

5.1.3 Hasil Immunobloting

Untuk menentukan spesifisitas dari protein *S.m 1(c) lokal* yang imunogenik (protein dengan berat molekul dominan 67 k Da) tersebut perlu dilakukan immunobloting. Protein yang tergambar pada gel yang benar-benar spesifik dengan antibodi yang digunakan akan tercatat dengan *fast red* pada nitroselulose.

Pada penelitian ini digunakan antibodi pertama dari antiserum kelinci yang telah disuntik dengan *S. m(c) 1 lokal*, sedang antibodi kedua digunakan konjugat *fragment IgG goat anti rabbit*.

Hasilnya protein 67 k Da memang benar protein yang spesifik terhadap antibodi tersebut.



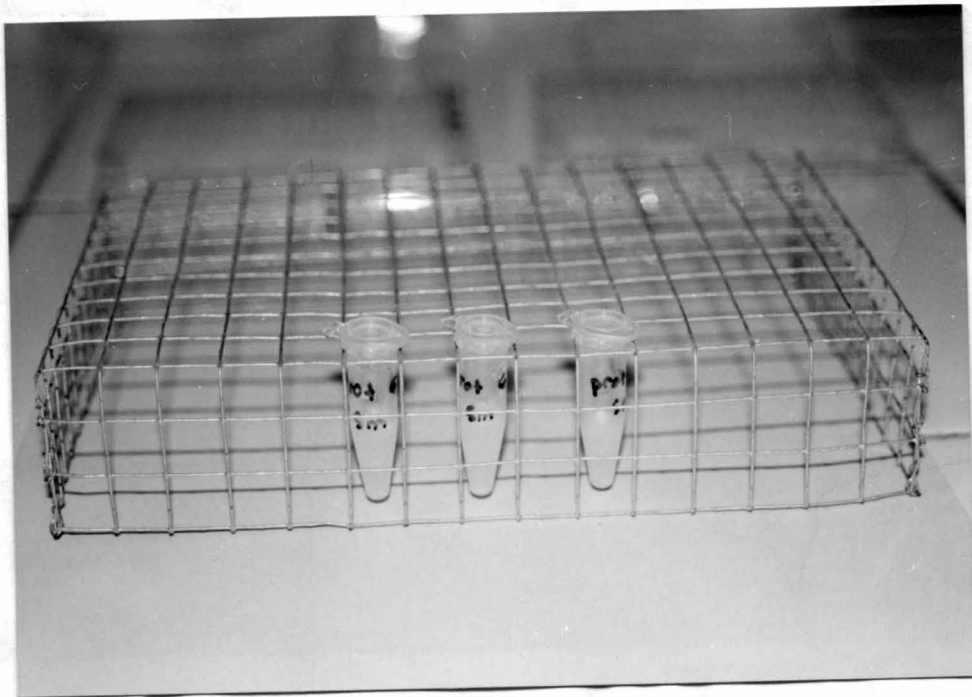
Gambar 5.3 Fraksi protein pada western blot yang direaksikan dengan Antibodipoliklonal dari kelinci dan divisualisasikan dengan Pewarnaan Fast red.

5.1.4 Hasil Purifikasi dan Pooling Protein

Supernatan dari suspensi *S. m(c)1 lokal* dari hasil pemecahan protein diatas diperbanyak dengan cara dilakukan elektroforesis sehingga banyak dihasilkan gel-gel elektroforesis.

Pada setiap gel tersebut kita potong pada area berat molekul yang dikehendaki (67 k Da) dan dilakukan homogenisasi dengan bahan-bahan kimia (detergen 10%, NaH_2PO_4 , NaCl 10%, Tris HCl) sehingga dihasilkan protein yang dimaksud dan dilakukan dialisis.

Protein yang telah murni tersebut dilakukan pengujian kadar protein yang terbentuk, yang hasilnya mempunyai kadar 1,27 g%.



Gambar 5.4 Protein murni yang telah diperbanyak (67 k Da) dari hasil elektroforesis dengan memotong gel-gel dari protein pada area berat molekul 67 k Da yang kemudian dilakukan pemusingan dengan kecepatan tinggi yang berulang-ulang .

5.1.5 Hasil Vaksinasi dan Booster pada Kelinci

Protein yang telah jadi dibuat vaksin dan booster untuk disuntikkan pada kelinci dengan menambahkan *complete* dan *incomplete Freund's Adjuvant* dengan perbandingan tertentu.

Setelah disuntikkan pada kelinci hingga booster III pada masing-masing penyuntikan kelinci diambil darahnya untuk dilakukan uji titrasi terhadap antiserum (antibodi poliklonal) yang terbentuk dengan uji ELISA tidak langsung.

Langkah pertama untuk uji ELISA adalah pembuatan standaridisasi kadar protein dalam $\mu\text{g/ml}$ yang paling sesuai terhadap antibodi Ig G

Tabel 5.1 Nilai Rata-rata Absorban Uji Standardisasi ELISA dari Protein 67 kDa S. m 1(c) lokal terhadap antibodi IgG

Kadar Protein 67 kDa (dalam $\mu\text{g/ml}$)	Nilai rata-rata absorban Serum kelinci pada pengenceran		
	1/10	1/100	1/200
10 μg	0,5818	0,5643	0,471
8 μg	1,1895	0,5565	0,3725
7 μg	1,8228	0,7553	0,4828
6 μg	0,5033	0,4633	0,4698
5 μg	1,364	0,4783	0,4108
4 μg	0,7655	0,5723	0,4048
3 μg	1,1635	0,5855	0,437
2 μg	0,3888	0,5065	0,5025

Dari tabel diatas dapat ditentukan kadar protein yang paling sesuai untuk penentuan titer dengan uji ELISA, kemudian dilakukan uji penentuan titer antiserum kelinci dari hasil booster.

Setelah dilakukan penentuan titer diperoleh hasil seperti terlihat pada tabel 5.2 dan tergambar pada grafik 5.1

Tabel 5.2 Nilai titer Antibodi Poliklonal dari Kelinci yang disuntik dengan Protein 67 k Da *S. m 1(c) lokal*

PENYUNTIKAN	NILAI TITER
Tanpa Vaksinasi	1/60
Vaksinasi	1/30.000
Booster I	1/70.000
Booster II	1/140.000
Booster III	1/240.000

Keterangan:

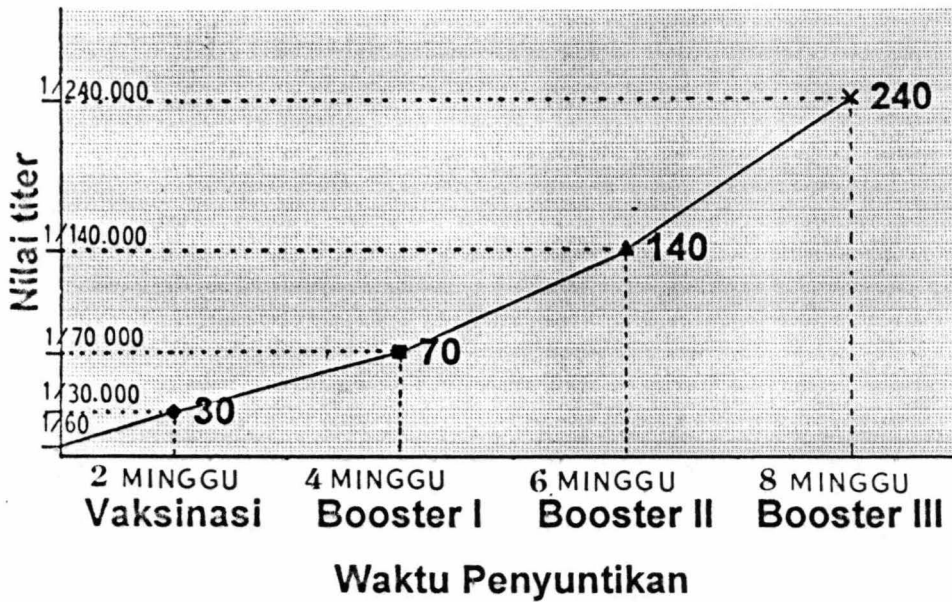
Tanpa vaksinasi = dilakukan pengambilan darah / serum sebelum dilakukan vaksinasi.

Vaksinasi = dilakukan pengambilan darah 2 minggu setelah dilakukan vaksinasi.

Booster I = dilakukan pengambilan darah 2 minggu setelah dilakukan booster I.

Booster II = dilakukan pengambilan darah 2 minggu setelah dilakukan booster II.

Booster III = dilakukan pengambilan darah 2 minggu setelah booster III.



Grafik 5.1 Kenaikan titer antibodi Kelinci yang disuntik dengan Protein 67 kDa dan dilakukan booster setiap 2 minggu sekali dengan dosis yang sama. Pengambilan sampel darah untuk pengukuran dilakukan 2 minggu setelah penyuntikan.

Keterangan:

Nilai titer pada grafik dalam satu per ribuan

Tabel 5.3. Nilai Absorban dari Penipisan Booster III Kelinci yang disuntik dengan Protein 67 kDa *S. m 1(c) lokal*

Booster III	
Penipisan	Nilai absorban
1/100.000	0,2103
1/120.000	0,2393
1/140.000	0,2463
1/160.000	0,2673
1/180.000	0,2778
1/200.000	0,2803
1/220.000	0,2901
1/240.000	0,3123
1/260.000	0,3333
1/280.000	0,3437
1/300.000	0,3473
1/320.000	0,4147

Keterangan :

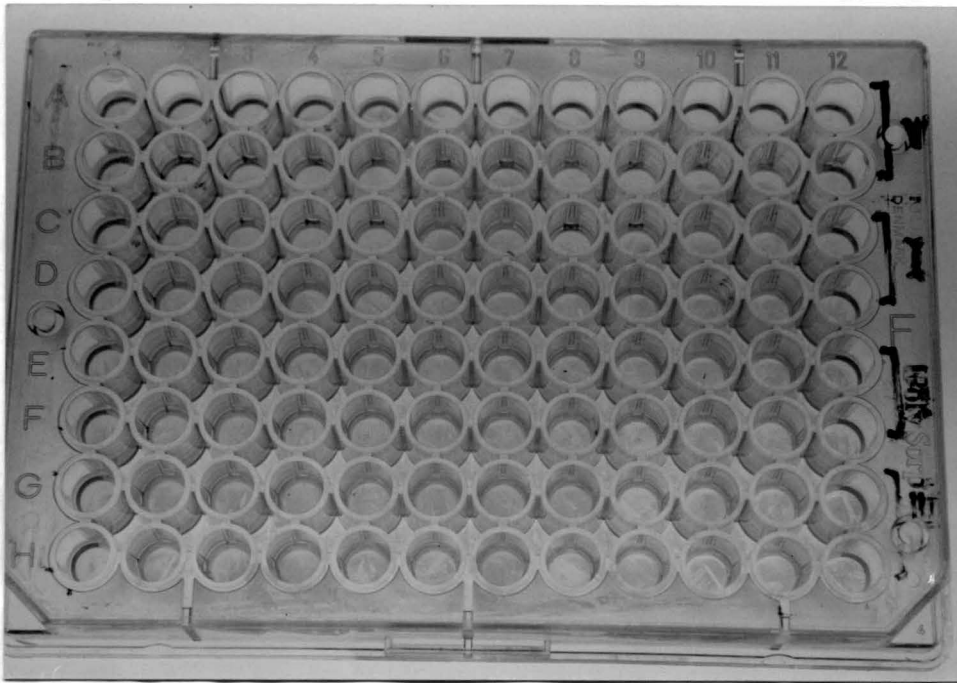
Nilai rata-rata kontrol = 0,2055

Cut of value = 1,5 x rata-rata kontrol

= 0,30825

Nilai pada absorban unit yang memenuhi cut of value adalah pada penipisan 1/240.000.

Jadi penipisan tertinggi pada Booster III adalah 1/240.000



Gambar 5.5. Hasil Uji ELISA dari anti serum kelinci dua minggu setelah Vaksinasi (V), booster I(I), booster II(II) ,booster III (III). ditandai dengan perubahan warna kuning secara fisik terlihat penipisan semakin tinggi dengan penambahan dilakukannya booster.

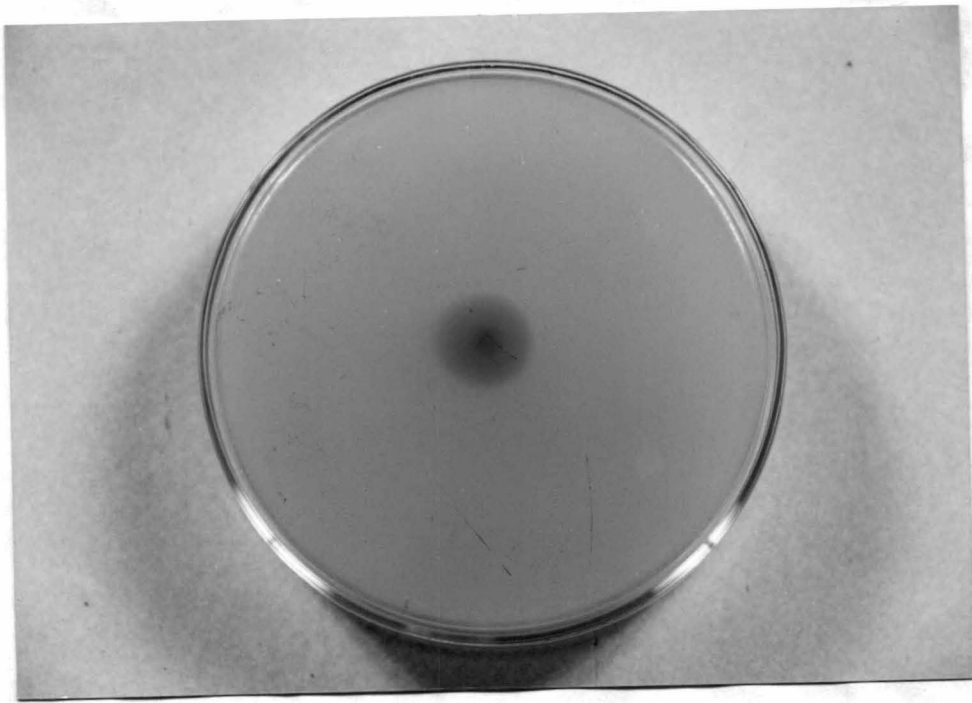
5.1.6 Uji In Vitro hasil Produksi Antibodi Poliklonal

Pada uji in vitro ini diperoleh hasil seperti yang tercantum pada gambar 5.5. Antiserum (antibodi poliklonal) yang dihasilkan dapat menghambat pertumbuhan kuman *S. ml(c) lokal*.

Uji in vitro ini dilakukan dengan modifikasi metode *Cylinder & well* (Wistreich & Leichtman, 1980), yang dikerjakan secara poured plate

Uji in vitro ini dilakukan dengan modifikasi metode *Cylinder & well* (Wistreich and Leichtman, 1980), yang dikerjakan secara poured plate pada medium TYC padat. Pada uji ini digunakan koloni *S.m1(c) lokal* sebagai antigen, sedang antibodinya adalah antibodi poliklonal hasil dari penyuntikan kelinci terhadap protein 67 k Da.

Pada uji ini plat (cawan) TYC medium yang telah ditanami kuman *S.m1(c) lokal* dan ditambahkan antibodi poliklonal ditengahnya diinkubasikan pada kondisi anaerob. Setelah 2x24 jam hasilnya terlihat bahwa disekitar lubang sumuran yang diisi dengan antibodi poliklonal terjadi suatu bentuk zona yang buram mengelilingi sumuran tersebut. Pada daerah (zona) bram tersebut setelah dilakukan kultur ulang ternyata tidak didapat pertumbuhan kuman. Hal ini bisa diartikan bahwa pada zona tersebut terjadi proses presipitasi dari antibodi poliklonal yang dapat menghambat pertumbuhan dari kuman *S.m1(c) lokal*.



Gambar 5.6 Uji in vitro dengan modifikasi dari *Cylinder & well Methode* (Wistreich and Leichtman, 1980) untuk melihat potensi dari antiserum yang terbentuk terhadap pertumbuhan kuman *S. ml(c) lokal*.

Pada uji ini terjadi proses presipitasi anti serum (antibodi poliklonal), sehingga pertumbuhan kuman *S.m l (c) lokal* terhambat.

5.2 Analisa Hasil Penelitian

5.2.1 Analisa hasil Pembuatan Protein

Pada isolasi protein yang peneliti lakukan menghasilkan protein dengan berat molekul 67 k Da yang dominan, walaupun ada juga beberapa protein dengan berat molekul yang lebih rendah diketemukan. Protein lain selain 67 k Da ini tidak dominan karena di dalam pewarnaan Silver hanya terlihat sangat tipis, oleh karena itu tidak

dilakukan uji imunobloting. Dengan demikian protein lain selain 67 k Da tersebut belum diketahui apakah imunogenik atau tidak.

Pada pemotongan gel dari hasil elektroforesis dilakukan dengan cara memotong gel pada area protein berat molekul 67 k Da. Cara ini merupakan estimasi berdasarkan pengukuran letak protein.

Akan tetapi setelah dilakukan proses purifikasi dan dilakukan uji ulang elektroforesis dan uji imunobloting, maka bisa diyakini bahwa protein tersebut benar-benar mempunyai berat molekul 67 k Da.

Pengukuran kadar protein yang terbentuk dari hasil purifikasi (dengan cara pemotongan gel seperti diatas) dan setelah dilakukan dialisis juga cukup tinggi yaitu 1,27 g%. Hasil tersebut diperoleh dari uji dengan spektrofotometer dengan metode Lowry.

5.2.2 Analisa hasil Pembuatan Vaksin dan Vaksinasi pada hewan coba.

Dalam pembuatan vaksin kadar protein yang diberikan / dibuat mempunyai kadar yang maksimum untuk kelinci yaitu 800 µg.

Dengan demikian diharapkan nantinya dapat menghasilkan antiserum dengan titer yang tinggi pula.

Pemberian ajuvan diharapkan dapat memperbesar respons imun, menambah area permukaan antigen dan memperlama penyimpanan antigen (protein 67 k Da) dalam tubuh.

Metode penyuntikan (vaksinasi) pada kelinci dilakukan dengan cara subkutan. Hal ini dilakukan karena cara ini mempunyai kelebihan yaitu bahan antigen dapat bertahan lebih lama berada dalam tubuh sehingga dapat memberi waktu pembentukan antibodi baik yang dari kelenjar getah bening maupun dari limfe dan tidak mudah memberikan efek toksis dibanding dengan cara intravenus.

Selang waktu pemberian booster dua minggu adalah masa pembentukan antibodi dalam fase *plateau* dimana jumlah antibodi yang terbentuk dan yang diurai mengalami jumlah yang stabil, sehingga bila diberikan booster dalam jumlah yang cukup, maka antibodi yang ada dapat mengikat antigen yang diberikan dan sisa antigen yang belum berikatan dengan antibodi akan merangsang pembentukan antibodi.

5.2.3 Analisa hasil Uji ELISA

Ada dua tahap yang dilakukan dalam uji ELISA yaitu uji standarisasi untuk menentukan kadar antigen (protein 67 k Da) yang sesuai terhadap antibodi IgG dengan uji papan catur. Sedang uji yang lain adalah uji ELISA untuk menentukan titer dari antiserum kelinci (produk antibodi poliklonal) yang dihasilkan baik pada waktu dilakukan vaksinasi, booster I, booster III ataupun booster III sehingga didapat kurva kenaikan titernya.

Pada Uji standarisasi menentukan kadar protein 67 k Da dengan uji papan catur ternyata hasilnya (pada tabel 5.1) dapat disimpulkan

bahwa jumlah kadar protein yang paling sesuai terhadap antibodi Ig G adalah 7 μ g.

Sedangkan pada uji titrasi dari pembentukan antibodi poliklonal memberikan hasil kenaikan yang berarti dari pemberian vaksinasi hingga pemberian booster terakhir.

Pembacaan hasil nilai absorban pada uji ELISA ini sangat relatif dan dapat berubah dari pembacaan satu plat mikro dengan plat mikro lainnya walaupun diberikan bahan yang sama. Untuk itu perlu dalam setiap pembacaan pada satu plat mikro dibuat kontrol tersendiri.

Hal ini dimaksudkan untuk menghindari kekeliruan interpretasi pembacaan hasil.

Dalam menentukan nilai titer dari anti serum ini memerlukan banyak sekali pengenceran, sehingga digunakan plat mikro yang berlainan pada pembacaanya. Tetapi hal ini dapat diantisipasi dengan mencantumkan pembuatan kontrol pada setiap plat mikro.

Nilai pembacaan interpretasi minimal adalah satu setengah kali dari nilai kontrol pada absorban yang terbaca.

Nilai pembacaan dari ELISA reader pada absorban dari masing-masing antiserum yang diperoleh dibandingkan dengan nilai kontrol dan ternyata memberikan hasil seperti yang tercantum pada tabel 5.2., yaitu titer dari antibodi poliklonal mengalami kenaikan.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Proses Isolasi Protein

6.1.1 Proses Elektroforesis

Ekstraksi protein dari suatu kuman memerlukan tahap-tahap yang cukup panjang dan memerlukan keakuratan yang cukup tinggi dalam bekerja. Hal ini diperlukan untuk mendapatkan hasil protein yang benar-benar diinginkan dan juga menghindari kerusakan protein pada proses tersebut. Pada kuman *Streptococcus mutans* protein yang akan diekstraksi banyak terdapat pada dinding selnya yang sangat tebal. Untuk itu juga perlu digunakan cara yang lebih khusus yaitu dengan menggunakan cara mekanis seperti sonikasi, *glass homogenizer*, *blender*, *ultrasonic probe* atau *vibrating glass bead mill*. Pada penelitian ini digunakan cara pemecahan dinding sel dengan sonikasi karena penggunaan yang lebih mudah dan dapat diatur kecepatan getarnya secara mudah pula. Pengaturan kecepatan ini juga berpengaruh pada sempurna atau tidaknya pemecahan sel, kecuali itu larutan dapar yang digunakan juga berpengaruh dalam memperoleh fraksinasi protein. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan variasi kecepatan untuk mendapatkan hasil yang optimum. Kemudian dilakukan pemusingan untuk melepas bahan-bahan residu yang tidak larut, dan supernatan yang diambil untuk bahan penelitian selanjutnya (Scopes, 1987).

Untuk melakukan pemecahan dinding sel mungkin cara ini dianggap lebih aman dibandingkan menggunakan enzim-enzim seperti protease, karena protease ini dapat berpengaruh pada pengurangan potensi imunogenik dari protein-protein yang terdapat pada dinding sel. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Forester, Hunter dan Knox (1983), yang menyatakan bahwa pengerjaan fraksinasi dinding sel dengan protease akan mengakibatkan kehilangan kemampuan proteksi dari kera yang telah diimunisasi dengan protein yang berasal dari fraksinasi dengan cara tersebut.

Alasan lain pemecahan dinding sel menggunakan cara sonikasi adalah bahwa pada kuman gram positif (*S. mutans*) mempunyai dinding sel yang lebih kuat melekat pada sel kuman, sehingga diperlukan getaran yang cukup kuat.

Ada beberapa macam berat molekul protein di dalam *S mutans* yang dapat digunakan (yang berpotensi) untuk pembuatan vaksin karies gigi, seperti yang dituliskan oleh Krasse (1987) dalam bukunya, bahwa ada beberapa berat molekul protein tertentu yang dapat digunakan sebagai bahan vaksin, antara lain adalah protein I/II dengan BM 185 k Da, protein A dengan BM 29 k Da, protein IF dengan BM 145 k Da dan berat molekul-berat molekul lainnya yang sudah terdeteksi yang berpotensi untuk digunakan sebagai bahan pembuatan vaksin karies gigi.

Pada gel elektroforesis yang peneliti kerjakan, pita protein dengan berat molekul 67 k Da adalah protein yang dominan dan imunogenik, sedang protein dengan berat molekul 185 k Da yang pertama kali dan yang biasa digunakan sebagai acuan pembuatan vaksin di Inggris tidak terlihat pita-pitanya.

Hal ini secara teknis bisa disebabkan oleh kemungkinan-kemungkinan sebagai berikut:

Pertama, yaitu dikarenakan dari kecepatan getar alat sonikasi yang digunakan dalam proses pemecahan protein di dalam penelitian ini terlalu tinggi. Dengan demikian dapat memisahkan berat molekul 185 k Da yang merupakan molekul protein dengan dua sisi determinan antigenik yang dapat terpisah menjadi berat molekul yang berbeda. Hal ini sesuai dengan penelitian yang pernah dilakukan oleh Lehner (1992) yang menyebutkan bahwa protein dengan berat molekul 185 k Da merupakan satu kesatuan antara antigen I dengan berat molekul 150 k Da dan antigen II dengan berat molekul 48 k Da yang menjadi satu kesatuan yang disebut dengan antigen I/II. Antigen I dan antigen II dari *Streptococcus mutans* ini terlihat menjadi dua determinan yang keberadaanya pada umumnya dalam bentuk molekul tunggal 185 k Da atau yang disebut juga dengan antigen I/II.

Sedangkan pada pita elektroforesis dari penelitian yang dikerjakan oleh peneliti, protein dengan berat molekul 150 k Da dan 48 k Da tidak terlihat pula. Sehingga dapat dikatakan bahwa asumsi untuk

alasan ini tidak berlaku dalam penelitian ini.

Kemungkinan kedua, bahwa isolat kuman yang digunakan mengalami mutasi sehingga berat molekul 185 kDa tidak tergambar di dalam pita-pita dari gel elektroforesis.

Mutasi ini dapat disebabkan oleh penanaman ulang kuman *S. mutans* yang sudah dilakukan berkali-kali sehingga struktur biokimia dari dinding selnya mengalami perubahan. Hal ini seperti yang diungkapkan oleh Koga dkk (1989) yaitu dengan dilakukannya penanaman ulang yang berkali-kali, maka akan merubah struktur biokimia dari dinding sel kuman *S. mutans* yang berakibat produksi antigen I/II menurun.

Sedang pada penelitian ini digunakan stok kuman *S. mutans* yang baru, jadi kemungkinan kedua juga tidak tepat untuk penelitian ini.

Kemungkinan ketiga adalah bahwa proses pemurnian dengan kromatografi yang dilakukan sebelum proses elektroforesis memberikan hasil gambaran pada gel yang berbeda bila dibanding dengan proses pemurnian yang dilakukan setelah elektroforesis.

Untuk lebih jelasnya akan dibahas dalam proses purifikasi dan amplifikasi protein.

Menurut penelitian-penelitian di negara maju dan di negara kita yang pernah dilakukan penelitian oleh Soerodjo (1989), bahwa *S. mutans* sendiri walaupun sama-sama mempunyai serotipe c, dan sebagai penyebab utama karies gigi tetapi mempunyai karakteristik yang berbeda dari negara satu dengan negara lain. Hal ini

memungkinkan bahwa di Indonesia mempunyai *S. mutans* dengan berat molekul protein yang spesifik pula. Keadaan ini bisa dilihat dari beberapa penelitian yang dilakukan di negara maju, yang mana para peneliti tersebut mencoba membuat vaksin karies gigi dengan mempergunakan protein yang spesifik di daerahnya dengan berat molekul yang berbeda pula, misalnya peneliti Smith (1994) mempergunakan protein 59 k Da dari *S. mutans* sebagai bahan vaksin, Ray (1999) dari Alabama memurnikan protein dengan berat molekul 65 k Da dari fimbriae *S. mutans* untuk membuat vaksin karies gigi. Jadi tidak mengherankan bila di Indonesia (Surabaya) mempunyai protein dengan berat molekul 67 k Da yang spesifik dan karakteristik untuk pembuatan vaksin karies gigi.

6.1.2 Proses Purifikasi dan Pooling Protein

Pada proses ini diambil dari gel-gel hasil elektroforesis yang tidak dilakukan pewarnaan (gel transparan). Sedang pemotongan protein dengan berat molekul 67 k Da dilakukan berdasarkan ukuran pola gel yang telah diwarnai dengan Silver stain, sehingga gel dipotong berdasarkan pengukuran panjang dari ujung gel.

Hal ini dapat menimbulkan kekeliruan dalam pemotongan bila tidak diantisipasi dengan mengatur kecepatan laju dari protein dengan cara memberikan arus listrik, komposisi dan ukuran formulasi dari gel yang sama dari satu gel dengan gel yang lainnya, sehingga jarak

pengendapan protein dari berat molekul yang satu ke berat molekul yang lain dari gel ke gel sama, dan juga digunakan sampel yang sama. Seperti yang dituliskan oleh Goers (1993), bahwa pengaruh dari volt (E), arus listrik (I), tahanan (R) dan power (P) harus dipertimbangkan dalam analisa perpindahan protein selama proses elektroforesis. Pada proses ini gel bisa dipertimbangkan sebagai tahanan yang dilalui oleh perpindahan protein dengan kecepatan yang sesuai terhadap arus listrik.

Garfin (1990), juga menuliskan bahwa berat molekul protein yang diperkirakan dari pergerakan relatifnya dan terukur pada gel, pita-pita tunggalnya pada gel dapat digunakan sebagai standar pemurnian.

Untuk itu pada proses elektroforesis pada pekerjaan ini selalu dilakukan dengan sampel, kuat arus, formulasi dan ukuran gel yang sama.

Antisipasi lainnya untuk cara ini adalah dilakukannya proses elektroforesis ulang atau dengan melakukan *Western blotting* setelah dilakukan proses pemurnian, hingga pada hasil elektroforesis nantinya benar-benar hanya tergambar satu protein yang murni. Hal ini sesuai dengan salah satu tujuan untuk melakukan imunoblotting (*Western blot*) seperti yang dituliskan Goers (1993), yaitu mendeteksi keberadaan berat molekul antigen (protein) yang imunogenik dari gel elektroforesis.

Zander dan Lehner pada tahun 1980, dalam penelitiannya juga melakukan cara purifikasi terhadap *S. mutans* dengan cara yang sama seperti diatas dan dibandingkan cara pemurnian dengan kromatografi, ternyata pada gel yang telah diwarnai dengan *Coomassie blue* terdapat perbedaan keluarnya pita protein pada gel. Purifikasi yang menggunakan cara kromatografi protein dengan berat molekul 185 k Da dapat tergambar dengan jelas. Sedangkan purifikasi dengan memotong gel yang seperti peneliti lakukan , kemudian dilakukan ekstraksi dengan urea, ternyata tergambar protein 67 k Da yang dominan.

Cara purifikasi dengan kromatografi sebenarnya lebih banyak memakan waktu lebih, rumit dan biaya yang dikeluarkan juga lebih besar, dengan hasil yang dicapai hampir sama validitasnya dengan cara yang peneliti lakukan.

6.2 Pemilihan hewan coba, Pembuatan Vaksin dan Vaksinasi

Hewan coba

Hewan coba untuk pembuatan antibodi poliklonal digunakan kelinci karena pertimbangan bahwa binatang ini sangat baik untuk produksi antibodi poliklonal, seperti yang dituliskan oleh Harlow dan Lane pada tahun 1988 bahwa spesies binatang yang digunakan untuk memproduksi antiserum ada beberapa macam, diantaranya adalah kelinci, untuk alasan yang praktis serta pemilihan yang baik, maka kelinci dipakai untuk produksi rutin serum poliklonal.

Keuntungan lain pemilihan binatang kelinci ini adalah mudah untuk menangani, aman dan pemanenan antibodi yang dihasilkan dapat dilakukan pengulangan serta antibodi yang dihasilkan baik karakteristiknya dan mudah dimurnikan.

Dosis pembuatan vaksin disesuaikan dengan hewan coba yang dipakai. Pada penelitian ini vaksin dibuat untuk hewan coba kelinci dan diberikan dosis maksimum 800 μg untuk mendapatkan hasil poliklonal yang maksimum. Untuk memproduksi antibodi poliklonal, seperti yang dituliskan oleh Harlow dan Lane pada tahun 1988, pemberian suntikan pada waktu vaksinasi kelinci, bahan antigen yang digunakan maksimum hingga 800 μg . Pemberian vaksin yang mengandung *Freund's adjuvant* harus dilakukan lebih dari satu sisi penyuntikan, karena dapat menyebabkan terjadinya granuloma. Dengan alasan tersebut, maka sebaiknya *Freund's adjuvant* memang tidak digunakan pada manusia.

Freund's adjuvant adalah preparat berbentuk emulsi - air dalam minyak dan merupakan salah satu dari ajuvan yang terbaik yang dapat merangsang kuat dan memperlama waktu terjadinya respons pembentukan antibodi.

Pemberian ajuvan juga mempunyai kelebihan yang diperkirakan dapat memproteksi antigen dari eliminasi dan katabolisme yang terlalu cepat, sehingga dapat memperpanjang waktu pelepasan antigen (Zinsser, 1992).

Jenis ajuvan lainnya adalah *Alum adjuvant*, ajuvan ini berisi potasium aluminium fosfat. Ajuvan jenis ini biasanya hanya dipakai untuk vaksinasi tetanus dan diphteria toksoid pada manusia.

Vaksinasi dan booster dari bahan antigen (protein 67 k Da) disuntikkan secara sub kutan dengan pertimbangan bahwa cara ini akan membuat bahan antigen bertahan lebih lama di dalam tubuh inang, sehingga diharapkan dapat merangsang pembentukan antibodi lebih banyak (White and O'Neill, 1991).

6.3 Uji Titrasi dengan ELISA

Sampel berupa anti serum yang dikoleksi setiap kali setelah dilakukan vaksinasi hewan coba maupun booster diuji kenaikan titernya dengan ELISA.

Dari uji ini diperoleh hasil adanya kenaikan titer dari antiserum. Pengambilan sampel dimulai dua minggu setelah dilakukan vaksinasi dan antiserum ini nilai titernya mencapai 1/30.000, kemudian setelah dilakukan booster I, nilai titer dari antiserum naik menjadi 1/70.000. Pada booster II titer naik menjadi 1/140.000 dan pada booster terakhir titer naik mencapai 1/240.000.

Dengan melakukan uji setiap setelah melakukan booster, maka dapat dilihat kenaikan titer anti serum dan dapat dibuat gambar (kurve) dari kenaikan titer tersebut.

Pada kelompok uji ini, bila pemberian dosis booster kurang mencukupi, maka tidak terjadi kenaikan titer dari antibodi (toleransi imun) hewan ini, karena jumlah antigen akan diikat keseluruhan oleh antibodi yang terbentuk pada waktu pemaparan pertama (vaksinasi).

Dosis yang diperlukan untuk membangkitkan respons sekunder lebih rendah bila dibanding dengan dosis yang dipergunakan untuk membangkitkan respons primer. Tetapi sebaliknya banyaknya respons imun pada penyuntikan kedua (booster) lebih besar bila dibanding respons imun yang terjadi pada penyuntikan (vaksinasi) pertama (White and O'Neill, 1991)

Saat pengambilan darah (serum) sampel yang tidak tepat waktunya juga tidak menunjukkan kenaikan titer antibodi, hal ini bisa dikarenakan waktu pengambilan sampel belum terbentuk antibodi (fase induktif)(Bellanti, 1993).

Pada kelompok kontrol yang tidak dilakukan vaksinasi, titer serum kelinci mencapai 1/60. Hal ini bisa disebabkan karena pada setiap binatang, walaupun binatang tersebut belum pernah dilakukan vaksinasi akan mendapat pemaparan secara alami baik melalui infeksi ataupun melalui makanan yang masuk, sehingga tubuh membentuk zat anti. Jadi hal ini merupakan sesuatu yang wajar dengan adanya nilai titer minimum pada hasil pemeriksaan darah (serum) dari setiap binatang sebelum diberi perlakuan.

Keadaan seperti ini sesuai dengan pernyataan Hercowitz (1993), bahwa pemaparan antigen ke dalam tubuh inang bisa melalui keadaan infeksi atau tanpa terjadi infeksi. Dengan demikian hal inilah yang didalam pengujian nilai titer dari binatang yang belum pernah mengalami vaksinasipun dapat menunjukkan adanya nilai titer tertentu.

Penyebab lain adanya nilai titer pada hewan coba sebelum dilakukan uji adalah karena adanya reaksi silang antara antigen *S.m l (c) lokal* dengan Streptococcus lain seperti *S. salivarius* yang terdapat pada hewan coba melakukan pembacaan kelinci (Soerodjo, 1989).

Untuk (interpretasi) hasil nilai titer dari antibodi yang diuji dengan uji ELISA ini digunakan kelompok kontrol dengan PBS dan tanpa antigen pada waktu inkubasi.

Ketentuan nilai positif (yang dianggap valid) adalah nilai absorban pada sampel harus mencapai 1,5 kali nilai absorban kontrol. Bila nilai absorban sampel tidak mencapai 1,5 nilai absorban kontrol, maka nilai tersebut masih dianggap negatif.

Pembacaan dapat dilakukan secara fisik dengan melihat perubahan warna absorban menjadi kuning (karena adanya substrat) atau dengan pembacaan nilai absorban pada *ELISA reader* dengan panjang gelombang 405 nm.

Ketentuan lain adalah bahwa nilai kontrol pada pembacaan dengan *ELISA reader* (PBS dan tanpa antigen) mempunyai nilai absorban

kurang dari 0,1.

Ketentuan ini yang agak sulit dicapai walaupun sudah berkali-kali peneliti melakukan pengulangan, hal ini bisa dikarenakan bahwa *fase solid* (plat mikrotiter dengan dasar datar yang terbuat dari *polystyren*) ini walaupun diproduksi dari satu pabrik yang sama, tetapi pada masing-masing tumpukan plat mempunyai kualitas daya serap yang berbeda. Pernyataan ini ditulis dalam buku tentang panduan pekerjaan ELISA yang ditulis oleh Crowther (1995).

Ketidak sesuaian dalam penentuan nilai absorban kontrol yang nilainya kurang dari 0,1 tidak mengurangi keakuratan hasil, karena apabila nilai absorban pada kontrol tersebut naik, berarti nilai absorban pada sampel pun juga akan naik. Dengan demikian nilai tersebut merupakan nilai yang relatif, bukan merupakan nilai mutlak.

6.4 Produksi antibodi poliklonal

Dari hasil pemanenan antibodi poliklonal dilakukan uji titrasi. Darah diambil mulai dua minggu setelah vaksinasi, kemudian dua minggu setelah booster I, dan seterusnya hingga pengambilan darah dua minggu setelah booster III. Anti serum dari sampel mulai vaksinasi hingga booster III mengalami Kenaikan. Hal ini bisa diindikasikan bahwa pemberian vaksin sangat berhasil, serta potensi dari antibodi poliklonal tersebut setelah dilakukan uji *in vitro* terhadap kuman *S.m 1 (c) lokal* memberikan gambaran zona berkabut (terjadi ikatan antara antibodi poliklonal dan antigen yang

berupa sel utuh *S. m l (c) lokal*) pada cawan petri. Zona ini menunjukkan tidak adanya pertumbuhan kuman *S.m l (c) lokal* karena adanya ikatan dari kuman tersebut dengan antiserum (antibodi poliklonal) yang terdapat pada sumuran ditengahnya.

Sebenarnya uji yang paling cocok untuk reaksi antigen dan antibodi adalah uji Ouchterlony atau Mancini. Tetapi uji ini hanya dapat dilakukan bila antigen dan antibodi yang digunakan dalam bentuk murni. Sedangkan pada pekerjaan yang peneliti lakukan adalah penggunaan antigen berupa sel utuh dari kuman *S. mutans* yang kandungan proteinnya sangat bervariasi. Dengan demikian digunakan uji lain yang lebih sederhana, modifikasi dari *Cylinder and well methode* (Wistreich and Leichtman 1980), yaitu uji sensitifitas terhadap antibiotik.

Pada uji ini antigen yang digunakan berupa *S. mutans*, karena produk antibodi poliklonal ini nantinya akan diaplikasikan pada gigi dan diharapkan dapat mengikat *S. mutans* dalam mulut yang selama ini dianggap sebagai kuman penyebab utama terjadinya karies gigi.

Hasil uji in vitro ini tidak mempunyai zona yang tidak begitu lebar, hal ini disebabkan bahwa antigen yang diikat oleh antibodi Adalah berupa kuman (sel utuh) yang mana pada sel ini mempunyai berat molekul protein yang sangat heterogen (tidak hanya dari protein dengan berat molekul 67 K Da). Sedangkan antibodi (anti Serum kelinci) ini adalah anti terhadap protein dengan berat molekul

67 k Da.

Dengan demikian yang terikat oleh antibodi tersebut adalah hanya sebagian dari protein yang ada pada kuman, sehingga bisa dimengerti bahwa zona yang terbentuk tidak begitu lebar.

BAB 7**KESIMPULAN DAN SARAN****7.1 Kesimpulan**

Dari hasil dan pembahasan tersebut diatas dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Protein yang dominan dan imunogenik yang terdapat pada dinding sel *S.m 1(c) lokal* adalah protein dengan berat molekul 67 k Da.
2. Bahwa hasil vaksinasi protein 67 k Da pada hewan coba kelinci memberikan hasil kenaikan titer antibodi poliklonal yang sangat tinggi, dengan nilai titer tertinggi mencapai 1/240.000. Apabila dibandingkan dengan sel utuh *S. mutans* sebagai bahan imunogen, maka hasil ini sangat meningkat tajam.
3. Pada uji secara *in vitro* diperoleh hasil bahwa potensi dari produk antibodi poliklonal tersebut dapat mempengaruhi pertumbuhan kuman *S. ml(c) lokal*, sehingga antibodi poliklonal ini bisa digunakan sebagai aplikasi untuk pencegahan karies gigi dengan melalui pengujian yang lebih akurat lagi.



7.2 Saran

1. Hasil produksi antibodi poliklonal ini, bila akan diaplikasikan pada gigi manusia secara topikal untuk pencegahan karies gigi, perlu dilakukan uji yang lebih komplek, yaitu uji untuk aplikasi dosis pada manusia, uji kompatibilitas, uji imunogenik serta uji-uji lainnya yang menunjang untuk diaplikasikan ke dalam rongga mulut manusia.
2. Hasil produksi antibodi poliklonal ini nantinya dapat diaplikasikan untuk pencegahan karies gigi manusia dengan dibuat kemasan dalam bentuk varnish atau obat kumur.

DAFTAR PUSTAKA

- Artama WT, Margino S, Hartiko H, Asmara W, Mubarika S, Sembiring, 1991: Isolasi, Purifikasi, Digesti, Ligasi dan Amplikasi DNA, Petunjuk Lab., Kursus Singkat Rekayasa Genetik, PAU Bioteknologi, UGM, Yogyakarta.
- Bachtiar EW, 1997 : Prospek Vaksinasi dalam Pencegahan Karies dengan Antigen Hasil Rekayasa Protein Dinding Sel *Streptococcus mutans*. Jurnal Ked. Gigi UI, vol. 4 Ed. Khusus KPPIKG XI.
- Benjamini E, Leskowitz S, 1993 : Immunology A Short Course, 2nd ed., A John Wiley & Sons Inc., Publication New York. Singapore.
- Bergmeyer, 1986 : Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed., vol. X Antigens and Antibodies 1, Weinheim (Federal Republic of Germany), pp. 45-52.
- Challacombe SJ, Shirlaw PJ, 1994 : Immunology of Disease of the Oral Cavity. In Handbook of Mucosal Immunology (Ogra PL, Lamm ME, Mc Ghee JR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J), Academic Press Inc., San Diego, pp. 607-608, 615-617.
- Crowther JR, 1995 : ELISA Theory and Practise in Methods in Molecular Biology, vol. 42, Humana Press, New Jersey.
- Devijanti R, 1996 : Pembuatan Antibodi (Antiserum) Terhadap *Streptococcus mutans* (Indonesia) pada Kelinci, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.

- Fudenberg HH, Stites DP, Caldwell JL, Wells JV, 1978 : Basic & Clinical Immunology, 2nded., Lange Medical Publication , Los Altos - California.
- Goers J, 1993 : Immunochemical Techniques Laboratory Manual, Academic Press Inc., San Diego:
- Harlow E, Lane D, 1988 : Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., New York, pp. 93-95, 479-510.
- Hercowitz HB, 1993 : Imunofisiologi : Fungsi Sel dan Interaksi Seluler dalam Pembentukan Antibodi. Dalam Buku Immunologi III, Belanti (Alih Bahasa : Wahab AS), Gajah Mada University Press, hal. 126-130.
- Jackson AL, 1993 : Antigen dan Immunogenitas. Dalam Buku Immunologi III, Bellanti JA, (Alih Bahasa : Wahab SA), Gajah Mada University Press, hal. 86-95.
- Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM, 1992 : Zinsser Microbiology, In Immune Responses to Infection, 20th ed., California, Norwalk Connecticut / San Mateo, pp.365.
- Lapolla RI, Harar JA, Kelly CG, Taylor WR, Bohart C, Hendricks M, Pyati J, Graft RT, Ma KC, Lehner T, 1991 : Sequence and Structural Analisa of Surface Protein Antigen I/II (Spa A) of Streptococcus sobrinus, Infect. Immun., vol. 59, no.8, pp.2677-2685.
- Lehner T, Russell MW, Caldwell J and smith R, 1981 : Immunisation with Purified Protein Antigen from Streptococcus mutans

- Liddell JE, Cryer A, 1996 : A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, Singapore. pp.53.
- Maiden MFJ, Lai CH, Tanner A , 1992 : Characteristic of Oral Gram Positive Bacteria. In Contemporary Oral Microbiology and Immunology, Mosby Year Book, pp. 342-367.
- MC. Ghee JR, Michalek SM, 1981: Microbiology Aspects and Local Immunity. In Immunology of Dental Caries, Ann. Rev. Microbiol., 35 : 595-638.
- Melville TH, Russell C, 1981 : Immunity in Microbiology for dental Students, 3rd ed, William Heinemann Medical Book Ltd., London, pp. 133.
- Nuraini P, 1993 : Prevalensi Karies Gigi Anak Usia 4-6 tahun di Kotamadya Surabaya, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Paul WE, 1993: Fundamental Immunology, 3rd ed., Raven Press., New York, pp. 459-460.
- Roitt I, Brostoff J, Male D, 1985 : Immunology , Gower Medical Publishing, London-New York, pp. 8-9.
- Rosen S, 1991 : Dental Caries. In Essential Dental Microbiology, International ed., Prentice Hall International Inc., pp. 341.
- Roeslan B.O, Sadono M.H, 1997 : Aspek Biokimia Proses Terjadinya Karies Gigi. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia, vol. 4, Edisi khusus KPPIKG XI, Jakarta.

- Roth GI, Calmes R, 1981 : Dental Caries. In Oral Biology, CV. Mosby Co., London, pp. 343
- Russell MW, Bergmeier LA, Zanders ED, Lehner T, 1980 : Purification and Properties of A Double Antigen and Its Protease-Resistant Component, Infect and Imm.,28, no., 2, pp. 486- 493.
- Russell MW, Lehner T, Caldwell J, 1980 : Immunisation with A Purified Protein from *Streptococcus mutans* Against Dental Caries in Rhesus Monkeys, The Lancet, May 10, London SE 1.
- Schadler R, Diringer H, Ludwig H, 1985: Isolation and Characterization of a 14500 Molecular Weight Protein from Brains and Tissue Cultures Persistently Infected with Borna Disease Viruses, J. gen. Virol, vol. 66, p. 2479-2484.
- Schoeff. LE, Williams RH, 1993: Principles of Laboratory Instruments, Mosby-Year Book, Inc.pp. 165.
- Scopes RK, 1987 : Protein Purification Principle and Practice, Springer- Verlag, New York Inc.
- Sidarningsih,1999: Perbedaan Kadar Antibodi sIg A dan s Ig M terhadap Antigen I/II *Streptococcus mutans* dalam Saliva subyek Bebas Karies dan Karies, Tesis, Pasca-Sarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Slot J, Taubman MA, 1992 : Contemporary Oral Microbiology and Immunology, Mosby Year Book, PP. 524-554.

- Soeparto P, 1997: Imunologi Intestinal. Dalam Buku Imunologi Mukosal Kedokteran, Gramik Surabaya, hal. 49-68.
- Soerodjo TS, 1989 : Respons Imun Humoral Terhadap Streptococcus mutans Sehubungan dengan Penyakit Karies Gigi, Disertasi, Universitas Airlangga Surabaya.
- Stites DP, Terr AI, Parslow TB, 1994 : Basic and Clinical Immunology, 8th ed., Prentice Hall International Inc.
- Subowo, 1993 : Imunologi, Penerbit Angkasa - Bandung, hal. 17-25.
- Thompson, RA, 1981: Techniques in Clinical Immunology, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Melbourne.
- Tizard IR, 1995 : Immunology an Introduction , 4rd ed. , Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Wistreich GA, Lechtman MD, 1980 : Laboratory Exercises in Microbiology, 3rd ed., Glencoe Publishing Co. Inc., USA.
- Zanders E D and Lehner T, 1980 : Separation and Characterization of A Protein Antigen from Cells of Streptococcus mutans, Journal of General Microbiology, 122,p. 217-225.

Lampiran

Lampiran 1

Bahan dan Alat Pekerjaan SDS-PAGE

Bahan Proses SDS-PAGE

- PBS (*Phosphat Buffer Saline*)= Larutan garam faali
- Larutan dapar Elektroforesis pH = 8,3
- *Tris HCl* pH = 8,8 dan 6,8
- *Bis Acrylamid*
- SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
- *Aquadest*
- *Temed*
- APS (*Amonium Per Sulfate*) 10%
- Butanol 50%
- Larutan dapar Lamkli

Bahan untuk Pencucian Gel

- Metanol 50% dan 5%
- Asam asetat 7,5%
- Glutaraldehyd 5%

Bahan untuk Pengecatan (Silver)

- NaOH 0,36%
- NH₃ 25%
- AgNO₃

- Asam asetat 10%
- Formaldehid
- Larutan Gliserin 5-10%
- Alkohol 70%
- Kertas Whatman

Alat-alat untuk Proses SDS-PAGE

- *Sonicator* 30 get/ det
- *Water bath*
- Pemusing: ■ Fisher model 59, dengan out put
10.000 rpm
■ Hettich EBA 8, dengan out put
10.000 rpm
- Gelas ukur 50 cc dan 250 cc
- Pipet eppendorf dengan tip ukuran 100 μ l dan 500 μ l
- *Eppendorf tube* ukuran 1,5 cc
- Erlenmeyer
- *Becker glass*
- Cawan petri besar dengan diameter 25 cm
- *Strirer* "Thermolyne" dengan *magnetic stir bar*
- *Shaker* HS 500
- Pipet ukuran 1 cc, 5 cc dan 10 cc
- Jarum suntik / *disposable syringe*

- Timbangan analitik “Sartorius Portable”
- Seperangkat alat “ Minigel Twin G-24” (Model Biometra),
terdiri dari:

- ▲ sepasang gelas plat : ♦ *glass plate with
edge straight*

- ♦ *notched glass
plate*

- ▲ 3 pasang klip

- ▲ sebuah *comb*

- ▲ *silicon rubber seal*(karet penyekat silikon)

- ▲ *main chamber*

Lampiran 2

Proses Denaturasi Protein

Proses denaturasi antigen protein (kuman *S. mutans*) menggunakan “Sonicated” dengan tahap-tahap sebagai berikut :

- Koloni *S. mutans* yang berasal dari agar TYC yang berumur 2X24 jam dimasukkan dalam *ependorf tube* dengan ditambahkan larutan PBS \pm 200 μ l (perbandingan larutan dan koloni kuman 1:1).
- Tabung tabung yang berisi koloni kuman tersebut dimasukkan dalam *becker glass* yang diisi dengan es dan dilakukan proses sonikasi dengan memasukkan ujung penggetar pada tabung selama 10 menit.
- Setiap 2 menit getaran dihentikan untuk memberikan peluang proses pendinginan.
- Setelah dilakukan penggetaran, suspensi koloni tersebut dilakukan pemusingan dengan kecepatan 7000 rpm. selama 10 menit pada suhu kamar.
- Kemudian supernatan diambil untuk dilakukan proses SDS-PAGE dan ditambah dengan larutan dapar lamlli kemudian dilakukan denaturasi.

Lampiran 3

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamid Gel Electrophoresis) Konsentrasi 12,5%

Pada proses ini diperlukan bahan *Separating gel* dan *Stacking gel* dengan formula sebagai berikut :

Formula Separating Gel

• Tris HCl dengan pH = 8,8	1,2 ml
• <i>Bis Acrylamid</i>	2,5 ml
• SDS 10%	1,2 ml
• <i>Aqudest</i>	1,1 ml
• TEMED	5 μ l
• APS 10%	30 μ l

Volume yang dibutuhkan \pm 6 ml / gel

Formula Stacking (Sammel) Gel

• Tris HCl dengan pH = 6,8	1,2 ml
• <i>Bis Acrylamid</i>	2,5 ml
• SDS 10%	0,6 ml
• <i>Aquadest</i>	1,1 ml
• TEMED	5 μ l
• APS 10%	30 μ l

Volume yang dibutuhkan \pm 2 ml / gel

Lampiran 4

Proses DSD-PAGE

- Sepasang gelas plat dari *Minigel Twin G-42* dibersihkan dengan alkohol 70 % untuk menghilangkan sisa-sisa lemak / detergent.
- Diantara kedua gelas plat tersebut dipasangkan *silicon rubber seal* kemudian klip dipasangkan pada sisi kanan, kiri dan bawah untuk berdiri.
- Campuran formula dari *Separating gel* dimasukkan diantara (sela sela) gelas plat dengan menggunakan pipet 10 ml.
- Kemudian ditambahkan larutan butanol 10% untuk meratakan permukaan gel dan dibiarkan selama ± 15 menit untuk menunggu proses polimerisasi.
- Setelah gel mengeras larutan butanol diatas gel tersebut dibuang sisanya dibersihkan dengan kertas whatman.
- Campuran formula dari *Stacking gel* dimasukkan di atas *Separating gel* hingga penuh, dan *comb* diselipkan pada *Stacking gel* untuk membuat cetakan.
- Proses polimerisasi ditunggu selama 5-10 menit.
- Setelah gel mengeras *comb* diambil dan gel dicuci dengan larutan dapar elektroforesis kemudian seal dilepas.
- Plat yang berisi gel dipindahkan dalam *main chamber* dan untuk medium perpindahan elektron dipergunakan larutan dapar elektroforesis (running buffer).

- Gelembung-gelembung udara yang terdapat di dasar gel dihisap dengan *disposable syringe*.
- Kemudian protein antigen yang telah dilakukan denaturasi masing masing dimasukkan dalam cetakan dari *comb* dengan volume $\pm 15 \mu\text{l}$
- Pada cetakan gigi paling kanan dimasukkan marker "NEN" atau *Caleidoscop*.
- *Chamber* ditutup dan arus listrik dinyalakan (proses *running*) dengan kuat arus 10 m ampere dan voltage 30 Volt (pada *Stacking gel*).
- Setelah proses *running* berjalan hingga mencapai *Separating gel* kuat arus ditambah hingga mencapai 25 m ampere dan 90 V.
- Proses *running* selesai ditandai dengan keluarnya protein antigen dan larutan *dapar lamlli* dari gel menuju ke medium.
- Kemudian dilakukan pencucian gel.

Lampiran 5

Proses Pencucian gel dan fiksasi

- Gelas plat yang berisi gel tersebut dibuka dan gel dipotong hingga batas antara *Separating gel* dan *Stacking gel* dibuang.
- Potongan dari *Separating gel* yang tersisa direndam dalam cairan step I yang berisi 100 ml metanol 50% dan 100 ml asam asetat 7,5% dan dimasukkan dalam petri besar.
- Kemudian dilakukan proses *shaking* selama 30 menit.
- Setelah itu cairan step I dibuang dan diganti dengan cairan step II yang berisi 100 ml metanol 5% dan 100 ml asam asetat 7,5% dan dilakukan *shaking* seperti step I.
- Kemudian cairan step II dibuang dan diganti dengan cairan step III yang berisi 40 ml glutaraldehyd 5% dan 200 ml aquadest, lalu dilakukan *shaking* seperti tahap diatas dengan waktu yang sama.
- Cairan step III dibuang diganti dengan aquadest dan dilakukan proses yang sama dengan waktu 2 jam baru dilakukan pengecatan.

Lampiran 6

Pengecatan Silver

Formula cat Silver

- NaOH 0,36% 42 ml
- NH₃ 25% 2,8 ml
- *Aquadest* 147 ml
- 1,6 gram AgNO₃ dalam 8 ml *aquadest*

Cara Pembuatan :

- + Ketiga larutan tersebut (NaOH 0,36%; NH₃ 25% dan *aquadest*) dicampur dalam erlenmeyer dan dimasukkan *magnetic stir bar*.
- + Erlenmeyer di tempatkan diatas stir yang telah dinyalakan, kemudian dimasukkan larutan AgNO₃ melalui kertas filter dan ditunggu hingga homogen.
- + Setelah homogen stir dimatikan dan larutan dapat digunakan untuk bahan cat.

Tahap-tahap Pengecatan:

- Bahan cat tersebut dituang dalam cawan petri besar yang telah berisi gel dan dilakukan *shaking* selama ± 15 menit.
- Setelah selesai bahan cat dibuang dan diganti dengan *aquadest* lalu dilakukan *shaking* dengan waktu 2X2 menit.
- *Aquadest* dibuang dan diganti dengan larutan yang terdiri dari campuran asam sitrun 200 μ l, formaldehid 100 μ l dan *aquadest* 200 ml.

- Dilakukan proses *shaking* yang sama seperti diatas hingga terlihat gambaran dari pita protein.
- Setelah warna cukup tajam, cairan dibuang dan diganti dengan cairan asam asetat 10% untuk menghentikan proses pengecatan (yang sebelumnya dibilas dahulu dengan *aquadest*).
- Untuk membuat dokumen protein dengan gel yang telah dilakukan pengecatan tersebut, maka gel dapat ditambahkan (direndam) dengan larutan gliserin 5-10% selama 1 jam (Harlow & Lane, 1988).

Lampiran 7

Proses Immunoblotting

Imunoblotting pada proses ini dilakukan untuk melanjutkan proses identifikasi protein spesifik yang dikerjakan dari proses preparasi sampel (denaturasi) dengan proses sonikasi dan resolusi dengan gel elektroforesis.

Adapun tahap-tahap dalam prosedur imunoblotting terbagi dalam:

- Preparasi sampel antigen
- Transfer bagian-bagian protein ke membran nitroselulose.
- Pengecatan protein pada membran nitroselulose.

Pada proses ini tahap Preparasi sampel telah pernah dituliskan dan dikerjakan. Selanjutnya dilakukan **Proses Transfer bagian-bagian protein ke membran nitroselulose.**

Proses tersebut dilakukan dengan metode *semi dry* dan caranya sebagai berikut:

- ^ Gel dan membran nitroselulose direndam dalam larutan dapar untuk transfer selama 15 menit.
- ^ Kertas whatman yang seukuran dengan gel sebanyak \pm 10 lembar dibasahi dengan larutan dapar untuk transfer.
- ^ Diletakkan pada dasar plat dari *aparatus semi dry* (bagian anode) sebanyak 5 lembar kertas whatman yang telah basah.

- ^ Diatasnya diletakkan membran nitroselulose, kemudian gel dan diatasnya lagi ditutup dengan kertas whatman yang telah basah sebanyak 5 lembar.
- ^ Katoda ditutupkan dan aliran listrik dinyalakan dengan voltage ± 5 V dan kuat arus ± 45 mA selama ± 1 jam.
- ^ Gel dilepas dan dilakukan pengecatan (dengan *fast red*).

Proses Pengecatan Protein pada membran Nitroselulose

- Membran nitroselulose di blok dengan ± 40 ml PBS / 1% BSA dan dibiarkan selama 10 menit (BSA 1% \rightarrow BSA 0,8 gram; PBS 0,8 ml; *aquadest* ad. 80 ml).
- Setelah 10 menit larutan tersebut dibuang dan diganti dengan anti serum dari protein I (diencerkan dengan PBS / 1% BSA dengan perbandingan 1:10) dan dilakukan *shaking* selama 3 jam.
- Larutan dibuang dan dicuci dengan PBS / 0,025% Triton X-100 sebanyak 3X (Cara pembuatan: PBS 4ml dalam 40 ml *aquadest* dan ditambah dengan Triton X 0,01 ml).
- Membran ditambahkan dengan antibodi II (anti Ig G yang telah di label dengan enzim *Goat anti rabbit conjugat*) dan PBS/1%BSA kemudian dilakukan *shaking* selama ± 1 jam.
- Dicuci dengan PBS / 0,025% Triton X-100 sampai 3X
- Dilakukan pewarnaan (dengan *Fast red*) yang ditambah dengan *substrat system*.

Lampiran 8

Cara Pembuatan Fast red

Tris buffer (untuk Pewarnaan): 200mM Tris HCl pH=8,0/2mM MgCl₂

(Pembuatan: MgCl₂=0,2033 gram/500ml; Tris HCl=15,75gram/500 ml)

Solution staining: Fast red dalam Tris buffer 15 ml

(Pembuatan: Fast 0,18 gram; Tris buffer 15 ml)

Substrat staining: B Naphtol As. MX Phospat dalam H₂O 0,8 mg/ml

(Pembuatan: B Naphtol As. MX Phospat 12 mg; H₂O 15 ml)

Cara kerja:

- Staining solution dicampur dengan substrat staining dengan perbandingan 1:1 (dicampur dalam kertas filter) dicuci dalam larutan dapar Tris.
- Nitroselulose dilakukan *shaking* 5-10 menit dalam temperatur ruang hingga terlihat gambar.



Lampiran 9

Reagen pada Immunoblotting

Larutan dapar untuk Transfer

■ <i>Tris hydroxymetan amonium</i>	36,3	gr
■ Glisin	84,375	gr
■ <i>Aquadest</i>	ad. 3000	ml

Larutan dapar untuk Running

■ <i>Tris (hydroxymetan amonium)</i>	15,15	gr
■ Glisin	72,00	gr
■ Methanol	1000	ml
■ <i>Aquadest</i>	ad. 5000	ml