

PROFIL PROTEIN VAKSIN *Aeromonas hydrophila* DAN *Streptococcus agalactiae* HASIL INAKTIVASI DENGAN FORMALIN: DIUJI MENGGUNAKAN *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

Desy Sugiani^{*)}, Angela Mariana Lusiastuti^{*)}, Sukenda^{**)}, dan Enang Harris^{**)}

^{*)} Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar
Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154
E-mail: *desysugiani@yahoo.co.id*

^{**)} Insitut Pertanian Bogor
Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

(Naskah diterima: 22 Februari 2014; Revisi final: 22 September 2014;
Disetujui publikasi: 10 November 2014)

ABSTRAK

Vaksin bakterin dalam bentuk protein merupakan salah satu tipe vaksin yang telah banyak dikembangkan. Protein digunakan sebagai vaksin biasanya dibuat dengan teknik inaktivasi formalin-killed. Vaksin ini biasanya lebih mudah dibuat, lebih murah, lebih stabil, dan mampu disimpan dalam waktu lama. Akan tetapi masih sedikit informasi mengenai efek perlakuan tersebut terhadap profil protein. Pada penelitian ini, untuk mengevaluasi profil protein, dilakukan inaktivasi sediaan vaksin dari isolat bakteri *Aeromonas hydrophila* AHL0905-2 dan *Streptococcus agalactiae* N₁₄G dengan menambahkan 0,5% formalin dan 3% neutral buffer formalin (NBF) ke dalam biakan plasebo bakterin dan diinkubasi selama 24 jam. Kualitas produk vaksin ditentukan berdasarkan uji karakterisasi protein menggunakan metode Bradford dan SDS-PAGE. Hasil uji menunjukkan bahwa sediaan vaksin *A. hydrophila* dan *S. agalactiae* yang diinaktivasi dengan 3% NBF memiliki profil protein lebih variatif dibandingkan dengan sediaan vaksin yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin. Akan tetapi, inaktivasi vaksin *A. hydrophila* dan *S. agalactiae* dengan 3% NBF menghasilkan berat total protein yang lebih rendah jika dibandingkan dengan dengan sediaan vaksin yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin.

KATA KUNCI: *A. hydrophila*, *S. agalactiae*, vaksin, SDS-PAGE, protein

ABSTRACT: *Protein profile of formalin-inactivated Aeromonas hydrophila and Streptococcus agalactiae vaccines: Tested Using Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). By: Desy Sugiani, Angela Mariana Lusiastuti, Sukenda, and Enang Harris*

Vaccine bacterin in form of protein is one type of vaccines has been developed. The protein used as a vaccine is usually made with a formalin-killed inactivation technique. They are easy to manufacture, relatively cheap, and for the most part stable, allowing for long periods of storage. It was less information on the effects of these treatments to protein profiles. In this study, to evaluate the protein profiles, bacterial isolates A. hydrophila AHL0905-2 and S. agalactiae N₁₄G were inactivated by adding 0.5% formalin and 3% neutral buffered formalin into placebo bacterin and incubated for 24 hours. Quality products of the vaccines were determined by characterization of

proteins using Bradford and SDS-PAGE methods. The results showed that protein profiles of *A. hydrophila* and *S. agalactiae* vaccines inactivated with 3% NBF were more varied than vaccines inactivated with 0.5% formalin. However, total weight of protein from vaccines *A. hydrophila* and *S. agalactiae* inactivated with 3% NBF is lower than vaccines inactivated with 0.5% formalin.

KEYWORDS: *A. hydrophila*, *S. agalactiae*, vaccine, SDS-PAGE, protein

PENDAHULUAN

Vaksinasi menjadi bagian yang semakin penting dari budidaya, karena dianggap sebagai metode yang efektif untuk pengendalian penyakit. Strategi vaksinasi telah ditetapkan menjadi salah satu faktor utama untuk memenuhi cara budidaya yang baik dan benar menurut kebijakan Kementerian Perikanan dan Kelautan Republik Indonesia. Keputusan untuk melakukan vaksinasi terhadap penyakit perlu memperhatikan jenis vaksin, metode vaksinasi, waktu vaksinasi, dan penggunaan vaksinasi ulang. Aspek-aspek yang perlu dipertimbangkan ketika akan dilakukan vaksinasi: (i) biokimia, antigenik, dan etiologi heterogenitas genetik dari agen penyakit, (ii) distribusi geografis dan inang sasaran, (iii) efektivitas vaksin, dan (iv) pendekatan vaksinasi jenis baru dengan menggunakan teknologi DNA rekombinan atau strategi lain yang berbeda selain dengan penggunaan bakterin secara klasik. Di samping itu, perlu juga memperhatikan aspek ekonomi dan tren yang berkaitan dengan vaksinasi.

Vaksin adalah bentuk imunisasi aktif di mana antigen akan merangsang respons imun bawaan dan adaptif, yang pada akhirnya akan menyebabkan imunitas humoral dari perantara sel antara patogen dan antigen-spesifik Abs membentuk memori. Memori imunologi dapat menjadi sel "memori" yang akan selalu tersedia dalam sistem imun atau sistemik dalam bentuk LPCs (*long-lived plasma cells*) (Kaattari *et al.*, 2005). Dalam bentuk yang paling sederhana, vaksin adalah persiapan antigen yang berasal dari organisme patogen yang dibuat menjadi non-patogen dengan berbagai cara, untuk merangsang sistem kekebalan tubuh dan ketahanan terhadap penyakit dari infeksi berikutnya oleh patogen yang sama (Ellis, 1999).

Beberapa tahun terakhir telah terjadi ekspansi yang luar biasa dalam pendekatan identifikasi komponen antigenik yang relevan untuk vaksin bakteri, dan ditemukannya teknik-teknik baru yang mulai diterapkan untuk

pengembangan vaksin hewan. Vaksin generasi pertama dibuat melalui pendekatan konvensional, yaitu persiapan vaksin mengikuti prinsip-prinsip yang ditetapkan oleh Pasteur, dengan menggunakan patogen keseluruhan yang tidak aktif, ekstrak dari patogen, atau bentuk hidup patogen yang telah dilemahkan untuk mengimunisasi inang. Vaksin generasi kedua berdasarkan penggunaan protein rekombinan dan strain yang dilemahkan, dan melibatkan teknologi DNA rekombinan. Vaksin yang biasa digunakan dalam industri akuakultur terdiri atas formulasi antigen bakterin (inaktivasi dengan formalin atau pemanasan) sel utuh, toksin, vektor rekombinan, dan asam nukleat (Prescott *et al.*, 2005).

Kebanyakan vaksin bakteri yang digunakan dalam budidaya sampai saat ini adalah vaksin yang dimatikan diperoleh dari kultur mikrobiologis strain tertentu hasil inaktivasi formalin. Vaksin bakterin dari sel-sel hidup yang dilemahkan atau dimatikan dapat menjadi masalah jika proses inaktivasinya tidak sempurna. Hal ini biasanya menyebabkan vaksin kadang-kadang gagal untuk merangsang respons imun, mereka biasanya juga membutuhkan *booster*, dan berpotensi dapat bermutasi dengan cara memulihkan virulensi patogen (Toranzo *et al.*, 2009).

Formalin banyak digunakan dalam proses persiapan vaksin untuk menstabilkan komponen protein atau untuk menonaktifkan molekul toksin seperti difteri, pertusis, dan tetanus. Formalin dapat bereaksi dengan kelompok asam amino lisin yang merupakan produk tidak stabil kemudian akan bereaksi dengan gugus amino kedua untuk membentuk sebuah jembatan metilen membentuk asam amino yang stabil. Reaksi-reaksi ini dapat terjadi baik antara asam amino dari molekul yang sama, sehingga terjadi internal *cross-linking* protein, atau antara dua molekul berbeda, sehingga terbentuk dimerisasi (Tommaso *et al.*, 1994).

Tommaso *et al.* (1994) melakukan percobaan *in vitro* untuk melihat pengaruh pemberian formalin pada protein terhadap pengenalan

antigen oleh sel T. Perifer sel-sel mononuklear darah dari individu yang divaksinasi dengan protein yang diberi formalin (pertusis toksin, filamentous hemagglutinin, pertactin) dari *Bordetella pertussis* menunjukkan respons yang rendah dibandingkan dengan yang divaksin protein tanpa formalin. Temuan ini dikonfirmasi lebih lanjut dengan CD4 + klon sel T spesifik untuk epitop yang didefinisikan dari protein bakteri. Beberapa epitop kurang terbentuk sempurna atau tidak terbentuk sama sekali ketika protein yang digunakan diberi formalin, sedangkan epitop lainnya sama-sama disajikan untuk klon sel T ketika formaldehid-antigen tidak digunakan. Namun, pengenalan sel T bisa dikembalikan dengan baik ketika dilakukan degradasi antigen sebelum pemberian formalin atau denaturasi panas setelah pemberian formalin. Paralel dengan mekanisme pencernaan tripsin dari protein yang diberi formalin dan tidak diberi formalin menunjukkan bahwa fragmen yang dihasilkan dari dua bentuk antigen yang sama akan berbeda dalam ukurannya. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian formalin dapat menghambat presentasi antigen ke sel T dan bahwa hal ini mungkin disebabkan oleh proses proteolitik yang berubah karena adanya formaldehid-protein.

Terdapat perbedaan dalam penggunaan bahan fiksatif formalin untuk preparasi dan inaktivasi vaksin bakterin. Ismail *et al.* (2010) membuat preparasi vaksin sel utuh bakteri *A. hydrophila* menggunakan 0,3% formalin. Osman *et al.* (2009) melakukan preparasi vaksin sel utuh *A. hydrophila* menggunakan 0,5% formalin. Giordano *et al.* (2010) melakukan inaktivasi sel utuh bakteri *S. agalactiae* menggunakan 3% NBF. Klesius *et al.* (2007) membuat preparasi vaksin ekstraselular dari bakteri *S. agalactiae* dan *S. iniae* menggunakan 3% NBF.

Sebelum menerapkan strategi vaksinasi, sangat penting untuk mempelajari karakteristik dari jenis sediaan vaksin yang akan digunakan. Langkah awal pembuatan sediaan vaksin bivalen yang merupakan gabungan dari kedua jenis bakteri *A. hydrophila* dan *S. agalactiae* adalah mencari bahan fiksatif yang paling tepat. Hal ini perlu diketahui karena akan memengaruhi pembentukan respons imun yang menandakan adanya pembentukan kekebalan terhadap antigen tertentu. Penelitian ini bertujuan untuk melihat karakter protein penyusun vaksin menggunakan metode SDS-PAGE dan variasi profil protein dari masing-masing

sediaan vaksin yang diinaktivasi menggunakan kadar fiksatif formalin yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

Preparasi Sediaan Vaksin

Bakteri *A. hydrophila* AHL0905-2 (gram negatif) diinokulasi dalam media BHI, diinkubasi dalam inkubator dengan *shaker* selama 24 jam pada suhu 28°C, sedangkan bakteri *S. agalactiae* N₁₄G (gram positif) diinokulasi dalam media TSB, diinkubasi dalam inkubator dengan *shaker* selama 72 jam pada suhu 28°C. Dalam penelitian ini dibuat dua jenis sediaan vaksin bakterin yang berbeda. Sediaan pertama adalah vaksin bakterin yang diinaktivasi dengan menambahkan 0,5% formalin (v/v), dan sediaan kedua adalah vaksin bakterin yang diinaktivasi dengan menambahkan *buffer* formalin sebanyak 3% v/v (NBF/*neutral buffer formalin* 10%; dibuat dengan mencampurkan 0,4 g NaH₂PO₄; 0,65g Na₂HPO₄; 10 mL formaldehyde 37% dan 90 mL akuades steril). Sediaan hasil inaktivasi kemudian diaduk menggunakan magnet pengaduk selama empat jam. Sel utuh bakteri inaktif diperoleh dengan mensentrifugasi pada 3.000 xg selama 30 menit dengan suhu 4°C, pelet (endapan) sel dipisahkan dari supernatan, pelet sel diresuspensi dengan larutan NaCl 0,845% (pH 7). Sediaan vaksin hasil inaktivasi dalam bentuk *broth* digunakan sebagai sediaan plasebo.

Produk ekstraselular (ECP) *A. hydrophila* diperoleh dengan menyaring supernatan hasil sentrifugasi menggunakan filter steril 0,45 µm; dan ECP *S. agalactiae* menggunakan filter steril 0,22 µm. Sediaan vaksin hasil inaktivasi disimpan pada suhu 4°C hingga akan digunakan dalam proses selanjutnya.

Analisis Total Protein Menggunakan Metode Bradford

Berat total protein secara umum dapat diukur dengan metode Bradford (1976) dalam Bollag & Edelstein (1991). Sebanyak 100 µL sampel ditambah dengan 1 mL pereaksi Bradford, kemudian dihomogenasi menggunakan vortex dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Pereaksi Bradford berasal dari larutan stok yakni: 100 mL etanol 95%, 200 mL *phosphoric acid* 88%, dan 350 mg Serva Blue G. Sebanyak 30 mL larutan stok ditambah 425 mL akuades, 15 mL etanol 95% dan 30 mL *phosphoric acid* 88%. Campuran tersebut diencerkan dua kali sebelum digunakan untuk

analisis protein. Konsentrasi protein contoh dihitung berdasarkan kurva standar yang dibuat menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA). Berat total protein sampel diukur pada panjang gelombang 280 nm (A_{280}).

Analisis Protein Menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

Elektroforesis dilakukan mengikuti metode Laemmli (1971) di dalam Bollag & Edelstein (1991) dengan tahapan persiapan gel pemisah (10%): 3,34 mL larutan A [30% (b/v) akrilamid dan 0,8% (b/v) bis-akrilamid]; 2,5 mL larutan B (1,5 M Tris-Cl pH 8,8; 0,4% SDS) ditambah 50 μ L APS 10% dan 5 μ L TEMED dituangkan ke dalam cetakan gel. *Stacking* gel (5%): 0,67 mL larutan C (1 M Tris-Cl pH 6,8 dan 0,4% SDS); 2,3 mL akuades; 30 μ L APS 10% dan 5 μ L TEMED dituang di atas gel pemisah yang sudah beku kemudian dipasang sisir, serta ditunggu hingga gel beku sempurna. *Buffer* elektroforesis berisi Tris 25 mM, glisin 192 mM, dan SDS 0,1%. *Buffer* diatur pada pH 8,3.

Pemisahan protein dilakukan dengan cara protein sampel (20 μ L) dicampur dengan 5 μ L *buffer* sampel (60 mM Tris-Cl pH 6,8 25% gliserol; 2% SDS; 14,4 mM 2-merkaptotanol; dan 0,1% bromfenol biru), dididihkan selama 2-3 menit dan dimasukkan ke dalam gel. Protein dipisahkan dengan memberikan aliran listrik 125 mA dan 150 V.

Gel diangkat, direndam selama 30 menit di dalam larutan berisi 50% metanol dan 10% asam asetat kemudian dicuci selama 30 menit di dalam larutan berisi metanol 5% dan asam asetat 7%. Selanjutnya, gel direndam di dalam 10% glutaraldehid selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama 1-2 jam (diganti setiap 30 menit). Selanjutnya gel direndam dalam larutan dithiothreitol (5 μ g/mL) selama 30 menit, larutan dibuang dan diganti dengan larutan perak nitrat 0,1%. Gel kemudian dibilas dengan sedikit aquades, dibilas dua kali dengan sedikit larutan *developer* (50 μ L formaldehid 37% di dalam sodium karbonat). Tahap akhir, gel direndam dalam larutan *developer* hingga pita protein dapat diamati dengan baik dan reaksinya segera dihentikan dengan mencuci gel di dalam larutan asam sitrat 2,3 M. Gel dicuci dengan ddH_2O sebanyak dua kali, gel dilakukan *packing* dan *scanning*, kemudian gel disimpan dalam 1% asam asetat pada suhu 4°C. Data hasil pengamatan total protein dan profil protein dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN BAHASAN

Total Protein Vaksin

Berat total protein dihitung menggunakan persamaan linier dari kurva standar protein hasil masing-masing uji. Berat total protein vaksin *A. hydrophila* hasil inaktivasi dengan 0,5% formalin dan 3% NBF dari jenis sediaan sel utuh adalah 0,43 dan 0,53 mg/mL; sediaan ECP adalah 2,06 dan 1,93 mg/mL; sediaan supernatan adalah 2,15 dan 1,99 mg/mL; serta sediaan plasebo adalah 2,20 dan 2,12 mg/mL (Tabel 1). Sementara itu, berat total protein sediaan vaksin *S. agalactiae* hasil inaktivasi dengan 0,5% formalin dan 3% NBF dari jenis sediaan sel utuh masing-masing adalah 1,60 dan 1,37 mg/mL; sediaan ECP adalah 2,02 dan 1,89 mg/mL; sediaan supernatan adalah 2,06 dan 1,88 mg/mL; serta sediaan plasebo adalah 2,25 dan 2,11 mg/mL (Tabel 2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa rata-rata sediaan vaksin dengan menggunakan 0,5% formalin sebagai bahan untuk proses inaktivasi memiliki konsentrasi yang lebih besar dibandingkan dengan sediaan vaksin yang diinaktivasi menggunakan 3% NBF.

Profil Protein Vaksin *A. hydrophila* hasil SDS-PAGE

Gambar 2 menunjukkan berat molekul pita protein vaksin *A. hydrophila* untuk sediaan plasebo diinaktivasi dengan 3% NBF terdapat tujuh pita, yaitu: 136,36; 119,57; 87,23; 55,80; 25,36; 19,00; dan 14,61 kDa. Sediaan sel utuh yang diinaktivasi dengan 3% NBF terdapat 14 pita yaitu: 119,57; 94,39; 82,76; 72,57; 58,81; 45,22; 40,71; 32,99; 26,73; 22,83; 19,00; 17,10; 15,00; dan 12,81 kDa. Sediaan supernatan yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin terdapat dua pita, yaitu: 55,80 kDa dan 17,10 kDa. Sediaan plasebo yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin terdapat dua pita, yaitu: 55,80 kDa dan 17,10 kDa. Sediaan sel utuh yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin, terdapat 17 pita yaitu: 143,72; 119,57; 110,51; 94,39; 72,57; 58,81; 51,57; 34,77; 31,30; 28,18; 25,36; 22,83; 19,50; 15,80; 15,00; 13,50; dan 11,53 kDa. Sediaan ECP yang diinaktivasi 3% NBF dan 0,5% formalin masing-masing terdapat dua pita yaitu: 55,80 kDa dan 17,10 kDa. Sediaan supernatan yang diinaktivasi dengan 3% NBF terdapat tiga pita, yaitu: 94,39; 55,80; dan 17,10 kDa (Tabel 3). Nilai kDa pita protein yang dihasilkan merupakan hasil hitung menggunakan persamaan linier $y = -1,187x + 5,226$

Tabel 1. Total protein sediaan vaksin *Aeromonas hydrophila* yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin dan diinaktivasi dengan 3% NBF

Table 1. Total protein vaccine of *Aeromonas hydrophila* inactivated with 0.5% formalin and inactivated with 3% NBF

Sediaan vaksin Vaccine	S	B	S - B	a	b	x (mg/L)	Protein mg/mL
Sel utuh (<i>Whole cell</i>) (1)	0.473±0.002	0.352±0.005	0.121	0.0044	0.0266	21.57	0.43
Sel utuh (<i>Whole cell</i>) (2)	0.495±0.017	0.352±0.005	0.143	0.0044	0.0266	26.45	0.53
ECP (1)	0.832±0.008	0.352±0.005	0.48	0.0044	0.0266	103.05	2.06
ECP (2)	0.802±0.010	0.352±0.005	0.450	0.0044	0.0266	96.34	1.93
Supernatan <i>Supernatant</i> (1)	0.851±0.009	0.352±0.005	0.499	0.0044	0.0266	107.36	2.15
Supernatan <i>Supernatant</i> (2)	0.815±0.008	0.352±0.005	0.463	0.0044	0.0266	99.30	1.99
Plasebo (<i>Placebo</i>) (1)	0.861±0.007	0.352±0.005	0.509	0.0044	0.0266	109.75	2.20
Plasebo (<i>Placebo</i>) (2)	0.845±0.011	0.352±0.005	0.493	0.0044	0.0266	106.11	2.12

Keterangan (*Description*):

- ECP = Produk ekstraselular (*Extracellular products*); (1) = Inaktivasi 0,5% formalin (*0.5% formalin inactivated*); (2) = Inaktivasi 3% NBF (*Inactivation of 3% NBF (neutral buffered formalin)*)
- S = Absorbansi 595 nm pada sampel (*Absorbance in 595 nm from sample*); B = Absorbansi 595 nm pada blanko (*Absorbance in 595 nm from blanko*)
- Persamaan linier kurva standar protein $y = 0,0044x + 0,0266$ (Gambar 1); $a = 0,0044$; $b = 0,0266$ (*Curve linear equation of standard protein $y = 0.0044x + 0.0266$ (Figure 1); $a = 0.0044$; $b = 0.0266$*)

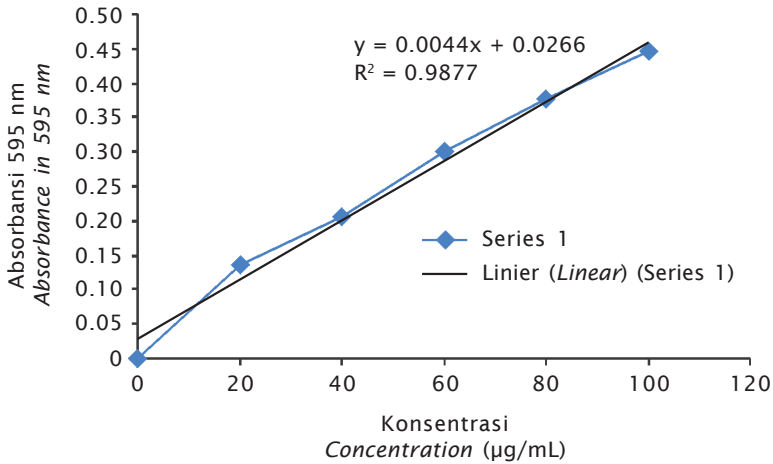
Tabel 2. Total protein sediaan vaksin *S. agalactiae* yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin dan diinaktivasi dengan 3% NBF

Table 2. Total protein vaccine of *S. agalactiae* inactivated with 0.5% formalin and inactivated with 3% NBF

Sediaan vaksin Vaccine	S	B	S - B	a	b	x (mg/L)	Protein mg/mL
Sel utuh (<i>Whole cell</i>) (1)	0.73±0.011	0.352±0.004	0.3785	0.0044	0.0266	79.98	1.60
Sel utuh (<i>Whole cell</i>) (2)	0.681±0.011	0.352±0.004	0.329	0.0044	0.0266	68.73	1.37
ECP (1)	0.822±0.003	0.352±0.004	0.47	0.0044	0.0266	100.77	2.02
ECP (2)	0.794±0.025	0.352±0.004	0.442	0.0044	0.0266	94.41	1.89
Supernatan <i>Supernatant</i> (1)	0.832±0.008	0.352±0.004	0.48	0.0044	0.0266	103.05	2.06
Supernatan <i>Supernatant</i> (2)	0.792±0.023	0.352±0.004	0.44	0.0044	0.0266	93.95	1.88
Plasebo (<i>Placebo</i>) (1)	0.873±0.005	0.352±0.004	0.521	0.0044	0.0266	112.36	2.25
Plasebo (<i>Placebo</i>) (2)	0.843±0.008	0.352±0.004	0.4915	0.0044	0.0266	105.66	2.11

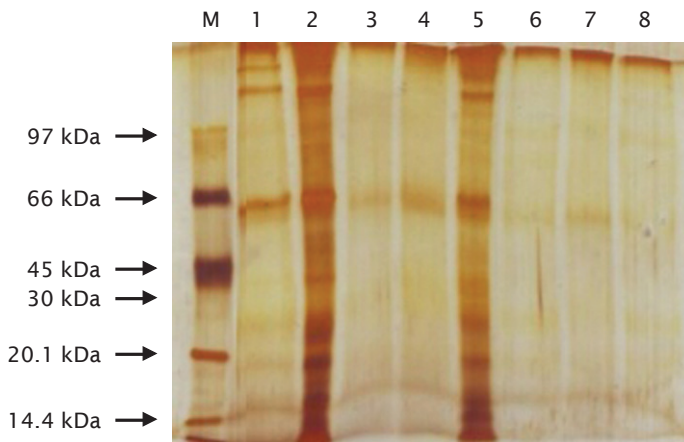
Keterangan (*Description*):

- ECP = Produk ekstraselular (*Extracellular products*); (1) = Inaktivasi 0,5% formalin (*0.5% formalin inactivated*); (2) = Inaktivasi 3% NBF (*Inactivation of 3% NBF (neutral buffered formalin)*)
- S = Absorbansi 595 nm pada sampel (*Absorbance in 595 nm from sample*); B = Absorbansi 595 nm pada blanko (*Absorbance in 595 nm from blanko*)
- Persamaan linier kurva standar protein: $y = 0,0044x + 0,0266$ (Gambar 1); $a = 0,0044$; $b = 0,0266$ (*Curve linear equation of standard protein: $y = 0.0044x + 0.0266$ (Figure 1); $a = 0.0044$; $b = 0.0266$*)



Gambar 1. Kurva standar protein

Figure 1. Curve of standard protein



Gambar 2. Profil protein sediaan vaksin sel utuh, produk ekstraselular (ECP), supernatan, dan plasebo isolat *Aeromonas hydrophila* AHL0905-2 dianalisis dengan SDS-PAGE. (M) Marker SeeBluePlus2 (Invitrogen), (1) plasebo *A. hydrophila* inaktivasi NBF, (2) sel utuh *A. hydrophila* inaktivasi NBF, (3) supernatan *A. hydrophila* inaktivasi formalin, (4) plasebo *A. hydrophila* inaktivasi formalin, (5) sel utuh *A. hydrophila* inaktivasi formalin, (6) ECP *A. hydrophila* inaktivasi NBF, (7) ECP *A. hydrophila* inaktivasi formalin, (8) supernatan *A. hydrophila* inaktivasi NBF

Figure 2. Protein profile of vaccine whole cell, ECP, supernatant, and placebo from isolates of *A. hydrophila* AHL0905-2 tested using SDS-PAGE. (M) Marker SeeBluePlus2 (Invitrogen), (1) placebo *A. hydrophila* inactivation with NBF, (2) whole cell *A. hydrophila* inactivation with NBF, (3) the supernatant *A. hydrophila* with formalin inactivation, (4) placebo *A. hydrophila* with formalin inactivation, (5) complete cell *A. hydrophila* with formalin inactivation, (6) ECP *A. hydrophila* with formalin inactivation with NBF, (7) ECP *A. hydrophila* with formalin inactivation, (8) supernatant *A. hydrophila* inactivation with NBF

Tabel 3. Ukuran protein hasil SDS-PAGE bakteri *A. hydrophila* yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin dan diinaktivasi dengan 3% NBF

Table 3. Size of protein analyzed with SDS-PAGE in bacterium *A. hydrophila* inactivated with 0.5% formalin and inactivated with 3% NBF

Sampel Sample	Migrasi Migration (cm)	Pita (Band)	Rf	a	b	Log BM	BM (kDa)
Sel utuh <i>Whole cell</i> (1)	5.2	0.3	0.0576923	-1.187	5.226	5.1575192	143.72
	5.2	0.65	0.125	-1.187	5.226	5.077625	119.57
	5.2	0.8	0.1538462	-1.187	5.226	5.0433846	110.51
	5.2	1.1	0.2115385	-1.187	5.226	4.9749038	94.39
	5.2	1.6	0.3076923	-1.187	5.226	4.8607692	72.57
	5.2	2	0.3846154	-1.187	5.226	4.7694615	58.81
	5.2	2.25	0.4326923	-1.187	5.226	4.7123942	51.57
	5.2	3	0.5769231	-1.187	5.226	4.5411923	34.77
	5.2	3.2	0.6153846	-1.187	5.226	4.4955385	31.30
	5.2	3.4	0.6538462	-1.187	5.226	4.4498846	28.18
	5.2	3.6	0.6923077	-1.187	5.226	4.4042308	25.36
	5.2	3.8	0.7307692	-1.187	5.226	4.3585769	22.83
	5.2	4.1	0.7884615	-1.187	5.226	4.2900962	19.50
	5.2	4.5	0.8653846	-1.187	5.226	4.1987885	15.80
	5.2	4.6	0.8846154	-1.187	5.226	4.1759615	15.00
	5.2	4.8	0.9230769	-1.187	5.226	4.1303077	13.50
	5.2	5.1	0.9807692	-1.187	5.226	4.0618269	11.53
Sel utuh <i>Whole cell</i> (2)	5.2	0.65	0.125	-1.187	5.226	5.077625	119.57
	5.2	1.1	0.2115385	-1.187	5.226	4.9749038	94.39
	5.2	1.35	0.2596154	-1.187	5.226	4.9178365	82.76
	5.2	1.6	0.3076923	-1.187	5.226	4.8607692	72.57
	5.2	2	0.3846154	-1.187	5.226	4.7694615	58.81
	5.2	2.5	0.4807692	-1.187	5.226	4.6553269	45.22
	5.2	2.7	0.5192308	-1.187	5.226	4.6096731	40.71
	5.2	3.1	0.5961538	-1.187	5.226	4.5183654	32.99
	5.2	3.5	0.6730769	-1.187	5.226	4.4270577	26.73
	5.2	3.8	0.7307692	-1.187	5.226	4.3585769	22.83
	5.2	4.15	0.7980769	-1.187	5.226	4.2786827	19.00
	5.2	4.35	0.8365385	-1.187	5.226	4.2330288	17.10
	5.2	4.6	0.8846154	-1.187	5.226	4.1759615	15.00
	5.2	4.9	0.9423077	-1.187	5.226	4.1074808	12.81
ECP (1)	5.2	2.1	0.4038462	-1.187	5.226	4.7466346	55.80
	5.2	4.35	0.8365385	-1.187	5.226	4.2330288	17.10
ECP (2)	5.2	2.1	0.4038462	-1.187	5.226	4.7466346	55.80
	5.2	4.35	0.8365385	-1.187	5.226	4.2330288	17.10
Supernatan <i>Supernatant</i> (1)	5.2	2.1	0.4038462	-1.187	5.226	4.7466346	55.80
	5.2	4.35	0.8365385	-1.187	5.226	4.2330288	17.10

Lanjutan Tabel 3 (Table 3 continued)

Sampel Sample	Migrasi Migration (cm)	Pita (Band)	Rf	a	b	Log BM	BM (kDa)
Supernatan	5.2	1.1	0.2115385	-1.187	5.226	4.9749038	94.39
Supernatant (2)	5.2	2.1	0.4038462	-1.187	5.226	4.7466346	55.80
	5.2	4.35	0.8365385	-1.187	5.226	4.2330288	17.10
	5.2	4.35	0.8365385	-1.187	5.226	4.2330288	17.10
Plasebo	5.2	2.1	0.4038462	-1.187	5.226	4.7466346	55.80
Placebo (1)	5.2	4.35	0.8365385	-1.187	5.226	4.2330288	17.10
	5.2	4.35	0.8365385	-1.187	5.226	4.2330288	17.10
Plasebo	5.2	0.4	0.0769231	-1.187	5.226	5.1346923	136.36
Placebo (2)	5.2	0.65	0.125	-1.187	5.226	5.077625	119.57
	5.2	1.25	0.2403846	-1.187	5.226	4.9406635	87.23
	5.2	2.1	0.4038462	-1.187	5.226	4.7466346	55.80
	5.2	3.6	0.6923077	-1.187	5.226	4.4042308	25.36
	5.2	4.15	0.7980769	-1.187	5.226	4.2786827	19.00
	5.2	4.65	0.8942308	-1.187	5.226	4.1645481	14.61
	5.2	4.65	0.8942308	-1.187	5.226	4.1645481	14.61

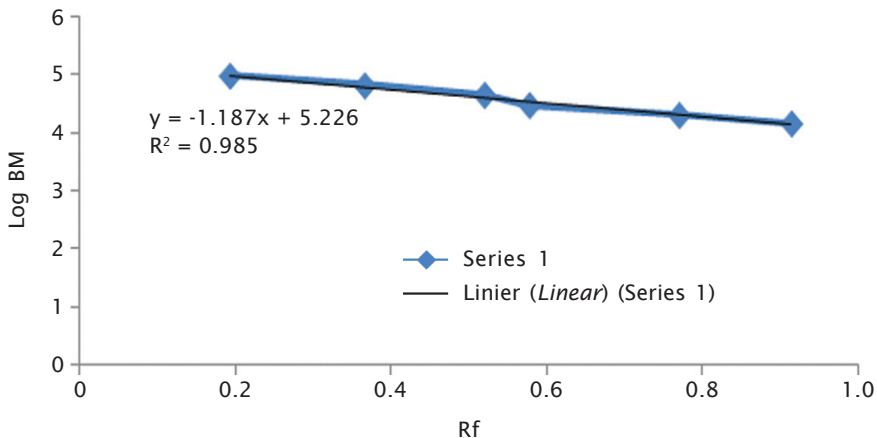
Keterangan (Description):

ECP = Produk ekstraselular (Extracellular products); (1) = Inaktivasi 0,5% formalin (0.5% formalin inactivated); (2) = Inaktivasi 3% NBF (Inactivation of 3% NBF (neutral buffered formalin))

(Gambar 3). Preparasi vaksin dari sediaan sel utuh menghasilkan jenis protein lebih bervariasi dibandingkan dengan preparasi sediaan ECP, plasebo, maupun supernatan.

Karakterisasi protein *A. hydrophila* menggunakan SDS-PAGE menunjukkan bahwa jumlah protein dari sediaan sel utuh vaksin dengan inaktivasi formalin lebih banyak dibandingkan dengan hasil inaktivasi NBF (Gambar 3). Se-

baliknya untuk sediaan ECP, supernatan, dan plasebo jumlah pita protein hasil inaktivasi dengan formalin lebih sedikit jika dibandingkan dengan hasil inaktivasi NBF. Sementara itu, jumlah pita protein terbanyak berturut-turut terdapat pada sel utuh, plasebo, supernatan, dan ECP. Hal ini menunjukkan bahwa untuk mendapatkan total protein vaksin terbanyak dapat menggunakan sel utuh dari bakteri. Sel



Gambar 3. Persamaan linier hasil SDS-PAGE bakteri *Aeromonas hydrophila*

Figure 3. Results of linear equations from SDS-PAGE bacterium *A. hydrophila*

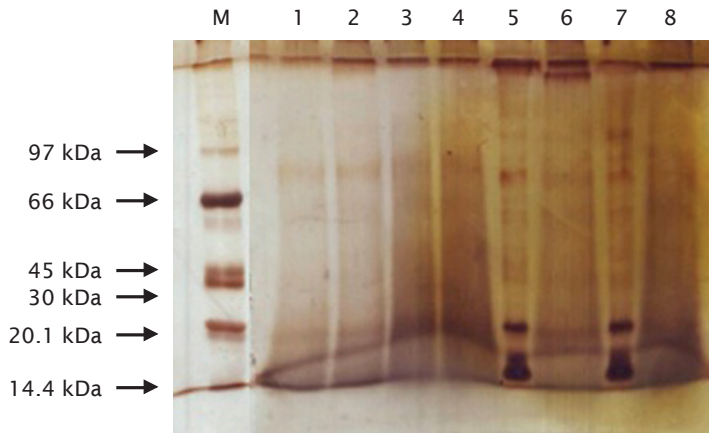
bakteri tersusun atas bahan peptidoglikan, yaitu suatu molekul yang mengandung rangkaian amino disakarida dan rantai peptide. Thomas *et al.* (2009) menggunakan empat jenis marka ukuran pita protein untuk mengarakterisasi *A. hydrophila* dari ikan *Eetroplus suratensis* yaitu: 19,5 kDa; 25,36 kDa; 29 kDa; dan 65,6 kDa. Jika dibandingkan dengan hasil SDS-PAGE terhadap *A. hydrophila* isolat AHL0905-2 maka hanya identik dengan dua pita yaitu: 19,5 kDa dan 25,36 kDa. Pita protein *A. hydrophila* AHL0905-2 berbeda dengan *A. hydrophila* yang dianalisis oleh Thomas *et al.* (2009) karena kedua bakteri ini merupakan strain yang berbeda.

Profil protein suatu bakteri dapat digunakan sebagai bahan acuan dalam penentuan potensi imunogenik dari suatu sediaan vaksin, karena setiap jenis protein memiliki kemampuan imunogenik yang berbeda. Selain itu, profil protein dapat digunakan dalam identifikasi strain bakteri. Korkoca & Boynukara (2003) menganalisis profil protein beberapa

strain *A. hydrophila*, *A. caviae*, dan *A. hydrophila* ATCC strain 7512 dengan SDS-PAGE untuk melihat keterkaitan hubungan antar kelompok bakteri tersebut. Hasil uji menunjukkan bahwa terdapat empat puluh lima pasang profil protein yang dibentuk untuk membandingkan antar strain.

Profil Protein Vaksin *S. agalactiae* Hasil SDS-PAGE

Gambar 4 menunjukkan berat molekul pita protein vaksin *S. agalactiae* untuk sediaan placebo yang diinaktivasi dengan 3% NBF terdapat tiga pita yaitu: 83,42; 58,98; dan 21,99 kDa. Sediaan supernatan yang diinaktivasi dengan 3% NBF terdapat dua pita yaitu: 83,42 dan 21,99 kDa. Sediaan placebo yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin terdapat satu pita yaitu 83,42 kDa. Sediaan supernatan yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin terdapat satu pita yaitu 83,42 kDa. Sediaan sel utuh yang diinaktivasi dengan 3% NBF terdapat 14 pita yaitu: 111,86; 83,42; 79,09; 58,98; 54,45;



Gambar 4. Profil protein sediaan vaksin sel utuh, produk ekstraselular (ECP), supernatan, dan placebo isolat *Streptococcus agalactiae* N₁₄G dianalisis dengan SDS-PAGE. (M) Marker SeeBluePlus2 (Invitrogen), (1) placebo *S. agalactiae* inaktivasi NBF, (2) supernatan *S. agalactiae* inaktivasi NBF, (3) placebo *S. agalactiae* inaktivasi formalin, (4) supernatan *S. agalactiae* inaktivasi formalin, (5) sel utuh *S. agalactiae* inaktivasi NBF, (6) ECP *S. agalactiae* inaktivasi NBF, (7) sel utuh *S. agalactiae* inaktivasi formalin, (8) ECP *S. agalactiae* inaktivasi formalin

Figure 4. Protein profile of vaccine whole cell, ECP, supernatant, and placebo from isolates of *S. agalactiae* N₁₄G tested using SDS-PAGE. (M) Marker SeeBluePlus2 (Invitrogen), (1) placebo *S. agalactiae* inactivation with NBF, (2) supernatant *S. agalactiae* inactivation with NBF, (3) placebo *S. agalactiae* with formalin inactivated, (4) supernatant *S. agalactiae* with formalin inactivated, (5) whole cell *S. agalactiae* inactivation with NBF, (6) ECP *S. agalactiae* inactivation with NBF, (7) whole cells *S. agalactiae* with formalin inactivated, (8) ECP *S. agalactiae* with formalin inactivated

43,99; 23,20; 18,74; 17,77; dan 15,97 kDa. Sediaan ECP yang diinaktivasi dengan 3% NBF terdapat lima pita yaitu: 185,64; 111,86; 79,09; 23,20; dan 18,74 kDa. Sediaan sel utuh yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin, terdapat sepuluh pita yaitu: 111,86; 83,42; 79,09; 58,98; 54,45; 34,61; 23,20; 18,74; 17,77; dan 15,97 kDa. Sediaan ECP yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin terdapat satu pita 18,74 kDa; sedangkan sediaan supernatan yang diinaktivasi dengan formalin 0,5% terdapat satu pita yaitu 83,42 kDa, sedangkan yang diinaktivasi dengan NBF 3% terdapat dua pita yaitu 83,42 kDa dan 21,99 kDa. Sediaan *plasebo* yang diinaktivasi dengan formalin 0,5% terdapat satu pita yaitu 83,42 kDa, sedangkan yang diinaktivasi dengan NBF 3% terdapat tiga pita yaitu 83,42; 58,98; dan 21,99 kDa (Tabel 4). Nilai kDa pita protein yang dihasilkan merupakan hasil hitung menggunakan persamaan linier $y = -1,158x + 5,315$ (Gambar 5).

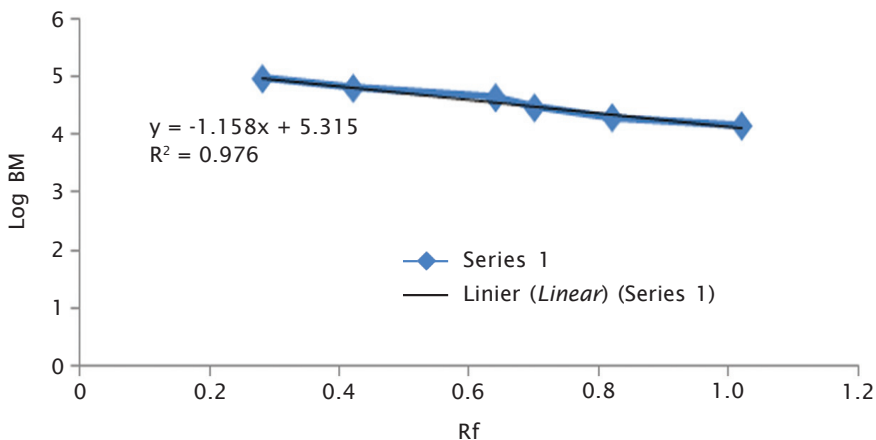
Preparasi sediaan vaksin dengan bahan inaktivasi yang berbeda ternyata dapat memengaruhi profil protein. Sediaan vaksin yang diinaktivasi dengan 3% NBF, jumlah pita profil proteinnya lebih banyak dibandingkan dengan sediaan vaksin yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin; terutama untuk sediaan vaksin ECP, supernatan, dan plasebo. Sediaan vaksin sel utuh memiliki jumlah pita protein yang lebih banyak dibandingkan dengan sediaan ECP, supernatan, dan plasebo.

Hasil tersebut sesuai dengan pendapat yang menyatakan bahwa formaldehid dapat mendegradasi secara parsial protein FHA

(*forkhead-associated*), mengubah sensitivitas protein pada aktivitas protease, adanya purifikasi digesti tripsin dan dapat mendegenerasi fragmen protein menjadi ukuran yang lain. Penggunaan formaldehid juga dapat membantu membentuk ikatan metilen yang akan memengaruhi respons sel-T terhadap data paralel protein yang terdiri atas asam amino dan turunannya seperti N-glikosilasi, alkilasi, dan iodinasi sehingga dapat memengaruhi persentase antigen oleh sel-T (Tommaso *et al.*, 1994).

Pasnik *et al.* (2005) melakukan uji karakterisasi protein *S. agalactiae* menggunakan SDS-PAGE terdapat dua pita 47 kDa dan 75 kDa dan dominan pita 54 kDa dan 55 kDa pada sediaan segar (satu hari setelah inaktivasi dengan 3% *buffer* formalin), sedangkan sediaan vaksin yang telah disimpan selama satu tahun pada suhu 4°C hanya terdeteksi pita 47, 54, dan 55 kDa. Proses penyimpanan dan lama waktu penyimpanan dapat merubah profil protein dari sediaan vaksin, serta dapat menurunkan tingkat proteksi terhadap sintasannya hanya 29%. Hanya terdapat satu ukuran protein yang hampir sama antara *S. agalactiae* N₄G yaitu 54,45 kDa dengan *S. agalactiae* yang digunakan Pasnik *et al.* (2005) pada berat 54-55 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa kedua strain bakteri tersebut berbeda.

Beberapa protein dari bakteri *A. hydrophila* dan *S. agalactiae* memiliki kemampuan untuk dikembangkan menjadi subunit vaksin potensial. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa sediaan sel utuh, ECP, supernatan, dan plasebo



Gambar 5. Persamaan linier SDS-PAGE bakteri *S. agalactiae*

Figure 5. Results of linear equations from SDS-PAGE bacterium *S. agalactiae*

Tabel 4. Ukuran protein hasil SDS-PAGE bakteri *S. agalactiae* yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin dan diinaktivasi dengan 3% NBF

Table 4. Size of protein analyzed with SDS-PAGE in bacterium *S. agalactiae* inactivated with 0.5% formalin and inactivated with 3% NBF

Sampel Sample	Migrasi Migration (cm)	Pita (Band)	Rf	a	b	Log BM	BM (kDa)
Sel utuh Whole cell (1)	5	1.15	0.23	-1.158	5.315	5.04866	111.86
	5	1.7	0.34	-1.158	5.315	4.92128	83.42
	5	1.8	0.36	-1.158	5.315	4.89812	79.09
	5	2.35	0.47	-1.158	5.315	4.77074	58.98
	5	2.5	0.5	-1.158	5.315	4.736	54.45
	5	3.35	0.67	-1.158	5.315	4.53914	34.61
	5	4.1	0.82	-1.158	5.315	4.36544	23.20
	5	4.5	0.9	-1.158	5.315	4.2728	18.74
	5	4.6	0.92	-1.158	5.315	4.24964	17.77
	5	4.8	0.96	-1.158	5.315	4.20332	15.97
Sel utuh Whole cell (2)	5	1.15	0.23	-1.158	5.315	5.04866	111.86
	5	1.7	0.34	-1.158	5.315	4.92128	83.42
	5	1.8	0.36	-1.158	5.315	4.89812	79.09
	5	2.35	0.47	-1.158	5.315	4.77074	58.98
	5	2.5	0.5	-1.158	5.315	4.736	54.45
	5	2.9	0.58	-1.158	5.315	4.64336	43.99
	5	3.35	0.67	-1.158	5.315	4.53914	34.61
	5	4.1	0.82	-1.158	5.315	4.36544	23.20
	5	4.6	0.92	-1.158	5.315	4.24964	17.77
	5	4.8	0.96	-1.158	5.315	4.20332	15.97
ECP (1)	5	4.5	0.9	-1.158	5.315	4.2728	18.74
ECP (2)	5	1.7	0.34	-1.158	5.315	4.92128	83.42
	5	4.2	0.84	-1.158	5.315	4.34228	21.99
Supernatan Supernatant (1)	5	1.7	0.34	-1.158	5.315	4.92128	83.42
Supernatan Supernatant (2)	5	1.7	0.34	-1.158	5.315	4.92128	83.42
	5	2.35	0.47	-1.158	5.315	4.77074	58.98
	5	4.2	0.84	-1.158	5.315	4.34228	21.99
Pasebo (Placebo) (1)	5	1.7	0.34	-1.158	5.315	4.92128	83.42
Plasebo Placebo (2)	5	1.15	0.23	-1.158	5.315	5.04866	111.86
	5	1.8	0.36	-1.158	5.315	4.89812	79.09
	5	4.1	0.82	-1.158	5.315	4.36544	23.20
	5	4.5	0.9	-1.158	5.315	4.2728	18.74

Keterangan (Description):

ECP = Produk ekstraselular (Extracellular products); (1) = Inaktivasi 0,5% formalin (0.5% formalin inactivated); (2) = Inaktivasi 3% NBF (Inactivation of 3% NBF (neutral buffered formalin))

memiliki berat molekul protein yang berada pada kisaran protein yang disarankan oleh Pasnik *et al.* (2005), yakni berkisar antara 47-75 kDa, dan yang paling dominan adalah protein 54 kDa dan 55 kDa. Produk vaksin dari subunit protein ini telah banyak dikembangkan dan diterapkan untuk pencegahan penyakit Streptococcosis. Amrullah (2014) melakukan penelitian subunit vaksin menggunakan protein toksin yang diperoleh dari hasil ekstraksi fraksinasi protein produk ekstrak seluler bakteri *S. agalactiae* menggunakan tiga pita protein dengan berat molekul berbeda yaitu 76,52 kDa; 89 kDa; dan 132,92 kDa.

Identifikasi dan *screening* setiap antigen potensial dimulai dari analisis profil protein. Ho *et al.* (2011) mengemukakan bahwa terdapat beberapa bakteri patogen yang telah lengkap dianalisis profil protein antigeniknya dan digunakan sebagai kandidat untuk pembuatan vaksin *reverse*, di antaranya adalah *Helicobacter pylori*, *Chlamydia trachomatis*, *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella ictaluri*, *Shigella flexneri*, *Borrelia garinii*, dan *Nisseria meningitides*. Bakteri tersebut telah berhasil dilakukan rekayasa genetika dengan teknologi kloning dan ekspresi antigen menggunakan inang perantara untuk ekspresi yang diambil dari sel tunggal seperti ragi dan *Escherichia coli*.

Perlakuan formalin dapat memengaruhi profil keberagaman protein dalam sediaan vaksin. Formalin juga dapat merubah sensitivitas protein terhadap aktivitas protease, dan gangguan pada asosiasi peptida-MHC atau reseptor pengenalan T-sel peptida kompleks-MHC. Oleh karena itu, sangat disarankan untuk menggunakan formalin dalam proses inaktivasi secara bijaksana, pengaruh perlakuan formalin dapat diminimalisasi pada tingkat awal pengolahan antigen yaitu dengan melakukan detoksifikasi formalin atau membuat konsentrasi formalin yang digunakan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Inaktivasi vaksin *A. hydrophila* dan *S. agalactiae* dengan 0,5% formalin dapat menghasilkan berat total protein yang lebih tinggi dibandingkan dengan sediaan vaksin yang diinaktivasi dengan 3% NBF. Jumlah pita profil protein vaksin *A. hydrophila* dan *S. agalactiae* hasil inaktivasi dengan 3% NBF lebih variatif dibandingkan dengan sediaan vaksin yang diinaktivasi dengan 0,5% formalin. Sediaan vaksin sel utuh memiliki jumlah

pita profil protein lebih variatif dibandingkan dengan sediaan vaksin ECP, supernatan, dan plasebo.

Formalin dapat digunakan sebagai bahan fiksatif untuk inaktivasi vaksin bakteri, direkomendasikan dalam bentuk *neutral buffer formalin* pada level konsentrasi 3%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Diucapkan terima kasih kepada Ibu Ika, analis di Laboratorium Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor (IPB) atas kerja sama pelaksanaan analisis Bradford dan SDS-PAGE.

DAFTAR ACUAN

- Amrullah.(2014). *Imunoproteksi vaksin protein toksoid bakteri Streptococcus agalactiae pada ikan nila (Oreochromis niloticus)*. Disertasi. Program Doktor, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor, 78 hlm.
- Bollag, D.M., & Edelman, S.J. (1991). Protein methods. Department of Biochemistry University of Geneva - Switzerland. Wiley-Liss, 170 pp.
- Ellis, A.E. (1999). Immunity to bacteria in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 9, 291-308.
- Giordano, L.G.P., Muller, E.E., Klesius, P., & Silva, V.G.D. (2010). Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. *Aquaculture Research*, 41, 1539-1544.
- Ho, L.P., Lin, J.H.Y., Liu, H.C., Chen, H.E., Chen, Y.Y., & Yang, H.L. (2011). Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. Piscicida. *Fish & Shellfish Immunology*, 30, 412-419.
- Ismail, N.D.A., Atta, N.S., & Aziz, A.E. (2010). Oral vaccination of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against motile *Aeromonas septicaemia*. *Nature and Science*, 6 pp.
- Kaattari, S., Bromage, E., & Kaattari, I. (2005). Analysis of long-lived plasma cell production and regulation: implications for vaccine design for aquaculture. *Aquaculture*, 246, 1-9.
- Klesius, P.H., Evans, J.J., & Shoemaker, C.A. (2007). The macrophage chemotactic activity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* extracellular products (ECP). *Fish and Shellfish Immunology*, 22, 443-450.

- Korkoca, H., & Boynukara, B. (2003). The characterization of protein profiles of the *Aeromonas hydrophila* and *A. caviae* strains isolated from gull and rainbow trout feces by SDS-PAGE. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 27, 1173-1177.
- Mora, M., Veggi, D., Santini, L., Pizza, M., & Rappuoli, R. (2003). Reverse vaccinology. *Drug Discovery Today*, 8, 459-464.
- Movahedi, A. & Hampson, D.J. (2008). New ways to identify novel bacterial antigens for vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 131, 1-13.
- Pasnik, D.J., Evans, J.J., Panangala, V.S., Klesius, P.H., Shelby, R.A., & Shoemaker, C.A. (2005). Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *Journal of Fish Diseases*, 28, 205-212.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., & Klein, D.A. (2005). *Microbiology*. 6th Edition, New York, NY. McGraw Hill, p. 673-760.
- Scarselli, M., Giuliani, M.M., Adu-Bobie, J., Pizza, M., & Rappuoli, R. (2005). The impact of genomics on vaccine design. *Trends Biotechnology*, 23, 84-91.
- Thomas, P.C., Divya, P.R., Chandrika, V., & Paulton, M.P. (2009). Genetic characterization of *Aeromonas hydrophila* using protein profiling and RAPD PCR. *Asian Fisheries Sciences*, 22, 763-771.
- Tommaso, A.D., Magistris, M.T.D., Bugnoli, M., Marsili, I., Rappuoli, R., & Abrignani, S. (1994). Formaldehyde treatment of proteins can constrain presentation to T cells by limiting antigen processing. *Infection and Immunity*, 62(5), 1830-1834.
- Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Magarinos, B., & Barja, J.L. (2009). Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. *Options Mediterraneennes*, 86, 155-176.