

Uji Protektif Protein Immunogenik Membran Luar Bakteri *Salmonella Pullorum* Terhadap Ayam Petelur

Protective Test Immunogenic Protein Of Outer Membrane *Salmonella Pullorum* Against Broiler

Sri Chusniati

Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp.031 5992785 Fax 031 5993015

Email : ichus@windowslive.com

Abstract

The goals of this research was to know immunogenic protein from Outer Membrane Protein (OMP) *Salmonella pullorum* as subunit vaccine that can be immune respons stimulants and also protective against pullorum disease. Subunit vaccine OMP was applicated to broiler and 1st booster at 21st days post vaccinal and then challenge test at 28th days with suspense bacteria of *Salmonella pullorum*. The work was done antibody titer with indirect Elisa methods. The measurement of antibody titer were from broiler samples 1st day, 7th, 14th, 21st, 28th, 35th, and 42nd day. The result of this research showed that subunit vaccine of protein OMP was immunogenic, high antibody titer and protective (60%). Conclusion of this research was success in vaccination programs and spesific immunogenic protein of OMP *Salmonella pullorum* can be recommended to develop as subunit vaccine pullorum.

Keywords : Protein OMP *Salmonella pullorum*, specific immunogenic, high antibody titer And good protectivity.

Pendahuluan

Studi tentang bakteri *Salmonella pullorum* akhir-akhir ini mulai bangkit kembali setelah kejadian Salmonellosis yang timbul di Zambia dan di Eropa (Duncan 1991), dimana *Salmonella* merupakan bakteri kontaminan pada makanan (*food infection*). Setelah diisolasi dan diidentifikasi, ternyata juga ditemukan *Salmonella enteritidis* dan *Salmonella pullorum*.

Kejadian penyakit pullorum di Eropa dan Amerika saat ini sudah mulai menurun dan bergeser dari Salmonellosis yang disebabkan oleh *Salmonella pullorum* menjadi disebabkan oleh *Salmonella enteritidis*, padahal kejadian penyakit pullorum di Indonesia dengan penyebab bakteri *Salmonella pullorum* masih merupakan momok bagi peternak ayam terutama para pengusaha *breeding farm*.

Upaya penanggulangan dan pengobatan dengan menggunakan antibiotik sampai saat ini masih belum memberikan hasil yang memuaskan. Pengendalian penyakit pullorum dilakukan sesuai dengan peraturan Direktur Jenderal Peternakan, yaitu secara rutin melakukan uji pullorum.

Uji pullorum dilakukan sebagai upaya deteksi dini untuk mencari reaktor positif dan bukan merupakan usaha preventif pengebalan tubuh. Pengujian ini selalu dilakukan karena sampai saat ini belum pernah dilakukan vaksinasi karena memang sampai sekarang belum pernah dibuat vaksin terhadap penyakit pullorum. Gast (1997) pernah meneliti protein dari *Outer Membrane Protein* (OMP) *Salmonella enteritidis* ternyata bersifat antigenik dan diduga dapat menimbulkan respon imun.

Bertitik tolak dari hal tersebut, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian bakteri *Salmonella pullorum* secara molekuler, sampai sejauh mana dinding sel luar bakteri *Salmonella pullorum* dapat bersifat antigenik ataupun imunogenik sebagai bahan vaksin pada ayam. Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian sebelumnya, yaitu bakteri *Salmonella pullorum* sebagai bahan vaksin inaktif (bakterin) yang ternyata hasilnya kurang memuaskan. Kini dicoba dan dikembangkan ke arah molekuler yaitu dengan memakai protein membran luar bakteri sebagai bahan dasar vaksin sub unit, dengan menguji daya protektif ayam terhadap penyakit pullorum.

Materi dan Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi FKH Unair dan Laboratorium ITD Unair untuk proses pengukuran titer antibodi. Bahan yang digunakan adalah media kultur bakteri *Salmonella Shigella* Agar (SSA) dan Laurie Berthani Broth (LBB), Phosphat Buffer Salin (PBS), Conjugate Antichicken Ig G, Horse Reddish Peroxidase ayam petelur, Bakteri *Salmonella pullorum*, Ajuvant Freund's Complete, antibodi poliklonal dan bahan untuk uji Elisa tak langsung. Ayam coba yang dipakai adalah 20 ekor White Leghorn umur + 2 minggu dan diseleksi dengan pullorum test (RWBT) negatif.

Alat yang digunakan adalah ultra sonikator untuk memecah dinding sel bakteri, *cold ultra centrifuge*, *Shaker incubator*, *Spectrophotometer*, kandang lengkap untuk uji protektif, alat uji Elisa dan ultra disperser untuk mencampur vaksin.

Penelitian ini diawali dengan pembuatan suspensi *Salmonella pullorum* pada media LBB dan dieramkan selama 6-7 jam pada shaker inkubator. Hal ini dilakukan untuk perbanyak bakteri. Pemecahan dinding sel bakteri dengan ultra sonikator dilanjutkan dengan sentrifugasi kecepatan tinggi sehingga diperoleh endapan dan cairan. Isolasi protein OMP bakteri *Salmonella pullorum* dengan metode Matsuyama yang dimodifikasi. Isolasi metode Matsuyama modifikasi pada putaran 40.000 rpm/20 menit, diulang dua kali pada suhu 4°C.

Setelah diperoleh protein OMP, dibuat vaksin sub unit dengan menambah Ajuvant Freud's Complete dengan perbandingan 3 : 7 supaya homogen dan mudah diaplikasikan. Ayam coba dibagi 2 kelompok yaitu 10 ekor kelompok kontrol (K) diberi PZ secara sub cutan (sc) dosis 1 ml, dan 10 ekor kelompok perlakuan (P) diinjeksi vaksin sub unit 1 ml sc. Pada minggu ke 3 (hari ke 21) dibooster satu kali dan pada minggu ke 4 (hari ke 28) ayam *challenge* (uji tantang) dengan pemberian suspensi bakteri *Salmonella pullorum* 1 ml/sc yang mengandung 9×10^8 sel/ml. Pengambilan darah dilakukan pada hari ke 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 dan diambil serumnya untuk dilihat titer antibodinya dengan metode Elisa tak langsung dan hasilnya dibaca melalui *Elisa Reader*.

Hasil dan Pembahasan

Bakteri *Salmonella pullorum* ditanam pada media SSA dan diidentifikasi berbentuk batang dengan sifat Gram negatif, uji biokimiawi TSIA: merah/kuning, gas dan H₂S +; SIM: non motil, indol -, H₂S +; gula-gula (glukosa +, sukrosa -, laktosa -, maltosa + dan mannososa +), Urea Agar - dan Simon Citrat Agar -.

Hasil ultra sonifikasi suspensi *Salmonella pullorum* diukur kadar proteinnya dengan spectrophotometer. Larutan standar protein adalah Bovine Serum Albumin (BSA) 1% setara 400 ug/ml dengan rekaman standar spectrum 592 nm. Setelah dihitung kadar proteinnya adalah 1.973,4 mikrogram per ml, dan jumlah ini cukup baik untuk digunakan

sebagai bahan vaksin. Vaksin sub unit adalah campuran suspensi protein imunogenik OMP dengan Ajuvant Freund's Complete dengan perbandingan 3 : 7. Supaya homogen digunakan ultra disperser dalam keadaan dingin dengan kecepatan 20.000 rpm selama 10 menit. Hasilnya berupa larutan vaksin berwarna putih. Dengan perbandingan ini (3:7) suspensi vaksin tidak terlalu pekat dan sesuai untuk aplikasi sehingga dengan cara sub cutan akan terjadi penyerapan yang pelan dan respon imun juga akan timbul secara pelan tanpa ada reaksi shock.

Pada hari ke 21, kelompok K dibooster dengan PZ steril dan kelompok P dibooster vaksin sub unit OMP. Pada hari ke 28 kedua kelompok (K dan P) diuji tantang dengan suspensi bakteri *Salmonella pullorum*. Dari perlakuan tersebut diperoleh hasil seperti pada Tabel 1.

Dari hasil nilai OD titer antibodi tersebut, protein OMP bakteri *Salmonella pullorum* selain bersifat antigenik juga bersifat imunogenik. Hal ini terbukti dengan terbentuknya antibodi dan terjadi peningkatan titer antibodi (Tabel 2), sedangkan pada kelompok K nilai OD relatif tetap rendah dan berfluktuasi non signifikan.

Perlu dicermati, pada tabel 2 (kelompok P) terjadi peningkatan titer antibodi pada hari ke 21, kemudian setelah dibooster terjadi penurunan titer antibodi pada hari ke 28. setelah diuji tantang (*challenge test*) terjadi peningkatan titer antibodi seminggu kemudian. Peningkatan titer antibodi pasca uji tantang (hari ke 28) secara drastis terlihat pada hari ke 42.

Peningkatan titer antibodi sampai hari ke 21 relatif kecil, kemungkinan karena tubuh dalam membentuk respon imun tergantung kondisi rangsangan. Hal ini sesuai dengan pendapat Samik (1993) bahwa kenaikan antibodi sebagai respon imun akan berlangsung sampai sekitar 3 minggu dan bila tidak ada perlakuan lain, maka antibodi akan turun kembali, oleh karena itu ketika dibooster pada hari ke 21, titer hari ke 28 masih relatif non signifikan dan

Tabel 1. Nilai OD Indirect Elisa Antibodi Ayam Kelompok K (Pengenceran 1 : 1000)

Sampel No.	TITER ANTIBODI HARI KE						
	1	7	14	21	28	35	42
1	0,1080	0,1050	0,0830	0,0810	0,0790	0,0860	0,1210
2	0,1030	0,0980	0,0760	0,0730	0,0710	0,0920	0,1130
3	0,1070	0,0870	0,0710	0,0640	0,0620	0,0710	0,1010
4	0,0950	0,0740	0,0820	0,0710	0,0700	0,0890	0,1020
5	0,1040	0,0770	0,0770	0,0750	0,0770	0,0850	0,0930
6	0,1060	0,0820	0,0790	0,0690	0,0810	0,0890	0,1130
7	0,0970	0,0740	0,0850	0,0890	0,0980	0,0990	0,0910
8	0,0960	0,0710	0,0890	0,0910	0,0890	0,1030	0,1230
9	0,1100	0,0910	0,0980	0,1030	0,1010	0,1120	0,1240
10	0,1070	0,0930	0,1060	0,1110	0,0990	0,1320	0,1140
RATAAN	0,1033	0,0848	0,0846	0,08277	0,0827	0,0958	0,1095

Tabel 2. Nilai OD Indirect Elisa Antibodi Ayam Kelompok P (Pengenceran 1 : 1000)

Sampel No.	TITER ANTIBODI HARI KE						
	1	7	14	21	28	35	42
1	0,1400	0,1570	0,1890	0,2710	0,2590	0,4140	0,6040
2	0,0960	0,1050	0,1430	0,2210	0,2160	0,3980*	0,5760
3	0,1190	0,1410	0,1780	0,2680	0,2550	0,4070	0,5910
4	0,0690	0,1120	0,1640	0,2420	0,2310	0,4020	0,5830
5	0,0810	0,1210	0,1680	0,2240	0,2120	0,4620	0,6020
6	0,0930	0,1150	0,1670	0,2130	0,1990	0,3980*	0,4990
7	0,1010	0,1210	0,1640	0,2250	0,2010	0,4780	0,6760
8	0,1110	0,1390	0,1870	0,2340	0,2010	0,4180	0,5670
9	0,1030	0,1140	0,1980	0,2280	0,1980	0,3490**	0,5560
10	0,0890	0,1070	0,1350	0,2120	0,1890	0,3980*	0,5350
RATAAN	0,0913	0,1232	0,1670	0,2338	0,2180	0,4074	0,5789

Keterangan: * = terjadi berak putih ringan

**= berak putih dengan sedikit warna hijau

tampak drastis meningkat pada hari ke 35 karena adanya rangsangan vaksin (booster) dan bakteri (ujiantang). Karena tubuh sudah siap, respon imun timbul dengan hasil peningkatan titer antibodi sampai pengamatan hari ke 42 (2 minggu pasca ujiantang).

Pada kelompok K, timbulnya respon imun kemungkinan karena booster PZ hari ke 21 tubuh beradaptasi dan hari ke 28 diberi suspensi bakteri seperti penularan alami, juga timbul respon imun alami, tapi antibodi yang terbentuk sedikit dan tidak bersifat protektif seperti kelompok P. Peningkatan titer antibodi yang terlihat pada peningkatan nilai OD Elisa Reader (Tabel 2) sesuai dengan pendapat Harlow and Savid (1988) bahwa antibodi bersifat protektif apabila peningkatan titer antibodi lebih besar tiga kali titer kontrol. Pada kelompok K, karena PZ sama dengan cairan tubuh, maka respon imun tetap rendah seperti biasa, dan pemberian suspensi bakteri pada hari ke 28 seperti infeksi alami sehingga merangsang timbulnya respon imun. Respon imun yang timbul ternyata rendah disertai gejala klinis tubuh lemah dan sedikit berak putih.

Selama pengamatan tidak terjadi kematian pada ayam, yang terjadi hanya perubahan gejala pada hari ke 35, ayam terlihat lesu, sedikit berak kapur pada 3 ekor dan satu ekor selain berak putih ada sedikit warna hijau. Tanda tersebut wajar sebagaitanda infeksi *Salmonella pullorum* (Siegmund 1994; Hagans and Bruner, 1994).

Sejalan dengan peningkatan titer antibodi ayam, gejala klinis mulai menghilang pada hari ke 42. Kemungkinan hal ini terjadi karena tubuh ayam mampu mengatasi infeksi tersebut, sehingga tidak sampai berakibat fatal.

Dari 10 ayam coba (kelompok P), 4 ekor menunjukkan gejala klinis dan 6 ekor tanpa gejala. Ini

berarti 60% ayam coba mempunyai daya protektif yang baik dan 40% terjadi gejala klinis pullorum. Menurut Andena (2002), vaksin yang baik untuk suatu peternakan adalah minimal 60% memiliki daya protektif. Ini berarti vaksin sub unit ini baik untuk dipakai dan bila dibooster lebih dari satu kali kemungkinan akan mampu menimbulkan respon imun yang baik dengan titer antibodi tinggi dan bersifat protektif.

Kesimpulan

Dari hasil dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa vaksin sub unit protein OMP bersifat imunogenik dan pemberian vaksin sub unit protein OMP mampu menimbulkan respon imun dengan titer yang cukup baik dengan daya protektif 60%. Dari penelitian ini, sub unit protein OMP bakteri *Salmonella pullorum* dapat dipakai sebagai vaksin pada ayam dan sebaiknya dibooster lebih dari satu kali

Daftar Pustaka

- Andena, 2000. Salmonellosis in Poultry. Makalah pada "Training on Breeding Farm". Malang Jawa Timur.
- Duncan, M.M. 1991. *Salmonella pullorum* Still Around After 55 Years of Eradications. Journal California Poultry Letter. February. Extension. Veterinarion. UK.
- Gast, R.K. 1997. Detecting Infection of Chicken With Recent *Salmonella pullorum* Isolate Using Standard serological Methode. USDA. Southeast Poultry Research Laboratory. Athens.
- Hagans, W. and D.W. Bruner. 1994. Infections Diseases of Domestic Animals. 7th Ed. C o m s t o c k Publishing Associated Corne University Press. Ithaca. London.

Harlow E. and L. David. 1988. Antibodies A Laboratory Manual. Cold Springs Harbor Laboratory. United State of America

Samik, W.A. 1993. Imunologi III. Cetakan Pertama. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
Siegmund, O.H. 1994. The Merck Veterinary Manual. 9th Ed. Merck and Co. Inc. Rahway. N e w Jersey. USA.