

LAMPIRAN

Lampiran 1. Bahan Pembuatan Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Elektrophoresis (SDS-PAGE)

- (1). *Acrylamide* 30%
 - Acrylamide : 14.5 g
 - Bis-acrylamide: 0.25 g
 - dH2O : 30 ml
- (2). *Tris HCL* (BM : 157.64) 1.5 M pH 8.8
 - Tris HCL : 11.82 g
 - dH2O : 50 ml
 - Adjust pH harus tepat
- (3). *Tris HCL* 1 M pH 6.8
 - Tris HCL : 3.152 g
 - dH2O : 20 ml
- (4). *SDS* 10%
 - SDS : 1 g
 - dH2O : 10 ml
- (5). *APS* 10%
 - APS : 0.1 g
 - dH2O : 1 ml
- (6). *Running Buffer* pH 8.8
 - Tris base : 3.03 g
 - Gliserine : 14.2 g
 - SDS : 1 g
 - dH2O : 100 ml
 - Pemakaian RB maksimal 4X
- (7). *Staining Solution*
 - Comasive Brilliant Blue : 3.03 g
 - Methanol : 40 g
 - Asam asetat glasial: 10 %
 - dH2O add 100 ml add 500 ml
- (8). *Destaining Solution*
 - Methanol 20%: 100 g
 - As.asetat glasial 10% : 50g
 - dH2O add : 500 ml
- (9). *RSB*
 - Tris HCL pH 6.8: 1 g
 - Gliserol 100%: 0.8 ml
 - SDS 10% : 1.6 ml
 - β mercapto etanol: 0.4 ml
 - Bromophenol Blue 1 % : 0.2 ml
 - Aquadest : 4 ml Total 8 ml
- 10). *PBS*
 - Dengan NaCl
 - NaCl : 8.473 g
 - Na2HPO4 : 1.779 g
 - NaH2PO4 : 1.379 g
 - Aquades : 1000 ml
 - pH7.4

Pembuatan Elektrophoresis Gel 12.5%

Lower	1 Slab (µl)
Acryl 30%	2063
Tris HCL 1.5 M, pH 8.8	1250
dH2O	1637
SDS 10%	50
APS 10%	50
Temed	10

Upper	1 Slab (µl)
Acryl 30%	257.5
Tris HCL 1.5 M, pH 8.8	312.5
dH2O	662.5
SDS 10%	12.5
APS 10%	3.75
Temed	2.5

Lampiran 2. Cara Perhitungan Berat Molekul

- Menghitung panjang separating gel (cm)
- Menghitung jarak pita-pita protein marker dari separating gel (cm)
- Menghitung pergerakan masing-masing pita protein marker (Rf) sebagai X dengan rumus :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pita protein}}{\text{Panjang separating gel}}$$

- Mencari logaritma dari berat molekul protein (Y) dalam marker

Marker PRO-STAIN™

Panjang separating: 6.7cm

No	Jarak Band	RF(x)	BM (dalton)	log BM (y)
1	0.1	0.014925	198,000	5.29666519
2	0.2	0.029851	115,000	5.06069784
3	0.6	0.089552	90,500	4.956648579
4	1.2	0.179104	61,500	4.788875116
5	1.6	0.238806	46,200	4.664641976
6	2.1	0.313433	37,800	4.5774918
7	2.9	0.432836	26,000	4.414973348
8	3.8	0.567164	18,500	4.267171728
9	4.9	0.731343	9,000	3.954242509

- Mencari persamaan dari X dan Y

$$Y = 5.35106922 - 1.3209278X$$

- Menghitung Rf untuk masing-masing pita protein sampel
- Mencari Y (log BM sampel) dari persamaan di atas
- Mencari BM sampel dengan rumus 10^Y .

Tabel data berat protein CP *Vibrio alginolyticus*

Panjang separating 6,7 cm

Pita Protein	Jarak Band	RF (X)	log BM (Y)	BM
Pita 1	0.7	0.104478	4.968512599	93,006.35
Pita 2	0.8	0.119403	4.943871096	87,876.17
Pita 3	1.2	0.179104	4.845305084	70,033.38
Pita 4	1.5	0.223881	4.771380575	59,071.85
Pita 5	1.7	0.253731	4.722097569	52,734.83
Pita 6	1.9	0.283582	4.672814563	47,077.63
Pita 7	2.2	0.328358	4.598890054	39,709.10
Pita 8	2.5	0.373134	4.524965545	33,493.89
Pita 9	2.5	0.373134	4.524965545	33,493.89
Pita 10	2.7	0.402985	4.475682539	29,900.78
Pita 11	3	0.447761	4.40175803	25,220.75
Pita 12	3.4	0.507463	4.303192019	20,099.81
Pita 13	3.7	0.552239	4.22926751	16,953.82
Pita 14	4	0.597015	4.155343001	14,300.23
Pita 15	4.3	0.641791	4.081418492	12,061.98



Lampiran 3. Perhitungan konsentrasi protein imunogenik 47,077 kDa *Vibrio alginolyticus* untuk uji klinis

a. Konsentrasi protein imunogenik 47,077 kDa *Vibrio alginolyticus*

Protein imunogenik	Absorbasnsi	Konsentrasi (mg/ml)
47,077 kDa <i>V. alginolyticus</i>	2.092	2.092

→ Konsentrasi protein imunogenik 3,27 mg/ml = 3270 µg/ml

a. Dosis penyuntikan dalam uji klinis adalah 33,3 µg/ 150 g ikan

b. Mencari pengenceran masing-masing protein imunogenik hingga didapatkan konsentrasi 33,3 µg dalam 0,1 ml, protein diencerkan dalam Tris HCl 0,5 N pH 8,6.

→ Jika 0,1 ml/ikan = 33 µg
 → maka 1 ml/ ikan = a
 → sehingga 1/0,1 = a/33
 a = 10 x 33
 = 330 µg / ml

Jika volume yang dibuat = 100 µl = 0,1 ml maka protein imunogeniknya:

$$\begin{aligned}
 3270 \mu\text{g/ml} * \alpha &= 0,1 \text{ ml} * 330 \mu\text{g/ml} \\
 \alpha &= \frac{33 \mu\text{g}}{3270 \mu\text{g/ml}} \\
 &= 0,01009 \text{ ml} \\
 &= 10,09 \mu\text{l}
 \end{aligned}$$

- c. Pada pembosteran pertama perbandingan protein imunogenik dengan Adjuvan CFA mempunyai perbandingan 1:1 dan pada pembosteran kedua perbandingan protein imunogenik dengan Adjuvan IFA mempunyai perbandingan 1:1.

Protein 10,09 μ l + tris HCL 39,91 + 50 μ l CFA

Protein 10,09 μ l + tris HCL 39,91 + 50 μ l IFA



