

PENGGUNAAN NATRIUM PIRUVAT DAN NATRIUM HIDROKSIDA UNTUK MENINGKATKAN JUMLAH KOLONI DAN PANENAN ANTIGEN BEWARNA *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*

SOERIPTO

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 21 Februari 1997)

ABSTRACT

SOERIPTO, 1997. The use of sodium pyruvate and sodium hydroxide to increase the number of colonies and coloured antigen yield of *Mycoplasma gallisepticum*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2 (3): 204-207.

A trial to increase the number of colonies and coloured antigen yield of *Mycoplasma gallisepticum* in mycoplasma broth medium was conducted by comparing the use of normal medium, medium with sodium pyruvate and medium with sodium hydroxide. The result showed that medium with sodium pyruvate had increased the number of colonies and antigen yield and was highly significant different ($P < 0.01$) compared to both normal medium and medium with sodium hydroxide. Medium with sodium hydroxide produced the number of colonies and antigen yield lower than medium with sodium pyruvate, but higher and was highly significant different ($P < 0.01$) compared to the normal medium.

Key words: Sodium pyruvate, sodium hydroxide, *Mycoplasma gallisepticum* antigen

ABSTRAK

SOERIPTO, 1997. Penggunaan natrium piruvat dan natrium hidroksida untuk meningkatkan jumlah koloni dan panen antigen berwarna *Mycoplasma gallisepticum*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2 (3): 204-207.

Suatu percobaan untuk meningkatkan jumlah koloni dan panen antigen berwarna *Mycoplasma gallisepticum* pada medium cair mikoplasma telah dilakukan dengan membandingkan penggunaan antara medium biasa, medium yang diberi natrium piruvat dan medium yang diberi natrium hidroksida. Hasil penelitian menunjukkan bahwa medium yang diberi natrium piruvat dapat meningkatkan jumlah koloni dan panen antigen yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dengan medium yang diberi natrium hidroksida dan medium biasa. Medium yang diberi natrium hidroksida menghasilkan jumlah koloni dan panen antigen yang lebih rendah daripada medium yang diberi natrium piruvat, tetapi lebih tinggi dan berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dengan medium biasa.

Kata kunci: Natrium piruvat, natrium hidroksida, antigen *Mycoplasma gallisepticum*

PENDAHULUAN

Salah satu perangkat untuk mendiagnosis penyakit pernapasan menahun (PPM) atau *chronic respiratory disease* (CRD) pada ayam yang disebabkan oleh kuman *Mycoplasma gallisepticum* (MG) secara cepat adalah dengan uji aglutinasi cepat yang menggunakan antigen berwarna MG.

Pembuatan antigen berwarna MG di Indonesia pernah dilaporkan oleh SRI POERNOMO *et al.* (1985). Modifikasi pembuatan antigen berwarna MG telah dilakukan oleh SOERIPTO (tidak dipublikasi) yang hasilnya tidak berbeda dengan antigen MG Nobilis buatan Intervet.

Kebutuhan akan antigen berwarna MG semakin lama semakin meningkat sejalan dengan meningkatnya populasi ayam baik ayam petelur, pedaging maupun buras yang secara nasional meningkat dengan tajam. Bersamaan dengan itu pula tanpa pengelolaan ayam dengan baik, maka PPM makin sulit dikendalikan.

Natrium piruvat dan asam laktat pernah digunakan untuk meningkatkan jumlah panen-an antigen (*yield*) beberapa *Mycoplasma* spp. pada ruminansia seperti *M. mycoides* var *mycoides*, *M. agalactiae*, *M. arginini* dan *M. mycoides* var *capri* (MILES *et al.*, 1988). Hasilnya memperlihatkan bahwa piruvat dapat meningkatkan jumlah panen antigen sekalipun hasilnya tidak berbeda nyata dengan medium tanpa piruvat, sedangkan asam laktat tidak memberikan peningkatan pertumbuhan.

Tujuan tulisan ini adalah untuk membandingkan hasil panen pembuatan antigen berwarna MG yang sangat dibutuhkan oleh peternak ayam antara MG yang ditumbuhkan pada medium mikoplasma cair biasa, medium mikoplasma cair yang diberi natrium hidroksida setelah biakan berubah warna dan medium mikoplasma cair yang diberi natrium piruvat.

MATERI DAN METODE

Isolat

Isolat MG galur S6 yang diperoleh dari Townsville, Australia tahun 1988 digunakan untuk pembuatan antigen berwarna.

Bahan kimia

Sebanyak 10 g natrium piruvat (Merck) dilarutkan dalam 10 ml aquabides, kemudian disaring dengan filter Millipore steril dengan ukuran 0,22 μ m. Larutan ini digunakan untuk 1 l medium cair.

Sebanyak 20 g natrium hidroksida (Merck) dilarutkan dalam 100 ml aquades (larutan 5M NaOH). Larutan ini digunakan untuk menaikkan pH biakan MG yang sudah berubah warna menjadi merah kekuningan (pH 6,8) dengan jalan ditetaskan sampai warna berubah kembali menjadi merah seperti semula (pH 7,8).

Medium

Medium mikoplasma yang digunakan adalah modifikasi medium yang diformulasikan oleh FREY *et al.* (1968). Medium cair terdiri dari *Mycoplasma broth base* (Gibco), sistein HCl (BDH), thallos aasetat (BDH), merah phenol (Chroma) dan aquabides. Derajat kebasahan medium diatur mencapai pH 7,8. Medium ini kemudian disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didinginkan pada suhu kamar untuk medium cair, sedangkan untuk medium padat dibiarkan di dalam penangas air dengan suhu 50°C. Setelah itu, medium diberi penyubur yang terdiri dari serum babi yang diinaktifkan lebih dahulu pada suhu 56°C selama 30 menit, *yeast extract* (Difco), DNA (Koch-Light), glukosa (May dan Baker) dan *amoxycillin* (Beecham P. I.). Medium padat komposisinya hampir sama dengan medium cair kecuali glukosa dan merah phenol tidak ditambahkan. Agar yang digunakan untuk medium padat adalah agar Noble (Difco). Untuk mencegah kontaminasi cendawan, medium diberi *actidione* (Up-John).

Medium yang diperbandingkan adalah:

1. Medium mikoplasma cair biasa.
2. Medium cair yang diberi natrium hidroksida setelah terjadi perubahan warna biakan.
3. Medium cair yang mengandung 1% natrium piruvat.

Analisis statistik

Hasil panen jumlah antigen dan jumlah koloni yang diperoleh dari masing-masing medium diolah dengan *analysis of variance* (ANOVA).

Cara kerja

Biakan kuman MG S6 dari freezer -20°C dicairkan pada penangas air dengan suhu 37°C. Segera setelah mencair, biakan ditumbuhkan pada medium padat, diletakkan dalam kaleng kedap udara yang diberi air dan nyala lilin, ditutup kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.

Setelah koloni mikoplasma tumbuh, kemudian diklon 3 kali agar kuman yang diperoleh tidak terkontaminasi dengan bakteri lain.

Koloni yang sudah dimurnikan kemudian ditumbuhkan secara bertingkat di dalam 3 tabung Erlenmeyer yang berisi medium mikoplasma cair sampai volume akhir mencapai 300 ml, yaitu 2 tabung berisi medium mikoplasma cair biasa dan 1 tabung berisi medium mikoplasma cair yang diberi natrium piruvat. Biakan diinkubasikan pada suhu 37°C sampai warna indikator merah phenol berubah dari merah menjadi merah kekuningan (pH 6,8). Satu tabung yang berisi medium biakan MG pada medium mikoplasma cair biasa yang sudah berubah warna menjadi merah kekuningan ditetesi dengan natrium hidroksida sampai warna indikator berubah kembali menjadi merah (pH 7,8). Kemudian biakan ini diinkubasikan kembali di dalam inkubator dengan suhu 37°C sampai warna indikator berubah menjadi merah kekuningan lagi (pH 6,8). Ulangan pertumbuhan dilakukan sebanyak 5 kali sehingga masing-masing medium membutuhkan volume sebanyak 5 x 300 ml.

Setiap biakan yang telah berubah warna dihitung dahulu jumlah koloni yang tumbuh dengan menggunakan medium padat, kemudian dibunuh dengan 0,1% formalin sambil dikocok. Setelah dibunuh kemudian disimpan dalam kamar pendingin selama satu malam.

Keesokan harinya, biakan yang sudah dibunuh dicuci dengan larutan *phosphate buffered saline* (PBS) sebanyak 3 kali dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit.

Pellet (sedimen) yang diperoleh dibuat suspensi dengan menambahkan 5 ml PBS (stok antigen).

Kekeruhan suspensi diukur dengan 2 x standar McFarland no.10 dengan menggunakan panjang gelombang 546 nanometer.

Setelah diketahui kekeruhannya, maka volume antigen yang diperoleh dihitung dengan metode sebagai berikut:

$$V = a/b \times vk$$

V = volume akhir dari antigen yang diperoleh

a = hasil pembacaan kekeruhan biakan

b = hasil pembacaan kekeruhan 2 x standar McFarland no.10

vk = volume stok antigen

Untuk pewarna antigen digunakan larutan 3% gentiana ungu sebanyak 1% dari volume akhir yang diperoleh (V).

Untuk menghindari kontaminasi cendawan digunakan larutan 1% mertiolat sebanyak 1% dari volume akhir yang diperoleh (V).

Jumlah volume akhir antigen diperoleh dengan penambahan PBS.

Sebelum digunakan, antigen disimpan dalam kamar pendingin dengan suhu 4°C paling cepat selama 14 hari.

HASIL DAN PEMBAHASAN

MG merupakan prokariota yang sangat kecil dan tidak memiliki dinding sel, tetapi pada bagian luar sel dilapisi oleh sebuah membran plasma (RAZIN and FREUNDT, 1984). Bentuk sel bervariasi, ada yang *coccoid*, *ovoid* atau seperti buah *pear*, tetapi pada umumnya berbentuk *coccoid* dengan ukuran penampang sebesar 0,20-0,50 μm (RAZIN and FREUNDT, 1984; YODER, 1991). MG tidak mudah diisolasi karena dalam pertumbuhannya membutuhkan medium yang kompleks yang diperkaya dengan serum babi, kuda atau ayam sebanyak 10-20%, *yeast extract* dan glukosa dengan pH medium 7,8 untuk pertumbuhan optimal.

Untuk pertumbuhan mikoplasma pada medium cair MG membutuhkan glukosa sebagai sumber energi (RAZIN dan FREUNDT, 1984; YODER, 1991). Sekalipun belum jelas mengenai fungsi piruvat, MILES *et al.* (1988) telah melakukan observasi secara empiris bahwa beberapa *Mycoplasma* spp. pada ruminansia dapat mengoksidasi asam piruvat dan laktat. Kondisi ini menyarankan bahwa asam piruvat dan laktat dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan mikoplasma. Dari hasil penelitiannya diperoleh kesimpulan bahwa asam piruvat mempunyai kemampuan menaikkan jumlah antigen *Mycoplasma* spp., sekalipun tidak berbeda nyata dengan medium biasa. BUDAVARI *et al.* (1996) juga menyatakan bahwa piruvat merupakan enzim yang diperoleh dari tanaman, kapang atau bakteri yang dapat digunakan sebagai perantara dalam fermentasi gula dan degadasi enzimatik karbohidrat.

Natrium hidroksida (NaOH) merupakan bahan kimia yang bersifat basa yang dapat digunakan untuk menetralkan larutan yang bersifat asam. Kuman MG yang diinokulasi dalam medium cair yang sudah berubah warna menjadi merah kekuningan juga sudah bersifat asam (pH biakan di bawah 7,0). Hasil perubahan warna dapat dianalisis bahwa kemungkinan pertama semua nutrisi sudah dimanfaatkan atau kemungkinan kedua belum dimanfaatkan secara optimal. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa penambahan natrium hidroksida pada biakan yang sudah berubah warna dapat meningkatkan jumlah panen antigen sebesar 22,5% dan jumlah koloni sebesar 55,8% dari medium mikoplasma biasa yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dengan

hasil yang diperoleh dari medium mikoplasma cair biasa (Tabel 1 dan 2).

Hasil ini menunjukkan bahwa pada kondisi biasa tanpa penambahan natrium hidroksida jumlah nutrisi ada dalam medium belum dimanfaatkan secara optimal untuk pertumbuhan MG, sedangkan penambahan natrium piruvat memperlihatkan hasil yang tertinggi dan berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dengan hasil dari kedua medium lainnya (Tabel 1 dan 2).

Tabel 1. Jumlah antigen MG yang diperoleh dalam medium cair (MC)

No	Jenis medium	Hasil panen antigen (ml)
1.	MC biasa	10,18a
2.	MC + natrium hidroksida	12,19b
3.	MC + natrium piruvat	17,08c

$P < 0,01$

Tabel 2. Jumlah koloni MG yang diperoleh dalam medium cair (MC)

No.	Jenis medium	Jumlah koloni cfu/ml
1.	MC biasa	$1,73 \times 10^8$ a
2.	MC + natrium hidroksida	$1,14 \times 10^9$ b
3.	MC + natrium piruvat	$1,87 \times 10^9$ c

$P < 0,01$

Hasil ini sejalan dengan penemuan MILES *et al.* (1988) yang menunjukkan bahwa natrium piruvat dapat digunakan sebagai sumber energi untuk meningkatkan pertumbuhan mikoplasma.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa medium dengan natrium hidroksida memberi hasil pertumbuhan koloni dan jumlah panen antigen yang lebih tinggi dan berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dengan medium biasa, sedangkan medium dengan natrium piruvat merupakan sumber energi yang dapat digunakan untuk meningkatkan jumlah koloni dan jumlah antigen MG dan memberikan hasil yang tertinggi dibandingkan dengan kedua medium lainnya. Sekalipun demikian, karena harga natrium piruvat cukup mahal dan tidak mudah didapat, sedangkan harga natrium hidroksida relatif cukup murah dan mudah didapat, maka alternatif pemberian natrium hidroksida untuk meningkatkan pertumbuhan dan jumlah antigen lebih disarankan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Zulkoyah Layla yang telah membantu pekerjaan laboratorium dan Sdr. Zainal Arifin yang telah membantu menganalisis data penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- BUDAVARI, S., M.J. O'NEIL, A. SMITH, P. E. HECKELMAN, and J.F. KINNEARY (Eds). 1996. *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*. 12th ed. The Merck Index, Research Laboratories Division of Merck and Co. Inc. Whitehouse Station, N.J. USA.
- FREY, M.C., R.P. HANSON, and D.P. HENDERSON. 1968. A medium for the isolation of avian mycoplasma. *Am. J. Vet. Res.* 29: 2164 - 171.
- MILES, R.J., B.J. WARDHER, C.L. HENDERSON, and K. MOHAN. 1988. Increased growth yields of *Mycoplasma* spp. in the presence of pyruvate. *Letters in Appl. Microbiol.* 7: 149 - 151
- RAZIN, S. and E.A. FREUNDT. 1984. The Mycoplasmas. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Ed. by N.L. Krieg and J.G. Holt. Williams and Wilkins. Baltimore/London. pp.740 - 793.
- SRI POERNOMO, S. HARDJOUTOMO, Y. HIDAYAT, dan DJAENURI. 1985. Mycoplasmosis pada unggas di Indonesia. Pembuatan antigen bewarna *Mycoplasma gallisepticum* untuk aglutinasi cepat serum. *Penyakit Hewan* 30 : 62 - 65.
- YODER JR. H.W. 1991. Mycoplasmosis. In: *Diseases of Poultry*. 9th edition. Ed. by B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid and H.W. Yoder Jr. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. pp. 196-212.