

LAPORAN PENELITIAN TAHAP I
PENELITIAN FUNDAMENTAL

PENGARUH PIRIDOKSIN TERHADAP BIOSINTESIS
IMMUNOGLOBULIN G (IgG) DAN
IMMUNOGLOBULIN M (IgM)

Oleh:

Drs.P.Maulim Silitonga, MS
Dra.Melva Silitonga,MS

Dibiayai Oleh

Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional
Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Fundamental
Nomor:003/SP2H/PP/DP2M/III/2008 Tanggal 6 Maret 2008

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI MEDAN
Nopember, 2008

**HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
HASIL PENELITIAN FUNDAMENTAL
TAHUN 2008**

1. Judul Penelitian	:	Pengaruh Piridoksin Terhadap Biosintesis Immnoglobulin G (IgG) dan Immunoglobulin M (IgM)
2. Ketua Peneliti	:	Drs.P.Maulim Silitonga,MS
a. Nama Lengkap	:	Laki-Laki
b. Jenis Kelamin	:	131477049
c. NIP	:	Pembina Tk.I /IVb
d. Pangkat/Golongan	:	Lektor Kepala
e. Jabatan Fungsional	:	FMIPA / Kimia
f. Fakultas/Jurusan	:	Universitas Negeri Medan (UNIMED)
g. Perguruan Tinggi	:	Lembaga Penelitian Universitas Negeri Medan
h. Pusat Penelitian	:	
3. Jumlah Tim Peneliti	:	2 (dua) orang
4. Lokasi Penelitian	:	Laboratorium Biokimia FMIPA Unimed
5. Kerjasama dengan Institusi Lain	:	
a. Nama Instansi	:	
b. Alamat	:	
6. Masa Penelitian	:	2 (dua) Tahun
Tahun 1 (2008)	:	Maret s/d November 2008
7. a. Total Biaya yang Diperlukan	:	Rp.80.000.000,-(Delapan puluhjuta rupiah)
b. Biaya Disetujui Tahun 2008	:	Rp. 30.000.000,-(Tiga puluh juta rupiah)
c. Surat Perjanjian Kerja	:	No.147/H33.8/KEP/PL/2008Tgl.14 April 2008

Mengetahui:
Dekan FMIPA Unimed,

Prof.Drs.M.Situmorang,MSc.,PhD
NIP: 131 572 430

Medan, 10 November 2008
Ketua Peneliti,

Drs.P.Maulim Silitonga,MS
NIP: 131477049

Menyetujui:
Ketua Lembaga Penelitian Universitas Negeri Medan,

Dr.Ridwan Abd.Sani,MS
NIP: 131 772 614

RINGKASAN

PENGARUH PIRIDOKSIN TERHADAP BIOSINTESIS IMMUNOGLOBULIN G (IgG) DAN IMMUNOGLOBULIN M (IgM)

Penelitian tentang faktor-faktor yang berpengaruh terhadap peningkatan sistem pertahanan tubuh sangat perlu dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sejauhmana pengaruh piridoksin terhadap biosintesis immunoglobulin G (IgG) dan immunoglobulin M (IgM), sekaligus untuk mengungkap apakah ada perbedaan yang signifikan kadar IgG dan IgM serum pada kondisi defisiensi piridoksin, kondisi normal dan piridoksin berlebih.

Dalam penelitian ini digunakan 15 ekor ayam broiler umur satu hari (DOC) Strain Arbor Acres CP-707. Percobaan dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan masing-masing perlakuan diberi lima ulangan. Perlakuan yang diberikan adalah berupa kondisi piridoksin yang bervariasi yaitu defisiensi, normal dan berlebih (suplementasi). Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar IgG dan IgM serum. Biosintesis Immunoglobulin pada ayam percobaan dilakukan dengan penyuntikan antigen "Newcastle Disease Virus" (NDV). Pemisahan fraksi albumin dan globulin serum dilakukan dengan metode "salting out", isolasi immunoglobulin dengan kromatografi gel filtrasi menggunakan gel-sephadex G-200. Selanjutnya isolasi IgG dan IgM dilakukan dengan Kromatografi gel filtrasi dengan bubuk protein A Separose CL-4b. Identifikasi dan analisis fraksi IgG dan IgM dilakukan dengan elektroforesis gel poliakrilamida terdenaturasi (SDS-PAGE). Kadar IgG dan IgM ditentukan dengan metode Bradford. Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Pengujian hipotesis dilakukan pada taraf signifikansi $\alpha = 0,05$.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa piridoksin berpengaruh nyata terhadap biosintesis IgG dan IgM. Selanjutnya diperoleh kesimpulan bahwa kadar IgG dan IgM serum berbeda secara nyata pada kondisi defisiensi, normal dan kondisi piridoksin berlebih. Kadar IgG dan IgM pada subjek yang mengalami defisiensi piridoksin lebih rendah dibandingkan dengan subjek yang diberi piridoksin dengan dosis normal dan berlebih. Rataan kadar IgG pada serum ayam broiler dengan kondisi piridoksin defisiensi, normal dan yang diberi suplementasi 3.0 mg/kg ransum, berturut-turut sebesar $238,96 \pm 1,66$; $355,84 \pm 1,66$ dan $467,41 \pm 2,50$ mg/100 mL. Rataan kadar IgM serum berturut-turut sebesar $109,09 \pm 1,66$; $191,14 \pm 2,50$ dan $218,88 \pm 5,01$ mg/100 mL. Dengan adanya fakta-fakta bahwa pada kondisi defisiensi piridoksin diperoleh kadar immunoglobulin (IgG dan IgM) serum yang paling rendah, maka dapat disimpulkan bahwa piridoksin berperan penting dalam biosintesis IgG dan IgM. Hasil penelitian ini diharapkan akan menjadi sumbangan yang sangat berguna dalam mengembangkan kajian ilmiah yang berkaitan dengan upaya peningkatan sistem pertahanan tubuh pada hewan dan manusia di masa yang akan datang.

SUMMARY

EFFECTS OF PYRIDOXINE ON BIOSYNTHESIS IMMUNOGLOBULIN G (IgG) AND IMMUNOGLOBULIN M (IgM)

Study on factors affecting the body immunity system improvement is very important to be conducted. This study was aimed to understand the effect of pyridoxine on both immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin M (IgM) and to evoke a probable significant difference in serum level of IgG and IgM, either in the deficient, normal or supplemented condition of pyridoxine.

For this goal, a completely randomized experimental design with three different treatments, each treatment consisted of five replications, using 15 one day-old (DOC) of Abror Acres EP-707 broiler chicken was applied. The treatments were a serial condition of pyridoxine, i.e. deficient, normal and supplemented conditions. Observed variable in this study was the serum level of IgG and IgM. After stimulation of immunoglobulin biosynthesis by using Newcastle Disease Virus (NDV) antigen, chicken serum albumin and globulin was fractionated (salting out), and immunoglobulin was isolated using a gel filtration chromatography (gel-sephadex G-200). IgG and IgM were then isolated from immunoglobulin fraction by using gel filtration chromatography with a sludge of protein A Sepharose Cl-4b. The last fraction of IgG and IgM was identified and analyzed with denatured polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and then quantified with a standard method of Bradford. The differences between treatments were analyzed by using analysis of variance followed by a post hoc analysis of least significant difference (LSD). All hypothesis testing were conducted at the significant level of $\alpha = 0.05$.

The results of this study indicate that pyridoxine has a significant effect on biosynthesis of both IgG and IgM. Furthermore, it is obtained that the serum level of IgG and IgM are significantly different in three different conditions of pyridoxine (deficient, normal and supplemented conditions). Mean (\pm SD) serum level of both IgG and IgM (in mg/100 mL) of pyridoxine deficient-chicken (IgG: 238.96 ± 1.66 , IgM: 109.09 ± 1.66) is significantly lower than that of normal- (IgG: 355.84 ± 1.66 , IgM: 191.14 ± 2.50) and supplemented-chicken (IgG: 467.41 ± 2.50 , IgM: 218.88 ± 5.01). The fact that the deficiency in pyridoxine resulted in the lowest serum level of immunoglobulin (both IgG and IgM), it can be concluded that pyridoxine has an important role in IgG and IgM biosynthesis. In the future, the results of this study could be contributed significantly in the development of scientific studies in the range of immunity system improvement, both in animals and especially in human being.

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, atas segala berkat dan rahmatNya sehingga tahapan penelitian Fundamental tahun 2008 ini dapat terselesaikan dengan baik sesuai dengan waktu yang direncanakan, yaitu merupakan tahap pertama dari penelitian yang direncanakan berlangsung 2 tahun.

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengungkap bagaimana keterlibatan piridoksin dalam biosintesis IgG dan IgM, apakah ada perbedaan yang signifikan kadar IgG dan IgM serum pada kondisi defisiensi piridoksin, normal dan kondisi piridoksin berlebih.

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada tim peneliti yang sudah bekerja keras dalam menyelesaikan penelitian ini demikian juga kepada mahasiswa yang turut serta membantu pelaksanaannya. Ucapan terimakasih juga kami sampaikan kepada Pimpinan Proyek Penelitian Fundamental yang sudah menyediakan dana sehingga penelitian tahun pertama ini dapat dilaksanakan. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada pimpinan UNIMED Medan yang telah memberikan izin pelaksanaan penelitian dan kepada semua pihak yang sudah banyak membantu tim peneliti mulai dari proses pembuatan usulan penelitian, pelaksanaan hingga penyusunan laporan hasil penelitian. Penulis berharap agar hasil penelitian ini dapat digunakan untuk mengembangkan kajian ilmiah dalam rangka upaya peningkatan sistem pertahanan tubuh pada hewan dan manusia. Kiranya hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di masa yang akan datang.

Medan, 10 November 2008

Ketua Peneliti,

Drs. P. Maulim Silitonga, MS
NIP. 131477049

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN DAN SUMMARY	ii
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Struktur dan Sifat-Sifat Piridoksin	3
2.2. Metabolisme dan Sifat Biokimia Piridoksin	4
2.3. Kebutuhan dan Defisiensi Piridoksin Pada Ayam	6
2.4. Sistem Imun dan Immunoglobulin	8
2.5. Piridoksin dan Biosintesis Immunoglobulin	10
2.6. Hipotesis Penelitian	12
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	13
2.1. Tujuan Penelitian	13
2.2. Manfaat Penelitian	13
BAB IV METODE PENELITIAN	14
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	14
4.2. Bahan Penelitian	14
4.3. Metode Penelitian	14
4.3.1. Rancangan Percobaan	14
4.3.2. Prosedur Penelitian	15
4.3.2.1. Biosintesis Immunoglobulin pada Ayam	16
4.3.2.2. Pemisahan Albumin dan Globulin	16
4.3.2.3. Isolasi Immunoglobulin	17
4.3.2.4. Isolasi IgG dan IgM	17

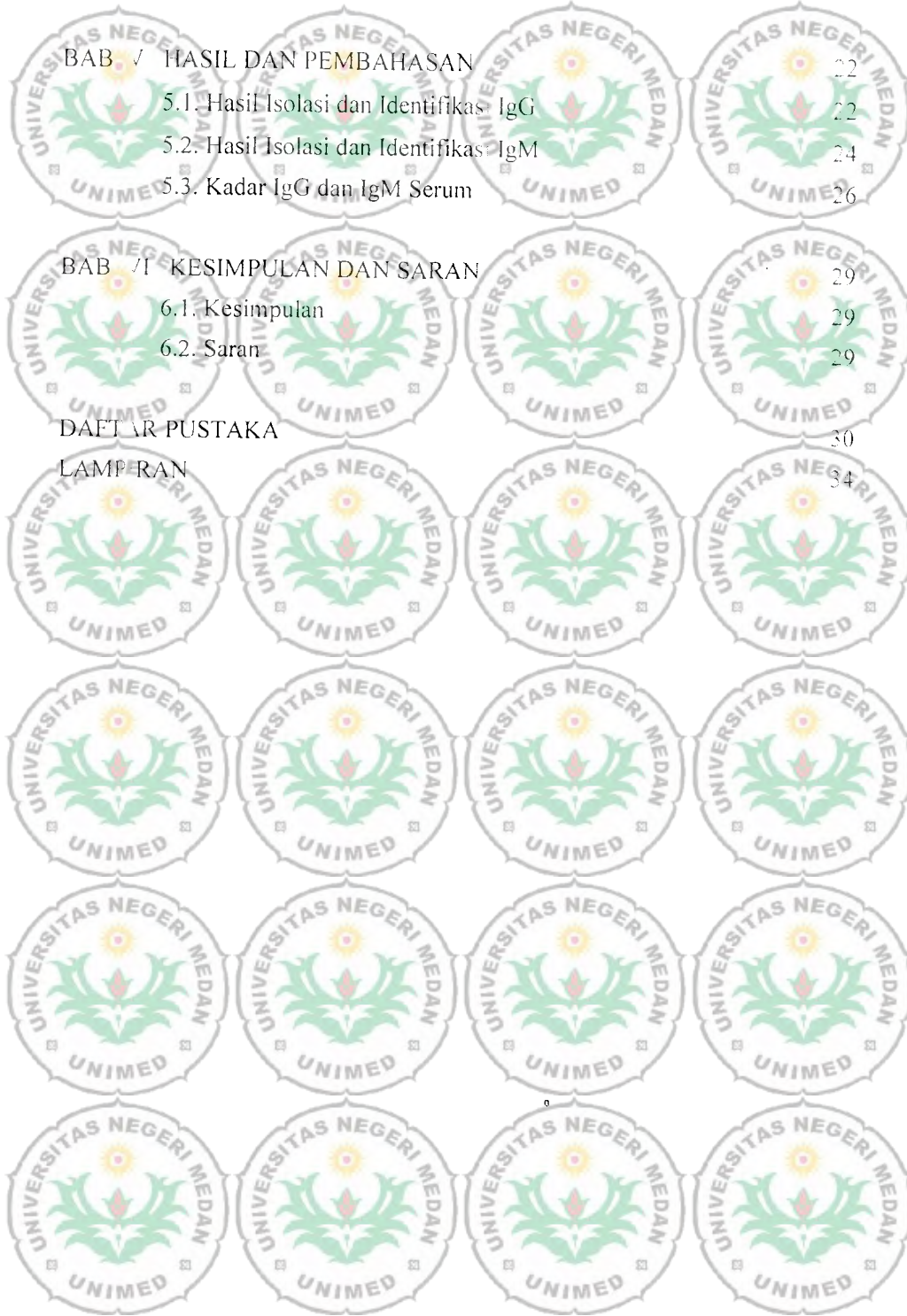
4.3.2.5. Identifikasi IgG dan IgM	18
4.3.2.6. Penentuan Kadar IgG dan IgM	21

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	22
5.1. Hasil Isolasi dan Identifikasi IgG	22
5.2. Hasil Isolasi dan Identifikasi IgM	24
5.3. Kadar IgG dan IgM Serum	26

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	29
6.1. Kesimpulan	29
6.2. Saran	29

DAFTAR PUSTAKA	30
----------------	----

LAMPIRAN	34
----------	----



DAFTAR TABEL

Tabel 2.	Sifat dasar beberapa kelas immunoglobulin	Halaman 9
Tabel 4.1	Rincian Perlakuan dalam Penelitian	15
Tabel 5.1	Nilai laju Mobilitas (Rf) Fraksi Protein IgG Serum	23
Tabel 5.2	Nilai laju Mobilitas (Rf) Fraksi Protein IgM Serum	25
Tabel 5.3	Rataan Kadar IgG dan IgM Serum Ayam Broiler yang Diberi Perlakuan Tingkat Piridoksin Yang Bervariasi	27



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1.	Struktur piridoksin, piridoksal, piridoksamin, piridoksal posfat dan piridoksamin posfat	Halaman 4
Gambar 1.2.	Metabolisme viamer-vitamer vitamin B6 pada selhewan	5
Gambar 1.1.	Hasil Isolasi dan Identifikasi IgG dengan Elektroforesis	22
Gambar 1.2.	Hasil Isolasi dan Identifikasi IgM dengan Elektroforesis	24
Gambar 1.3.	Kurva Standar Penentuan Kadar IgG dan IgM Sampel	26
Gambar 1.4.	Skema Mekanisme Pengaruh Piridoksin Terhadap Biosintesis Immunoglobulin	28



BAB I PENDAHULUAN

Vitamin adalah senyawa organik yang dibutuhkan dalam jumlah kecil pada diet hewan maupun manusia untuk menjamin berlangsungnya pertumbuhan dan reproduksi yang wajar (Conn, 1987). Karena vitamin dibutuhkan dalam diet hanya dalam jumlah milligram atau mikrogram per hari, maka vitamin disebut juga "mikro nutrient" (Lehninger, 1982). Tidak adanya vitamin dalam diet atau tersedia dalam jumlah yang cukup tetapi hanya sedikit yang diserap dari sistem pencernaan, pada umumnya akan dapat mengakibatkan sejenis penyakit defisiensi dengan gejala yang khas (Conn, 1987).

Vitamin B6 atau piridoksin sebagai salah satu kelompok vitamin yang larut dalam air, merupakan vitamin yang sangat penting untuk hewan maupun manusia. Piridoksal fosfat (PLP) sebagai bentuk aktif dari vitamin B6 merupakan koenzim yang serbaguna yang berperan untuk mengkatalisis berbagai reaksi penting dalam metabolisme asam amino dan protein seperti transaminasi, dekarboksilasi, resemisasi, dan transulfurasi. Salah satu peranan piridoksin yang paling menarik adalah dengan adanya fakta-fakta bahwa vitamin ini juga terlibat dalam aspek pembentukan sistem imun atau pertahanan tubuh terhadap invasi mikroorganisme.

Perubahan-perubahan dalam sistem imun, baik sistem imun humoral maupun sistem imun seluler pada hewan percobaan dan manusia yang mengalami defisiensi piridoksin, telah menarik perhatian para peneliti. Perubahan ini sangat mungkin terjadi dengan alasan sebagaimana yang dikemukakan oleh Beisel (1982) yang menyatakan bahwa pada keadaan normal, piridoksin dibutuhkan dalam sintesis asam nukleat dan sintesis protein. Oleh karena itu tidak mengherankan jika defisiensi piridoksin dapat menyebabkan pengaruh yang lebih banyak terhadap system kekebalan tubuh dibandingkan dengan defisiensi vitamin B yang lainnya.

Dari hasil-hasil penelitian telah diketahui bahwa pada kondisi defisiensi piridoksin pada berbagai spesies hewan maupun manusia menunjukkan adanya kelainan-kelainan dalam sistem pertahanan tubuh. Total sel-sel pembentuk antibodi dan limfosit lebih sedikit pada subjek yang mengalami defisiensi piridoksin

dibandingkan dengan keadaan normal (Kumar dan Axelrod, 1968; Debes dan Kirksey 1979; Beisel, 1982).

Studi tentang pengaruh piridoksin terhadap sintesis antibodi pada ayam broiler telah dilakukan (Silitonga, 1992). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian piridoksin berpengaruh terhadap titer HI (titer antibodi) dan kadar globulin serum. Pemberian piridoksin dengan dosis 3,0 mg/kg ransum memberikan kadar globulin paling tinggi. Penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa piridoksin berpengaruh nyata terhadap kadar Immunoglobulin serum, kadar DNA dan RNA organ bu sa Fabricus. Defisiensi piridoksin memberikan kadar Immunoglobulin DNA dan RNA paling rendah sebaliknya suplementasi piridoksin dengan dosis 3,0 mg/kg ransum memberikan kadar Immunoglobulin yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok defisiensi (Silitonga, 1996). Pada ayam telah dapat dideteksi 3 kelas Immunoglobulin yaitu IgG, IgM dan IgA. Immunoglobulin G (IgG) dan IgM merupakan kelas Immunoglobulin yang terdapat dalam konsentrasi tertinggi dalam serum darah, dan karena itu kelas ini berperan utama dalam mekanisme pertahanan yang diperantarai oleh antibodi. Immunoglobulin A (IgA) terdapat dalam ekskresi eksternal tubuh seperti ludah, air mata, kolustrum dan keringat (Khare, 1996; Tizard, 1982; Litman dan Good, 1998).

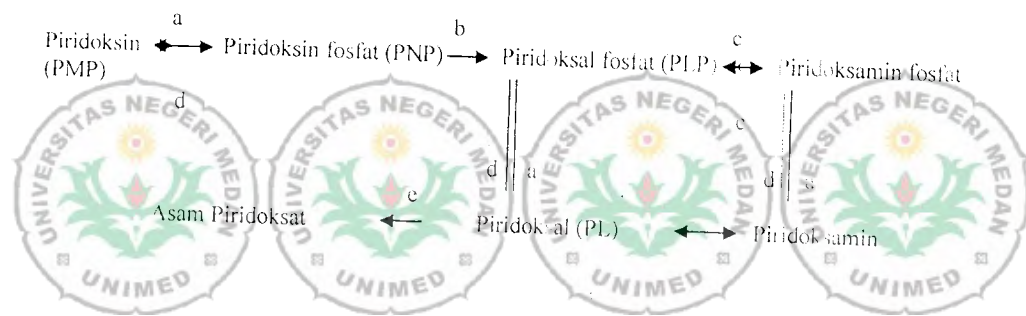
Walaupun telah diketahui bahwa kadar Immunoglobulin serum lebih rendah pada ayam broiler yang mengalami defisiensi piridoksin dibandingkan dengan subjek yang diberi piridoksin dengan dosis normal (Silitonga, 1996), namun penelitian tersebut belum mengungkapkan apakah piridoksin terlibat dalam biosintesis keseluruhan kelas Immunoglobulin atau hanya untuk kelas tertentu saja. Oleh karena itu penelitian ini dimaksudkan untuk mengungkap bagaimana keterlibatan piridoksin dalam biosintesis IgG dan IgM, apakah ada perbedaan yang signifikan kadar IgG dan IgM serum pada kondisi defisiensi piridoksin, normal dan kondisi piridoksin berlebih. Hasil penelitian ini akan menjadi sumbangan yang sangat berguna dalam mengembangkan kajian ilmiah dalam rangka upaya peningkatan sistem pertahanan tubuh pada hewan dan manusia di masa yang akan datang.



Gambar 2.1. Struktur Piridoksin, Piridoksal, Piridoksamin, Piridoksal fوسفat, dan Piridoksamin fوسفat.

2.2. Metabolisme dan Fungsi Biokimia Piridoksin

Vitamin B6 mempunyai vitamer-vitamer yang mampu untuk saling berubah dalam sel-sel hewan dengan melibatkan enzim seperti: (a) PL Kinase, (b) PMP/PNP Oksidase, (c) transferase, (d) fوسفatase, dan (e) PL oksidase (Ink dan Henderson, 1984). Metabolisme vitamer-vitamer vitamin B6 pada sel hewan disajikan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Metabolisme vitamin-vitamin vitamin B6 pada sel hewan

Piridoksal fosfat merupakan koenzim yang serbaguna yang berperan untuk mengkatalisis berbagai reaksi penting dalam metabolisme asam amino dan protein. Telah diketahui sekitar 60 jenis reaksi-reaksi asam amino yang melibatkan piridoksal posfat (Cona, 1987). Piridoksal posfat terlibat dalam reaksi transulfurasi, misalnya pada reaksi perubahan metionin menjadi sistein (Martin, 1985), dalam reaksi dekarboksilasi asam amino tirosin, arginin asam glutamat, dihidrosifenilalanin (DOPA) dan beberapa asam amino lainnya. Piridoksal posfat berfungsi juga dalam sintesis triptofan dari indol dan serin. Disamping itu, vitamin ini ternyata berperan juga dalam sintesis δ -aminolevulinat yang merupakan zat pemula bagi senyawa-senyawa heme (Moeljohardjo, 1988). Vitamin B6 terlibat juga dalam pembentukan hemoglobin (Ensminger, 1990). Klorofil pigmen fotosintetik tanaman dan hemo protoforpirin besi hemoglobin pada hewan, keduanya disintesis dalam sel-sel hidup dengan jalan yang sama. Dalam proses sintesis tersebut, dua zat pemula adalah "suksinat aktif" derivat koenzim A dari asam suksinat yang berasal dari siklus asam sitrat dalam mitokondria dan asam amino glisin. Dalam reaksi ini, piridoksal fosfat berperan untuk mengaktifkan glisin, kemungkinan dalam hal ini piridoksal posfat bereaksi dengan glisin membentuk "basa Schiff" dimana karbon alfa glisin dapat bergabung dengan karbon karbonil suksinat. (Martin, 1985). Pada proses selanjutnya, hasil dari reaksi kondensasi antara suksinil - KoA dengan glisin yaitu asam- α -amino- β keto adipat, dengan cepat dikarboksilasi menjadi asam δ amino levulinat.

Selain dari fungsi biokimiawi di atas, piridoksal fosfat juga berperan sebagai gugus prostetik enzim transaminase misalnya glutamat oksaloasetat transaminase dan glutamat peruvat transaminase (Moeljohardjo, 1988). Prinsip kerja piridoksal fosfat dalam reaksi dekarboksilasi dan transaminasi nampak pada reaksi dari gugus α -amino dari asam amino dengan gugus aldehid pada posisi 4 piridoksal fosfat. Reaksi ini berlangsung karena piridoksal fosfat mempunyai kemampuan untuk membentuk imino atau "basa Schiff" dimana oksigen dari gugus aldehid dipertukarkan, sedangkan nitrogen dari α -amino dicantelkan kepada karbon aldehid dengan suatu ikatan rangkap (Scott, 1982).

Pada reaksi transaminasi yang dikatalisis oleh enzim transaminase atau aminotransferase, piridoksal fosfat yang terikat kuat berfungsi sebagai pembawa gugus asam amino dari senyawa donor yaitu asam α -amino kepada akseptor gugus amino yaitu asam α keto. Selanjutnya Lehninger (1982) menyatakan bahwa pada siklus katalitik transaminase, gugus amino dari suatu substrat α -amino dipindahkan ke piridoksal fosfat yang terikat kuat oleh enzim, kemudian turunan amino yang dihasilkan ke substrat yang kedua yaitu asam α -keto, sedang koenzim kembali dibentuk piridoksal fosfat. (Lehninger, 1982).

2.3. Kebutuhan dan Defisiensi Piridoksin pada Ayam.

Unggas sangat peka terhadap defisiensi vitamin, hal ini disebabkan oleh karena (1) unggas tidak memperoleh keuntungan dari sintesis vitamin oleh mikroorganisme dalam alat pencernaan, bahkan mikroorganisme usus pada unggas justru bersaing dengan tuan rumahnya sendiri dalam memperoleh vitamin. (2) unggas mempunyai kebutuhan yang tinggi terhadap vitamin untuk reaksi-reaksi metabolisme dalam tubuh. (3) populasi yang padat dalam peternakan unggas modern, menimbulkan berbagai macam stress, sehingga unggas tersebut membutuhkan banyak vitamin (Yasin, 1988).

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengetahui tingkat kebutuhan vitamin B6, baik bagi hewan maupun manusia. Makin tinggi kandungan protein ransum, maka kebutuhan akan vitamin B6 semakin meningkat (Dagher dan Shah 1973; Gries dan Scott, 1972).

Kebutuhan piridoksin untuk ayam broiler yang direkomendasikan oleh NRC (1977) adalah 3.0 mg/kg ransum, sedangkan kebutuhan protein secara normal adalah 23 persen (Wahju, 1988). Menurut Weiss dan Scott (1979), pemberian piridoksin sebanyak 3.0 mg/kg ransum ayam petelur nampaknya sudah mencukupi, sedangkan menurut NRC (1977) kebutuhan vitamin untuk ayam petelur sekitar 4.5 mg/kg ransum. Kebutuhan piridoksin untuk kalkun stater adalah 4.0 mg/kg ransum, sedangkan untuk itik bebek ("breeder") dibutuhkan sebanyak 3.0 mg/kg ransum (Wahju, 1988). Meskipun beberapa faktor telah diketahui dapat mempengaruhi tingkat kebutuhan piridoksin, tetapi penggunaan jagung, bungkil kacang kedele dan bahan-bahan lain yang merupakan sumber energi dan protein dalam ransum, biasanya sudah memenuhi kebutuhan piridoksin (Wahju, 1988).

Karena piridoksin, piridoksal dan piridoksamina terlibat dalam metabolisme asam-asam amino dan protein maka kebutuhan akan vitamin tersebut meningkat jika konsumsi diet kaya protein, terutama protein yang mengandung metionin dan asam amino bersulfur lainnya. Oleh karena itu defisiensi vitamin B6 menyebabkan timbulnya gejala sebagai akibat terganggunya metabolisme asam amino atau protein (Moeljohardjo, 1988).

Berbagai jenis gejala defisiensi piridoksin pada ayam dewasa ditandai dengan penurunan produksi dan daya tetas telur, penurunan konsumsi pakan, kehilangan berat badan dan kematian. Defisiensi piridoksin yang hebat dimana tingkat piridoksin ransum di bawah 0.5 mg/kg ransum, dapat mengakibatkan hambatan pada perkembangan kantong telur, saluran telur, jengger, dan pial pada ayam petelur dewasa. Pada ayam jantan dapat terjadi hambatan perkembangan pada testes, jengger dan pial (Wahju, 1988; Scott, 1982).

Weiss dan Scott (1979) mengemukakan bahwa pada ayam petelur, defisiensi piridoksin dapat mengakibatkan gejala anorexia, kehilangan berat badan, penurunan cadangan lemak tubuh, menurunnya fertilitas dan daya tetas telur. Defisiensi piridoksin yang kronis pada ayam dapat mengakibatkan perosis, biasanya satu kakinya pincang, satu atau dua jari tengah mem bengkok (Gries dan Scott, 1972).

Defisiensi piridoksin pada anak ayam akan memperlihatkan gejala saraf yang khas. Anak ayam tersebut berjalan terhenti-henti, gerakan gangguan saraf pada kaki dan sering memperlihatkan konvulsi ekstrim yang berakhir dengan kematian. Selama

adanya gejala konvulsi ini, anak ayam kelihatan berjalan tanpa tujuan. sayap terkulai, jatuh terguling-guling, melakukan gerak dalam kandang yang terhenti-henti (Wahju, 1988).

Dalam melakukan penelitian, kondisi defisiensi piridoksin dapat dibuat dengan dua cara yaitu dengan memberikan makanan basal yang tersusun dari bahan-bahan atau zat yang tidak mengandung piridoksin atau dengan cara pemberian deoksipiridoksin suatu analog struktural yang bersifat antagonis terhadap piridoksin (Beisel, 1972).

2.4. Sistem Imun dan Immunoglobulin.

Sistem imun adalah suatu system perlindungan atau pertahanan tubuh pada vertebrata terhadap invasi mikroorganisme atau bahan-bahan asing yang dapat mengganggu kesehatannya. System imun ada dua macam, yang pertama adalah system imun humoral yang ditandai oleh sintesis dan sekresi zat antibodi ke dalam sirkulasi darah atau cairan tubuh lainnya oleh sel-sel limfosit B dan plasma di dalam organ limfoid. Sistem imun yang kedua adalah sistem imun seluler yang respons terhadap antigen atau bahan organik asing yang ditandai oleh suatu reaksi penolakan atau penghapusan terhadap benda asing oleh sel-sel efektor (Sel T) yang terdapat pada organ limfoid, misalnya reaksi penolakan terhadap organ yang dicangkokkan yang merupakan benda asing bagi penerima (Sikar, 1987).

Pada unggas, organ bursa Fabricius dan timus digolongkan ke dalam system imun sebagai organ limfoid primer (Cooper, 1966). Bursa fabricius pada ayam secara langsung dapat menangkap antigen dari lingkungan luar atau isi usus, masuk ke dalam lumen kemudian melalui epitel usus masuk ke dalam folikel dan akhirnya terjadi sintesis antibodi terhadap antigen tersebut (Sikar, 1987).

Antibodi dibawakan oleh suatu protein serum yaitu γ -globulin karena molekul antibodi adalah globulin, maka antibodi tersebut lebih dikenal sebagai Immunoglobulin. Dengan demikian, Immunoglobulin dapat didefinisikan sebagai semua protein hewani yang mempunyai aktifitas antibodi (Bell dan Freeman, 1971; Tizard, 1982; Goodman, 1987).

Immunoglobulin terdiri dari kelompok yang heterogen yang jumlahnya sekitar 20 persen dari total protein plasma. Immunoglobulin adalah glikoprotein

dengan komposisi 82-96 persen polipeptida dan 4-8 persen karbohidrat, komponen polipeptida ini memiliki hampir semua sifat biologi yang berhubungan dengan molekul antibodi (Goodman, 1987).

Berdasarkan berat molekul dan sifat-sifat kimianya maka dikenal lima kelas immunoglobulin yang diantaranya adalah IgG, IgM, dan IgA yang secara kuantitatif lebih banyak, disamping itu terdapat kelas IgD dan IgE masing-masing mempunyai sifat-sifat dasar sebagaimana disajikan dalam tabel 2.1. Disamping kelima kelas immunoglobulin, dikenal juga beberapa sub kelas. IgG dibagi atas empat sub kelas yaitu IgG₁, IgG₂, IgG₃ dan IgG₄, sedangkan IgA dibagi lagi menjadi dua sub kelas yaitu IgA₁ dan IgA₂. Tiap sub kelas berbeda dalam hal susunan asam amino dan berat molekulnya, sekaligus berbeda juga sifat-sifat biologisnya (Kresno, 1984).

Tabel 2.1. Sifat Dasar Beberapa Kelas Immunoglobulin.

Immunoglobulin	Berat Molekul	Koefisien Sedimentasi	Tipe Rantai H
I:G	150000-180000	7 S	Gamma
I:M	900000-950000	19 S	mu
I:A	300000-600000	11 S	Alpa
I:D	160000-200000	7 S	Delta
I:E	190000	8 S	Epsilon

Sumber : Metzler (1977); Tizard (1982); Kresno (1984)

Diantara kelima kelas Immunoglobulin, IgG merupakan kelas yang terdapat dalam konsentrasi tertinggi di dalam serum, oleh karena itu kelas ini memainkan peranan utama dalam mekanisme pertahanan yang diperantarai antibodi (Tizard, 1982). Immunoglobulin G (IgG) mampu membentuk kekebalan terhadap banyak perantara pembawa infeksi yang menyebar melalui udara termasuk virus, bakteri, parasit, beberapa jamur dan toksin mikroorganisme tersebut. Disamping itu Immunoglobulin ini memberikan aktivitas antibody dalam jaringan-jaringan (Roitt 1980). Hingga saat ini, telah dapat dideteksi adanya tiga kelas Immunoglobulin pada ayan yaitu IgG, IgM, dan IgA. Kadar immunoglobulin G (IgG) pada serum

ayam ada ah sekitar 300 – 700 mg/100 ml. IgM sekitar 120 - 250 mg/ 100 ml sedangkan IgA berkisar antara 30 – 60 mg/ 100 ml (Tizard, 1982).

2.5. Piridoksin dan Biosintesis Immunoglobulin

Berbagai penelitian tentang hubungan vitamin B6 dengan aspek kekebalan tubuh pada hewan maupun manusia telah banyak dilaporkan oleh peneliti. Defisiensi piridoksin pada kerang laut dapat menurunkan fungsi kekebalan tubuh (Chen, 2005). Stoerk dan Eisen (1946) melaporkan bahwa titer antibodi serum ternyata menurun pada tikus defisiensi piridoksin. Selanjutnya Axelrod (1947) menyatakan bahwa titer hemaglutinasi individual pada tikus defisiensi piridoksin dan defisiensi asam pentotenat, mengalami penurunan yang drastis. Brown dan Pike (1960) melakukan penelitian yang bertujuan untuk melihat perubahan yang terjadi pada volume darah, hematokrit, hemoglobin, total protein serum dan fraksi-fraksi protein serum pada tikus bunting dan tikus betina dewasa yang diberi deoksipiridoksin dan piridoksin. Mereka mendapatkan bahwa kadar γ -globulin dan total γ -globulin yang beredar pada semua tikus percobaan yang diberi dioksipiridoksin lebih rendah dibandingkan dengan tikus yang diberi piridoksin.

Beatson (1953) melaporkan bahwa kadar globulin serum pada tikus defisiensi vitamin B6 lebih rendah dibandingkan dengan kadar globulin tikus yang diberi ransum dengan kandungan vitamin B6 yang cukup. Pada tikus defisiensi vitamin B6 diperoleh ransum kadar albumin, globulin, total protein berturut-turut sebesar 3.5, 1.6, dan 5.1 gram persen, sedangkan pada tikus yang diberi vitamin B6 yang cukup diperoleh ransum kadar albumin, globulin dan total protein berturut-turut sebesar 3.3, 1.8, dan 5.1 gram persen.

Sintesis antibodi seluler telah diamati Kumar dan Axelrod (1968) pada tikus yang diberi ransum normal dan ransum defisiensi piridoksin. Tikus diimunisasi dengan eritrosit domba. Ternyata, sel-sel pembentuk antibodi pada limfa dan titer antibodi pada tikus yang diberi ransum dengan kandungan vitamin B6 yang cukup. Dengan demikian, mereka menarik kesimpulan bahwa defisiensi vitamin B6 dapat mengakibatkan menurunnya produksi antibodi. Penelitian Debes dan Kirkey (1979) telah membuktikan bahwa anak dari induk tikus yang diberi ransum defisiensi vitamin B6 selama masa kebuntingan dan masa laktasi, mempunyai jumlah limfosit

dan sel-sel pembentuk antibody yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberi vitamin B6 yang cukup.

Hasil penelitian pada manusia menunjukkan bahwa pemberian makanan yang tidak mengandung vitamin B6, dapat mengakibatkan terjadinya limfositopenia (Cheslock dan McCully, 1960; Beisel, 1982). Pembentukan antibody terhadap tetanus dan tifus akan terganggu pada subjek yang mengalami defisiensi vitamin B6 (Hodges, 1962a), bahkan respon antibody terhadap vaksin tetanus dan tifus sama sekali tidak ditemukan pada subjek yang defisiensi vitamin B6 sekaligus defisiensi asam pantoat (Hodges, 1962b).

Penelitian tentang pengaruh piridoksin terhadap status imun pada manusia lanjut usia telah dilakukan oleh Talbott (1987). Mereka melaporkan bahwa suplementasi piridoksin pada manusia lanjut usia dapat memperbaiki fungsi limfosit serta memulai sistem kekebalan. Sementara itu, Baisel (1982) mengemukakan bahwa defisiensi piridoksin pada hewan dan manusia, dapat menurunkan respon imun berperantara sel (*cell-mediated immune function*) dan respon imun humoral terhadap berbagai jenis antigen.

Traktellis dan Axelrod (1965) telah melakukan penelitian tentang pengaruh defisiensi vitamin B6 terhadap sintesis DNA dan RNA. Mereka memperoleh data bahwa sintesis DNA dan RNA mengalami penurunan di dalam limpa tikus yang diberi ransum defisiensi piridoksin. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Montjar (1965), yang menyimpulkan bahwa defisiensi vitamin B6 pada tikus, dapat menyebabkan menurunnya laju sintesis r-RNA dan m-RNA.

Studi tentang pengaruh piridoksin terhadap sintesis antibody pada ayam broiler telah dilakukan (Silitonga, 1992). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian piridoksin berpengaruh terhadap titer HI (titer antibody) dan kadar globulin serum. Pemberian piridoksin dengan dosis 3,0 mg/kg ransum memberikan kadar globulin paling tinggi. Penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa piridoksin berpengaruh nyata terhadap kadar Immunoglobulin serum, kadar DNA dan RNA organ bursa Fabricus. Defisiensi piridoksin memberikan kadar Immunoglobulin DNA dan RNA paling rendah, sebaliknya suplementasi piridoksin dengan dosis 3,0 mg/kg ransum memberikan kadar Immunoglobulin yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok defisiensi (Silitonga, 1996).

Bebagai pendapat dan hipotesis telah diajukan para peneliti sehubungan dengan adanya bukti-bukti keterlibatan vitamin B6 dalam kekebalan tubuh. Trakatellis (1992) menyatakan bahwa menurunnya aktivitas enzim serin hidroksimetil transferase (SHMT) sebagai akibat defisiensi piridoksin merupakan kunci utama terganggunya sistem kekebalan tubuh dan perkembangbiakan sel. Menurut Montjar (1965), menurunnya laju sintesis antibodi pada hewan yang diberi ransum defisiensi vitamin B6 merupakan akibat lanjutan dari terganggunya sintesis m-RNA pada hewan tersebut. Selanjutnya Kumar dan Axelrod (1968) berpendapat bahwa gangguan yang diakibatkan oleh keadaan defisiensi piridoksin terhadap respon in mun, berhubungan dengan terjadinya hambatan pada proses perkembangbiakan sel-sel sebagai akibat dari ketidakcukupan DNA dan menurunnya produksi m-RNA yang dibutuhkan untuk sintesis IgM.

2.6. Hipotesis Penelitian

Dalam keadaan normal, hewan dan manusia membutuhkan piridoksin untuk proses sintesis asam nukleat, asam amino dan protein. Fakta-fakta menunjukkan bahwa piridoksin berperan dalam biosintesis DNA, RNA dan Immunoglobulin. Immunoglobulin G (IgG) dan IgM merupakan kelas Immunoglobulin yang utama dan terbanyak ditemukan dalam serum ayam, dimana kedua kelas Immunoglobulin tersebut berbeda dalam hal susunan asam-asam amino dan berbagai sifat fisikokimia lainnya. Dengan demikian, keterlibatan piridoksin dalam biosintesis IgG dan IgM diduga akan menunjukkan perbedaan yang cukup berarti pada kondisi defisiensi, normal dan kondisi piridoksin yang berlebih. Berdasarkan hal tersebut, maka dalam penelitian ini diajukan hipotesis sebagai berikut:

- a. Ada pengaruh piridoksin terhadap biosintesis IgG dan IgM,
- b. Ada perbedaan yang signifikan kadar IgG dan IgM serum pada kondisi defisiensi, normal dan kondisi piridoksin berlebih.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Untuk mengetahui bagaimana pengaruh piridoksin terhadap biosintesis IgG dan IgM.
- b. Untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan kadar IgG dan IgM serum pada kondisi defisiensi, normal dan kondisi piridoksin berlebih.

3.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat :

- a. Sebagai tambahan informasi bagi pengembangan ilmu, tentang peranan piridoksin dalam biosintesis Immunoglobulin G (IgG) dan Immunoglobulin M (IgM).
- b. Sebagai bahan pertimbangan untuk penelitian lanjutan yang bertujuan untuk memanfaatkan piridoksin dalam biosintesis Immunoglobulin dan meningkatkan sistem pertahanan tubuh baik pada hewan maupun manusia.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia FMIPA UNIMED Medan yang menyangkut tahap “bioassay” yaitu tahap pemberian perlakuan piridoksin terhadap ayam broiler. Analisis kadar IgG dan IgM dari sampel dilakukan di laboratorium Biokimia FMIPA – IPB Bogor. Penelitian ini dilakukan selama sepuluh bulan yang dilakukan sejak bulan Maret hingga November 2008.

4.2. Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayam broiler umur satu hari (DOC) Strain Abroor Acres CP-707 sebanyak 15 ekor. Antigen yang digunakan adalah vaksin NDV (Newcastle Disease Virus) Strain La sota Produksi PT. Rhone Poulec Indonesia Pharma – Bogor. Ransum yang digunakan selama penelitian adalah ransum dari pasaran (ransum komersil yang telah mengandung piridoksin dengan dosis normal). Piridoksin yang dicobakan dalam penelitian adalah Piridoksin kemasan 5 gram, antagonis piridoksin digunakan adalah deoksipiridoksin kemasan 500 mg. Bahan-bahan kimia dan alat yang digunakan disebutkan dalam prosedur penelitian.

4.3. Metode Penelitian

4.3.1. Rancangan Percobaan

Penelitian ini bersifat eksperimental, dalam perancangannya digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan masing-masing perlakuan diberi lima ulangan. Digunakan 15 ekor ayam broiler umur satu hari (DOC) Strain Abroor Acres CP-707. Ayam dikelompokkan menjadi 3 (tiga) kelompok yaitu kelompok defisiensi (D), Kontrol (K) dan kelompok Suplementasi (S) Ayam percobaan diberi perlakuan pemberian piridoksin dengan kondisi yang bervariasi yaitu defisiensi, normal dan berlebih. Rincian perlakuan yang diberikan disajikan pada Tabel 4.1

Tabel 4.1. Rincian Perlakuan dalam Penelitian Pengaruh Piridoksin Terhadap Biosintesis IgG dan IgM

Kelompok	Perlakuan
Defisiensi (D)	Diberi ransum komersial yang telah mengandung piridoksin dengan dosis normal, dan diberi antagonis piridoksin yaitu deoksipiridoksin dengan dosis 3,0 mg/kg ransum
Kontrol (K)	Diberi ransum komersial yang telah mengandung piridoksin dengan dosis normal.
Suplementasi (S)	Diberi ransum komersial yang telah mengandung piridoksin dengan dosis normal, dengan tambahan piridoksin 3,0 mg/kg ransum.

4.3.2. Prosedur Penelitian

Adapun tahapan-tahapan kerja yang dilakukan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

1. Biosintesis Immunoglobulin pada ayam percobaan (*bioassay*) dengan memberi perlakuan kondisi piridoksin yang bervariasi selama 30 hari. Setelah umur tiga minggu, semua ayam percobaan disuntik dengan antigen "Newcastle Disease Virus" (NDV). Sepuluh hari setelah penyuntikan antigen NDV, darah diambil untuk preparasi serum yang akan digunakan untuk analisis, isolasi, identifikasi dan penentuan kadar IgG dan IgM serum.
2. Pemisahan fraksi albumin dan globulin serum dengan metode "salting out" (Hert, 1970)
3. Isolasi Immunoglobulin dilakukan dengan kromatografi gel filtrasi menggunakan gel-sephadex G-200 (Mackenzie, 1990)
4. Isolasi IgG dan IgM dilakukan dengan kromatografi gel filtrasi dengan bubuk protein A Separose CL-4b (Khare, 1996)
5. Identifikasi dan analisis fraksi IgG dan IgM dilakukan dengan elektroforesis gel poliakrilamida terdenaturasi (SDS-PAGE) (Hames dan Rickwood, 1990; Mackenzie, 1990; Alexander, 1985)

6. Penentuan kadar IgG dan IgM dengan Metode Bradford sesuai prosedur (Alexander, 1985).

4.3.2.1. Biosintesis Immunoglobulin Pada Ayam

Disediakan satu buah kandang yang dibagi menjadi tiga petak dengan bentuk, ukuran dan bahan yang seragam. Kandang dibersihkan, dicat dan dibebashamakan dengan lautan karbol. Ayam percobaan diberi nomor kode pada sayap dan ditempatkan masing-masing lima ekor dalam satu petak. Tata cara pemeliharaan selama 30 hari dilakukan sesuai dengan prosedur (Murtidjo, 1990; AAK, 1991). Selama pemeliharaan, Kelompok Defisiensi diberi ransum komersil yang telah mengandung piridoksin dengan dosis normal, tetapi diberi antagonis piridoksin yaitu deoksipiridoksin dengan dosis 3,0 mg/kg ransum dengan cara cekok. Kelompok kontrol hanya diberi ransum komersil dari pasaran dengan dosis piridoksin normal, selanjutnya Kelompok Suplementasi diberi ransum komersil yang telah mengandung piridoksin dengan dosis normal dengan tambahan piridoksin 3,0 mg/kg ransum dengan cara pecekokan langsung pada ayam.

Pada umur tiga minggu, semua ayam percobaan disuntik dengan antigen NDV. Setelah 7 hari setelah penyuntikan antigen NDV, darah diambil untuk preparasi serum yang akan digunakan untuk analisis, isolasi, identifikasi dan penentuan kadar IgG dan IgM serum.

4.3.2.2. Pemisahan Albumin dan Globulin dengan metode "Salting out"

Ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 1,0 ml serum, kemudian ditambahkan 0,18 gr natrium sulfat anhidrat (18 % b/v) sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga larut dengan kejenuhan 33%. Larutan tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu 25° C. Larutan dipusing pada suhu 25° C, 5000 rpm selama 30 menit. Supernatan dipisahkan dan endapan globulin dilarutkan dalam 1,0 ml aquades. Tahapan selanjutnya, ke dalam larutan ditambahkan kembali natrium sulfat anhidrat 14 % (w/v) dan diinkubasi pada suhu 25° C selama 30 menit, lalu dipusing selama 30 menit pada suhu 25° C dengan kecepatan 5000 rpm. Supernatan dibuang dan endapan globulin dilarutkan dalam 1,0 ml aquades. Proses "salting out" dengan

natrium sulfat anhidrat (14% w/v) diulangi sekali lagi. Endapan globulin dilarutkan dalam 1,0 buffer pospat mM(pH 8,2) dan disimpan untuk analisis berikutnya.

4.3.2.3. Isolasi Immunoglobulin dengan Kromatografi Gel Filtrasi

Mula-mula kolom dipersiapkan dan diletakkan dalam tiang penyangga. Kemudian kolom diisi dengan buffer posfat 100 mM (pH 8,2) dan bubuk sephadex G-200 secara perlahan-lahan. Klem dibuka dan buffer dibiarkan mengalir terus, seiring dengan itu dilakukan penambahan bubuk Sephadex G-200 hingga mencapai 1-2 cm dari bagian atas kolom di klem dan dilakukan penambahan buffer posfat hingga 1 cm dari bagian atas kolom.

Sebanyak 500 µl sample hasil pemisahan "salting out" dimasukkan ke dalam kolom, dan klem dibuka. Setelah seluruh sampel terendam dalam gel, ditambahkan buffer posfat 100 mM (pH 8,2) dan penambahan ini dilakukan terus menerus hingga kolom tidak sempat kering. Fraksi-fraksi/eluen ditampung masing-masing sebanyak 0,5 ml dalam 24 buah tabung fraksi yang telah diberi nomor sebelumnya. Dari setiap fraksi (tabung) diambil 30 µl dan dimasukkan ke tabung lain, lalu ditambahkan 2,5 ml pereaksi Bradford. Absorbansinya dibaca pada 595 nm dalam spektronic 20 (Lampiran 1). Fraksi-fraksi yang terelusi pada volume elusi sekitar 3 ml hingga 6 ml (untuk kolom 10 ml) dan mempunyai puncak paling tinggi dipastikan adalah fraksi Immunoglobulin (Mackenzie, 1990). Sebanyak empat tabung fraksi-fraksi Immunoglobulin tersebut dikumpulkan/ dicampur menjadi satu dan disimpan untuk isolasi dan identifikasi IgG dan IgM.

4.3.2.4. Isolasi IgG dan IgM dengan Kromatografi Gel Filtrasi

Kolon polietilen diisi dengan buffer posfat 100 mM (pH 8,2) dan bubuk protein A Separose CL-4b secara perlahan-lahan. Hasil penyatuan fraksi pada prosedur 4.3.2.3 sebelumnya diambil 1 mL lalu dimasukkan ke dalam kolom tepat saat permukaan bubuk dibasahi oleh sedikit buffer. Pada saat bubuk telah dilewati sampel tepat pada tanda batas permukaannya, kolom dibilas dengan 1 mL buffer asetat pH 4 (Fase gerak untuk isolasi IgG adalah 3,5-4,0). Fraksi eluen ditampung dan disimpan untuk identifikasi IgG dengan Elektroforesis Gel poliakrilamida Terdenaturasi (SDS-PAGE). Prosedur seperti di atas diulangi dengan menggunakan

pembilas buffer asetat pH 6,0 (Fase gerak untuk isolasi IgM adalah 6,0-7,0). Fraksi eluen hasil dari kolom protein separose CL-4B ditampung dan disimpan untuk identifikasi IgM dengan Elektroforesis Gel poliakrilamida Terdenaturasi (SDS-PAGE).

4.3.2.5. Identifikasi IgG dan IgM dengan Elektroforesis Gel Poliakrilamida Terdenaturasi (SDS-PAGE)

A. Identifikasi IgG

Pada tahap preparasi sampel disediakan 4 tabung (vial) yang bersih dan kering yang telah diberi nomor. Ke dalam masing-masing vial dimasukkan sampel sebagai berikut:

Nomor Vial	Sampel yang dimasukkan	Kode Sampel
1	Sampel IgG /eluen hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi dengan bubuk protein A-separose CL-4B, fase gerak buffer asetat pH 4, ayam yang diberi ransum komersil yang telah mengandung piridoksin dengan dosis normal, dan diberi antagonis piridoksin yaitu deoksipiridoksin dengan dosis 3,0 mg/kg ransum	D1
2	Sampel IgG /eluen hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi dengan bubuk protein A-separose CL-4B, fase gerak buffer asetat pH 4, ayam yang diberi piridoksin dengan dosis normal	K1
3	Sampel IgG /eluen hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi dengan bubuk protein A-separose CL-4B, fase gerak buffer asetat pH 4, ayam yang diberi ransum komersil yang telah mengandung piridoksin dengan dosis normal, dengan tambahan piridoksin 3,0 mg/kg ransum	S1
4	Marker IgG	M.IgG

Ke dalam masing-masing vial dipipet 10 µl sample, kemudian ditambahkan 100 µl "dissociation buffer" dihomogenkan dengan "vortex mixer", didenaturasi dengan pemanasan dalam water bath 80°C selama 3 menit. Selanjutnya ke dalam masing-masing vial ditambahkan dua tetes β-mercapto etanol, dikocok dengan "vortex mixer" dan dipanaskan kembali dalam water bath 80°C selama 5 menit.

Sampel tersebut disimpan di lemari es dan telah siap di "inject" ke dalam sumur-sumur gel poliakrilamida.

Sebanyak 10 µl masing-masing sample dimasukkan ("diinject") ke dalam sumur gel menurut urutan yang telah ditentukan yaitu D1, K1, S1 dan M-IgG. Plat kaca yang berisi gel dan sample dengan hati-hati dimasukkan ke dalam bak elektroforesis SDS-PAGE. Proses elektroforesis dilakukan selama 3 jam hingga warna pelacak mencapai dasar plat kaca. Dengan hati-hati plat kaca diangkat dari bak dan dilakukan pemisahan gel dari plat kaca. Gel difiksasi dengan larutan TCA 12% selama 24 jam dalam bak plastik dan disimpan dalam lemari es.

Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan larutan Comasie Blue R-250 dalam campuran methanol, asam asetat dan aquades dalam bak plastik berisi gel selama 4 jam dan ditempatkan di atas "shaker". Pencucian gel (penghilangan warna) dilakukan dengan larutan pencuci campuran methanol, aquades dan asam asetat (5:4:1) dan ditempatkan di atas "shaker" selama satu jam hingga gel jernih dan nampak pita-pita biru protein. Selanjutnya gel direndam dalam larutan gliserol 1% dan disimpan dalam lemari es.

Untuk menentukan nilai Rf (laju mobilitas) pita-pita protein, maka dilakukan pengukuran jarak pergerakan pita-pita protein dan pewarna pelacak dari tempat awal. Nilai Rf dari protein ditentukan dengan rumus:

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita protein dari tempat awal (cm)}}{\text{Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal (cm)}}$$

Dengan membandingkan nilai Rf Marker IgM G (IgG) dengan nilai Rf sampel, maka pita protein pada sampel dapat diidentifikasi.

Identifikasi IgM.

Pada tahap preparasi sampel disediakan 6 tabung (vial) yang bersih dan kering yang telah diberi nomor/kode. Ke dalam masing-masing vial dimasukkan sampel sebagai berikut:

Nomor Vial	Sampel yang dimasukkan	Kode sampel
1	Sampel IgM /eluen hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi dengan bubuk protein A-separose CL-4B, fase gerak buffer asetat pH 6, ayam yang diberi ransum komersil yang telah mengandung piridoksin dengan dosis normal, dan diberi antagonis piridoksin yaitu deoksipiridoksin dengan dosis 3,0 mg/kg ransum	D2
2	Sampel IgM /eluen hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi dengan bubuk protein A-separose CL-4B, fase gerak buffer asetat pH 6, ayam yang diberi piridoksin dengan dosis normal	K2
3	Sampel IgM /eluen hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi dengan bubuk protein A-separose CL-4B, fase gerak buffer asetat pH 6, ayam yang diberi ransum komersil yang telah mengandung piridoksin dengan dosis normal, dengan tambahan piridoksin 3,0 mg/kg ransum	S2
4	Marker IgM	M.IgM
5	Marker Protein	M.P
6	Marker IgM	M.IgM

Ke dalam masing-masing vial dipipet 10 μ l sample, kemudian ditambahkan 100 μ l "dissociation buffer" dihomogenkan dengan "vortex mixer", didenaturasi dengan pemanasan dalam water bath 80°C selama 3 menit. Selanjutnya ke dalam masing-masing vial ditambahkan dua tetes β -mercapto etanol, dikocok dengan "vortex mixer" dan dipanaskan kembali dalam water bath 80°C selama 5 menit. Sampel tersebut disimpan di lemari es dan telah siap di "inject" ke dalam sumur-sumur gel poliakrilamida.

Sebanyak 10 μ l masing-masing sample dimasukkan ("diinject") ke dalam sumur gel menurut urutan yang telah ditentukan yaitu D2, K2, S2, M-IgM; MP, dan M-IgM. Prosedur pengerjaan selanjutnya sama dengan Prosedur identifikasi IgG sebagaimana dijelaskan sebelumnya. Dengan membandingkan nilai Rf Marker IgM M (IgM) dengan nilai Rf sampel, maka pita protein pada sampel dapat diidentifikasi

4.3.2.6. Penentuan Kadar IgG dan IgM

Untuk menentukan kadar IgG dan IgM secara kuantitatif maka pita IgG dan IgM hasil elektroforesis diambil dan dilarutkan dengan buffer pospat lalu dihomogenizer, selanjutnya dianalisis kadarnya dengan Metode Bradford (Alexander, 1985).

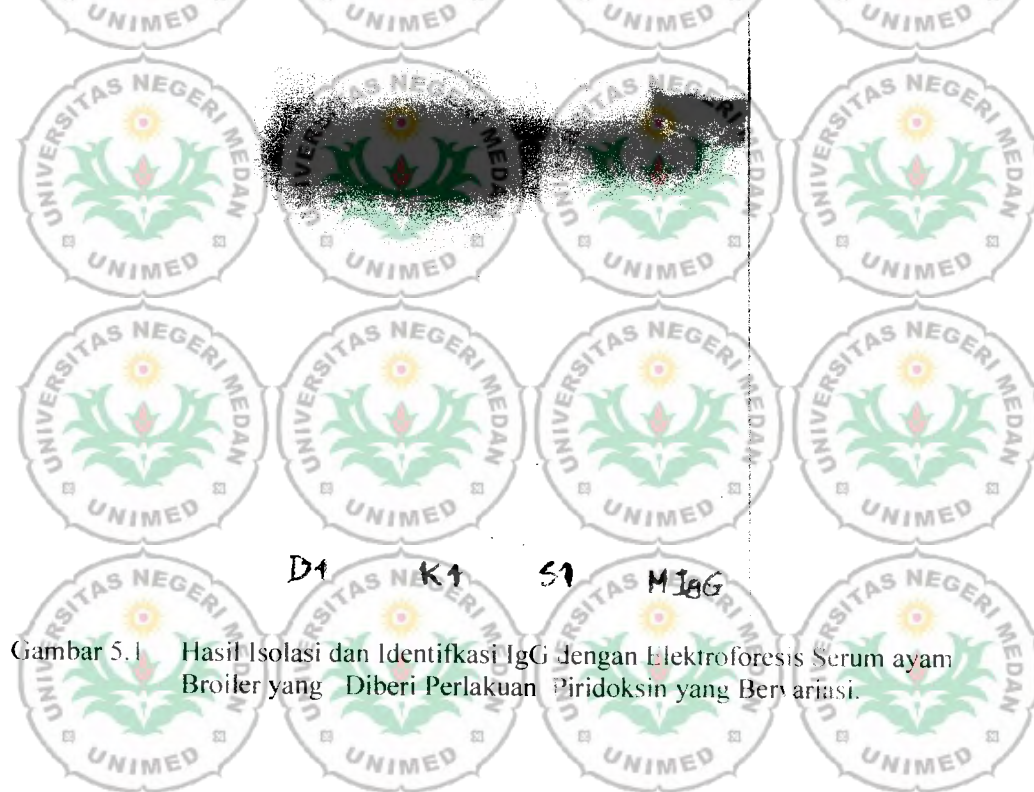
Disiapkan 8 buah tabung reaksi yang bersih dan kering, ke dalam tabung 1 sampai dengan 6 dimasukkan 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; dan 0,8 mL larutan standar BSA dengan konsentrasi berturut-turut: 0 ; 100 ; 200 ; 300 ; 500 dan 1000 mg /mL, ke dalam tabung 7 dan 8 dimasukkan masing-masing 0,2 mL sampel IgG dan IgM hasil isolasi sebelumnya. Selanjutnya ke dalam masing-masing tabung dimasukkan air sehingga volume 0,8mL, kemudian ditambahkan 0,2 reagen Bradford ke dalam masing-masing tabung diaduk dengan mixer dan diinkubasi selama 5 menit pada temperatur kamar. Absorbansinya dibaca pada 595 nm dengan spektrometri 20. Dibuat kurva standar dengan mem-plot konsentrasi vs absorbansi. Kadar IgG dan IgM dapat ditentukan dengan menggunakan kurva standar.

BAB V
HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Isolasi dan Identifikasi IgG dengan Elektroforesis (SDS-PAGE)

Hasil pemisahan fraksi-fraksi protein serum ayam broiler yang diberi piridoksin dengan tingkatan yang bervariasi, menunjukkan bahwa baik pada kelompok defisiensi (D1), Kontrol (K1) maupun kelompok suplementasi (S1) dapat diidentifikasi adanya fraksi Immunoglobulin G (IgG).

Bila diperhatikan fraksi protein yang diperoleh dari sampel IgG / eluen hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi dengan bubuk protein A-separose CL-4B, fase gerak buffer asetat pH 4 serum (Gambar 5.1), untuk setiap perlakuan defisiensi (D1), Kontrol (K1) dan Suplementasi (S1) terlihat bahwa pada semua sampel diperoleh pita tunggal. Berdasarkan perbandingan Rf sampel terhadap Rf marker IgG (M-IgG) sebagaimana disajikan pada Tabel 5.1 dapat dipastikan bahwa pita tunggal tersebut adalah Immunoglobulin G (IgG).



Gambar 5.1 Hasil Isolasi dan Identifikasi IgG dengan Elektroforesis Serum ayam Broiler yang Diberi Perlakuan Piridoksin yang Bervariasi.

Keterangan :

- D1 : Sampel /hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi, ayam Defisiensi Piridoksin
K1 : Sampel /eluen hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel, ayam yang diberi piridoksin dengan dosis normal
S1 : Sampel /eluen hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi ayam yang diberi suplementasi piridoksin 3,0 mg/kg ransum
M-IgG : Marker IgG

Tabel 5.11 Nilai Laju mobilitas (Rf) Fraksi Protein IgG serum ayam yang diberi perlakuan Piridoksin yang bervariasi:

Kode sampel	a (cm)	Rf (a/b)
D1	5,5	0,78
K1	5,5	0,78
S1	5,5	0,78
MIGG	5,1	0,73

Def : a = Jarak pergerakan pita protein dari tempat awal (cm)

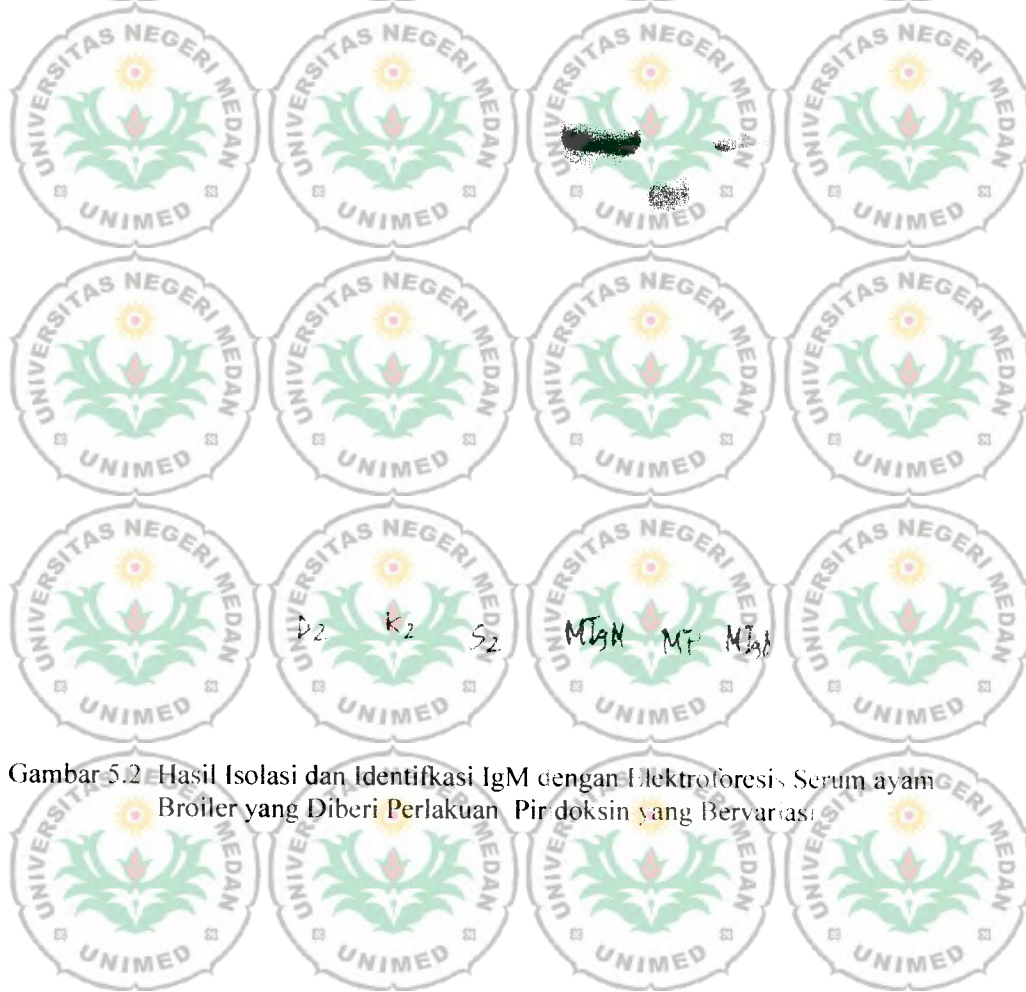
b = Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal (7 cm)

Dari hasil pemisahan dengan teknik elektroforesis untuk sampel-sampel serum yang terlebih dahulu difraksinasi dengan kromatografi gel filtrasi D1, K1, dan S1 diperoleh masing-masing satu pita protein yang diidentifikasi sebagai Immunoglobulin G (IgG). Untuk perlakuan serum ayam broiler yang mengalami defisiensi piridoksin (D1) kelihatan pita protein IgG yang sangat tipis dibandingkan terhadap pita protein IgG kelompok kontrol (K1) dan suplementasi (S1). Kemungkinan perbedaan dalam hal kesempurnaan susunan dan ketebalan pita fraksi IgG untuk masing-masing kelompok perlakuan piridoksin tersebut juga ada hubungannya dengan perbedaan konsentrasi IgG yang diperoleh dalam penelitian ini.

5.2. Hasil Isolasi dan Identifikasi IgM dengan Elektroforesis (SDS-PAGE)

Hasil pemisahan fraksi-fraksi protein serum ayam broiler yang diberi piridoksin dengan tingkatan yang bervariasi, menunjukkan bahwa baik pada kelompok defisiensi (D2), Kontrol (K2) maupun kelompok suplementasi (S2) dapat diidentifikasi adanya fraksi Immunoglobulin M (IgM).

Bila diperhatikan fraksi protein yang diperoleh dari sampel IgM /eluen hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi dengan bubuk protein A-separose CL-4B, fase gerak buffer asetat pH 6 serum (Gambar 5.2), untuk setiap perlakuan defisiensi (D2), Kontrol (K2) dan Suplementasi (S2) terlihat bahwa pada semua sampel diperoleh pita tunggal. Berdasarkan perbandingan Rf sampel terhadap Rf marker IgM (M-IgM) sebagaimana disajikan pada Tabel 5.2 dapat dipastikan bahwa pita tunggal tersebut adalah Immunoglobulin M (IgM).



Gambar 5.2 Hasil Isolasi dan Identifikasi IgM dengan Elektroforesis Serum ayam Broiler yang Diberi Perlakuan Piridoksin yang Bervariasi

Keterangan :

- D2 : Sampel /hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi, ayam Defisiensi Piridoksin
 K2 : Sampel /eluen hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel, ayam yang diberi piridoksin dengan dosis normal
 S2 : Sampel /eluen hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi gel filtrasi ayam yang diberi suplementasi piridoksin 3,0 mg/kg ransum
 M-IgM : Marker IgM
 M-P : Marker Protein
 M-IgM : Marker IgM

Tabel 5.2. Nilai Laju Mobilitas (Rf) Fraksi Protein IgM serum ayam yang diberi Perlakuan Piridoksin yang bervariasi

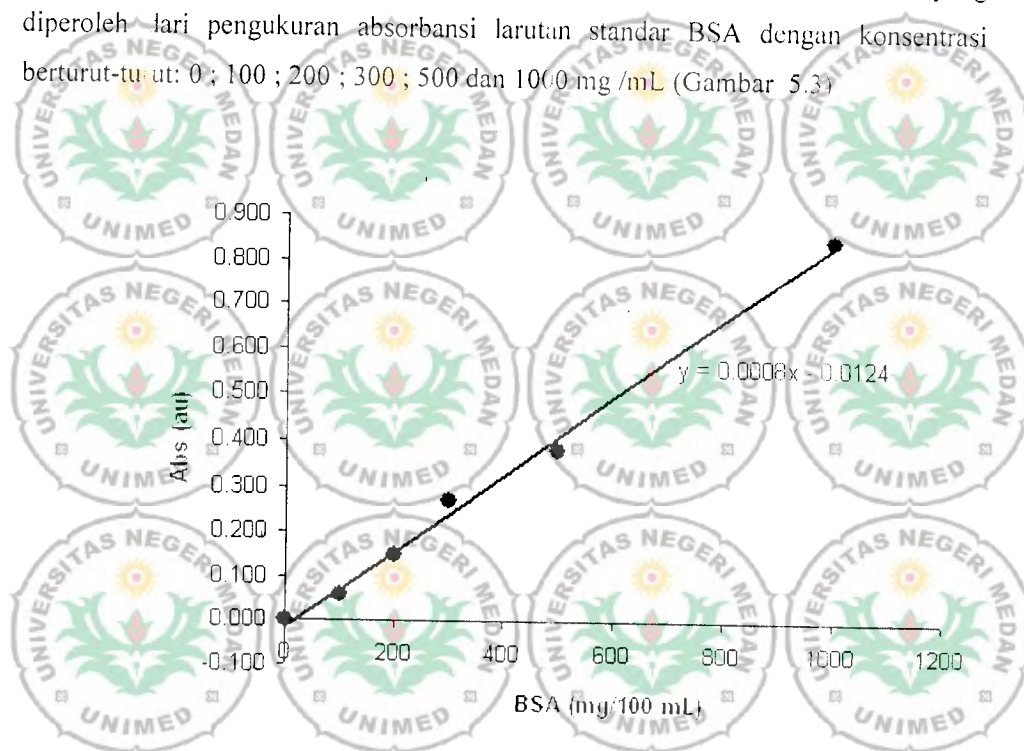
Nomor Pita	KODE SAMPEL											
	D2		K2		S2		MIgM		MP		MIgM	
	a	Rf	a	Rf	a	Rf	a	Rf	a	Rf	a	Rf
1	-	-	-	-	-	-	-	-	3,5	0,48	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6	0,50	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	4,2	0,58	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	4,6	0,63	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	5,5	0,76	-	-
6	6,1	0,84	6,1	0,84	6,1	0,84	6,3	0,87	6,3	0,87	6,3	0,87
7	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5	0,90	-	-

Ket a = Jarak pergerakan pita protein dari tempat awal (cm)
 b = Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal (7,2 cm)

Dari hasil pemisahan dengan teknik elektroforesis untuk sampel-sampel serum yang terlebih dahulu difraksinasi dengan kromatografi gel filtrasi D2, K2, dan S2 diperoleh masing-masing satu pita protein diidentifikasi sebagai IgM. Untuk perlakuan serum ayam broiler yang mengalami defisiensi piridoksin (D2) kelihatan pita protein IgM yang sangat tipis dibandingkan dengan pita protein IgM kelompok kontrol (K2) dan suplementasi (S2). Kemungkinan perbedaan dalam hal kesempurnaan susunan dan ketebalan pita fraksi IgM untuk masing-masing kelompok perlakuan piridoksin tersebut juga ada hubungannya dengan perbedaan konsentrasi IgM yang diperoleh dalam penelitian ini.

5.3. Kadar IgG dan IgM Serum

Untuk penentuan kadar IgG dan IgM serum, digunakan kurva standar yang diperoleh dari pengukuran absorbansi larutan standar BSA dengan konsentrasi berturut-turut: 0 ; 100 ; 200 ; 300 ; 500 dan 1000 mg /mL (Gambar 5.3)



Gambar 5.3. Kurva Standar Penentuan Kadar IgG dan IgM Sampel

Data Kadar IgG dan IgM Serum Ayam Broiler Pada Kondisi Piridoksin Defisiensi, normal dan Suplementasi yang diperoleh dalam penelitian ini disajikan pada **Lampiran 2** dan **Lampiran 3**. Selanjutnya, rataan kadar IgG dan IgM serum ayam broiler untuk setiap perlakuan piridoksin disajikan dalam Tabel 5.3.

Dari hasil uji statistik dengan sidik ragam (**Lampiran 4** dan **Lampiran 5**) disimpulkan bahwa H_0 ditolak yang berarti ada pengaruh piridoksin terhadap kadar IgG dan IgM serum ayam broiler ($P < 0.05$). Selanjutnya dengan uji BNT disimpulkan bahwa pada kondisi defisiensi piridoksin diperoleh kadar IgG dan IgM serum yang paling rendah. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini sesuai dengan penelitian Bawn dan Pike (1960), yang mendapatkan bahwa kadar τ -globulin dan total τ -globulin yang beredar pada tikus defisiensi piridoksin rendah dibandingkan dengan tikus kontrol. Hal ini juga mendukung penelitian sebelumnya (Silitonga,

1996), di mana telah dibuktikan bahwa piridoksin berpengaruh nyata terhadap kadar Immunoglobulin serum, kadar DNA dan RNA organ bursa Fabricus. Defisiensi piridoksin memberikan kadar IgM, DNA dan RNA paling rendah sebaliknya suplementasi piridoksin dengan dosis 3,0 mg/kg ransum memberikan kadar Immunoglobulin yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok defisiensi.

Tabel 5.3. Rataan Kadar IgG dan IgM Serum Ayam Broiler yang diberi perlakuan dengan tingkat Piridoksin yang Bervariasi.

Peubah	Tingkat Piridoksin		
	Defisiensi	Normal	Suplementasi
Kadar Immunoglobulin G (IgG) serum (mg/100 ml)	238,96 ± 1,66 ^a	355,84 ± 1,66 ^b	467,41 ± 2,50 ^c
Kadar Immunoglobulin M (IgM) serum (mg/100 ml)	109,09 ± 1,66 ^{aa}	191,14 ± 2,50 ^{bb}	218,88 ± 5,0 ^{cc}

Keterangan : *Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata untuk kadar IgG dan IgM (P < 0,05)*

Dalam penelitian ini ditemukan bahwa suplementasi piridoksin dengan dosis 3,0 mg/kg ransum memberikan kadar IgG dan IgM yang masih berada dalam kisaran normal walaupun relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kadar IgG dan IgM pada kondisi defisiensi dan kondisi normal. Diduga suplementasi piridoksin dengan dosis 3,0 mg/kg ransum belum mencukupi untuk memacu laju sintesis IgG dan IgM hingga batas kadar optimum, tetapi harus diberikan dalam dosis tinggi.

Dengan adanya fakta-fakta bahwa pada kondisi piridoksin diperoleh kadar Immunoglobulin (IgG dan IgM) serum yang paling rendah, maka dapat disimpulkan bahwa piridoksin berperan penting dalam biosintesis Immunoglobulin baik IgG maupun IgM. Berbagai pendapat dan hipotesis telah diajukan para peneliti sehubungan dengan adanya bukti-bukti keterlibatan vitamin B6 dalam kekebalan tubuh. Menurut Montjar (1965), menurunnya laju sintesis antibodi pada hewan yang diberi ransum defisiensi vitamin B6 merupakan akibat lanjutan dari terganggunya sintesis m-RNA pada hewan tersebut. Trakatellis (1992) menyatakan bahwa menurunnya aktivitas enzim serin hidroksimetil transferase (SHMT) sebagai akibat defisiensi piridoksin merupakan kunci utama terganggunya sistem kekebalan tubuh.

dan memperkembangkan sel. Diduga, terganggunya sintesis immunoglobulin merupakan akibat lanjutan dari ketidak aktifan enzim SHMT dalam kondisi defisiensi piridoksin. Alternatif skema mekanisme keterlibatan piridoksin dalam biosintesis immunoglobulin adalah sebagaimana diperlihatkan pada gambar 5.4.



Gambar 5.4. Skema mekanisme pengaruh piridoksin terhadap biosintesis Immunoglobulin.

Untuk dapat bekerja sebagai katalis, enzim serin hidroksi metil transferase (SHMT) sangat tergantung dari keberadaan koenzim piridoksal posfat. Enzim SHMT berperan dalam pengubahan serin menjadi glisin dan unit C-1 yang dibutuhkan untuk sintesis nukleotida (purin dan pirimidin). Dengan demikian, defisiensi vitamin B6 akan menurunkan aktivitas SHMT yang pada gilirannya akan mengurangi laju sintesis unit C-1 dan akan mempengaruhi sintesis DNA dan m-RNA. Gangguan atau hambatan pada proses memperkembangkan sel-sel sebagai akibat dari ketidakcukupan DNA dan menurunnya produksi m-RNA mempunyai konsekuensi logis terhadap menurunnya sintesis immunoglobulin baik IgG maupun IgM sebagaimana ditemukan dalam penelitian ini.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil-hasil yang diperoleh dalam penelitian ini maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut.

1. Piridoksin berpengaruh secara nyata terhadap biosintesis IgG dan IgM.
2. Ada perbedaan yang signifikan kadar IgG dan IgM serum pada kondisi defisiensi, normal dan kondisi piridoksin berlebih. Kadar IgG dan IgM pada subjek yang mengalami defisiensi piridoksin lebih rendah dibandingkan dengan subjek yang diberi piridoksin dengan dosis normal dan berlebih.
3. Rataan kadar IgG pada serum ayam broiler dengan kondisi piridoksin defisiensi, normal dan yang diberi suplementasi 3.0 mg/kg ransum, berturut-turut sebesar $238,96 \pm 1,66$; $355,84 \pm 1,66$ dan $467,41 \pm 2,50$ mg/100 mL. Rataan kadar IgM serum berturut-turut sebesar $109,09 \pm 1,66$; $191,14 \pm 2,50$ dan $218,88 \pm 5,01$ mg/100 mL.

6.2. Saran

Berdasarkan temuan penelitian ini, maka disarankan:

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan yang komprehensif tentang pengaruh piridoksin terhadap biosintesis sub-sub kelas IgG yaitu IgG1, IgG 2 dan IgG 3 pada subjek yang sama, karena tiap sub kelas berbeda dalam hal susunan asam amino dan berat molekulnya, sekaligus berbeda juga sifat-sifat biologisnya.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui dosis piridoksin yang tepat untuk disuplementasikan pada ransum sehingga dapat memberikan pengaruh yang optimal dalam meningkatkan kadar IgG maupun IgM.

dibandingkan dengan subjek yang diberi piridoksin dengan dosis normal dan berlebih. Selanjutnya telah diperoleh bahwa rata-rata kadar IgG pada serum ayam broiler dengan kondisi piridoksin defisiensi, normal dan yang diberi suplementasi 3.0 mg/kg ransum, berturut-turut sebesar $238,96 \pm 1,66$; $355,84 \pm 1,66$ dan $467,41 \pm 2,50$ mg/100 mL. Rata-rata kadar IgM serum berturut-turut sebesar $109,09 \pm 1,66$; $191,14 \pm 2,50$ dan $218,88 \pm 5,01$ mg/100 mL.

Selubungan dengan hasil yang diperoleh dalam penelitian, masih perlu dilakukan penelitian lanjutan yang komprehensif tentang pengaruh piridoksin terhadap biosintesis sub-sub kelas IgG yaitu IgG1, IgG2 dan IgG3 pada subjek yang sama, karena tiap sub kelas berbeda dalam hal susunan asam amino dan berat molekulnya, sekaligus berbeda juga sifat-sifat biologisnya. Disamping itu perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui dosis piridoksin yang tepat untuk disuplementasikan pada ransum sehingga dapat memberikan pengaruh yang optimal dalam meningkatkan kadar IgG maupun IgM.

Ucapan Terima kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pimpinan Proyek Penelitian Fundamental Direktorat Pendidikan Tinggi Depdiknas yang telah menyediakan dana sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan.

Daftar Pustaka

- A.A.K. 1991. *Beternak Ayam Pedaging*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Alexander, R.R., J.M. Griffiths dan M.L. Wilkinson. 1985. *Basic Biochemical Methods*. Jhon Wiley & Sons. New York.
- Axelrod, A.E., B.B. Carter, R.H. McCoy dan R. Geisinger. 1947. Circulating antibodies in vitamin - deficiency states: Pyridoxine, Riboflavin and Pantothenic deficiencies. *Roc.Soc. Exp. Biol. And Med.* 66: 137- 140.
- Beaton, J.R., J.L. Beare, J.M. White and E.W. McHenry. 1953a. Studies on vitamin B6: Biochemical changes in vitamin B6 deficiency in rat. *J. Biol. Chem.* 201: 587 - 721.
- Beisel, W.R. 1982. Single nutrients and immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 417 - 418
- Bell, D.J., and B.M. Freeman. 1971. *Physiology and Biochemistry of the Domestic*

- Brown, M.L., and R.L. Pike. 1960. Blood volume and serum protein in deoxy pyridoxine – fed rat during pregnancy. *J. Nutr.* 71: 191 – 199
- Cheslock, K.E., and M.T. McCully. 1960. Response of human beings to a low-vitamin B6 diet. *J. Nutr.* 70: 507 – 513.
- Chen, H., X. Mai., W.Zhang., Z.Liufu., W. Xu and B.Tan. 2005. Effects of dietary pyridoxine on immune responses in abalone, *haliotis discus hannai* ino. *Fish and Shellfish Immunology.* 19 (3) :241-252
- Conn, E.E. P.K. Stumpf, G. Bruening and R.H. Doi. 1987. *Outlines of Biochemistry.* John Wiley & Sons New York
- Cooper, M.D., M.E. Swartz and R.A. Good. 1966. Retoration of gamma globulin production in a gammaglobulinemia in chikens. *Science.* 151: 471.
- Daghir, N. and M.A. Shah. 1973. Effect of dietary protein level on vitamin B6 requirements of chicks. *Poultry Sci.* 52: 1247 – 1252.
- Debes, S.A., and A. Kirskey. 1979. Infulence of dietary pyridoxine on selected immune capacities of rat dams and pups. *J. Nurt.* 109: 744 – 753
- Ensminger, M.E., J.E. Oldfield and W.W. Heieman. 1990. *Feeds & Nutrition.* 2nd ed. The Ensminger Publishing Company. Clovis – USA.
- Freed, M. 1966. *Methods of vitamin Assay,* Inter – Science Publishers. New York.
- Goodman, J. W. Immunoglobulins I: *Structure & Function in States,* D. J.D. Stobo and J.V. Wells. 1987. Basic and Clinical immunology. 6th.ed. Appleton & Lange. Los Altos – California.
- Gries, C.L., and M.L. Scott. 1972. The pathology of pyridoxine deficiency in chicks. *J. Nutr.* 102: 1259 – 1268.
- Hames, B.D. and D. Rickwood. 1990. *Gel Electrophoresis of protein: A practical Aproch.* IRL Press. Oxford.
- Heard, G.S., and E.F. Annison. 1986. Gastrointestinal absorption of vitamin B6 in the chicken (*Gallus demseticus*). *J. Nutr.* 116: 107 – 120.
- Herbert, W.J. 1970. *Veterinary immunology,* Blackwell Scientifications. Oxford.
- Hodges, R.E. W.B. Bean., M.A. Ohlson and R.E. Bleiler. 1962a. Factors affecting human antibody response: IV. Pyridoxine Deficiency *Am. J. Clin. Nutr.* 11: 180-186

- Hodges, F.E., W.B. Bean., M.A. Ohlson and R.E. Bleiler. 1962b. Factors affecting human antibody response: V. Combined deficiencies of panthothenic acid and pyridoxine. *Am. J. Clin. Nutr.* **11**: 1210 – 1222.
- Ink, S.L., and L.M. Henderson. 1984. Vitamin B6 metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* **4**: 451 – 470.
- Khare, M.L., S. Kumar and J. Grun. 1996. Immunoglobulins of the chicken Antibody to Newcastle Disease Virus (Muktewwar and F Strain). *Poultry Sci.* **55**: 152-159.
- Kresno, S.B. 1984. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Kumar, M., and A.E. Axelrod. 1968. Cellular antibody synthesis in vitamin B6 – deficient rats. *J. Nutr.* **96**: 53 -59.
- Lehninger, A.L. 1982. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc
- Litman, G. And R. Good. 1998. *Immunoglobulins*. Pelenum Medical book Company, New York and London.
- Mackenzie, D.C. 1990. *Technical Requirements for Amino Acid and Protein Structure*. IPB – Australia
- Martin, D.W., P.A. Mayes, V.W. Rodwell and D.K. Granner. 1985. *Harper's Review of Biochemistry*. (Iyan Darmawan). Penerbit E.G.C. Jakarta.
- Metzler, D.E. 1977. *Biochemistry "The chemical Reactions of Living Cells"*. Academic Press. New York.
- Montjar, M., A.E. Axelrod and A.C. Trakatellis. 1965. Effect of pyridoxine deficiency upon polysomes and messenger RNA of rats tissues. *J. Nutr.* **85**: 45-51.
- Murtidjo, B.A. 1990. *Pedoman Beternak Ayam Broiler*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Roitt, I.M. 1980. *Essential Immunology*. 4thed. Blacwell Scientific Publications, Oxford
- Scott, M.L. M.C. Neishem and R.J. Young., 1982. *Nutrition of the chickens*. 3rded. M.L. Scott & Associates. Ithaca, New York.
- Sikar, S.H.S. 1987. *Peranan Bursa Fabricius Dalam Produksi Antibodi Terhadap Antigen NDV Pada Ayam Kampung dan White Leghorn*. Disertasi. Fakultas Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Silitonga, P.M. 1992. *Pengaruh Piridoksin Terhadap Sintesis Antibodi Pada Ayam Broiler*. MS – Thesis, Institut Pertanian Bogor.

Silitonga, P.M., M.Simorangkir dan M.Silitonga. 1996. *Pengaruh Piridoksin Terhadap Kadar Immunoglobulin, DNA dan RNA Pada Ayam Broiler*, Laporan Hasil Penelitian Proyek PPTG-Dikti-Depdikbud.

Stoerk, F.C., and H.N. Eisen. 1946. Suppression of circulating antibodies in pyridoxine deficiency. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 62: 88 – 89.

Talbott, M.C., L.T. Miller and N.L. Kerkvliet. 1987. Pyridoxine supplementation: Effect on lymphocyte responses in elderly persons. *Am. J. Clin. Nutr.* 46: 659 – 664.

Tizard, I.F. 1982. *An Introduction to Veterinary Immunology*. (M. Partodiredjo, cs). Penerbit Universitas Airlangga, Surabaya.

Trakatellis, A.C., and A.E. Axelrod. 1965. Effect of pyridoxine deficiency on nucleic acid metabolism in the rat. *Biochem. J.* 95: 344 – 349.

Trakatellis A.C., A.Dimitriadou., M.Exindari., J.Scountzou., G.Koliakos., D.Christodoulou., N. Malissiovas., A.Antoniadis and T.Polyzoni. 1992. Effect of pyridoxine deficiency on immunological phenomena. *Postgrad Med J.* 68 Suppl 1: 570-577.

Tucker, H.A. 1964. Influence of Number of Suckling Young on Nucleic Acid Content of Lactating Rat mammary gland. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116: 318 – 320.

Wahju, J. 1988. *Ilmu Nutrisi Unggas*. Gajahmada University Press, Yogyakarta.

Weiss, F.G. and M.L. Scott. 1979. Influence of vitamin B6 upon reproduction and upon plasma and egg cholesterol in chickens. *J. Nutr.* 109: 1010 – 1017.

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS NEGERI MEDAN
(STATE UNIVERSITY OF MEDAN)
LEMBAGA PENELITIAN
(RESEARCH INSTITUTE)

Jl. W. Iskandar Psr. V-kotak Pos No.1589 – Medan 20221 Telp. (061) 6636757, 6614002, 6613319.e-mail:lpunimed@
Indo.net.Id

SURAT PERJANJIAN KERJA
No. 147/H33.8/KEP/PL/2008

Pada hari ini Senin tanggal empat belas bulan April tahun dua ribu delapan, kami yang bertanda tangan di bawah ini:

1. Dr. Ridwan A. Sani, M Si :Ketua Lembaga Penelitian Universitas Negeri Medan, dan atas nama Rektor Unimed, dan dalam perjanjian ini disebut PIHAK PERTAMA.
2. Drs. P. Maulim Silitong, MS :Dosen FMIPA bertindak sebagai Peneliti/Ketua pelaksana penelitian, selanjutnya disebut PIHAK KEDUA.

Kedua belah pihak secara bersama-sama telah sepakat mengadakan Surat Perjanjian Kerja (SPK) untuk melakukan penelitian sebagai berikut

Pasal 1

Berdasarkan SP2HP Tahun Anggaran 2008 DP2M Dirjen Dikti Depdiknas, tanggal 6 Maret 2008 Nomor : 003/SP2H/PP/DP2M/III/2008, PIHAK PERTAMA memberi tugas kepada PIHAK KEDUA dan PIHAK KEDUA menerima tugas tersebut untuk melaksanakan/mengkoordinasi pelaksanaan penelitian Fundamental, berjudul :

”Pengaruh Piridoksin Terhadap Bosintetis Immunoglobulin G (IgG) dan Immunoglobun M (IgM).”

Yang berada di bawah tanggung jawab/yang diketahui oleh : PIHAK KEDUA dengan masa kerja 8 (delapan) bulan, terhitung sejak diterbitkannya SP2H Dirjen Dikti dan SPK ini ditanda tangani .

Pasal 2

1. PIHAK PERTAMA memberikan dana penelitian tersebut pada pasal 1 sebesar Rp. 30.000.000,- (Tiga puluh juta rupiah) dilaksanakan secara bertahap.
2. Tahap pertama sebesar 70% yaitu Rp.21.000.000,- (Dua puluh satu juta rupiah) dibayarkan sewaktu Surat Perjanjian Kerja ini ditandatangani oleh kedua belah pihak.
3. Tahap kedua sebesar 30% yaitu Rp.9.000.000,- (Sembilan juta rupiah) dibayarkan setelah PIHAK KEDUA menyerahkan laporan hasil penelitian kepada PIHAK PERTAMA.

Pasal 3

1. PIHAK KEDUA mengajukan/menyerahkan rincian anggaran biaya (RAB) pelaksanaan penelitian sesuai dengan besarnya dana penelitian yang telah disetujui oleh Dikti dan alokasi dana mengikuti peraturan yang berlaku
2. Semua kewajiban yang berkaitan dengan pengelolaan keuangan dan aset Negara termasuk kewajiban memungut dan menyetorkan pajak dibebankan kepada PIHAK KEDUA.

Pasal 4

1. PIHAK KEDUA harus menyelesaikan penelitian serta menyerahkan laporan hasil penelitian Fundamental kepada PIHAK PERTAMA sebagaimana yang dimaksud dalam pasal 1 (selambat-lambatnya 1 Nopember 2008) sebanyak 8 (delapan) eksemplar, dalam bentuk "Hard Copy" disertai dengan 2 (dua) buah file elektronik "Soft Copy" yang berisi laporan hasil penelitian dan naskah artikel ilmiah hasil penelitian dalam bentuk Compact disk (CD).
2. Sebelum laporan akhir penelitian diselesaikan, PIHAK KEDUA melakukan diseminasi hasil penelitiannya melalui forum yang dikoordinasikan oleh Lembaga Penelitian UNIMED yang pembiayaannya dibebankan kepada PIHAK KEDUA.
3. Bahan Seminar dimaksud disampaikan ke Lembaga Penelitian Unimed sebanyak 5 (lima) eksemplar, diketik satu setengah spasi ukuran kuarto, disertai file elektronik dalam format MICROSOFT WORD.
4. Bukti Pengeluaran keuangan menjadi arsip pada PIHAK KEDUA atau PIHAK LAIN yang berkepentingan sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Pasal 5

1. Apabila PIHAK KEDUA tidak dapat menyelesaikan pelaksanaan penelitian Fundamental sesuai dengan pasal 1 di atas, maka PIHAK KEDUA wajib menyerahkannya kepada pengganti yang dianggap mampu menyelesaikannya.
2. Apabila sampai batas waktu masa penelitian ini berakhir PIHAK KEDUA belum menyerahkan hasil penelitian kepada PIHAK PERTAMA, maka PIHAK KEDUA dikenakan denda sebesar 1% perhari dan setinggi-tingginya 5% dari seluruh jumlah dana penelitian yang diterima sesuai dengan pasal 2.
3. Bagi peneliti yang tidak dapat menyelesaikan kewajibannya dalam tahun anggaran berjalan dan proses pencairan Biaya telah berakhir, maka seluruh dana yang belum cair yang belum sempat dicairkan dinyatakan hangus dan PIHAK KEDUA harus membayar denda sebagaimana tersebut diatas kepada Kas Negara.
4. Dalam hal PIHAK KEDUA tidak dapat memenuhi perjanjian pelaksanaan penelitian Fundamental PIHAK KEDUA wajib mengembalikan dana penelitian yang telah diterima kepada PIHAK PERTAMA untuk selanjutnya disetorkan kembali ke Kas Negara.

Pasal 6

Laporan hasil penelitian yang tersebut dalam pasal 4 harus memenuhi ketentuan sbb:

- a. Bentuk kuarto
- b. Warna cover disesuaikan dengan ketentuan yang ditetapkan Dirjen Dikti
- c. Dibawah bagian kulit/cover depan ditulis : Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Dosen Muda, Fundamental, Hibah Bersaing dan Hibah Pasca Nomor : 003/SP2H/PP/DP2M/III/2008 6 Maret 2008.
- d. Dibagian dalam lembar pengesahan laporan akhir dituliskan Surat Perjanjian Kerja (SPK) di bawah point 3 (Pendanaan dan jangka penelitian) Nomor : 148/H33.8/KEP/PL/2008 tanggal 14 April 2008.

Pasal 7

Hak Cipta penelitian tersebut ada pada PIHAK KEDUA, sedangkan untuk penggandaan dan penyebaran laporan hasil penelitian berada dalam PIHAK PERTAMA.

Pasal 8

Surat perjanjian kerja ini dibuat rangkap 5 (lima), dimana dua buah diantaranya dibubuhi materai sesuai dengan ketentuan yang berlaku yang pembiayaannya dibebankan kepada PIHAK KEDUA, satu rangkap untuk PIHAK PERTAMA, satu rangkap untuk PIHAK KEDUA, dan selainnya akan digunakan bagi pihak yang berkepentingan untuk diketahui.

Hal-hal yang belum diatur dalam Surat Perjanjian Kerja ini akan ditentukan kemudian oleh kedua belah pihak.

PIHAK PERTAMA
Drs. KHANVAH A. Sami, M.Si
NIP. 131772674

PIHAK KEDUA

Drs. P. Maulim Silitong, MS
NIP. 131477049