

LAPORAN
PENELITIAN HIBAH BERSAING
TAHUN ANGGARAN 2008



IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI OUTER MEMBRANE
PROTEIN IMMUNOGEN *Brucella abortus* S-19 SEBAGAI
ANTIGEN PEMBUAT KITT DIAGNOSTIK SPESIFIK

Oleh

R.Budi Utomo , Msi .,Drh

Rr.Ratih Ratnasari , SU .,Drh

DIBIAYAI OLEH DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
DEPARTEMEN PENDIDIKAN TINGGI

Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksana Penelitian Pengabdian Kepada
Masyarakat Nomor 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008

Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Universitas Airlangga

TAHUN 2008

LAPORAN
PENELITIAN HIBAH BERSAING
TAHUN ANGGARAN 2008

kkc
kk
LP. 231/10
uto
i



IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI OUTER MEMBRANE
PROTEIN IMMUNOGEN *Brucella abortus* S-19 SEBAGAI
ANTIGEN PEMBUAT KITT DIAGNOSTIK SPESIFIK

Oleh

R.Budi Utomo , Msi .,Drh

Rr.Ratih Ratnasari , SU .,Drh

DIBIYAI OLEH DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
DEPARTEMEN PENDIDIKAN TINGGI

Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksana Penelitian Pengabdian Kepada
Masyarakat Nomor 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008

Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Universitas Airlangga

TAHUN 2008

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Identifikasi dan Karakterisasi "*Outer Membrane Protein Immunogen*"

Brucella abortus S-19 Sebagai Antigen Pembuatan Kitt Diagnostik Spesifik

Ketua Peneliti :

- a. Nama lengkap dan gelar: R. Budi Utomo,MSi, Drh
- b. Jenis kelamin : Laki-laki
- c. Pangkat/Gol/Nip : Lektor/ Gol.III-D/ 130 701 129
- d. Jabatan Fungsional : Lektor
- e. Bidang keahlian : Imunologi
- f. Fakultas/Puslit/Jurusan : Kedokteran Hewan
- g. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti	Nama dan gelar akademik	Bidang keahlian	Fakultas	Prguruan Tinggi
1	Rr.Ratih Ratnasari, SU, Drh	Bakteriologi	FKH	Unair

Pendanaan dan jangka waktu penelitian :

Jangka waktu yang diusulkan : 2 tahun

Biaya yang diusulkan : Rp.50.000.000,-/tahun

Biaya yang disetujui : Rp. 35.000.000,- / tahun (Tiga puluh lima juta rupiah/tahun)

Surabaya , 19 Desember 2008

Mengetahui :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D.,drh

Nip. 130 687 305

Peneliti Utama

R. Budi Utomo, M.Si.,drh

Nip. 130 701 129

Mengetahui;

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Prof. Dr. Bambang Sektiari, L.,DEA., Drh

Nip. 131 837 004



RINGKASAN

Brucellosis adalah penyakit zoonosis yang disebabkan oleh kuman *Brucella spp* menyebabkan gangguan kesehatan .

Kuman *Brucella* merupakan bakteri intraseluler yang berkembang pada retikulo endothelial system (RES) dan kadang-kadang pada target organ lainnya seperti persendian dan plasenta yang dapat menyebabkan abortus pada sapi. *Brucella abortus*, merupakan penyebab penyakit keguguran yang menular pada sapi.

Sebagian Negara di dunia, vaksinasi pada hewan sapi dikerjakan dengan pemberian pada anak sapi dengan vaksin *Brucella abortus S-19*. Tetapi pada kenyataannya, virulensi dan kejadiannya tidak stabil, untuk itu diperlukan penelitian mengenai vaksinasi lebih lanjut, terutama vaksin *Brucella spp* karena seringnya terjadi *cross reaction* diantara spesies *Brucella*.

Serodiagnosis dilakukan secara konvensional test, yang prinsipnya adalah menghitung antibody *Smooth Lipopolysaccharida (S-LPS)*, tetapi tidak dapat membedakan secara jelas antara tingginya antibody yang disebabkan karena hasil vaksinasi atau infeksi. Jadi sangat diperlukan untuk dapatnya mengidentifikasi penyakit *brucellosis* dengan menggunakan antigen untuk mengdiagnosa *brucellosis*.

Penelitian yang dilakukan adalah menggunakan teknik *SDS-PAGE* dan *Immunoblotting analysis* dengan menggunakan protein membrane luar (OMP) kuman *Brucella abortus S-19* Teknik ini adalah menghitung berat molekul protein membrane luar (OMP) yang diduga mempunyai sifat imunogenik sebagai antigen diagnosis.

Berat molekul protein membrane luar (OMP) dengan menggunakan teknik *SDS-PAGE* adalah 6,5 ; 20,1 ; 29,0 ; 66,0 ; 116,0 ; 205,0 kDa, untuk tahap selanjutnya dengan menggunakan Uji *Western Blotting* didapat hasil berat protein yang immunogenic adalah 13,4 ; 14,6 ; 37,2 ; 61,8 ; dan 164,1 kDa, yang terjadi ikatan antara protein OMP dengan antibody spesifik protein OMP *B.abortus S-19*.

Pada tahap selanjutnya dilakukan uji indirect ELISA pada protein OMP hasil Western Blotting, OD tertinggi (OD 0,975 pada protein OMP dengan berat molekul 37,2 kDa) digunakan pada ujiantang pada kelinci. Kemudian di uji kembali dengan teknik indirect ELISA, hasilnya adalah 0,968.

Kesimpulannya adalah protein OMP dengan berat molekul 37,2 kDa merupakan protein OMP yang immunogenic dan dapat dibuat untuk Kitt diagnostic.

SUMMARY

Brucellosis caused by *Brucella spp* is a major zoonotic disease. *Brucella* are facultative intracellular bacteria which develop mainly in the Reticulo Endothelial System (RES) and occasionally in other target organs, such as joints and placenta, and can cause abortion in cattle. The major species involved in bovine brucellosis is *Brucella abortus*.

In many parts of the world, vaccination of cattle is done by inoculation calves with *Brucella abortus* S-19 . In fact, the virulent and apparently unstable, creating the need for improved vaccines for addition, *Brucella spp* may or may not provide cross protection against *Brucella spp*, hampering the acceleration of vaccine development.

Serodiagnosis by conventional tests, which principally measure antibody to Smooth Lipopolysaccharide (S-LPS), does not permit a clear cut distinction between vaccinated and infected cattle. Thus, work actually performed in the field of bovine brucellosis identifies protective antigens and antigens useful for diagnosis.

The purpose of the present study will to investigate by SDS-PAGE and Immunoblot analysis (*Western-Blotting*) using the anti-OMP polyclonal antibody the potential usefulness of these *Outer Membrane Proteins* as diagnostic antigens.

The result of the molecular weight of *Outer Membrane Proteins* (OMP) by using SDS-PAGE is 6,5 ; 20,1 ; 29,0 ; 66,0 ; 116,0 ; 205,0 kDa. In the next stage of the research characterization protein OMP is 13,4 ; 14,6 ; 37,2 ; 61,8 and 164,1 kDa ,by using the anti-OMP polyclonal antibody the potential usefulness of these OMPs as diagnostic antigens .

In last step from protein OMP by using indirect ELISA , the OD are 0,325; 0,586; 0,975; 0,643; 0,598 and the highest OD is 0,975 (protein OMP with molecule weight 37,2 kDa). "Uji tumpang" with protein OMP 37,2 kDa to Rabbit immunization, after three weeks, take blood serum and by using indirect ELISA measured. The result is 0,968, so that the conclusion is the protein OMPs with molecule weight 37,2 kDa have potential as diagnostic.

PRAKATA

Brucellosis adalah penyakit pada ternak yang bersifat zoonosis disebabkan oleh bakteri dari genus *brucella*. Pada sapi, domba dan kambing penyakit ini menyerang organ saluran reproduksi terutama plasenta sehingga menyebabkan keguguran, sehingga dikenal juga dengan sebutan penyakit “*Keluron Menular*”, *Contagious Abortion* atau *Epizootic Abortion*.

Penyakit ini dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat besar, di Indonesia kecendrungan meningkatnya populasi dan lebih sering terjadinya perpindahan sapi merupakan penyebab utama meningkatnya kasus *brucellosis*, maka di Indonesia penyakit tersebut pada sapi dimasukkan dalam daftar penyakit menular yang harus dicegah dan diberantas sejak tahun 1959.

Diagnosis yang tepat penyakit *brucellosis* sangat diperlukan untuk membantu upaya pencegahan dan penanggulangannya. Diagnosis terhadap penyakit *brucellosis* di lapangan selama ini hanya berdasarkan dari sejarah penyakit, tanda klinis dan perubahan pasca mati, sedangkan diagnosis di laboratorium dilakukan isolasi –identifikasi kuman penyebab dan uji serologis

Oleh karena itu sebagai tujuan penelitian ini adalah untuk menemukan protein antigenik dari protein membrane luar (OMP) yang nantinya dapat digunakan sebagai bahan diagnostik dan produksi vaksin sub unit.



DAFTAR ISI

	Halaman
Lembar Pengesahan	
Ringkasan	i
Summary	li
Prakata	iii
Daftar Isi	iv
Daftar Gambar	vii
Daftar Lampiran	viii
BAB I Pendahuluan	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Subyek Penelitian	3
1.3. Aspek Penelitian	4
1.4. Lokasi Penelitian	4
1.5. Hasil yang Ditargetkan	5
1.6. Keterangan yang Dianggap Perlu	5
BAB II Tujuan dan Manfaat Penelitian	6
2.1. Tujuan Khusus Jangka Pendek	6
2.2. Tujuan Khusus Jangka Panjang	6
2.3. Manfaat Penelitian	6
BAB III Studi Pustaka	7
3.1. Tinjauan Tentang Brucella abortus S-19	7

3.1.1. Klasifikasi	7
3.1.2. Brucellosis	7
3.1.3. Struktur Dinding Kuman	11
3.1.4. Diagnosis Penyakit	12
3.1.5. Pencegahan dan Penanggulangan	12
3.1.6. Penularan dan Patogenesa	13
3.1.7. Patologi Anatomi	14
3.1.8. Isolasi dan Identifikasi kuman Brucella abortus S-19	15
3.1.9. Protein Membran Luar (OMP) Brucella abortus S-19	15
3.2.10. Antibodi Poliklonal	15
3.2.11. Imunisasi	15
3.2.12. Antibodi dan Antigen	16
3.2.13. Adjuvant	17
3.2.14. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent ASSAY).....	17
BAB IV. Metode Penelitian	
4.1. Uji antigenitas dengan indirect ELISA.....	19
4.2. Pemotongan berat molekul OMP dengan teknik Elusi	19
4.3. Antibodi poliklonal protein spesifik dengan ujiantang	19
4.4. Uji antigenitas dengan teknik indirect ELISA	20
BAB V. Hasil dan Pembahasan	21
5.1. Isolasi protein OMP spesifik band dengan teknik Elusi.....	24
5.2. Imunisasi protein OMP hasil ELUSI pada kelinci.....	25
5.3. Uji antigenitas dengan tknik indirect ELISA	26
5.4 Ujiantang pada hewan kelinci.....	27

BAB VI. Kesimpulan dan Saran	29
Daftar Pustaka	30

Daftar Gambar

Halaman

Gambar 5.1. Profil protein OMP *Brucella abortus* S-19 dengan teknik SDS-Page ,,,,,. 21

Gambar 5.2. Imunitas protein OMP secara subcutan..... 25

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Brucellosis adalah penyakit infeksius yang disebabkan oleh bakteri dari genus *brucella*. Kuman *brucella* berbentuk batang kecil atau coccid, tidak berspora, tidak berflagela, dan bersifat Gram negative.

Gejala klinis yang paling utama dari Brucellosis adalah adanya abortus dengan presentasi tinggi yang terjadi pada suatu populasi sapi bunting. Abortus terjadi setelah bulan kelima dari masa kebuntingan dan kebuntingan berikutnya kuman biasanya karier, tidak terjadi abortus dan kuman dikeluarkan pada saat partus. Abortus merupakan akibat dari plasentitis yang melibatkan kotiledon dan jaringan kotiledonaris. Kuman *brucella* dalam jumlah banyak terdapat pada cairan fetus yang dikeluarkan selama kira-kira 2 sampai 4 minggu kemudian diikuti dengan abortus, sedangkan pada kebuntingan berikutnya, anak sapi dapat dilahirkan dan tampak normal, kuman terdapat pada cairan fetus pada saat partus. Infeksi pada anak sapi terjadi dalam waktu yang terbatas dibandingkan dengan infeksi pada sapi betina dewasa dimana infeksi pada glandula mammae dan limfoglandula sapisetina dewasa berlangsung terus dalam beberapa tahun pada setiap periode kebuntingan. Kuman *brucella* dapat dikeluarkan secara terus menerus pada air susu dalam beberapa tahun. Pada sapi jantan target organ kuman *brucella* adalah vesikula seminalis, ampula, testis dan epididemis. Sekelompok populasi ternak yang terinfeksi *brucella*, brucellosis dapat menyebabkan penurunan fertilitas, mengurangi produksi susu dan abortus. Pada sapi jantan orchitis nekrotik kadang-kadang terjadi lesi fibrotic yang terlokalisasi (Quinn *et al.*, 2002).

Brucellosis sudah lama di kenal di Indonesia terutama sejak ditemukannya kasus di Jawa dimana *Brucella abortus* menyerang pada sapi perah. Prevalensinya tinggi di Timor Timur, Nusa Tenggara Timur dan Sulawesi Selatan, dan penyakit tersebut menyerang hewan yang ada di sekitarnya dan dapat menyebar dengan cepat ke banyak tempat di Indonesia (Handijatno., 1995).

Diagnosa penyakit brucellosis yang tepat sangat diperlukan untuk membantu upaya pencegahan dan penanggulangannya. Diagnosa terhadap penyakit brucellosis di lapangan selama ini dapat berdasarkan sejarah penyakit, gejala klinis dan perubahan pasca mati, sedangkan diagnosis di laboratorium dilakukan isolasi-identifikasi terhadap kuman penyebabnya dan uji serologis. Isolasi –identifikasi dapat dilakukan pembiakan pada media *Trypticase Soy Agar* dari bahan berupa air susu, air tembuni, dan bahan lain yang dicurigai. Uji serologis misalnya dilakukan uji *screening* seperti *Milk Ring Test* (biasanya ditujukan uji terhadap susu untuk kelompok sapi perah). *Rose Bengal Test* (untuk individual) dan dilanjutkan uji Fiksasi Komplemen (*Complemen Fixation Test =CFT*) atau uji yang lebih sensitifitasnya tinggi yaitu uji ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) dan lain-lain (Handijatno., 2003)

Struktur bakteri *B.abortus* tidak seperti bakteri Gram negative lainnya. Pada permukaan luar bakteri *B.abortus* tidak memiliki pili dan tidak berkapsul , permukaan luarnya terdiri dari dua komponen yang telah di identifikasi sebagai factor virulensi yang potensial yaitu lipopolisakarida (LPS) dan protein membrane luar (OMP) (Quinn *et al.*, 2002). Lipopolisakarida dalam mengukur antigen potensial yang dapat secara langsung menginduksi respon imun spesifik humoral yaitu sel B sehingga lebih cepat memacu terbentuknya antibodi, sedangkan protein membrane luar dari *B.abortus* masih belum banyak diteliti mengenai sifat antigenic maupun imunogeniknya (Alonso-Urmeneta *et al.*, 1998; Forestier *et al.*, 1999).

Pada umumnya protein yang tidak dimurnikan mengandung banyak protein yang berbeda dan tidak spesifik. Untuk itu *single protein* spesifik diperlukan *chemical assay*. Teknik sonikasi merupakan salah satu metode yang digunakan untuk memecah dan mendapatkan

protein murni yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan diagnostik. Spesifisitas bahan uji dilakukan karena protein pada infeksi bakteri banyak dan tidak spesifik sehingga perlu dilakukan teknik sonikasi (Quinn *et al.*, 2002 ; Rantam., 2003).

Kemajuan yang pesat di bidang biologi molekuler juga mendukung deteksi adanya antibodi. Di dalam penelitian ini dilakukan identifikasi dan karakterisasi protein membrane luar melalui sonikasi , kemudian untuk mengetahui berat molekul protein membrane luar dilakukan melalui metode *SDS-PAGE* dan metode *Western Blot* (Quinn *et al* ; Rantam., 2003).

Tahapan ke dua adalah untuk mengetahui apakah protein membrane luar dengan berat molekul tertentu tersebut yang diduga mempunyai sifat antigenic dan imunogenik dilakukan teknik *elusi*, dengan metode *indirect ELISA* akan terdeteksi apakah terdapat respon antibody pada kelinci yang di vaksinasi dengan ekstrak protein membrane luar murni (sifat antigenic) (Hirst., 2003 ; Rantam., 2003).

Sampai saat ini protein imunogenik pada kuman *Brucella abortus* S-19 secara molekuler masih belum banyak di teliti dan informasi tentang pemakaian protein sebagai sub unit imunogenik belum pernah dilakukan.

Berdasarkan uraian diatas maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui imunogenitas protein membrane luar dari kuman *Brucella abortus* S-19 sebagai pemicu pembentukan antibody poliklonal pada kelinci. Antibodi poliklonal yang terbentuk dapat dideteksi dengan metode *indirect ELISA* berdasarkan nilai absorban yang diperoleh, sehingga dapat dijadikan acuan untuk karakterisasi protein spesifik sebagai dasar isolasi protein imunogenik *Brucella abortus* sebagai bahan Kit Diagnostik dan bahan vaksin sub unit.

1.2. Subyek Penelitian

Kuman *Brucella abortus* yang telah diisolasi dari berbagai daerah di Jawa Timur , dibiakkan pada *Potato agar* yang ditempatkan pada botol-botol besar yang di inkubasi pada 37

derajat Celcius selama 48 jam. Selanjutnya suspensi kuman murni *Brucella abortus* dilakukan sonikasi dan ultrasentrifus untuk mendapatkan protein membrane luar (OMP) spesifik.

Setelah didapatkan protein membrane luar(OMP) kuman *Brucella abortus* , dilakukan SDS-PAGE untuk menentukan berat molekulnya yang dikonfirmasi dengan uji reaktifitas dengan cara immunoblotting (*Western blotting*). Protein membrane luar (OMP) yang telah diketahui berat molekulnya, digunakan sebagai bahan untuk imunisasi pada hewan coba kelinci untuk mengetahui sifat antigenitas pada tahap selanjutnya yaitu melalui uji *indirect* ELISA.

1.3. Aspek Penelitian

Penelitian ini mempunyai aspek yang sangat strategis terhadap penyakit yang infeksius dan zoonosis, khususnya ternak sapi di Indonesia. Utamanya adalah sebagai bahan untuk mengetahui (deteksi) secara akurat dan cepat, sehingga dapat dilakukan langkah-langkah pencegahannya penyakit brucellosis, sehingga kerugian ekonomi para peternak dapat ditekan. Selain itu langkah selanjutnya adalah mendapatkan bahan untuk membuat vaksin dari protein membrane luar (OMP) jika ternyata protein tersebut mempunyai sifat antigenik dan imunogenik , serta menambah khasanah ilmu pengetahuan dan informasi dibidang molekuler bakteriologi.

1.4. Lokasi Penelitian

- a. Laboratorium Pengendalian Mutu dan Peningkatan Produksi (PMPP) Pusvetma
Surabaya.
- b. Laboratorium Biologi Molekuler Veteriner FKH Unair
- c. Tropical Disease Centre Universitas Airlangga Surabaya

1.5. Hasil yang Ditargetkan

- a. Penemuan baru protein membrane luar (Outer Membran Protein) yang bersifat antigenic dan imunogenik
- b. Eksplorasi pengembangan bahan Kit Diagnostik kuman *Brucella abortus*
- c. Pengembangan antigen dari protein membran luar sehingga didapatkan bahan yang mempunyai sifat inductor pembentukan antibody spesifik kuman *Brucella abortus*.

1.6. Keterangan yang dianggap perlu

Penelitian ini merupakan kajian jangka panjang untuk pembuatan bahan vaksin dari protein membrane luar tersebut sebagai pembentukan antibodi spesifik kuman *Brucella abortus*.

Penelitian ini melibatkan empat mahasiswa S1 Fakultas Kedokteran Hewan untuk bahan penyusunan skripsi.

BAB II

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Khusus Jangka Pendek

- a. Mengidentifikasi dan karakterisasi protein membrane luar (OMP) kuman *Brucella abortus* S-19
- b. Menguji sifat antigenic dan imunogenik protein membrane luar (OMP)
- c. Membuktikan protein membrane luar (OMP) dapat digunakan untuk bahan Kit Diagnostik

2.2. Tujuan Khusus Jangka Panjang

- a. Memproduksi bahan Kit Diagnostik secara serologis dengan menggunakan antigen protein membrane luar (OMP)
- b. Mengembangkan pembuatan *dipstick* untuk diagnostic di lapangan
- c. Membuat vaksin kuman *Brucella abortus* dari bahan protein membrane luar (OMP) sebagai vaksin sub unit atau dikombinasi dengan antigen lain

2.3. Manfaat Penelitian

- a. Dapat men deteksi secara dini dan spesifik penyakit *brucellosis*
- b. Penyebaran penyakit dapat diturunkan
- c. Kerugian para peternak dapat ditekan

BAB III

STUDI PUSTAKA

3.1. Tinjauan Tentang *Brucella abortus* S-19

3.1.1 Klasifikasi

Menurut Dwidjoseputro (1995) yang mengutip dari *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, klasifikasi bakteri *Brucella abortus* adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisi : Protophyta

Klass : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales

Subordo : Eubacterianeae

Famili : Brucelaceae

Genus : *Brucella*

Spesies : *Brucella abortus*

3.1.2 Brucellosis

Brucellosis adalah penyakit infeksius dan zoonosis yang disebabkan oleh bakteri dan genus *Brucella* . Anggota dari genus *Brucella* pertama kali di isolasi pada tahun 1887 oleh David Bruce dari limpa pasien yang mati karena demam Mediterranean atau demam Malta.

Organisme ini kemudian disebut *Brucella melitensis*. Sepuluh tahun kemudian, tepatnya 1897, seorang dokter hewan, Frederick Bang, mengisolasi dan menamai kuman *Brucella abortus* dari fetus sapi yang diabortuskan. Kuman *Brucella* berbentuk batang kecil atau coccoid, tidak berspora, tidak berflagela, dan bersifat Gram negative. Kuman *Brucella* merupakan kuman patogen yang intraseluler (Timoney *et al.*, 1988; Toth., 2004).

Gejala klinis yang paling utama dari *brucellosis* adalah adanya abortus dengan presentase tinggi yang terjadi pada sekumpulan sapi bunting. Abortus biasanya terjadi setelah bulan ke lima dari masa kebuntingan dan pada kebuntingan berikutnya kuman biasanya karier, tidak terjadi abortus dan kuman dikeluarkan pada saat partus (Gambar 3.1.). Abortus merupakan akibat dari plasentitis yang melibatkan kotiledon dan jaringan kotiledonaris. Kuman *Brucella* dalam jumlah yang banyak terdapat pada cairan fetus yang dikeluarkan selama kira-kira 2 sampai 4 minggu diikuti dengan abortus, sedangkan pada kebuntingan berikutnya, anak sapi dapat dilahirkan dan tampak normal, kuman terdapat pada cairan fetus pada saat partus.

Infeksi pada anak sapi terjadi dalam waktu yang terbatas dibandingkan dengan infeksi pada sapi betina dewasa dimana infeksi pada glandula mammae dan limfoglandula sapi betina dewasa berlangsung terus pada beberapa tahun pada setiap periode kebuntingan. Kuman *Brucella* dapat dikeluarkan secara terus menerus pada air susu dalam beberapa tahun. Pada sapi jantan target organ kuman *Brucella* adalah vesikula seminalis, ampula, testis dan epididemis. Sekelompok populasi ternak yang terinfeksi *Brucella*, *brucellosis* dapat menyebabkan penurunan fertilitas, mengurangi produksi susu dan abortus. Pada sapi jantan orchitis nekrotik kadang-kadang terjadi lesi fibrotik yang terlokalisasi (Quinn *et al.*, 2002).

Cara penularan kuman *Brucella* yang paling sering terjadi adalah melalui pencernaan, tetapi dapat juga melalui kontak kelamin (*veneral contact*), penetrasi melalui kulit yang luka, pernafasan atau penularan transplasental dari induk ke anak. Pada plasenta sapi, kambing dan domba serta babi terdapat senyawa *erythrytol* suatu polihidrik alcohol yang diketahui

berperan sebagai factor pertumbuhan kuman *Brucella* dalam konsentrasi yang tinggi, sehingga proliferasi organism pada hewan bunting menyebabkan timbulnya plasentitis dan diikuti abortus. Bahan yang diketahui sebagai bahan pertumbuhan *Brucella* ini juga ditemukan pada organ lain seperti glandula mammae dan epididimis yang juga merupakan target organ kuman *Brucella*. Pada *brucellosis* kronis , organism ini dapat terlokalisasi pada persendian dan *diskus intervertebralis* (Jawetz *et al.*,1990 ; Quinn *et al.*,2002).

Brucellosis pada manusia dikenal sebagai *Undulant Fever* menampakkan gejala klinis demam, nyeri sendi dan nyeri otot serta kelemahan pada sendi dan otot. Gejala yang khas pada penyakit ini adalah berkeringat banyak pada malam hari, menggigil yang mengikuti pada kondisi kelemahan yang parah. Osteomielitis , meningitis, kholestitis, splenomegali, dan peradangan pada hati umumnya terjadi sebagai bentuk komplikasi *brucellosis*. Bila penderita tidak terawatt , gejala akan berlangsung antara 2 sampai 4 minggu , bila kejadian berlangsung kronis , akan muncul gangguan sistim saraf yang berlangsung selama berbulan-bulan bahkan bertahun-tahun (Alton *et al.*,1988; Jawetz *et al.*,1990; Quinn *et al.* 2002).

Menurut Alton *et al* (1988), abortus bukan merupakan bagian dari infeksi *brucellosis* pada manusia. Hal ini disebabkan karena pada plasenta manusia tidak terdapat *erythrytol* sebagai factor pertumbuhan kuman *brucella*. Pada kasus yang akut kematian terjadi karena toxemia, trombositopenia, endokarditis, atau komplikasi serius lainnya seperti *Disseminated Intra vascular Coagulation* .

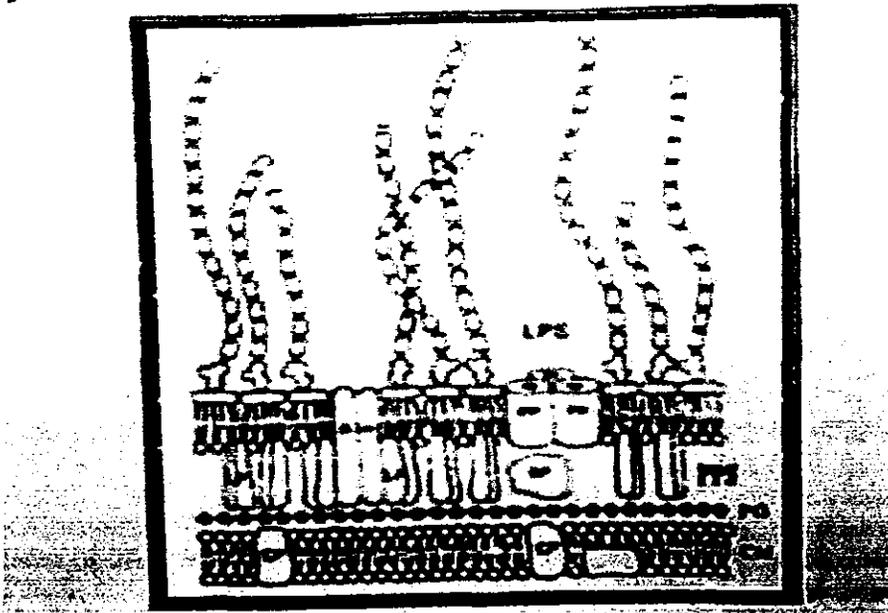
Kejadian penyakit di Jawa Timur menurut data yang diperoleh dari Dinas Peternakan Provinsi Jawa Timur menyebutkan bahwa pada tahun 2003 dari 4225 sampel darah dari berbagai kota yang diperiksa, 194 kasus positif dengan uji RBT dan 350 kasus positif dari CFT atau sekitar 6,44% dengan prevalensi sebesar 0,18% (Dispet, 2003).



Gambar 1.1. Jalannya infeksi *Brucella abortus* pada sapi dewasa (Sumber : Quinn *et al*, 2002)

3.1.3 Struktur Dinding Kuman

Struktur bakteri *Brucella abortus* tergolong unik tidak seperti bakteri Gram negative lainnya. Pada permukaan luar bakteri tidak memiliki pili dan tidak berkapsul, permukaan luarnya terdiri dari dua komponen yang telah diidentifikasi sebagai factor virulensi yang potensial yaitu lipopolisakarida (LPS) dan protein membrane luar (OMP) (Quinn *et al.*, 2002). Lipopolisakarida merupakan komponen terbesar antigen dari membrane luar bakteri Gram negative, merupakan antigen potensial yang dapat secara langsung menginduksi respon imun spesifik humoral yaitu sel B limfosit sehingga lebih cepat memacu terbentuknya antibodi, sedangkan protein membrane luar (OMP) yang tebal dan berhubungan dengan lapisan peptidoglikan (Wolfgang *et al.*, 1992 ; Susilohadi., 2003).



Gambar 1.2. Organisasi molekul protein membrane luar (OMP) bakteri Gram negative.

LPS (Lipopolisakarida); A (OMP A) ; PP (Protein pori); LP (Lipoprotein); BP (Protein pengikat zat makanan); PPS (ruang periplasma); PG (peptidoglikan); CP (protein pembawa); CM (membrane sitoplasma) (Sumber : Burges., 1995).

3.1.4 Diagnosis Penyakit

Diagnosis terhadap penyakit *brucellosis* dapat dilakukan secara bakteriologis dan serologis. Secara bakteriologis dapat dilakukan isolasi dan identifikasi kuman yang berasal dari bahan-bahan yang dicurigai. Bahan-bahan tersebut bias berasal dari fetus yang diaborsikan, plasenta, eksudat uterus, susu atau cairan abses. Diagnosis yang hanya berdasarkan gejala klinis sangat tidak spesifik walaupun pada ternak dijumpai gejala klinis penyakit (Timoney *et al.*, 1988 ; Quinn *et al.*, 2002).

Diagnosis secara serologis dapat dilakukan beberapa uji diantaranya *Brucella Milk Ring Test*, *Rose Bengal Test* (hanya untuk uji kualitatif, hasil positif harus dilanjutkan dengan CFT dan ELISA) (Quinn *et al.*, 2002 ; Rantam ., 2003).

3.1.5 Pencegahan dan Penanggulangan

Brucella adalah bakteri intraseluler, karena itu ia terlindungi dari daya pertahanan tubuh sapi dan aktivitas antibiotika. Pada hakekatnya tidak ada obat yang baik untuk pengobatan penyakit *brucellosis*, apalagi bila penyakitnya sudah kronis. Disamping itu pengobatan *brucellosis* yang sudah kronis membutuhkan waktu lama dan dosis besar. Oleh karena itu pengobatan ini dipandang tidak ekonomis, walaupun kira-kira 15% sapi penderita *brucellosis* dapat sembuh secara alami (Hardjopranjoto. 1995).

Upaya pencegahan dan penanggulangan terhadap *brucellosis* , ditujukan pada tindakan sanitasi dan tata laksana peternakan sapi yang baik, misalnya : 1) sisa bahan abortus hendaknya dibakar dan cairan vagina dilakukan irigasi dengan larutan desinfektan misalnya larutan kreolin, lisol dll; 2) kandang dan peralatan bekas sapi penderita *brucellosis* dilakukan desinfeksi; 3) dihindari perkawinan antara pejantan dan betina penderita abortus; 4) untuk pemasukan sapi Perah baru hendaknya dipilih dari peternakan yang mempunyai sertifikat bebas *brucellosis* dan pada ternak tersebut dilakukan uji serologis selang waktu 60 sampai 120 hari; 5) pada daerah

atau kelompok ternak bebas *brucellosis* tidak dilakukan vaksinasi kecuali pada daerah tersebut didapatkan kasus *brucellosis* ; 6) pada daerah tertular atau kelompok ternak tertular dilakukan tes dan pengeluaran reactor; 7) pemberian sertifikat bebas *brucellosis* pada sapi perah yang menunjukkan hasil tes negative berlaku selama 1 tahun (Handijatno, 2003).

3.1.6 Penularan dan Patogenesis

Umumnya infeksi terjadi melalui kontak langsung dengan material yang terinfeksi seperti air ketuban, fetus yang abortus, susu atau produk susu, dan bahan-bahan lain yang terkontaminasi. Cara penularan yang paling banyak adalah melalui pakan yang tercemar oleh selaput janin atau cairan yang keluar dari rahim yang menderita infeksi *brucellosis*. Penularan *brucellosis* juga dapat terjadi melalui penetrasi melalui kulit yang terluka, pernafasan atau penularan melalui plasenta dari induk ke anak. Terjadinya infeksi melalui konjungtiva atau gesekan kulit yang sehat diperlukan kurang lebih 1,5 juta kuman *Brucella*, media yang dapat membawa penyakit adalah jerami, konsentrat, air minum, lantai kandang, kotoran kelamin, selaput fetus, atau fetus yang diabortuskan. Pejantan penderitanya dapat pula mengeluarkan kuman *Brucella* kedalam air maninya, meskipun infeksi hewan betina tidak dapat terjadi melalui perkawinan alami, namun pada inseminasi buatan infeksi akan segera terjadi bila mani beku yang digunakan tercemar atau terinfeksi oleh kuman (Subronto., 2003).

Quinn (2002) menyebutkan bahwa jalannya infeksi *brucellosis* pada sapi melalui saluran pada jaringan limfoid kemudian bakteri akan terbawa oleh makrofag menuju aliran darah. Bila yang terinfeksi sapi betina bunting maka kuman *Brucella abortus* akan masuk ke uterus pada kebuntingan pertama menyebabkan terjadinya plasentitis dan diikuti terjadinya abortus, keluron yang terjadi pada hari ke 33 sampai 230 hari (Subronto., 2003). Fetus biasanya tetap tinggal di uterus selama 24-72 jam setelah kematian dan selaput fetus terlihat oedematus, terjadi lesi dan nekrosa. Dimana nantinya kuman *Brucella* ini akan ditemukan pada fetus, plasenta, cairan fetus, cairan uterus. Kejadian abortus biasanya hanya terjadi sekali, kemudian pada bunting selanjutnya tidak terjadi abortus (Quinn *et al.*, 2002 ; Handijatno., 2003) dan

kuman *Brucella* dikeluarkan pada saat partus. Selain uterus kuman *Brucella* juga dapat masuk kedalam glandula mammae pada sapi bunting, dan bakteri ini dapat ditemukan bersama dengan air susu yang dihasilkan. Pada sapi betina tidak bunting kuman *Brucella* tetap terdapat pada limpa, limfoglandula supra mammae dan jaringan limfatik lainnya. Kejadian pada sapi jantan, kuman *Brucella* akan menuju organ reproduksi dan menyebabkan orchitis, epididimitis sehingga menyebabkan infertilitas (*infertile*). Kuman *Brucella* juga dapat ditemukan pada air mani beku (semen beku) (Hardjopranjoto, 1995).

Pedet yang memperoleh infeksi dari induknya akan membentuk imunitas yang pasif, dapat melalui plasenta sebelum lahir atau melalui air susu setelah lahir, tetapi penularan ini tidak selalu menyebabkan penyakit pada anak dan akan menghilang beberapa minggu kemudian karena adanya imunitas pasif (Quinn *et al.*, 2002; Rantam., 2003).

3.1.7 Patologi Anatomi

Perubahan patologis yang sering terlihat adalah pada bagian rahim yang berisi janin terdiri dari proses degenerasi melemak dan nekrosis dari berkas-berkas korion. Perubahan tersebut disertai pengeluaran eksudat yang bersifat purulen, mengandung jonjot fibrin dan berwarna kecoklatan, yang pada suatu saat menyebabkan terpisahnya kotiledon maternal dan kotiledon fetal (Subronto., 2003).

Selain perubahan pada rahim, perubahan patologi juga dapat ditemukan pada ambing namun perubahannya tidak khas, bersifat ringan mulai dari tanpa ditemukan lesi sampai adanya perubahan pada jaringan interstitial yang kronis. Perubahan pada kelenjar limfe dan limpa juga tidak begitu jelas sifatnya, reaksi jaringan mungkin berupa sebagai granuloma yang bersifat infeksi ringan, yang dapat melanjut menjadi nekrotik. Pada hewan jantan biasanya ditemukannya adanya abses serta nekrosis pada sebuah pelir dan kelenjar=kelenjar kelamin.

3.1.8 Isolasi dan Identifikasi kuman *Brucella abortus* S-19

Kuman *Brucella abortus* S-19 diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya yang sudah dilemahkan. Kemudian bakteri tersebut dibiakkan pada media Potato Agar (PA) yang (Quinn *et al.*, 2002).

Untuk identifikasi kuman *Brucella abortus*, kuman dikultur pada media *Sulfit Indol Motily* (SIM) dimana hasilnya menunjukkan hasil yang negative, pada *Simon Citrate Agar* menunjukkan hasil negative, pada uji katalase dan urease menunjukkan reaksi positif (Quinn *et al.*, 2002; Ratnasari dkk., 2004).

3.1.9 Protein Membran Luar (OMP) *Brucella abortus* S-19

Protein Membran Luar (OMP) belum banyak diteliti dalam usaha mendapatkan antigen yang dapat diandalkan baik untuk diagnosis maupun sebagai bahan pembuatan vaksin terhadap *Brucellosis*. Protein membrane luar (OMP) yang diekstraksi secara kimiawi dari galur kuman *Brucella abortus* telah dideteksi dengan berat molekul berkisar 10,; 16,5; 19; 25; 27; 36; 38; 89 kDa (Cloeckaert *et al.*,1992).

3.2. Antibodi Poliklonal

Produksi serum hiperimun dengan melalui imunisasi terhadap hewan coba dengan suatu antigen atau protein imunogen yang spesifik untuk mendapatkan antibody terhadap protein imunogen spesifik tersebut. Antibodi didapat dengan jalan mengumpulkan sampel darah dari hewan yang diimunisasi, antibodi yang didapat dari hiperimunisasi dikenal sebagai *antibody polyclonal* (Smith., 1995).

3.2.1 Imunisasi

Imunisasi dapat menimbulkan respon kebal (pembentukan zat kebal atau antibody), dimana imunisasi dapat dibagi menjadi dua cara yaitu imunisasi pasif dan imunisasi aktif. Ada

dua macam vaksin yang dapat digunakan dalam imunisasi aktif, yaitu vaksin hidup dan vaksin mati. Keduanya mempunyai kelebihan dan kekurangan. Vaksin hidup bersifat kuat, tidak memerlukan *adjuvant*, tidak stabil dalam penyimpanan, mampu berreplikasi didalam sel tubuh. Sedangkan vaksin mati stabil dalam penyimpanan dan tidak mampu bereplikasi di dalam sel tubuh, sehingga cenderung menghasilkan tanggapan kebal yang lebih rendah dari pada vaksin hidup. Imunisasi pasif bersifat sementara dengan memindahkan antibody dari hewan resisten ke hewan rentan. Antibodi ini membentuk perlindungan yang lebih cepat, akan tetapi cepat dikatabolisasi (Tizard., 1988; Bellanti., 1993).

3.2.2. Antibodi dan Antigen

Antibodi adalah immunoglobulin yang dibentuk oleh tubuh (sel B limfosit) sebagai respon terhadap stimulasi antigenic. Semua molekul antibody mempunyai 4 rantai polipeptida dasar yang terdiri dari dua rantai berat dan rantai ringan yang identik dan dihubungkan satu sama lain dengan disulfide. Ada lima jenis immunoglobulin, yaitu immunoglobulin G (IgG).

Immunoglobulin M (IgM), immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin D (IgD), dan immunoglobulin E (IgE) (Bellanti.,1993).

Antigen adalah substansi yang dapat dikenali dan diikat dengan baik oleh sistim imun. Antigen dapat berasal dari organisme (bakteri , virus, jamur, parasit atau protein dalam tubuh lainnya) . Tidak setiap antigen berinteraksi dengan molekul sistim imun. Bagian dari antigen yang secara langsung berkaitan dengan molekul reseptor (seperti antibody)dikenal dengan nama *epitop*. Hal ini menandakan bahwa antigen mempunyai beberapa *epitop* (Rantam., 2003).

3.2.3 Adjuvant

Kebanyakan antigen yang digunakan untuk memproduksi antibody tidak bersifat terlalu imunogenik, sehingga membutuhkan *adjuvant* untuk meningkatkan respon imun. *Adjuvant* adalah suatu zat imunopotensiasi yang dapat memperbesar respon imun jika disuntikkan

bersamaan dengan zat yang imunogen. *Adjuvant* merupakan substansi tertentu yang dapat meningkatkan secara tidak spesifik efektifitas imunologis dari agen peng immunisasi, *adjuvant* mempunyai sifat-sifat tertentu sebagai karakteristiknya terutama membuat depot antigen dan melepas antigen sedikit demi sedikit sehingga memperpanjang pemaparan antigen dengan system imun dan memacu system imun dengan afinitas tinggi (Baratawidjaja., 2002)

Salah satu cara untuk membentuk depot adalah dengan menggabungkan antigen dalam emulsi air dan minyak. Kehadiran minyak mendorong terjadinya reaksi pendarahan local dan bentukan jaringan granuloma di sekitar tempat suntikan, sedang antigen dilepaskan secara perlahan-lahan dari fase air dalam emulsi. Substansi mikrobakteri yang tercampur emulsi air dalam minyak disebut *Complete Freun's Adjuvant (CFA)* dan masih dianggap sebagai salah satu pelarut paling kuat yang dikenal, atau tanpa mikrobakteri yang disebut *Incomplete Feund's Adjuvant (IFA)* . Bagian aktif dari mikrobakteri yang meningkatkan aktivitas ini dikenal sebagai muramil dipeptida (*n-avetyl-muramyl L-alanyl D-isoglutamin*)..*Adjuvant* ini terbaik diberikan melalui sub kutan atau intradermal dan peningkatan yang optimal diperoleh bila dosis antigen relative rendah. Zat ini bertindak khusus untuk merangsang fungsi sel T (Tizard., 1988).

3.2.4 ELISA (*Enzyme Linked Immunsorbent Assay*)

Metode ELISA pertama kali diperkenalkan oleh Engvall dan Parلمان pada tahun 1971 dengan cara mengkonjugasikan enzim dalam *immunoassay*. ELISA adalah salah satu metode yang sensitive untuk mendeteksi antibody, antigen hormone, maupun bahan toksik. ELISA terbagi menjadi dua bagian (sistem) yaitu system homogeny dan system heterogen. Sistem homogeny dipengaruhi oleh aktivitas enzim dan tidak memerlukan pencucian dan reaksi secara bertahap. Kerugian dari system ini adalah tidak sensitive sehingga tidak digunakan untuk skrining. Sistem heterogen adalah system uji yang tidak dipengaruhi oleh aktivitas enzim, dalam system ini terdapat dua model yaitu Kompetitif ELISA dan non-Kompetitif ELISA. Kompetitif ELISA kebanyakan digunakan untuk pengukuran antigen melalui kompetitif antara antigen yang

tidak berlabel dan yang berlabel pada antibody yang dilapiskan pada *mikroplate polystirol*. Sedang non-Kompetitif ELISA adalah system yang paling banyak digunakan dan dikembangkan karena lebih sensitive, yang termasuk dalam system ini antara lain *Direct ELISA* (antibody pertama yang dilabel), *Indirect ELISA* (antibody kedua yang dilabel), jembatan antibody (antibody ketiga yang dilabel seperti *peroxidase anti peroxidase/PAP*) (Rantam.,2003).

Prinsip teknik *indirect* ELISA yaitu merekasikan antigen dalam sampel dengan antibody yang dilabel enzim. Kompleks antigen dengan antibody yang dilabel enzim kemudian dipisahkan dengan antigen dan antibody yang bebas, lalu diinkubasi dengan substrat kromogenik yang semula tidak berwarna, tetapi kemudian menjadi berwarna apabila dihidrolisa oleh enzim. Intensitas warna yang terbentuk dapat diukur dan merupakan parameter untuk antigen yang diuji (Kresno., 2000).

Interpretasi *indirect* ELISA dapat dilakukan secara kualitatif (visual) atau secara kuantitatif (spektrofotometer). Secara kualitatif *indirect* ELISA dibaca dengan melihat perubahan warna antara kelompok yang diperiksa dengan kelompok control. Secara kuantitatif, *indirect* ELISA dibaca dengan spektrofotometer (*ELISA reader*) berdasarkan pada nilai absorben atau kerapatan optik (*optical Density*) (Rantam., 2003; Suwarno., 2003).

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Uji antigenitas dengan Indirect ELISA

Prinsip dari teknik **Indirect ELISA** yaitu mereaksikan antigen sampel dengan antibody yang dilabel enzim . Kompleks antigen dengan antibody yang dilabel enzim kemudian dipisahkan dengan antigen dan antibody yang bebas , lalu di inkubasi dengan **substrat kromogenik** yang semula tidak berwarna , tetapi kemudian menjadi berwarna apabila di hidrolisa oleh enzim , intensitas warna yang terbentuk dapat di ukur dan merupakan parameter untuk antigen yang di uji (Kresno , 2000 ; Rantam, 2003).

Interpretasi indirect ELISA dapat dilakukan secara kualitatif (Visual) atau secara kuantitatif (spektrofotometer) . Secara kualitatif dibaca dengan melihat perubahan warna antara kelompok yang diperiksa dengan kelompok control . Sedangkan secara kuantitatif , dibaca dengan spectrophotometer (**Spectrophotometer-ELISA reader**) berdasarkan pada nilai **absorbent (Optical Density)** (Rantam, 2003 ; Suwarno, 2003).

4.2. Pemotongan berat molekul protein OMP dengan Teknik ELUSI

Prinsip pemurnian antibody dengan afinitas kolom kromatografi, maka preparasi kolom antinbody yang tidak murni disesuaikan dengan kolom modifikasi antigen support . Antibody spesifik terhadap antigen mengikat kolom dan yang tidak murni dicuci dengan buffer dalam jumlah banyak . Antibody spesifik akan dikeluarkan dari kolom dengan cara penambahan buffer yang melepaskan ikatan antigen dan antibody . Bahan yang digunakan untuk melepaskan antibody adalah chaotropic salt NaSCN dan KBr atau detergen seperti SDS

4.3. Antibody poliklonal protein OMP berat molekul spesifik dengan Uji Tantang

Imunisasi protein dengan berat molekul protein OMP spesifik di suntikkan ke hewan coba kelinci , ambil serum (antibody anti OMP murni / hasil elusi) .

4.4. Uji antigenitas dengan teknik indirect ELISA

Uji antigenitas protein OMP dengan berat molekul yang spesifik berat molekul pada uji ELISA dengan OD tertinggi .

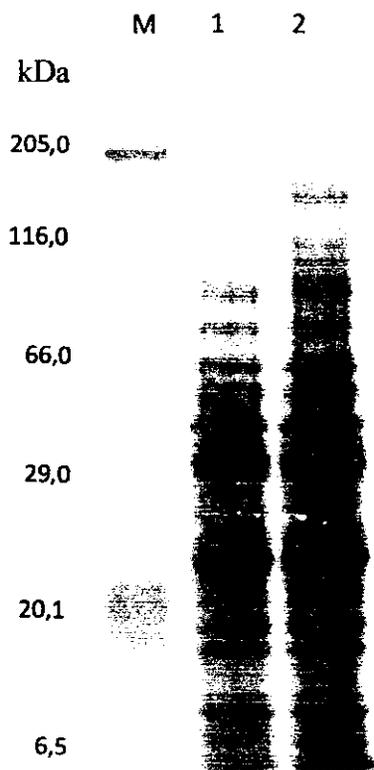
Bila terbukti terjadi ikatan antigen antibody dengan protein OMP berat molekul spesifik , maka berarti protein *Outer Membrane Protein Brucella abortus S-19* mempunyai potensi immunogenic sehingga protein OMP tersebut dapat dipakai sebagai **bahan Kitt Diagnostik / vaksin** .

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil elektroforesis *Outer Membrane Protein Brucella abortus S-19* dengan SDS-Page dari analisis karakterisasi protein maka diketahui berat molekul protein membrane luar (OMP) adalah sebagai berikut : 6,5 kDa; 20,1 kDa; 29,0 kDa; 66,0 kDa; 116,0 kDa; 205,0 kDa .

(Gambar 5.1).



Gambar 5.1 Profil protein OMP *B.abortus S-19* dengan teknik SDS-Page (M=marker , dan nomer 1,2 = sampel OMP).

Hasil analisis berdasarkan berat molekulnya pada penelitian ini , maka isolate OMP *B.abortus S-19* dapat dikategorikan sebagai protein yang mempunyai kemampuan imunogenik, dan dapat merupakan protein yang imunogen seperti yang dikatakan oleh Bellanti (1985) bahwa protein imunogen yang efektif mempunyai berat molekul (BM) lebih besar dari 10.000 Da.

Kresno , 2000 dan Rantam , 2003 mengatakan bahwa Polycrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) merupakan standard metoda pengujian terhadap berat molekul protein , struktur subunit dan kemurnian protein . Karena protein merupakan molekul yang amphoteric dan mengandung kedua grup karboksil negative dan grup amino yang positif . Semenjak protein dikarakterisasi *point isoelectric* akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda kedaerah elektrik. Selama PAGE protein dipisahkan seperti migrasi melalui matrik tiga dimensi dengan elektrik , maka matrik mempunyai dua fungsi yaitu memisahkan protein sesuai dengan ukuran , bentuk dan muatan listrik dan hal ini memerlukan pH buffer yang sesuai . Polyacrylamide adalah matrik pilihan untuk memisahkan protein yang mempunyai range dengan berat molekulnya antara 500-250.000 pada SDS-PAGE , protein di elektroforesis dalam *ionic detergent sodium dodecyl sulfate*(SDS). Deterjent akan mengikat residu hidropobik dan bagian belakang peptide dari protein , diperkirakan salah satu dari setiap asam amino,sehingga dapat membuka rantai peptide secara komplit .

Dengan demikian protein SDS-Komplek migrasi melalui polyacrylamide tergantung dari berat molekul ,protein migrasi dengan cepat melalui pelarur ion melalui *stacking gel* kedalam

separating gel. Protein terkonsentrasi pada garis yang tipis dan terlarut pada Band yang tipis , pada metoda SDS-PAGE setelah diwarnai akan terlihat Band dengan berat molekul yang besar

Menurut Cloeckert(1992),OMP *Brucella abortus* dengan berat molekul protein sebesar 36-38 kDa sensitive untuk mendeteksi hewan yang terinfeksi kuman brucella .

Hasil karakterisasi *Outer Membrane Protein B.abortus S-19* dengan metode Western Blotting menunjukkan adanya protein yang dikenali oleh antibodinya, yaitu protein dengan berat molekul sebagai berikut : 13,4 kDa., 14,6 kDa., 37,2 kDa., 61,8 kDa ., 164,1 kDa.

Hasil uji Western Blott dimana terjadi ikatan antara protein antigenic OMP dengan antibody anti OMP spesifik dan dapat dikembangkan lebih lanjut untuk mencari protein dengan berat molekul yang lebih spesifik dengan teknik *elusi* sebagai kitt diagnostic. Hal ini menurut Cloeckert (1992), bahwa protein OMP *B.abortus S-19* dengan protein yang berat molekulnya 36- 38 kDa sensitive untuk mendeteksi hewan yang terinfeksi kuman brucella.

Menurut Rantam (2003), mengatakan bahwa pada umumnya protein yang tidak dimurnikan mengandung banyak protein yag berbeda dan tidak spesifik . Untuk itu dalam mengukur single protein spesifik diperlukan uji biokimia. Metode *Western-Blotting* digunakan untuk mendeteksi berat molekul protein dari campuran antigen dan digunakan untuk membedakan kros reaksi diantara protein. Pada tahap sebelumnya dilakukan pemisahan protein dengan SDS-Page, kemudian ditransfer ke membrane nitroselulose yang sesuai dan akhirnya di label dengan antibody dan di visualisasikan dengan pewarnaan . Fraksi-fraksi

protein yang telah dipisahkan satu sama lain dengan probe antibody yang sesuai. Protein yang diikat pada membrane dapat mempertahankan antigenitasnya dengan mudah direaksikan dengan antibody. Adanya pita tertentu pada *blott* menunjukkan antigen spesifik dalam sample atau antibody pada probe.

5.1. Isolasi Protein OMP Spesifik Band dengan Teknik Elusi

Berdasarkan hasil *Western Blotting* tersebut diatas selanjutnya dilakukan isolasi protein spesifik band dari *Brucella abortus S-19* karena diduga band tersebut mengandung protein yang dapat bereaksi dengan antibody poliklonal yang diproduksi pada kelinci . Hal ini menunjukkan bahwa protein OMP tersebut dapat menginduksi pembentukan antibody yang timbul akibat penyuntikkan bahan protein OMP yang bertindak sebagai antigen pada kelinci.

Model pemurnian yang digunakan adalah dengan cara *elusi* yang memisahkan protein OMP band dari gel dengan melakukan electrophoresis dalam selopon, selanjutnya sekitar 2 jam cairan dalam selopon dipisahkan dan kemudian dilakukan dialysis pada suhu 4 derajat selama 24 jam dengan cara memutar menggunakan magnetic stirrer sehingga bahan-bahan yang tidak spesifik dapat terbuang, kemudian protein dipisahkan untuk digunakan pemeriksaan step berikutnya.

5.2. Imunisasi Protein OMP Hasil Elusi pada Kelinci

Penyuntikan (imunisasi) protein-protein OMP *Brucella abortus* S-19 hasil Elusi pada kelinci-kelinci dengan 0,5 ml pada kelinci jantan secara subkutan. yang diharapkan akan memproduksi antibody poliklonal. Tiga minggu setelah dilakukan imunisasi selanjutnya diambil serumnya sebagai bahan uji *indirect ELISA* (Gambar 5.2)



Gambar 5.2. Imunisasi Protein OMP *Brucella abortus* S-19 secara subkutan.

5.3. Uji antigenitas dengan Teknik *indirect ELISA*

Serum protein OMP hasil *Western Blotting* ditera antibodinya dengan menggunakan metode *indirect ELISA* . Pada metode ini antibody dapat dideteksi dengan cara antigen diikat dengan benda padat kemudian ditambahkan antibody yang pertama yang dicari, selanjutnya ditambahkan antibody yang kedua (*conjugate*), dan yang terakhir ditambahkan substrat. Setelah dilakukan penambahan substrat akan menimbulkan warna, akibat beraksi dengan enzim. Perubahan warna sesuai dengan jumlah enzim yang diikat dan kadar antibody yang dicari. Kemudian dilakukan peneraan antibodinya dengan membaca hasil akhir *indirect ELISA* dengan menggunakan ELISA Reader dengan panjang gelombang 490 nm.

Setelah dilakukan pengukuran nilai OD pada uji *indirect ELISA* terhadap antibody protein OMP dapat dilihat pada table 4.1 dibawah ini :

Sampel OMP	13,4 kDa	14,6 kDa	37,2 kDa	61,8 kDa	164,1 kDa
Nilai OD	0,325	0,586	0,975	0,643	0,598

Tabel 5.1. Hasil OD dengan teknik *indirect ELISA* protein OMP berbagai berat molekul

Dari hasil pemeriksaan nilai OD yang tinggi pada protein OMP *Brucella abortus S-19* adalah dengan berat molekul 37,2 kDa dibanding dengan protein OMP yang lain, hal ini menunjukkan bahwa protein OMP *Brucella abortus S-19* mempunyai sifat immunogenic dalam artian dapat membentuk antibody (bersifat antigenic) sesuai dengan pendapat Cloeckert

(1992), bahwa protein OMP *Brucella abortus* S-19 dengan protein yang berat molekulnya sekitar 36- 38 kDa mempunyai sifat imunogenik (antigenic).

5.4. Uji Tantang pada Hewan Kelinci

Setelah diketahui bahwa nilai OD tertinggi pada pemeriksaan indirect ELISA , maka dilakukan ujiantang dalam arti pembuktian kembali apakah protein OMP *Brucella abortus* S-19 dengan berat molekul 37,2 kDa memang benar-benar mempunyai sifat imunogenik (antigenic) yaitu dengan penyuntikkan kembali imunisasi pada kelinci . Setelah tiga minggu kemudian diambil serumnya untuk dilakukan pemeriksaan pembentukan antibody dengan teknik indirect ELISA.

Setelah dilakukan pemeriksaan dengan teknik indirect ELISA maka didapat hasil bahwa OD protein OMP *Brucella abortus* S-19 yaitu OD protein OMP dengan berat molekul 37,2 kDa adalah sebesar 0,968, ini berarti hasil pemeriksaan yang pertama dengan yang kedua tidak jauh berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa protein OMP dengan berat molekul 37,2 kDa mempunyai sifat imunogenik (antigenic) yaitu dapat menginduksi terbentuknya antibody.

Pada indirect capture ELISA ,anti-Ig M atau anti-Ig G diikatkan pada fase padat,lalu ditambahkan Ig M atau Ig G dari serum yang diperiksa . Tahap berikutnya adalah penambahan Ag spesifik terhadap Ig M atau Ig G . Selanjutnya ditambahkan konjugat (Ab spesifik terhadap Ag yang telah berlabel ensim).

Respon imun humoral timbul jika sel B limfosit berkomunikasi dengan sel-sel yang lain untuk membentuk pertahanan terhadap masuknya antigen asing. Sel B limfosit menangkap antigen yang disajikan oleh sel-sel aksesori, kemudian sel B limfosit akan merangsang untuk berdiferensiasi menjadi sel plasma dan kemudian mensekresi immunoglobulin (Bellanti, 1993. Rantam, 2003).

Pada prinsipnya , respon imun humoral terjadi apabila sel B limfosit dapat mensekresi antibody, sedangkan sel B limfosit akan mensekresi antibody apabila sel B teraktifasi. Aktifasi sel B diawali oleh pengikatan antigen dengan molekul immunoglobulin (Ig) pada membrane sel B limfosit. Interaksi antigen-Ig membrane ini menyebabkan terjadinya respon sebagai berikut : antigen yang sudah dipecah menjadi peptide berasosiasi dengan molekul MHC II yang ada pada sel B limfosit. Bentuk kompleks peptide – MHC II ini dipaparkan ke permukaan sel B limfosit supaya dapat dikenali oleh sel T limfosit. Sel B limfosit bertindak sebagai Antigen Presenting Cell (APC) kepada sel T limfosit, sehingga terjadi komunikasi antara sel B limfosit dengan sel T limfosit serta reseptor sel T (TCR) akan merespon peptide antigen yang nantinya akan mengaktifkan sel B limfosit untuk berdeferensiasi menjadi sel plasma dan kemudian mensekret antibody (Rantam, 2003).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

Berdasarkan atas data hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan maka

dapat disimpulkan :

- 1. Protein spesifik OMP yang mempunyai sifat imunogenik, setelah uji indirect ELISA
maka OD tertinggi adalah protein OMP dengan berat molekul 37,2 kDa (OD =0,975)**
- 2. Protein OMP dengan berat molekul 37,2 kDa setelah diimunisasikan pada kelinci
(Ujiantang), dengan indirect ELISA OD = 0,968 sehingga mempunyai sifat imunogenik
dapat di gunakan sebagai Kitt diagnostic**

6.2. SARAN

Protein OMP dengan berat molekul 37,2 kDa selain dapat digunakan sebagai bahan Kitt

Diagnostic dapat pula disarankan sebahai bahan pembuatan bahan vaksin yang poten.

DAFTAR PUSTAKA

- Alonso-Urmeneta,B., C.Marin., V.Aragon., J.M.Blasco., R.Diaz and I.Mariyon. 1998.Evaluation of Lipopolysaccharides and
- Alton,G.G., L.M.Jones and D.E.Pietiz. 1988. Laboratory Techinques in Brucellosis 3rd Ed Ed.WHO.Switzerland.
- Baratawidjaja,K.G.2002. Immunologi Dasar.Edisi Kelima. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.Jakarta.Hal.13-15.
- Bellanti,J.A. 1993. Imunologi III. Diterjemahkan oleh Prof.Dr.A.Samik Wahab. Gajah Mada University Press Yogyakarta.Hal.86-95, 173-188.
- Burgess,G.W. 1995. Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian. Diterjemahkan oleh Wajan T.Artama.Gajah Mada University Press.Yogyakarta.
- CloECKaert,A.,P.Kerhofs and J.N.Limet. 1992. Antibody Response to Brucella Outer Membran Proteins in Bovine Brucellosis : Immunoblot Analysis and Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies. Journal of Clinical Micobiology . Dec.1992. ,pp.3168-3174.
- Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur.2003
- Dwidjoseputro,D.1995. Dasar-dasar Mikrobiologi.Penerbit Djambatan.Hal.69,103,118-120.

- Forestier,C., E.Moreno., J.P.Cerda and J.P. Gorvel.1999. Lysosomal Accumulation and Recycling of Polysaccharide to the Cell Surface of Murine Macrophages, an In Vitro and In Vivo Study. www.jimmunol.org/cgi/content/full/162/11/6784.
- Handijatno,D. 2003. Pencegahan dan Penanggulangan Brucellosis pada Sapi Perah. Disampaikan Pada Rakor Pemberantasan Brucellosis di Jawa Timur.Hal.1-3.
- Hardjopranjoto,S.H.1995.Ilmu Kemajiran pada Ternak.Airlangga University Press Surabaya. Hal. 215-219.
- Hirst,R.G. 1995. Antigen Bakteri Dalam Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian . Grahan W.Burgers (Ed) Gajah Mada University Press.
- Jawetz,E., J.L.Melnick and E.A.Adelberg. 1990. Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan. ECG Penerbit Buku Kedokteran Jakarta. Hal.7-33, 193-204, 311-313.
- Kresno, S.B. 2000. Imunologi. Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Edisi ketiga. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.Jakarta.
- Quinn,P.J., B.K.Harkey., M.E.Corter., W.J.Donneley and F.C.Leonard.2002. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing. Great Britain.Hal. 3-11, 162-167.
- Rantam,F.A. 2003. Metode Immunologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Ratnasari,R., J.Rahmahani., T.Juniastutik dan Suwarno. 2004. Isolasi dan Karakterisasi Lipopolisakarida Brucella abortus S-19. Guna Pembuatan Antigen Diagnostik untuk Aplikasi

Teknik ELISA. Laporan Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Smith, J.R. 1995. Produksi Serum Hiperimun Dalam: Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian (Burgers, G.W. Ed). Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 28-29.

Subronto, I.T. 2001. Ilmu Penyakit Ternak I. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 464-485.

Susilohadi, W., A.Sadik. dan F.A.Rantam. 2000. Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunogenik Salmonella pullorum Sebagai Alternatif Bahan Vaksin Subunit. Disertasi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Suwarno., R.Ernawati., A.P.Rahardjo., N.Sianita., J.Rahmahani., F.A.Rantam. 2003. Prinsip Dasar, Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji Elisa. Laboratorium Virologi dan Immunologi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Hal 1-10.

Timoney, J.F., J.H.Gillespie., F.W.Scott and J.E.Barlough. 1988. Hagan and Brunner's Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animal. Eighth Ed. Comstock Publishing Associate Cornell University Press. London. Hal 7, 135-151.

Tizard, I. 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Edisi Kedua. Diterjemahkan oleh Dr.Masduki Partodiredjo cs dan Dr.Soehardjo Hardjosworo. Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 10-12.

BIOGRAFI PENELITTI UTAMA

1. Nama Lengkap dengan gelar : R. Budi Utomo. M.Si, Drh
2. Umur/Jenis kelamin/Agama : 55 tahun/ Laki-laki/ Islam
3. Pangkat/Gol / Nip : Penata – Lektor/ Gol .III-d / 130 701 129
4. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
5. Alamat Kerja : Fakultas Kedokteran Hewan Unair
Jl. Mulyorejo Kampus C – Unair
Surabaya

Riwayat Pendidikan :

No	Nama Pendidikan	Tempat	Tahun	Bidang Ilmu	Gelar
1	Kedokteran Hewan	FKH-Unair	1979	--	Drh
2	Research Immunologi	Swedia	1988- 1990	Imunologi	-
3	Pasca Sarjana	Unair	2005	Imunologi	M Si

Pengalaman Penelitian

No	Thn	Judul Penelitian	Biaya	Keterangan
1	1981	Gambaran Darah Tepi Akibat Pemberian Antibiotika Thiamfenicol Intramuskular Pd Hewan Kelinci	Sendiri	Skripsi
2	1985	Pengaruh Pemberian Wafer Rumput Gajah & Pucuk Tebu Thd Perubahan Komposisi Darah Sapi Potong	Puskud	Ketua
3	1985	Pengaruh Pemberian Wafer Rumput Gajah & Pucuk Tebu Thd Perubahan Berat Badan Sapi Bali	Puskud	Ketua
4	1989	The Influence of Interleukin-4, Interleukin-6 And LPS in B-Lymphocytes	World Bank	Ketua
5	1991	Pengamatan Titer HI Thd Vaksinasi ND & Jenis Lekosit Darah Tepi Pd Ayam Pedaging Yg Diberi Pakan Mengandung Virginiamycin dan Levamisol	OPF	Ketua
6	1997	Manfaat Suplementasi Minyak Ikan Untuk Memodifikasi Profil Lipid Darah Ayam Pedaging	Dana Rutin	Anggota
7	1999	Skrining Sel Hibrid Calon Penghasil Antibodi Monoklonal Thd Virus Swollen Head Syndrome	DP3M	Ketua
8	2005	Perubahan Respons Imun Pada Ayam Pedaging Yang Stress Akibat Transportasi	BPPS-Pasca	Tesis

BIOGRAFI PENELITI

Nama lengkap dan gelar : Rr. Ratih Ratnasari, SU, Drh.

Tempat dan tanggal Lahir : Surabaya, 28 September 1952

Pendidikan :

1. Kedokteran Hewan Universitas Airlangga tahun lulus 1976 Gelar : Drh.

2. Pasca Sarjana (S2) UGM tahun lulus 1987 Bidang Sain Veteriner (SU)

Pengalaman Penelitian :

1. 1990. Pengaruh Penambahan Serum Berbagai Hewan pada Media PPLO Agar terhadap Pertumbuhan Kuman Mycoplasma gallisepticum Anggota Dana OPF
2. 1991. Uji Bakteriologis S.aureus pada susu Pasteurisasi Anggota Dana OPF
3. 1993. Penggunaan Kuman dengan Berbagai Tingkat Standard McFarland pada Uji Kepekkan Antibiotika Anggota Dana OPF
4. 1994. Isolasi dan Identifikasi Bakteri dari Uterus Sapi Perah yang Infertil di Kodya Surabaya Ketua Dana SPP/DPP
5. 1995. Pengaruh Dosis Kaporit Terhadap Total Bakteri Ketua Dana SPP/DPP
6. 2004. Isolasi dan Karakterisasi Lipopolisakarida B abortus S-19 Guna Pembuatan Antigen Diagnostik untuk Aplikasi Teknik ELISA Ketua Dana Due -Like

