

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Pasteurella multocida*

Pertama kali bakteri ini ditemukan oleh Pasteur pada tahun 1880 dari unggas yang menderita kolera. Sekitar tahun 1887 – 1889 ditemukan oleh Rivolta dan Rivolee pada wabah yang menyerang unggas. Pada tahun 1878 Bollinger di Jerman menyampaikan kasus kejadian pada sapi. Pada tahun 1887 Trevisan mengusulkan nama *Pasteurella* pada organisme tersebut sebagai penghormatan terhadap kerja Louis Pasteur dalam meneliti etiologi dari kolera unggas. Penyakit yang disebabkan oleh *Pasteurella multocida* pada sapi disebut penyakit ngorok dengan nama lain *Septicemia Epizootica* (SE) atau *Haemorrhagic Septicaemia* (HS), sedang apabila menyerang pada unggas disebut kolera unggas (De Alwis, 1992).

Menurut taxonomy data base identifier: 747 dari Merops (2007), kuman ini termasuk :

Superkingdom : *Bacteria*
 Phylum : *Proteobacteria*
 Class : *Gammaproteobacteria*
 Order : *Pasteurellales*
 Family : *Pasteurellaceae*
 Genus : *Pasteurella*
 Species : *multocida*

2.2 Struktur dan Morfologi

2.2.1 Struktur antigen

Pasteurella multocida mempunyai dua struktur antigen yaitu antigen kapsular (K antigen) dan antigen somatik (O antigen). Menurut Carter, berdasarkan kapsular antigen dapat dibagi menjadi 5 serotipe, yaitu A, B, C, D dan E. Robert pada tahun 1947 mengklasifikasikan serotipe tersebut dalam bentuk type I, II, III dan IV. Berdasarkan antigen somatik (O antigen), Namioka dan Murata membagi serotipe B menjadi subtype 6 B dan subtype 2 B, sedang menurut Namioka-Carter membagi menjadi serotipe 6 B dan 6 E (OIE, 2005).

Secara konvensional bahwa sifat antigenik terdapat pada kapsul dan somatik, tetapi fraksi-fraksi antigen yang secara spesifik menimbulkan kekebalan belum ditemukan (Bain *et al.*, 1982). Mulai sekitar tahun 1990 mulai banyak penelitian antigen yang bersifat imunogenik yang mengarah ke protein sebagai faktor yang berperan (Woolcock, 1992).

2.2.2 Morfologi

Pasteurella multocida berbentuk *coccobacillus*, bersifat gram negatif dan mempunyai kapsul, dalam biakan koloninya akan tampak halus, sedang yang tak berkapsul koloninya tampak kasar, tidak mempunyai spora dan tidak bergerak (non motil). Kuman ini dengan ciri khas bipolar yaitu mempunyai dua kutub, bersifat gram negatif (Bain *et al.*, 1982).

2.2.3 Kapsul

Spesifitas antigenik dari kapsul *Pasteurella multocida* dapat dibagi menjadi serotipe A, B, D, E dan F. Menurut Carter (1967) Kapsul dari tipe A terdiri dari asam hialuronik, polisakarid, lipid dan protein.

Menurut Ryu *et al.* pada tahun 1984, asam hialuronik tidak mempunyai aktifitas untuk menghindar dari pagosit, tetapi ekstrak kapsul dengan BM sekitar 300 kDa mampu menghambat fungsi sel leukosit polimorponuklear pada sapi. Menurut Snipes dan Hirsh pada tahun 1986, kapsul dari strain unggas mampu melindungi dari aktifitas komplemen. Adanya kapsul yang bersifat antigenik atau disebut K antigen akan menambah virulensi dari kuman, karena dapat mencegah fagositosis dan dapat dipakai dalam menetapkan diagnosis (Woolcock, 1992).

2.2.4 Pili

Banyak kuman gram negatip mempunyai pili, berupa tonjolan-tonjolan pada permukaan sel yang terdiri dari atas sub satuan protein. Adanya pili menyebabkan kuman *Pasteurella multocida* mampu mengadakan perlekatan dengan reseptor sel pada *host*. Perlekatan setiap strain berbeda satu dengan lainnya, pada strain tipe A lebih kelihatan perlekatannya pada sel epitel trachea pada babi dibanding tipe D (Woolcock, 1992).

2.2.5 *Outer membran proteins (OMP)*

Karakteristik dari kuman gram negatif adalah dikelilingi dengan selaput membran luar. Selaput luar merupakan suatu selaput ganda fosfolipid yang khas, merupakan suatu mosaik cairan yang mengandung sejumlah protein khusus yang tertanam dalam suatu matres fosfolipid. Protein ini meliputi 3 atau 4 protein utama, yang merupakan 70% dari protein selaput luar. Selain fungsi protein dalam pengangkutan dan difusi yang tidak khas, pelbagai protein selaput luar terlibat pula dalam proses konyugasi kuman dalam mengendalikan replikasi DNA dan pembelahan sel. Selaput luar berfungsi pula sebagai penghalang difusi molekul besar dan sebagai selaput pelindung untuk enzim hidrolitik atau protein pengikat yang bertumpuk dalam rongga periplasma (Jawetz, *et al.*, 2002). Protein ini juga berperan dalam menunjukkan adanya sifat imunogenik pada berat molekul tertentu.

Dalam penelitian yang dilakukan pada *Pasteurella multocida* tipe 3:A pada kelinci, ditemukan 18 pita protein yang mempunyai respon terhadap antibodi, dengan analisa *Western Blot* diketahui yang mempunyai antigenesitas kuat terhadap antibodi adalah protein dengan BM 27 , 37,5 , 49,5, 58 dan 64,4 kDa (Lu *et al.*,1988).

Pada kasus penyakit atrophic rhinitis yang disebabkan oleh *Pasteurella multocida* dimana protein yang terlibat berada pada kisaran 28 – 40 kDa. Terdapat lebih dari 40 pita profil protein kompleks pada strain kuman *Pasteurella multocida* dan yang menonjol protein dengan

BM 27 kDa karena hampir terdapat pada semua isolat. Protein dengan BM 50 kDa pada *Pasteurella multocida* strain unggas mampu menghambat fagositosis dari mononuklear (Woolcock, 1992).

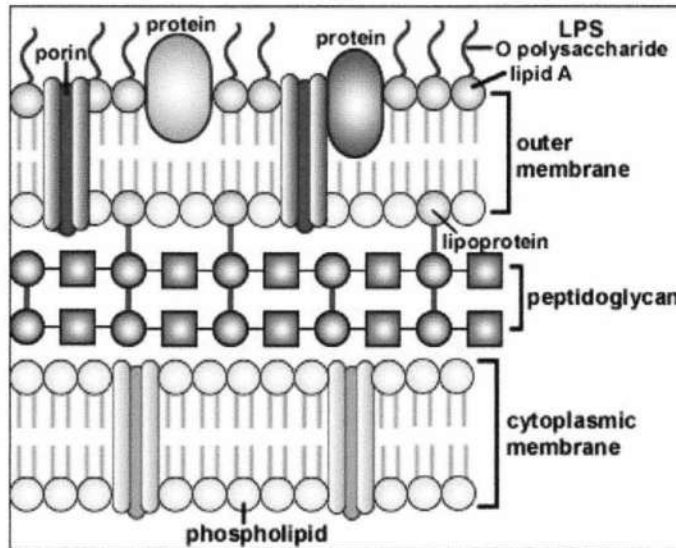
Menurut Marandi *et al* (1996) OMP dengan protein BM 32 kDa dari *Pasteurella multocida* kapsular serotipe D, mempunyai antigenisitas silang. Pada kolera unggas yang disebabkan *Pasteurella multocida* serotipe A1, A3 dan A4 pada protein 39 kDa mampu menunjukkan adanya reaksi imunogenik silang (Tabatai and Emillie, 2003).

Pada penelitian pembuatan subunit vaksin dari *Pasteurella multocida* serotipe A1 untuk kolera unggas, diteliti dari protein dengan BM 30 – 80 kDa yang terdapat pada fraksi OMP. Protein rentangan itu yang menonjol adalah pada pita 30, 33 dan 45 kDa dan pengujian pada mencit memberikan proteksi 80 % (Hamhuan *et al.*, 2004).

Pati dkk mengatakan , protein dengan BM 44, 37 dan 30 kDa dari *Pasteurella multocida* tipe B yang diisolasi dari kerbau menunjukkan respons imunogenik yang kuat (Borkowska and Agniezkha, 2003). Protein 39 kDa strain P-1059 (serovar A:3) dari *Pasteurella multocida* pada unggas yang dicobakan pada mencit dapat menimbulkan respons kekebalan sekitar 60 – 100% dan juga dapat menimbulkan respons kekebalan silang dengan serovar A:1 (Al-haj, 2004)

Protein dengan BM 44, 37 dan 30 kDa *Pasteurella multocida* serotipe B merupakan protein imunogenik. Hasil immunoblotting

menunjukkan bahwa protein tersebut merupakan antigenik kuat (Verma and Jaiswal, 1998).



Gambar 2.1 Model pembungkus kuman Gram negatif (Jawetz *et al.*, 2002)

2.3 Imunogen

Imunogen merupakan zat yang mempunyai kemampuan untuk membangkitkan respons imun spesifik yaitu pembentukan antibodi, pengembangan imunitas seluler atau keduanya. Antigen adalah zat yang dapat bereaksi dengan produk-produk dari respons imun spesifik, misalnya antibodi. Imunogen selalu bersifat antigenik, sebaliknya antigen tidak selalu imunogenik. Sebagai contoh suatu zat yang mempunyai berat molekul rendah yang disebut haptan tidak bersifat imunogenik tetapi

bersifat antigenik, dan sifat imunogenisitas suatu zat dipengaruhi oleh berbagai macam faktor (Belanti, 1985).

Ukuran molekul merupakan salah satu faktor yang menentukan imunogenisitas suatu zat. Zat yang dengan berat molekul rendah tidak bersifat imunogenik. Imunogen yang efektif paling tidak mempunyai berat molekul di atas 10.000 Da. Hapten merupakan zat yang mempunyai BM rendah, kurang dapat bersifat imunogen tetapi bila bergabung dengan protein pembawa sehingga BM nya menjadi ukuran yang sesuai di atas 10.000 dapat bersifat imunogen (Belanti, 1985). Menurut Kuby (1992) imunogen yang paling baik mempunyai BM mendekati 100.000 Da.

2.4 Protein

Protein merupakan biomolekul yang sangat penting. Beberapa fungsi protein adalah sebagai katalisator (enzim), pengangkut dan penyimpanan, penyebab gerakan, pendukung kekakuan struktural maupun pendukung sistem kekebalan. Protein merupakan makromolekul yang mengandung nitrogen dan bobot molekul berkisar antara 5000 hingga 1.000.000 lebih (Aulani'am, 2005)

Berdasarkan fungsinya, protein dapat digolongkan : enzim (ribonuklease, tripsin), protein transport (hemoglobin, albumin serum, gandum, ovalbumin = telur, kasein = susu, feritin), protein kontraktile (aktin, myosin, tubulin, dynein) protein struktural (keratin, fibroin, kolagen, elastin, proteoglikan), protein pelindung (antibodi, fibrinogen,

trombin, toksin botulinium, toksin difteri, bisa ular, risin), protein pengatur (insulin, hormone tumbuh, kortikotropin, repressor) (Toha, 2001).

2.5 Vaksin

Vaksin SE termasuk vaksin bakterial, di mana vaksin bakterial ini dapat dibagi menjadi dua kelompok :

- a. Vaksin inaktif, dimana komposisinya dapat terdiri dari sel utuh kuman *Pasteurella multocida* yang telah diinaktifkan, atau pemurnian dari fraksi selnya seperti protein.
- b. Vaksin aktif, di mana terdiri dari kuman hidup yang sudah dilemahkan.

Pendekatan dalam perkembangan pembuatan vaksin tergantung banyak faktor, walaupun pada dasarnya pengelompokan jenis vaksin seperti yang tersebut di atas.

Pada mulanya pengembangan vaksin dengan teknik pencarian kultur *seed* atau isolat yang sesuai dengan kasus penyakit yang ada atau isolat lapangan, karena isolat ini biasanya lebih mendekati dengan penyakit yang terjadi, dan juga pembuatan vaksin dengan formula adjuvant yang sesuai. Ada dua Pendekatan rancangan pembuatan vaksin terbaru yaitu yang pertama dengan teknik molekuler, di mana dengan sengaja memanipulasi molekuler atau *recombinant* dan yang kedua dengan teknik melakukan identifikasi komponen antigen yang dapat menimbulkan respon imunogenik, komponen ini dikenal sebagai bahan

sub unit vaksin, untuk itu diperlukan karakterisasi terhadap komponen tadi dan salah satu komponen yang berperan adalah protein (Morrison, 1997)

2.5.1 Respon imun

Injeksi satu dosis suatu substansi asing ke dalam binatang yang mampu membuat respon imun akan menghasilkan antibodi spesifik yang muncul dalam serum sesudah beberapa waktu berlangsung. Pemaparan pertama pada imunogen membangkitkan respons primer. Segera sesudah perkenalan dengan imunogen, sedikit antibodi atau tidak ada antibodi yang ditemukan dalam serum. Periode ini disebut periode *induktif* atau periode *laten*. Selama waktu tersebut imunogen dikenal sebagai benda asing dan diproses, dan isyarat yang tidak diketahui dikirim pada sel-sel yang sesuai yang ditugaskan untuk membuat antibodi. Periode laten ini dikarakterisasi dengan proliferasi dan diferensiasi seluler. Lama periode ini bervariasi dan tergantung pada : 1) imunogenisitas, kualitas, bentuk dan kelarutan stimulant, 2) spesies binatang yang diinjeksi, 3) rute imunisasi, 4) sensitifitas asay yang digunakan untuk mendeteksi antibodi yang baru dibentuk. Sesudah timbulnya antibodi pertama pada akhir periode induksi, mulailah waktu biosintesis aktif antibodi yang dapat dibagi lebih lanjut menjadi tiga fase. Dalam fase pertama, ialah *logaritmik*, konsentrasi antibodi bertambah secara logaritmik selama 4 – 10 hari, tergantung pada sifat imunogen, sampai konsentrasi ini mencapai puncaknya. Selama fase ini, waktu ganda (*doubling time*), ialah waktu yang diperlukan untuk

mencapai kenaikan kadar antibodi dua kali lipat, dilaporkan hanya 5 – 8 jam. Titer antibodi tertinggi terhadap protein yang larut dicapai dalam 8 – 12 hari (Belanti, 1985).

Antibodi-antibodi yang dibentuk awal dalam respons imun mempunyai daya gabung rendah, dan daya gabung antibodi yang dibentuk biasanya bertambah besar dengan bertambahnya waktu. Respons sekunder terjadi pada pemaparan kedua terhadap imunogen yang sama, setelah beberapa minggu, bulan atau bahkan beberapa tahun kemudian, ada suatu penambahan respon yang menyolok sekali, yang dikarakterisasi dengan pemunculan sel-sel imunokompeten dan antibodi yang dipercepat. Jika antibodi masih dalam serum pada saat injeksi imunogen kedua, antibodi ini menghilang lebih cepat dalam fase penurunan respons primer. Peristiwa ini disebut *fase negatif*. Hal ini disebabkan karena reaksi cepat antibodi yang ada sebelumnya dengan imunogen yang baru disuntikkan, menghasilkan pembentukan kompleks antigen-antibodi. Jika dosis kedua imunogen ini sangat kecil, penambahan respons imun tidak terjadi, mungkin karena semua imunogen yang disuntikkan dihabiskan dalam kompleks antigen-antibodi, difagosit, dan dilenyapkan secara efektif, sehingga sel-sel pembentuk antibodi kehilangan rangsangan. Bila dosis imunogen kedua ini cukup sehingga memungkinkan zat-zat ini tersisa sesudah pembentukan kompleks antigen-antibodi untuk merangsang sistem imun, maka respons sekunder

yang khas atau *recall* dicetuskan, dan ini sebagai prinsip dasar *booster* vaksin maupun pembuatan antibodi poliklonal (Belanti, 1985).

2.6 Karakterisasi Profil Protein

2.6.1 Elektroforesis

Karakterisasi protein antigen berdasarkan berat molekul dan biasanya yang dipakai adalah *sodium dodesil-poliakrilamid gel elektroforesis* (SDS-PAGE).

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) adalah merupakan standar metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur subunit dan kemurnian protein. Protein adalah molekul yang amphoteric mengandung kedua group karboksil negatif dan grup amino positif. *Isoelectric point* (pI) adalah pH pada protein yang tidak mempunyai jaringan elektrik. Hal itulah menjadi ukuran dari sejumlah protein grup positif dan negatif, dan merupakan jalan yang tepat sekali untuk membedakan secara relatif jaringan protein yang tidak bermuatan listrik (Rantam, 2003).

2.6.2 Blotting

Merupakan teknik untuk mentransfer pita protein dari gel hasil elektroforesis ke matrik membran. Hal ini dilakukan untuk identifikasi dan klasifikasi terhadap spesifitas protein dengan antibodinya. Pada umumnya protein yang tidak dimurnikan mengandung banyak protein yang berbeda dan tidak spesifik. Untuk itu dalam mengukur single protein spesifik

diperlukan *chemical assay*. Sedang pada enzimatik atau sifat ikatan dari sigle protein tidak dapat diukur. Meskipun dengan PAGE protein dapat dideteksi, tetapi bukan protein yang spesifik. Sehingga untuk mendeteksi protein yang spesifik diperlukan imunokimia (Rantam, 2003).

2.6.3 Western Blot

Suatu cara untuk mendeteksi antigen yang mempunyai ukuran kecil dalam larutan yang banyak mengandung protein. Antibodi yang dipergunakan harus mempunyai spesififikasi tinggi dan mempunyai daya ikat yang stabil. Namun demikian pada protein yang spesifikasinya rendah jika dilakukan denaturasi sebelum dilakukan transfer dengan SDS akan menolong protein terhadap antibodi. Hal ini disebabkan kemungkinan terjadinya fragmentasi protein, sehingga antibodi mengenali epitop (Rantam, 2003).

2.6.4 Dot Blot

Suatu cara untuk mendeteksi keberadaan antigen, dengan protein yang akan diuji langsung ditetaskan pada membran. Sampel yang berisi antigen ditetaskan pada membran, diuji dengan antibodi hasil produksi hewan coba yang telah dimunisasi dengan antigen. *Dot Blot* hanya memberikan informasi tentang keberadaan antigen, tidak untuk menentukan berat molekul, tapi dapat digunakan untuk menetapkan

secara cepat konsentrasi optimal antigen dan pelabelan antibodi yang digunakan dalam *Western Blot* (Aulani'am, 2005).