

FF  
FFA  
T=D. 26/11  
Soe  
K

**TESIS**

**KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN STRUKTURAL  
*Pasteurella multocida* ISOLAT PUSVETMA DAN ISOLAT MAROS**



**SOEKARNO**

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2007**

TESIS

KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN STRUKTURAL  
*Pasteurella multocida* ISOLAT PUSVETMA DAN ISOLAT MAROS

SOEKARNO  
NIM. 090515532 M

PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2007

**KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN STRUKTURAL**  
*Pasteurella multocida* ISOLAT PUSVETMA DAN ISOLAT MAROS

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar pada  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

**SOEKARNO**  
NIM. 090515532 M

**PROGRAM PASCASARJANA**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**SURABAYA**

Tanggal 31 Juli 2007

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 31 Juli 2007

Oleh

Pembimbing I



Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK  
NIP. 130 676 011

Pembimbing II



Dr Suwarno, drh, Msi  
NIP. 131 836 994

Mengetahui  
KPS S2 ilmu Kedokteran Dasar



Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD  
NIP. 130 541 984

Telah diuji pada

Tanggal 31 Juli 2007

**PANITIA PENGUJI TESIS**

Ketua : Budiono, dr, MKes.

Anggota : 1. Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK  
2. Dr. Suwarno, drh, MSi  
3. Lindawati Alimsardjono, dr, MKes, SpMK  
4. Ratih Ratnasari, drh, SU

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, puji syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmatNya sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis dengan judul KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN STRUKTURAL *Pasteurella multocida* ISOLAT PUSVETMA DAN ISOLAT MAROS.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK sebagai dosen pembimbing pertama yang telah membimbing penulis dan senantiasa menyediakan waktu untuk memberikan informasi dan arahan yang sangat berharga sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian ini.
2. Dr Suwarno, drh, MSi sebagai dosen pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan terutama dalam masalah biologi molekuler dalam penelitian ini.
3. Drh Harry Besar Sosiawan, SU sebagai Kepala Pusat Veterinaria Farma Surabaya atas pemberian fasilitas dan dukungan kepada penulis selama melaksanakan tugas pendidikan program magister.
4. Drh Darmawan, MSi sebagai mantan plh. Kepala Pusat Veterinaria Farma yang memberikan dukungan dalam pengambilan program ini dan sebagai Kepala Bidang Produksi Aneka Vaksin dan Antisera Pusat Veterinaria Farma beserta staf terutama Drh Herawati, S., MKes dan Drh Hardiati yang telah membantu dalam pemakaian sarana untuk penelitian ini.

5. Dr Aulanni'am, drh, DESS Kepala Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Unibraw yang telah memfasilitasi keperluan bahan dan sarana laboratorium dalam menunjang penelitian ini.
6. Seluruh staf, karyawan, dan karyawan Laboratorium Bidang Pengujian Mutu Produksi Pusat Veterinaria Farma Surabaya yang telah membantu dalam pelaksanaan pemakaian hewan coba.
7. Kepada semua pihak yang tidak mungkin penulis sebut satu persatu, dan kepada keluarga yang telah memberikan bantuan dan dorongan serta saran-saran terhadap terlaksananya dan selesainya penelitian.

Penulis sadar bahwa tulisan ini jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran dari semua pihak masih tetap diharapkan.

Akhirnya penulis berharap semoga penelitian ini bermanfaat bagi masyarakat.

Surabaya, 31 Juli 2007

Penulis

## RINGKASAN

Di Indonesia penyakit Ngorok atau *Septicemia Epizootica* (SE) atau *Haemorrhagic Septicaemia* (HS) disebabkan oleh kuman *Pasteurella multocida* tergolong dalam penyakit hewan menular strategis.

Program vaksinasi adalah cara terbaik untuk mengatasi penyakit ini. Vaksin yang baik tergantung dari jenis formulasinya maupun *seed* isolat yang dipakai, akan lebih baik apabila dibuat dari isolat lokal karena memaparkan serotipe yang diperlukan dan sangat menentukan keberhasilan vaksin tersebut untuk memberikan kemampuan membangkitkan respons imun spesifik seperti pembentukan antibodi.

Profil protein sebagai zat yang sangat berperan dalam penentuan imunogenisitas yang terdapat sebagai bagian dari membran sel baik dari berat molekul maupun kemampuan reaksi silang untuk mengenali berbagai induksi antibodi dari isolat lain sangat diperlukan.

Penulis melakukan penelitian karakterisasi profil protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros, untuk mengetahui kisaran berat molekul protein kedua isolat *Pasteurella multocida*, antigenisitasnya terhadap antibodi spesifik dan kemampuan reaksi silang terhadap antibodi antar keduanya.

Penelitian diawali dengan pembiakan kedua isolat yang murni, untuk pembuatan antibodi poliklonal pada kelinci dengan menggunakan *adjuvant Seppic* ISA 50. Ekstraksi protein dari kedua isolat kuman *Pasteurella multocida*



dilakukan secara mekanik dengan sonikasi dan penambahan Tween, kandungan protein yang dihasilkan kadar 2660 µg/mL untuk isolat Pusvetma dan 2280 µg/mL untuk isolat Maros.

Karakterisasi profil protein dengan SDS-PAGE diperoleh beberapa 13 pita protein untuk isolat Pusvetma dan 12 pita untuk isolat Maros dengan kisaran 21 – 166 kDa. Uji afinitas antigenisitas protein kedua isolat dengan antibodi hasil induksinya memakai metode *dot blot* menunjukkan hasil yang positif, demikian juga terhadap reaksi silang antara *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat dari Maros dengan antibodi antar keduanya.

Dengan metode *western blot* menunjukkan adanya protein dengan BM 54,34 kDa pada isolat Pusvetma yang mempunyai afinitas dengan antibodi hasil induksinya dan BM 31,51 kDa dari kedua isolat yang mempunyai afinitas reaksi silang antara protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros dengan antibodi antar keduanya.

Vaksin S.E yang terbuat dari *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dapat terus diproduksi karena mempunyai kandungan protein dengan kemampuan reaksi silang dengan isolat *Pasteurella multocida* dari daerah lain.

Penelitian selanjutnya disarankan protein yang spesifik tersebut yaitu BM 54,34 kDa pada isolat Pusvetma dan BM 31,51 kDa dari kedua isolat dilakukan elusi dan diuji imunogenisitasnya pada hewan coba sebagai bahan pertimbangan untuk bahan diagnostik deteksi kasus lapangan dan pembuatan vaksin subunit.

## SUMMARY

The disease of Ngorok in Indonesia which is usually named *Septicaemia Epizootica* (SE) or *Haemorrhagic Septicaemia* (HS) was caused by *Pasteurella multocida* and classified as strategic contagious disease.

The vaccination program is the best method in the moment to eradicate the disease. To produce a good vaccine it is extremely depends on the formulation types and the seed isolate which was applied. It is better to use a local seed isolate because it roll out a serotype which can decide to give success in producing vaccines and to raise the spesific immune response as the antibody establishment.

The protein profile as a substance has extremely a role in deciding immunogenicity and it forms a part of cell membrane which was recognized by either a various antibody inductions of the isolate.

The research was intended to explore about the characterization protein profile of *Pasteurella multocida* from Pusvetma and Maros to know their molecule weight, and antigenicity against a specific antibody and the cross reaction ability of both.

The research was started by culturing both *Pasteurella multocida* to made the polyclonal antibody. the method applied was carried out by vaccination of the rabbit with seppic isa 50 adjuvant. The extraction of both *Pasteurella multocida* organism were carrier out by sonication and addition with tween 20. The protein contents of *Pasteurella multocida* were 2660 µg/ml for Pusvetma isolate and 2280 µg/ml for Maros isolate.

Protein profile characterization carried out by SDS-PAGE were obtained 13 protein ribbons for Pusvetma isolate and 12 protein ribbons for Maros isolate.

The affinity test of protein antigenicity of *Pasteurella multocida* Pusvetma isolates and Maros isolates with antibody as result of induction agains by dot blot method showed a positive result, even both of the antibodies pointed out a cross reaction with them.

By western blot method, both of *Pasteurella multocida* showed an affinity on protein and having 31.51 kDa of M.W (Molecule Weight) which has affinity a cross reaction with the antibodies of them.

The vaccine of SE made by *Pasteurella multocida* isolate came from Pusvetma can be produce continuously because it contains protein which has ability a cross reaction with other area.

Based on the research, the *Pasteurella multocida* Pusvetma isolate with antigenic protein 53,34 kDa and protein 31,51 kDa from Pusvetma isolate and Maros isolate can be judgment for diagnostic agent and to elution for imunogenicity testing to subunit vaccine production in the future.

**ABSTRACT**

This research was intended to explore about protein profile characterization, protein antigene against specific antibody and antibody crossed reaction of *Pasteurella multocida* isolate came from Pusvetma and Maros. The extraction of both *Pasteurella multocida* were carried out by sonicator and addition with tween 20. The result were the protein contents of *Pasteurella multocida* were 2660 µg/ml for Pusvetma and 2280 µg/ml for Maros.

The characterization of protein profile was carried out by 12 % SDS-PAGE metode and were obtained 13 protein ribbons for Pusvetma isolate and 12 protein ribbons for Maros isolate. Both of them had molecule weight (MV) between 21 – 166 kDa. The antigenicity protein test was carried out by dot blot metode and both of them were positive against *Pasteurella multocida* and by western blot metode, both of *Pasteurella multocida* showed an affinity on protein and having 31.51 kDa of M.W

Based on the research, the *Pasteurella multocida* isolate even from Pusvetma and Maros can be judgment for diagnostic agent and subunit vaccine in the future.

Key Word : *Pasteurella multocida*, protein profile, cross reaction affinity.



## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan .....	iv
Penetapan Panitia .....	v
Ucapan terima kasih .....	vi
Ringkasan .....	viii
Summary.....	x
Abstract.....	xi
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN ....	xvi
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xvii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>8</b>
2.1 <i>Pasteurella multocida</i> .....	8
2.2 Struktur dan Morfologi .....	9
2.2.1 Struktur antigen .....	9
2.2.2 Morfologi .....	9
2.2.3 Kapsul.....	10
2.2.4 Pili.....	10
2.2.5 <i>Outer Membrane Proteins (OMP)</i> .....	11
2.3 Imunogen .....	13
2.4 Protein .....	14
2.5 Vaksin .....	15
2.5.1 Respon imun .....	16
2.6 Karakterisasi Profil Protein .....	18
2.6.1 Elektroforesis .....	18
2.6.2 <i>Blotting</i> .....	18
2.6.3 <i>Western Blot</i> .....	19
2.6.4 <i>Dot Blot</i> .....	19
<b>BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN .....</b>	<b>21</b>
3.1 Rancangan Penelitian .....	21
3.2 Sampel .....	21
3.3 Bahan Penelitian .....	21
3.3.1 Kuman .....	21

3.3.2	Media biakan .....	22
3.4	Alat Laboratorium .....	22
3.5	Hewan Percobaan .....	22
3.6	Lokasi dan Waktu Penelitian .....	22
3.6.1	Lokasi penelitian .....	22
3.6.2	Waktu penelitian .....	22
3.7	Tahap Penelitian .....	23
3.7.1	Pembuatan kultur kuman .....	23
3.7.2	Pembuatan antibodi poliklonal .....	23
3.7.3	Ekstraksi protein kuman <i>Pasteurella multocida</i> .....	24
3.7.4	Penentuan profil berat molekul protein dengan SDS-PAGE .....	25
3.7.5	Karakterisasi protein dengan <i>Western Blot</i> .....	26
3.7.6	<i>Dot Blot</i> dari Antigen .....	28
BAB 4	HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN .....	31
4.1	Data penelitian .....	31
4.2	Analisis dan Hasil penelitian .....	32
4.2.1	Uji kemurnian kultur .....	32
4.2.2	Pembuatan antibodi poliklonal .....	34
4.2.3	Ekstraksi protein dari <i>Pasteurella multocida</i> isolat Pusvetma dan isolat Maros .....	35
4.2.4	Karakterisasi profil protein dari <i>Pasteurella multocida</i> isolat Pusvetma dan isolat Maros .....	36
4.2.5	Analisis antigenisitas protein <i>Pasteurella multocida</i> isolat Pusvetma dan isolat Maros .....	37
4.2.6	Analisis afinitas antigenisitas profil protein <i>Pasteurella multocida</i> isolat Pusvetma dan isolat Maros .....	39
BAB 5	PEMBAHASAN.....	43
BAB 6	PENUTUP .....	49
6.1	Kesimpulan .....	49
6.2	Saran .....	50
DAFTAR PUSTAKA	.....	51

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil uji kemurnian kuman .....	33

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Model pembungkus kuman Gram negatif..... 13
Gambar 3.1	Alur kerangka kerja ..... 30
Gambar 4.1	Morfologi kuman <i>Pasteurella</i> <i>multocida</i> isolat Pusvetma dengan pembesaran 1000 x ..... 33
Gambar 4.2	Morfologi kuman <i>Pasteurella</i> <i>multocida</i> isolat Pusvetma dengan pembesaran 1000 x ..... 34
Gambar 4.3	Profil protein <i>Pasteurella</i> <i>multocida</i> dengan teknik SDS- PAGE 12 % ..... 36
Gambar 4.4	Uji dot blot protein <i>Pasteurella</i> <i>multocida</i> isolat Pusvetma dengan antibodi hasil induksinya pada kelinci ..... 37
Gambar 4.5	Uji dot blot protein <i>Pasteurella</i> <i>multocida</i> isolat Maros dengan antibodi hasil induksinya pada kelinci ..... 38
Gambar 4.6	Afinitas silang antara kedua isolat protein <i>Pasteurella multocida</i> dengan antibodi hasil induksinya pada kelinci ..... 39
Gambar 4.7	Uji western blot protein <i>Pasteurella multocida</i> dengan antibodi hasil induksinya pada kelinci ..... 40

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Perhitungan Berat Molekul (BM) protein <i>Pasteurella multocida</i> pada gel SDS-PAGE 12% .....	54
Lampiran 2 : Pengukuran kadar protein <i>Pasteurella multocida</i> isolat Pusvetma dan isolat Maros .....	56



## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

Ab	: Antibodi
Ag	: Antigen
APS	: <i>Amonium Persulphate</i>
AP	: <i>Alkaline Phosphatase</i>
BCIP	: <i>5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt</i>
BM	: Berat Molekul
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
kDa	: Kilo dalton
NaN <sub>3</sub>	: <i>Sodium Azida</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
TBS	: <i>Tris Buffer Saline</i>
TEMED	: <i>Tetramethyldiamine</i>

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit Ngorok atau *Septicemia Epizootica* (SE) atau *Haemorrhagic Septicaemia* (HS) disebabkan oleh kuman *Pasteurella multocida* serotipe 6B dan 6E menurut klasifikasi Namioka dan Murata. Type B dikenal sebagai tipe I pada klasifikasi Carter dan biasanya diisolasi di Asia termasuk Indonesia, sedang tipe E biasanya di Afrika (Direktorat Kesehatan Hewan, 2001).

Pada tahun 2002 surveilans terhadap penyakit SE di Kabupaten Sumba Timur dilakukan oleh Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional VI DENPASAR BALI telah berhasil diisolasi satu isolat *Pasteurella multocida* serotipe A (BPPV VI, 2006).

Penyakit SE ini merupakan penyakit bakterial yang bersifat per akut pada ternak, yang merugikan pada sektor peternakan di Indonesia. Pada saat ini ternak masih merupakan sumber protein hewani dan tumpuan pendapatan bagi peternak. Dalam Sistem Kesehatan Hewan Nasional (SIKHNAS), penyakit SE tergolong dalam penyakit hewan menular strategis dan berdasarkan dari data Indonesia *International Animal Science Research* (INI-ANSREDEF) tahun 2001 penyakit SE ini termasuk katagori *list A*, penyakit berbahaya pada ternak (INI-ANSREDEF, 2001).

Penyakit Ngorok dapat menyerang sapi, kerbau, babi, kadang-kadang domba, kambing dan kuda. Di Indonesia, penyakit ini termasuk

endemis, hampir seluruh wilayah terkena, kecuali yang sudah dinyatakan bebas, yaitu pulau Lombok. Pembebasan penyakit Ngorok di Pulau Lombok dilakukan dengan vaksinasi masal secara intensif dan merata, selama tiga tahun berturut-turut sejak tahun 1977/1978 sampai dengan tahun 1979/1980 dan berdasarkan hasil pengamatan selama 12 tahun sejak 1985 sampai dengan bulan Juni 1997, tidak ditemukan lagi penyakit ngorok pada sapi dan kerbau (Mentan SK No. 889/Kpts/TN.560/9/97).

Pada tahun 2000 terjadi kasus penyakit SE pada sapi di Sulawesi Selatan dan oleh BPPH (Balai Penyidikan Penyakit Hewan) Wilayah VII Maros telah berhasil diisolasi kuman penyebab, yaitu *Pasteurella multocida*. Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) mendapatkan isolat tersebut sebagai pertimbangan yang akan dipergunakan sebagai *seed* produksi vaksin *Septicemia Epizootica* atau vaksin SE (INI-ANSREDEF, 2001)

Pada bulan februari 2006 di kabupaten Timor Tengah Utara, Nusa Tenggara Timur terjadi kasus penyakit SE dengan kematian sekitar 500 ekor sapi ( Kompas, 2006), pada sekitar bulan desember 2006 di Propinsi Bengkulu terjadi kasus pada 41 ekor sapi ( Suara Pembaruan, 2006 ) dan tahun 2006 di Provinsi Bali ditemukan 1 kasus di Kecamatan Tabanan ( BPPV VI, 2006 ).

Untuk pencegahan dan penanggulangan penyakit Ngorok ini, pemerintah menggunakan kebijakan dengan melakukan vaksinasi S.E, Penanggulangan dengan vaksinasi ini sangat efektif apabila dilakukan

secara teratur dan dipantau terhadap uji tanggap kebal, hal ini terbukti dengan P. Lombok yang dinyatakan bebas dari penyakit ngorok sejak tahun 1985. Pengendalian pada daerah yang belum bebas dilakukan dengan vaksinasi untuk mengebalkan atau supaya terbentuk imunitas pada ternak-ternak yang sehat, sehingga dapat kebal terhadap infeksi dari penyakit, sedangkan vaksin untuk penyakit ngorok ini diproduksi oleh Pusat Veterinaria Farma (Direktorat Kesehatan Hewan, 2001).

Imunitas sendiri tergantung dari imunogenisitas yaitu sifat sesuatu zat (imunogen) yang memberikan zat tersebut kemampuan membangkitkan respons imun spesifik seperti pembentukan antibodi, pengembangan imunitas seluler atau keduanya. Zat yang imunogenik selalu antigenik, tetapi antigen tidak selalu imunogenik. Protein sebagai zat yang sangat berperan dalam penentuan imunogenisitas, dapat berupa protein murni atau berkombinasi dengan zat lain seperti lipid (lipoprotein), asam nukleat (nukleoprotein) atau karbohidrat (glikoprotein). Lipoprotein merupakan jenis khusus imunogen yang terdapat sebagai bagian dari membran sel. Ukuran molekul sangat berpengaruh agar suatu zat dapat menjadi imunogenik. Imunogen yang efektif mempunyai berat molekul (BM) lebih besar dari 10.000 Da (Belanti, 1985).

Pati dkk mengatakan, protein dengan BM 30, 37 dan 44 kDa dari *Pasteurella multocida* type B yang diisolasi dari kerbau menunjukkan respons imunogenik yang besar (Borkowska and Agniezkha, 2003). Pada kasus *Haemorrhagic Septicaemia* (HS) di Philipina dapat diisolasi kuman

*Pasteurella multocida* type B dari kerbau dan sapi. Ciri yang menonjol adalah adanya protein dengan BM 27, 32, 45 dan 47 kDa (Johnson *et al.*, 1992).

Protein dengan BM antara 30 – 80 kDa ditemukan pada kuman *Pasteurella multocida* type A, di antaranya yang menonjol adalah protein dengan BM 30, 33 dan 45 kDa dan menunjukkan sifat imunogenik yang baik ( Hamhuan, *et al.* 2004 ). *Pasteurella multocida* serotipe A1, A2 dan A3 dapat menyebabkan penyakit kolera unggas dan protein dengan BM 39 kDa dari isolat tadi menunjukkan reaksi silang satu sama lain (Tabatai and Emillie, 2003).

Dalam perkembangan pembuatan vaksin terakhir, protein-protein yang imunogenik mulai diteliti untuk dipergunakan sebagai bahan dasar pembuatan vaksin subunit. *American Veterinary Medical Foundation* menawarkan suatu riset tentang pengembangan vaksin *Pasteurella multocida* untuk sapi dengan mempergunakan teknik *cloning* dari protein 35 kDa (Confer *et al.*, 1998)

Vaksin SE produksi Pusvetma terbuat dari *whole cell* kuman *Pasteurella multocida*, yang telah diinaktifkan dan diformulasi dengan ajuvan. Permasalahan yang ada selama ini *seed* dari vaksin S.E yang diproduksi di Pusvetma dan isolat kuman *Pasteurella multocida* dari kasus penyakit S.E di Maros belum pernah dilakukan karakterisasi profil proteinnya.

Untuk pembuatan vaksin, bahan *seed* kumannya akan lebih baik apabila dibuat dari isolat lokal karena memaparkan serotipe yang diperlukan (OIE, 2005).

Mengingat peranan protein kuman *Pasteurella multocida* sangat penting dalam penentuan imunogenisitas, maka perlu diteliti bagaimana profil dari *seed* vaksin S.E dan isolat dari kasus penyakit S.E di Maros. Penelitian ini dilakukan untuk mencoba menjawab sebagian kecil dari permasalahan yang ada.

## 1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang ada dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Bagaimanakah profil protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat dari Maros ?
2. Apakah protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat dari Maros mempunyai antigenisitas yang kuat terhadap antibodi spesifik ?
3. Apakah ada reaksi silang antara protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat dari Maros terhadap antibodi antar kedua isolat ?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### A. Tujuan umum :

Untuk mengidentifikasi profil protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat dari Maros.

#### B. Tujuan khusus :

1. Untuk mengetahui kisaran berat molekul protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat dari Maros.
2. Untuk mengetahui antigenisitas protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat dari Maros terhadap antibodi spesifik.
3. Untuk mengetahui reaksi silang antara *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat dari Maros terhadap antibodi antar keduanya.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk :

- a. Mendapatkan profil berat Molekul protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat dari Maros.
- b. Mendapatkan profil berat molekul dari *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat dari Maros yang mempunyai antigenisitas yang kuat terhadap antibodi spesifik

- c. Mendapatkan profil berat molekul yang mempunyai afinitas silang antara kedua isolat dari *Pasteurella multocida*
- d. Mendapatkan profil protein yang nantinya dapat dipergunakan sebagai bahan antigen diagnostik.



## 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).

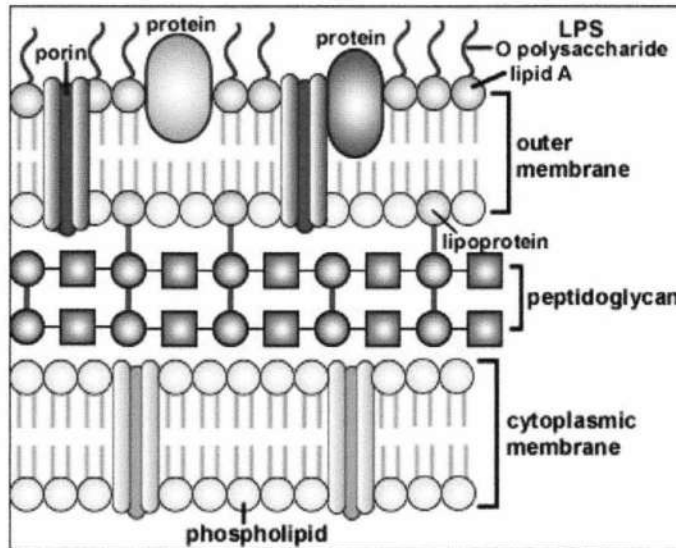
Menurut Marandi *et al* (1996) OMP dengan protein BM 32 kDa dari *Pasteurella multocida* kapsular serotipe D, mempunyai antigenisitas silang. Pada kolera unggas yang disebabkan *Pasteurella multocida* serotipe A1, A3 dan A4 pada protein 39 kDa mampu menunjukkan adanya reaksi imunogenik silang (Tabatai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

## **BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN**

### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif observasional laboratoris bertujuan untuk mengetahui karakterisasi berat molekul profil protein struktural kuman *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros dilanjutkan dengan penelitian eksploratif observasional laboratoris juga untuk mengetahui antigenisitasnya terhadap antibodi dan antigenisitas silang antar kedua isolat tadi, serta afinitas antibodi poliklonal dengan antigen maupun reaksi silang antar keduanya.

### **3.2 Sampel**

Sampel yang akan diperiksa untuk penelitian adalah isolat *seed* kuman *Pasteurella multocida* dari Pusvetma dan isolat kuman *Pasteurella multocida* dari Maros.

Hewan yang akan dipergunakan untuk pembuatan antibodi poliklonal adalah kelinci umur 4 – 6 bulan, masing-masing sebanyak 3 ekor jantan dengan berat 1,5 kg (bebas penyakit) .

### **3.3 Bahan Penelitian**

#### **3.3.1 Kuman**

Kuman *Pasteurella multocida* dari isolat Pusvetma dan kuman *Pasteurella multocida* dari isolat Maros.

### **3.3.2 Media biakan**

Media dan bahan kimia yang dipergunakan untuk menumbuhkan kultur kuman antara lain adalah *Heart Infusion Agar (HIA)*, *Casein Hydrolysate*, *Tryptone*, *Yeast extract*, *Sucrose*, *Extract Pancreas*,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ , *adjuvant Seppic ISA 50*.

### **3.4 Alat Laboratorium**

Alat-alat laboratorium yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain, Bio-Rad Mini-Protean II, penangas air, mikropipet, pengering gel, tabung ependorf, sumber arus, *shaker*.

### **3.5 Hewan Percobaan**

Kelinci jantan berat 1,5 kg umur 4 – 6 bulan untuk pembuatan antibodi poliklonal

### **3.6 Lokasi dan Waktu penelitian**

#### **3.6.1 Lokasi penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

### 3.6.2 Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret 2007 sampai dengan bulan Mei 2007.

## 3.7 Tahap Penelitian

### 3.7.1 Pembuatan kultur kuman.

Masing-masing isolat dari 2 macam kuman *Pasteurella multocida* di tumbuhkan pada media biakan yang mengandung *Heart Infusion Agar (HIA)*, *Casein Hydrolysisate*, *Tryptone*, *Yeast extract*, *Sucrose*, *Extract Pancreas*,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$  kemudian diinkubasikan pada temperatur  $37^{\circ}C$ , selanjutnya di uji kemurniannya dengan preparat apus di atas gelas obyek kemudian dilakukan pewarnaan gram.

Setelah itu kultur kuman diinaktifasi dengan formaldehyde 0,5 %, kemudian masing-masing kultur kuman yang sudah inaktif tadi dibagi dua, yang satu dipersiapkan untuk pembuatan antibodi poliklonal dan yang satunya untuk dilakukan pengukuran berat molekul proteinnya dengan elektroforesis.

### 3.7.2 Pembuatan antibodi poliklonal.

Biakan kuman inaktif distandarisasi kepekatan kuman nya 5 kali *Brown's tube* no 6. Biakan kuman ditambah dengan *adjuvant Montanide ISA 50 (Seppic ISA 50)*. *Adjuvant* 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). Formulasi volume biakan kuman dengan adjuvan adalah 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.

### **3.7.3 Ekstraksi protein kuman *Pasteurella multocida***

Melakukan ekstraksi protein harus memperhatikan cara dan sifat hasil ekstraksi, hal ini mengingat bahwa protein mudah mengalami denaturasi, maka perlu dipertimbangkan pemilihan metode untuk mempertahankan kualitas isolat yang dihasilkan.

Kultur kuman tadi disentrifugasi 8.000 rpm 10 menit kemudian supernatan dibuang dan dicuci dengan buffer *Phosphat Buffer Saline Tween* (PBST), kemudian suspensi pellet sel dalam bufer tadi kemudian disonikasi pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 3 menit jalan dan berhenti 2 menit diulang 3 kali, kemudian di sentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 10 menit. Supernatannya diambil ditambah etanol, disentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 10 menit, endapannya dipakai sebagai bahan *running*. Penentuan konsentrasi protein dengan metode biuret. (Aulani'am, 2005).

### 3.7.4 Penentuan profil berat molekul protein dengan SDS-PAGE

Penentuan profil berat molekul protein dilakukan dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan komposisi *separating gel* 12 % (2 ml acrylamide; 1,3 ml LGB, 1,7 ml ddH<sub>2</sub>O, 70 ul APS, 7 ul N,N,N',N'- *Tetramethylendiamin* (TEMED) dan *stacking gel* 3 % (415 ul UGB, 267 ul T-Acryl, 975 ul ddH<sub>2</sub>O, 20 ul APS, 2 ul TEMED). *Plate* berisi gel kemudian dipasang pada Minigel Twin G-42 *slab* dan dituangkan electrophoresis buffer (30,29 g Tris aminomethan; 144,13 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest).

Ke 2 macam isolat sampel masing-masing sebanyak 15 ul ditambah RSB (*Reducing Sampel Bufer*) sama banyak. Kemudian dipanaskan 100<sup>0</sup> C selama 3 menit, setelah didinginkan sampel dimasukkan pada sumuran *stacking gel*, dengan volume 15 µl, sebagai marker dipergunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 20 – 212 kDa produksi BIO-RAD, yang diletakkan dibagian deret paling kanan dari sumuran, sedangkan ke 2 macam isolat protein sampel dimasukkan pada sebelah kiri dari marker. Sumber arus dinyalakan pada tegangan 125 V dengan voltage konstan, 30 mA dilangsungkan sampai permukaan pewarna bermigrasi mencapai 1-5 mm dari dasar gel.

Pencucian terhadap gel hasil *running* dilakukan 3 tahap, yaitu : 1) pencucian pertama menggunakan 25 ml methanol 50%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 71,25 ml aquadest selama 30 menit; 2) Pencucian kedua

menggunakan 2,5 ml methanol 5%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 93,75 ml aquadest selama 20 menit; 3) Pencucian ketiga menggunakan glutaraldehyde 10% selama 25 menit. Gel kemudian diwarnai dengan merendam gel dalam larutan *staining* comassie blue R-250 selama 30-60 menit. Penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *destaining* (asam asetat 7 ml, methanol absolut 7 ml dan ditambahkan akuades sampai batas 100 ml) sambil digoyang dengan *shaker* sampai gel menjadi jernih, kemudian hasil dapat difoto atau di scan.

Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dimana :

$$Rf = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Kemudian dibuat kurva standar dengan harga Rf sebagai sumbu X dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu Y. Berat molekul ditentukan dengan diinterpolasikan pada kurva standar (Aulani'am, 2005).

### **3.7.5 Karakterisasi protein dengan *Western Blot***

Protein hasil SDS-PAGE dari 2 macam kuman *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan kuman *Pasteurella multocida* isolat Maros, kemudian dikarakterisasi dengan teknik *Western Blot*. Setelah proses *running* selesai, gel ditransfer pada membran nitroselulose (NC) dengan cara *semi-dry blotting* dengan tahapan sebagai berikut :

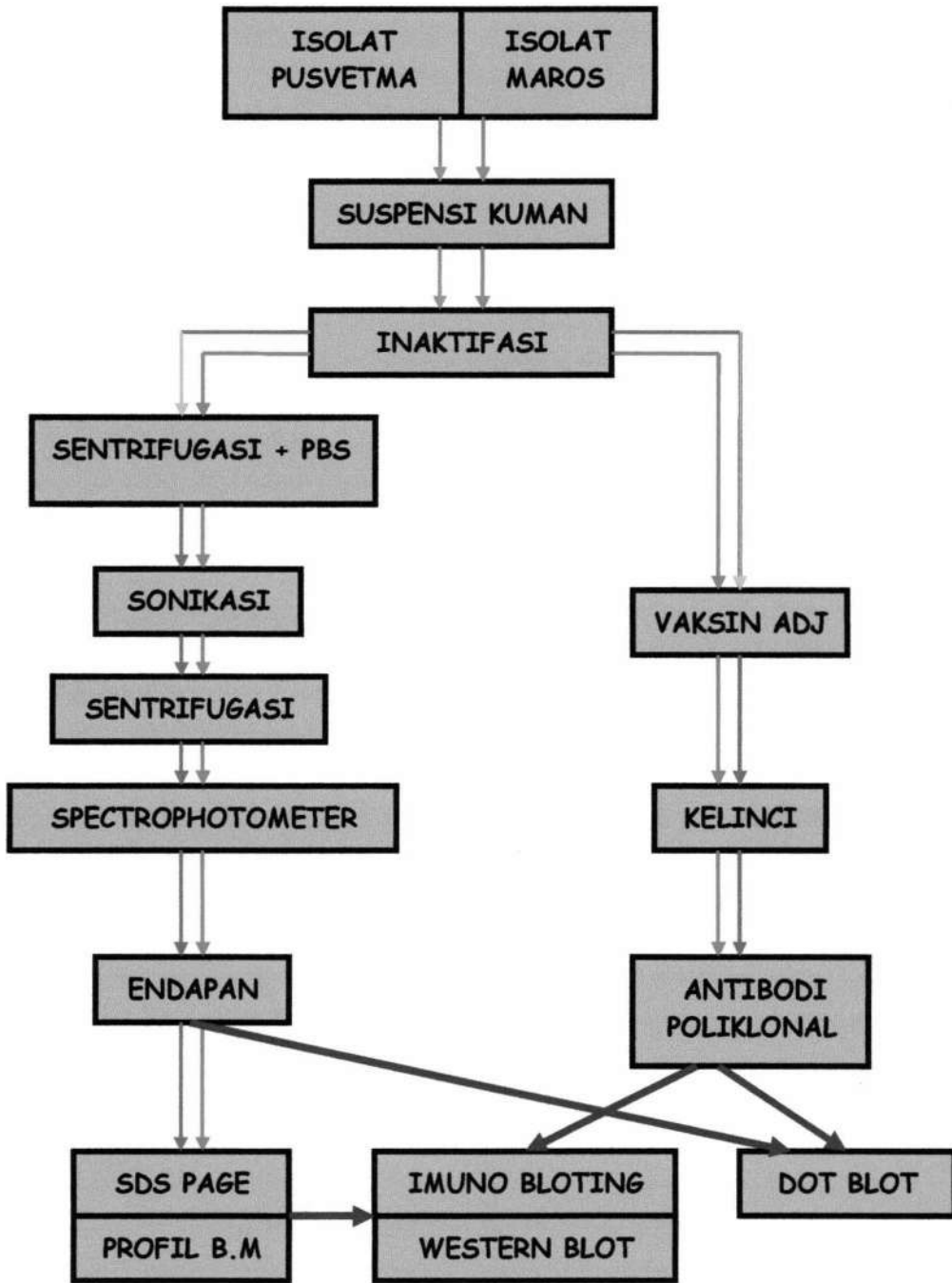
Gel hasil elektroforesis diambil dan dimasukkan dalam aquadest dan direndam dalam buffer blotting. Membran NC (nitroselulose) dipotong selanjutnya dibasahi dengan PBS selama 10 menit pada suhu kamar. Membran dan kertas Whatman 8-10 lembar direndam dalam transfer bufer. Kertas Whatman kemudian disusun pada blotter satu-persatu sehingga tersusun 4-5 lapisan, kemudian di letakkan membran nitroselulose. Gel hasil elektroforesis di letakkan di atas membran nitroselulose dan diusahakan tidak ada gelembung udara, kemudian ditutup dengan 4 lembar kertas Whatman dengan cara menyusun satu persatu sehingga tersusun lapisan. Setelah selesai kemudian ditutup dengan penutup blotter dan siap untuk di *running*, dengan 100Volt, 40mA selama 1-2 jam. Setelah selesai transfer blotter dibuka, kertas Whatman diambil satu persatu dan di Cek hasil transfer (dengan melihat marker/penanda warna), apabila protein sudah ditransfer, membran ditandai letak marker dan posisi sampel. Membran dimasukkan ke dalam larutan PBS di Bloking dengan skim milk 1% selama 1 jam pada suhu kamar sambil digoyang. Setelah itu dicuci dengan PBS Tween 0,05% selama 10 menit dengan digoyang dan diulangi sampai 3 kali, kemudian membran nitroselulose diambil dan ditambahkan antibodi primer yang telah diencerkan dalam PBS-T Skim Milk 5% dan diinkubasi selama semalam pada suhu 4<sup>0</sup>C. Sebagai blanko antibodi primer tidak ditambahkan, kemudian membran dicuci dengan TBS Tween 0,05% selama 10 menit dengan digoyang dan diulang sampai 3 kali, kemudian

membran nitroselulose diambil dan ditambahkan antibodi sekunder (*conjugate*) dengan perbandingan yang telah ditentukan, diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar dengan shaker. Membran dicuci lagi seperti diatas dan diinkubasi dengan Western Blue substrat solution pada ruang gelap selama semalam atau sampai terlihat warna *band* kemudian dicuci dengan akuades (stop reaksi).

### 3.7.6 *Dot Blot* dari antigen.

Protein antigen masing-masing 10 µl dari 2 macam isolat kuman *Pasteurella multocida* yang diuji dilarutkan ditambah 40 µl PBS mengandung NaN<sub>3</sub> (1 ml Na-Azida 1%+9 ml PBS), antigen dibuat pengenceran 1/20 dan 1/40 duplo, kemudian diteteskan pada membran nitroselulosa yang telah dibasahi dengan PBS. Membran dipasangkan pada alat *dot blotter* kemudian dibloking dengan bloking bufer selama 1 jam dan selanjutnya dicuci dengan PBS Tween 20 0,05% (3 menit dan diulang 3 kali). Hasil kemudian diinkubasi dengan serum (antibodi primer, 1/200) dalam PBS-Skim Milk 1% selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan PBS-Tween 20 0,05% (3 menit dan diulang 3 kali). Hasil yang didapatkan diinkubasi kembali dengan antibodi sekunder dengan pengenceran 2/2500 (konjugat alkali fosfatase) selama satu jam dan dicuci kembali dengan PBS-Tween 20 0,05% selama 3 menit dan diulang 3 kali. Kemudian dilakukan inkubasi dalam substrat *Western Blue* (dalam ruang gelap) selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan

akuades, kemudian membran diamati ada tidaknya noda berwarna biru gelap.



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.**

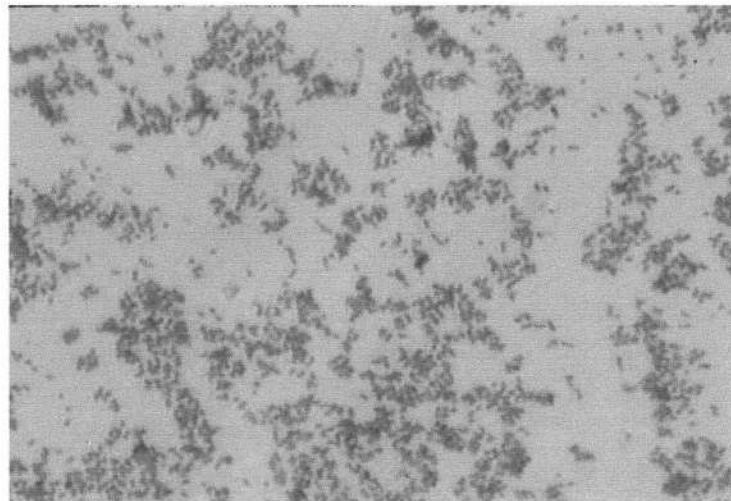
Berdasarkan pejelasan data penelitian, maka hasil penelitian diuraikan sebagai berikut :

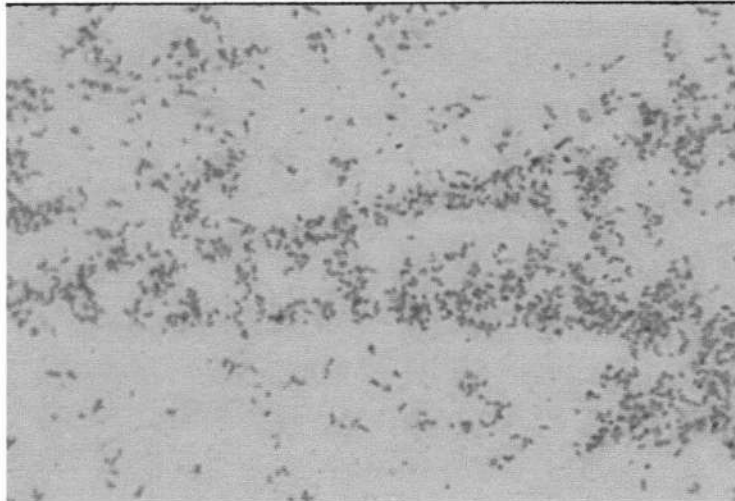
### **4.2.1 Uji kemurnian kultur**

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

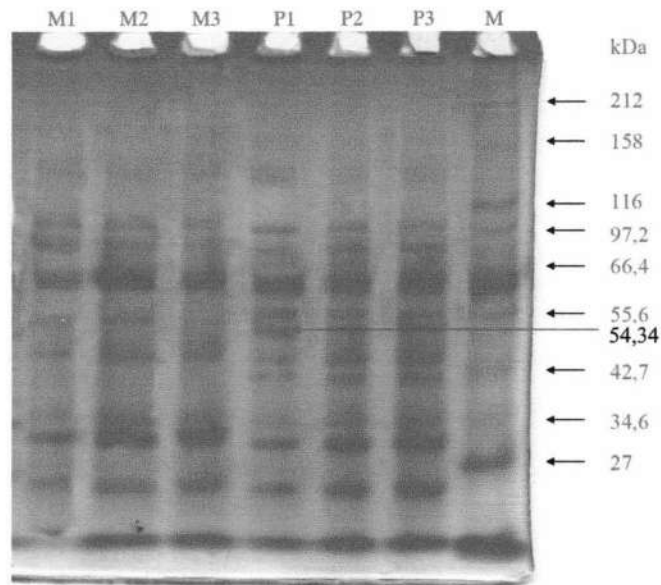
ulangan dengan dosis yang sama. Pada akhir interval ke 3 diambil darah dari kelinci tadi untuk uji imunobloting.

#### **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 %.

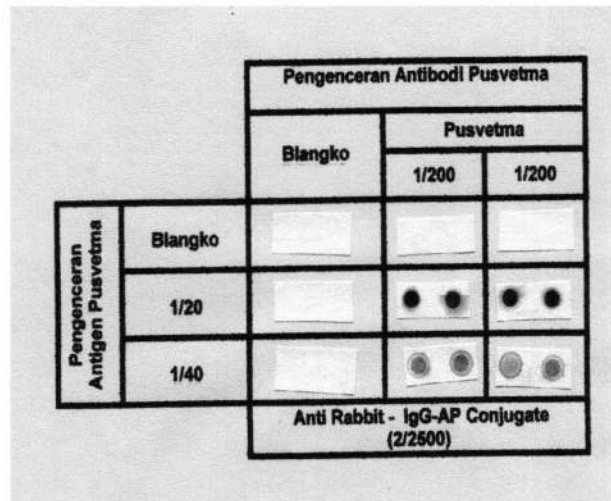
Keterangan: M = Marker ;  
 M 1, 2,3 = isolat Maros  
 P 1, 2,3 = isolat Pusvetma.

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.

		Pengenceran Antibodi Maros		
		Blangko	Maros	
			1/200	1/200
Pengenceran Antigen Maros	Blangko			
	1/20			
	1/40			

Anti Rabbit - IgG-AP Conjugate  
(2/2500)

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

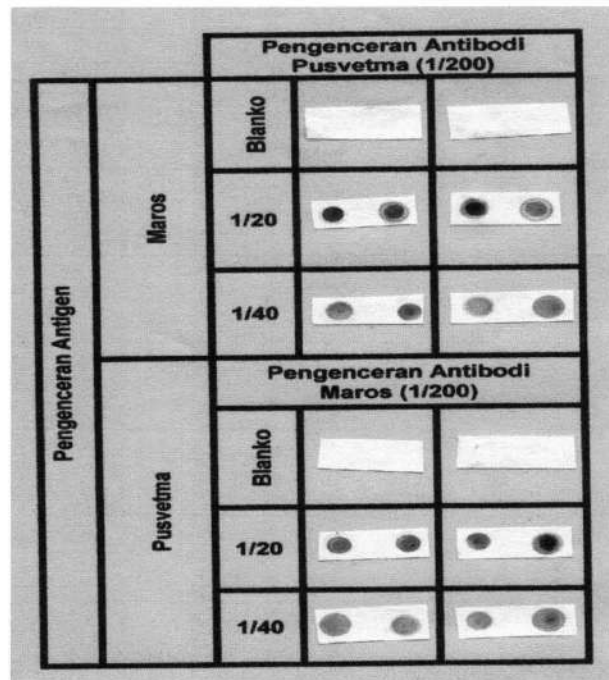
Keterangan : 1/20 ; 1/40: pengenceran antigen dan 1/200 pengenceran antibodi

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

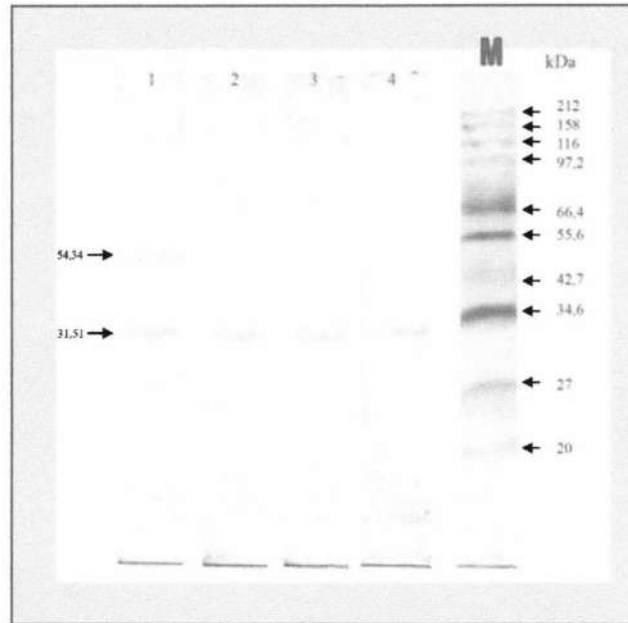


Gambar 4.6 Afinitas silang antara kedua isolat protein *Pasteurella multocida* dengan antibodi hasil induksinya pada kelinci  
 Keterangan : 1/20 ; 1/40: pengenceran antigen dan 1/200 pengenceran antibodi  
 Positif : berwarna biru  
 Blangko : rekasi tanpa antibodi primer.

#### 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

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

## 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, enzimatis 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 *denritic* 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.

## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan atas data hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan :

- 1 Profil protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma yang didapat ada 13 pita dengan 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 didapat 12 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.
- 2 Adanya kemampuan antigenisitas pada BM 31,51 dan 54,34 kDa dari protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan BM 31,51 kDa dari isolat Maros untuk dikenali oleh antibodi spesifiknya
- 3 Adanya kemampuan afinitas silang protein dengan BM 31,51 kDa dari kedua *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros yang dikenali antar antibodi keduanya.

## 6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan kesimpulan atas penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disarankan hal-hal sebagai berikut :

- 1 Protein antigen dengan BM 31,51 kDa dapat diteliti dan dikembangkan sebagai bahan diagnostik laboratoris untuk deteksi kasus lapangan.
- 2 Adanya protein BM 54,34 kDa pada isolat Pusvetma yang tidak terdapat pada isolat Maros dapat lebih lanjut diteliti dengan DNA sequencing untuk mengetahui fungsi protein tadi.
- 3 Protein antigen dengan BM 54,34 pada isolat Pusvetma dan 31,51 kDa yang terdapat di kedua isolat dapat diteliti lebih lanjut dengan dilakukan elusi untuk mengetahui imunogenisitasnya pada hewan coba sebagai bahan pertimbangan untuk pembuatan vaksin sub unit.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Al-haj AH, Sawada T, Noda K, 2004. Protectivity of an Immunoaffinity-Purified 39 kDa Capsular Protein of Avian *Pasteurella multocida* in Mice. *J.Vet.Med.Sci* 66(12) 1603-1604.
- Aulanni'am, 2005. Protein dan Analisisnya. Penerbit Citra Mentari Group, hlm 65-93.
- Bain RVS, De Alwis MCL, Carter GR, Gupta BK, 1982. Haemorrhagic Septicaemia. *FAO Animal Production and Health Paper* 33 : 26.
- Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional VI Denpasar, 2006. Isolasi *Pasteurella multocida* berkaitan dengan evaluasi program pemberantasan penyakit SE di pulau Sumbawa pada tahun 2002. *Buletin Veteriner, XVIII (68) : 2-3*
- Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional VI Denpasar, 2006. Peta Distribusi Penyakit Hewan, hlm 9
- Bellanti, J.A. 1985. *Imunology III*. Diterjemahkan oleh A.Samik Wahab 1993. *Imunologi III*. Cetakan pertama. Gajah Mada University Press. Yogyakarta, hlm 86 – 95
- Borkowska B, Agnieszka, 2003. Evaluation of Immunogenicity of Outer Membran Proteins of *Pasteurella multocida* serotipe B:2,5 in Cattle. *Bull.Vet.Inst.Pulaway* 47:377-385.
- Confer AW, Dabo SM, Murphy GL, 1998. Immunity in Cattle to the *Pasteurella multocida* 35 kDa OMP. [www. Osu-ovrs.okstate.edu/report 98/VetMed/anatpathphar.html](http://www.Osu-ovrs.okstate.edu/report%2098/VetMed/anatpathphar.html).
- De Alwis MCL, 1992. Haemorrhagic Septicaemia. A General Review. *Br. Vet. J*, 148(2) : 99-112
- Direktorat Kesehatan Hewan, 2001. Manual penyakit hewan mamalia. Departemen Pertanian.
- Hamhuan A, Pathanasophan P, Crommelin Daan JA, Jiskoot W, Kersten Gideon FA, Prakongpan S, 2004. Characterization and Protection in Mice of Outer Membran Proteins from *Pasteurella multocida* A:1 Incorporated in Lipid Vaccine Delivery Systems. *Science Asia* 30: 231-237

- Harlow E and David L, 1988. Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory. United State Of America.
- Info on Animal Health in Indonesia, 2001. INI-ANSREDEF. <http://iniansredef.org>.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, 2002. Review of Medical Microbiology. Lange Medical Publication Drawer L California, pp 21-23
- Johnson RB, Dawkins HJS, Spencer TL, Bascon JLT, Almazan MJPP, Agor EC, Rivera WC, 1992. Characterisation of *Pasteurella multocida* ( Haemorrhagic Septicaemia) Isolats from the Philippines. ACIAR proceedings, pp 203 – 208
- Kompas, 2006. Ngorok Tewaskan 500 Sapi di Timor Tengah Utara. Kompas 15 Februari 2006.
- Kuby J, 1992. Immunology. W.H Freeman and company. New York.
- Lu YS, Afendis SJ, and Pakes SP, 1988. Identification of immunogenic outer membran proteins of *Pasteurella multocida* 3 : A in rabbits. Infect Immun 56 (6): 1532-1537.
- Marandi MV, Mittal KR, 1996. The 32 kDa major outer membran protein of *Pasteurella multocida* capsular serotype D. microbiology 142 : 199-206.
- Mentan SK No. 889/Kpts/TN.560/9/97 tentang Pernyataan pulau Lombok Propinsi Daerah Tingkat I Nusa Tenggara Barat bebas dari penyakit hewan menulaer ngorok (Septicemia Epizootica) pada ternak sapi dan kerbau.
- Merchant I A and R A Packer, 1984. Veterinary Bacteriology and Virology. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A
- Merops, 2007. *Pasteurella multocida*. <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/speccards?sp=sp001853&type=P>
- Morrison WI, 1997. The induction of immunity by veterinary immunoprophylactics. Vaccine Manual. FAO Rome, pp 5 – 15
- OIE, 2005. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Haemorrhagic Septicaemia. OIE Worrlid Organisation for Animal Health. <http://www.oie.int/eng/norms/manual/A-00063>. 2- 14

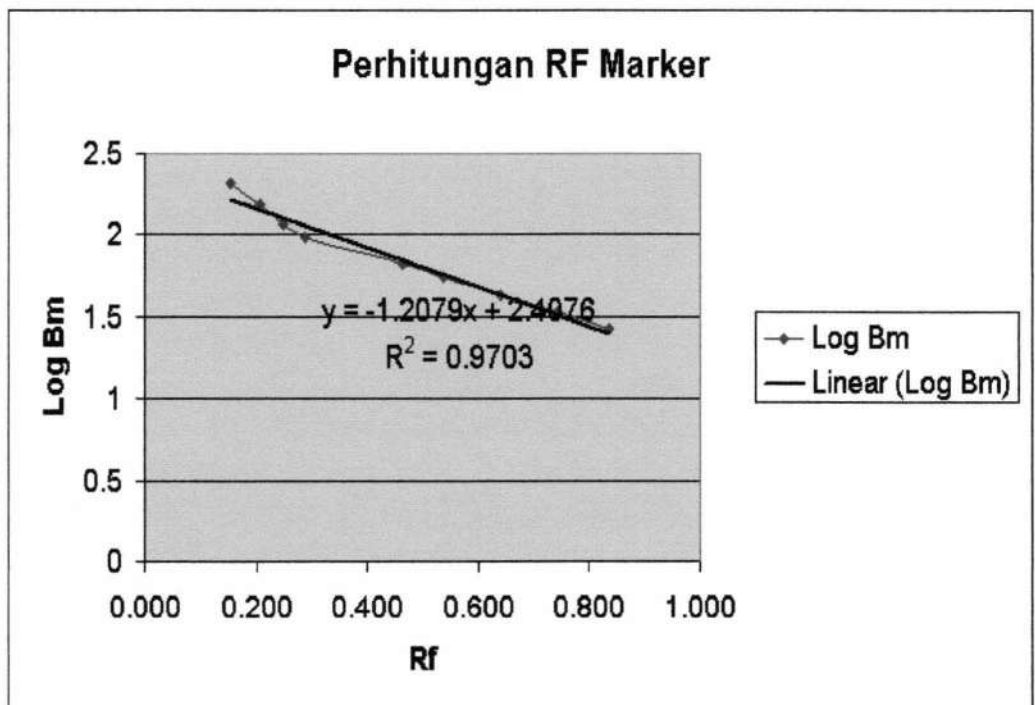
- Rantam FA , 2003. Metode imunologi. Airlangga University Press, hlm 145-163
- RATS Online Help, 2003. Polyclonal Antibodi Production. 1-6 .  
<http://www.oprs.ucla.edu/animal/help/mamal>.
- Suara Pembaruan Daily, 2006. Kerbau dan Sapi di Bengkulu Terkena Penyakit Ngorok. Suara Pembaruan Daily 17 Februari 2006.
- Tabatabai BL, Emilie SZ , 2003. Identification of Five Outer Membran-Associated Proteins among Cross-Protective Factor Proteins of *Pasteurella multocida*. Infection and Immunity 72 (2) : 1195-1198
- The University of Iowa, 2002. Recommendations for Use and Alternatives to Freund's Complete Adjuvant. The University of Iowa.  
[http://research.uiowa.edu/animal/? Get=adjuvant](http://research.uiowa.edu/animal/?Get=adjuvant). 1-2
- The University of Iowa, 2002. Recommendations for Use and Alternatives to Freund's Complete Adjuvant. The University of Iowa.  
[http://research.uiowa.edu/animal/? Get=adjuvant](http://research.uiowa.edu/animal/?Get=adjuvant). 1-2
- Toha A.H, 2001. Biokoimia : Metabolisme Biomolekul. Penerbit Alfabeta, hlm 53-65.
- University of California, 2004. Policy and Guidelines on Adjuvants and Polyclonal Antibodi Production. University of California San Diego Institutional Animal Care and Use Committee. [http ://iacuc.ucsd.edu/policies/policy](http://iacuc.ucsd.edu/policies/policy). 1-2
- Verma R, Jaiswal TN, 1998. Haemorrhagic septicaemia vaccines. Vaccine 16 (11) : 1187
- Woolcock JB, 1992. The Biology of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* .ACIAR proceedings, pp 25 – 26

Lampiran 1 : Perhitungan Berat Molekul ( BM ) protein *Pasteurella multocida* pada gel SDS-PAGE 12%

Rf Marker

a	b	Rf	BM	Log Bm
1.5	9.7	0.155	212	2.32
2	9.7	0.206	158	2.19
2.4	9.7	0.247	116	2.06
2.8	9.7	0.289	97.2	1.98
4.5	9.7	0.464	66.4	1.82
5.2	9.7	0.536	55.6	1.74
6.2	9.7	0.639	42.7	1.63
7.2	9.7	0.742	34.6	1.53
8.1	9.7	0.835	27	1.43

	Rf	Log Bm
1	0.155	2.32
2	0.206	2.19
3	0.247	2.06
4	0.289	1.98
5	0.464	1.82
6	0.536	1.74
7	0.639	1.63
8	0.742	1.53
9	0.835	1.43



**Rf Maros**

pita	a	b	Rf	Log BM	BM
1	1.5	9.7	0.155	2.221	166.26
2	2.4	9.7	0.247	2.109	128.45
3	3.3	9.7	0.340	1.997	99.23
4	3.8	9.7	0.392	1.934	85.98
5	4.5	9.7	0.464	1.847	70.34
6	5	9.7	0.515	1.785	60.95
7		9.7			
8	6	9.7	0.619	1.660	45.75
9	6.3	9.7	0.649	1.623	41.98
10	6.6	9.7	0.680	1.586	38.52
11	7.3	9.7	0.753	1.499	31.51
12	7.7	9.7	0.794	1.449	28.1
13	8.7	9.7	0.897	1.324	21.09

\*)

\*) pita ke 7  
pada isolat  
Maros tidak  
tampak.

**Rf Pusvetma**

pita	a	b	Rf	Log BM	BM
1	1.5	9.7	0.155	2.221	166.26
2	2.4	9.7	0.247	2.109	128.45
3	3.3	9.7	0.340	1.997	99.23
4	3.8	9.7	0.392	1.934	85.98
5	4.5	9.7	0.464	1.847	70.34
6	5	9.7	0.515	1.785	60.95
7	5.4	9.7	0.557	1.735	54.34
8	6	9.7	0.619	1.660	45.75
9	6.3	9.7	0.649	1.623	41.98
10	6.6	9.7	0.680	1.586	38.52
11	7.3	9.7	0.753	1.499	31.51
12	7.7	9.7	0.794	1.449	28.1
13	8.7	9.7	0.897	1.324	21.09



Lampiran 2 : Pengukuran kadar protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dan isolat Maros

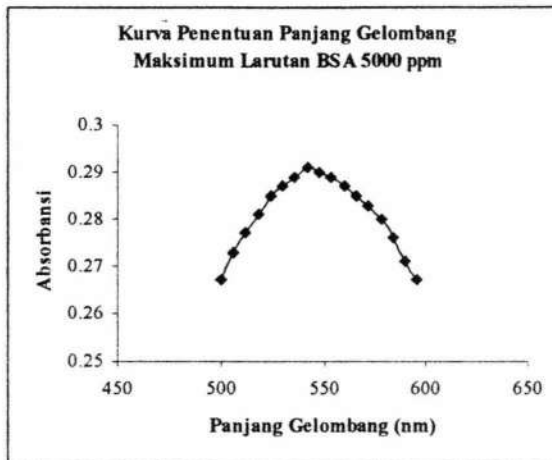
- Pembuatan Kurva Standar BSA
- Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan BSA 5000 ppm

Absorbansi Larutan Standar BSA 5000 ppm

Panjang Gelombang	Absorbansi
500	0,267
506	0,273
512	0,277
518	0,281
524	0,285
530	0,287
536	0,289
<b>542 *</b>	<b>0,291</b>
<b>548</b>	<b>0,29</b>
554	0,289
560	0,287
566	0,285
572	0,283
578	0,280
584	0,276
590	0,271
596	0,267

\* Panjang Gelombang Maksimum

## Kurva Panjang Gelombang Maksimum Larutan BSA 5000 ppm

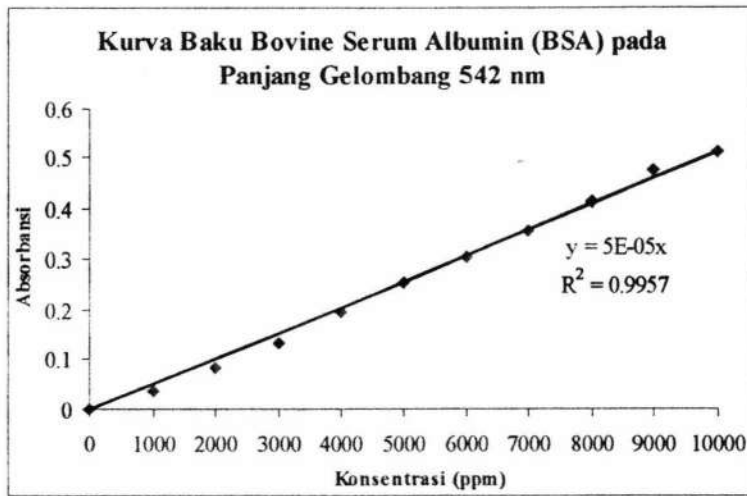


## ➤ Pembuatan Kurva Standar BSA

## Absorbansi Larutan Standar BSA

Konsentrasi (X)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs rata-rata (Y)
0	0	0	0	0
1000	0,034	0,038	0,036	0,036
2000	0,081	0,082	0,083	0,082
3000	0,133	0,136	0,136	0,135
4000	0,194	0,196	0,195	0,195
5000	0,259	0,249	0,254	0,254
6000	0,308	0,301	0,306	0,305
7000	0,358	0,358	0,358	0,358
8000	0,409	0,418	0,415	0,414
9000	0,473	0,478	0,477	0,476
10000	0,514	0,512	0,513	0,513

## Kurva Standar BSA pada Panjang Gelombang 542 nm



➤ **Perhitungan Kandungan Protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma.**

Kandungan protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma dihitung dengan cara mengkonversikan data absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linier kurva standar BSA ( $Y = 5 \times 10^{-5} X$ ).

Sehingga kandungan protein yang ada sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{Absorbansi} &= 0,133 \\ Y &= 5 \times 10^{-5} X \\ X &= \frac{Y}{5 \times 10^{-5}} = \frac{0.133}{5 \times 10^{-5}} = 2660 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Jadi kandungan protein *Pasteurella multocida* isolat Pusvetma sebesar 2660 ppm

➤ **Perhitungan Kandungan Protein *Pasteurella multocida* isolat Maros.**

Kandungan protein *Pasteurella multocida* isolat Maros dihitung dengan cara mengkonversikan data absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linier kurva standar BSA ( $Y = 5 \times 10^{-5} X$ ).

Sehingga kandungan protein yang ada sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{Absorbansi} &= 0,114 \\ Y &= 5 \times 10^{-5} X \\ X &= \frac{Y}{5 \times 10^{-5}} = \frac{0,114}{5 \times 10^{-5}} = 2280 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Jadi kandungan protein *Pasteurella multocida* isolat Maros sebesar 2280 ppm