

## **BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN**

### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif observasional laboratoris bertujuan untuk mengetahui karakterisasi berat molekul profil protein struktural kuman *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros dilanjutkan dengan penelitian eksploratif observasional laboratoris juga untuk mengetahui antigenisitasnya terhadap antibodi dan antigenisitas silang antar kedua isolat tadi, serta afinitas antibodi poliklonal dengan antigen maupun reaksi silang antar keduanya.

### **3.2 Sampel**

Sampel yang akan diperiksa untuk penelitian adalah isolat *seed* kuman *Pasteurella multocida* dari Pusvetma dan isolat kuman *Pasteurella multocida* dari Maros.

Hewan yang akan dipergunakan untuk pembuatan antibodi poliklonal adalah kelinci umur 4 – 6 bulan, masing-masing sebanyak 3 ekor jantan dengan berat 1,5 kg (bebas penyakit) .

### **3.3 Bahan Penelitian**

#### **3.3.1 Kuman**

Kuman *Pasteurella multocida* dari isolat Pusvetma dan kuman *Pasteurella multocida* dari isolat Maros.

### 3.3.2 Media biakan

Media dan bahan kimia yang dipergunakan untuk menumbuhkan kultur kuman antara lain adalah *Heart Infusion Agar (HIA)*, *Casein Hydrolysate*, *Tryptone*, *Yeast extract*, *Sucrose*, *Extract Pancreas*,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ , *adjuvant Seppic ISA 50*.

### 3.4 Alat Laboratorium

Alat-alat laboratorium yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain, Bio-Rad Mini-Protean II, penangas air, mikropipet, pengering gel, tabung ependorf, sumber arus, *shaker*.

### 3.5 Hewan Percobaan

Kelinci jantan berat 1,5 kg umur 4 – 6 bulan untuk pembuatan antibodi poliklonal

### 3.6 Lokasi dan Waktu penelitian

#### 3.6.1 Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

### 3.6.2 Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret 2007 sampai dengan bulan Mei 2007.

## 3.7 Tahap Penelitian

### 3.7.1 Pembuatan kultur kuman.

Masing-masing isolat dari 2 macam kuman *Pasteurella multocida* di tumbuhkan pada media biakan yang mengandung *Heart Infusion Agar (HIA)*, *Casein Hydrolysate*, *Tryptone*, *Yeast extract*, *Sucrose*, *Extract Pancreas*,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$  kemudian diinkubasikan pada temperatur  $37^{\circ}C$ , selanjutnya di uji kemurniannya dengan preparat apus di atas gelas obyek kemudian dilakukan pewarnaan gram.

Setelah itu kultur kuman diinaktifasi dengan formaldehyde 0,5 %, kemudian masing-masing kultur kuman yang sudah inaktif tadi dibagi dua, yang satu dipersiapkan untuk pembuatan antibodi poliklonal dan yang satunya untuk dilakukan pengukuran berat molekul proteinnya dengan elektroforesis.

### 3.7.2 Pembuatan antibodi poliklonal.

Biakan kuman inaktif distandarisasi kepekatan kuman nya 5 kali *Brown's tube* no 6. Biakan kuman ditambah dengan *adjuvant Montanide ISA 50 (Seppic ISA 50)*. *Adjuvant* tersebut sebagai pengganti dari *Freund's Complete Adjuvant (FCA)* dan *Freund's Incomplete Adjuvant (FIA)*, yang

komponennya terbuat dari *manide-oleate* (The University of Iowa, 2002; University of California, 2004). Formulasi volume biakan kuman dengan adjuvan adalah sama banyak. Setelah jadi vaksin disuntikkan pada kelinci secara subcutan dengan dosis 0,2 ml (RATS on line, 2003). Penyuntikan diulang dengan interval 2 minggu sekali sebanyak 3 kali ulangan dengan dosis yang sama. Pada akhir interval ke 3 diambil darah dari kelinci tadi untuk uji imunobloting.

### **3.7.3 Ekstraksi protein kuman *Pasteurella multocida***

Melakukan ekstraksi protein harus memperhatikan cara dan sifat hasil ekstraksi, hal ini mengingat bahwa protein mudah mengalami denaturasi, maka perlu dipertimbangkan pemilihan metode untuk mempertahankan kualitas isolat yang dihasilkan.

Kultur kuman tadi disentrifugasi 8.000 rpm 10 menit kemudian supernatan dibuang dan dicuci dengan buffer *Phosphat Buffer Saline Tween* (PBST), kemudian suspensi pellet sel dalam bufer tadi kemudian disonikasi pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 3 menit jalan dan berhenti 2 menit diulang 3 kali, kemudian di sentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 10 menit. Supernatannya diambil ditambah etanol, disentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 10 menit, endapannya dipakai sebagai bahan *running*. Penentuan konsentrasi protein dengan metode biuret. (Aulani'am, 2005).

### 3.7.4 Penentuan profil berat molekul protein dengan SDS-PAGE

Penentuan profil berat molekul protein dilakukan dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan komposisi *separating gel* 12 % (2 ml acrylamide; 1,3 ml LGB, 1,7 ml ddH<sub>2</sub>O, 70 ul APS, 7 ul N,N,N',N'- *Tetramethylethylenediamin* (TEMED) dan *stacking gel* 3 % (415 ul UGB, 267 ul T-Acryl, 975 ul ddH<sub>2</sub>O, 20 ul APS, 2 ul TEMED). *Plate* berisi gel kemudian dipasang pada Minigel Twin G-42 *slab* dan dituangkan electrophoresis buffer (30,29 g Tris aminomethan; 144,13 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest).

Ke 2 macam isolat sampel masing-masing sebanyak 15 ul ditambah RSB (*Reducing Sampel Bufer*) sama banyak. Kemudian dipanaskan 100<sup>o</sup> C selama 3 menit, setelah didinginkan sampel dimasukkan pada sumuran *stacking gel*, dengan volume 15 µl, sebagai marker dipergunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 20 – 212 kDa produksi BIO-RAD, yang diletakkan dibagian deret paling kanan dari sumuran, sedangkan ke 2 macam isolat protein sampel dimasukkan pada sebelah kiri dari marker. Sumber arus dinyalakan pada tegangan 125 V dengan voltage konstan, 30 mA dilangsungkan sampai permukaan pewarna bermigrasi mencapai 1-5 mm dari dasar gel.

Pencucian terhadap gel hasil *running* dilakukan 3 tahap, yaitu : 1) pencucian pertama menggunakan 25 ml methanol 50%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 71,25 ml aquadest selama 30 menit; 2) Pencucian kedua

menggunakan 2,5 ml methanol 5%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 93,75 ml aquadest selama 20 menit; 3) Pencucian ketiga menggunakan glutaraldehyde 10% selama 25 menit. Gel kemudian diwarnai dengan merendam gel dalam larutan *staining* comassie blue R-250 selama 30-60 menit. Penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *destaining* (asam asetat 7 ml, methanol absolut 7 ml dan ditambahkan akuades sampai batas 100 ml) sambil digoyang dengan *shaker* sampai gel menjadi jernih, kemudian hasil dapat difoto atau di scan.

Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dimana :

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

Kemudian dibuat kurva standar dengan harga Rf sebagai sumbu X dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu Y. Berat molekul ditentukan dengan diinterpolasikan pada kurva standar (Aulani'am, 2005).

### **3.7.5 Karakterisasi protein dengan *Western Blot***

Protein hasil SDS-PAGE dari 2 macam kuman *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan kuman *Pasteurella multocida* isolat Maros, kemudian dikarakterisasi dengan teknik *Western Blot*. Setelah proses *running* selesai, gel ditransfer pada membran nitroselulose (NC) dengan cara *semi-dry blotting* dengan tahapan sebagai berikut :

Gel hasil elektroforesis diambil dan dimasukkan dalam aquadest dan direndam dalam buffer blotting. Membran NC (nitroselulose) dipotong selanjutnya dibasahi dengan PBS selama 10 menit pada suhu kamar. Membran dan kertas Whatman 8-10 lembar direndam dalam transfer bufer. Kertas Whatman kemudian disusun pada blotter satu-persatu sehingga tersusun 4-5 lapisan, kemudian di letakkan membran nitroselulose. Gel hasil elektroforesis di letakkan di atas membran nitroselulose dan diusahakan tidak ada gelembung udara, kemudian ditutup dengan 4 lembar kertas Whatman dengan cara menyusun satu persatu sehingga tersusun lapisan. Setelah selesai kemudian ditutup dengan penutup blotter dan siap untuk di *running*, dengan 100Volt, 40mA selama 1-2 jam. Setelah selesai transfer blotter dibuka, kertas Whatman diambil satu persatu dan di Cek hasil transfer (dengan melihat marker/penanda warna), apabila protein sudah ditransfer, membran ditandai letak marker dan posisi sampel. Membran dimasukkan ke dalam larutan PBS di Bloking dengan skim milk 1% selama 1 jam pada suhu kamar sambil digoyang. Setelah itu dicuci dengan PBS Tween 0,05% selama 10 menit dengan digoyang dan diulangi sampai 3 kali, kemudian membran nitroselulose diambil dan ditambahkan antibodi primer yang telah diencerkan dalam PBS-T Skim Milk 5% dan diinkubasi selama semalam pada suhu 4<sup>0</sup>C. Sebagai blanko antibodi primer tidak ditambahkan, kemudian membran dicuci dengan TBS Tween 0,05% selama 10 menit dengan digoyang dan diulang sampai 3 kali, kemudian

membran nitroselulose diambil dan ditambahkan antibodi sekunder (*conjugate*) dengan perbandingan yang telah ditentukan, diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar dengan shaker. Membran dicuci lagi seperti diatas dan diinkubasi dengan Western Blue substrat solution pada ruang gelap selama semalam atau sampai terlihat warna *band* kemudian dicuci dengan akuades (stop reaksi).

### 3.7.6 *Dot Blot* dari antigen.

Protein antigen masing-masing 10 µl dari 2 macam isolat kuman *Pasteurella multocida* yang diuji dilarutkan ditambah 40 µl PBS mengandung NaN<sub>3</sub> (1 ml Na-Azida 1%+9 ml PBS), antigen dibuat pengenceran 1/20 dan 1/40 duplo, kemudian diteteskan pada membran nitroselulosa yang telah dibasahi dengan PBS. Membran dipasangkan pada alat *dot blotter* kemudian dibloking dengan bloking bufer selama 1 jam dan selanjutnya dicuci dengan PBS Tween 20 0,05% (3 menit dan diulang 3 kali). Hasil kemudian diinkubasi dengan serum (antibodi primer, 1/200) dalam PBS-Skim Milk 1% selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan PBS-Tween 20 0,05% (3 menit dan diulang 3 kali). Hasil yang didapatkan diinkubasi kembali dengan antibodi sekunder dengan pengenceran 2/2500 (konjugat alkali fosfatase) selama satu jam dan dicuci kembali dengan PBS-Tween 20 0,05% selama 3 menit dan diulang 3 kali. Kemudian dilakukan inkubasi dalam substrat *Western Blue* (dalam ruang gelap) selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan



akuades, kemudian membran diamati ada tidaknya noda berwarna biru gelap.