



## BAB III

### BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2008 - September 2009.

Penelitian dilakukan di Kandang Hewan Laboratorium Ruminansia Besar Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Laboratorium Terpadu FKH B Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet FKH IPB.

#### 2. Bahan dan Alat

Hewan coba yang digunakan adalah induk sapi Friesian Holstein (FH) bunting trimester akhir sebanyak enam ekor. Induk sapi yang digunakan dipilih yang sehat secara klinis, dan berada pada laktasi kedua sampai dengan ketiga. Induk sapi berasal dari Kawasan Usaha Peternakan Sapi Perah (KUNAK) di Cibungbulang Bogor.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah vaksin *E.coli* polivalen inaktif, larutan buffer karbonat bikarbonat pH 9,6, larutan *phosphate buffer saline* (PBS), larutan 0,05% *Phosphate Buffer Saline Tween-20* (PBST), larutan PBS skim 5%, konjugat *rabbit anti bovine IgG peroxidase* (Cat. No. A-5295, Sigma Chemical Co), substrat ABTS (2,2'-azino-di [3-ethyl-benzothiazoline sulfonate]).

Alat-alat yang digunakan adalah lemari pendingin, *freezer*, penangas air, tabung mikro, pipet mikro, cawan polysterene 96 sumuran (Nunc<sup>(R)</sup>), *aluminium foil*, inkubator, dan alat pembaca mikro-ELISA.

#### 3. Metode Penelitian

##### 3.1 Pemeliharaan hewan coba

Induk sapi bunting dipelihara sejak masa kering kandang sampai melahirkan. Selama percobaan berlangsung induk sapi diberi pakan dua kali



sehari pada pagi dan sore hari dengan pakan hijauan, konsentrat dan ampas tahu. Air minum diberikan secara *ad libitum*.

### 3.3.2 Vaksinasi

Vaksin yang digunakan pada penelitian ini adalah vaksin *E. coli* polivalen yang berisi sel bakteri *enterotoxigenic E. coli* K99, F41 dengan K99 dan F41 (serogroup O9, 101), formalin 0,02%, dan alhidrogel 1,5%, F41 inaktif yang emulsikan ke dalam alhidrogel. Vaksinasi dilakukan terhadap induk sapi sebanyak 3 kali yaitu pada 8, 6, dan 4 minggu sebelum induk sapi diperkirakan melahirkan. Vaksinasi dilakukan secara intramuskular dengan dosis 5 ml/ ekor.

### 3.3 Pengambilan dan penyimpanan kolostrum

Kolostrum yang digunakan pada penelitian ini adalah kolostrum yang berasal dari induk sapi yang divaksin ( $n=6$ ) dan induk sapi yang tidak divaksin (kontrol;  $n=6$ ). Koleksi kolostrum dilakukan segera setelah induk sapi melahirkan sampai dengan lima hari setelah induk melahirkan. Kolostrum kemudian disimpan dalam sebuah wadah plastik dan diberi label dan dimasukkan ke dalam freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) sampai analisis dilakukan.

### 3.3.4 Deteksi antibodi anti-*E. coli* K99 dalam kolostrum dengan ELISA

Antigen K99 diencerkan dalam larutan buffer karbonat bikarbonat pH 9,6 dengan perbandingan 1:5000. Sumuran-sumuran cawan ELISA kemudian dilapisi dengan antigen tersebut sebanyak 100  $\mu\text{l}$ / sumur (*coating*) menggunakan pipet mikro, kemudian cawan dibungkus dengan aluminium foil, lalu diinkubasi semalam pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ .

Sumuran-sumuran cawan ELISA dicuci dengan 0,05% PBST sebanyak tiga kali setelah diinkubasi selama semalam, dan dimasukkan 100  $\mu\text{l}$  PBS Skim 5% ke dalam sumuran-sumuran cawan ELISA (*blocking*). Cawan dibungkus seperti sebelumnya dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam. Cawan ELISA selanjutnya dicuci kembali tiga kali sesuai dengan prosedur di atas.



Sumur cawan nomor 1 dan 2 dari baris A diisi dengan 100 µl PBS sebagai kontrol negatif. Sumuran nomor 1 dan 2 dari baris B sampai G diisi dengan 100 µl sampel kolostrum sapi untuk menentukan nilai *cut off*. Sumur yang lain masing-masing diisi dengan 100 µl sampel kolostrum yang akan di uji. Setiap sampel kolostrum diperiksa dua kali (duplo). Cawan ELISA diinkubasi lagi dalam suhu 37<sup>0</sup>C selama satu jam lalu dilakukan pencucian seperti diatas.

Sebanyak 100 µl suspensi konjugat *rabbit anti-bovine IgG peroxidase* konsentrasi 1:10000 dimasukkan ke dalam setiap sumur sebelum diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama satu jam. Cawan ELISA dicuci lagi tiga kali dengan PBST dan sebanyak 100 µl substrat ABTS dimasukkan ke dalam setiap sumur. Cawan ELISA kemudian dinkubasikan ke dalam ruangan gelap pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 10 menit sampai ada perubahan warna. Hasil reaksi di ukur dengan alat pembaca ELISA pada panjang gelombang 405 nm, berupa kerapatan optik (*Optical density*) dalam bentuk nilai absorbansi.

### 3.5. Pengukuran konsentrasi IgG total dalam kolostrum dengan ELISA

Anti-IgG sapi (*anti-bovine IgG*) diencerkan dengan larutan buffer karbonat bikarbonat pH 9,6 dengan perbandingan 1:10000. Sumuran-sumuran cawan ELISA kemudian dilapisi dengan anti-IgG tersebut sebanyak 100 µl/ sumur (*coating*). Plate kemudian dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi semalam pada suhu 4<sup>0</sup>C.

Sumuran-sumuran cawan ELISA dicuci dengan 0,5% PBST sebanyak tiga kali setelah diinkubasi selama semalam, dan dimasukkan 100 µl PBS Skim 5% ke dalam sumuran-sumuran cawan ELISA (*blocking*). Cawan dibungkus seperti sebelumnya dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 1 jam. Cawan ELISA selanjutnya dicuci kembali tiga kali sesuai dengan prosedur di atas.

Sumuran cawan nomor 1 dan 2 dari baris A diisi dengan 100 µl PBS sebagai kontrol negatif. Sumuran nomor 1 dan 2 dari baris B sampai G diisi dengan 100 µl IgG sapi dengan konsentrasi 1, 0,5, 0,125, 0,0625, 0,0312 yang digunakan sebagai standar. Sumur yang lain masing-masing diisi dengan 100 µl sampel kolostrum yang akan di uji. Setiap sampel kolostrum diperiksa dua kali (duplo).

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Cawan ELISA diinkubasi lagi dalam suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama satu jam lalu dilakukan pencucian seperti diatas.

Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  suspensi konjugat *rabbit anti-bovine IgG peroxidase* konsentrasi 1:10000 dimasukkan ke dalam setiap sumur sebelum diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama satu jam. Cawan ELISA dicuci lagi tiga kali dengan PBST dan sebanyak 100  $\mu\text{l}$  substrat ABTS dimasukkan ke dalam setiap sumur. Cawan ELISA kemudian diinkubasikan ke dalam ruangan gelap pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit sampai ada perubahan warna. Hasil reaksi di ukur dengan alat pembaca ELISA pada panjang gelombang 405 nm, berupa kerapatan optik (*Optical density*) dalam bentuk nilai absorbansi. Berdasarkan nilai absorbansi standar hitung konsentrasi IgG total dalam kolostrum menggunakan persamaan regresi linear, dengan nilai absorbansi sebagai Y dan X sebagai konsentrasi.

#### 4. Analisis data

Analisis hasil diamati secara deskriptif ` menggunakan Tabel dan Gambar yang menyajikan nilai absorbansi dari setiap sampel kolostrum yang diperiksa.

#### Hak Cipta Diliindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.