

## BAB 5 PEMBAHASAN

Dari hasil uji biokimiawi, morfologi dan pewarnaan gram yang didapat maka dalam penelitian ini hasil dari biakan kultur *Pasteurella multocida* dari isolat Pusvetma dan isolat Maros dianggap murni, karena sifat-sifat yang didapat tersebut seperti pada penelitian dari Merchant and Packer (1984) , tidak terkontaminasi dengan kuman lain, oleh karena itu kedua biakan kultur tadi dapat dilanjutkan dalam penelitian untuk dikarakterisasi profil proteinnya.

Secara umum ada berbagai cara untuk ekstraksi protein antaranya dengan sonikasi, penggerusan, enzimatik dan deterjen, dalam hal ini ekstraksi protein dari *Pasteurella multocida* Isolat Pusvetma dan isolat Maros dilakukan dengan sonikasi dan penambahan Tween (Aulani'am, 2005).

Tujuan dari cara tersebut untuk memecah ikatan protein dari dinding sel, sehingga dapat diekstraksi protein struktural pada bagian luar dari sel atau *Outer membran Proteins* (OMP) kuman *Pasteurella multocida* dari kedua isolat tadi, kemudian kandungan protein yang ada diukur dengan cara biuret dihasilkan kadar 2280 µg/mL untuk isolat Pusvetma dan 2660 µg/mL untuk isolat Maros. Peranan OMP selain fungsi protein dalam pengangkutan, pelbagai protein selaput luar terlibat pula dalam proses konyugasi kuman dan dalam mengendalikan replikasi DNA dan pembelahan sel. Selaput luar berfungsi pula sebagai penghalang difusi

molekul-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.

Menurut Marandi and Mittal (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)

Hasil karakterisasi profil protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma yaitu terdapat BM 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 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. Dari analisa BM proteinnya kedua isolat ini mirip sekali hanya pita protein 54,34 kDa didapatkan pada isolat Pusvetma. Dari hasil konfirmasi berdasarkan berat molekul proteinnya, maka kedua isolat ini dikategorikan sebagai protein yang mempunyai kemampuan imunogenik, karena memenuhi syarat untuk dijadikan imunogen, hal tersebut berdasarkan bahwa imunogen yang efektif mempunyai berat molekul (BM) lebih besar dari 10.000 Da (Belanti, 1985).

Demikian juga halnya pada analisis afinitas antibodi terhadap antigen dari hasil uji dot blot yang menunjukkan bahwa *crude* protein

yang mengandung protein total dari kedua isolat mampu dikenali oleh antibodi hasil induksinya, demikian juga reaksi silang antara antigen protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros dengan antibodi antar keduanya menunjukkan adanya penyerapan warna, yang berarti kedua isolat tersebut saling mempunyai afinitas terhadap antar kedua antibodi. Hal tersebut sangat penting dalam pembuatan vaksin karena isolat sebagai *master seed* diperlukan yang dapat menginduksi antibodi dan dapat secara silang mengenali antigen yang masuk seperti halnya pada *Pasteurella multocida* serotipe A1, A2 dan A3 pada protein dengan BM 39 kDa dari isolat tadi menunjukkan kemampuan reaksi silang satu sama lain (Tabatai and Emillie, 2003).

Selanjutnya konfirmasi untuk mengetahui profil protein antigen yang spesifik pada hasil uji *dot blot* merupakan reaksi imunogenik dari protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan Maros dengan antibodi hasil induksinya, maupun reaksi silang antar antibodi hasil induksinya dilakukan dengan 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 menunjukkan afinitas adalah Protein BM 31,51 kDa dengan antibodi hasil induksinya, adapun pada membran 3 setelah dilakukan reaksi silang antara protein antigen isolat Pusvetma dengan antibodi isolat Maros dan membran 4 antara isolat Maros dengan antibodi isolat Pusvetma hanya mengenali protein dengan BM 31,51 kDa sehingga baik isolat

protein antigen Pusvetma maupun Maros dengan BM 31,51 kDa mempunyai afinitas silang yang dapat dikenali oleh antibodi kedua isolat. Pita 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, perbedaan ini dapat divisualisasikan dengan adanya perbedaan intensitas warna ungu pada Gambar 4.6. Dari data penelitian ini menunjukkan bahwa isolat protein Pusvetma mempunyai kelebihan untuk dapat menginduksi antibodi yang dapat mengenali protein antigen *Pasteurella multocida* dari daerah lain yang tidak dikenali oleh antibodi dari isolat Maros. Protein antigen BM 31,51 dan 54,34 kDa adalah protein yang mempunyai afinitas kuat yang dikenali antibodi hasil induksinya hal tersebut karena 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 and David 1988).

Secara teoritis hasil penelitian ini sesuai dengan konsep teori yang mendasari bahwa protein kedua isolat mempunyai epitop, yaitu bagian antigen yang berikatan dengan molekul imunoglobulin (*antigen binding site*) yang mempunyai potensi untuk menginduksi respon imun dengan bantuan limfosit T, dimana kedua isolat ini merupakan antigen terlarut yang ditangkap oleh sel *dendritic* atau APC (*Antigen presenting cell*) melalui tahapan endositosis yang diperantarai oleh receptor dan dipresentasikan oleh MHC (Major histocompatibility complex) kelas II.

Komplek peptida - MHC kelas II kemudian dipresentasikan dengan densitas tinggi pada permukaan sel pada saat sel *dendritic* berdifferentiasi. Pada saat sel *dendritic* matang penggantian peptida yang terikat pada MHC menjadi berkurang, dan peptida imunogenik tersekresi pada permukaan sel. Sel *dendritic* yang membawa antigen bermigrasi menuju kelenjar getah bening lokal melalui limfatik aferent. Sel *dendritic* kelenjar getah bening yang membawa antigen kemudian merangsang sel T untuk berproliferasi untuk menghasilkan antibodi (Kuby, 1992).

Pada protein dengan berat molekul 31,51 kDa dari kedua isolat mempunyai antigenisitas kuat yang saling dapat dikenali antar antibodi. Hal ini artinya bahwa isolat baik Pusvetma maupun Maros dapat dikenali antibodi hasil induksi dari isolat protein *Pasteurella multocida* dari lokasi yang berbeda, sehingga protein dengan berat molekul 31,51 kDa dapat dikembangkan sebagai bahan diagnostik untuk mendeteksi penyakit S.E yang ada di lapangan, bahkan isolat Pusvetma menunjukkan kelebihan profil protein yang dapat menginduksi antibodi untuk dapat mengenali isolat *Pasteurella multocida* dari sumber lain yang tidak dikenali oleh antibodi dari isolat Maros, maka vaksin yang dipakai selama ini dapat diandalkan sebagai penanggulangan dalam rangka pengendalian penyakit S.E yang ada di Indonesia seperti halnya yang tertera dalam Manual Penyakit Hewan Mamalia (Direktorat Kesehatan Hewan, 2001).

Dengan makin berkembangnya pembuatan vaksin kearah vaksin subunit, dimana vaksin yang terbuat dari *whole cell* masih mempunyai

kelemahan karena dalam struktur antigennya masih ada potensi virulensinya, maka dimasa mendatang dengan keterbatasan penelitian ini dapat diteliti lebih jauh lagi efektivitas dari profil protein antigen untuk dilakukan elusi sehingga mengetahui respons imunogenisitasnya pada hewan coba sebagai bahan pertimbangan untuk dikembangkan sebagai vaksin subunit.