

Gambar 3.1 Alur kerangka kerja

Keterangan :

- > alur kerja bahan dari isolat Pusvetma
- > alur kerja bahan dari isolat Maros
- >** alur kerja dilakukan secara silang antar kedua isolat

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1 Data penelitian.

Penyajian data penelitian disusun sebagai berikut :

Tahap pertama adalah pembiakkan kedua isolat pada media pertumbuhan dan dibuat suspensi kuman kemudian dilakukan uji kemurnian. Data hasil pengujian sebagaimana Tabel 4.1 dan Gambar 4.1 dan 4.2

Tahap kedua pembuatan antibodi poliklonal pada kelinci menggunakan kedua isolat kultur kuman dan *adjuvant Seppic* ISA 50. Serum yang dihasilkan dipergunakan sebagai antibodi primer .

Tahap ketiga dilakukan ekstraksi protein dari kuman *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros, dilakukan secara mekanik dengan sonikasi dan penambahan *Tween*, supernatan hasil ekstraksi proteinnya ditampung dalam *cryotube*, kemudian diukur kandungan protein yang ada dengan cara biuret dihasilkan kadar 2660 µg/mL untuk isolat Pusvetma dan 2280 µg/mL untuk isolat Maros.

Tahap keempat karakterisasi profil protein dengan SDS-PAGE diperoleh beberapa pita protein dari kedua isolat kuman *Pasteurella multocida* dengan kisaran 21 – 166 kDa. Data visualisasi pada Gambar 4.3

Tahap kelima adalah uji afinitas antara antibodi poliklonal hasil induksi *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros terhadap masing-masing antigen protein kedua isolat. Data visualisasi pada Gambar

4.4 dan 4.5 . Selanjutnya pada uji afinitas silang antar antibodi poliklonal hasil induksi dari kedua *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros terhadap masing-masing protein antigen kedua isolat. Data visualisasi pada Gambar 4.6

Tahap keenam adalah afinitas antigenisitas profil protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros dengan masing-masing antibodi poliklonal hasil induksinya dan afinitas silang antar antibodi poliklonal hasil induksi dari kedua *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros terhadap masing-masing profil protein antigen kedua isolat. Data visualisasi menunjukkan protein dengan BM 31,51 kDa dan 54,34 kDa Gambar 4.6

4.2 Penapisan Hasil penelitian.

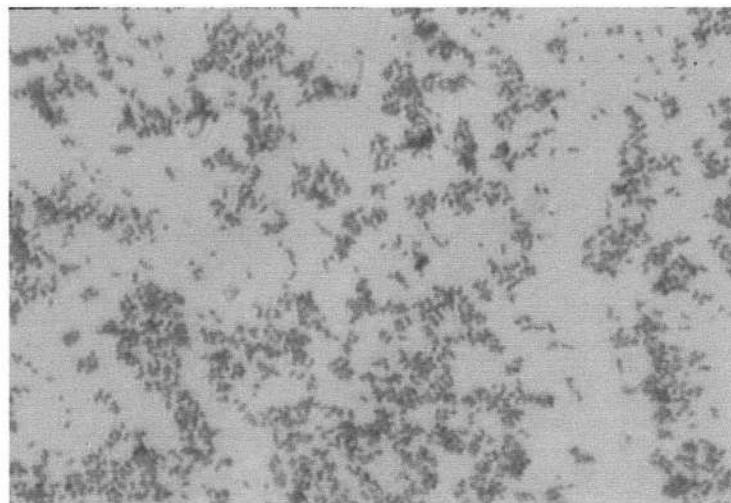
Berdasarkan pejelasan data penelitian, maka hasil penelitian diuraikan sebagai berikut :

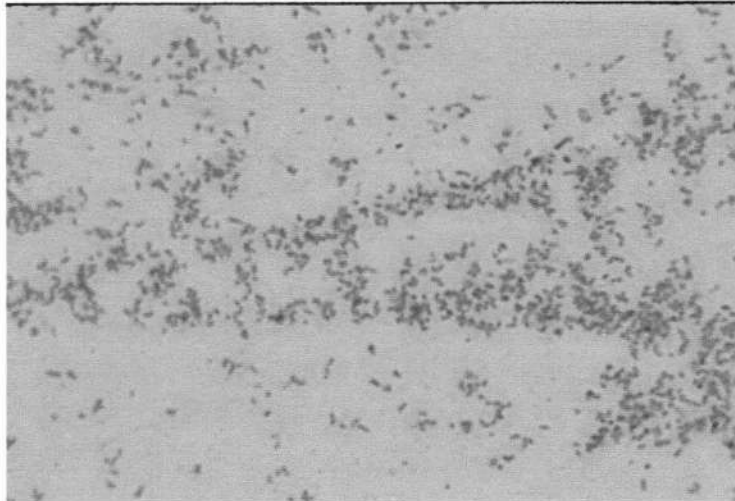
4.2.1 Uji kemurnian kultur

Uji kemurnian kultur dilakukan untuk mencegah adanya kontaminasi dari kuman lain supaya analisis protein yang dilakukan murni terhadap kedua isolat yang diteliti. Hasil uji biokimiawi dan pewarnaan gram sebagai berikut :

Tabel 4.1 Hasil Uji Kemurnian Kuman

No.	Jenis Pemeriksaan Biokimia	Kuman <i>Pasteurella multocida</i> isolat Pusvetma	Kuman <i>Pasteurella multocida</i> isolat Maros
1.	Motility	-	-
2.	Hemolysis	-	-
3.	Indol	+	+
4.	Glucose	+	+
5.	Saccharose	+	+
6.	Lactose	-	-
7.	Katalase	+	+
8.	Raffinose	-	-
9.	Rhamnose	-	-
10	Litmus Milk	Netral	Netral

Gambar 4.1 Morfologi kuman *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dengan pembesaran 1000 X .



Gambar 4.2 Morfologi kuman *Pasteurella multocida* isolat Maros dengan pembesaran 1000 X.

4.2.2 Pembuatan antibodi poliklonal.

Formulasi volume kuman dengan adjuvant *Seppic Isa 50* adalah sama banyak. Adjuvan tersebut sebagai pengganti dari Freund's Complete Adjuvant (FCA) dan Freund's Incomplete Adjuvant (FIA), yang komponennya terbuat dari manide-oleate (The University of Iowa, 2002; University of California, 2004). Keunggulan daripada formula tersebut dibanding Freund's Adjuvant, tidak perlu pada awal vaksinasi menggunakan FCA dan ulangnya dengan FIA Freund's Adjuvant, demikian juga viscositasnya lebih encer sehingga lebih mudah disuntikkan pada kelinci dan tidak menimbulkan reaksi kesakitan. Formulasi biakan kuman dengan kepekatan 5 kali *Brown's tube* no 6 ditambah adjuvan dengan volume yang sama banyak. Setelah jadi vaksin disuntikkan pada kelinci secara subcutan dengan dosis 0,2 ml (RATS on line, 2003). Penyuntikan diulang dengan interval 2 minggu sekali sebanyak 3 kali

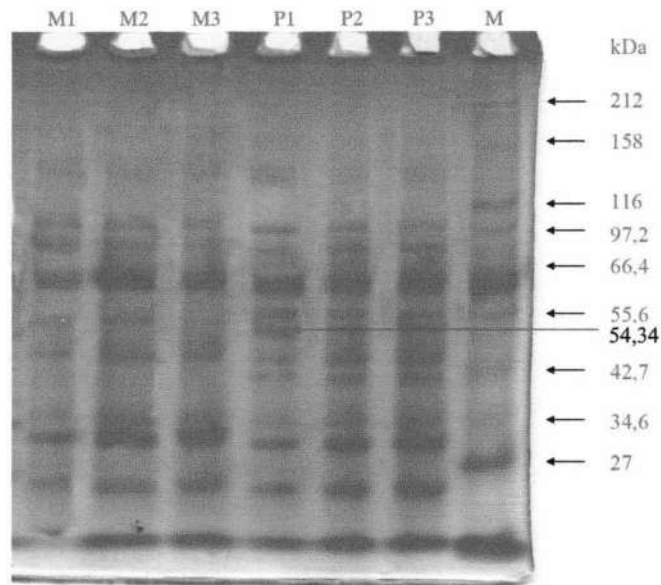
ulangan dengan dosis yang sama. Pada akhir interval ke 3 diambil darah dari kelinci tadi untuk uji imunobloting.

4.2.3 Ekstraksi Protein dari *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros .

Secara umum ada berbagai cara untuk ekstraksi protein diantaranya dengan sonikasi, penggerusan, enzimatis dan deterjen, dalam hal ini ekstraksi protein dari *Pasteurella multocida* Isolat Pusvetma dan isolat Maros dilakukan dengan sonikasi dan penambahan Tween, tujuan dari cara tersebut untuk memecah ikatan protein dari dinding sel kuman isolat kemudian supernatan hasil ekstraksi proteinnya ditampung dalam *cryotube*, kemudian kandungan protein yang ada diukur dengan cara biuret dihasilkan kadar 2280 µg/mL untuk isolat Pusvetma dan 2660 µg/mL untuk isolat Maros. Perhitungan pada Lampiran 2

4.2.4 Karakterisasi Profil Protein *Pasteurella multocida* Isolat Pusvetma dan isolat Maros .

Setelah didapat hasil ekstraksi protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros, kemudian dikarakterisasi profil proteinnya dengan metode elektroforesis (SDS-PAGE 12 %), dan didapatkan beberapa pita protein seperti pada Gambar 4.3



Gambar 4.3 Profil Protein *Pasteurella multocida* dengan teknik SDS-PAGE 12 %.

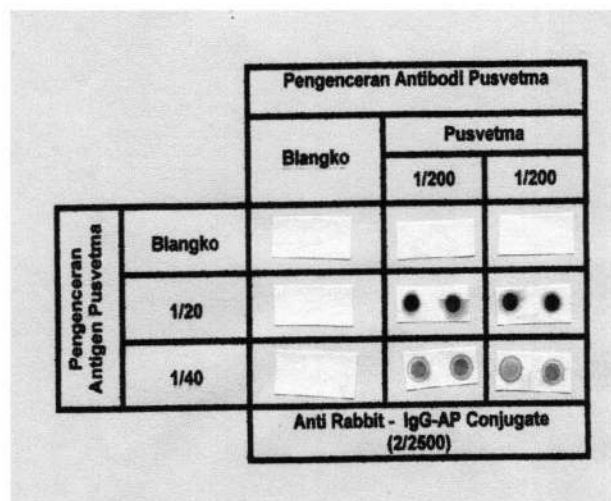
Keterangan: M = Marker ;
 M 1, 2,3 = isolat Maros
 P 1, 2,3 = isolat Pusvetma.

Hasil isolat Pusvetma menunjukkan beberapa pita protein yaitu 166,26; 128,45; 99,23; 85,98; 70,34; 60,95; 54,34 ; 45,75; 41,98; 38,52; 31,51; 28,1; 21,09 kDa, sedangkan isolat Maros menunjukkan adanya pita dengan BM yaitu 166,26; 128,45; 99,23; 85,98; 70,34; 60,95; - ; 45,75; 41,98; 38,52; 31,51; 28,1; 21,09 kDa. Pita protein 54,34 kDa hanya didapatkan pada isolat Pusvetma. Perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 1. Dari hasil konfirmasi berdasarkan berat molekul dari 13 pita dan 12 pita yang ada, berdasarkan berat molekul proteinnya maka dikategorikan sebagai protein yang mempunyai kemampuan imunogenik, karena memenuhi syarat untuk dijadikan imunogen, yang

mana imunogen yang efektif mempunyai protein dengan berat molekul (BM) lebih besar dari 10.000 Da (Belanti, 1985).

4.2.5 Analisis antigenisitas protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros

Analisis afinitas antigen terhadap antibodi digambarkan dari hasil uji dot blot yang menunjukkan bahwa *crude* protein yang mengandung protein total dari kedua isolat mampu dikenali oleh antibodi hasil induksinya (Gambar 4.4 dan 4.5)



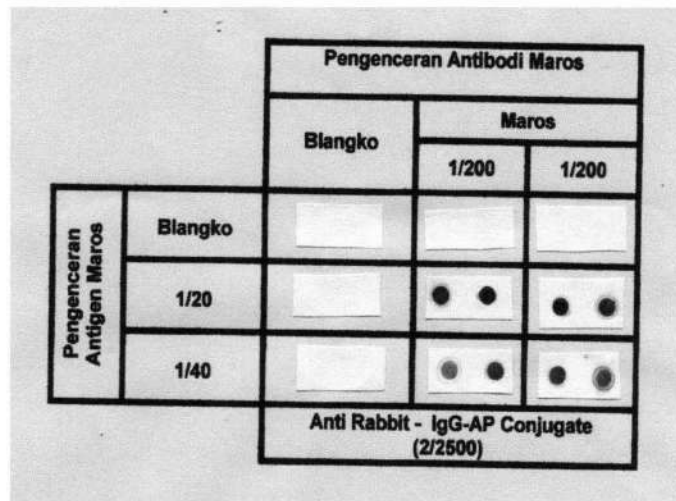
Gambar 4.4 Uji dot blot protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dengan antibodi hasil induksinya pada Kelinci

Keterangan : 1/20 ; 1/40: pengenceran antigen dan 1/200 pengenceran antibodi

positif : berwarna biru

Blangko : reaksi tanpa antibodi primer.

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa adanya perbedaan intensitas warna (ungu) yang dipengaruhi oleh pengenceran antigennya yaitu protein isolat Pusvetma, artinya semakin sedikit kandungan protein, maka ratio ikatan yang terbentuk dengan antibodinya juga semakin kecil, sehingga warna semakin terang. Hal ini tampak bahwa pengenceran antigen 1/20 menghasilkan intensitas warna yang lebih gelap dibanding pengenceran 1/40. Hal yang sama juga ditunjukkan pada gambar 4.5 yaitu Uji dot blot protein *Pasteurella multocida* isolat Maros dengan antibodi hasil induksinya pada kelinci.



Gambar 4.5 Uji dot blot protein *Pasteurella multocida* isolat Maros dengan antibodi hasil induksinya pada kelinci

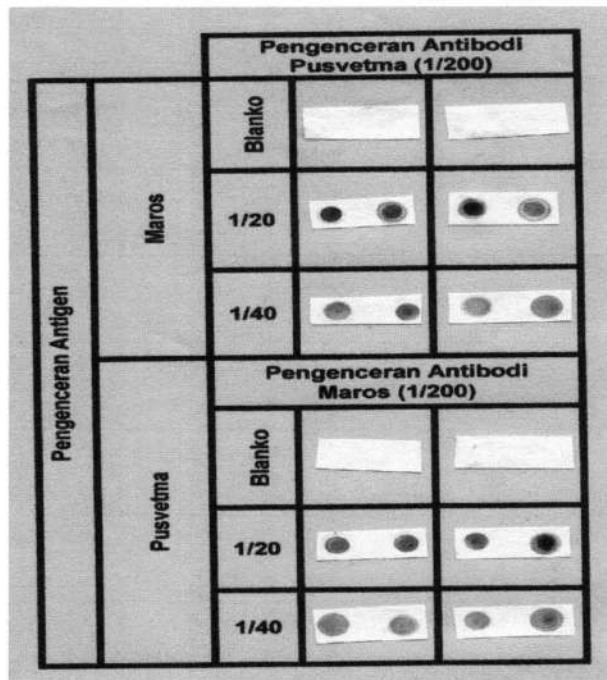
Keterangan : 1/20 ; 1/40: pengenceran antigen dan 1/200 pengenceran antibodi

Positif : berwarna biru

Blangko : rekasi tanpa antibodi primer.

Afinitas silang antara protein antigen *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros terhadap antibodi antar keduanya menunjukkan adanya penyerapan warna, yang berarti kedua isolat

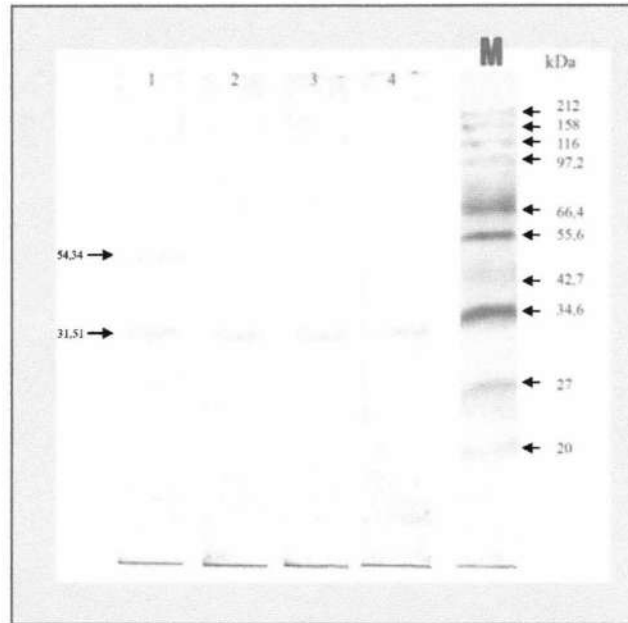
tersebut saling dapat dikenali oleh kedua antibodi dan terbukti mampu memberikan intensitas warna ungu. Data visualisasi pada Gambar 4.6



Gambar 4.6 Afinitas silang antara kedua isolat protein *Pasteurella multocida* dengan antibodi hasil induksinya pada kelinci
 Keterangan : 1/20 ; 1/40: pengenceran antigen dan 1/200 pengenceran antibodi
 Positif : berwarna biru
 Blangko : rekasi tanpa antibodi primer.

4.2.6 Analisis afinitas antigenisitas profil protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros

Hasil uji dot blot menunjukkan adanya pengenalan antigen oleh antibodinya. Konfirmasi untuk mengetahui afinitas profil berat molekul yang terjadi pada hasil uji dot blot dari protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros dengan antibodi hasil induksinya, maupun afinitas silang antar antibodi hasil induksinya yang dilakukan dengan uji *western blot*, dan didapatkan hasil seperti pada Gambar 4.7



Gambar 4.7 Uji *western blot* protein *Pasteurella multocida* dengan antibodi hasil induksinya pada kelinci

Keterangan :

- Membran 1 : Ag Pusvetma + Antibodi Pusvetma
- Membran 2 : Ag Maros + Antibodi Maros
- Membran 3 : Ag Pusvetma + Antibodi Maros
- Membran 4 : Ag Maros + Antibodi Pusvetma
- M : Marker .

Gambar 4.7 pada membran pertama menunjukkan adanya protein yang dikenali oleh antibodinya yaitu protein dengan berat molekul 31,51 dan 54,34 kDa . Hal ini menunjukkan bahwa afinitas yang terjadi pada uji *western blot* untuk isolat Pusvetma adalah pada protein BM 31,51 dan 54,34 kDa dengan antibodi hasil induksinya. Sedangkan pada membran 2 hasil uji *western blot* untuk isolat Maros yang dikenali adalah protein BM 31,51 kDa oleh antibodi hasil induksinya, demikian juga pada isolat membran 3 menunjukkan berat molekul yang sama setelah dilakukan reaksi silang antara protein antigen isolat Pusvetma dengan antibodi

isolat Maros dan pada membran 4 antara protein antigen isolat Maros dengan antibodi hasil induksi isolat Pusvetma hanya dikenali pada protein dengan BM 31,51 kDa. Dengan demikian baik protein antigen isolat Pusvetma maupun isolat Maros dengan BM 31,51 kDa mampu dikenali oleh antibodi kedua isolat, sedangkan pita protein BM 54,34 kDa dari isolat Pusvetma tidak dikenali oleh antibodi isolat Maros. Hal ini karena isolat Maros tidak mempunyai protein dengan BM 54,34 kDa. Dari data penelitian ini menunjukkan bahwa isolat protein Pusvetma mempunyai kelebihan untuk menghasilkan antibodi yang dapat mengenali isolat *Pasteurella multocida* dari sumber lain yang tidak dikenali oleh antibodi dari isolat Maros. Protein BM 31,51 dan 54,34 kDa adalah antigen dinyatakan bersifat spesifik, karena dapat dikenali dan mampu menginduksi respon imun. Terbentuknya ikatan yang terjadi antara protein antigenik dengan antibodi spesifik dapat divisualisasikan dengan pewarnaan *western blue* sehingga dapat diketahui berat molekul dari protein yang spesifik (Harlow dan David 1988). Hal ini dapat dinyatakan bahwa pada protein dengan berat molekul 31,51 kDa dari kedua isolat bersifat antigenik spesifik karena mampu saling dikenali kedua antibodi hasil induksinya.

Hasil Gambar 4.7 mendukung data penelitian yang ditunjukkan oleh Gambar 4.6 dimana kedua isolat saling dikenali antar antibodi terhadap isolat masing-masing. Hal ini artinya bahwa hasil induksi isolat

Pusvetma maupun Maros dapat mengenali protein antigen isolat *Pasteurella multocida* dari lokasi yang berbeda.