

SALMONELLA PULLORUM

TESIS

KK
KKA
TI.03/11
Wri
i

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN ANTIGENIK STRAIN
Salmonella pullorum 11, *Salmonella pullorum* AV DAN *Escherichia coli* K88
UNTUK MENJELASKAN REAKSI SILANG PADA TES PULLORUM**



WRINGATI

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

TESIS

ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN ANTIGENIK STRAIN
Salmonella pullorum 11, *Salmonella pullorum* AV DAN *Escherichia coli* K88
UNTUK MENJELASKAN REAKSI SILANG PADA TES PULLORUM

WRININGATI
NIM : 090515577/M

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007

ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN ANTIGENIK STRAIN
Salmonella pullorum 11, *Salmonella pullorum* AV DAN *Escherichia coli* K88
UNTUK MENJELASKAN REAKSI SILANG PADA TES PULLORUM

TESIS

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Imunologi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

WRININGATI
NIM : 090515577/M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

6 Agustus 2007

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 6 AGUSTUS 2007

Oleh :
Pembimbing ketua



Dr.dr.H. Eddy Bagus Wasito, MS.,SpMK
NIP : 130676011

Pembimbing



Dr.drh. Suwarno,MS.
NIP : 131836994

Mengetahui KPS S2 Imunologi



Dr.dr. Sri Hidajati BS.DTM.,MS.SpPar(K)
NIP : 130680855

Telah diuji pada :

Tanggal 6 Agustus 2007

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. dr. Sri Hidajati BS., DTM. MS. Sp Par. (K)

Anggota :

- 1. Dr. dr. H. Eddy Bagus Wasito, MS.,Sp MK**
- 2. Dr. drh. Suwarno, MS**
- 3. dr. Lindawati Alimsardjono, M.Kes.,Sp MK**
- 4. dr. Budiono, M.Kes**

UCAPAN TERIMA KASIH

Berawal dari ucapan Bismillahirrohmanirrohim dan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah swt, atas rahmat dan ridhonya yang telah dilimpahkan, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis serta seluruh kegiatan akademik yang berlangsung dalam suasana kedamaian.

Selama menjalankan pendidikan S-2, banyak dukungan, dorongan, semangat, dan bantuan dari berbagai pihak. Dalam kesempatan yang baik ini perkenankanlah saya menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

Dr. Eddy Bagus Wasito, dr.,MS.,SpMK., selaku pembimbing I, yang dalam hal ini selain memberi bimbingan dan petunjuk, juga dengan tulus memberikan semangat, sehingga saya dapat menyelesaikan penulisan tesis ini.

Dr. Suwarno, drh., MS, selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, semangat, dan bantuan yang sangat berguna sekali dalam melaksanakan penelitian, sehingga kendala-kendala penelitian dapat teratasi dan menuai hasil yang baik.

Dosen penguji Dr.Eddy Bagus Wasito, dr.,MS.,SpMK. Dr. Suwarno, drh., MS, Dr.Sri Hidajati BS.,dr.,DTM.,MS.Sp.Par.(K), dr Lindawati Alimsardjono, M.Kes.Sp.MK, dan dr. Budiono.,M.Kes., yang telah memberikan masukan demi kebaikan dalam penelitian dan penulisan tesis.

Ketua Program Studi Imunologi Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Dr. Sri Hidajati B.S.,dr.,DTM.,MS.,Sp.Par.(K), yang telah membantu dan membimbing saya selama menjalani pendidikan S-2 ini.

Rektor Universitas Airlangga, Prof.Dr.H. Fasichul Lisan,Apt. dan mantan rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Med. Puruhito, dr. SpB.TKV yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan S-2 Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof.Dr.H.Muhammad Amien,dr., dan seluruh Asisten Direktur, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan S-2 Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Kepala Pusat Veterinaria Farma, Drh. Harry Besar Sosiawan, SU., dan mantan Kepala Pusat Veterinaria Farma, Drh Syamsul Bahri Siregar M.Sc., atas ijinnya dalam memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan S-2 Program Pascasarjana di Universitas Airlangga. Teman-teman sejawat di Pusat Veterinaria Farma; Drh Irtisam M.Kes., Drh. Moehammad Moechrom, Drh. Soekarno, Drh. Darmawan M.Si., Drh. Endang Pujiastuti M.Kes., Drh. Herawati Setyaningsih, MKes., Drh. Rosmiati Wisindie, Drh. Asri Wahyuni, Drh. Bambang Suprayogi, dan Drh. Sri Susila Andayani, yang telah mendukung dan memberi semangat dalam menyelesaikan pendidikan S-2 saya. Teman-teman baik saya di laboratorium Penyakit Mulut Kuku Pusat Veterinaria Farma; C.N. Endang Tularsih S.Si, Sukijat, Prasetyono, Triyono dan Giyono, yang dengan sangat pengertian membantu pekerjaan di laboratorium dengan tulus dan ikhlas. Teman-teman di laboratorium Pengujian Mutu Produksi Pusat Veterinaria Farma; Bu Dini, dan Pak Yusuf yang telah banyak membantu saya dalam pemurnian bakteri dan pembuatan media selektif. Serta teman-teman saya yang lain yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah mendukung saya dalam menempuh pendidikan S-2 Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Seluruh staf pengajar Program Pascasarjana pada Program Studi Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga antara lain; Dr.Sri Hidajati B.S., dr.,DTM.,MS.,Sp.Par.(K), Dr.Eddy Bagus Wasito, dr.,MS.,SpMK., Prof.Dr,Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc., Prof.Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.,MSc., Prof.Dr. PG.Konthen, dr.,Sp.PD., Prof.Dr. Poernomo,dr., Sp.BK., Prof. Dr. Soebandiri,dr.,Sp.PD., Dr.Prihatini,dr.SpPK., dan lainnya yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah memberikan ilmunya sehingga saya mendapat bekal ilmu pengetahuan yang sangat bermanfaat dalam mengembangkan khasanah pengetahuan saya.

Pemerintah Republik Indonesia c.q. Menteri Pendidikan dan Kebudayaan melalui Program Beasiswa Unggulan yang telah memberikan bantuan dana berupa beasiswa selama pendidikan S-2 Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Tropical Disease Center Universitas Airlangga, Prof.Dr,Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc., yang telah mengizinkan saya memanfaatkan Laboratorium Gastroenteritis, Salmonellosis, dan Dengue sebagai tempat pelaksanaan penelitian.

Kepala Laboratorium Virologi dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof.Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.,MSc. , yang telah mengizinkan saya menggunakan laboratorium tersebut dalam pelaksanaan penelitian tesis.

Tidak terlupakan pula kepada Linda, dari Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, mbak Helen, mbak Wahyu, mbak Indah Bapak Muh.Choesen, dan mas Erik, dari Tropical Disease Center Universitas Airlangga yang dengan tulus ikhlas dan sabar membantu pelaksanaan penelitian sampai selesai.

Kepada seluruh teman S-2 Program Pascasarjana Universitas Airlangga Angkatan 2005/2006 khususnya Suhariyadi SPd., dan Yohandromeda Syamsu SKM., yang telah banyak memberikan bantuan dan dorongan semangat maju terus pantang mundur.

Ibu saya, Moerdijati, yang selalu mendorong dan mendoakan saya dalam menjalani pendidikan S-2 ini. Almarhum bapak saya, R.Tjokrojuwono, masih segar dalam ingatan saya pada akhir hayat beliau masih mendorong saya untuk terus belajar.

Juga kepada suamiku, Drh. Aris Suharya, yang dengan sabar dan mendukung dengan sepenuh hati selama saya menyelesaikan pendidikan S-2 ini. Anak-anakku Achmad Ariaseto, Achmad Ariabhisma, dan Achmad Rijalu Arianindita, yang dengan sabar dan pengertian merelakan ibunya banyak meninggalkan mereka untuk belajar dan berjuang menuntut ilmu. Semoga dengan perjuangan ini dapat mendorong anak-anakku untuk mengikuti jejak ibunya lillahi ta alla dalam menuntut ilmu pengetahuan.

Akhirnya tak lupa kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu yang telah membantu memberikan dorongan semangat untuk menyelesaikan studi, sekali lagi saya mengucapkan terima kasih. Atas segala bantuan, bimbingan, dan dorongan semangat, serta doa restu semua, semoga Allah swt. memberikan balasan taufik dan hidayah yang berlimpah. Amin ya Robbal alamin. Sekali lagi saya mengucapkan terima kasih.

Salam hormat saya

Penyusun

RINGKASAN

Isolasi Dan Karakterisasi Protein Antigenik Strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV Dan *Escherichia coli* K88 Untuk Menjelaskan Reaksi Silang Pada Tes Pullorum

Wringati

Salmonella pullorum menyebabkan penyakit pullorum, menyerang unggas termasuk ayam. Di Indonesia, penyakit pullorum sudah tersebar luas, dikenal sejak tahun 1950 dengan nama penyakit berak kapur (*bacillary white diarrhea*). Penyakit pullorum menimbulkan kerugian ekonomi yang besar. Untuk pengendalian penyakit pullorum yang dilakukan sampai saat ini adalah deteksi dini penyakit dengan melakukan pullorum tes. Pelaksanaan tes aglutinasi pullorum sering terjadi kesalahan interpretasi. Menurut Snoeyenbos (1991), reaksi nonpullorum menyebabkan masalah interpretasi. Bakteri yang memiliki antigen yang *closely related* dengan *Salmonella pullorum* bila menginfeksi unggas akan menghasilkan suatu respon aglutinasi. Beberapa peneliti melaporkan bahwa, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus sp*, *Aerobacter aerogenes*, *Proteus sp*, *Escherichia coli*, dan spesies dari *Arizona*, *Providencia*, dan *Citrobacter*, menyebabkan reaksi nonpullorum tersebut. Di antara infeksi bakteri-bakteri tersebut yang menyebabkan reaksi silang dengan antigen pullorum, infeksi *Escherichia coli* pada unggas merupakan masalah yang serius, karena menimbulkan kerugian ekonomi yang besar.

Telah dilakukan penelitian isolasi dan karakterisasi protein antigenik strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 untuk menjelaskan penyebab reaksi silang pada tes pullorum.

Penelitian diawali dari pemurnian bakteri strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88, dilanjutkan dengan pembuatan bakterin. Bakterin digunakan untuk pembuatan antibodi poliklonal pada ayam. Tahap selanjutnya adalah melakukan isolasi protein antigenik Omp (*Outer Membrane Protein*) *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88, serta fimbria *Escherichia coli* K88. Untuk itu langkah yang dilakukan adalah pembuatan suspensi bakteri yang diikuti dengan proses pemecahan dinding sel bakteri dengan cara ultra sonikasi yang dimodifikasi. Isolasi protein Omp dengan menggunakan metode Matsujama, sedangkan isolasi fimbria dengan menggunakan metode Erickson *et al.* Karakterisasi protein dengan menggunakan teknik SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate- poly Acrilamide gel Electropheresis) untuk mengetahui berat molekul protein tersebut. Dari hasil SDS-PAGE diperoleh berbagai macam protein dengan berat molekul tertentu yang berupa *band*. Tahap karakterisasi berikutnya adalah *western blotting* dengan menambahkan antibodi poliklonal, sehingga pada kertas Whatman akan menunjukkan *band* yang spesifik yang merupakan bukti telah terjadi ikatan spesifik protein antigenik dengan antibodi. Untuk membuktikan bahwa *band* yang tampak pada hasil *western blotting* bersifat antigenik maka *band* tersebut dipotong dan dielusi. Protein antigenik sebelum dan sesudah elusi dites antigenisitasnya dengan teknik ELISA.

Dari hasil *western blotting* diketahui bahwa, ketika protein Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88 maupun fimbria *Escherichia coli* K88 direaksikan masing-masing dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88, *band* dengan berat molekul 42 – 47 kD dan 28 -30 kD muncul dan tercetak tebal. Sedangkan *band* protein

berat molekul 33-35 kD juga muncul, tetapi tercetak tipis. Dari ELISA *indirect* protein Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88, dan fimbria *Escherichia coli* K88 sebelum elusi (*whole protein*) dan sesudah elusi (BM 42-47 kD, 33-35 kD, 28-30 kD) dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88 menunjukkan hasil positif. Hasil *Univariate Analysis of Variance* pada taraf 5 % menunjukkan ada perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0.01$) di antara protein dan antibodi. Dari *post hoc test* HSD diketahui bahwa protein Omp *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV berat molekul 42-47 kD bersifat paling antigenik dan berinteraksi paling kuat dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88. Protein Omp *Escherichia coli* K88 berat molekul 33-35 kD mempunyai antigenisitas terkuat dan berinteraksi kuat dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88. Sedangkan protein sebelum elusi (*whole protein*) fimbria *Escherichia coli* K88 mempunyai antigenisitas dan interaksi dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 terkuat.

Kesimpulan dalam penelitian ini adalah protein Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88 dan fimbria *Escherichia coli* K88 mempunyai kesamaan, yaitu protein berat molekul 42-47 kD, 33-35 kD, dan 28-30 kD bersifat antigenik dan menyebabkan reaksi silang pada tes pullorum.

Summary

Isolation And Characterization of Antigenic Protein Strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV And *Escherichia coli* K88 To Learn Cross Reaction On Pullorum Test

Wringati

Salmonella pullorum causing pullorum infects birds including chicken. Spreading widely in Indonesia, this pullorum has been identified since 1950 as *bacillary white diarrhea*. Pullorum has caused a great economic loss. Early detection on this disease using pullorum test has been carried out in order to control the spread of the disease. However, pullorum agglutinating test has shown a misinterpretation, which, according to Snoyenbos (1991), was caused by nonpullorum reaction. Bacteria carrying antigen closely related to *Salmonella pullorum* will result in an agglutinating response when infecting birds. Some researchers reported that *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus sp*, *Aerobacter aerogenes*, *Proteus sp*, *Escherichia coli*, dan spesies dari *Arizona*, *Providence*, dan *Citrobacter* resulted in the above nonpullorum reaction. Among the bacterial infection causing cross reaction against pullorum antigen, *Escherichia coli* infection on birds proves to be a big problem, because it brings about a great economic loss.

Study in isolation and characterization on antigenic protein strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K88 has been carried out to learn the cross reaction on pullorum test.

The study began with purifying bacteria strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K8, then making bacterin which would be used to produce polyclonal antibody on chicken. Next, antigenic protein Outer Membrane Protein (Omp) of *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli*

K88, and fimbriae *Escherichia coli* K88 is isolated. To do this, bacteria suspension is made, followed by the process of breaking the wall of bacteria cell using modified ultrasonication. Isolation of protein Omp applies Matsujama method, while isolation of fimbriae applies the method of Erickson *et al.* The protein characterization is using the SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) method in order to know the weight of the protein molecule. From SDS-PAGE are then yielded some kinds of protein with certain molecule weight forming as band. The next step of characterization is *western blotting* by adding polyclonal antibody, so on Whatman paper will appear specific band. This proves that resulted band of *western blotting* is antigenic, the band is cut and eluted. The antigenic protein before and after elution is then tested on its antigenicity using ELISA technique.

The result of western blotting shows that, when Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K88 as well as fimbriae *Escherichia coli* K88 is reacted each against polyclonal antibody *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K88, then it appears band with the molecule weight of 42-47 kD and 28-30 kD which are printed thick. Meanwhile, band protein with molecule weight 33-35 kD also appears, but thin. From ELISA indirect protein Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K88 before elution (whole protein) and after elution (weight molecule 42-47 kD, 33-35 kD, 28-30) against polyclonal antibody *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K88 shows positive results. By using post hoc test HSD, it shows that protein Omp *Salmonella pullorum* 11 and *Salmonella pullorum* AV with molecule weight 42-47 kD, protein Omp *Escherichia coli* K88 with molecule weight 33-35 kD, and whole protein

fimbria *Escherichia coli* K88, are the most antigenic and interact the most strongly against polyclonal antibody *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K88.

It is concluded in this study that protein Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88, and fimbriae *Escherichia coli* K88 have similarities ; molecule weight 42-47 kD, 33-35 KD, and 28-30 kD are antigenic protein and causing cross reaction on pullorum test.

Abstract

Isolation And Characterization of Antigenic Protein Strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV And *Escherichia coli* K88 To Learn Cross Reaction On Pullorum Test

Wringati

Study in isolation and characterization on antigenic protein strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K88 has been carried out to learn the cross reaction on pullorum test.

The study began with purifying bacteria strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K8, and producing polyclonal antibody on chicken. Next, antigenic protein Outer Membrane Protein (Omp) of *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88 and fimbriae *Escherichia coli* K88 is isolated. Isolation of protein Omp applies Matsujama method, while isolation of fimbriae applies the method of Erickson *et al.* The protein characterization is using the SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) method in order to know the weight of the protein molecule. From SDS-PAGE are then yielded some kinds of protein with certain molecule weight forming as band. The next step of characterization is *western blotting* by adding polyclonal antibody, so on Whatman paper will appear specific band. This proves that resulted band of *western blotting* is antigenic, the band is cut and eluted. The antigenic protein before and after elution is then tested on its antigenicity using ELISA technique.

The result of *western blotting* shows that, when Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K88 as well as fimbriae *Escherichia coli* K88 is reacted each against polyclonal antibody *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K88, then it appears band with the molecule weight of 42-47 kD and 28-30 kD which are printed thick. Meanwhile, band protein with molecule weight 33-35 kD also appears, but thin. From ELISA indirect protein Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K88 before elution (*whole protein*) and after elution (weight molecule 42-47 kD, 33-35 kD, 28-30) against polyclonal antibody *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K88 shows positive results. By using *post hoc test* HSD, it shows that protein Omp *Salmonella pullorum* 11 and *Salmonella pullorum* AV with molecule weight 42-47 kD, protein Omp *Escherichia coli* K88 with molecule weight 33-35 kD, and whole protein fimbria *Escherichia coli* K88, are the most antigenic and interact the most strongly against polyclonal antibody *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV and *Escherichia coli* K88.

It is concluded in this study that protein Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88, and fimbriae *Escherichia coli* K88 have similarities ; molecule weight 42-47 kD, 33-35 kD, and 28-30 kD are antigenic protein and causing cross reaction on pullorum test.

Key word : Protein Omp *Salmonella pullorum*.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Lembar Pengesahan	iv
Panitia Penguji	v
Ucapan Terima kasih	vi
Ringkasan	x
Summary	xiii
Abstract	xvi
Daftar Isi	xvii
Daftar Gambar	xxi
Daftar Tabel	xxiii
Daftar Lampiran	xxv
Daftar Singkatan	xxvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan umum	6
1.3.2 Tujuan khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 <i>Enterobacteriaceae</i>	8
2.1.1 Struktur pembungkus sel bakteri	8
2.2 <i>Salmonella pullorum</i>	12
2.2.1 Antigenisitas <i>Salmonella pullorum</i>	14
2.2.2 Penyakit pullorum	16

2.2.3 Cara penularan penyakit pullorum	17
2.2.4 Gejala klinik penyakit pullorum	18
2.2.5 Diagnosa penyakit pullorum	18
2.3 <i>Escherichia coli</i>	20
2.3.1 Struktur antigenik	22
2.3.2 Antigenisitas <i>Escherichia coli</i>	23
2.3.3 Strain <i>Escherichia coli</i> K88.....	24
BAB 3 MATERI DAN METODA	26
3.1 Rancangan Penelitian	26
3.2 Sampel	26
3.3 Variabel Penelitian	26
3.4 Lokasi Dan Waktu Penelitian	28
3.4.1 Lokasi	28
3.4.2 Waktu penelitian	29
3.5 Prosedur Pengumpulan Data	29
3.6 Analisa Data	29
3.7 Bahan Penelitian	30
3.7.1 Bahan untuk pemurnian dan identifikasi bakteri strain <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV dan <i>Escherichia coli</i> K88	30
3.7.2 Bahan untuk pembuatan bakterin dan antibodi poliklonal	30
3.7.3 Bahan untuk isolasi protein antigenik	31
3.7.4 Bahan untuk karakterisasi protein antigenik	31
3.7.5 Bahan untuk pengukuran kadar protein antigenik	33
3.7.6 Bahan untuk elusi	33
3.7.7 Bahan untuk pengujian ELISA	33
3.8 Alat Penelitian	33
3.8.1 Alat yang digunakan untuk identifikasi dan pemurnian bakteri ...	33
3.8.2 Alat yang digunakan untuk pembuatan bakterin dan antibodi poliklonal	34
3.8.3 Alat yang digunakan untuk pengukuran kadar protein antigenik ..	34

3.8.4	Alat yang digunakan untuk isolasi protein antigenik	34
3.8.5	Alat yang digunakan untuk karakterisasi protein antigenik	34
3.8.6	Alat yang digunakan untuk pengujian ELISA	35
3.9	Metoda Penelitian	35
3.9.1	Pemurnian Strain <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV dan <i>Escherichia coli</i> K88	35
3.9.2	Pembuatan bakterin <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV dan <i>Escherichia coli</i> K88.....	35
3.9.3	Pembuatan antibodi poliklonal <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV dan <i>Escherichia coli</i> K88	37
3.9.4	Isolasi protein antigenik Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV dan <i>Escherichia coli</i> K88.....	39
3.9.5	Isolasi protein antigenik fimbria strain <i>Escherichia coli</i> K88.....	40
3.9.6	Pengukuran kadar protein	41
3.9.7	Karakterisasi protein antigenik strain <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV dan <i>Escherichia coli</i> K88	42
3.9.8	Pengujian antigenisitas protein antigenik secara ELISA	45
BAB 4	ANALISIS HASIL PENGUJIAN	48
4.1	Pemurnian Strain <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV Dan <i>Escherichia coli</i> K88	48
4.2	Pembuatan Bakterin <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV Dan <i>Escherichia coli</i> K88.....	51
4.3	Pembuatan Antibodi Poliklonal <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV Dan <i>Escherichia coli</i> K88	51
4.4	Isolasi Protein Antigenik Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11, Omp <i>Salmonella pullorum</i> AV Dan Omp <i>Escherichia coli</i> K88.....	52
4.5	Isolasi Protein Pntigenik Fimbria Strain <i>Escherichia coli</i> K88.....	52
4.6	Pengukuran Kadar Protein	52
4.7	Karakterisasi Protein Antigenik Strain <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV Dan <i>Escherichia coli</i> K88	53

4.8 Pengujian Antigenisitas Protein Antigenik Secara ELISA	58
BAB 5 PEMBAHASAN	71
5.1 Pemurnian Strain <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV Dan <i>Escherichia coli</i> K88	71
5.2 Pembuatan Bakterin <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella</i> <i>pullorum</i> AV Dan <i>Escherichia coli</i> K88.....	72
5.3 Pembuatan Antibodi Poliklonal <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella</i> <i>pullorum</i> AV Dan <i>Escherichia coli</i> K88	73
5.4 Isolasi Protein Antigenik Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11, Omp <i>Salmonella pullorum</i> AV , Omp <i>Escherichia coli</i> K88 Dan Fimbria <i>Escherichia coli</i> K88.....	74
5.5 Karakterisasi Protein Antigenik Strain <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV Dan <i>Escherichia coli</i> K88	76
5.6 Pengujian Antigenisitas Protein Antigenik Secara ELISA	79
BAB 6 PENUTUP	83
6.1 KESIMPULAN	83
6.2 SARAN	83
DAFTAR PUSTAKA	85

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Model pembungkus sel bakteri Gram-negatif (Jawetz, <i>et al.</i> , 1980) ..	9
Gambar 2.2 Struktur lipopolisakarida <i>Salmonella</i> secara umum (Todar, 2002) ...	14
Gambar 2.3 Model kapsul sel <i>Escherichia coli</i> (Jawetz, <i>et al.</i> , 1982)	23
Gambar 3.1 Pembuatan bakterin <i>Salmonella pullorum</i> 11 dan <i>Salmonella pullorum</i> AV	36
Gambar 3.2 Pembuatan bakterin <i>Escherichia coli</i> K88	36
Gambar 3.3 Bakterin <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV, dan <i>Escherichia coli</i> K88	37
Gambar 3.4 Penyuntikan bakterin <i>Escherichia coli</i> K88 ke hewan coba ayam ..	38
Gambar 3.5 Pengambilan darah ayam secara <i>intracardial</i>	38
Gambar 3.6 Pelaksanaan ultrasonikasi pada proses isolasi protein fimbria <i>Escherichia coli</i> K88	41
Gambar 3.7 Pengukuran kadar protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11, Omp <i>Salmonella pullorum</i> AV, Omp <i>Escherichia coli</i> K88 dan fimbria <i>Escherichia coli</i> K88 dengan menggunakan spektrofotometer	42
Gambar 3.8 Elektroforesis protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11, Omp <i>Salmonella pullorum</i> AV, Omp <i>Escherichia coli</i> K88 dan fimbria <i>Escherichiacoli</i> K88 pada proses SDS-PAGE.....	43
Gambar 3.9 Pembacaan hasil ELISA protein sebelum elusi (<i>whole protein</i>) dengan menggunakan ELISA Reader.....	46
Gambar 3.10 Kerangka operasional penelitian	47
Gambar 4.1 Hasil pewarnaan Gram <i>Escherichia coli</i> K88 (pembesaran 100x10)	50
Gambar 4.2 Hasil Pewarnaan Gram <i>Salmonella pullorum</i> 11 (pembesaran 100x10).....	50
Gambar 4.3 Hasil SDS-PAGE protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV, Omp <i>Escherichia coli</i> K88, dan fimbria <i>Escherichia coli</i> K88	54

Gambar 4.4 Hasil <i>western blotting</i> Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV, Omp <i>Escherichia coli</i> K88, dan fimbria <i>Escherichia coli</i> K88 yang direaksikan dengan antibodi poliklonal <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV, <i>Escherichia coli</i> K88 dan serum negatif dengan konjugat Anti Chicken IgG Peroksidase dan substrat AEC	55
Gambar 4.5 Hasil <i>western blotting</i> Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV, Omp <i>Escherichia coli</i> K88, dan fimbria <i>Escherichia coli</i> K88 yang direaksikan dengan antibodi poliklonal <i>Salmonella pullorum</i> 11, <i>Salmonella pullorum</i> AV, <i>Escherichia coli</i> K88 dengan konjugat Anti Chicken Alkaline Phospatase dan substrat BCIP/NBT ..	56
Gambar 4.6 Hasil ELISA sebelum elusi (<i>whole protein</i>)	70

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1 Rencana Reaksi Antigen Antibodi Pada <i>Western Blott</i>	44
Tabel 4.1 Hasil Pewarnaan Gram Dan Tes Biokimiawi	49
Tabel 4.2 Hasil Pengukuran Kadar Protein Sebelum Elusi	53
Tabel 4.3 Hasil Pengukuran Kadar Protein Sesudah Elusi	58
Tabel 4.4 Nilai Rata-rata OD ELISA <i>Indirect</i> Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11 Sebelum Elusi (<i>Whole Protein</i>) Dan Sesudah Elusi (BM 39-42 kD, 29-31 KD, 20-22 kD) Dengan Antibodi Poliklonal	59
Tabel 4.5 Nilai Rata-rata OD ELISA <i>Indirect</i> Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> AV Sebelum Elusi (<i>Whole Protein</i>) Dan Sesudah Elusi (BM 39-42 kD, 29-31 KD, 20-22 kD) Dengan Antibodi Poliklonal	59
Tabel 4.6 Nilai Rata-rata OD ELISA <i>Indirect</i> Protein Omp <i>Escherichia coli</i> K88 Sebelum Elusi (<i>Whole Protein</i>) Dan Sesudah Elusi (BM 39-42 kD, 29-31 KD, 20-22 kD) Dengan Antibodi Poliklonal	60
Tabel 4.7 Nilai Rata-rata OD ELISA <i>Indirect</i> Protein Fimbria <i>Escherichia coli</i> K88 Sebelum Elusi (<i>Whole Protein</i>) Dan Sesudah Elusi (BM 39-42 kD, 29-31 KD, 20-22 kD) Dengan Antibodi Poliklonal	60
Tabel 4.8 Rata-rata Nilai OD Kekuatan Antibodi Poliklonal Terhadap Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11 Dan Tingkat Notasinya	62
Tabel 4.9 Rata-rata Nilai OD Antigenisitas Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11 Dan Tingkat Notasinya	62
Tabel 4.10 Rata-Rata Nilai OD Interakai Antibodi dengan Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11 Dan Tingkat Notasinya	63
Tabel 4.11 Rata-rata Nilai OD Kekuatan Antibodi Poliklonal Terhadap Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11 Dan Tingkat Notasinya	64
Tabel 4.12 Rata-rata Nilai OD Antigenisitas Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> AV Dan Tingkat Notasinya	64
Tabel 4.13 Rata-Rata Nilai OD Interakai Antibodi dengan Protein Omp	

<i>Salmonella pullorum</i> AV Dan Tingkat Notasinya	65
Tabel 4.14 Rata-rata Nilai OD Kekuatan Antibodi Poliklonal Terhadap Protein Omp <i>Escherichia coli</i> K88 Dan Tingkat Notasinya	66
Tabel 4.15 Rata-rata Nilai OD Antigenisitas Protein Omp <i>Escherichia coli</i> K88 Dan Tingkat Notasinya	66
Tabel 4.16 Rata-Rata Nilai OD Interakai Antibodi dengan Protein Omp <i>Escherichia coli</i> K88 Dan Tingkat Notasinya	67
Tabel 4.17 Rata-rata Nilai OD Kekuatan Antibodi Poliklonal Terhadap Protein Fimbria <i>Escherichia coli</i> K88 Dan Tingkat Notasinya	68
Tabel 4.18 Rata-rata Nilai OD Antigenisitas Protein Fimbria <i>Escherichia coli</i> K88 Dan Tingkat Notasinya	68
Tabel 4.19 Rata-Rata Nilai OD Interakai Antibodi dengan Protein Fimbria <i>Escherichia coli</i> K88 Dan Tingkat Notasinya	69

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Jawaban Hasil Pengujian Contoh	89
Lampiran 2 Reaksi biokimia <i>Salmonella pullorum</i> dan <i>Escherichia coli</i> (Api ® 20E Biomerieux).....	90
Lampiran 3 Cara kerja SDS-PAGE	93
Lampiran 4 Cara kerja <i>western blotting</i>	95
Lampiran 5 Cara kerja ELISA	96
Lampiran 6 Cara kerja Elusi	97
Lampiran 7 Penghitungan Berat Molekul Protein Hasil SDS-PAGE	98
Lampiran 8 Penghitungan Berat Molekul Protein Antigenik Hasil <i>Western</i> <i>Blotting</i> Dengan Konjugat Antichicken Peroksidase Dan Substrat AEC	102
Lampiran 9 Hasil Elisa (Nilai OD)	108
Lampiran 10 Univariate Analysis of Variance	112

DAFTAR SINGKATAN

ADH	: Arginine Dihydrolase
AEC	: Amino Ethil Carbazole
BCIP/NBT	: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-Phospatase/Nitroblue Tetrazolium
BM	: Berat Molekul
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HSD	: <i>Honestly Significant Difference</i>
IM	: <i>Intra Muscular</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NB	: <i>Nutrient Broth</i>
Omp	: <i>Outer membrane protein</i>
ONPG	: <i>o-Nitrophenyl-D-galactopyranoside</i>
OPD	: <i>O-phenylenediamine</i>
TBS Tween	: <i>Tris Buffer Saline Tween</i>
Rf	: <i>Retandation factor</i>
SCA	: <i>Share Common Antigen</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Deodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
SS Agar	: <i>Salmonella Shigella Agar</i>
TCR	: <i>T Cell Receptor</i>
TSIA	: <i>Triple Sugar Iron Agar</i> :

BAB I PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salmonella pullorum menyebabkan penyakit pullorum, menyerang unggas termasuk ayam. *Salmonella pullorum* merupakan anggota famili *Enterobacteriaceae* dan sangat beradaptasi pada hos (Snoeyenbos, 1991). Di Indonesia, penyakit pullorum sudah tersebar luas, dikenal sejak tahun 1950 dengan nama penyakit berak kapur (*bacillary white diarrhea*) (Direktorat Kesehatan Hewan, 1981).

Infeksi alami *Salmonella pullorum* pada hewan lain merupakan akibat dari kontak langsung atau tidak langsung dengan ayam sakit. Jenis burung yang dapat terinfeksi secara alami adalah itik, ayam mutiara, burung merak, burung puyuh, burung gereja, burung kenari, burung kutilang, dan sejenis burung kakatua. Jenis mamalia yang dapat terinfeksi secara alami ataupun buatan adalah simpanse, kelinci, marmot, babi, anak kucing, serigala, anjing, babi, *mink*, anak sapi dan tikus liar. Kadang-kadang dapat ditemukan adanya Salmonellosis akibat *Salmonella pullorum* pada manusia yang berhubungan dengan makanan (Tabbu, 2004).

Telur tetas yang terinfeksi oleh *Salmonella pullorum* mempunyai peranan penting dalam penularan penyakit ini. Penularan penyakit yang terjadi selama periode penetasan dari anak ayam yang terinfeksi kepada anak ayam yang sehat dapat mengakibatkan penyebaran yang ekstensif. Penularan penyakit dapat juga terjadi dalam suatu *flock* akibat adanya kanibalisme dari ayam yang terinfeksi, memakan

telur yang terinfeksi, dan masuknya *Salmonella pullorum* melalui luka. Penularan dapat juga terjadi melalui pakan yang tercemar oleh *Salmonella pullorum* (Tabbu, 2004).

Penyakit pullorum menimbulkan kerugian ekonomi yang besar sampai milyaran rupiah karena bersifat akut dan kematian yang ditimbulkan pada hewan dapat mencapai 85% terutama anak ayam yang baru menetas (Direktorat kesehatan Hewan, 1981). Pada ayam petelur dewasa yang terkena penyakit pullorum akan menimbulkan penurunan produksi telur sampai 80%, pertumbuhan terhambat, penurunan kualitas daging, daya tetas menurun dan berat badan turun. Pada hewan dewasa penyakitnya bersifat kronis dan dapat sebagai pembawa (*carrier*) penyakit pullorum. Kerugian ekonomi akibat penyakit pullorum juga bersifat tidak langsung sehubungan dengan biaya yang dikeluarkan untuk melakukan pemeriksaan laboratorium oleh *breeder*, untuk memastikan bahwa *breeder* tersebut bebas terhadap penyakit pullorum (Tabbu, 2004).

Upaya pengobatan terhadap penyakit pullorum dengan antibiotika belum memuaskan hasilnya, sedangkan pencegahan dengan pemberian vaksin belum pernah dilakukan di Indonesia. Pencegahan yang dilakukan menurut peraturan Direktur Jendral Peternakan yaitu dengan sanitasi yang baik pada kandang, pakan yang cukup serta pullorum tes untuk mengetahui reaktor positif (Direktorat Kesehatan Hewan, 1981).

Untuk pengendalian penyakit pullorum yang dilakukan sampai saat ini adalah deteksi dini penyakit dengan melakukan pullorum tes, yaitu cara *whole blood plate test* (untuk dilakukan di lapangan / kandang) atau dengan *serum plate test* (untuk pengujian di laboratorium). Pengujian ini hanyalah merupakan deteksi dini untuk mengetahui reaktor, karena bila diperoleh hasil yang positif harus dilanjutkan dengan identifikasi agen dengan cara isolasi bakteri *Salmonella pullorum* yang dilanjutkan dengan uji biokimiawi (OIE, 2000). Di Indonesia, suatu lembaga resmi telah memproduksi antigen pullorum. Produksi antigen pullorum menggunakan cara melemahkan bakteri (inaktivasi bakteri), dan merupakan antigen polivalen yang mengandung strain *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV (Vademicum Pusat Veterinaria Farma, 2007).

Kejadian pada bulan Agustus 2005 bahwa pelaksanaan tes aglutinasi pullorum dengan menggunakan antigen pullorum produksi lembaga resmi tersebut nomor *batch* 0505 dan 0805, pada peternakan ayam Budi Farm, alamat Pakis Kembar, Malang, Jawa Timur, 30-50% dari seluruh populasi 600.000 ekor, menunjukkan hasil positif. Kondisi ayam yang dites tersebut tidak menunjukkan gejala klinis penyakit pullorum. Hal ini menimbulkan masalah, karena peternakan tersebut merupakan peternakan *breeder* yang harus bebas penyakit pullorum.

Pengaduan ke lembaga resmi tersebut sebagai produsen antigen pullorum bahwa antigen tersebut hipersensitif, membuat lembaga tersebut melakukan pengujian ulang. Hasil pengujian ulang tersebut menunjukkan bahwa antigen pullorum nomor

batch 0505 dan 0805 masih baik, dengan arti antigen menunjukkan reaksi positif terhadap serum positif pullorum dan reaksi negatif terhadap serum negatif pullorum.

Dari hasil tersebut, pihak Budi Farm mengambil langkah mengirim sampel berupa ayam untuk diisolasi ke Balai Besar Veteriner (BBV) di Wates Yogyakarta. Hasilnya menunjukkan bahwa ayam tersebut secara serologis positif pullorum tetapi tidak ditemukan bakteri *Salmonella sp.* Menurut Snoeyenbos (1991), reaksi nonpullorum menyebabkan masalah interpretasi. Bakteri yang memiliki antigen yang *closely related* dengan *Salmonella pullorum* bila menginfeksi unggas akan menghasilkan suatu respon aglutinasi. Beberapa peneliti menemukan serum unggas yang terinfeksi bakteri lain, tetapi reaktif dengan antigen pullorum. Mereka melaporkan bahwa, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus sp*, *Aerobacter aerogenes**, *Proteus sp*, *Escherichia coli*, dan spesies dari *Arizona*, *Providence*, dan *Citrobacter*, menyebabkan reaksi nonpullorum tersebut (Snoeyenbos, 1991). Di antara infeksi bakteri-bakteri tersebut yang menyebabkan reaksi silang dengan antigen pullorum, infeksi *Escherichia coli* pada unggas merupakan masalah yang serius, karena menimbulkan kerugian ekonomi yang besar. Penyakit yang ditimbulkan karena infeksi *Escherichia coli* pada unggas ini disebut kolibasilosis, dengan gejala mirip dengan penyakit pullorum yaitu diare. Perbedaan hasil tes aglutinasi pullorum dan hasil isolasi bakteri dapat mengganggu pelaksanaan uji pullorum. sehingga mengakibatkan kerugian ekonomi yang besar.

* Sekarang bernama *Enterobacter aerogenes*.

Menurut Shipley *et al.*, (1981), dan Bakker *et al.*, (1990), *Escherichia coli* K88, penyebab diare pada anak babi, dapat berproliferasi dalam usus halus bagian atas karena mempunyai suatu antigen permukaan yang spesifik. Fimbria *Escherichia coli* K88 merupakan antigen imunogenik yang kuat. Omp *Escherichia coli* berat molekul 35 kD juga bersifat antigenik. Menurut Arockiasamy dan Krishnaswamy (1995), porin OmpC *Salmonella typhi* bersifat imunogenik dan mempunyai kemiripan 90% dengan OmpC *Escherichia coli* dan 78% dengan OmpF *Escherichia coli*. Menurut Nicolle *et al.*, (1988), Omp *Escherichia coli* berat molekul 36 kD secara konsisten bereaksi silang dengan antibodi terhadap Omp strain *Escherichia coli* lain. Omp *Escherichia coli* juga bereaksi silang dengan antibodi terhadap Omp bakteri *Enterobacteriaceae* yang lain.

Hasil penelitian awal menunjukkan bahwa infeksi oleh 2 strain masing-masing *Escherichia coli* K88 dan *Escherichia coli* Vtec pada ayam menimbulkan gejala awal klinis menyerupai infeksi *Salmonella pullorum*, yaitu nafsu makan menurun, lesu, dan diare. Kondisi ayam yang diinfeksi *Escherichia coli* K88 berangsur membaik meskipun tanpa pengobatan, dan tetap bertahan sampai *booster* ke 5. Sedangkan kondisi ayam yang diinfeksi strain *Escherichia coli* Vtec semakin lemah dan mati setelah *booster* pertama. Dari pengalaman tersebut peneliti meneruskan penelitian terhadap strain *Escherichia coli* K88.

Widjajanto dan Suwarno (2001) telah melakukan sonikasi untuk mengisolasi protein membran luar (Omp) *Salmonella pullorum*, dan menemukan bahwa Omp

Salmonella pullorum tersebut bersifat antigenik. Widjajanto (2003) melakukan penelitian lebih lanjut tentang kemungkinan sifat imunogenik protein tersebut dengan teknik SDS-PAGE dan *western blotting* dan memperoleh hasil sebagai berikut : ditemukan protein Omp yang bersifat antigenik dan imunogenik dengan berat molekul 40-45 kD.

Berdasarkan uraian diatas, peneliti menghubungkan dengan fenomena yang ada. Untuk itu langkah awal yang dilakukan ialah isolasi dan karakterisasi protein antigenik dari Omp strain *Salmonella pullorum* 11 dan Omp *Salmonella pullorum* AV dan dibandingkan dengan protein antigenik dari Omp dan fimbria strain *Escherichia coli* K88. Dengan cara ini diharapkan ada persamaan karakter dari keduanya sehingga penyebab positif palsu diatas dapat diketahui.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ada kesamaan karakter (berat molekul) protein antigenik antara Omp strain *Salmonella pullorum* 11 dan Omp *Salmonella pullorum* AV dengan Omp dan fimbria strain *Escherichia coli* K88 yang menyebabkan reaksi silang pada tes pullorum ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum :

- Menjelaskan penyebab kejadian reaksi silang pada tes pullorum.

1.3.2 Tujuan khusus :

- Mengkarakterisasi protein antigenik Omp strain *Salmonella pullorum* 11 dan Omp strain *Salmonella pullorum* AV.

- Mengkarakterisasi protein antigenik Omp dan fimbria strain *Escherichia coli* K88.
- Mengkarakterisasi protein antigenik Omp strain *Salmonella pullorum* 11 dan Omp strain *Salmonella pullorum* AV yang mempunyai kesamaan (berat molekul) dengan protein antigenik Omp dan fimbria strain *Escherichia coli* K88.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini secara ilmiah adalah memberi informasi bahwa :

- Penyelesaian secara biomolekuler tentang penentuan protein antigenik Omp strain *Salmonella pullorum* 11 dan Omp strain *Salmonella pullorum* AV, serta protein antigenik Omp dan fimbria strain *Escherichia coli* K88, dalam rangka pembuatan antigen pullorum subunit yang lebih spesifik dapat diwujudkan.
- Hasil penelitian ini bermanfaat pula membantu pemerintah dalam rangka mengendalikan penyakit pullorum pada unggas khususnya ayam di Indonesia.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae adalah sekelompok besar bakteri berbentuk batang Gram-negatif yang heterogen, yang habitat alaminya adalah saluran usus manusia dan hewan. Famili ini mencakup banyak genus (misalnya *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, dan *Proteus*). Beberapa organisme enterik, misalnya *Escherichia coli*, merupakan bagian flora normal dan kadang-kadang menyebabkan penyakit, sementara lainnya, *Salmonella* dan *Shigella*, selalu bersifat pathogen (Joklik *et al.*, 1984).

2.1.1 Struktur pembungkus sel bakteri

Enterobacteriaceae mempunyai struktur dinding sel yang kompleks, yang terdiri dari murein (peptidoglikan), lipoprotein, fosfolipid, protein, dan lipopolisakarida, yang tersusun dalam beberapa lapisan. Lapisan murein-lipoprotein meliputi 20 % dari total dinding sel; sedangkan 80 % merupakan lapisan lipid bilayer dan lipopolisakarida yang terdiri dari rantai polisakarida yang spesifik yang mempunyai sifat antigenik, dan bertanggung jawab terhadap aktivitas endotoksik (Joklik *et al.*, 1984).

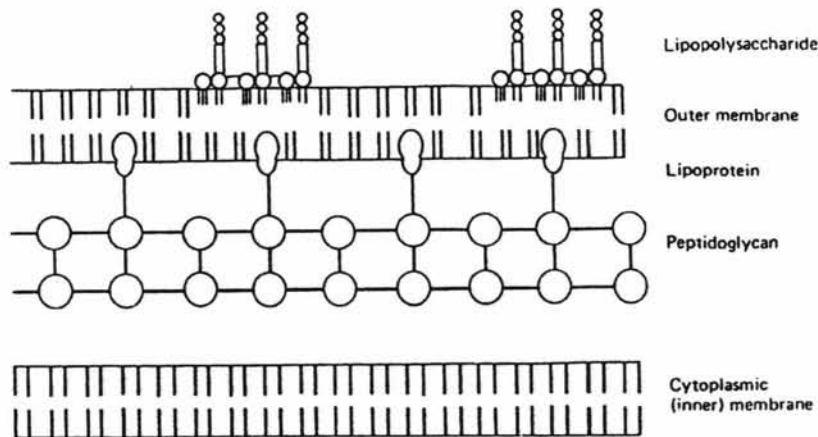


Figure 2-19. A model of the gram-negative cell envelope.

Gambar 2.1 Model pembungkus sel bakteri Gram-negatif (Jawetz *et al.*, 1980)

Salmonella pullorum dan *Escherichia coli* adalah bakteri Gram-negatif. Menurut Taylor (1992), dinding sel bakteri Gram-negatif mengandung 3 polimer yang terletak diluar lapisan peptidoglikan yaitu lipoprotein, selaput luar dan lipopolisakarida. Molekul protein terdiri dari lipid yang terikat pada selaput luar dan senyawa protein mengandung 57 asam amino. Protein ini berhubungan dengan peptidoglikan melalui rantai samping peptidoglikan (tetrapeptida). Pada selaput luar terdapat protein utama dan protein minor. Protein utama menembus kedua sisi selaput luar bergabung dengan lipoprotein dan terikat dengan peptidoglikan, sedangkan protein minor di dalam selaput luar berfungsi sebagai pengangkut (Jawetz *et al.*, 1980). Selanjutnya Robsch *et al.*, (2000) menyatakan bahwa protein pada dinding sel Gram-negatif mempunyai berat molekul 28-43 kD. Mengenai dinding sel bakteri ,

Terry (2000) menjelaskan bahwa pada bakteri Gram-negatif mempunyai peptidoglikan juga memiliki membran luar yang terdiri dari lipid, protein dan lipopolisakarida.

Sebagian besar bakteri Gram-negatif memiliki lipopolisakarida kompleks yang merupakan endotoksin, pada dinding selnya. Menurut El-Samalouti *et al.*, (1990), endotoksin adalah bagian utama dari membran luar dinding sel bakteri Gram-negatif, dan berperan selama terjadi infeksi, trauma, dan syok. Aktifitas biologis dari endotoksin berhubungan dengan lipopolisakarida, toksisitas berhubungan dengan komponen lipid (lipid A), dan imunogenisitas berhubungan dengan komponen polisakarida (Todar, 2002).

Lapisan lipopolisakarida dinding sel tersusun atas 3 regio. Regio I terdiri atas antigen somatik (O), yang merupakan bagian terluar dari lipopolisakarida dinding sel dan terdiri dari unit oligosakarida yang berulang (Joklik *et al.*, 1984). Regio II melekat pada posisi 6 dari *N-acetylglucosamine* (NAG), yaitu berupa suatu *core* polisakarida, disebut juga antigen *core*. Antigen *core* ini tampak sebagai bagian yang konstan pada setiap genus *Enterobacteriaceae*. Antigen *core* tersusun dari suatu rantai gula pendek. Dua gula yang unik ialah *heptose* dan *2-keto-3-deoxyoctonoic acid* (KDO) terdapat pada bagian ujung polisakarida ini. KDO merupakan gula yang unik dan merupakan indikator dalam pengujian lipopolisakarida. Regio III terdiri atas Lipid A, adalah lipid lapisan lipopolisakarida yang merupakan bagian hidrofobik. Lipid A tersusun atas NAG *dimer* dengan 6-7 asam lemak. Lipid A melekat pada

core polisakarida dan menghubungkan lipopolisakarida dengan lapisan lipoprotein dari dinding sel (Todar, 2002).

Baron *et al.*, (1994) mengatakan bahwa disamping secara sifat biokimiawi dan morfologinya, *Enterobacteriaceae* juga dapat didiferensiasi secara serologis berdasarkan 3 kelas *antigenic determinants*, yaitu antigen O (somatik), H, dan K. Joklik *et al.*, (1984) juga mengatakan bahwa antigen O, H, dan K merupakan komponen utama yang digunakan untuk penggolongan *Enterobacteriaceae* secara serologis. *Enterobacteriaceae* mempunyai *share common antigen* (SCA) yang berada pada permukaan luar dari bakteri dan terlibat dalam reaksi antara bakteri dengan hos.

Antigen O merupakan antigen determinan utama (*antibody-combining site*) dari sel bakteri Gram-negatif (Todar, 2002). Menurut Baron *et al.*, (1994), antigen O merupakan lipopolisakarida atau endotoksin yang bersifat *heat-stabile*.. Antigen O penting sebagai faktor virulensi yang toksik, yang berperan pada ikatan bakteri pada jaringan *target* selama terjadi infeksi. Hilangnya rantai antigen O menyebabkan perubahan virulensi organisme (Joklik *et al.*, 1984). Menurut Todar (2002), antigen O berfungsi proteksi sel bakteri dari reaksi antibodi dan komplemen.

Antigen K berada di luar antigen O. Istilah antigen K (*capsule*) berasal dari bahasa Jerman, yaitu untuk menerangkan antigen yang berbentuk *capsular polysaccharide* dari bakteri enterik. Penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa antigen K dari *Escherichia coli* adalah protein dan berbentuk fimbria. Antigen fimbria *Escherichia coli* K88 dan K99 berperan penting pada proses perlekatan pada

mukosa usus halus (Joklik *et al.*, 1984). Antigen K dimiliki oleh *Klebsiella*, *Escherichia coli* dan *Salmonella*, dan bersifat *heat-labile* (Baron *et al.*, 1994)

Antigen flagella (H) adalah protein. Variasi antigeniknya terletak pada perbedaan susunan asam amino flagella (Joklik *et al.*, 1984). Antigen H bersifat *heat-labile* (Baron, *et al.*, 1994).

2.2 *Salmonella pullorum*

Genus *Salmonella* spesies enterika mempunyai lebih dari 2000 serovar, di antara serovar tersebut secara alamiah ditemukan pada unggas dan penyakitnya disebarluaskan melalui berbagai macam makanan. Pada manusia dan hewan lain yang peka Salmonellosis menyebabkan enteritis dan demam enterik, salah satu spesies adalah *Salmonella pullorum* (Baron *et al.*, 1994).

Pengelompokan bakteri *Salmonella sp.* memiliki berbagai variasi, antara lain Holt *et al.*, (1994) menulis bahwa bakteri *Salmonella pullorum* adalah merupakan serovar dari subspecies *choleraesuis* dari spesies *Salmonella choleraesuis*; sedangkan Le Minor dan Popoff (1998) tetap menyatakan bahwa berdasarkan atas skema Kauffmann-White, bakteri *Salmonella pullorum* terdapat pada kelompok *Salmonella* serogroup D1 bersama-sama dengan *Salmonella gallinarum* dan *Salmonella enteritidis*. Christensen *et al.*, (1995) dan Olsen *et al.*, (1996) menyatakan bahwa *Salmonella pullorum* adalah merupakan biovar/biotip dari serotipe *gallinarum*. Keduanya berbeda dalam menimbulkan penyakit, yaitu bakteri *Salmonella pullorum*

menimbulkan penyakit pullorum sedangkan bakteri *Salmonella gallinarum* menimbulkan *fowl typhoid* dan virulensi yang dimiliki pun berbeda.

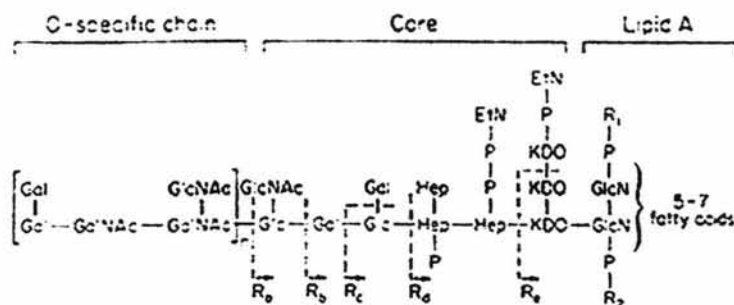
Salmonella pullorum berbentuk batang, bersifat Gram-negatif, tidak berspora, dan tidak memiliki flagella, tidak berkapsul, non motil, serta tumbuh optimum pada 37^oC. *Salmonella pullorum* hanya memiliki antigen O (somatik) dan dalam uji biokimiawi membentuk dihidrogen sulfida pada TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), memfermentasi glukosa dan tidak memecah urea (Snoeyenbos, 1991). Pada TSIA, *Salmonella pullorum* menunjukkan warna merah (basa) di daerah miring, sedangkan bagian ujung berwarna kuning (asam) dan pembentukan gas ditandai pada bagian ujung bawah medium pecah serta media terangkat ke atas (OIE, 2000).

Isolasi bakteri *Salmonella pullorum* membutuhkan media selektif yaitu media *Salmonella Shigella Agar (SSA)* tetapi dapat pula digunakan media *Mac Conkey Agar* dan *Endo Agar* (Cappucino & Sherman, 1985). Pertumbuhan bakteri pada media selektif menunjukkan koloni yang halus, bulat dan tepi rata, tidak berwarna (*colorless*) dan tembus cahaya / transparan (OIE, 2000). Pertumbuhan bakteri *Salmonella pullorum* pada media *sulfit indol motility (SIM)* berupa garis putih pada bekas tusukan (non motil), terjadi pembentukan gas H₂S, dan uji indol hasilnya negatif, untuk pengujian ini memerlukan suasana aerob atau fakultatif aerob (Gillespie dan Timoney, 1981, dan Santoso, 2000).

2.2.1 Antigenisitas *Salmonella pullorum*

Salmonella pullorum tidak memiliki antigen H karena tidak mempunyai flagella, dan hanya memiliki antigen O saja. Antigen O pada *Salmonella pullorum* adalah bagian dari sel bakteri yang tahan terhadap pemanasan, alkohol, dan asam (Merchant dan Packer, 1965). Antigen O adalah spesifik, resisten terhadap enzim proteolitik, stabil pada pemanasan dan memiliki komposisi lipopolisakarida. Antigen serupa juga dimiliki oleh *Salmonella gallinarum*, oleh karena itu untuk membedakan antara keduanya dilakukan uji biokimiawi (Gillespie dan Timoney, 1981). Menurut Stefanov *et al.*, (1977), bagian yang toksik, antigenik, dan imunogenik dari *Salmonella gallinarum - pullorum* adalah antigen O.

Lipopolisakarida pada dinding sel dapat bersifat endotoksin apabila bakteri mengalami lisis. Perubahan lipopolisakarida karena sesuatu akan menjadi lipid A dan polisakarida (oligosakarida) yang masing-masing mempunyai sifat berbeda (Taylor,1992 dan Terry,2000). Sifat lipid A sebagai toksin dan oligosakarida sebagai antigen O merupakan spesifik pada *Salmonella pullorum* (Terry, 2000).



Gambar 2.2 Struktur lipopolisakarida *Salmonella* secara umum (Todar, 2002)

Sebagai antigen somatik dari oligosakarida, di dalamnya mengandung 3-4 monosakarida yaitu terdiri dari pentosa, 4 amino pentosa, heksosa dan 2 amino heksosa. Sedangkan pada bagian *core* mengandung 2 keto 3 deoxyoctonic acid (KDO), heptosa dan fosfat. Ketiganya dikenal sebagai *core* polisakarida, yang merupakan antigen O polisakarida (Robsch *et al.*, 2000).

Gillespie dan Timoney (1981) menyatakan bahwa lipopolisakarida sebagai endotoksin sebenarnya dapat bersifat sebagai antigen yang baik dalam menstimulasi aglutinin, tetapi antibodi IgM dapat menetralkan efek toksin dan endotoksin; sedangkan IgG, selain penting untuk menetralkan toksin bakteri dan virus, juga dapat melisis bakteri Gram-negatif dan menghambat pertumbuhan bakteri.

Widjajanto dan Suwarno (2001) melaporkan bahwa telah dilakukan isolasi Omp dari bakteri *Salmonella pullorum* 11 dengan cara ultrasonikasi dan sentrifugasi, kemudian diuji *in vitro* dengan cara ELISA *indirect* ternyata menunjukkan sifat antigenisitas yang baik. Tetapi dalam laporan tersebut tidak dilakukan uji *in vivo* pada hewan coba sehingga belum diketahui titer antibodi dan sifat protektifnya. Widjajanto (2003), melanjutkan penelitiannya dan membuktikan bahwa bahan subunit Omp strain *Salmonella pullorum* 11 dengan berat molekul 40-45 kD merupakan protein spesifik yang bersifat imunogenik.

Menurut Tizzard (1988), bahwa protein yang baik dan bersifat imunogenik dapat menimbulkan antibodi harus memiliki berat molekul di atas 10.000 dalton. Selanjutnya Tizzard (1988) menjelaskan bahwa antigen adalah merupakan suatu

molekul yang mampu berikatan secara spesifik dengan antibodi. Sifat zat antigenik memungkinkan zat tersebut bereaksi dengan produk-produk dari respon imun spesifik, misalnya antibodi. Tidak semua antigen dapat menimbulkan respon imun. Ada dua ciri pokok antigenisitas, yaitu limitasi fisikokimiawi dan keasingan. Limitasi fisikokimiawi suatu senyawa artinya agar dapat bersifat antigenik adalah molekul harus besar, kaku dan kimiawi kompleks. Molekul kecil dapat berlaku sebagai antigen, namun molekul besar jauh lebih baik (misalnya albumin serum dengan berat molekul lebih dari 60.000 dalton merupakan antigen yang baik dibanding angiotensin berat molekul 1031 dalton merupakan antigen yang kurang baik). Selain itu makromolekul dengan struktur yang kompleks seperti protein merupakan antigen yang jauh lebih baik dari pada polimer besar sederhana. Keasingan suatu senyawa agar dapat bersifat antigenik, artinya adalah sifat dasar bahan asing yang harus sedemikian rupa sehingga dapat dikenal sebagai bukan unsur tubuh normal. Dengan demikian dapat dikatakan semua protein merupakan antigen yang baik. Abbas dan Lichtman (2005) menyatakan bahwa struktur imunogen sangat ditentukan oleh kuat tidaknya keserasian bentuk, makin konstan keserasian bentuknya makin kuat sifat imunogenitasnya.

2.2.2 Penyakit pullorum

Penyakit pullorum merupakan suatu penyakit infeksius pada unggas, terutama anak ayam dan anak kalkun, yang ditularkan melalui telur. Penyakit ini disebabkan

oleh *Salmonella pullorum*, juga dikenal dengan nama *bacillary white diarrhea*, *white diarrhea*, atau berak kapur. Penyakit pullorum menimbulkan kerugian ekonomi yang besar sampai milyaran rupiah karena bersifat akut dan kematian yang ditimbulkan pada hewan dapat mencapai 80-90% terutama anak ayam umur sampai 7 hari. Pada ayam petelur dewasa yang terkena penyakit pullorum akan menimbulkan penurunan produksi telur sampai 80%, pertumbuhan terhambat, penurunan kualitas daging, daya tetas menurun dan berat badan turun. Pada hewan dewasa penyakitnya bersifat kronis dan dapat sebagai pembawa (*carrier*) penyakit pullorum. Kerugian ekonomis akibat penyakit pullorum dapat bersifat tidak langsung sehubungan dengan biaya yang dikeluarkan untuk melakukan pemeriksaan laboratorium pada peternakan *breeder* untuk memastikan bahwa *breeder* tersebut bebas dari infeksi *Salmonella pullorum* (Tabbu, 2004).

2.2.3 Cara penularan penyakit pullorum.

Telur tetas yang terinfeksi oleh *Salmonella pullorum* mempunyai peranan yang penting dalam penularan penyakit ini. Penularan dapat juga terjadi akibat adanya kanibalisme, dari ayam yang terinfeksi memakan telur yang terinfeksi, dan masuknya *Salmonella pullorum* lewat luka. Penularan penyakit yang terjadi selama periode penetasan dari anak ayam yang terinfeksi kepada anak ayam yang sehat dapat mengakibatkan penyebaran yang ekstensif. Penularan dapat juga terjadi melalui

pakan, kandang, dan peralatan kandang yang tercemar oleh *Salmonella pullorum* (Tabbu, 2004).

2.2.4 Gejala klinik penyakit pullorum.

Pada anak ayam akan terlihat mengantuk, lemah, kehilangan nafsu makan, dan diikuti kematian yang mendadak. Anak ayam yang terinfeksi kerap kali juga "menciap" kesakitan ketika sedang defekasi dan pada umumnya akan terbentuk kotoran berwarna putih menyerupai kapur (pasta) atau hijau kecoklatan. Pada ayam dewasa yang terinfeksi menunjukkan adanya jengger yang pucat, berkeriput, mengecil dan berwarna kelabu, juga diikuti penurunan produksi telur, fertilitas dan daya tetas telur (Tabbu, 2004).

2.2.5 Diagnosis penyakit pullorum

Ayam dewasa yang terinfeksi dapat dideteksi dengan pemeriksaan serologis dengan menggunakan uji aglutinasi. Sejumlah metode pemeriksaan digunakan meliputi *whole blood plate test*, *serum plate test* dan *tube agglutination test*, meskipun demikian uji terbanyak yang dilakukan adalah *whole blood test* dan *tube agglutination test* (OIE, 2000).

a. *Whole blood plate test*

Pada *object glass* ditetaskan 2 tetes antigen dengan menggunakan pipet, kemudian dicampur dengan darah ayam sebanyak 1 tetes dan diaduk dengan pengaduk kaca sehingga keduanya bercampur dengan baik. Tunggu sampai 2 menit sambil digoyang goyangkan perlahan . Penilaian hasil reaksi dimulai sejak selesai mengaduk sampai 2 menit berikutnya. Reaksi negatif terlihat jika campuran tetap homogen (tidak terjadi aglutinasi) hingga 2 menit berlalu. Reaksi positif bila terjadi gumpalan (aglutinasi) yang jelas dengan sekeliling bening dan terang maksimum 2 menit setelah pengadukan. Reaksi *dubius* bila reaksi berada antara negatif dan positif, yaitu reaksi aglutinasi yang tidak spesifik dengan cairan disekelilingnya yang keruh (OIE, 2000).

b. *Rapid serum plate test*

Uji ini dilakukan bila *whole blood plate test* meragukan, yaitu dengan cara mengambil darah ayam dari vena atau jantung kemudian ditampung dalam tabung steril untuk dipisahkan serumnya. Selanjutnya diambil 1 tetes serum dan diletakkan pada dasar obyek, kemudian ditambah 2 tetes antigen pullorum dan diaduk sampai rata. Reaksi positif bila setelah beberapa detik terjadi aglutinasi, sedangkan reaksi negatif bila tidak terjadi aglutinasi, sedangkan bila diantaranya dianggap *dubius* (OIE, 2000).

c. Tube agglutination test.

Dalam uji ini diperlukan serum darah ayam tersangka dan antigen *Salmonella pullorum*. Cara melakukan uji ini adalah : ayam tersangka diambil darahnya dan ditampung pada tabung steril sebanyak 1-2 ml dan dipisahkan serumnya. Campuran yang sama banyak antara serum dan antigen diinkubasi kurang lebih 20 jam pada 37°C. Adanya aglutinasi pada dasar tabung dan cairan bagian atas jernih dianggap bahwa uji tersebut positif. Pada uji yang negatif cairan pada tabung masih tetap keruh dan bila hasilnya merupakan diantara keduanya dianggap *dubius* (OIE, 2000).

2.3 Escherichia coli

Escherichia dinamai setelah seorang ahli bakteri Jerman, Theodore Escherich (1857-1911), menemukannya pada tahun 1885. *Escherichia coli* berbentuk batang lurus, Gram- negatif, berukuran 1,1-1,5µm x 2,0-6,0µm, tunggal atau sepasang, dan umumnya berkapsul (Holt *et al.*, 1994). Pada media isolasi, beberapa strain tampak menunjukkan reaksi fermentasi. Beberapa strain menunjukkan β hemolitik ketika tumbuh pada agar darah, motil, menghasilkan lisin dekarboksilase, dan menggunakan asetat sebagai sumber karbon (Joklik *et al.*, 1984).

Spesies *Escherichia coli* merupakan mikroflora normal pada usus besar hewan berdarah panas dan manusia. Meskipun demikian, beberapa strain *Escherichia coli* merupakan strain enteropatogenik yang dapat menyebabkan penyakit pada usus. Patogenesis penyakit oleh *Escherichia coli* dihubungkan dengan faktor virulensinya,

yang dikode oleh plasmid, bakteriofaga, atau kromosom. Strain-strain *Escherichia coli* yang bersifat enteropatogenik ialah :

Enteroxigenic Escherichia coli (ETEC) adalah penyebab yang umum dari diare pada anak-anak dan hewan ternak. Strain ini menghasilkan adhesin yang menyebabkan strain ini dapat melekat dan membentuk koloni di epitel usus. Ketika sudah membentuk koloni, strain ini akan menghasilkan satu atau beberapa toksin, yang menyebabkan hos merasa mual, muntah, kram perut dan diare yang diikuti dengan dehidrasi (ERIC, 2006).

Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) dapat berinvansi dan bereplikasi dalam sel-sel epitel usus, menyebabkan kerusakan sel, reaksi inflamasi, dan ulserasi pada usus (ERIC, 2006).

Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) menyebabkan wabah diare dan diare kronis, khususnya pada anak-anak. Setelah diawali hubungannya dengan sel epitel usus, strain ini mengeluarkan respon yang menyebabkan sel hos kehilangan mikrofili, dan membentuk *platform* atau tumpuan pada tempat perlekatan bakteri (ERIC, 2006).

Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) mirip dengan strain EPEC, kecuali dalam menimbulkan gejala diare berdarah. Strain ini juga menghasilkan toksin yang dapat menyebabkan kerusakan sel-sel epitel usus (ERIC, 2006).

Enteraggregative Escherichia coli (EagEC) membentuk agregat bakteri sehingga sel menjadi tebal, hal ini yang membedakan dari ETEC, EPEC, dan EHEC.

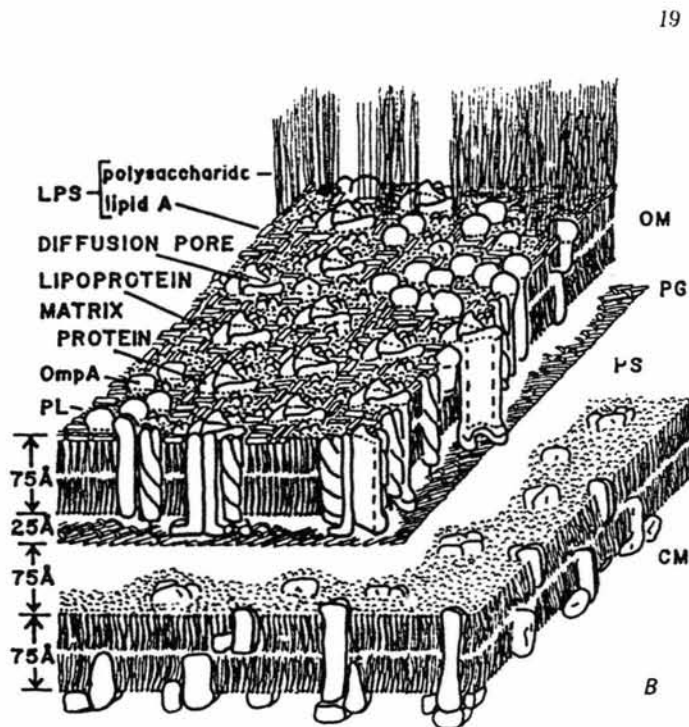
Agregat ini mungkin berhubungan dengan diare persisten yang ditimbulkan (ERIC, 2006).

Diffusely adherent Escherichia coli (DAEC), membentuk hubungan yang menyebar dengan sel hos. Strain ini dilaporkan menyebabkan diare dan infeksi saluran kencing (ERIC, 2006).

2.3.1 Struktur antigenik

Secara serologis atau berdasar pada faktor virulensi, *Escherichia coli* terdiri dari antigen O, antigen K, dan antigen H. Telah dikenal sedikitnya 150 tipe antigen O, 90 tipe antigen K, dan 50 tipe antigen H. Antigen H berdasar sifat fisiknya, dibagi menjadi 3, yaitu L, A, dan B .

Sebagian besar antigen K adalah polisakarida (Joklik *et al.*, 1984). Seperti menurut Poxton dan Arbuthnott (1990), *Escherichia coli* K1 dan K5 memiliki *capsular polysaccharide*, yang bersifat imunogenik dan berfungsi sebagai antikomplemen dan antifagositik. Tetapi, menurut Joklik *et al.*, (1984), antigen K dari *Escherichia coli* K88 dan K99 adalah protein dan berbentuk fimbria. Antigen fimbria *Escherichia coli* K88 dan K99 berperan penting pada proses perlekatan pada mukosa usus halus hewan.



Gambar 2.3 Model kapsul sel *Escherichia coli* (Jawetz *et al.*, 1980)

2.3.2 Antigenisitas *Escherichia coli*

Escherichia coli memproduksi sedikitnya 2 tipe fimbria, yaitu *mannose-sensitive* atau disebut "*common pilli*", dan *mannose-resistance*. Keduanya penting untuk membentuk koloni pada jaringan hos. Antigen faktor kolonisasi (CFAs) *mannose-resistance* I dan II pada EPEC dapat melekatkan bakteri tersebut pada usus manusia, sedangkan pada K88 dan K99 dapat melekatkan bakteri tersebut pada usus hewan (Joklik *et al.*, 1984).

Dua enterotoksin telah diisolasi dari *Escherichia coli*, yaitu: *heat-labile* enterotoksin (LT) dan *heat-stabile* enterotoksin (ST). Kemampuan menghasilkan

enterotoksin ini berhubungan dengan 2 plasmid. Plasmid kesatu mengkode kedua enterotoksin, dan plasmid kedua hanya mengkode ST. LT menstimulasi *adenil siklase* pada sel epitel mukosa usus halus. Stimulasi enzim ini akan meningkatkan permeabilitas usus, sehingga dapat dilewati cairan dan terjadi diare. LT juga memicu reaksi imunologis, sedangkan ST tidak menstimulasi *adenil siklase*, tetapi menstimulasi *guanilat siklase* sehingga menghasilkan *cyclic* guanosin monofosfat dan mengganggu absorpsi Na dan Cl. ST juga menurunkan motilitas usus besar (Joklik *et al.*, 1984).

Escherichia coli juga menghasilkan hemolisin yang dikode oleh suatu plasmid dengan berat molekul 41 megadalton. Peran hemolisin dalam infeksi belum jelas, tetapi hemolisin bersifat sitotoksik pada sel kultur jaringan, dan strain *Escherichia coli* yang hemolitik lebih virulen daripada strain *Escherichia coli* yang nonhemolitik (Joklik *et al.*, 1984).

2.3.3 Strain *Escherichia coli* K88

Strain *Escherichia coli* K88, penyebab diare pada anak babi, dapat berproliferasi dalam usus halus bagian atas karena mempunyai suatu antigen permukaan yang spesifik (Shiple *et al.*, 1981). Secara eksperimental fimbria strain *Escherichia coli* K88 pada babi merupakan antigen yang penting untuk perlekatan pada mukosa usus halus (Blomberg *et al.*, 1993). Menurut Bakker *et al.*, (1990), fimbria K88 dari ETEC merupakan antigen imunogenik yang kuat yang dapat

menimbulkan *protective immunity*. Suatu polipeptida dengan berat molekul 70.000-dalton, produk dari *adhA* pili adesi K88ac, berada pada membran luar sel, berhubungan dengan Omp A dan matrik protein. Dua polipeptida dengan berat molekul 26.000 dan 17.000-dalton (produk dari *adhB* dan *adhC*) berada di sekitar ruang periplasmik. Suatu molekul dengan berat molekul 23.500-dalton (produk dari *adhD*) ditemukan pada membran dalam dan luar (Dougan *et al.*, 1983).

BAB III

MATERI DAN METODA PENELITIAN

BAB 3 MATERI DAN METODA PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi laboratoris bertujuan guna mendapatkan bahan protein subunit dengan melakukan isolasi dan karakterisasi protein antigenik Omp strain *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV , serta protein antigenik Omp dan fimbria strain *Escherichia coli* K88. Untuk selanjutnya protein spesifik yang bersifat antigenik antara *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV direaksikan silang dengan antibodi poliklonal *Escherichia coli* K88, demikian sebaliknya. Dengan metoda demikian diharapkan penyebab reaksi silang pada tes pullorum dapat diketahui.

3.2 Sampel

Sampel yang akan diperiksa untuk penelitian ini adalah isolat bakteri strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 dari Pusat veterinaria Farma Surabaya. Hewan yang akan dipergunakan untuk pembuatan antibodi poliklonal adalah ayam *Gallus gallus*, jantan, jenis broiler strain Cobb, umur 1 bulan, masing-masing sebanyak 4 ekor.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini dijabarkan sebagai berikut :

a. Strain *Escherichia coli* K88

Strain *Escherichia coli* K88 merupakan penyebab diare pada anak babi. Fimbria strain *Escherichia coli* K88 pada babi merupakan antigen yang penting untuk perlekatan pada mukosa usus halus, dan bersifat imunogenik yang kuat yang dapat menimbulkan *protective immunity*.

b. Strain *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV

Strain *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV merupakan strain dari serovar *Salmonella pullorum* yang menyebabkan penyakit pullorum pada unggas, terutama anak ayam yang ditularkan melalui telur. Penyakit pullorum juga dikenal dengan nama *bacillary white diarrhea*, *white diarrhea*, atau berak kapur. *Salmonella pullorum* tidak memiliki fimbria, dan dilaporkan Omp nya bersifat antigenik dan imunogenik.

c. Omp (*outer membrane protein*)

Omp adalah protein yang ditemukan berikatan dengan membran sel (apakah melekat secara ekstrinsik atau peripheral) ataupun terinsersi (intrinsik atau integral) ke dalam membran (Dorland, 2005). Menurut Joklik *et al.*, (1984) Omp adalah protein yang bergabung dengan lipoprotein dan terikat dengan peptidoglikan.

d. Fimbria

Fimbria disebut juga pili, adalah tonjolan pada permukaan sel yang kaku, dan banyak dimiliki oleh bakteri Gram-negatif. Protein minor yang terletak pada ujung fimbria bertanggung jawab terhadap sifat-sifat perlekatan (Jawetz *et al.*, 1980).

f. Antibodi poliklonal

Antibodi poliklonal ialah antibodi yang tidak spesifik terhadap satu macam epitop. Antibodi ini sering digunakan untuk *blotting* karena mempunyai afinitas yang tinggi terhadap antigen (Rantam, 2003).

g. Reaksi silang

Interaksi antigen dengan suatu antibodi yang terbentuk terhadap antigen yang berbeda, karena antigen yang pertama mempunyai *antigenic determinant* yang identik atau sangat terkait.

3.4 Lokasi Dan Waktu Penelitian

3.4.1 Lokasi

Penelitian ini dilakukan di Surabaya, yaitu di Laboratorium Biologi Molekuler dan Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Tropical Disease Centre (TDC) Universitas Airlangga (keduanya berada di kampus C Sukolilo Surabaya), dan Laboratorium Penyakit Mulut Dan Kuku Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

3.4.2 Waktu penelitian

- a. Pemurnian bakteri dan identifikasi bakteri : 1 minggu
- b. Pembuatan bakterin dan antibodi poliklonal : 4 bulan
- c. Isolasi dan karakterisasi protein antigenik strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 : 2 minggu
- d. Tes antigenisitas : 1 minggu

Seluruh pelaksanaan penelitian memerlukan waktu 5 bulan. Untuk penyusunan akhir dan lainnya dibutuhkan waktu sekitar 2 bulan.

3.5 Prosedur Pengumpulan Data

Pengumpulan dan pencatatan data dilakukan pada saat pemurnian bakteri, uji biokimiawi, pembuatan bakterin dan poliklonal antibodi. Penghitungan kadar protein antigenik, pelaksanaan isolasi dan karakterisasi protein antigenik Omp strain *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88 dan fimbria *Escherichia coli* K88, juga dicatat hasilnya. Hasil ELISA berupa nilai OD sebelum dan sesudah elusi dicatat dan dibandingkan..

3.6 Analisa Data

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi laboratoris dengan pengertian tanpa penghitungan statistika. Data dari hasil isolasi dan identifikasi bakteri, isolasi protein antigenik, SDS-PAGE, *western blotting* dan ELISA sebelum dan sesudah

elusi dianalisa secara diskriptif. Untuk melihat perbedaan antara protein antigenik dan antibodi poliklonal digunakan *Univariate of Analysis Variance* dan *post hoc test* HSD.

3.7 Bahan Penelitian

3.7.1 Bahan untuk pemurnian dan identifikasi bakteri strain *Salmonella*

***pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88**

- Bakteri strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 berasal dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya.
- Media Mac Conkay Agar
- Media SS Agar
- Bahan-bahan untuk pewarnaan Gram
- TSIA
- Kit tes gula-gula Api @20E Biomerieux

3.7.2 Bahan untuk pembuatan bakterin dan antibodi poliklonal

- Ayam (*Gallus gallus*, jantan, jenis broiler strain Cobb), umur 1 bulan
- Stok bakteri strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 (yang sudah murni).
- Adjuvant Sephic
- NaCl fisiologis steril
- PBS steril

3.7.3 Bahan untuk isolasi protein antigenik

- Stok bakteri strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 (yang sudah murni).
- Media Mac Conkay Agar
- Media SS Agar
- Media *nutrient broth* (NB)
- Triton X-100 2%
- Asam sitrat 2,5% pH 4

3.7.4 Bahan untuk karakterisasi protein antigenik

- Bahan- bahan untuk pelaksanaan SDS-PAGE
 - o Protein Omp *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88, dan fimbria *Escherichia coli* K88.
 - o Bis-acrylamide
 - o Tris
 - o SDS
 - o Temed
 - o Ammonium persulfate
 - o Glycerol
 - o Glycine
 - o Coomasie blue
 - o *Marker* protein (produksi Bio-Rad)

- Asam sitrat 10%

- Bahan untuk pelaksanaan *western blotting*

- Membran nitroselulose
- Marker Rainbow (produksi Bio-Rad)
- Kertas Whatman
- Tris
- SDS
- Glycine
- TBS Tween 0,05%
- Bovine Serum Albumin
- Antibodi polivalen *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88
- Serum negatif
- Konjugat *anti-chicken* IgG Alkaline phosphatase
- Substrat Phospatase BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-Phospatase/Nitroblue Tetrazolium)
- Konjugat anti-chicken anti Ig G peroksidase
- Substrat AEC (Amino Ethil Carbazole)
- NN Dimetil Formamid
- 0,05 M Sodium Acetat *Buffer*
- H₂O₂

3.7.5 Bahan untuk pengukuran kadar protein antigenik

- Bovine Serum Albumin

3.7.6 Bahan untuk elusi

Sama dengan bahan untuk SDS-PAGE

3.7.7 Bahan- bahan untuk pengujian ELISA

- Protein Omp *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88 dan protein fimbria *Escherichia coli* K88
- Konjugat *anti-chicken* IgG *Horse Radish Peroxidase* (HRP) (produksi Sigma)
- Substrat OPD
- H₂SO₄
- *Washer solution*
- *Coating buffer*
- Antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88
- Serum negatif

3.8 Alat Penelitian

3.8.1 Alat yang digunakan untuk identifikasi dan pemurnian bakteri

- *Laminar flow*
- Inkubator

3.8.2 Alat yang digunakan untuk pembuatan bakterin dan antibodi poliklonal

- *Laminar flow*
- *Ultra disperser* model LK 22 merek Yamato Jepang
- Kandang ayam

3.8.3 Alat yang digunakan untuk pengukuran kadar protein antigenik

- Spektrofotometer UV-1601 merek Shimadzu

3.8.4 Alat yang digunakan untuk isolasi protein antigenik

- *Incubator shaker*
- Ultracentrifus merek BeckmanTMLE-80K Produksi AS
- *Waterbath*
- *Refrigerated sentrifuge* merek Hitachi tipe Himac SCR 20 B
- Sonikator *Ultrasonic homogenizer* tipe 4710 series, produksi Cole- Parmer Instrument Co. Chicago Illinois.
- *Shaker* model VRN-2000

3.8.5 Alat yang digunakan untuk karakterisasi protein antigenik

- Cetakan dan *chamber* untuk SDS merek Biometra
- *Power suplay* merek Bio-Rad
- *Shaker* GFL
- *Blotter* merek Biometra
- *Cutter*
- Plastik selofan

3.8.6 Alat yang digunakan untuk pengujian ELISA

- *Mikroplate* 96 sumur (merek Nunclon produksi Nunc)
- Alat *washer*
- ELISA *Reader*

3.9 Metoda Penelitian

3.9.1 Pemurnian strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV dan *Escherichia coli* K88

Strain *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV dari kultur media selektif (*Salmonella Shigella* Agar) dan strain *Escherichia coli* K88 dari kultur media selektif (*Mac Conkey* Agar), dilakukan tes biokimia dan pewarnaan Gram. Pada tes biokimia, dilakukan inkubasi selama 24 jam pada temperatur 37⁰ C, selanjutnya diperiksa hasilnya. Apabila pada pengujian ini menunjukkan tanda dan sifat biokimia sesuai dengan *Salmonella pullorum* dan *Escherichia coli*, maka dapat dipakai sebagai stok bakteri.

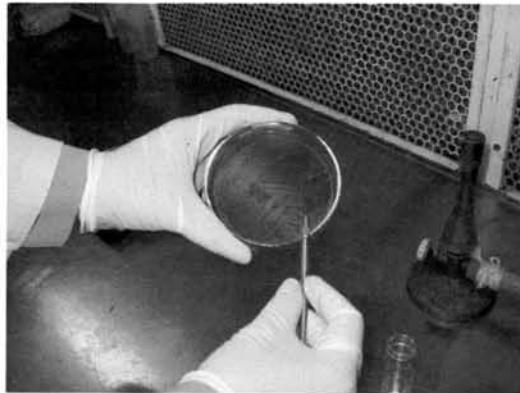
3.9.2 Pembuatan bakterin *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV dan *Escherichia coli* K88

Untuk pembuatan bakterin diperlukan dulu pembuatan suspensi bakteri dengan penambahan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) steril yang sesuai dengan standar Mac Farland 3 (perkiraan 1 ml mengandung 9x10⁸ sel bakteri) sebanyak 20 ml pada tabung reaksi, kemudian dipanaskan pada *waterbath* dengan temperatur 80⁰C selama

30 menit. Setelah dingin ditambahkan kedalamnya *adjuvant* Saphic sama banyak, dan dimikser selama 5 menit. Bakterin ini dapat langsung digunakan. Pada penelitian ini suspensi bakterin *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 disuntikkan pada hewan coba (ayam), untuk pembuatan antibodi poliklonal.



Gambar 3.1 Pembuatan bakterin *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV



Gambar 3.2 Pembuatan bakterin *Escherichia coli* K88



Gambar 3.3 Bakterin *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88

3.9.3 Pembuatan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV dan *Escherichia coli* K88

Bakterin *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV dan *Escherichia coli* K88 masing-masing disuntikkan pada 4 ekor ayam. Setiap ayam disuntik 1 ml secara intramuskuler (IM), penyuntikan ini diulang setiap 2 minggu sekali sampai 6 kali (12 minggu). Pengambilan darah untuk mengukur titer antibodi dilakukan dengan metode *plate test* (*rapid whole blood test*) dan *tube agglutination test* pada minggu ke1 dan 2 setelah penyuntikan terakhir. Pada minggu ke 3 setelah penyuntikan terakhir dilakukan ujiantang terhadap masing-masing ayam yaitu dengan menyuntikkan bakterin tanpa inaktivasi secara intra muskuler. Pengambilan darah dilakukan 3 minggu setelah ujiantang untuk mendapatkan antibodi poliklonal dalam jumlah banyak dan titer tinggi. Serum diukur titer antibodi dengan *plate test*

dan *tube agglutination test*, dan dapat digunakan saat itu atau disimpan pada temperatur -20°C untuk dipakai pada saat *western blotting* dan ELISA.



Gambar 3.4 Penyuntikan bakterin *Escherichia coli* K88 ke hewan coba ayam



Gambar 3.5 Pengambilan darah ayam secara *intracardial*

3.9.4 Isolasi protein antigenik Omp strain *Salmonella pullorum* 11, Omp

Salmonella pullorum AV dan Omp *Escherichia coli* K88

Isolasi protein Omp menggunakan metode Matsujama (Harn, 1992). Bakteri dari media stok strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV dan *Escherichia coli* K88 dibuat suspensi dengan *nutrient broth* (NB) steril sesuai dengan standard Mac Farland 9 (perkiraan 1 ml mengandung 27×10^8 sel bakteri). Suspensi-suspensi tersebut diinkubasi dalam *incubator shaker* 37°C selama 7 jam. Kemudian dilakukan sentrifugasi memakai *refrigerated centrifuge* dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C , sehingga didapatkan supernatan dan endapan (*pellet*). Supernatan dibuang dan endapan dicuci dengan PBS steril, pencucian dilakukan 2 kali sehingga didapatkan supernatan dan endapan. Supernatan dibuang, dan endapan dilarutkan dalam 20 ml PBS steril pH 7,2 dan dilakukan sonikasi. Sonikator yang dipakai adalah Ultrasonic Homogenizer tipe 4710/series, metode yang digunakan adalah jalan 3 menit diikuti dengan istirahat 2 menit dengan kekuatan 20 kHz, dan perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 kali.

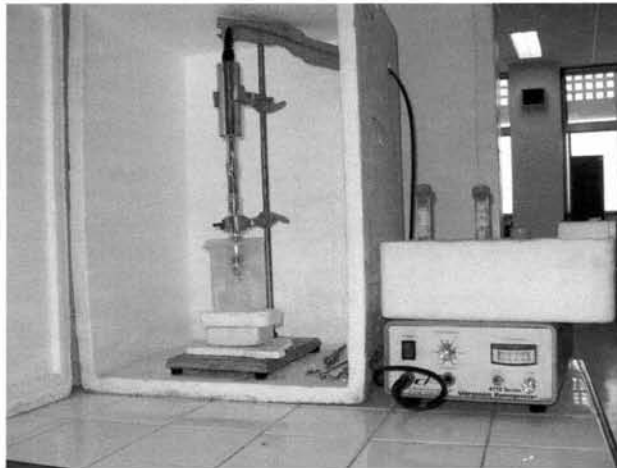
Setelah dilakukan sonikasi dilanjutkan dengan sentrifugasi 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C lagi. Endapan yang diperoleh dibuang, dan supernatan diultrasentrifus 38.000 rpm (4°C) selama 35 menit. Ultrasentrifus yang digunakan adalah merek Beckman OptimaTMLE-80K produksi AS. Supernatan dibuang, dan endapan dilarutkan dalam 20 ml 2% Triton X-100 dalam PBS steril pH 7,2, dan diinkubasi 37°C selama 20 menit. Setelah inkubasi dilanjutkan dengan ultrasentrifus

lagi 38.000 rpm (4⁰C) selama 35 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang, dan endapan dilarutkan dalam 10 ml PBS steril pH 7,2 dan diultrasentrifus 38.000 rpm (4⁰C) selama 35 menit. Supernatan dibuang, dan endapan dilarutkan dalam 1 ml PBS steril pH 7,2, dimasukkan dalam tabung *eppendorf*, dan disimpan dalam -20⁰C.

3.9.5 Isolasi protein antigenik fimbria strain *Escherichia coli* K88

Antigen fimbria strain *Escherichia coli* K88 diisolasi dengan menggunakan suatu modifikasi metode Erickson *et al.*, (Fang *et al.*, 2000). Bakteri strain *Escherichia coli* K88 dikultur dalam NB selama 48 jam dalam *incubator shaker* 150 rpm 37⁰C. Kultur bakteri yang telah tumbuh dalam NB, disentrifus 6000 rpm 4⁰C selama 15 menit. Supernatan dibuang dan endapan dicuci dengan PBS steril. Endapan yang dilarutkan dalam PBS dipanaskan 60⁰C dalam *waterbath* selama 30 menit untuk melepaskan fimbria dari sel bakteri. Ketika masih panas, larutan endapan tersebut disonikasi dengan menggunakan Ultrasonic Homogenizer tipe 4710/series, metode yang digunakan adalah jalan 3 menit diikuti dengan istirahat 2 menit dengan kekuatan tinggi (30 kHz). Fimbria dipisahkan dari sel bakteri dengan sentrifugasi 14.000 rpm 4⁰C selama 15 menit, dan dengan filtrasi melalui membran filter 0,45 um. Fimbria dalam supernatan diendapkan dengan penambahan asam sitrat pH 4, dan disimpan dalam suhu 4⁰C selama 2 jam untuk memfasilitasi presipitasi fimbria, dan diikuti dengan sentrifugasi 14.000 rpm 4⁰C selama 15 menit. Endapan fimbria dilarutkan

dalam 0,1 M PBS steril pH 7,2. Presipitasi dengan asam sitrat pH 4 dan pencucian diulang 4 kali. Hasil akhir berupa endapan fimbria dilarutkan dalam PBS steril pH 7,2 dan disimpan dalam suhu -20°C . Menurut Fang *et al.*, (2000) fimbria yang diperoleh diestimasi lebih dari 95 % murni.



Gambar 3.6 Pelaksanaan ultrasonikasi pada proses isolasi protein fimbria *Escherichia coli* K88

3.9.6 Pengukuran kadar protein

Larutan protein sebelum diukur berat molekul ditera lebih dulu kadar protein per ml dengan memakai alat spectrophotometer tipe UV 1601 merek Shimadzu dan protein standar memakai 3 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA). Dengan alat ini diketahui kadar kandungan proteinnya yang kemudian dapat dipakai sebagai ukuran pemakaian protein tersebut baik untuk SDS-PAGE, *western blotting* maupun untuk ELISA.



Gambar 3.7 Pengukuran kadar protein Omp *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88 dan fimbria *Escherichia coli* K88 dengan menggunakan spektrofotometer

3.9.7 Karakterisasi protein antigenik strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV dan *Escherichia coli* K88

a. SDS-PAGE

Protein yang diperoleh dilakukan pengukuran berat molekul dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate- Poly Acrilamyde Gel Electrophoresis*). Pelaksanaan SDS-PAGE meliputi antara lain pembuatan *stacking gel*, *separating gel*, *electrophoresis buffer*, *washing* dan *staining solution*. Protein sebanyak 15ug dilakukan elektrophoresis dengan menggunakan daya 100 v dan arus 40 mA. Dari elektrophoresis akan diperoleh hasil gambaran protein berupa pita yang mempunyai berat molekul tertentu. Berat molekul pita ditentukan dengan menstarakan dengan *marker* dan selanjutnya dilakukan *western blotting*.



Gambar 3.8 Elektroforesis protein Omp *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88 dan fimbria *Escherichia coli* K88 pada proses SDS_PAGE

b. Western blotting

Protein yang diperoleh ditransfer ke membran nitroselulose menggunakan alat *blotter* dengan daya 125v dan arus 40mA selama 60 menit. *Blocking* dilakukan dengan merendam membran nitroselulosa tersebut dalam larutan BSA 1% selama 24 jam pada suhu 4⁰C. Antibodi primer yang digunakan merupakan antibodi poliklonal dengan pengenceran 1/100.

Tabel 3.1 Tabel Rencana Reaksi Antigen Antibodi Pada *Western Blotting*

Antigen Antibodi	Omp <i>Salmonella</i> <i>pullorum</i> 11	Omp <i>Salmonella</i> <i>pullorum</i> AV	Omp <i>Escherichia</i> <i>coli</i> K88	Fimbria <i>Escherichia</i> <i>coli</i> K88
<i>Salmonella pullorum</i> 11				
<i>Salmonella pullorum</i> AV				
<i>Escherichia coli</i> K88				
Serum negatif				

Setelah inkubasi selama 1 jam dan di cuci dengan TBS dan 0,05% Tween 20 sebanyak 5 kali, membran tersebut direndam dalam antibodi sekunder. Antibodi sekunder yang digunakan ialah yaitu konjugat *anti-chicken* IgG Alkaline Phospatase pengenceran 1/1000. Semua proses tersebut dilakukan pada alat *shaker* dan diakhiri dengan penambahan substrat. *Band* yang tampak merupakan bukti terjadi ikatan spesifik antara protein antigenik dengan antibodi yang direaksikan.

c. Penghitungan berat molekul antigen protein

Penghitungan berat molekul antigen protein dilakukan secara extrapolasi, yaitu dengan mengukur jarak pergerakan protein *marker* dari tempat asal dan jarak pergerakan warna masing-masing *band* protein sampel dari tempat asal. Penghitungan berat molekul secara extrapolasi ditulis dengan rumus sebagai berikut :

Rumus Penghitungan berat molekul metoda ekstrapolasi:

$$\frac{a - b}{c - b} = \frac{d - e}{x - e}$$

Keterangan rumus :

- a. Jarak pergerakan dari tempat asal protein *marker* di bawah warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- b. Jarak pergerakan dari tempat asal protein *marker* di atas warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- c. Jarak pergerakan dari tempat asal warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- d. Berat protein *marker* di bawah warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- e. Berat protein *marker* di atas warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- x. Berat protein sampel yang akan dihitung

d. Elusi

Dari elektroforesis (seperti dalam rangkaian SDS-PAGE) akan diperoleh hasil gambaran protein berupa *band* yang mempunyai berat molekul tertentu. *Band* yang muncul di semua reaksi protein antigenik dengan antibodi poliklonal, dipotong dan dielusi. Hasilnya ialah protein yang mempunyai berat molekul sesuai yang dikehendaki untuk selanjutnya dilakukan ELISA.

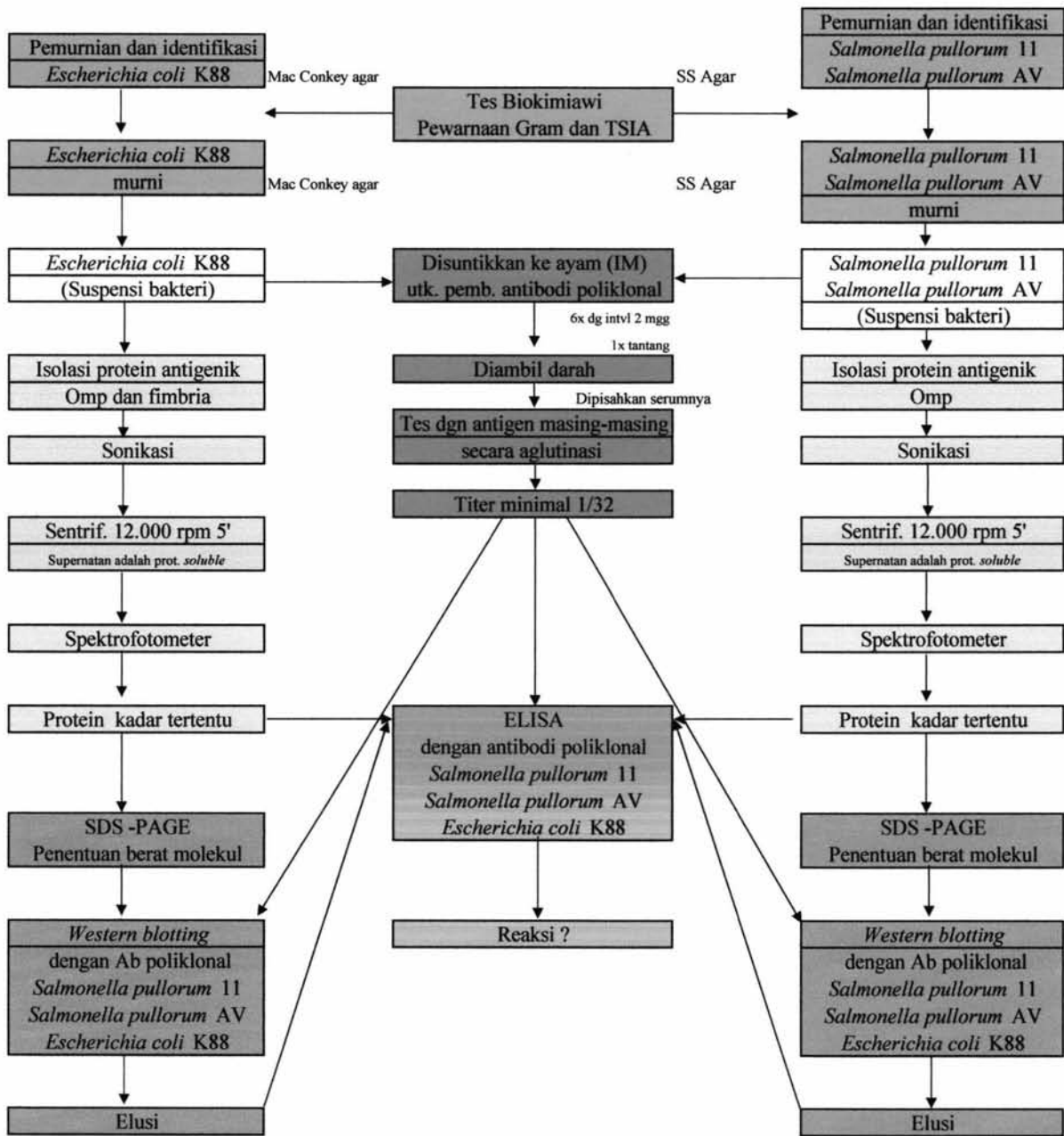
3.9.8 Pengujian antigenisitas protein antigenik secara ELISA

Protein antigenik sebelum elusi dan setelah elusi diukur daya antigeniknya dengan teknik ELISA. Daya antigenik protein spesifik ini terlihat dari titer antibodinya. Antibodi yang digunakan merupakan antibodi poliklonal. *Coating*

protein antigenik sebanyak 10ug dengan menggunakan *coating buffer* selama 24 jam pada suhu 4⁰C. Pemberian antibodi poliklonal dengan pengenceran 1/100 dengan pengaturan seperti pada saat *western blotting*. Konjugat yang digunakan ialah konjugat *anti-chicken IgG Horse Radish Peroksidase (HRP)* pengenceran 1/1000. Semua proses tersebut diakhiri dengan penambahan substrat OPD. Hasil dibaca dengan menggunakan *ELISA reader* dengan filter 450nm.



Gambar 3.9 Pembacaan hasil ELISA protein sebelum elusi (*whole protein*) dengan menggunakan *ELISA Reader*



- Keterangan warna :
- Pemurnian dan identifikasi bakteri
 - Pembuatan bakterin
 - Pembuatan antibodi poliklonal
 - Isolasi protein antigenik
 - Penentuan kadar protein antigenik
 - Karakterisasi protein antigenik
 - Pengujian protein antigenik secara ELISA

Gambar 3.10 Kerangka Operasional Penelitian

BAB IV

ANALISIS HASIL PENELITIAN

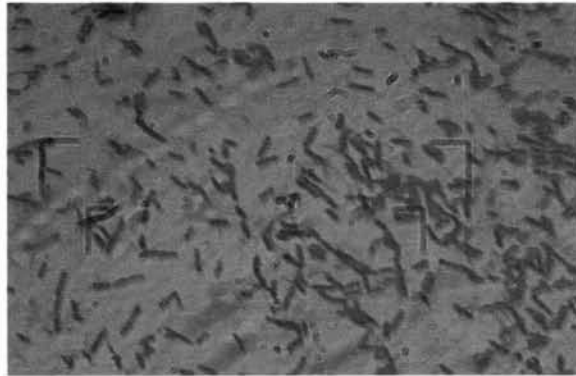
BAB 4 ANALISIS HASIL PENELITIAN

4.1 Pemurnian bakteri strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88

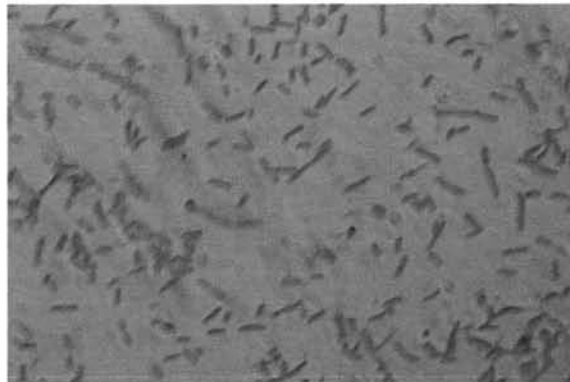
Bakteri *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 tersebut berasal dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Dari pemurnian bakteri yang dilakukan dengan membiakkan bakteri strain *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV pada media selektif Salmonella Shigella Agar, diketahui bentuk koloninya bulat halus dan tidak berwarna (*colourless*), kontaminan negatif, sedangkan koloni bakteri strain *Escherichia coli* K88 pada media selektif MacConkey Agar berbentuk bulat halus berwarna merah, kontaminan negatif. Setelah didapat biakan bakteri yang murni maka tahap ini dilanjutkan dengan pewarnaan Gram dan tes biokimia. Dari hasil pewarnaan Gram diperoleh hasil bahwa bakteri strain *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV dan *Escherichia coli* K88 berbentuk batang Gram-negatif (Gambar 4.1 dan 4.2). Dari hasil tes biokimia diperoleh hasil yang tertera pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Pewarnaan Gram Dan Tes Biokimiawi

Jenis Tes	<i>Salmonella pullorum</i> 11	<i>Salmonella pullorum</i> AV	<i>Escherichia coli</i> K88
Pewarnaan Gram	Batang, Gram-negatif	Batang, Gram-negatif	Batang, Gram-negatif
Morfologi koloni	Bulat, halus, colourless, (kontaminan negatif).	Bulat, halus, colourless, (kontaminan negatif).	Bulat, halus, merah, (kontaminan negatif)
ONPG	-	-	+
ADH	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+
Citrat	-	-	-
H ₂ S	+	+	-
Urea	+	+	-
TDA	-	-	-
Indol	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-
Gelatin	-	-	-
Glukose	-	-	+
Manose	-	-	+
Inositol	-	-	+
Sorbitol	-	-	+
Rhamnose	-	-	+
Sakarose	-	-	+
Melibiose	-	-	+
Amilase	-	-	+
Arabinose	-	-	+



Gambar 4.1 Hasil pewarnaan Gram *Escherichia coli* K88 (pembesaran 100x10)



Gambar 4.2 Hasil pewarnaan Gram *Salmonella pullorum* 11 (pembesaran 100x10)

Kedua gambar di atas mempunyai latar belakang yang berbeda disebabkan karena pencahayaan yang berbeda pada saat pemotretan.

Pada bahan bakteri *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV terdapat penyimpangan pada tes H₂S, maka dilakukan tes TSIA. Hasil tes biokimia pada TSIA terhadap bakteri *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV didapatkan hasil pada dasar agar berwarna kuning, bagian miring agar berwarna merah dengan bercak hitam.

4.2 Pembuatan bakterin *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88

Bakterin adalah bakteri yang dilemahkan (inaktifasi bakteri) dengan cara pemanasan dan diharapkan mampu merangsang timbulnya antibodi pada hewan coba (ayam) dalam rangka produksi antibodi poliklonal. Dalam pembuatan bakterin *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 diperoleh hasil berupa bakterin yang mengandung 9×10^8 sel / ml dalam suspensi sebanyak ± 10 ml. Bakterin yang diperoleh dicampur dengan adjuvan Sephic sama banyak dan diaplikasikan dengan cara injeksi intra muskuler pada hewan coba (ayam), sehingga diharapkan bakterin terserap perlahan dan antibodi terbentuk optimal.

4.3 Pembuatan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88

Dari 4 ekor ayam, masing-masing ayam diambil darahnya sebanyak ± 10 ml sehingga diperoleh ± 40 ml. Setelah didiamkan selama 1 jam akan diperoleh serum sebanyak ± 10 ml.

Untuk menguji bahwa serum ayam ini mengandung antibodi poliklonal dengan titer tinggi (titer minimal untuk *western blotting* ialah 1:32), dilakukan *tube agglutination test*, yaitu dengan membuat pengenceran serum 1:2; 1:4; 1:8 dan seterusnya dalam tabung reaksi, kemudian dicampur suspensi bakteri utuh sama

banyak dan diinkubasikan 24 jam. Titer antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11 adalah 1:64, titer antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* AV adalah 1:64, dan titer antibodi poliklonal *Escherichia coli* K88 adalah 1:32. Kesimpulan dari hasil tersebut bahwa antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV dan *Escherichia coli* K88 dapat digunakan pada saat *western blotting* dan ELISA.

4.4 Isolasi protein antigenik Omp strain *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, dan Omp *Escherichia coli* K88

Hasil akhir proses isolasi adalah protein Omp *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, dan Omp *Escherichia coli* K88 dalam bentuk suspensi protein dalam PBS masing-masing sebanyak 1 ml.

4.5 Isolasi protein antigenik fimbria *Escherichia coli* K88

Hasil akhir proses isolasi protein fimbria *Escherichia coli* K88 dalam bentuk suspensi protein dalam PBS sebanyak 2 ml.

4.6 Pengukuran kadar protein

Setelah diperoleh suspensi protein Omp strain *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88, dan protein fimbria *Escherichia coli* K88, langkah selanjutnya adalah mengukur kadar protein Omp dan fimbria dengan memakai alat spektrofotometer. Untuk itu sebagai larutan protein

standard digunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1 % setara 3 mg/ml dengan rekaman standard spektrum 592 nm. Penentuan kadar protein Omp dan fimbria menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar protein/ml} = \frac{\text{Nilai OD sampel}}{\text{Nilai OD standard}} \times \text{Konsentrasi standard BSA}$$

Tabel 4.2 Hasil Pengukuran Kadar Protein Sebelum Elusi

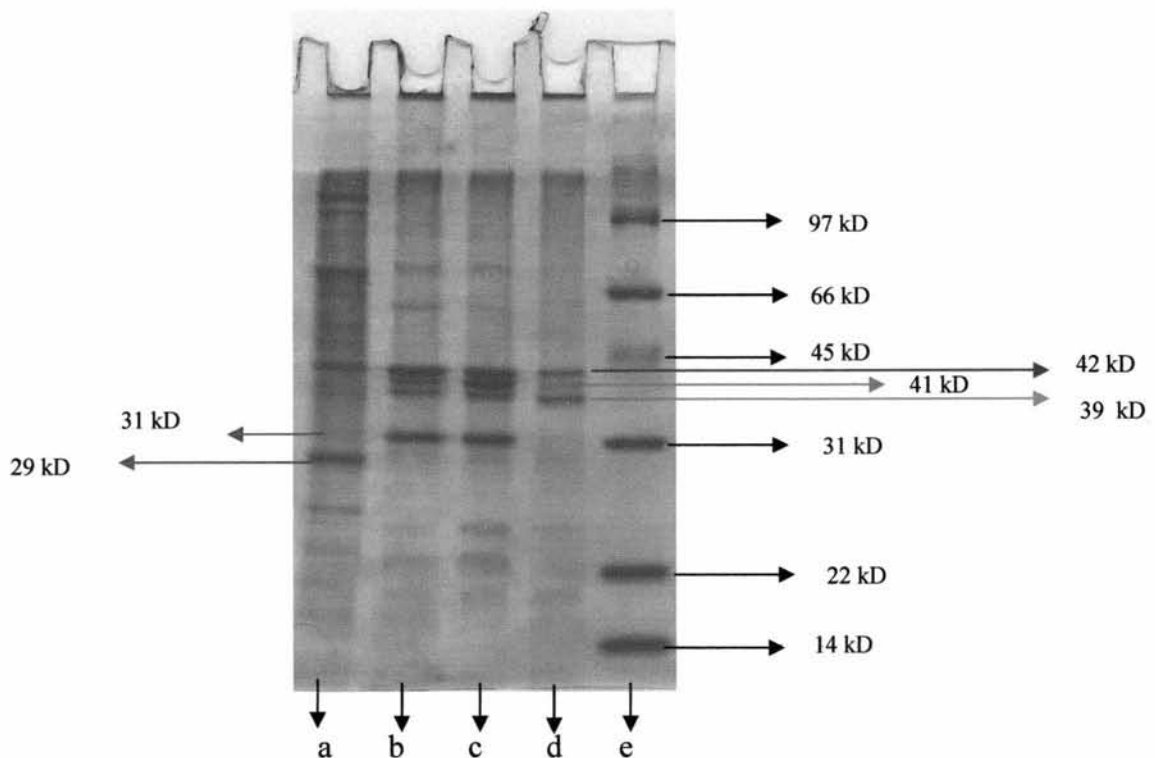
Protein	Kadar protein
Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11	94,4 mg/ml
Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> AV	83,2 mg/ml
Protein Omp <i>Escherichia coli</i> K88	28 mg/ml
Protein fimbria <i>Escherichia coli</i> K88	10,4 mg/ml

4.7 Karakterisasi protein antigenik strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88

a. SDS-PAGE

Setelah diketahui kadar protein Omp strain *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88, dan protein fimbria *Escherichia coli* K88, langkah selanjutnya ialah mengkarakterisasi protein dengan teknik SDS-PAGE. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya berbagai macam protein dengan berat molekul yang disetarakan dengan marker (berat molekul terendah 14,40 kD, berat molekul tertinggi 97,40 kD). Beberapa protein yang tampak

berupa *band* menunjukkan berat molekul protein Omp *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV berkisar antara 18 - 73 kD, Omp *Escherichia coli* K88 berkisar antara 19 - 64 kD, dan fimbria *Escherichia coli* K88 berkisar antara 16 -101 kD. Dari semua protein tersebut di atas, ada suatu kesamaan, yaitu gambaran *band* yang tebal berada pada 29-31 kD dan 39-42 kD sebagaimana dapat dilihat pada gambar 4.3.



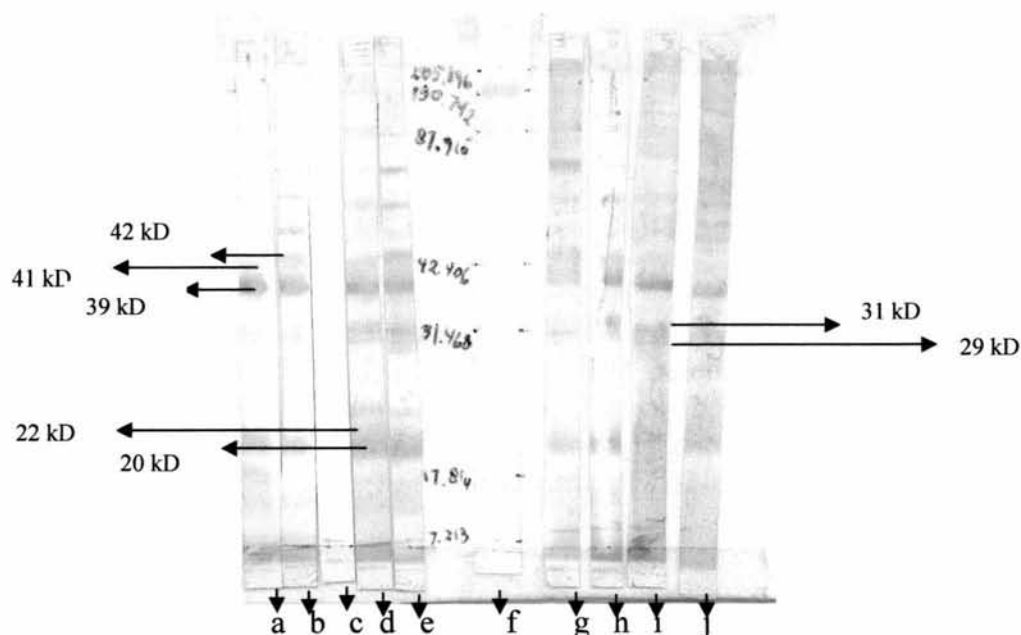
Gambar 4.3 Hasil SDS-PAGE protein Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88, dan fimbria *Escherichia coli* K88

Keterangan gambar :

- Protein fimbria *Escherichia coli* K88
- Protein Omp *Salmonella pullorum* 11
- Protein Omp *Salmonella pullorum* AV
- Protein Omp *Escherichia coli* K88
- Protein *marker*

b. Western blotting

Untuk melihat antigenisitas masing-masing *band*, maka langkah selanjutnya adalah melakukan *western blotting* dengan menggunakan antibodi poliklonal yang disusun secara bersilang sebagaimana terlihat pada gambar 4.4 dan 4.5.



Gambar 4.4 Hasil *western blotting* protein Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88, dan fimbria *Escherichia coli* K88 yang direaksikan dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88 dan serum negatif, dengan konjugat *antichicken* IgG Peroksidase dan substrat AEC

Keterangan gambar:

- Protein Omp *Escherichia coli* K88 + Antibodi *Escherichia coli* K88
- Protein Omp *Escherichia coli* K88 + Antibodi *Salmonella pullorum* AV
- Protein Omp *Escherichia coli* K88 + Antibodi negatif
- Protein Omp *Salmonella pullorum* AV + Antibodi *Escherichia coli* K88
- Protein Omp *Salmonella pullorum* AV + Antibodi *Salmonella pullorum* AV
- Protein marker
- Protein Omp *Salmonella pullorum* 11 + Antibodi *Salmonella pullorum* 11
- Protein Omp *Salmonella pullorum* 11 + Antibodi *Escherichia coli* K88
- Protein fimbria *Escherichia coli* K88 + Antibodi *Escherichia coli* K88
- Protein fimbria *Escherichia coli* K88 + Antibodi *Salmonella pullorum* AV

Tabel 4.3 Hasil Pengukuran Kadar Protein Setelah Elusi

Protein	Berat molekul	
Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11	39-42 kD	4.1 mg/ml
	29-31 kD	7.77 mg/ml
	20-22 kD	44.7 mg/ml
Omp <i>Salmonella pullorum</i> AV	39-42 kD	1.51 mg/ml
	29-31 kD	2.16 mg/ml
	20-22 kD	1.73 mg/ml
Omp <i>Escherichia coli</i> K88	39-42 kD	-
	29-31 kD	1.73 mg/ml
	20-22 kD	4.75 mg/ml
Fimbria <i>Escherichia coli</i> K88	39-42 kD	15.4 mg/ml
	29-31 kD	8.2 mg/ml
	20-22 kD	9.7 mg/ml

4.8 Pengujian antigenisitas protein antigenik secara ELISA

Protein antigenik diuji antigenisitasnya dengan antibodi poliklonal dengan teknik ELISA. ELISA dilakukan terhadap protein Omp *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88, dan fimbria *Escherichia coli* K88 sebelum elusi (*whole protein*) dan sesudah elusi (protein berat molekul 39-42 kD, 29-31 kD, dan 20-22 kD). *Coating* protein antigenik sebanyak 10ug dan antibodi poliklonal yang digunakan diencerkan 1/100 dengan pengaturan seperti pada saat

western blotting. Konjugat yang digunakan ialah konjugat *anti-chicken IgG Horse Radish Peroksidase* (HRP) pengenceran 1/1000. Semua proses tersebut diakhiri dengan penambahan substrat OPD. Hasil yang dibaca dengan menggunakan ELISA *reader* dengan filter 450nm adalah sebagai berikut :

Tabel 4.4 Nilai Rata-rata OD ELISA *Indirect Protein Omp Salmonella pullorum* 11 Sebelum Elusi (*Whole Protein*) Dan Sesudah Elusi (BM 39-42 kD, 29-31 kD, 20-22 kD) Dengan Antibodi Poliklonal

Anti Bodi	Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11											
	<i>Whole protein</i>			BM 39-42 kD			BM 29-31 kD			BM 20-22 kD		
	Rata-Rata	<i>Cut off</i>	Hasil	Rata-Rata	<i>Cut Off</i>	Hasil	Rata-rata	<i>Cut off</i>	Hasil	Rata-rata	<i>Cut Off</i>	Hasil
<i>Sp</i> 11	0.441	0.130	+	0.628	0.060	+	0.526	0.044	+	0.195	0.031	+
<i>Sp</i> AV	0.492	0.130	+	0.633	0.060	+	0.530	0.044	+	0.202	0.031	+
<i>E.coli</i> K88	0.364	0.130	+	0.526	0.060	+	0.427	0.044	+	0.160	0.031	+
S (-)	0.065			0.030			0.022			0.020		
PBS	0.056			0.001			0.001			0.001		

Tabel 4.5 Nilai Rata-rata OD ELISA *Indirect Protein Omp Salmonella pullorum* AV Sebelum Elusi (*Whole Protein*) Dan Sesudah Elusi (BM 39-42 kD, 29-31 kD, 20-22 kD) Dengan Antibodi Poliklonal

Anti Bodi	Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> AV											
	<i>Whole protein</i>			BM 39-42 kD			BM 29-31 kD			BM 20-22 kD		
	Rata-Rata	<i>Cut off</i>	Hasil	Rata-Rata	<i>Cut Off</i>	Hasil	Rata-rata	<i>Cut off</i>	Hasil	Rata-rata	<i>Cut Off</i>	Hasil
<i>Sp</i> 11	0.415	0.148	+	0.647	0.181	+	0.616	0.163	+	0.497	0.157	+
<i>Sp</i> AV	0.456	0.148	+	0.679	0.181	+	0.660	0.163	+	0.530	0.157	+
<i>E.coli</i> K88	0.334	0.148	+	0.538	0.181	+	0.533	0.163	+	0.456	0.157	+
S(-)	0.074			0.090			0.082			0.079		
PBS	0.058			0.078			0.078			0.078		

Tabel 4.6 Nilai Rata-rata OD ELISA *Indirect* Protein Omp *Escherichia coli* K88 Sebelum Elusi (*Whole Protein*) Dan Sesudah Elusi (BM 39-42 kD, 29-31 kD, 20-22 kD) Dengan Antibodi Poliklonal

Anti Bodi	Protein Omp <i>Escherichia coli</i> K88											
	<i>Whole protein</i>			BM 39-42 kD			BM 29-31 kD			BM 20-22 kD		
	Rata-rata	<i>Cut off</i>	Hasil	Rata-Rata	<i>Cut Off</i>	Hasil	Rata-rata	<i>Cut off</i>	Hasil	Rata-rata	<i>Cut Off</i>	Hasil
<i>Sp</i> 11	0.431	0.196	+	0.451	0.157	+	0.651	0.177	+	0.470	0.157	+
<i>Sp</i> AV	0.571	0.196	+	0.436	0.157	+	0.636	0.177	+	0.426	0.157	+
<i>E.coli</i> K88	0.457	0.196	+	0.518	0.157	+	0.688	0.177	+	0.500	0.157	+
S(-)	0.098			0.078			0.088			0.079		
PBS	0.066			0.078			0.078			0.078		

Tabel 4.7 Nilai Rata-rata OD ELISA *Indirect* Protein Fimbria *Escherichia coli* K88 Sebelum Elusi (*Whole Protein*) Dan Sesudah Elusi (BM 39-42 kD, 29-31 kD, 20-22 kD) Dengan Antibodi Poliklonal

Anti Bodi	Protein Fimbria <i>Escherichia coli</i> K88											
	<i>Whole protein</i>			BM 39-42 kD			BM 29-31 kD			BM 20-22 kD		
	Rata-rata	<i>Cut off</i>	Hasil	Rata-Rata	<i>Cut Off</i>	Hasil	Rata-rata	<i>Cut off</i>	Hasil	Rata-rata	<i>Cut Off</i>	Hasil
<i>Sp</i> 11	0.955	0.215	+	0.289	0.146	+	0.381	0.152	+	0.468	0.004	+
<i>Sp</i> AV	1.063	0.215	+	0.414	0.146	+	0.402	0.152	+	0.528	0.004	+
<i>E.coli</i> K88	0.944	0.215	+	0.322	0.146	+	0.702	0.152	+	0.602	0.004	+
S.(-)	0.108			0.073			0.076			0.002		
PBS	0.064			0.005			0.005			0.005		

Keterangan :

- Antibodi *Sp* 11 : Antibodi *Salmonella pullorum* 11
 Antibodi *Sp* AV : Antibodi *Salmonella pullorum* AV
 Antibodi *E.coli* K88 : Antibodi *Escherichia coli* K88
 S(-) : Serum negatif
 PBS : *Phospat Buffer Saline*

Dari ELISA *indirect* protein Omp *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88, dan fimbria *Escherichia coli* K88 sebelum elusi (*whole protein*) dan sesudah elusi (BM 39-42 kD, 29-31 kD, 20-22 kD) dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88 menunjukkan hasil positif. Penghitungan *cut off* masing-masing reaksi dengan menggunakan rumus : $Cut\ off = 2 \times \text{rata-rata OD serum negatif}$.

Hasil analisis dengan menggunakan *Univariate Analysis of Variance* pada taraf 5 % menunjukkan bahwa perbedaan interaksi antara protein-protein dengan antibodi-antibodi tersebut sangat bermakna ($p < 0.01$). Dari *post hoc test* HSD, dapat diketahui notasi dari kekuatan antibodi ketika berikatan dengan protein antigenik, antigenisitas dari protein, dan kekuatan interaksi protein antigenik dengan antibodi poliklonal. Secara ringkas hasil *post hoc test* ditampilkan pada tabel-tabel berikut ini.

Hasil *post hoc test* terhadap protein Omp *Salmonella pullorum* 11

Tabel 4.8 Rata-rata Nilai OD Kekuatan Antibodi Poliklonal Terhadap Protein Omp *Salmonella pullorum* 11 Dan Tingkat Notasinya

Antibodi	Rata-rata
<i>Salmonella pullorum</i> 11	0.447 ^C
<i>Salmonella pullorum</i> AV	0.464 ^D
<i>Escherichia coli</i> K88	0.369 ^B
Serum negatif	0.309 ^A

Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : **A-B-C-D**

Tabel 4.9 Rata-rata Nilai OD Antigenisitas Protein Omp *Salmonella pullorum* 11 Dan Tingkat Notasinya

Protein	Rata-rata
<i>Whole protein</i>	0.340 ^B
Protein BM 39-42 kD	0.454 ^D
Protein BM 29-31 kD	0.377 ^C
Protein BM 20-22 kD	0.140 ^A

Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : **A-B-C-D**

Tabel 4.10 Rata-Rata Nilai OD Interaksi Antibodi dengan Protein Omp *Salmonella pullorum* 11 Dan Tingkat Notasinya

Antibodi	Protein	Rata-rata
<i>Salmonella pullorum</i> 11	<i>Whole protein</i>	0.441 ^E
	Protein BM 39-42 kD	0.628 ^G
	Protein BM 29-31 kD	0.526 ^F
	Protein BM 20-22 kD	0.194 ^C
<i>Salmonella pullorum</i> AV	<i>Whole protein</i>	0.492 ^F
	Protein BM 39-42 kD	0.633 ^G
	Protein BM 29-31 kD	0.530 ^F
	Protein BM 20-22 kD	0.201 ^C
<i>Escherichia coli</i> K88	<i>Whole protein</i>	0.363 ^D
	Protein BM 39-42 kD	0.525 ^F
	Protein BM 29-31 kD	0.427 ^E
	Protein BM 20-22 kD	0.160 ^C
Serum negatif	<i>Whole protein</i>	0.652 ^B
	Protein BM 39-42 kD	0.313 ^A
	Protein BM 29-31 kD	0.023 ^A
	Protein BM 20-22 kD	0.004 ^A

Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : A-B-C-D-E-F-G

Hasil *post hoc* test terhadap protein Omp *Salmonella pullorum* AV

Tabel 4.11 Rata-rata Nilai OD Kekuatan Antibodi Poliklonal Terhadap Protein Omp *Salmonella pullorum* 11 Dan Tingkat Notasinya

Antibodi	Rata-rata
<i>Salmonella pullorum</i> 11	0.544 ^C
<i>Salmonella pullorum</i> AV	0.581 ^D
<i>Escherichia coli</i> K88	0.465 ^B
Serum negatif	0.080 ^A

Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : **A-B-C-D**

Tabel 4.12 Rata-rata Nilai OD Antigenisitas Protein Omp *Salmonella pullorum* AV Dan Tingkat Notasinya

Protein	Rata-rata
<i>Whole protein</i>	0.320 ^A
Protein BM 39-42 kD	0.488 ^C
Protein BM 29-31 kD	0.472 ^C
Protein BM 20-22 kD	0.390 ^B

Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : **A-B-C**

Tabel 4.13 Rata-Rata Nilai OD Interaksi Antibodi dengan Protein Omp *Salmonella pullorum* AV Dan Tingkat Notasinya

Antibodi	Protein	Rata-rata
<i>Salmonella pullorum</i> 11	<i>Whole protein</i>	0.415 ^C
	Protein BM 39-42 kD	0.647 ^F
	Protein BM 29-31 kD	0.616 ^F
	Protein BM 20-22 kD	0.497 ^D
<i>Salmonella pullorum</i> AV	<i>Whole protein</i>	0.456 ^C
	Protein BM 39-42 kD	0.679 ^F
	Protein BM 29-31 kD	0.660 ^F
	Protein BM 20-22 kD	0.530 ^E
<i>Escherichia coli</i> K88	<i>Whole protein</i>	0.334 ^B
	Protein BM 39-42 kD	0.538 ^E
	Protein BM 29-31 kD	0.533 ^E
	Protein BM 20-22 kD	0.456 ^D
Serum negatif	<i>Whole protein</i>	0.074 ^A
	Protein BM 39-42 kD	0.089 ^A
	Protein BM 29-31 kD	0.081 ^A
	Protein BM 20-22 kD	0.077 ^A

Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : **A-B-C-D-E-F**

Hasil *post hoc test* terhadap protein Omp *Escherichia coli* K88

Tabel 4.14 Rata-rata Nilai OD Kekuatan Antibodi Poliklonal Terhadap Protein Omp *Escherichia coli* K88 Dan Tingkat Notasinya

Antibodi	Rata-rata
<i>Salmonella pullorum</i> 11	0.500 ^B
<i>Salmonella pullorum</i> AV	0.517 ^B
<i>Escherichia coli</i> K88	0.540 ^C
Serum negatif	0.086 ^A

Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : A-B-C

Tabel 4.15 Rata-rata Nilai OD Antigenisitas Protein Omp *Escherichia coli* K88 Dan Tingkat Notasinya

Protein	Rata-rata
<i>Whole protein</i>	0.389 ^A
Protein BM 39-42 kD	0.371 ^A
Protein BM 29-31 kD	0.516 ^B
Protein BM 20-22 kD	0.368 ^A

Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : A-B

Tabel 4.16 Rata-Rata Nilai OD Interaksi Antibodi dengan Protein Omp *Escherichia coli* K88 Dan Tingkat Notasinya

Antibodi	Protein	Rata-rata
<i>Salmonella pullorum</i> 11	<i>Whole protein</i>	0.431 ^B
	Protein BM 39-42 kD	0.451 ^B
	Protein BM 29-31 kD	0.650 ^F
	Protein BM 20-22 kD	0.470 ^D
<i>Salmonella pullorum</i> AV	<i>Whole protein</i>	0.571 ^E
	Protein BM 39-42 kD	0.436 ^B
	Protein BM 29-31 kD	0.636 ^F
	Protein BM 20-22 kD	0.426 ^B
<i>Escherichia coli</i> K88	<i>Whole protein</i>	0.457 ^C
	Protein BM 39-42 kD	0.518 ^D
	Protein BM 29-31 kD	0.688 ^F
	Protein BM 20-22 kD	0.498 ^D
Serum negatif	<i>Whole protein</i>	0.095 ^A
	Protein BM 39-42 kD	0.079 ^A
	Protein BM 29-31 kD	0.090 ^A
	Protein BM 20-22 kD	0.079 ^A

Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : A-B-C-D-E-F

Hasil *post hoc test* terhadap protein fimbria *Escherichia coli* K88

Tabel 4.17 Rata-rata Nilai OD Kekuatan Antibodi Poliklonal Terhadap Protein Fimbria *Escherichia coli* K88 Dan Tingkat Notasinya

Antibodi	Rata-rata
<i>Salmonella pullorum</i> 11	0.524 ^B
<i>Salmonella pullorum</i> AV	0.601 ^C
<i>Escherichia coli</i> K88	0.642 ^D
Serum negatif	0.066 ^A

Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : **A-B-C-D**

Tabel 4.18 Rata-rata Nilai OD Antigenisitas Protein Fimbria *Escherichia coli* K88 Dan Tingkat Notasinya

Protein	Rata-rata
<i>Whole protein</i>	0.768 ^C
Protein BM 39-42 kD	0.275 ^A
Protein BM 29-31 kD	0.390 ^B
Protein BM 20-22 kD	0.400 ^B

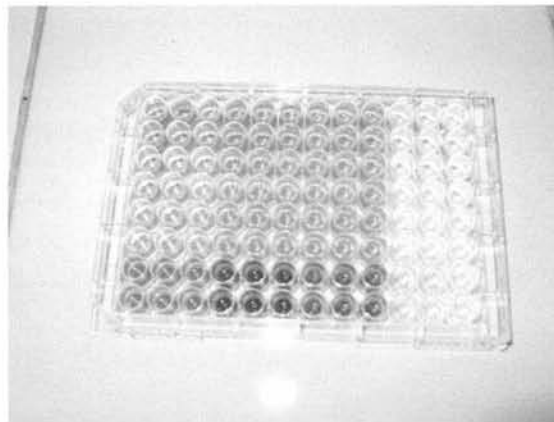
Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : **A-B-C-D**

Tabel 4.19 Rata-Rata Nilai OD Interaksi Antibodi dengan Protein Fimbria *Escherichia coli* K88 Dan Tingkat Notasinya

Antibodi	Protein	Rata-rata
<i>Salmonella pullorum</i> 11	<i>Whole protein</i>	0.955 ^I
	Protein BM 39-42 kD	0.289 ^C
	Protein BM 29-31 kD	0.381 ^D
	Protein BM 20-22 kD	0.468 ^E
<i>Salmonella pullorum</i> AV	<i>Whole protein</i>	1.062 ^J
	Protein BM 39-42 kD	0.414 ^E
	Protein BM 29-31 kD	0.402 ^D
	Protein BM 20-22 kD	0.528 ^F
<i>Escherichia coli</i> K88	<i>Whole protein</i>	0.944 ^I
	Protein BM 39-42 kD	0.322 ^C
	Protein BM 29-31 kD	0.702 ^H
	Protein BM 20-22 kD	0.602 ^G
Serum negatif	<i>Whole protein</i>	0.111 ^B
	Protein BM 39-42 kD	0.074 ^B
	Protein BM 29-31 kD	0.075 ^A
	Protein BM 20-22 kD	0.002 ^A

Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : A-B-C-D-E-F-G-H-I-J

Dari *post hoc test* HSD diketahui bahwa protein Omp *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV berat molekul 39-42 kD bersifat paling antigenik dan berinteraksi paling kuat dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88. Protein Omp *Escherichia coli* K88 berat molekul 29-31 kD mempunyai antigenisitas terkuat dan berinteraksi kuat dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88. Sedangkan *whole protein* fimbria *Escherichia coli* K88 mempunyai antigenisitas dan interaksi dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 yang kuat.



Gambar 4.6 Hasil ELISA protein sebelum elusi (*whole protein*)

BAB V PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

5.1 Pemurnian Bakteri Strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, Dan *Escherichia coli* K88

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan bakteri *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 yang berasal dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Strain *Salmonella pullorum* yang dikenal di Indonesia khususnya Jawa Timur adalah strain *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV. *Salmonella pullorum* 11 merupakan strain standar sedangkan *Salmonella pullorum* AV merupakan variannya (Subcommittee On Avian Diseases, 1971).

Dari hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa baik strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, maupun *Escherichia coli* K88 merupakan bakteri berbentuk batang Gram-negatif. Hal ini sesuai dengan Joklik *et al.*, (1984), yang menyatakan bahwa *Salmonella* dan *Escherichia* adalah genus yang masuk dalam kelompok *Enterobacteriaceae* berbentuk batang Gram-negatif.

Hasil tes biokimiawi dalam penelitian ini telah sesuai dengan standar uji laboratoris. Widjajanto (2003) menyatakan bahwa adanya strain atau varian pada bakteri dapat terjadi penyimpangan hasil gula-gula. Pada penelitian ini terdapat sedikit penyimpangan yaitu *Escherichia coli* K88 menunjukkan hasil indol negatif dan inositol positif. Menurut Holt *et al.*, (1994) dan Baron *et al.*, (1994) bahwa yang

menciri dari *Escherichia coli* ialah bentuk koloni yang berwarna merah pada media selektif Mac Conkay Agar. Beberapa strain *Escherichia coli* menunjukkan reaksi yang atipikal pada tes H₂S, sitrat, urease, indol, inositol, dan adonitol. Sedangkan strain *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV pada tes biokimiawi dengan menggunakan Api ®20E Biomerieux menunjukkan sedikit penyimpangan yaitu tes H₂S negatif, tetapi pada TSIA H₂S positif yaitu tampak bercak hitam pada bagian miring agar. Kesimpulan dari analisis hasil pemurnian bakteri ialah biakan bakteri *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88 adalah murni dan memenuhi syarat untuk dipakai dalam penelitian ini.

5.2 Pembuatan Bakteri *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, Dan *Escherichia coli* K88

Inaktifasi bakteri dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu dengan penambahan bahan kimia seperti formalin 5% atau dengan pemanasan 80-100⁰C selama 30 menit. Dalam penelitian ini inaktifasi bakteri dengan pemanasan karena dianggap lebih praktis. Widjajanto (2003) dalam penelitiannya melaporkan bahwa cara pemanasan pada suhu 80⁰C selama 30 menit terhadap suspensi bakteri campuran strain *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV, apabila disuntikkan pada hewan coba masih dapat menimbulkan respon imun.

5.3 Pembuatan Antibodi Poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, Dan *Escherichia coli* K88

Alberto and Macaris (1985) menyatakan bahwa teknik pembuatan antibodi monoklonal maupun poliklonal mempunyai peranan yang penting dalam aplikasi di bidang veteriner, sebab teknik ini bermanfaat untuk deteksi antigen dari spesimen bakteri. Bertitik tolak dari hal tersebut maka pembuatan antibodi poliklonal dalam penelitian ini sangat penting untuk keakuratan hasil *western blotting* dan ELISA. Pembuatan antibodi poliklonal dapat dilakukan pada ayam, kelinci atau tikus. Karena *Salmonella pullorum* merupakan bakteri patogen khususnya ayam, maka pada penelitian ini pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan menggunakan hewan coba ayam. Penyuntikan bakterin pada ayam dilakukan secara intra muskuler dengan tujuan bakterin terserap perlahan sehingga diharapkan respon imun maksimal. Penyuntikan dilakukan *booster* 6 kali dengan tenggang waktu 2 minggu dan ujiantang setelah *booster* terakhir dimaksudkan agar tubuh dapat membentuk antibodi dengan titer tinggi sebagai respon imun.

Hal yang sama telah diteliti oleh Widjajanto (2000) dengan membuat bakterin dari bakteri *Salmonella pullorum* 11 diberikan pada ayam umur 3 minggu dan ternyata memberikan titer antibodi yang baik. Puncak titer tertinggi pada hari ke 21, tetapi menurun drastis pada hari ke 28. Dalam penelitiannya pada tahun 2003, Widjajanto membuat bakterin dicampur dengan adjuvan dan disuntikkan pada hewan coba secara intra muskuler, diberikan secara berulang dengan interval waktu tertentu

dan ditantang dengan bakteri, ternyata menimbulkan respon imun yang lebih baik. Berdasarkan hasil penelitian Widjajanto (2003) tersebut, maka antibodi poliklonal yang diperoleh dapat dipakai untuk *western blotting* dan ELISA.

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa penyuntikan bakterin dengan menggunakan adjuvan Saphic dengan 6 kali *booster* dan 1 kali ujiantang menghasilkan tes *rapid whole blood test* positif kuat. Hal ini membuktikan bahwa di dalam tubuh ayam telah terbentuk antibodi yang kuat. Sesuai dengan pendapat Tizzard (1988) bahwa hewan yang diberikan vaksin berulang (*booster*) akan merangsang terbentuknya antibodi yang lebih kuat.

5.4 Isolasi Protein Antigenik Omp Strain *Salmonella pullorum* 11, Omp

***Salmonella pullorum* AV, Dan Omp *Escherichia coli* K88 Dan Fimbria**

***Escherichia coli* K88**

Holt (1994) menyatakan bahwa dalam melakukan isolasi Omp bakteri dapat dilakukan dengan cara lama menggunakan metode fenol panas (*Hot Phenol Method*), tetapi ada kemungkinan akan tercampur dengan protein lain dari dalam sel. Metode yang baru dikembangkan dan mudah dilakukan adalah metode Matsujama (Harn, 1992) yaitu dengan menggunakan alat ultrasonikasi dengan frekuensi dan waktu tertentu sehingga dinding sel bakteri pecah. Isolasi fimbria *Escherichia coli* K88 juga telah dilakukan oleh Fang *et al.*, (2000) dengan menggunakan modifikasi metode

Erickson *et al.*, dan berhasil baik. Pada metoda ini dinding sel bakteri juga dipecah dengan menggunakan alat ultrasonikator.

Pada penelitian ini, sel bakteri dipecah dengan menggunakan alat ultrasonikator dengan frekuensi 20 KHz dengan waktu pemakaian dimodifikasi. Modifikasi berdasarkan pengalaman Widjajanto (2003) bahwa isolasi protein Omp bakteri menggunakan cara berselang-seling 3 menit jalan 2 menit istirahat yang diulang 3 kali pada suhu dingin (direndam es batu), ternyata hasilnya baik dan dapat diperoleh protein dalam jumlah yang banyak. Pelaksanaan sonikasi memerlukan suhu dingin karena efek ultra sonikasi menimbulkan panas yang berpengaruh terhadap bakteri. Suhu sangat berpengaruh terhadap kimia sel, membran lipid, lipopolisakarida, Omp, fimbria dan virulensinya. Oleh karena itu pada saat melakukan isolasi Omp dan fimbria, pengaturan suhu harus dilakukan dengan sebaik-baiknya. Pengaturan suhu tersebut dilakukan baik pada saat inkubasi, sonikasi, maupun sentrifugasi, sehingga Omp dan fimbria yang diperoleh dapat optimal.

Berdasarkan saran tersebut, dalam penelitian ini pengaturan suhu dilakukan dengan sebaik-baiknya, baik sewaktu inkubasi, sonikasi, maupun pada saat sentrifugasi. Dengan demikian hasil yang diperoleh dapat optimal.

Sebelum dilakukan sonikasi terhadap suspensi bakteri, perlu dilakukan biakan bakteri. Waktu pertumbuhan bakteri ini penting karena pada saat tersebut bakteri berada pada fase peningkatan pertumbuhan. Hal ini sesuai dengan pendapat Harn

(1992) bahwa pada fase peningkatan pertumbuhan, kondisi bakteri sangat baik dan jumlah bakteri menjadi banyak.

Setelah didapatkan protein Omp dan fimbria maka perlu diketahui kadar protein tersebut. Untuk itu pengukuran kadar protein dilakukan dengan alat spektrofotometer. Hasil pengukuran kadar protein adalah Omp *Salmonella pullorum* 11 94,4 mg/ml, Omp *Salmonella pullorum* AV 83,2 mg/ml, Omp *Escherichia coli* K88 28 mg/ml, dan fimbria *Escherichia coli* K88 10,4 mg/ml. Jumlah tersebut cukup untuk mendapatkan protein spesifik yang bersifat antigenik. Dengan diperoleh protein Omp dan fimbria, maka tahap isolasi protein dilanjutkan dengan karakterisasi protein antigenik dan pengukuran berat molekul protein antigenik

5.5 Karakterisasi Protein Antigenik Strain *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, Dan *Escherichia coli* K88

a. SDS-PAGE

Teknik SDS-PAGE merupakan langkah lanjutan untuk mengetahui protein spesifik dengan berat molekul tertentu. Dalam penelitian ini diperoleh gambaran SDS-PAGE berupa beberapa *band* tebal yang dimiliki baik oleh Omp *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88, maupun oleh fimbria *Escherichia coli* K88, yang berada di sekitar protein *marker* berat molekul 45 kD. Setelah dilakukan penghitungan ternyata *band* tersebut mempunyai berat molekul 39 - 42 kD. Hal ini hampir mirip dengan hasil penelitian Widjajanto

(2003), bahwa protein antigenik dan imunogenik Omp *Salmonella pullorum* 11 mempunyai berat molekul 40-45 kD. Sedikit perbedaan hasil penghitungan berat molekul antara hasil penelitian ini dengan hasil penelitian Widjajanto (2003) bisa disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya : kondisi acrilamid (lama atau baru); persentase acrilamid; pH Tris Hcl (8,8 atau 8,6); dan kekuatan *power* suplay. Faktor-faktor tersebut sangat mempengaruhi *running* protein pada proses elektroforesis.

Omp *Salmonella pullorum* 11 dan Omp *Salmonella pullorum* AV memiliki protein 31 kD yang berupa *band* tebal, tetapi pada Omp *Escherichia coli* K88 dan fimbria *Escherichia coli* K88 protein 31 kD tersebut berupa *band* tipis. Sebaliknya fimbria *Escherichia coli* K88 mempunyai protein 29 kD berupa *band* tebal, sedangkan pada Omp *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV dan Omp *Escherichia coli* K88, protein 29 kD tersebut berupa *band* tipis. Kemiripan Omp *Salmonella pullorum* dengan *Escherichia coli* ini sesuai dengan pendapat Arockiasamy dan Krishnaswamy (1995), bahwa porin OmpC *Salmonella typhi* bersifat imunogenik dan mempunyai kemiripan 90% dengan OmpC *Escherichia coli*, dan 78% dengan OmpF *Escherichia coli*.

b. Western blotting

Karakterisasi selanjutnya ialah *western blotting*. Pada tahap ini dapat diketahui protein antigenik yang dapat berikatan dengan antibodi. Hasil *blotting* pada penelitian ini dengan menggunakan bahan antigen protein spesifik dengan antibodi poliklonal menunjukkan reaksi yang jelas. Ini berarti terjadi reaksi pengikatan antara antigen

dengan antibodi yang homolog. Reaksi demikian menunjukkan bahwa reapon imun yang ditimbulkan oleh tubuh ayam dalam membentuk antibodi adalah akibat reaksi dari antigen sebagai benda asing yang spesifik.

Dari hasil *western blotting* ini dapat diketahui bahwa protein dengan berat molekul 39- 42 kD yang tampak sebagai *band* yang tebal pada hasil SDS-PAGE, juga tercetak tebal di semua reaksi protein Omp *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escheichia coli* K88, dan fimbria *Escherichia coli* K88 dengan antibodi poliklonal secara bersilang. Protein lain yang muncul tebal di semua reaksi protein dengan antibodi poliklonal adalah protein berat molekul 20-22 kD. Sedangkan protein berat molekul 29-31 kD yang pada SDS-PAGE tampak berupa *band* tebal dan dimiliki oleh semua protein Omp *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escheichia coli* K88, dan fimbria *Escherichia coli* K88 , ternyata pada *western blotting* juga muncul, tetapi tidak setebal protein berat molekul 39-42 kD dan 20-22 kD.

Hasil ini sesuai dengan pendapat Nicolle *et al.*, (1988) bahwa Omp *Escherichia coli* bereaksi silang dengan antibodi terhadap Omp bakteri *Enterobacteriaceae* yang lain. Menurut Nicolle *et al.*, (1988) bahwa Omp *Escherichia coli* K88 berat molekul 36 kD secara konsisten bereaksi silang dengan antibodi terhadap Omp bakteri *Enterobacteriaceae* yang lain. Sedangkan menurut pendapat Shipley *et al.*, (1981), bahwa Omp *Escherichia coli* berat molekul 35 kD barsifat antigenik. Perbedaan berat molekul protein yang diperoleh antara penelitian ini dengan beberapa peneliti

sebelumnya disebabkan karena metode penghitungan berat molekul yang berbeda. Shipley *et al.*,(1981) dan Nicolle *et al* (1988) tidak menyebutkan metode penghitungan berat molekul yang digunakan. Pada penelitian kali ini metode penghitungan molekul yang digunakan adalah metode extrapolasi. Pada penelitian ini diperoleh hasil beberapa protein antigenik yang dimiliki oleh Omp *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88, dan fimbria *Escherichia coli* K88, yaitu protein berat molekul 42 kD, 41 kD, 39 kD, 29 kD, 22 kD, dan 22 kD, yang diduga sebagai penyebab reaksi silang pada tes pullorum.

c. Elusi

Untuk membuktikan hal tersebut perlu dilakukan pemotongan *band* dan elusi terhadap *band-band* yang pada hasil *western blotting* tercetak tebal dan diperkirakan bersifat antigenik. Protein Omp dites antigenisitasnya dengan teknik ELISA.

5.6 Pengujian Antigenisitas Protein Antigenik Secara ELISA

Dari hasil ELISA diketahui bahwa protein Omp protein *Salmonella pullorum* 11, Omp *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88, dan fimbria *Escherichia coli* K88 sebelum elusi (*whole protein*) dan sesudah elusi (protein berat molekul 39-42 kD, 29-31 kD, dan 20-22 kD) menunjukkan hasil positif setelah direaksikan secara silang dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi reaksi silang antara protein Omp strain *Salmonella pullorum* 11 dan Omp *Salmonella pullorum* AV dengan

antibodi poliklonal *Escherichia coli* K88, demikian sebaliknya. Reaksi silang juga terjadi antara antigen fimbria *Escherichia coli* K88 dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV.

Hasil *Univariate Analysis of Variance* pada taraf 5 % menunjukkan bahwa perbedaan antara protein-protein dengan antibodi-antibodi tersebut sangat bermakna ($p < 0.01$). Dari hasil *post hoc test* HSD diketahui bahwa protein Omp *Salmonella pullorum* 11 berat molekul 39-42 kD lebih antigenik daripada protein berat molekul 29-31 kD dan *whole protein*. Protein berat molekul 20-22 kD paling rendah antigenisitasnya dibanding ketigannya. Protein Omp *Salmonella pullorum* 11 berat molekul 39-42 kD berinteraksi paling kuat dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88. Sedangkan protein berat molekul 20-22 kD paling rendah interaksinya dengan antibodi.

Protein Omp *Salmonella pullorum* AV berat molekul 39-42 kD mempunyai antigenisitas sama tinggi dengan protein berat molekul 29-31 kD. Sedangkan *whole protein* Omp *Salmonella pullorum* AV mempunyai antigenisitas paling rendah. Protein berat molekul 39-42 kD dan berat molekul 29-31 kD berinteraksi sama kuat dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88. *Salmonella pullorum* AV *whole protein* berinteraksi paling lemah dengan antibodi poliklonal.

Hasil di atas mirip dengan hasil penelitian Widjajanto (2003) bahwa protein Omp *Salmonella pullorum* 11 berat molekul 40-45 kD bersifat antigenik dan imunogenik.

Pada penelitian tersebut Widjanto (2003) tidak mengkarakterisasi *Salmonella pullorum* AV.

Protein Omp *Escherichia coli* K88 berat molekul 29-31 kD mempunyai antigenisitas tertinggi. Protein ini juga berinteraksi paling kuat dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum*11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88. Sedangkan secara umum *whole protein* Omp *Escherichia coli* K88 mempunyai antigenisitas dan interaksi dengan antibodi rendah. Protein berat molekul 39-42 kD dan 20-22 kD berinteraksi lemah dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11 dan *Salmonella pullorum* AV, tetapi berinteraksi lebih kuat dengan antibodi poliklonal *Escherichia coli* K88.

Hasil ini sesuai dengan pendapat Shipley *et al.*, (1981), yang mengatakan bahwa Omp *Escherichia coli* berat molekul 35 kD bersifat antigenik. Meskipun dari hasil *western blotting* protein Omp *Escherichia coli* K88 berat molekul 29-31 kD hanya tampak sebagai *band* yang sangat tipis, tetapi dari hasil penghitungan *post hoc test* HSD terhadap nilai OD ELISA, menunjukkan bahwa protein tersebut mempunyai antigenisitas paling kuat dibanding protein berat molekul 39-42 kD, 20-22 kD dan *whole protein*. Hal ini berarti protein Omp *Escherichia coli* K88 berat molekul 29-31 kD bersifat antigenik dan mempunyai sensitivitas yang tinggi, karena meskipun kadar protein tersebut rendah sekali dan hampir tidak terdeteksi pada *western blotting*, tetapi pada ELISA dapat dideteksi. Hal ini sesuai dengan pendapat Handojo (2003)

yang mengatakan bahwa sensitivitas ELISA masih jauh lebih tinggi dibandingkan dengan uji imunofloresens, aglutinasi dan teknik yang lain.

Dari hasil *post hoc test* HSD diketahui pula bahwa *whole protein* fimbria *Escherichia coli* K88 mempunyai antigenisitas dan interaksi tertinggi dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88, dibandingkan dengan protein berat molekul 39-42 kD, 29-31 kD dan 20-22 kD. Menurut Low *et al.*, (1996) fimbria *Escherichia coli* K88 mempunyai kandungan terbesar karbohidrat, yaitu dalam bentuk glikolipid dan glikoprotein. Fimbria tersebut sangat banyak dan berada pada permukaan sel dan bersifat sangat imunogenik. Hal ini yang menyebabkan *whole protein* fimbria *Escherichia coli* K88 mempunyai antigenisitas dan interaksi dengan antibodi poliklonal lebih tinggi dibandingkan dengan protein fimbria *Escherichia coli* sebelum elusi.

BAB VI PENUTUP

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dalam penelitian ini adalah :

1. Protein Omp strain *Salmonella pullorum* 11 dan Omp strain *Salmonella pullorum* AV berat molekul 39-42 kD, 29-31 kD, dan 20-22 kD bersifat antigenik.
2. Protein Omp strain *Escherichia coli* K88, dan fimbria strain *Escherichia coli* K88 berat molekul 39-42 kD, 29-31 kD, dan 20-22 kD bersifat antigenik.
3. Protein Omp strain *Salmonella pullorum* 11, Omp strain *Salmonella pullorum* AV, Omp strain *Escherichia coli* K88 dan fimbria strain *Escherichia coli* K88 mempunyai kesamaan, yaitu protein berat molekul 39-42 kD, 29-31 kD, dan 20-22 kD bersifat antigenik dan menyebabkan reaksi silang pada tes pullorum.

6.2 Saran

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

1. Protein Omp *Salmonella pullorum* 11 dan Omp *Salmonella pullorum* AV berat molekul 39-42 kD, 29-31 kD, dan 20-22 kD tidak dapat digunakan untuk pembuatan bahan diagnostik pullorum sub unit.

2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mencari protein spesifik Omp *Salmonella pullorum* 11 dan Omp *Salmonella pullorum* AV.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK and Lichtman AH. 2005. Cellular And Meolecular Immunology Updated Edition. 5th Ed. Elsevier Saunders. 58.
- Alberto L and Macaris M. 1985. Monoclonal Antibodies Against Bacteria. Vol.1. London: Academic Press Inc. Ltd.
- Arockiasamy A and Krishnaswamy S. 1995. Prediction Of B-Cell Epitopes For *Salmonella typhi* OmpC. J.Biosci., Vol.20, Number 2. Printed in India. 235-243.
- Bakker D, van Zijderveld FG, van der Veen S, Oudega B, de Graaf FK. 1990. K88 Fimbriae As Carriers Of Heterologous Antigenic Determinants. Microb Pathog ; 8(5). 343-52.
- Baron EJO, Paterson LR, Finegold SM. 1994. Diagnostic Microbiology. 9th Ed. Baltimore. Sydney. Philadelphia. London. Madrid. Boston. Toronto: Balley & Scotts. St. Louis. 365.
- Blomberg L, Krivan HC, Cohen PS, and Conway PL. 1993. Piglet Ilieal Mucus Contain Protein And Glycolipid (Galactosylceramide) Receptors Specific For *Escherichia coli* K88 Fimbriae. *Infect Immun.* 61(6). 2526-2531
- Cappucino JG, and Sherman N.1985. Microbiology A Laboratory Manual. 2nd Ed Canada: Addison Wesley. Publishing Company Inc. 92.
- Christensen JP, Borrow P and Bisgaard M. 1995. RFLP Variation In *Salmonella gallinarum* Virulence Plasmid And The Effect On Virulence Southeast Asian Journal Of Tropical Medicine And Public Health. Vol 26. Suppl.2 . 160-162.
- Direktorat Kesehatan Hewan. 1981. Pedoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular. Jilid I. Jakarta: Dit. Kes Wan. Direktorat Jenderal Peternakan. Departemen Pertanian. 73-80.
- Dorland. 2005. Kamus Kedokteran. Edisi 29. Alih Bahasa dr. Huriawati Hartono dkk. Penerbit Buku Kedokteran EGC. 598.836.1788.1860.

- Dougan G, Dowd G, and Kehoe M. 1983. Organization Of K88ac-Encoded Polypeptides In The *Escherichia coli* Cell Envelope: Use Of Minicells And Outer Membrane Protein Mutants For Studying Assembly Of Pili. *J Bacteriol* ; 153(1). 364-370.
- El-Samalouti VT, Hamann L, Flad HD, and Ulmer AJ. 1990. The Biology Endotoxin. In *Methods in Molecular Biology*. Vol.145: Bacterial Toxins Method And Protocols. Edited by O.Holst. Totowa: Humana Press Inc. 287-288.
- ERIC – Enteropathogen Resource Integration Centre. 2006. Diarrheagenic *Escherichia coli*. <http://www.ericbrc.org/portal/eric/ecoli?id=entero>. 2-3.
- Fang L, Gang Z, and Marquardt RR. 2000. Isolation, Affinity Purification, And Identification Of Piglet Small Intestine Mucosa Receptor for Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88ac+Fimbriae. *Infect Immune*; 68(2). 564-569.
- Gillespie JH and Timoney JF. 1981. Hagens and Brunners Infectious Diseases Of Domestic Animals. 7 th Ed. London: Comstock Publishing Associated Cornell University Press. 80-91.
- Handojo I. 2003. Pengantar Imunoasai Dasar. Airlangga University Press. 168.
- Harn GL. 1992. Antibody Responses To Bacterial Omp And Flagellar Protein In Typhoid Fever. Thesis Submitted To Institute of Advanced.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, and Williams ST. 1994. Bergeys Manual Of Determinative Bacteriology. 9th Ed. USA : Williams & Wilkins.179-180.
- Jawetz L, Melnick JL, and Adelberg EA. 1980. Review Of Medical Microbiology 14th Ed. Los Altos Chicago: Lange Medical Publication. 10-14.
- Joklik WK, Willet HP, and Amos DB. 1984. Zinsser Microbiology, 18th Ed. Connecticut.: Appleon-Century-Crofts/Norwalk. 598-599, 604-605.
- Le Minor L and Popoff MY. 1988. Kauffmann-White Scheme. Behring Diagnostika.
- Low D, Braaten B, and Woude MVD. 1996. Fimbriae In *Escherichia coli* And *Salmonella*. Ed by Neidratt FC. Washington DC: American Society For Microbiology.
- Merchant IA, and Packer RA.1965. Veterinary Bacteriology And Virology. 6th Ed.3rd . Ames. Iowa: The Iowa State University Press. USA. 374-377.

- Nicolle LE, Ujack E, Brunka J, Bryan LE. 1988. Immunoblott Analysis Of Serologic Response To Omp Of *Escherichia coli* In Elderly Individuals With Urinary Tract Infections. J.Clin Microbiol. 2087-2091.
- OIE - Office International Des Epizooties. 2000. Manual Of Standards For Diagnostic Test And Vaccines. 4th Ed. World Organisation For Animal Health. 694-695.
- Olsen JE, Christensen JP, and Bisgaard M. 1996. Genomic Lineage Of *Salmonella Enteritica* Serotype *Gallinarum*. Journal Medical Microbiology. Dec. 45 (6). 413-418.
- Poxton IR, and Arbuthnott JP. 1990. Determinants Of Bacterial Virulence In Topley & Wilsons Principles Of Bacteriology, Virology And Immunity. 8th Ed. London. Melbourne. Auckland : Edward Arnold Advission of Hodder & Stoughton. 332-338.
- Rantam FA. 2003. Metode Immunologi. Airlangga University Press. 153-155
- Robsch W, Billy M and Andreas JB. 2000. Competitive Exclusion Of *Salmonella enteridis* By *Salmonella gallinarum* In Poultry. Journal Emerging Infectious Diseases. Vol.6. No.5. Sep-Oct. 443-448.
- Santoso B. 2000. Pemanfaatan Tepung Jangkrik Sebagai Sumber Protein (Pengganti Pepton) Bagi Pertumbuhan Bakteri *Salmonella pullorum* Pada Media Agar. Skripsi FKH-Universitas Airlangga Surabaya.
- Shibley PL, Dougan, Falkow, S., 1981. Identification And Cloning Of The Genetic Determinant That Encodes For The K88ac Adherence Antigen. J Bacteriol ; 145(2) . 920-925.
- Snoeyenbos GH. 1991. Pullorum Disease. In Diseases Of Poultry. Ed by Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HWJr. 9th Ed. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press. 75 and 82.
- Stefanov V, Lozeva T, Stefanova M, Balimezov I. 1977. Changes In Toxic, Antigenic And Immunogenic Properties Of The Antigen-O of *Salmonella gallinarum-pullorum* Irradiated With Gamma Rays. Vet Med Nauki ;14(6).53-60.
- Subcommittee On Avian Diseases. 1971. Methods For Examining Poultry Biologics And For Identifying And Quantifying Avian Pathogens. National Academy Of Sciences. 192-193.

- Tabbu CR. 2004. Penyakit Ayam Dan Penanggulangannya Penyakit Bakterial, Mikal, Dan Viral. Cetakan ke 5. Yogyakarta: Kanisius. 54-56.
- Taylor J. 1992. Micro Organisms And Biotechnology. University of Bath. 2nd Ed. Hongkong: Thomas Nelson And Sons Ltd. 16-19.
- Terry TM. 2000. Procaryote Anatomy, Cell Envelope, Motility, Endosperm In Microbiology, 4th Ed. Internet 25 Agustus 2000.
- Tizzard I. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner. Edisi ke 2. Surabaya: Airlangga University Press.
- Todar K. 2002. Mechanisms Of Bacterial Pathogeniciy: Endotoxins. Todar's Online Textbook Of Bacteriology. 1-7.
- Vademicum Pusat Veterinaria Farma. 2007. Pusat Veterinaria Farma Surabaya.
- Widjajanto S. 2003. Isolasi Dan Karakterisasi Protein Immunogenik *Salmonella pullorum* Sebagai Bahan Vaksin Sub Unit. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Widjajanto S dan Suwarno. 2001. Pengaruh Berbagai Tingkat Ultra Sonikasi Terhadap Antigenisitas Protein Membran Kuman *Salmonella pullorum*. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya.

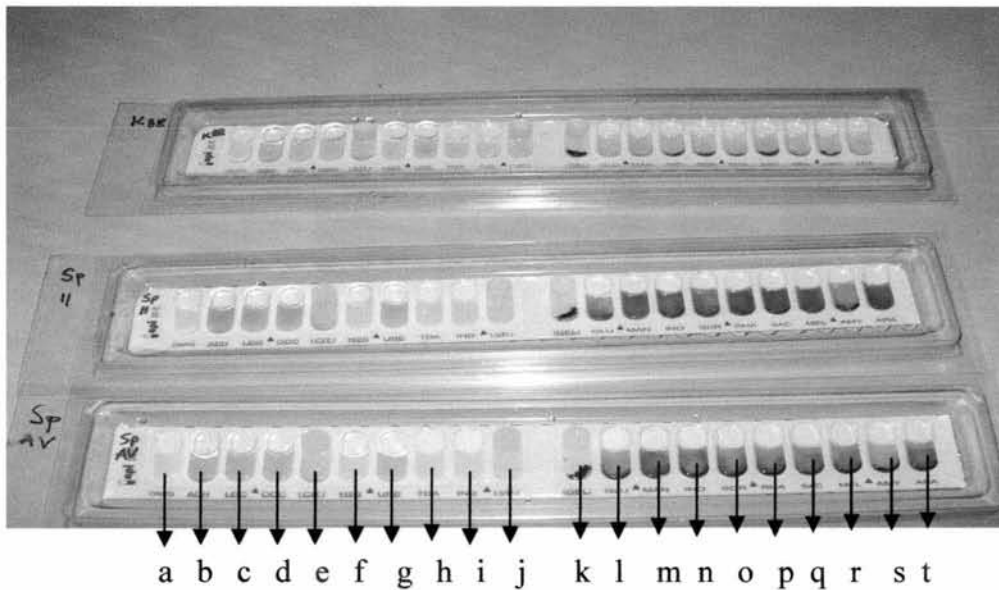
LAMPIRAN

Lampiran 2

Reaksi biokimia *Salmonella pullorum* dan *Escherichia coli* (Api ®20E

Biomerieux)

	<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Escherichia coli</i>
Pegecatan Gram	-	-
ONPG	-	+
ADH	-/+	-
Lysine decarboxylase	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+
Citrat	-	-
H ₂ S	+	-
Urea	-	-
TDA	-	-
Indol	-	+
Voges-Proskauer	-	-
Gelatin	-	-
Glukose	+	+
Manose	+	+
Inositol	-	-
Sorbitol	-	+
Rhamnose	+	+
Sakarose	-	+
Melibiose	-	+
Amilase	-	+
Arabinose	+	+



Gambar 4.3 Hasil tes biokimia dengan menggunakan **Api @20E Biomerieux** *Salmonella puulorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, dan *Escherichia coli* K88

Keterangan gambar :

		<u>Warna positif</u>	<u>Warna negatif</u>
a.	ONPG	: kuning	merah muda
b.	ADH	: kuning	merah muda
c.	Lysine decarboxylase	: kuning	merah muda
d.	Ornithine decarboxylase:	kuning	merah muda
e.	Citrat	: kuning	merah muda
f.	H ₂ S	: hitam	merah muda
g.	Urea	: kuning	merah muda
h.	TDA	: kuning	merah muda
i.	Indol	: kuning	merah muda
j.	Voges Proskauer	: kuning	merah muda
k.	Gelatin	: hitam	merah muda
l.	Glukosa	: kuning	biru
m.	Manose	: kuning	biru
n.	Inositol	: kuning	biru
o.	Sorbitol	: kuning	biru
p.	Rhamnose	: kuning	biru
q.	Sakarose	: kuning	biru
r.	Melibiose	: kuning	biru
s.	Amilase	: kuning	biru
t.	Arabinose	: kuning	biru

- h. Tutup tabung ependorf ditusuk dengan jarum $\pm 1/2$ tusukan, dan langsung direbus dalam air mendidih selama 5 menit.
- i. Setelah inkubasi, *comb* dilepaskan dan dicuci dengan *E-buffer* 1x sampai tidak ada gelembung udara.

Bahan *E-buffer* 10x :

- Tris Base	3,29 g
- Glysine	14,4 g
- SDS	1 g
- Aquades	ad. 1 lt
- pH	8,3

- j. Sampel sebanyak 15ul dimasukkan ke dalam lubang-lubang *comb*. Gelembung udara dihilangkan dengan menggunakan jarum. *Marker* dimasukkan pada salah satu lubang *comb*.
- k. Listrik dipasang dengan daya 100v arus 40mA.
- l. Sampel ditunggu sampai turun seluruhnya. Listrik dimatikan dan dilepaskan pelan-pelan.
- m. Gel dimasukkan ke dalam piring petri dan direndam Coomasie blue selama 30 menit.

Bahan Coomasie blue :

- Coomasie blue	0,25 g
- Metanol	40 ml
- Asam asetat	10 ml
- Aquades	ad. 100 ml

- n. Setelah terwarnai, gel disimpan dalam larutan asam asetat 10%.

Lampiran 4

Cara kerja *western blotting*

- a. Gel dikeluarkan dari cetakan dan dicuci dengan *transfer buffer*.
- b. Membran nitroselulose dan kertas Whatman disiapkan. Kertas Whatman direndam dalam *transfer buffer*.
- c. Kertas Whatman yang sudah dibasahi diletakkan pada alat *blotter* sebanyak 4-5 lapis.
- d. Membran nitroselulose diletakkan di atas kertas Whatman, dan dihindari adanya gelembung udara.
- e. Gel agarose diletakkan di atas membran nitroselulose (hindari adanya gelembung udara), dan ditutup lagi dengan kertas Whatman yang sudah dibasahi 4-5 lapis.
- f. Alat *blotter* ditutup dengan kuat, dan dilakukan *running* dengan daya 125v dan arus 40mA selama 1 jam.
- g. Membran nitroselulose diambil dengan hati-hati, diblok dengan larutan BSA 1% dalam TBS Tween 5%, dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 1 jam.
- h. Membran nitroselulose dicuci dengan TBS Tween 0,05% sebanyak 5 kali, masing-masing 10 menit di atas *shaker*.
- i. Antibodi primer (antibodi poliklonal) dengan pengenceran 1/100 dalam *buffer* ditambahkan, dan diinkubasikan selama 1 jam di atas *shaker* pada suhu kamar.
- j. Pencucian dilakukan seperti di atas.
- k. Antibodi sekunder (konjugat *anti-chicken* IgG HRP) dengan pengenceran 1/1000 ditambahkan, dan diinkubasikan selama 1 jam di atas *shaker* pada suhu kamar.
- l. Pencucian dilakukan seperti di atas.
- m. Penambahan substrat (larutan Ammino Ethyl Carbazole) dilakukan di kamar gelap sampai terlihat pita yang berwarna coklat. Reaksi dihentikan dengan mencelupkan membran nitroselulose dalam aquades.

Bahan substrat larutan Ammino Ethyl Carbazole :

- Ammino Ethyl Carbazole20 mg
- NN dimethyl formamid 1,2 ml
- H₂O₂ 0,4 ml
- 0,05M Sodium Asetat buffer pH5 ad. 100 ml

Lampiran 5

Cara kerja ELISA

- a. *Coating* antigen dilakukan dengan menambahkan larutan protein antigenik sebanyak 15ul yang dilarutkan dalam *coating buffer*, pada setiap sumur *mikroplate*.
- b. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 4⁰C.
- c. Pencucian *mikroplate* dilakukan sebanyak 3 kali dengan *washing buffer*.
- d. Penambahan antibodi poliklonal yang diencerkan 1/100 sebanyak 50ul pada setiap sumur, kecuali sumur kontrol dan sumur PBS, kemudian diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37⁰C.
- e. Pencucian dilakukan 3 kali seperti di atas.
- f. Penambahan konjugat *anti-chicken* IgG HRP dengan pengenceran 1/1000 sebanyak 50ul pada stiap sumur, dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37⁰C..
- g. Pencucian dilakukan 3 kali seperti di atas.
- h. Substrat OPD ditambahkan sebanyak 100ul pada setiap sumur.
- i. Hasil reaksi dibaca dengan menggunakan ELISA *reader* dengan filter 450 nm.

Lampiran 6

Cara Kerja Elusi

1. SDS-PAGE dikerjakan sampai *running* saja.
2. *Band* yang ditentukan dipotong, dipisahkan dari *band* yang lain, dan ditempatkan pada tempat yang telah diisi dengan PBS, diusahakan jangan sampai mengalami kekeringan.
3. Kantong selopan panjang \pm 10 cm disiapkan, ujung bawahnya diikat dengan benang.
4. Potongan *band* dimasukkan ke dalam selopan dengan posisi lurus dan tidak melengkung, serta ditambahkan PBS sebanyak 2 ml.
5. Bagian atas selopan diikat dengan benang.
6. Kantong selopan selanjutnya dimasukkan ke dalam Bio-rad yang telah diisi dengan *E-buffer* sebanyak 500 ml.
7. Bio-rad dijalankan pada 150 volt, 40 mA selama 1,5-2 jam.
8. Cairan yang terdapat di dalam selopan diambil dan dimasukkan ke dalam *tube* eppendorf dan disimpan pada -20°C sebagai protein spesifik.

Catatan : *Band* yang dipotong adalah pada berat molekul 39-42 kD, 29-31 kD, dan 20 – 22 kD.

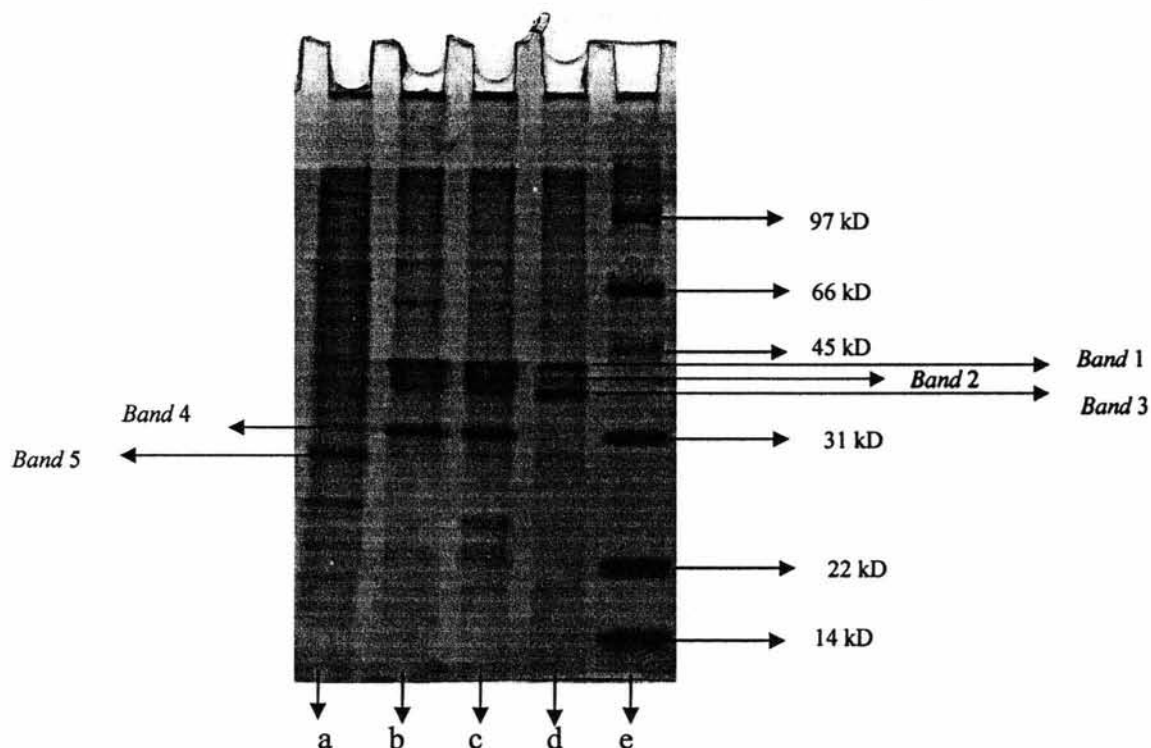
LAMPIRAN 7**Penghitungan Berat Molekul Protein Hasil SDS-PAGE Metode Ekstrapolasi**

Rumus :

$$\frac{a - b}{c - b} = \frac{d - e}{x - e}$$

Keterangan rumus :

- a. Jarak pergerakan dari tempat asal protein *marker* di bawah warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- b. Jarak pergerakan dari tempat asal protein *marker* di atas warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- c. Jarak pergerakan dari tempat asal warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- d. Berat protein *marker* di bawah warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- e. Berat protein *marker* di atas warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- x. Berat protein sampel yang akan dihitung



Gambar Hasil SDS-PAGE protein Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88, dan fimbria *Escherichia coli* K88

Keterangan gambar :

- a. Protein fimbria *Escherichia coli* K88
- b. Protein Omp *Salmonella pullorum* 11
- c. Protein Omp *Salmonella pullorum* AV
- d. Protein Omp *Escherichia coli* K88
- e. Protein *marker*

Band 1

$$\frac{3,5 - 2,4}{2,6 - 2,4} = \frac{31 - 45}{x - 45}$$

$$\triangleright \frac{1,1}{0,2} = \frac{-14}{x - 45}$$

$$\triangleright 5,5 = \frac{-14}{x - 45}$$

$$\triangleright 5,5 (x - 45) = -14$$

$$\triangleright 5,5 x - 247,5 = -14$$

$$\triangleright 5,5 x = 235,5$$

$$\triangleright x = 42,4$$

Band 2

$$\frac{3,5 - 2,4}{2,7 - 2,4} = \frac{31 - 45}{x - 45}$$

$$\triangleright \frac{1,1}{0,3} = \frac{-14}{x - 45}$$

$$\triangleright 3,67 = \frac{-14}{x - 45}$$

$$\triangleright 3,67(x - 45) = -14$$

$$\triangleright 3,67x - 165 = -14$$

$$\triangleright 3,67x = 151$$

$$\triangleright x = 41,1$$

Band 3

$$\frac{3,5 - 2,4}{2,9 - 2,4} = \frac{31 - 45}{x - 45}$$

$$\triangleright \frac{1,1}{0,5} = \frac{-14}{x - 45}$$

$$\triangleright 2,2 = \frac{-14}{x - 45}$$

$$\triangleright 2,2(x - 45) = -14$$

$$\triangleright 2,2x - 99 = -14$$

$$\triangleright 2,2x = 85$$

$$\triangleright x = 38,6$$

Band 4

$$\frac{3,5 - 2,4}{3,5 - 2,4} = \frac{31 - 45}{x - 45}$$

$$\triangleright 1 = \frac{-14}{x - 45}$$

$$\triangleright x - 45 = -14$$

$$\triangleright x = 31$$

Band 5

$$\frac{5,2 - 3,5}{3,8 - 3,5} = \frac{21,5 - 31}{x - 31}$$

$$\triangleright \frac{1,7}{0,3} = \frac{-9,5}{x - 31}$$

$$\triangleright 5,67 = \frac{-9,5}{x - 31}$$

$$\triangleright 5,67(x - 31) = -9,5$$

$$\triangleright 5,67x - 175,7 = -9,5$$

$$\triangleright 5,67x = 166,2$$

$$\triangleright x = 29,3$$

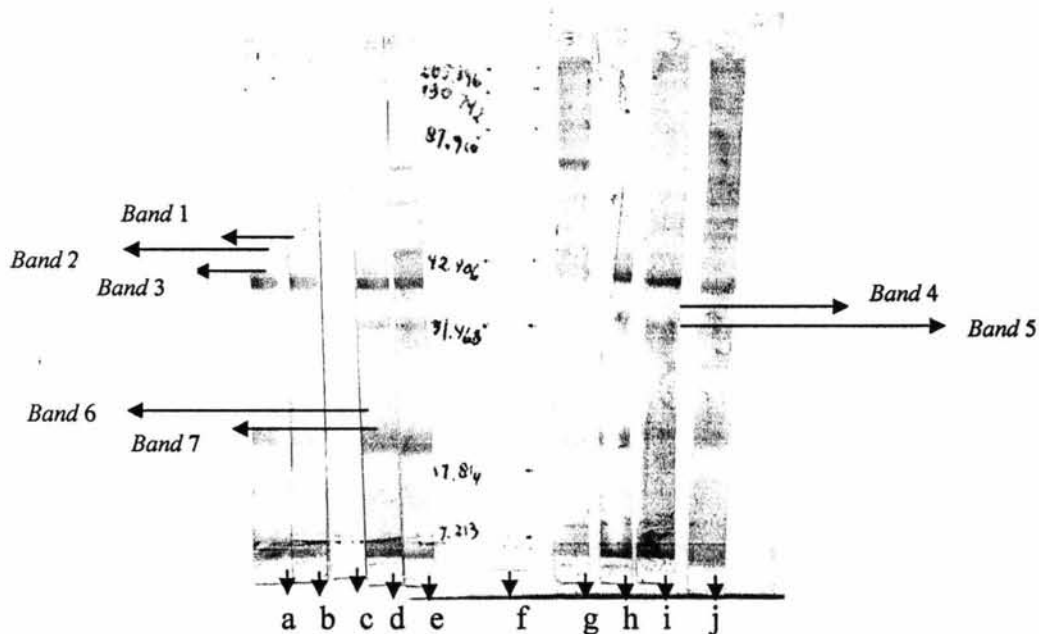
LAMPIRAN 8**Penghitungan Berat Molekul Protein Antigenik Hasil *Western Blotting* Dengan Konjugat Antichicken Peroksidase Dan Substrat AEC Metode Ekstrapolasi**

Rumus :

$$\frac{a - b}{c - b} = \frac{d - e}{x - e}$$

Keterangan rumus :

- a. Jarak pergerakan dari tempat asal protein *marker* di bawah warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- b. Jarak pergerakan dari tempat asal protein *marker* di atas warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- c. Jarak pergerakan dari tempat asal warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- d. Berat protein *marker* di bawah warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- e. Berat protein *marker* di atas warna *band* protein sampel yang akan dihitung
- x. Berat protein sampel yang akan dihitung



Gambar 4.5 Hasil *western blotting* protein Omp *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, Omp *Escherichia coli* K88, dan fimbria *Escherichia coli* K88 yang direaksikan dengan antibodi poliklonal *Salmonella pullorum* 11, *Salmonella pullorum* AV, *Escherichia coli* K88 dan serum negatif, dengan konjugat *antichicken* IgG Peroksidase dan substrat AEC

Keterangan gambar:

- a. Protein Omp *Escherichia coli* K88 + Antibodi *Escherichia coli* K88
- b. Protein Omp *Escherichia coli* K88 + Antibodi *Salmonella pullorum* AV
- c. Protein Omp *Escherichia coli* K88 + Antibodi negatif
- d. Protein Omp *Salmonella pullorum* AV + Antibodi *Escherichia coli* K88
- e. Protein Omp *Salmonella pullorum* AV + Antibodi *Salmonella pullorum* AV
- f. Protein marker
- g. Protein Omp *Salmonella pullorum* 11 + Antibodi *Salmonella pullorum* 11
- h. Protein Omp *Salmonella pullorum* 11 + Antibodi *Escherichia coli* K88
- i. Protein fimbria *Escherichia coli* K88 + Antibodi *Escherichia coli* K88
- j. Protein fimbria *Escherichia coli* K88 + Antibodi *Salmonella pullorum* AV

Band 1

$$\frac{4,9 - 2,5}{4,9 - 2,5} = \frac{42,4 - 87,9}{x - 87,9}$$

$$\triangleright 1 = \frac{-45,5}{x - 87,9}$$

$$\triangleright x - 87,9 = -45,5$$

$$\triangleright x = 42,4$$

Band 2

$$\frac{6,3 - 4,9}{5,1 - 4,9} = \frac{31,47 - 42,41}{x - 42,41}$$

$$\triangleright \frac{1,4}{0,2} = \frac{-10,94}{x - 42,41}$$

$$\triangleright 7 = \frac{-10,94}{x - 42,41}$$

$$\triangleright 7(x - 42,41) = -10,94$$

$$\triangleright 7x - 296,9 = -10,94$$

$$\triangleright 7x = 285,9$$

$$\triangleright x = 40,8$$

Band 3

$$\frac{6,3 - 4,9}{5,3 - 4,9} = \frac{31,47 - 42,41}{x - 42,41}$$

$$\triangleright \frac{1,4}{0,4} = \frac{-10,94}{x - 42,41}$$

$$\triangleright 3,5 = \frac{-10,94}{x - 42,41}$$

$$\triangleright 3,5(x - 42,41) = -10,94$$

$$\triangleright 3,5x - 148,4 = -10,94$$

$$\triangleright 3,5x = 137,5$$

$$\triangleright x = 39,2$$

Band 4

$$\frac{3,6 - 2,9}{3,6 - 2,9} = \frac{31,47 - 42,41}{x - 42,41}$$

$$\triangleright 1 = \frac{-10,94}{x - 42,41}$$

$$\triangleright x - 42,41 = -10,94$$

$$\triangleright x = 31,4$$

Band 5

$$\frac{5,7 - 3,6}{3,9 - 3,6} = \frac{17,8 - 31,47}{x - 31,47}$$

$$\triangleright \frac{2,1}{0,3} = \frac{-13,67}{x - 31,47}$$

$$\triangleright 7 = \frac{-13,67}{x - 31,47}$$

$$\triangleright 7(x - 31,47) = -13,67$$

$$\triangleright 7x - 220,3 = -13,67$$

$$\triangleright 7x = 206,6$$

$$\triangleright x = 29,5$$

Band 6

$$\frac{5,7 - 3,6}{5,1 - 3,6} = \frac{17,8 - 31,47}{x - 31,47}$$

$$\triangleright \frac{2,1}{1,5} = \frac{-13,67}{x - 31,47}$$

$$\triangleright 1,4 = \frac{-13,67}{x - 31,47}$$

$$\triangleright 1,4(x - 31,47) = -13,67$$

$$\triangleright 1,4x - 44,1 = -13,67$$

$$\triangleright x = 21,7$$

Band 7

$$\frac{5,7 - 3,6}{5,3 - 3,6} = \frac{17,8 - 31,47}{x - 31,47}$$
$$\triangleright \frac{2,1}{1,7} = \frac{-13,67}{x - 31,47}$$
$$\triangleright 1,2 = \frac{-13,67}{x - 31,47}$$
$$\triangleright 1,2(x - 31,47) = -13,67$$
$$\triangleright 1,2x - 38,9 = -13,67$$
$$\triangleright 1,2x = 25,2$$
$$\triangleright x = 20,4$$

Lampiran 9 Hasil Elisa (Nilai OD)

Tabel Hasil Elisa *Indirect* (Nilai OD) Protein Omp *Salmonella pullorum* 11 Sebelum Elusi (*Whole Protein*) Dan Sesudah Elusi (Protein BM 39-42 kD, 29-31 kD, 20-22 KD) Dengan Antibodi Poliklonal

Antibodi	Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> 11			
	<i>Whole Protein</i>	BM 39-42 kD	29-31 kD	20-22 KD
<i>Salmonella pullorum</i> 11	0.424	0.611	0.512	0.171
	0.406	0.639	0.537	0.195
	0.428	0.610	0.515	0.201
	0.429	0.643	0.542	0.213
	0.490	0.618	0.529	0.191
	0.469	0.648	0.523	0.199
Rata-rata	0.441	0.628	0.526	0.195
<i>Salmonella pullorum</i> AV	0.547	0.606	0.484	0.190
	0.544	0.653	0.546	0.190
	0.486	0.621	0.532	0.264
	0.435	0.659	0.540	0.191
	0.454	0.625	0.537	0.192
	0.485	0.634	0.541	0.182
Rata-rata	0.492	0.633	0.530	0.202
<i>Escherichia coli</i> K88	0.344	0.493	0.413	0.147
	0.339	0.517	0.422	0.158
	0.392	0.534	0.429	0.160
	0.363	0.549	0.430	0.166
	0.372	0.515	0.421	0.165
	0.370	0.549	0.446	0.165
Rata-rata	0.364	0.526	0.427	0.160
Serum Negatif	0.066	0.025	0.022	-0.018
	0.065	0.035	0.027	-0.019
	0.064	0.032	0.018	0.021
	0.065	0.036	0.021	0.010
	0.066	0.025	0.027	0.010
	0.065	0.035	0.022	0.021
Rata-rata	0.065	0.030	0.022	0.020

Tabel Hasil Elisa *Indirect* (Nilai OD) Protein Omp *Salmonella pullorum* AV Sebelum Elusi (*Whole Protein*) Dan Sesudah Elusi (Protein BM 39-42 kD, 29-31 kD, 20-22 KD) Dengan Antibodi Poliklonal

Antibodi	Protein Omp <i>Salmonella pullorum</i> AV			
	<i>Whole Protein</i>	BM 39-42 kD	29-31 kD	20-22 KD
<i>Salmonella pullorum</i> 11	0.436	0.665	0.592	0.511
	0.382	0.601	0.587	0.495
	0.372	0.631	0.625	0.483
	0.342	0.636	0.593	0.481
	0.431	0.718	0.629	0.496
	0.529	0.642	0.672	0.517
Rata-rata	0.415	0.647	0.616	0.497
<i>Salmonella pullorum</i> AV	0.520	0.750	0.665	0.550
	0.460	0.712	0.688	0.547
	0.502	0.733	0.663	0.566
	0.452	0.727	0.677	0.547
	0.418	0.550	0.666	0.507
	0.384	0.602	0.598	0.460
Rata-rata	0.456	0.679	0.660	0.530
<i>Escherichia coli</i> K88	0.352	0.544	0.535	0.459
	0.367	0.542	0.535	0.451
	0.298	0.533	0.520	0.454
	0.376	0.545	0.544	0.448
	0.309	0.539	0.527	0.460
	0.300	0.527	0.534	0.464
Rata-rata	0.334	0.538	0.533	0.456
Serum Negatif	0.076	0.086	0.083	0.077
	0.072	0.085	0.086	0.072
	0.078	0.107	0.080	0.091
	0.070	0.083	0.077	0.074
	0.078	0.086	0.077	0.072
	0.070	0.085	0.080	0.077
Rata-rata	0.074	0.090	0.082	0.079

Tabel Hasil Elisa *Indirect* (Nilai OD) Protein Omp *Escherichia coli* K88 Sebelum Elusi (*Whole Protein*) Dan Sesudah Elusi (Protein BM 39-42 kD, 29-31 kD, 20-22 KD) Dengan Antibodi Poliklonal

Antibodi	Protein Omp <i>Escherichia coli</i> K88			
	<i>Whole Protein</i>	BM 39-42 kD	29-31 kD	20-22 KD
<i>Salmonella pullorum</i> 11	0.417	0.436	0.650	0.450
	0.402	0.394	0.656	0.467
	0.395	0.561	0.644	0.561
	0.401	0.440	0.642	0.442
	0.476	0.435	0.689	0.455
	0.495	0.442	0.622	0.443
Rata-rata	0.431	0.451	0.651	0.470
<i>Salmonella pullorum</i> AV	0.622	0.436	0.655	0.422
	0.594	0.471	0.642	0.426
	0.596	0.425	0.622	0.406
	0.557	0.439	0.628	0.431
	0.532	0.412	0.637	0.425
	0.525	0.434	0.631	0.445
Rata-rata	0.571	0.436	0.636	0.426
<i>Escherichia coli</i> K88	0.471	0.536	0.688	0.529
	0.466	0.486	0.706	0.525
	0.498	0.527	0.686	0.457
	0.460	0.514	0.679	0.489
	0.391	0.536	0.678	0.475
	0.455	0.509	0.689	0.515
Rata-rata	0.457	0.518	0.688	0.500
Serum Negatif	0.119	0.081	0.100	0.080
	0.095	0.077	0.085	0.080
	0.089	0.080	0.086	0.075
	0.090	0.075	0.082	0.079
	0.089	0.077	0.085	0.080
	0.090	0.081	0.100	0.080
Rata-rata	0.098	0.078	0.088	0.079

Tabel Hasil Elisa *Indirect* (Nilai OD) Protein Fimbria *Escherichia coli* K88 Sebelum Elusi (*Whole Protein*) Dan Sesudah Elusi (Protein BM 39-42 kD, 29-31 kD, 20-22 KD) Dengan Antibodi Poliklonal

Antibodi	Protein Fimbria <i>Escherichia coli</i> K88			
	<i>Whole Protein</i>	BM 39-42 kD	29-31 kD	20-22 KD
<i>Salmonella pullorum</i> 11	0.880	0.278	0.373	0.451
	0.845	0.285	0.371	0.428
	1.028	0.276	0.367	0.479
	0.892	0.299	0.366	0.476
	1.082	0.308	0.410	0.506
	1.003	0.290	0.401	0.470
Rata-rata	0.955	0.289	0.381	0.468
<i>Salmonella pullorum</i> AV	1.129	0.451	0.409	0.537
	1.166	0.446	0.423	0.563
	1.055	0.432	0.388	0.539
	1.079	0.450	0.414	0.499
	0.972	0.375	0.394	0.508
	0.974	0.330	0.385	0.520
Rata-rata	1.063	0.414	0.402	0.528
<i>Escherichia coli</i> K88	0.944	0.322	0.743	0.573
	0.960	0.271	0.742	0.601
	0.938	0.322	0.512	0.585
	0.927	0.333	0.745	0.603
	0.950	0.321	0.730	0.608
	0.944	0.360	0.741	0.641
Rata-rata	0.944	0.322	0.702	0.602
Serum Negatif	0.123	0.088	0.082	0.001
	0.114	0.069	0.073	0.001
	0.112	0.067	0.074	0.002
	0.081	0.068	0.074	0.004
	0.123	0.088	0.074	0.001
	0.114	0.069	0.074	0.001
Rata-rata	0.108	0.073	0.076	0.002

Lampiran 10

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Antibodi	1	S.p(11)	24
	2	S.p(AV)	24
	3	E.c(K88)	24
	4	Sr(-)	24
Protein	1	Whole protein	24
	2	P39-42 kDa	24
	3	P29-31 kDa	24
	4	P20-22 kDa	24

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Ag-Omp Sp(11)

Antibodi	Protein	Mean	Std. Deviation	N
S.p(11)	Whole protein	.44100	.031661	6
	P39-42 kDa	.62817	.017081	6
	P29-31 kDa	.52633	.011928	6
	P20-22 kDa	.19417	.013776	6
	Total	.44742	.165054	24
S.p(AV)	Whole protein	.49183	.045841	6
	P39-42 kDa	.63300	.020070	6
	P29-31 kDa	.53000	.023004	6
	P20-22 kDa	.20150	.030827	6
	Total	.46408	.166225	24
E.c(K88)	Whole protein	.36333	.019531	6
	P39-42 kDa	.52533	.021002	6
	P29-31 kDa	.42683	.011232	6
	P20-22 kDa	.16017	.007195	6
	Total	.36892	.137299	24
Sr(-)	Whole protein	.06517	.000753	6
	P39-42 kDa	.03133	.005086	6
	P29-31 kDa	.02283	.003545	6
	P20-22 kDa	.00417	.018236	6
	Total	.03088	.024301	24
Total	Whole protein	.34033	.171111	24
	P39-42 kDa	.45446	.253880	24
	P29-31 kDa	.37650	.213237	24
	P20-22 kDa	.14000	.083683	24
	Total	.32782	.221357	96

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ag-Omp_Sp(11)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	14.937 ^a	16	.934	2139.377	.000
Antibodi	2.946	3	.982	2250.140	.000
Protein	1.292	3	.431	987.054	.000
Antibodi * Protein	.382	9	.042	97.312	.000
Error	.035	80	.000		
Total	14.972	96			

a. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .997)

Post Hoc Tests

Antibodi

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ag-Omp_Sp(11)

Tukey HSD

(I) Antibodi	(J) Antibodi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
S.p(11)	S.p(AV)	-.01667*	.006030	.035	-.03249	-.00084
	E.c(K88)	.07850*	.006030	.000	.06268	.09432
	Sr(-)	.41654*	.006030	.000	.40072	.43236
S.p(AV)	S.p(11)	.01667*	.006030	.035	.00084	.03249
	E.c(K88)	.09517*	.006030	.000	.07934	.11099
	Sr(-)	.43321*	.006030	.000	.41739	.44903
E.c(K88)	S.p(11)	-.07850*	.006030	.000	-.09432	-.06268
	S.p(AV)	-.09517*	.006030	.000	-.11099	-.07934
	Sr(-)	.33804*	.006030	.000	.32222	.35386
Sr(-)	S.p(11)	-.41654*	.006030	.000	-.43236	-.40072
	S.p(AV)	-.43321*	.006030	.000	-.44903	-.41739
	E.c(K88)	-.33804*	.006030	.000	-.35386	-.32222

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Ag-Omp_Sp(11)

Tukey HSD^{a,b}

Antibodi	N	Subset			
		1	2	3	4
Sr(-)	24	.03088			
E.c(K88)	24		.36892		
S.p(11)	24			.44742	
S.p(AV)	24				.46408
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .000.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

Protein

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ag-Omp_Sp(11)

Tukey HSD

(I) Protein	(J) Protein	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Whole protein	P39-42 kDa	-.11413*	.006030	.000	-.12995	-.09830
	P29-31 kDa	-.03617*	.006030	.000	-.05199	-.02034
	P20-22 kDa	.20033*	.006030	.000	.18451	.21616
P39-42 kDa	Whole protein	.11413*	.006030	.000	.09830	.12995
	P29-31 kDa	.07796*	.006030	.000	.06214	.09378
	P20-22 kDa	.31446*	.006030	.000	.29864	.33028
P29-31 kDa	Whole protein	.03617*	.006030	.000	.02034	.05199
	P39-42 kDa	-.07796*	.006030	.000	-.09378	-.06214
	P20-22 kDa	.23650*	.006030	.000	.22068	.25232
P20-22 kDa	Whole protein	-.20033*	.006030	.000	-.21616	-.18451
	P39-42 kDa	-.31446*	.006030	.000	-.33028	-.29864
	P29-31 kDa	-.23650*	.006030	.000	-.25232	-.22068

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Ag-Omp_Sp(11)

Tukey HSD^{a,b}

Protein	N	Subset			
		1	2	3	4
P20-22 kDa	24	.14000			
Whole protein	24		.34033		
P29-31 kDa	24			.37650	
P39-42 kDa	24				.45446
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .000.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

Interaksi Antibodi*Protein

Ag-Omp_Sp(11)

Tukey HSD^a

Perlakuan Kombinasi	N	Subset for alpha = .05						
		1	2	3	4	5	6	7
Sr(-)*P20-22 kDa	6	.00417						
Sr(-)*P29-31 kDa	6	.02283	.02283					
Sr(-)*P39-42 kDa	6	.03133	.03133					
Sr(-)*Whole protein	6		.06517					
E.c(K88)*P20-22 kDa	6			.16017				
S.p(11)*P20-22 kDa	6			.19417				
S.p(AV)*P20-22 kDa	6			.20150				
E.c(K88)*Whole protein	6				.36333			
E.c(K88)*P29-31 kDa	6					.42683		
S.p(11)*Whole protein	6					.44100		
S.p(AV)*Whole protein	6						.49183	
E.c(K88)*P39-42 kDa	6						.52533	
S.p(11)*P29-31 kDa	6						.52633	
S.p(AV)*P29-31 kDa	6						.53000	
S.p(11)*P39-42 kDa	6							.62817
S.p(AV)*P39-42 kDa	6							.63300
Sig.		.658	.054	.068	1.000	.998	.132	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Antibodi	1	S.p(11)	24
	2	S.p(AV)	24
	3	E.c(K88)	24
	4	Sr(-)	24
Protein	1	Whole protein	24
	2	P39-42 kDa	24
	3	P29-31 kDa	24
	4	P20-22 kDa	24

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Ag-Omp_Sp(AV)

Antibodi	Protein	Mean	Std. Deviation	N
S.p(11)	Whole protein	.41533	.066271	6
	P39-42 kDa	.64717	.039046	6
	P29-31 kDa	.61633	.032654	6
	P20-22 kDa	.49717	.014511	6
	Total	.54400	.102937	24
S.p(AV)	Whole protein	.45600	.050739	6
	P39-42 kDa	.67900	.082365	6
	P29-31 kDa	.65950	.031577	6
	P20-22 kDa	.52950	.039247	6
	Total	.58100	.107084	24
E.c(K88)	Whole protein	.33367	.035365	6
	P39-42 kDa	.53833	.007033	6
	P29-31 kDa	.53250	.008167	6
	P20-22 kDa	.45600	.006033	6
	Total	.46513	.086123	24
Sr(-)	Whole protein	.07400	.003795	6
	P39-42 kDa	.08867	.009048	6
	P29-31 kDa	.08050	.003507	6
	P20-22 kDa	.07717	.007139	6
	Total	.08008	.008113	24
Total	Whole protein	.31975	.157546	24
	P39-42 kDa	.48829	.245400	24
	P29-31 kDa	.47221	.236665	24
	P20-22 kDa	.38996	.187453	24
	Total	.41755	.217450	96

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ag-Omp_Sp(AV)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	21.126 ^a	16	1.320	1022.976	.000
Antibodi	3.812	3	1.271	984.568	.000
Protein	.440	3	.147	113.535	.000
Antibodi * Protein	.137	9	.015	11.765	.000
Error	.103	80	.001		
Total	21.230	96			

a. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .994)

Post Hoc Tests**Antibodi****Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Ag-Omp_Sp(AV)

Tukey HSD

(I) Antibodi	(J) Antibodi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
S.p(11)	S.p(AV)	-.03700*	.010371	.003	-.06421	-.00979
	E.c(K88)	.07888*	.010371	.000	.05166	.10609
	Sr(-)	.46392*	.010371	.000	.43670	.49113
S.p(AV)	S.p(11)	.03700*	.010371	.003	.00979	.06421
	E.c(K88)	.11588*	.010371	.000	.08866	.14309
	Sr(-)	.50092*	.010371	.000	.47370	.52813
E.c(K88)	S.p(11)	-.07888*	.010371	.000	-.10609	-.05166
	S.p(AV)	-.11588*	.010371	.000	-.14309	-.08866
	Sr(-)	.38504*	.010371	.000	.35783	.41225
Sr(-)	S.p(11)	-.46392*	.010371	.000	-.49113	-.43670
	S.p(AV)	-.50092*	.010371	.000	-.52813	-.47370
	E.c(K88)	-.38504*	.010371	.000	-.41225	-.35783

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Ag-Omp_Sp(AV)

Tukey HSD^{a,b}

Antibodi	N	Subset			
		1	2	3	4
Sr(-)	24	.08008			
E.c(K88)	24		.46513		
S.p(11)	24			.54400	
S.p(AV)	24				.58100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .001.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

Protein

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ag-Omp_Sp(AV)

Tukey HSD

(I) Protein	(J) Protein	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Whole protein	P39-42 kDa	-.16854*	.010371	.000	-.19575	-.14133
	P29-31 kDa	-.15246*	.010371	.000	-.17967	-.12525
	P20-22 kDa	-.07021*	.010371	.000	-.09742	-.04300
P39-42 kDa	Whole protein	.16854*	.010371	.000	.14133	.19575
	P29-31 kDa	.01608	.010371	.413	-.01113	.04330
	P20-22 kDa	.09833*	.010371	.000	.07112	.12555
P29-31 kDa	Whole protein	.15246*	.010371	.000	.12525	.17967
	P39-42 kDa	-.01608	.010371	.413	-.04330	.01113
	P20-22 kDa	.08225*	.010371	.000	.05504	.10946
P20-22 kDa	Whole protein	.07021*	.010371	.000	.04300	.09742
	P39-42 kDa	-.09833*	.010371	.000	-.12555	-.07112
	P29-31 kDa	-.08225*	.010371	.000	-.10946	-.05504

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Ag-Omp_Sp(AV)

Tukey HSD^{a,b}

Protein	N	Subset		
		1	2	3
Whole protein	24	.31975		
P20-22 kDa	24		.38996	
P29-31 kDa	24			.47221
P39-42 kDa	24			.48829
Sig.		1.000	1.000	.413

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .001.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

Interaksi Antibodi*Protein

Ag-Omp_Sp(AV)

Tukey HSD^a

Perlakuan Kombinasi	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
Sr(-)*Whole protein	6	.07400					
Sr(-)*P20-22 kDa	6	.07717					
Sr(-)*P29-31 kDa	6	.08050					
Sr(-)*P39-42 kDa	6	.08867					
E.c(K88)*Whole protein	6		.33367				
S.p(11)*Whole protein	6			.41533			
S.p(AV)*Whole protein	6			.45600	.45600		
E.c(K88)*P20-22 kDa	6			.45600	.45600		
S.p(11)*P20-22 kDa	6				.49717	.49717	
S.p(AV)*P20-22 kDa	6					.52950	
E.c(K88)*P29-31 kDa	6					.53250	
E.c(K88)*P39-42 kDa	6					.53833	
S.p(11)*P29-31 kDa	6						.61633
S.p(11)*P39-42 kDa	6						.64717
S.p(AV)*P29-31 kDa	6						.65950
S.p(AV)*P39-42 kDa	6						.67900
Sig.		1.000	1.000	.839	.826	.826	.184

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Antibodi	1	S.p(11)	24
	2	S.p(AV)	24
	3	E.c(K88)	24
	4	Sr(-)	24
Protein	1	Whole protein	24
	2	P39-42 kDa	24
	3	P29-31 kDa	24
	4	P20-22 kDa	24

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Ag-Omp Ec(K88)

Antibodi	Protein	Mean	Std. Deviation	N
S.p(11)	Whole protein	.43100	.043253	6
	P39-42 kDa	.45133	.056624	6
	P29-31 kDa	.64967	.020373	6
	P20-22 kDa	.46967	.045667	6
	Total	.50042	.097931	24
S.p(AV)	Whole protein	.57100	.038956	6
	P39-42 kDa	.43617	.019671	6
	P29-31 kDa	.63583	.011686	6
	P20-22 kDa	.42583	.012671	6
	Total	.51721	.093786	24
E.c(K88)	Whole protein	.45683	.035572	6
	P39-42 kDa	.51800	.019235	6
	P29-31 kDa	.68767	.010093	6
	P20-22 kDa	.49833	.029221	6
	Total	.54021	.092925	24
Sr(-)	Whole protein	.09533	.011810	6
	P39-42 kDa	.07850	.002510	6
	P29-31 kDa	.08967	.008116	6
	P20-22 kDa	.07900	.002000	6
	Total	.08563	.010021	24
Total	Whole protein	.38854	.183959	24
	P39-42 kDa	.37100	.177793	24
	P29-31 kDa	.51571	.252323	24
	P20-22 kDa	.36821	.174537	24
	Total	.41086	.205911	96

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ag-Omp Ec(K88)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	20.171 ^a	16	1.261	1602.629	.000
Antibodi	3.404	3	1.135	1442.505	.000
Protein	.358	3	.119	151.526	.000
Antibodi * Protein	.203	9	.023	28.715	.000
Error	.063	80	.001		
Total	20.234	96			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .996)

Post Hoc Tests**Antibodi****Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Ag-Omp_Ec(K88)

Tukey HSD

(I) Antibodi	(J) Antibodi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
S.p(11)	S.p(AV)	-.01679	.008096	.171	-.03804	.00445
	E.c(K88)	-.03979*	.008096	.000	-.06104	-.01855
	Sr(-)	.41479*	.008096	.000	.39355	.43604
S.p(AV)	S.p(11)	.01679	.008096	.171	-.00445	.03804
	E.c(K88)	-.02300*	.008096	.029	-.04424	-.00176
	Sr(-)	.43158*	.008096	.000	.41034	.45283
E.c(K88)	S.p(11)	.03979*	.008096	.000	.01855	.06104
	S.p(AV)	.02300*	.008096	.029	.00176	.04424
	Sr(-)	.45458*	.008096	.000	.43334	.47583
Sr(-)	S.p(11)	-.41479*	.008096	.000	-.43604	-.39355
	S.p(AV)	-.43158*	.008096	.000	-.45283	-.41034
	E.c(K88)	-.45458*	.008096	.000	-.47583	-.43334

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Ag-Omp_Ec(K88)

Tukey HSD^{a,b}

Antibodi	N	Subset		
		1	2	3
Sr(-)	24	.08563		
S.p(11)	24		.50042	
S.p(AV)	24		.51721	
E.c(K88)	24			.54021
Sig.		1.000	.171	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .001.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

Protein

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ag-Omp_Ec(K88)

Tukey HSD

(I) Protein	(J) Protein	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Whole protein	P39-42 kDa	.01754	.008096	.142	-.00370	.03879
	P29-31 kDa	-.12717*	.008096	.000	-.14841	-.10592
	P20-22 kDa	.02033	.008096	.066	-.00091	.04158
P39-42 kDa	Whole protein	-.01754	.008096	.142	-.03879	.00370
	P29-31 kDa	-.14471*	.008096	.000	-.16595	-.12346
	P20-22 kDa	.00279	.008096	.986	-.01845	.02404
P29-31 kDa	Whole protein	.12717*	.008096	.000	.10592	.14841
	P39-42 kDa	.14471*	.008096	.000	.12346	.16595
	P20-22 kDa	.14750*	.008096	.000	.12626	.16874
P20-22 kDa	Whole protein	-.02033	.008096	.066	-.04158	.00091
	P39-42 kDa	-.00279	.008096	.986	-.02404	.01845
	P29-31 kDa	-.14750*	.008096	.000	-.16874	-.12626

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Ag-Omp_Ec(K88)

Tukey HSD^{a,b}

Protein	N	Subset	
		1	2
P20-22 kDa	24	.36821	
P39-42 kDa	24	.37100	
Whole protein	24	.38854	
P29-31 kDa	24		.51571
Sig.		.066	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .001.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

Interaksi Antibodi*Protein

Ag-Omp_Ec(K88)

Tukey HSD^a

Perlakuan Kombinasi	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
Sr(-)*P39-42 kDa	6	.07850					
Sr(-)*P20-22 kDa	6	.07900					
Sr(-)*P29-31 kDa	6	.08967					
Sr(-)*Whole protein	6	.09533					
S.p(AV)*P20-22 kDa	6		.42583				
S.p(11)*Whole protein	6		.43100				
S.p(AV)*P39-42 kDa	6		.43617				
S.p(11)*P39-42 kDa	6		.45133	.45133			
E.c(K88)*Whole protein	6		.45683	.45683			
S.p(11)*P20-22 kDa	6		.46967	.46967	.46967		
E.c(K88)*P20-22 kDa	6			.49833	.49833		
E.c(K88)*P39-42 kDa	6				.51800	.51800	
S.p(AV)*Whole protein	6					.57100	
S.p(AV)*P29-31 kDa	6						.63583
S.p(11)*P29-31 kDa	6						.64967
E.c(K88)*P29-31 kDa	6						.68767
Sig.		1.000	.345	.237	.199	.101	.121

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Antibodi	1	S.p(11)	24
	2	S.p(AV)	24
	3	E.c(K88)	24
	4	Sr(-)	24
Protein	1	Whole protein	24
	2	P39-42 kDa	24
	3	P29-31 kDa	24
	4	P20-22 kDa	24

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Ag-Fimbria Ec(K88)

Antibodi	Protein	Mean	Std. Deviation	N
S.p(11)	Whole protein	.95500	.095348	6
	P39-42 kDa	.28933	.012388	6
	P29-31 kDa	.38133	.019107	6
	P20-22 kDa	.46833	.026538	6
	Total	.52350	.266805	24
S.p(AV)	Whole protein	1.06167	.078538	6
	P39-42 kDa	.41400	.050180	6
	P29-31 kDa	.40217	.015381	6
	P20-22 kDa	.52767	.023372	6
	Total	.60138	.279745	24
E.c(K88)	Whole protein	.94383	.011107	6
	P39-42 kDa	.32150	.028863	6
	P29-31 kDa	.70217	.093311	6
	P20-22 kDa	.60183	.023190	6
	Total	.64233	.232692	24
Sr(-)	Whole protein	.11117	.015536	6
	P39-42 kDa	.07400	.010973	6
	P29-31 kDa	.07517	.003371	6
	P20-22 kDa	.00167	.001211	6
	Total	.06550	.041613	24
Total	Whole protein	.76792	.394498	24
	P39-42 kDa	.27471	.130328	24
	P29-31 kDa	.39021	.231004	24
	P20-22 kDa	.39988	.240579	24
	Total	.45818	.321698	96

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ag-Fimbria_Ec(K88)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	29.833 ^a	16	1.865	982.665	.000
Antibodi	5.109	3	1.703	897.557	.000
Protein	3.303	3	1.101	580.230	.000
Antibodi * Protein	1.268	9	.141	74.235	.000
Error	.152	80	.002		
Total	29.984	96			

a. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .994)

Post Hoc Tests**Antibodi****Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Ag-Fimbria_Ec(K88)

Tukey HSD

(I) Antibodi	(J) Antibodi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
S.p(11)	S.p(AV)	-.07788*	.012575	.000	-.11087	-.04488
	E.c(K88)	-.11883*	.012575	.000	-.15183	-.08584
	Sr(-)	.45800*	.012575	.000	.42501	.49099
S.p(AV)	S.p(11)	.07788*	.012575	.000	.04488	.11087
	E.c(K88)	-.04096*	.012575	.009	-.07395	-.00796
	Sr(-)	.53588*	.012575	.000	.50288	.56887
E.c(K88)	S.p(11)	.11883*	.012575	.000	.08584	.15183
	S.p(AV)	.04096*	.012575	.009	.00796	.07395
	Sr(-)	.57683*	.012575	.000	.54384	.60983
Sr(-)	S.p(11)	-.45800*	.012575	.000	-.49099	-.42501
	S.p(AV)	-.53588*	.012575	.000	-.56887	-.50288
	E.c(K88)	-.57683*	.012575	.000	-.60983	-.54384

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Ag-Fimbria_Ec(K88)

Tukey HSD^{a,b}

Antibodi	N	Subset			
		1	2	3	4
Sr(-)	24	.06550			
S.p(11)	24		.52350		
S.p(AV)	24			.60138	
E.c(K88)	24				.64233
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .002.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

Protein

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ag-Fimbria_Ec(K88)

Tukey HSD

(I) Protein	(J) Protein	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Whole protein	P39-42 kDa	.49321*	.012575	.000	.46021	.52620
	P29-31 kDa	.37771*	.012575	.000	.34471	.41070
	P20-22 kDa	.36804*	.012575	.000	.33505	.40104
P39-42 kDa	Whole protein	-.49321*	.012575	.000	-.52620	-.46021
	P29-31 kDa	-.11550*	.012575	.000	-.14849	-.08251
	P20-22 kDa	-.12517*	.012575	.000	-.15816	-.09217
P29-31 kDa	Whole protein	-.37771*	.012575	.000	-.41070	-.34471
	P39-42 kDa	.11550*	.012575	.000	.08251	.14849
	P20-22 kDa	-.00967	.012575	.868	-.04266	.02333
P20-22 kDa	Whole protein	-.36804*	.012575	.000	-.40104	-.33505
	P39-42 kDa	.12517*	.012575	.000	.09217	.15816
	P29-31 kDa	.00967	.012575	.868	-.02333	.04266

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets**Ag-Fimbria_Ec(K88)**Tukey HSD^{a,b}

Protein	N	Subset		
		1	2	3
P39-42 kDa	24	.27471		
P29-31 kDa	24		.39021	
P20-22 kDa	24		.39988	
Whole protein	24			.76792
Sig.		1.000	.868	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .002.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

Interaksi Antibodi*Protein**Ag-Fimbria_Ec(K88)**Tukey HSD^a

Perlakuan Kombinasi	N	Subset for alpha = .05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sr(-)*P20-22 kDa	6	.0017									
Sr(-)*P39-42 kDa	6	.0740	.07400								
Sr(-)*P29-31 kDa	6	.0752	.07517								
Sr(-)*Whole protein	6		.11117								
S.p(11)*P39-42 kDa	6			.2893							
E.c(K88)*P39-42 kDa	6			.3215	.3215						
S.p(11)*P29-31 kDa	6				.3813	.3813					
S.p(AV)*P29-31 kDa	6				.4022	.4022					
S.p(AV)*P39-42 kDa	6					.4140					
S.p(11)*P20-22 kDa	6					.4683	.46833				
S.p(AV)*P20-22 kDa	6						.52767	.5277			
E.c(K88)*P20-22 kDa	6							.6018			
E.c(K88)*P29-31 kDa	6								.7022		
E.c(K88)*Whole protein	6									.94383	
S.p(11)*Whole protein	6									.95500	
S.p(AV)*Whole protein	6										1.062
Sig.		.227	.982	.996	.119	.062	.582	.215	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.