

## PRODUKSI ANTIBODI TERHADAP *Salmonella* SP ISOLAT LOKAL ASAL AYAM KAMPUNG PADA KELINCI

### *Antibody production against Salmonella sp local isolate from native chicken in Rabbit*

Darniati, Darmawi, Erina, Maryulia Dewi, Fakhurrrazi, Mahdi Abrar, Safika, Muhammad Daud

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

e-mail: [darnizain@gmail.com](mailto:darnizain@gmail.com)

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan antibodi spesifik *Salmonella* sp pada kelinci dengan menggunakan bakteri isolat lokal dari ayam kampung. Kelinci diinjeksi dengan antigen *Salmonella* untuk menghasilkan serum positif. Antibodi yang dihasilkan diuji spesifitasnya dengan menggunakan metode *Agar Gel Precipitation Test* (AGPT). Tidak ada reaksi presipitasi yang terjadi pada serum yang dipanen pada hari ke tujuh. Garis presipitasi terbentuk dalam jumlah yang cukup tinggi pada serum yang dipanen pada hari ke 14 pasca immunisasi. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa, *Salmonella* sp isolat lokal dari ayam kampung dapat menginduksi pembentukan antibodi spesifik pada kelinci, dan isolat ini dapat menjadi salah satu kandidat vaksin untuk mengontrol infeksi *Salmonella* di lapangan.

Kata kunci: Antibodi, *Salmonella* sp., AGPT

#### ABSTRACT

*This study carried out to produce specific antibody in rabbit to Salmonella sp local isolate from native chicken. Rabbits were injected with the antigen to produce positive serum. Antibody were tested the specificity with Agar Gel Precipitation Test (AGPT). No bands of precipitation reaction in AGP test with seven days rabbit serum. The precipitation detected in fourteen days rabbit serum and showed high spesify. It is concluded that, the Salmonella sp local isolate from native chicken can induce specific antibody in rabbit, and this isolate can be used as a vaccine candidate to control Salmonella infection in field.*

*Key words: antibody, Salmonella sp, AGPT*

#### PENDAHULUAN

*Salmonella* merupakan bakteri yang sangat umum menginfeksi di daerah-daerah dengan tingkat sanitasi dan kebersihan lingkungan yang rendah. Pada umumnya infeksi *Salmonella* terjadi setelah mengkonsumsi makanan dan minuman yang terkontaminasi oleh bakteri tersebut. Salmonellosis adalah penyakit menular yang menyerang hewan dan manusia, yang disebabkan oleh *Salmonella*. Salmonellosis merupakan penyakit zoonosis, dan bersifat *food borne disease* karena dapat menular dari hewan ke manusia atau sebaliknya serta penularannya dapat terjadi melalui makanan dan minuman (Quinlan, 2013).

Hampir semua hewan rentan terhadap salmonellosis terutama ayam dan babi. Derajat kerentanan tergantung pada umur, kondisi tubuh induk semang serta keseimbangan flora dalam tubuh (karena pengobatan antibiotika terus menerus). Cara penularan salmonellosis terutama terjadi melalui saluran pencernaan yaitu akibat

mengonsumsi bahan makanan yang tercemari bakteri *Salmonella* (Dirjen Peternakan 1982).

Saat ini, pencegahan salmonellosis pada ayam dan juga pada hewan lain di Indonesia masih dilakukan melalui pengobatan dan desinfektan untuk mengurangi tingkat infeksi. Penerapan pencegahan dengan menggunakan vaksin masih jarang dilakukan. Vaksinasi terhadap *Salmonella* pada ayam dapat menurunkan tingkat kolonisasi bakteri dalam usus dan pengeluaran bakteri dalam feses (Faberwee *et al.*, 2000 dan Babu *et al.*, 2004).

Untuk melihat titer antibodi dalam serum, dapat dilakukan dengan berbagai cara. Salah satu teknik yang sering digunakan adalah *Agar Gel Precipitation Test* (AGPT). Uji ini dilakukan untuk melihat ikatan kompleks antara antigen terlarut dan antibodi pada agar gel. Ikatan ini akan terjadi jika menggunakan antibodi yang homolog. Antibodi homolog yang dirangkaikan dengan antigen terlarut dengan kondisi tepat akan membentuk kompleks, dan

pada konsentrasi yang setimbang, campuran tersebut akan menjadi keruh dan membentuk presipitat (Tizard, 2004).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri *Salmonella* isolat lokal dari ayam kampung dalam menginduksi kekebalan yang protektif. Penelitian ini dapat bermanfaat untuk mengembangkan vaksin terhadap *Salmonella* sp dengan isolat lokal dan meningkatkan immunitas ternak dengan antigen yang bersirkulasi di lapangan.

## MATERI DAN METODE

### Kelinci percobaan

Kelinci sebagai hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini. Sebanyak dua ekor, berumur 6 bulan dengan bobot badan masing-masing 1 kg. Lima hari sebelum imunisasi aktif, kelinci dipastikan bebas dari koksidiosis dan scabies. Kelinci dipelihara secara individual dalam kandang dan diberi pakan berupa pelet serta sayuran (wortel dan kangkung).

### Bakteri *Salmonella* sp

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bakteri isolat lokal yang berasal dari ayam kampung. Vaksinasi pada hewan coba dilakukan dengan menyuntikkan protein aktif *whole cell* bakteri. Bakteri biakan murni dikultur pada media cair dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Biakan bakteri disentrifus pada kecepatan 8000g selama 10 menit. Pellet yang diperoleh kemudian dicuci sebanyak tiga kali dan diencerkan dengan NaCl fisiologis kemudian distandarkan dengan Mc Farland 2 atau setara dengan  $10^{10}$  sel hidup/ml suspensi.

### Immunisasi dan Pengumpulan Serum

Immunisasi pertama pada kelinci dilakukan secara *sub cutan* (SC) dengan dosis antigen yang diberikan adalah 2 ml/ekor. Imunisasi kedua diberikan seminggu kemudian dengan rute *sub cutan* (SC).

Pengumpulan serum dilakukan dengan mengambil darah kelinci sebanyak 1,5-2 ml

melalui vena auricularis dengan menggunakan *disposable syringe* 3 ml. Pengambilan darah pertama dilakukan seminggu setelah vaksinasi dan pengambilan darah kedua dilakukan dua minggu setelah vaksinasi. Sampel darah dimasukkan dalam tabung dan diinkubasikan pada suhu ruang dengan posisi miring selama 30 menit. Kemudian disimpan dalam *refrigerator* pada suhu 4° C selama 24 jam. Serum yang diperoleh dimasukkan ke dalam *mikrotube* 1.5 ml.

### Preparasi Antigen Terlarut

Isolat bakteri yang telah tumbuh pada media nutrient cair disentrifus dengan kecepatan 10.000rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dua kali dengan 5 ml NaCl fisiologis. Pelet yang terkumpul ditambahkan dengan 0.5 ml HCL 0.2 N, kemudian dimasukkan dalam waterbath pada suhu 52° C selama 1 jam. Satu tetes *phenol red* ditambahkan sebagai indikator. Suspensi disentrifus dengan kecepatan 10.000rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan digunakan sebagai antigen terlarut dan disimpan pada suhu 4° C (Wibawan *et al.* 2004).

### Agar Gel Precipitation Test (AGPT)

*Agar Gel Precipitation Test* (AGPT) merupakan uji presipitasi antigen terlarut. Uji presipitasi dalam penelitian ini menggunakan metode yang dilakukan oleh Wood *et al.* (1979) dan Castello (1987) dalam Okwor *et al.* (2011). Bahan untuk AGPT terdiri atas Phosphate Buffer Saline (PBS) dengan pH 7,4, aquades, agarose 1%, dan Na azide 0,001%. Campuran tersebut dipanaskan dengan *hot plate* sampai agar larut dan mendidih. Larutan Agar gel kemudian dituang sebanyak 5 ml di atas gelas objek hingga seluruh permukaan gelas objek tertutup dan dibiarkan hingga mengeras. Agar gel yang telah mengeras, dilubangi menggunakan *gel puncher*. Lubang pada bagian tengah diisi dengan antigen dan enam lubang disekelilingnya diisi dengan serum antibodi dari kelinci (Wibawan, 2009). Agar disimpan dalam

wadah tertutup yang telah dialasi tissue basah untuk menjaga kelembaban dan diinkubasikan selama 24 hingga 48 jam pada suhu ruang.

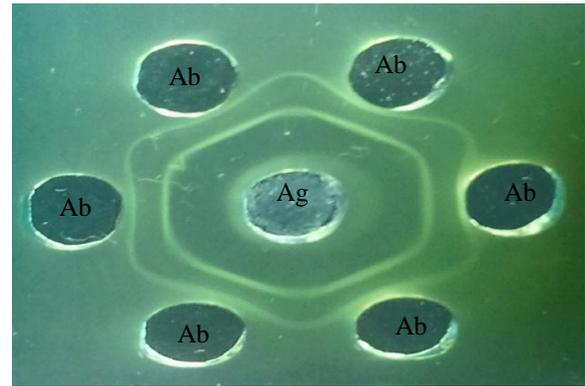
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Immunisasi yang diberikan pada kelinci adalah protein *whole cell* dari bakteri *Salmonella* sp secara sub cutan. Serum kelinci dipanen tujuh hari dan 14 hari setelah dua kali vaksinasi dengan antigen *whole cell Salmonella* sp. Serum diperiksa keberadaan antibodi dengan AGPT. Hasil AGPT serum kelinci pada tujuh hari pertama menunjukkan reaksi negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya garis presipitasi antara Antigen dan antibodi. Garis presipitasi baru terbentuk pada serum yang dipanen pada hari ke 14 pasca vaksinasi (Gambar). Hal ini menunjukkan bahwa pada hari ke-14, di dalam tubuh kelinci telah terbentuk antibodi homolog terhadap bakteri *Salmonella* yang diimmunisasi.

Natih *et al.* (2010) menyatakan, antibodi serum adalah antibodi poliklonal karena antibodi ini dihasilkan oleh turunan dari beberapa sel B yang mengenali epitop berbeda pada antigen yang sama. Antibodi poliklonal dihasilkan dengan cara menyuntikkan antigen ke dalam tubuh hewan lalu memurnikan antibodi dari serum darah. Antibodi ini umumnya bereaksi dengan banyak epitop.

Penyuntikan hewan dengan vaksin yang ideal dapat membentuk imunitas aktif yang akan melindungi dan mengurangi tingkat mortalitas akibat infeksi pathogen (Van Immerseel *et al.*, 2005). Imunitas aktif didapatkan melalui imunisasi dimana tubuh aktif membentuk kekebalan dan bertahan lama dalam tubuh. Vaksin mengandung organisme yang telah mati atau dilemahkan. Vaksin akan merangsang sistem imun untuk membentuk antibodi terhadap mikroorganisme tertentu dan selama proses tersebut berlangsung, sistem imun membentuk sel memori terhadap paparan mikroorganisme. Antibodi akan terbentuk

lebih banyak apabila ada paparan ulangan (Coleman, 1996)



Gambar. Presipitasi identik yang terjadi antara antigen dan antibodi homolog yang dipanen pada hari ke 14.

Pengulangan vaksinasi pada kelinci dilakukan sebanyak 2 kali untuk membentuk kondisi hiperimun sehingga kelinci akan menghasilkan antibodi dengan titer yang cukup tinggi. Vaksinasi pertama dilakukan untuk memperkenalkan antigen pada sistem imun sedangkan vaksinasi kedua dilakukan sebagai pengulangan supaya imunitasnya meningkat (Rantam, 2005)

Titer antibodi yang tertinggi dicapai dua minggu setelah vaksinasi ke dua. Pembentukan antibodi dipengaruhi beberapa faktor, yaitu: imunogenesitas, kualitas, bentuk kelarutan stimulan, spesies hewan, rute imunisasi, dan sensitivitas assay (Bellanti 1993). Vaksin akan merangsang sistem imun untuk membentuk antibodi terhadap mikroorganisme tertentu secara spesifik dan akan membentuk sel memori terhadap paparan mikroorganisme tersebut. Antibodi spesifik akan terbentuk lebih banyak apabila terjadi paparan ulangan dengan antigen yang sama (Coleman 1996).

AGPT dilakukan untuk melihat reaksi pengendapan antigen oleh antibodi spesifik. Pengendapan antigen oleh antibodi ini diperlihatkan oleh adanya garis presipitasi pada media agar gel. Jika sediaan antibodi tidak homolog dengan antigen maka tidak akan terbentuk garis presipitasi (Natih *et al.*, 2010). Teknik *Agar Gel Precipitation Test* (AGPT) merupakan salah

satu teknik immunodifusi yang bertujuan untuk menetapkan atau menganalisis antigen maupun antibodi secara kualitatif dan kuantitatif. Antigen yang dimasukkan ke dalam sumur di bagian tengah akan berdifusi ke daerah sekitarnya, hal yang sama juga terjadi pada antibodi yang diletakkan pada sumur di sekeliling antigen. Antibodi akan berdifusi melalui gel hingga bertemu dengan antigen terlarut. Jika antibodi dan antigen bersifat homolog maka akan terbentuk garis presipitasi antara antigen-antibodi (Wibawan et al. 2009).

Konsentrasi antigen dan antibodi merupakan faktor penting dalam uji presipitasi. ketika rasio antara antigen dan antibodi seimbang, maka akan terbentuk ikatan silang yang ekstensif dan terjadi pembentukan kisi-kisi. Kisi-kisi ini kemudian menjadi besar, tidak larut dan akhirnya mengendap. Kompleks antigen-antibodi yang mengendap akan terlihat sebagai garis berwarna putih yang disebut garis presipitasi (Tizard, 2004). Kondisi antigen berlebihan akan mengakibatkan melarutnya kembali kompleks yang terbentuk, sedangkan antibodi yang seimbang mengakibatkan kompleks antigen-antibodi tetap ada dalam larutan. Wibawan et al. (2009) menyatakan bahwa reaksi presipitasi terjadi apabila titer immunoglobulin berada pada titer di atas  $2^7$  sehingga teknik ini dipilih karena nilai positif pada AGPT mencerminkan kandungan antibodi yang cukup besar di dalam serum.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil AGPT ini membuktikan bahwa *Salmonella* sp isolat lokal mampu menginduksi pembentukan antibodi dalam jumlah yang cukup tinggi pada minggu ke dua setelah dilakukan vaksinasi. Bakteri isolat lokal ini dapat dijadikan salah satu kandidat vaksin untuk mengendalikan infeksi *Salmonella* di lingkungan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Babu U, Dalloul RA, Okamura M, Lillehoj HS, Wie H, Raybourne RB, Gaines D, Hekert RA. 2004. *Salmonella* enteritidis Clearance and Immune Response in Chickens Following *Salmonella* Vaccination and Challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 101(3- 4): 251-257.
- Bellanti JA. 1993. **Imunologi III**. Terjemahan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Coleman, P. G. and C. Dye. 1996. Immunization coverage required to prevent outbreaks of dog rabies. **Vaccine** 14: 185-186.
- Dirjen Peternakan. 1982. **Pedoman Pengendalian Penyakit Menular**. Jilid IV. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Feberwee A, Hartman EG, De Wit JJ, De Vries TS. 2001. The spread of *Salmonella* gallinarum 9R vaccine strain under field conditions. **Avian Diseases**. 45:1024-1029.
- Gast RK, Stone HD, Holt PS. 1993. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella* Enteritidis by laying hens. **Avian Disease**. 1993; 37:1085-91.
- Mustopa Z. 2004. Peran Immunoglobulin Y (IgY) sebagai Anti Adhesi dan Oponin untuk Pencegahan serangan *Escherichia coli* Enteropatogenik (EPEC) K1. 1. [Tesis]. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Natih et al. 2010. Preparasi Immunoglobulin G Kelinci sebagai Antigen Penginduksi Antibodi Spesifik Terhadap Virus Avian Influenza H5N1 Strain Legok. **Jurnal Veteriner**. 11 (2): 99-106.
- Okwor, EC. D.C. EZe, K.E. Okonwo, and J.O. Ibu. 2011. Comparative evaluation of agar gel precipitation test (AGPT) and indirect haemagglutination test (IHA) for the detection of antibodies against infectious bursal disease (IBD) virus in village chickens. **African Journal Of Biotechnology**. 10(71):16024-16027.
- Quinlan, J.J. 2013. Foodborne Illness Incidence Rates and Food Safety Risks for Populations of Low Socioeconomic Status and Minority Race/Ethnicity: A Review of the Literature. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. 10:3634-3652.
- Rantam FA. 2005. **Metode Immunologi**. Airlangga University Press. Surabaya.
- Tizard, I. 2004. **Veterinary Immunology**. An Introduction. 7<sup>th</sup>. ed. W.B. Saunders Company.
- Van Immersel F, Methner U, Rvchlik I, Velge P, Martin G, Foster N, Ducatelle R, Barrow PA. Vaccination and early protection against host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate and microbial activity. **Epidemiology and Infection**. 2005; 33:959-978.
- Wibawan, IWT, Djannatun T, dan Halimah LS. 2004. Pengujian Teknik Koagulasinya Tidak Langsung Untuk Deteksi Penyakit Unggas. Laporan Hibah Bersaing XI 2003-2004.
- Wibawan, IWT., S. Murtini, RD. Soejoedono, IGKN. Mahardika. 2009. **Jurnal Veteriner**. 10 (3):118-124.