

Laporan Akhir  
Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi  
Tahun Anggaran 2015



POTENSI OUTER MEMBRANE PROTEIN *BRUCELLA ABORTUS*  
ISOLAT LOKAL INDONESIA UNTUK PENGEMBANGAN VAKSIN  
BRUCELLOSIS DI INDONESIA

Tahun kedua dari rencana 2 tahun

Oleh

Didik Handijatno, Drh., M.S., PhD./ NIDN 0018105403  
Dr. Hani Plumeriastuti, Drh., M.Kes./NIDN 0008085905  
Wiwiek Tyasningsih, Drh., M.Kes. / NIDN 0028036207

Dibiayai oleh DIPA DITLITABNAS Tahun Anggaran 2015 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Pelaksanaan Hibah Kegiatan Penelitian dan Program Pengabdian kepada Masyarakat Baru dan Lanjutan Dana DIPA Ditlitabnas Tahun Anggaran 2015 Nomor: 519/UN3/2015 Tanggal 26 Maret 2015

UNIVERSITAS AIRLANGGA

OKTOBER 2015

**HALAMAN PENGESAHAN**

Judul Penelitian : Potensi Outer Membrane Protein *Brucella abortus* Isolat Lokal Indonesia Untuk Pengembangan vaksin Brucellosis di Indonesia.

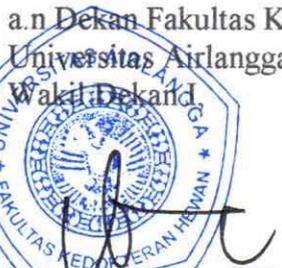
Peneliti/ Pelaksana  
Nama Lengkap : Didik Handijatno, Drh., M.S., Ph.D.  
NIDN : 0018105403  
Program Studi : Kedokteran Hewan  
Nomor HP : 081235247447  
Alamat Surel (e-mail) : Didik\_fkhunair@yahoo.co.id

Anggota (1)  
Nama : Dr. Hani Plumeriastuti, Drh., M.Kes.  
NIDN : 0008085905  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)  
Nama : Wiwiek Tyasningsih, Drh., M.Kes.  
NIDN : 0028036207  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tahun Pelaksanaan : Tahun ke-2 dari rencana 2 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 50.000.000  
Biaya Keseluruhan : Rp. 100.000.000

Mengetahui :  
a.n Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Wakil Dekan

  
Dr. Anwar M. Arif, Drh., MKes.  
NIP. 19531216 197806 2 001

Surabaya, 30 Oktober 2015  
Ketua Peneliti,

  
Didik Handijatno, Drh., M.S., Ph.D.  
NIP. 19541018 198103 1 001

Mengetahui  
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi  
  
Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs., M.Si., Ph.D  
NIP. 19670507 199102 1 001

## RINGKASAN

Brucellosis merupakan salah satu penyakit yang penting pada dunia peternakan, karena dapat mengakibatkan kerugian ekonomi berupa abortus (keguguran) pada hewan yang sedang bunting (gravid), penurunan produksi susu, dan gangguan reproduksi baik yang temporer sampai permanen. Pulau Jawa sebagai sentra sapi perah dengan populasi mencapai 98% dari populasi nasional menghadapi masalah penyakit Brucellosis dengan angka prevalensi yang masih cukup tinggi, hal ini disebabkan tidak terlihatnya gejala klinis pada reaktor Brucellosis, sukarnya monitoring lalu lintas ternak, belum optimalnya pelaksanaan *test and slaughter*, pemakaian vaksin *Brucella abortus* S19 dan belum optimalnya keikutsertaan petani dalam penanggulangan menjadi penyebab sulitnya melakukan pemberantasan dan pengendalian Brucellosis pada sapi perah.

Vaksinasi dilakukan sebagai upaya pencegahan terhadap penyakit Brucellosis, penggunaan vaksin *Brucella abortus* strain 19 direkomendasi karena tidak menimbulkan reaksi post vaksinasi, tetapi karena berasal dari *whole* bakteri kemungkinan adanya mutasi bakteri dan berubah menjadi patogen kemungkinan dapat terjadi sehingga ada pemikiran untuk menggunakan vaksin sub unit berupa OMP. OMP *Brucella abortus* merupakan salah satu antigen potensial yang dapat secara langsung menginduksi respon imun spesifik humoral yaitu sel limfosit B sehingga lebih cepat memacu terbentuknya antibodi.

Penelitian ini terdiri dari tiga (3) kelompok penelitian yaitu P0 sebagai kontrol adalah kelompok kelinci yang tidak mendapat vaksinasi, P1 adalah kelompok kelinci yang divaksin dengan *whole* bakteri *Brucella abortus* S19 dan P2 adalah kelompok kelinci yang divaksin dengan OMP *Brucella abortus* isolat lokal. Vaksinasi diberikan secara subcutan dan dilakukan dengan *booster* dua kali dengan interval waktu dua minggu. Pengamatan dilakukan

dengan menghitung kadar immunoglobulin (Ig G) setiap minggu sampai minggu keempat setelah pemberian *booster* terakhir.

Hasil penelitian menunjukkan kadar IgG hasil vaksinasi dengan *whole B. abortus* S19 pada minggu pertama sampai minggu keempat berturut-turut adalah 14.20 µg, 14.75 µg, 15.51 µg dan 16.36 µg, sedangkan hasil vaksinasi dengan OMP *B. abortus* isolat lokal adalah 15.43 µg, 16.30 µg, 16.95 µg dan 18.90 µg, Hasil analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan yang nyata diantara masing-masing perlakuan ( $p < 0,05$ ), kemudian dilakukan uji multivariate hasilnya menunjukkan pada perlakuan P2 dengan pemberian OMP *Brucella abortus* isolat lokal menunjukkan kadar IgG yang lebih tinggi pada minggu pertama, minggu kedua, minggu ketiga dan minggu keempat lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan P0 dan P1.

Penggunaan *Brucella abortus* isolat lokal sebagai antigen diharapkan dapat menghasilkan antibodi yang lebih baik karena sama dengan bakteri penyebab penyakit sehingga dapat melindungi hewan dari penyakit Brucellosis.

*Keyword* : OMP, *Brucella abortus* isolat lokal, Brucellosis, ELISA

## PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga peneliti dapat melaksanakan penelitian tahun kedua dengan judul “Potensi Outer Membrane Protein *Brucella abortus* Isolat Lokal Indonesia Untuk Pengembangan vaksin Brucellosis di Indonesia”.

Pada kesempatan ini peneliti menyampaikan terima kasih kepada Bapak Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga, atas kesempatan serta fasilitas dan pembiayaan yang telah diberikan untuk melaksanakan program penelitian Unggulan Perguruan Tinggi ini melalui pembiayaan oleh DIPA DITLITABNAS Tahun Anggaran 2015 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Pelaksanaan Hibah Kegiatan Penelitian dan Program Pengabdian kepada Masyarakat Baru dan Lanjutan Nomor: 519/UN3/2015 Tanggal 26 Maret 2015.

Semoga penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan dunia peternakan khususnya peternakan sapi perah dan Allah SWT senantiasa melimpahkan Rahmat dan hidayah-Nya kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Terimakasih.

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN .....	iii
PRAKATA .....	iv
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vii
DAFTAR LAMPIRAN .....	viii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1.1. Perumusan Masalah .....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1. Penyakit Brucellosis .....	5
2.2 Pathogenesis Brucellosis .....	5
2.3. Pencegahan dan Pemberantasan Brucellosis .....	7
2.4 Outer Membrane Protein <i>Brucella abortus</i> .....	8
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	10
3.1. Tujuan Umum .....	10
3.2. Tujuan Khusus .....	10
3.3. Manfaat Penelitian .....	10
BAB IV METODE PENELITIAN .....	11
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian .....	11
4.2. Bahan Penelitian .....	11
4.3. Rancangan Penelitian .....	11
4.4 Tahapan Penelitian .....	12
4.4. Kerangka Operasional Penelitian .....	14
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....	15
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	23
DAFTAR PUSTAKA .....	24

**DAFTAR GAMBAR**

	<b>Halaman</b>
Gambar 5.1 Koloni <i>Brucella abortus</i> pada Media Brucella Agat .....	15
Gambar 5.2 <i>Brucella abortus</i> pada Pewarnaan Gram .....	15
Gambar 5.3 Uji Urease positif .....	16
Gambar 5.4 Uji Oksidase positif .....	16
Gambar 5.5 Hasil PCR <i>Brucella abortus</i> .....	17
Gambar 5.6 Analisis OMP <i>Brucella abortus</i> Isolat Lokal dengan SDS-PAGE .....	18
Gambar 5.7 Hasil Uji Western Blot .....	18
Gambar 5.8 Profil Plot Kadar IgG Perlakuan P0, P1 dan P2 .....	22

**DAFTAR TABEL**

**Halaman**

Tabel 5.1	Rerata dan Standar Deviasi Kadar IgG Hasil Vaksinasi	16
-----------	--	----

**DAFTAR LAMPIRAN**

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1 Foto Pendukung Penelitian .....	26
Lampiran 2 Hasil Analisis Statistik .....	27
Lampiran 3 Personalia Tenaga Peneliti .....	33

## BAB I PENDAHULUAN

Penyediaan bahan pangan berupa protein hewani merupakan bagian penting dari sektor pertanian khususnya sub sektor peternakan dalam memenuhi ketahanan pangan terutama penyediaan bahan pangan asal ternak untuk memenuhi konsumsi protein hewani masyarakat Indonesia. Produktivitas ternak mempunyai peran yang penting untuk penyediaan bahan pangan tersebut. Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi produktivitas ternak adalah masalah kesehatan, sehingga upaya pencegahan dan pemberantasan terhadap penyakit pada ternak harus mendapat perhatian baik oleh masyarakat peternak maupun pemerintah.

Kebijaksanaan pemerintah dalam program pengendalian dan pemberantasan penyakit hewan menular dilakukan secara bertahap berdasarkan prioritas terhadap penyakit hewan strategis, yaitu penyakit hewan yang berdampak kerugian tinggi karena bersifat menular, menyebar dengan cepat atau berpotensi mengancam kesehatan masyarakat. Pada tahun 2012 pemerintah telah menetapkan 11 penyakit hewan menular strategis secara nasional yang salah satunya adalah penyakit Brucellosis pada skala prioritas urutan ketiga (Ditjen Keswan, 2012).

Brucellosis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri genus *Brucella*, menyerang hewan sapi, kambing, domba, babi, dan bersifat zoonosis (Quinn *et al.*, 2002). Brucellosis merupakan salah satu penyakit yang penting pada dunia peternakan, karena dapat mengakibatkan kerugian ekonomi berupa abortus (keguguran) pada hewan yang sedang bunting (gravid), penurunan produksi susu, dan gangguan reproduksi baik yang temporer sampai permanen (Noor, 2006). Brucellosis pada hewan disebut sebagai Penyakit Keluron Menular atau Bang's Disease, dan pada manusia disebut sebagai Undulant Fever atau Malta Fever (OIE, 2009). Menurut Hidayat (2010) Brucellosis berpotensi menyebabkan kerugian ekonomi sebesar Rp. 138,5 miliar per tahun karena terjadi keguguran, kematian pedet, sterilitas, infertilitas dan penurunan produksi susu

Kejadian penyakit Brucellosis hampir di seluruh dunia, prevalensi kejadiannya antara 0,85 – 23,3 %, di Pakistan prevalensi Brucellosis 5,05%, dan Mesir 10,0% (Asif *et al.*, 2009), di Malaysia dilaporkan oleh Shahaza *et al.*, 2009) sebanyak 476 kasus Brucellosis pada kambing, sedangkan di Indonesia hampir semua daerah / provinsi tertular Brucellosis kecuali Bali dan Lombok (BBalitvet, 2010).

Pulau Jawa sebagai sentra sapi perah dengan populasi mencapai 98% dari populasi nasional menghadapi masalah penyakit Brucellosis dengan angka prevalensi yang masih cukup tinggi, hal ini disebabkan tidak terlihatnya gejala klinis pada reaktor Brucellosis, sukarnya monitoring lalu lintas ternak, belum optimalnya pelaksanaan *test and slaughter*, pemakaian vaksin *Brucella abortus* S19 dan belum optimalnya keikutsertaan petani dalam penanggulangan menjadi penyebab sulitnya melakukan pemberantasan dan pengendalian Brucellosis pada sapi perah ( Noor, 2006). Kejadian Brucellosis cenderung semakin meningkat baik dari segi jumlah (tingkat prevalensi) maupun dalam penyebarannya (distribusi), hal ini terjadi karena mutasi (perpindahan) ternak, sehingga sangat mengancam pertumbuhan peternakan khususnya sapi perah (Dispet Jatim, 2009).

Pengobatan penyakit Brucellosis tidak efektif karena bakteri penyebabnya bersifat fakultatif intraseluler, sehingga penanggulangan Brucellosis pada sapi perah selama ini dilakukan dengan vaksinasi dan *test and slaughter* ( Noor, 2006). Namun demikian pelaksanaan *test and slaughter* belum dilakukan secara optimal karena terkendali oleh dana sehingga biaya kompensasi tidak dapat dilakukan oleh pemerintah.

Vaksinasi dilakukan sebagai upaya pencegahan terhadap penyakit Brucellosis, beberapa vaksin yang telah digunakan di Indonesia adalah vaksin aktif berupa *whole* bakteri *Brucella abortus* strain 19 dan RB 51. Vaksin *Brucella abortus* RB 51 mempunyai tingkat proteksi yang tidak jauh berbeda dengan *Brucella abortus* strain 19. Penggunaan vaksin *Brucella abortus* strain 19 dan RB 51 direkomendasi karena tidak menimbulkan reaksi post

vaksinasi (Noor, 2006), tetapi karena berasal dari *whole* bakteri maka kemungkinan adanya mutasi bakteri dan berubah menjadi patogen kemungkinan dapat terjadi. Evaluasi di lapangan menunjukkan bahwa penggunaan vaksin *Brucella abortus* strain 19 dan RB 51 belum memberikan hasil yang optimal, hal ini terbukti masih banyak ditemukan adanya kasus Brucellosis di peternakan sapi perah (Dispet Jatim, 2009).

Menurut Quinn *et al.*, (2002) OMP bakteri *Brucella abortus* merupakan salah satu antigen potensial yang dapat secara langsung menginduksi respon imun spesifik humoral yaitu sel limfosit B sehingga lebih cepat memacu terbentuknya antibodi (Jawetz *et al.*, 2001; Forestier *et al.*, 2005). Cha *et al.*, (2010), mengatakan bahwa hasil vaksinasi menggunakan protein *outer membrane* (OMP) memberikan imunitas yang lebih baik dibandingkan dengan menggunakan *whole* bakteri. Penggunaan isolat lokal sebagai bahan vaksin akan memberikan proteksi yang tinggi karena sama dengan bakteri penyebab penyakitnya, tetapi karena bersifat patogen maka akan menyebabkan reaksi post vaksinasi sehingga penggunaan isolat lokal sebaiknya bukan berupa *whole* bakteri tetapi bagian komponen sel nya supaya tidak menyebabkan reaksi post vaksinasi. Sampai saat ini penggunaan OMP bakteri sebagai bahan pembuatan vaksin sedang dikembangkan. Tubuh host yang di vaksinasi akan menimbulkan respon imun baik respon *innate* maupun *adaptive* untuk mendapat imunitas berupa pencegahan terhadap infeksi *Brucella abortus*.

Berdasarkan latar belakang di atas maka perlu dilakukan penelitian penggunaan OMP *Brucella abortus* isolat lokal Indonesia sebagai model vaksin bakterial, yang nantinya diharapkan dapat menghasilkan respon imun yang lebih baik berupa titer Ig G yang lebih tinggi dibandingkan dengan vaksin menggunakan *whole* bakteri *Brucella abortus* strain 19 sehingga pencegahan penyakit Brucellosis di Indonesia dapat berhasil optimal.

### 1.1. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka timbul permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimana karakter bakteri *Brucella abortus* isolat lokal?
2. Bagaimana karakter OMP *Brucella abortus* isolat lokal?
3. Berapa berat molekul OMP *Brucella abortus* isolat lokal yang bersifat imunogenik?
4. Berapa besar kadar Ig G yang dihasilkan hasil vaksinasi OMP *Brucella abortus* isolat lokal yang bersifat imunogenik pada kelinci?
5. Apakah terdapat perbedaan kadar IgG hasil vaksinasi antara OMP *Brucella abortus* isolat lokal dan *whole* bakteri *Brucella abortus* S19 pada kelinci pada minggu pertama, minggu kedua, minggu ketiga dan minggu keempat?

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Penyakit Brucellosis

Brucellosis merupakan penyakit infeksius pada ternak yang disebabkan oleh bakteri genus *Brucella* dan dikategorikan oleh *Office International des Epizooties (OIE)* sebagai penyakit zoonosis (Alton *et al.*, 1988).

Di Indonesia, penyakit Brucellosis dikenal pertama kali pada tahun 1935 secara serologis ditemukan pada sapi di daerah Grati, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur, sedangkan bakteri penyebabnya yaitu *Brucella abortus* berhasil diisolasi pada tahun 1938 (Putra, 2001). Penyakit Brucellosis bersifat endemis di Indonesia, kadang-kadang muncul sebagai epidemi pada banyak peternakan sapi perah di Jakarta, Bandung, Jawa Tengah dan Jawa Timur dan secara serologis kejadian Brucellosis telah diketahui terdapat diseluruh propinsi di wilayah Indonesia kecuali Bali dan Lombok.

Pada manusia, spesies *Brucella* yang patogen adalah *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* dan *Brucella canis* dan menyebabkan meningitis, endokarditis, spondylitis dan arthritis (Al-Attas *et al.*, 2000). Kejadian Brucellosis pada manusia di Indonesia belum pernah dilaporkan, hal ini disebabkan kurangnya publikasi sehingga sebagian besar masyarakat tidak mengetahui jika Brucellosis dapat menular ke manusia. Tingginya angka prevalensi Brucellosis pada ternak di Indonesia yang mencapai 40 % (BBalitvet, 2010) dan menyebar hampir diseluruh Indonesia, sehingga memungkinkan untuk terjadinya penularan Brucellosis dari hewan ke manusia.

### 2.2. Pathogenesis Brucellosis

Penularan Brucellosis pada hewan dapat terjadi secara inhalasi, per oral atau secara kongenital dari pejantan ke induk melalui perkawinan alam (Merchant & Packer, 1971).

Bakteri *Brucella* yang masuk kedalam tubuh host, akan ditangkap oleh sel makrofag sebagai sel fagosit dan dapat terhindar dari proses fagositosis selanjutnya mengadakan penetrasi melalui epitel mukosa menuju ke lymphoglandula regional. Penyebaran dan multiplikasi *Brucella* dapat terjadi dalam lymphoglandula, limpa, hati, sumsum tulang, glandula mammae dan organ kelamin melalui makrofag (Ahmed *et al.*, 2010). Pada plasenta sapi, domba, kambing dan babi terdapat senyawa erythritol yaitu suatu alkohol polihidril dalam konsentrasi tinggi yang berperan sebagai faktor pertumbuhan bakteri *Brucella*. Faktor pertumbuhan ini juga terdapat pada glandula mammae dan epididymis yang merupakan target organ bakteri *Brucella* (Quinn, *et al.*, 2002).

Pada hewan betina yang terserang *Brucellosis* biasanya menunjukkan gejala yang asimtomatik, sedangkan pada hewan bunting menyebabkan plasentitis, metritis yang mengakibatkan keguguran (abortus) pada masa kebuntingan 5 bulan sampai 9 bulan. *Brucella* banyak diekskresikan dalam cairan fetus, plasenta dan leleran vagina selama 2 sampai 4 minggu setelah abortus atau setelah beranak (Quinn *et al.*, 2002). *Brucella* dapat diekskresikan melalui susu dalam beberapa tahun bahkan bisa persisten seumur hidup. Akibat dari infeksi *Brucella* pada kelenjar susu menyebabkan produksi susu menurun (Quinn *et al.*, 2002; OIE, 2004).

Pada sapi jantan *Brucellosis* dapat menyerang vesicula seminalis, testis dan epididymis (Hardjopranto, 1995). Infeksi *Brucella* pada sapi jantan menyebabkan *epididymitis*, *orchitis* yang nekrotis kemudian diikuti dengan degenerasi testis sehingga terjadi kemajiran dan mempengaruhi kualitas semen. Di negara tropis penyakit *Brucellosis* bersifat endemis pada sekelompok ternak dan sering dijumpai adanya hygroma pada persendian kaki (Hardjopranto, 1995; Quinn, *et al.*, 2002).

*Brucellosis* merupakan penyakit infeksi yang bersifat zoonosis, penularan *Brucellosis* pada manusia dapat terjadi : (1) melalui aerosol, kontaminasi kulit yang luka dengan jaringan,

darah, urin, fetus yang diabortuskan atau plasenta dan cairan yang keluar dari vagina sapi penderita, (2) melalui makanan (*Food borne infection*) yang berasal dari susu yang tidak dipasteurisasi atau hasil olahan susu (mentega dan keju), daging mentah (Asif *et al.*, 2009). Penularan Brucellosis paling sering ditemukan di daerah pedesaan dan merupakan penyakit yang berhubungan dengan pekerjaan yaitu terjadi pada pekerja rumah potong hewan, peternak, pekerja laboratorium mikrobiologi juga dapat terekspos secara aerosol waktu memproses specimen. Dokter hewan biasanya dapat tertular ketika melakukan vaksinasi dengan vaksin *Brucella abortus* dan *Brucella melitensis*. Gejala klinis Brucellosis pada manusia adalah demam *undulant* yang intermiten, sakit pada otot dan persendian yang sering diikuti komplikasi dengan osteomielitis (Quinn, *et al.*, 2002).

### 2.3. Pencegahan dan Pemberantasan Brucellosis

Brucellosis merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh bakteri genus *Brucella*, bakteri ini bersifat fakultatif intraseluler yaitu bakteri yang mampu hidup dan berkembang biak dalam sel fagosit (Quinn, *et al.*, 2002).

Menurut Noor (2006) penanggulangan kejadian Brucellosis pada sapi perah di Indonesia selama ini dilakukan dengan vaksinasi dan atau *test and slaughter*. Tetapi karena pelaksanaan *test and slaughter* membutuhkan biaya kompensasi yang sangat tinggi maka pengendalian terhadap penyakit Brucellosis terutama dilakukan melalui program vaksinasi. Seperti pendapat Samkhan dkk., (2012) bahwa dana kompensasi daerah perlu dihidupkembangkan lagi, agar ternak-ternak yang positif sebagai reaktor Brucellosis segera dapat dilakukan eliminasi dengan dipotong bersyarat, supaya tidak tidak menyisakan kasus positif di suatu lokasi serta diperlukan pengadaan vaksinasi Brucellosis terutama pada kantong-kantong ternak sapi perah.

Vaksinasi terhadap Brucellosis yang dilakukan selama ini menggunakan vaksin hidup *Brucella abortus* Strain 19 (*Brucella abortus* S 19). Tujuan pemberian vaksinasi adalah untuk

mendapatkan respon imun, baik respon imun seluler maupun humoral sehingga diperoleh imunitas berupa pencegahan terhadap infeksi *Brucella abortus*. Penggunaan vaksin hidup *Brucella abortus* Strain 19 yang merupakan strain tidak patogen mempunyai kelebihan karena tidak terjadi reaksi post vaksinasi (Noor, 2006), tetapi tingkat proteksinya masih jauh dari yang diharapkan yaitu sekitar 65% (Dirkeswan, 2012).

Hasil evaluasi di lapangan menunjukkan masih banyak ditemukan adanya kasus Brucellosis yang masih tinggi pada peternakan sapi perah di Indonesia, hal ini sesuai hasil surveilence bahwa prevalensi Brucellosis di Indonesia pada daerah endemik masih lebih tinggi dari 2% (Samkhan dkk., 2012). Belum optimalnya hasil yang dicapai diduga disebabkan oleh pertama, vaksin *Brucella abortus* Strain 19 yang selama ini digunakan bukan spesifik protein tertentu yang terkandung dalam bakteri *Brucella abortus* yang bersifat antigenik, sehingga diduga kurang mempunyai kemampuan secara langsung dalam menginduksi respon imun (kurang imunogenik), kedua dikarenakan strain tersebut bukan strain *Brucella* yang menjadi penyebab penyakit Brucellosis di Indonesia.

Menurut Samkhan dkk., (2012) kejadian Brucellosis di Jawa Timur menunjukkan angka prevalensi > 2% dan secara random ditemukan di wilayah Blitar, Kediri, Tulungagung, Malang, Pasuruan dan Jember, sehingga untuk pencegahan dan pemberantasannya sebaiknya menggunakan vaksinasi dan *test and slaughter*.

#### 2.4 Outer Membrane Protein *Brucella abortus*

*Outer membrane* protein (OMP) *Brucella abortus* pertama kali berhasil diidentifikasi dan dikelompokkan berdasarkan berat molekulnya pada tahun 1980 dengan mengelompokkan dalam 3 kelompok yaitu grup 1 yang mempunyai berat molekul 88 sampai 94 kDa, grup 2 berat molekul antara 36 sampai 38 kDa dan grup 3 berat molekul antara 25 sampai 27 kDa (Moriyon and Lopez-Goni, 1998). Menurut Macedo *et. al.*, (2011) *Brucella abortus* mempunyai faktor virulensi berupa lipopolysakharida (LPS) dan *outer membrane*

protein (OMP). OMP bakteri Gram negatif bersifat imunogenik sehingga dapat digunakan sebagai pengembangan vaksin (Munir *et. al.*, 2010).

OMP merupakan protein yang terdapat pada bagian membran luar dan dapat dipisahkan dari membran sel dengan penambahan suatu detergent seperti Sodium lauryl sarcocinate (sarcosyl) 1%. OMP *Brucella abortus* merupakan salah satu antigen potensial yang dapat secara langsung menginduksi respon imun spesifik humoral yaitu sel limfosit B sehingga lebih cepat memacu terbentuknya antibodi (Forestier *et. al.*, 2005).

## BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### 3.1 Tujuan Umum

Mengetahui respon imun berupa besar kadar IgG pada kelinci yang divaksinasi dengan *whole* bakteri *Brucella abortus* S19 dan *Outer Membrane Protein* (OMP) *Brucella abortus* isolat lokal.

### 3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui karakter bakteri *Brucella abortus* isolat lokal
2. Melakukan isolasi dan karakterisasi OMP *Brucella abortus* isolat lokal.
3. Menentukan kadar IgG hasil vaksinasi dengan *whole* bakteri *Brucella abortus* S19 dan OMP *Brucella abortus* isolat lokal pada kelinci.
4. Mengetahui perbedaan kadar IgG hasil vaksinasi antara *whole* bakteri *Brucella abortus* S19 dengan OMP *Brucella abortus* isolat lokal pada minggu pertama, minggu kedua, minggu ketiga dan minggu keempat pada kelinci.

### 3.3 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui potensi bakteri *Brucella abortus* isolat lokal dalam menghasilkan kadar IgG sehingga dapat digunakan untuk pengembangan vaksin Brucellosis yang berbasis protein.

## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian (Tahun Kedua)

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya. Waktu penelitian mulai bulan April sampai September 2015.

### 4.2 Bahan Penelitian

Sebagai bahan pemeriksaan berupa isolat bakteri *Brucella abortus* yang berasal dari sapi penderita Brucellosis yang menunjukkan uji RBT positif di wilayah kerja Kabupaten Blitar Jawa Timur dan *Brucella abortus* S19 berasal dari antigen Brucella Pusvetma (hasil penelitian tahun pertama). Kelinci lokal warna putih, mata merah, jantan, umur 8 minggu dengan berat badan lebih kurang 1.300 – 1.500 gram.

Bahan penelitian yang lain berupa media perbenihan yaitu Brucella Broth, Brucella Medium Base, Brucella Selective Supplement, Serum kuda, antigen Rose Bengal Test, reagen uji untuk identifikasi Brucella, DNazol, ethanol 75%, ethanol absolut, reagen untuk PCR, reagen dan bahan kimia untuk SDS-Page, Marker protein, membrane Nitrocellulose, Freund Complete Adjuvant, Freund Incomplete Adjuvant dan konjugat Anti Rabbit IgG.

### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian tahun kedua bertujuan untuk mendapatkan bahan protein subunit dengan melakukan karakterisasi *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* isolat lokal dengan metode Western Blot, kemudian dilanjutkan dengan penelitian kuantitatif berupa uji imunogenitas dengan menggunakan hewan coba kelinci untuk mengetahui besar konsentrasi antibodi (IgG) yang dihasilkan.

#### 4.4 Tahapan penelitian meliputi sebagai berikut:

##### 4.4.1. Isolasi Protein Outer Membrane Protein (OMP) *Brucella abortus* isolat lokal

Pemisahan membran luar protein *B. abortus* dengan teknik sonikasi merupakan tahap awal untuk mengisolasi Outer Membrane Protein (OMP) *Brucella abortus* dari koloni dibuat suspsi dengan penambahan Phosphat Buffer Saline (PBS), kemudian diinkubasi 37° C dalam shaker incubator selama 3 hari. Suspensi kuman disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C (*refrigerated centrifuge*). Endapan (*pellet*) diresuspensi/dicuci dengan PBS kemudian disentrifus 2.000 rpm selama 10 menit. Pencucian ini dilakukan 3 kali. Pellet dilarutkan dengan 1-5 ml PBS, kemudian disonikasi dengan Ultrasonic homogenizer pada ferkuensi 25 Hz selama 15 x 1 menit dengan interval waktu 1 menit. Setelah sonikasi dilanjutkan dengan sentrifugasi. Sentrifugasi dengan *refrigerated centrifuge* dengan kecepatan 20.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C. Supernatan diambil dan dilakukan ultra sentrifugasi dengan kecepatan 20.000 rpm selama 20 menit sehingga diperoleh *pellet*. Pellet dilarutkan dalam 2 ml 2% Triton X-100 atau 2 ml sarcosyl 1% ditambah PBS sama banyak dan diinkubasi 37° C selama 20 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan 20.000 rpm selama 20 menit pada 4° C. Pellet hasil sentrifugasi diresuspensi dengan PBS, suspensi ini berisi protein membran luar (OMP) disimpan dalam tabung Eppendorf pada suhu -20° C (Khatun *et al.*, 2009).

##### 4.4.2. Analisis OMP *Brucella abortus* dengan Tehnik SDS- PAGE

Analisis ini bertujuan untuk melihat pola berat molekul dari OMP *B. abortus*. Metode pengujian dengan tehnik SDS-PAGE merupakan standard metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur subunit dan kemurnian. Tahapan pelaksanaan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide*) dengan kadar gel 15% meliputi pembuatan *Stacking gel*, *Separating gel*, *Running gel* dan *Stainning*. Pada *running* dengan elektroforesis digunakan arus listrik 125 V kekuatan 25 mA. Pada elektroforesis diperoleh hasil gambaran protein

berupa pita (*band*) yang mempunyai berat molekul tertentu dan setara dengan *marker* dipotong kemudian dilakukan *elusi* protein, maka akan didapat protein yang mempunyai berat molekul sesuai dengan yang dikehendaki, setelah itu dilakukan proses *immunoblotting*. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan *band* protein dimaksud dengan standar yaitu marker protein (*Color Burst™ Electrophoresis Markers*, No. C.4105).

#### 4.4.3. Purifikasi protein hasil SDS-PAGE pada OMP *Brucella abortus* isolat lokal.

Gel hasil analisis SDS-PAGE (gel acrilamide) yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong selofan dan direndam dengan 0,2 mM fosfat buffer sebanyak 1-2 ml. Kemudian dimasukkan dalam chamber elektroelusi yang mengandung fosfat buffer 0,1 mM. Selanjutnya dilakukan elektroelusi di dalam cool chamber 40° C (dalam refrigerator), power supply dinyalakan dengan kekuatan 220 V, 20 mA selama semalam. Protein yang sudah terelusi dapat ditentukan dengan cara mewarnai potongan gel acrilamide dengan pewarnaan commasie blue selama 20 menit. Kemudian ditambahkan destaining, bila tidak terdapat pita berarti protein sudah terelusi. Selanjutnya cairan yang mengandung protein yang terdapat dalam kantong selofan dikeluarkan kemudian dipresipitasi dan dipurifikasi dengan ethanol absolut 1:1 untuk mendapatkan protein yang dimaksud.

#### 4.4.4. Perlakuan pada hewan coba kelinci

Sebanyak 30 ekor kelinci secara acak dikelompokkan dalam 3 perlakuan yaitu:

P0 adalah kelompok kelinci kontrol disuntik dengan Na Cl fisiologis

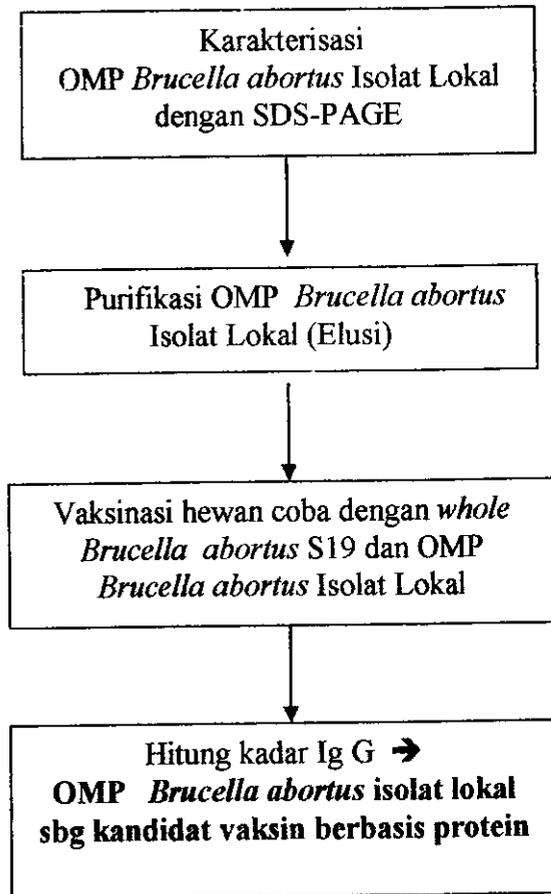
P1 adalah kelompok kelinci yang divaksin dengan *whole* bakteri *Brucella abortus* S19, dosis yang diberikan  $1,0 \times 10^8$  per ml sebanyak 0,5 ml per ekor secara subcutan.

P2 adalah kelompok kelinci yang divaksin dengan OMP *Brucella abortus* isolat lokal, dosis yang diberikan 100 µl/ml sebanyak 0,5 ml per ekor secara subcutan.

Pemberian vaksin dengan menambahkan Freund adjuvant (CFA dan IFA), vaksinasi dilakukan dengan booster sebanyak dua kali dengan interval waktu selama 2 minggu dan pemeriksaan kadar immunoglobulin G dilakukan setiap minggu setelah booster terakhir sampai pada minggu keempat (4). Sebelum diberikan perlakuan, hewan coba diadaptasikan selama 1 minggu dengan pemberian makanan *ad libitum*.

Pengamatan yang dilakukan adalah mengukur kadar IgG (antibodi) hasil vaksinasi pada masing-masing perlakuan yaitu P0, P1 dan P2 dengan menggunakan Rat Brucellosis Ab IgG ELISA KIT nomor katalog MBS733295.

#### 4.5 Kerangka Operasional Penelitian (Tahun kedua) :



## BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil penelitian Tahun Pertama

#### 1. Karakterisasi bakteri *Brucella abortus* S19 dan *Brucella abortus* Isolat Lokal

Hasil isolasi dari bahan pemeriksaan berupa organ limfoglandula mammae sapi yang menunjukkan uji Rose bengal positif didapatkan koloni *Brucella* dengan ciri-ciri warna putih kekuningan seperti madu dengan diameter 1-2 mm dan tumbuh dalam waktu agak lambat (gambar 5.1) seperti yang dilaporkan oleh Quinn *et al.*, (2002) , kemudian isolat *Brucella abortus* dilakukan identifikasi dengan hasil identifikasi sebagai berikut :

Pemeriksaan Mikroskopis dengan pewarnaan Gram menunjukkan bakteri berwarna merah, bentuk *coccobacil* bergerombol dan bersifat Gram negatif (gambar 2) sesuai dengan kriteria morfologi yang dilaporkan oleh Alton *et. al.*,(1998) dan *Office International des Epizooties* (OIE) tahun 2004.



Gambar 5.1. Koloni *Brucella* pada Media *Brucella* Agar



Gambar 5.2. *Brucella abortus* pada Pewarnaan Gram

Identifikasi koloni yang tumbuh pada media *Brucella* Agar dilanjutkan dengan melakukan serangkaian uji biokimia yang meliputi uji katalase dengan menggunakan larutan  $H_2O_2$  3%,

uji H<sub>2</sub>S menggunakan larutan lead asetat 10%, uji urease menggunakan media urease dan uji oksidase menggunakan kertas saring yang mengandung *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride*. Hasil uji biokimia pada uji katalase dengan menggunakan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, terlihat adanya gelembung udara, hal ini menunjukkan uji katalase positif sehingga diartikan bahwa bakteri yang diuji mempunyai enzim katalase yang dapat mengurai H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub>. Pada uji urease terlihat bahwa setelah diinkubasi pada suhu 37<sup>o</sup>C selama semalam bakteri mampu merubah warna media menjadi merah muda, sehingga pada uji urease menunjukkan urease positif (Gambar 3), selanjutnya pada uji oksidase bakteri yang diuji menunjukkan adanya perubahan warna kertas saring menjadi biru setelah pemberian *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride* (Gambar 4).



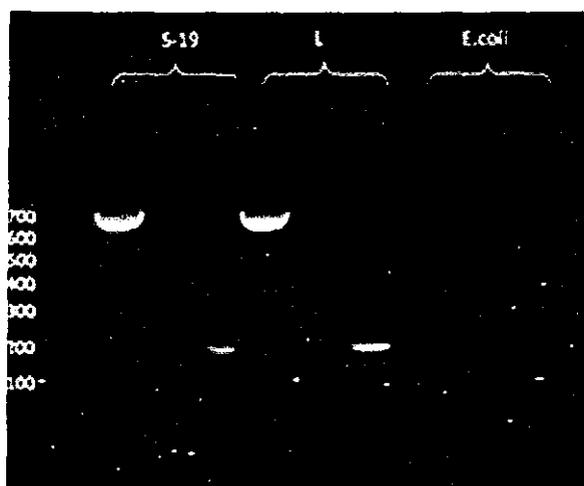
Gambar 5.3. Uji Urease positif



Gambar 5.4. Uji Oksidase positif

Pada uji H<sub>2</sub>S dengan menggunakan larutan lead acetat (Pb acetat) 10%, *Brucella abortus* menunjukkan hasil yang positif dengan ditandai adanya media yang berwarna hitam karena menghasilkan PbS yang berwarna hitam.

Hasil konfirmasi koloni yang tumbuh pada media Brucella Agar dengan PCR yang menggunakan primer BMEI 1435f dan BMEI 1436r serta JPF-f dan JPF (ab)-r dapat dilihat pada Gambar 5.5.



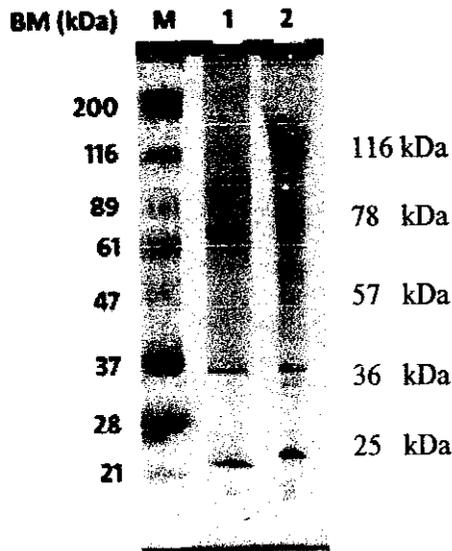
Gambar 5.5. Hasil PCR *Brucella abortus* Isolat lokal dengan primer BMEI 1435 dan JPF.

Keterangan: S19 *Brucella abortus* S19 sebagai kontrol positif  
 L *Brucella abortus* isolat lokal  
 E. coli sebagai kontrol negatif

Hasil PCR menunjukkan bahwa isolat bakteri *Brucella abortus* menggunakan primer BMEI 1435f sebagai *forward* dan primer BMEI 1436r sebagai *reverse* mampu menghasilkan gen *Brucella abortus* dengan panjang 794 bp, sedangkan dengan menggunakan primer JPF-f sebagai primer *forward* dan primer JPF (ab)-r sebagai *reverse* mampu menghasilkan gen omp *Brucella abortus* dengan panjang 186 bp, sehingga untuk mengkonfirmasi bahwa isolat yang berhasil diidentifikasi adalah *Brucella abortus*.

## 2. Karakterisasi OMP *Brucella abortus* Isolat Lokal

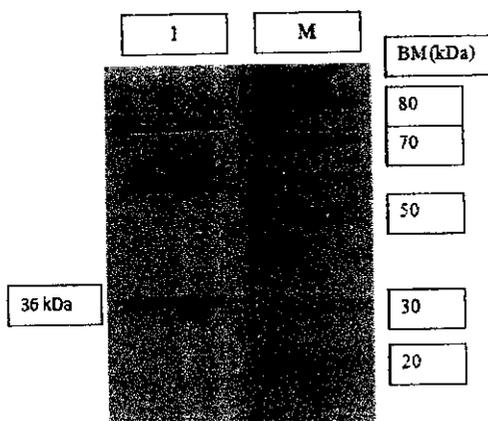
Hasil separasi protein OMP *B. abortus* isolat lokal dengan Metode SDS-PAGE didapatkan pita yang terukur dengan membandingkan dengan ukuran berat molekul pada marker (Intron™ Biotechnology Electroforesis Marker). Pada pembacaan elektroforesis dengan menggunakan sinar ultra violet didapatkan beberapa pita protein dengan ukuran berat molekul 25 kDa, 36 kDa, 57 kDa, 78 kDa dan 116 kDa pada isolat lokal.



Gambar 5.6. Hasil Analisis OMP dengan SDS-PAGE  
 Kolom 1           Marker protein  
 Kolom 2           *Brucella abortus* S19  
 Kolom 3           *Brucella abortus* Isolat Lokal

### 3. OMP *Brucella abortus* Isolat Lokal bersifat Imunogenik

Untuk mengetahui sifat imunogenik OMP *Brucella abortus* Isolat Lokal dilakukan uji Western Blot berdasarkan reaktivitasnya terhadap antibodi (Khatun *et. al.*, 2009). Perhitungan berat molekul dengan membandingkan hasil elektroforesis fraksi protein dengan marker protein. Hasil Western Blot menunjukkan adanya protein yang dikenali oleh antibodinya yang jelas terlihat pada pita dengan berat molekul 36 kDa.



Gambar 5.7. Hasil Uji Western Blot menggunakan antibodi poliklonal  
 M           Marker Protein  
 1           *Brucella abortus* Isolat Lokal

### **Hasil Penelitian Pada Tahun Kedua:**

Pada penelitian tahun kedua target yang diharapkan adalah mengetahui kadar IgG hasil vaksinasi pada masing-masing perlakuan yaitu P0 sebagai kelompok kontrol kelinci disuntik dengan menggunakan NaCl fisiologis, P1 dengan *whole* bakteri *Brucella abortus* S19 dan P2 dengan OMP *Brucella abortus* isolat lokal.

### **Elusi OMP *Brucella abortus* Isolat lokal**

Hasil isolasi dan karakterisasi OMP *Brucella abortus* Isolat lokal dengan metode SDS-PAGE 15% menunjukkan adanya band (pita) berdasarkan berat molekulnya. Kemudian hasil gel SDS-PAGE yang telah diwarnai dengan larutan *Commassie Blue* dipotong sepanjang pita. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong selofan dan direndam dengan 0,2 mM fosfat buffer sebanyak 1-2 ml. Selanjutnya dimasukkan dalam Chamber Elektroelusi yang mengandung fosfat buffer 0,1 mM dan dilakukan elektroelusi di dalam cool chamber 40° C (dalam refrigerator), power supply dinyalakan dengan kekuatan 220 V, 20 mA selama semalam. Protein yang sudah terelusi dapat ditentukan dengan cara mewarnai potongan gel acrilamide dengan pewarnaan *commassie blue* selama 20 menit. Kemudian ditambahkan destaining, bila tidak terdapat pita berarti protein sudah terelusi. Selanjutnya cairan yang mengandung protein yang terdapat dalam kantong selofan dikeluarkan kemudian dipresipitasi dan dipurifikasi dengan ethanol absolut 1:1 untuk mendapatkan protein yang dimaksud dan disimpan pada suhu - 20°C.

### **Penentuan kadar protein dilakukan dengan NanoDrop N-1000 Spectrofotometer.**

Hasil penentuan kadar protein OMP *Brucella abortus* isolat lokal, diperoleh kadar OMP pada elusi 1 sebesar 0,180 mg/mL, elusi 2 sebesar 0,202 mg/mL, elusi 3 sebesar 0,205 mg/mL, dan elusi 4 sebesar 0,205 mg/mL dan elusi 5 sebesar 0,180 mg/mL.

Hasil elusi OMP *Brucella abortus* isolat lokal selanjutnya digunakan untuk bahan vaksin untuk perlakuan kelinci P2.

#### 4. Hasil Perhitungan Kadar IgG setelah Vaksinasi

Hasil rerata perhitungan kadar IgG pada kelinci yang divaksinasi dengan *whole* bakteri *Brucella abortus* S19 dan OMP *Brucella abortus* isolat lokal dapat dilihat pada tabel 5.1 selengkapnya pada lampiran2.

**Tabel 5.1 Rerata dan Standar deviasi Kadar IgG Hasil Vaksinasi ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )**

Perlakuan	Minggu 1	Minggu 2	Minggu 3	Minggu 4
P0	$5.46^a \pm 0.33$	$5.71^a \pm 0.56$	$5.73^a \pm 0.56$	$5.86^a \pm 0.49$
P1	$14.20^b \pm 0.64$	$14.75^b \pm 0.77$	$15.51^b \pm 0.57$	$16.36^b \pm 0.46$
P2	$15.43^c \pm 0.50$	$16.30^c \pm 0.50$	$16.95^c \pm 0.67$	$18.90^c \pm 0.46$

Keterangan P0 Kontrol (Na Cl fisiologis)

P1 *Whole B. abortus* S19

P2 OMP *B. abortus* isolat lokal

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ( $p < 0.05$ )

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara rerata kadar IgG pada perlakuan P0, P1 dan P2 ( $p < 0.05$ ). Pada perlakuan P2 yang mendapat vaksinasi dengan OMP *B. abortus* isolat lokal menunjukkan kadar IgG yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok P1 yang mendapat vaksinasi dengan *whole B. abortus* S19.

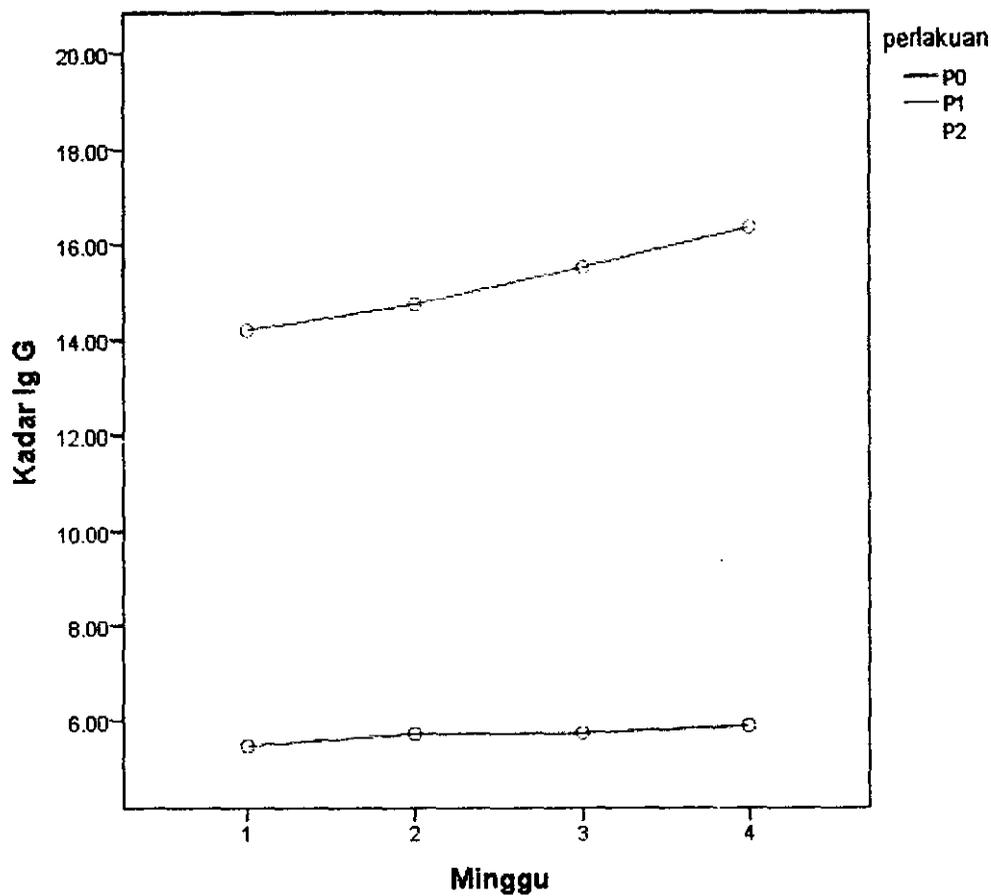
Hasil analisis statistik dengan multivariate menunjukkan adanya perbedaan yang nyata diantara masing-masing perlakuan pada minggu pertama, minggu kedua, minggu ketiga dan minggu keempat, untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada lampiran 2.

Hasil analisis Hotelling's menunjukkan ada perbedaan yang signifikan antara kadar IgG pada masing-masing perlakuan kontrol, *whole B. abortus* S19 dan OMP *B. abortus* isolat lokal ( $p < 0.05$ ). Pada kelompok kontrol yang hanya mendapat vaksinasi dengan larutan Na Cl fisiologis menunjukkan rata-rata kadar IgG yang lebih rendah dibandingkan dengan pemberian vaksin baik dengan *whole B. abortus* S19 maupun OMP *B. abortus* isolat lokal, hal ini karena pada pemberian Na Cl fisiologis bukan merupakan suatu bahan yang bersifat antigenik sehingga tidak menimbulkan respon antibodi di dalam tubuh. Pada pemberian OMP *B. abortus* isolat

lokal menunjukkan hasil kadar IgG yang lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian *whole B. abortus* S19, hal ini karena protein OMP pada *B. abortus* isolat lokal mampu memicu respon antibodi yang lebih baik. Seperti yang dilaporkan oleh Munir *et. al.*, (2010) bahwa protein yang berasal dari membran luar (OMP) *B. abortus* bersifat imunogenik karena mampu menghasilkan respon imun yang tinggi. Demikian juga menurut Siadat *et. al.*, (2010) bahwa penggunaan OMP *B. abortus* S99 sebagai vaksin subunit menghasilkan titer IgG yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberikan *whole B. abortus* S19. Sedangkan Ko and Spliter (2003) melaporkan bahwa pemberian vaksin berupa protein *B. abortus* dapat memberikan respon imun untuk melindungi terhadap penyakit Brucellosis.

Pemberian OMP *B. abortus* isolat lokal memicu respon imun dengan hasil IgG yang lebih tinggi diduga karena adanya perbedaan epitop yang bertanggung jawab pada virulensi terhadap Brucellosis antara *B. abortus* isolat lokal dengan *B. abortus* S19.

Perbedaan kadar IgG hasil vaksinasi pada masing-masing perlakuan untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Profil Plot Gambar 5.2



Gambar 5.8 Profil Plot Kadar IgG perlakuan P0, P1 dan P2 pada Minggu 1 sampai 4

Keterangan : P0 Kontrol (Na Cl fisiologis)  
 P1 *Whole B. abortus* S19  
 P2 OMP *B. abortus* isolat lokal

## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

1. *Brucella abortus* isolat lokal mempunyai karakter bentuk batang pendek (kokobasil), Gram negatif, uji katalase positif, uji citrat positif, uji urease positif, uji oksidase positif dan membentuk gas H<sub>2</sub>S.
2. *Outer Membrane Protein* (OMP) dapat diisolasi dari *Brucella abortus* isolat lokal dengan berat molekul antara 25 – 116 kDa yaitu 25, 36, 57, 78, dan 116 kDa.
3. Pada Western Blot OMP *Brucella abortus* isolat lokal yang bersifat imunogenik ditunjukkan oleh OMP 36 kDa.
4. Kadar IgG hasil vaksinasi dengan *whole B. abortus* S19 pada minggu pertama sampai minggu keempat berturut-turut 14.20 µg, 14.75 µg, 15.51 µg dan 16.36 µg, sedangkan hasil vaksinasi dengan OMP *B. abortus* isolat lokal 15.43 µg, 16.30 µg, 16.95 µg dan 18.90 µg,
5. Pemberian vaksinasi dengan OMP *B. abortus* isolat lokal memberikan hasil kadar IgG yang lebih tinggi dibandingkan dengan *whole B. abortus* S19.

### Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui potensi *B. abortus* isolat lokal guna pengembangan pembuatan vaksin Brucellosis pada hewan.
2. Terbatasnya prasarana laboratorium menyebabkan penelitian tidak dapat dilakukan pada satu tempat sehingga tidak efisien

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K. and A.H. Lichtman. 2004. *Basic Immunology : Functions and Disorders of The Immune System*. 2<sup>nd</sup> Ed. Saunders Elsevier Inc. Philadelphia.
- Al-Attas, R.A., M. Al-Khalifa and A.R. Al-Qurashi. 2000. Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human Brucellosis. *Ann. Saudi Med.*, 20: 224-228.
- Alton, G.G., L. M. Jones, R.D. Angus and J.M. Verger, 1988. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. INRA., Paris, France.
- Asif, M., A.R. Awan, M.E. Babar, Ahmad Ali, S. Firyal and Q. M. Khan. 2009. Development of Genetic Marker for Molecular detection of *Brucella abortus*. *Pakistan J. Zool. Suppl. Ser.* 9 : 267-271.
- Balai Besar Penelitian Veteriner (BBalitvet). 2010. *Syarat Kesehatan Hewan Sapi Perah Ditinjau dari Penyakit Bakteri*. Bogor.
- Dinas Peternakan Provinsi Jawa Timur, 2009. *Penyakit Keluron Menular (Brucellosis)*. Dispet Provinsi Jatim, Surabaya.
- Enright, F. M. 1990. The Pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In Nielsen and Duncan : *Animal Brucellosis*. CRC Press, Boston. 301 – 320.
- Hardjopranto, S., 1995. *Ilmu Kemajiran pada Ternak*. Airlangga University Press.
- Jawetz, E., J.L. Melnick and E.A. Adelberg, 2002. *Mikrobiologi untuk Profesi Kedokteran*. ECG. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Khatun, M.M., M.A. Islam, B.K. Baek and S.I. Lee, 2009. Cellular and Humoral Immune Responses and Antigen Recognition in Sprague-Dawley Rats Experimentally Infected with *Brucella abortus* Biotype I. *Asian J. of Animal and Vet. Advances*. 4(6): 267-277.
- Macedo G.C., D.M. Magnani, N.B. Carvalho and O.B. Romero. 2011. Central Role of MyD88-Dependent Dendritic Cell Maturation and Proinflammatory Cytokine Production to Control *Brucella abortus* Infection. *Journal Immunology*. Vol. 180 . Pp. 1080-1087.
- Mariyon, I., I.L. Goni, 1998. Structure and Properties of the Outer Membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Internatl. Microbiol. J.* Vol. 1, p 19-26.
- Merchant, I.A. and R. A. Packer. 1971. *Veterinary Bacteriology and Virology*. 7<sup>th</sup> Ed 3<sup>rd</sup> printing. The Iowa State University Press, Ames, Iowa. USA.
- Office de International Epizooties (OIE), 2004. *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccine for Terrestrial Animals*. References Laboratories for Bovine Brucellosis. [www.unau.es/microbial/Brucellosis 2003 proceeding.pdf](http://www.unau.es/microbial/Brucellosis%202003%20proceeding.pdf).

Office de International Epizooties (OIE), 2009. **Bovine Brucellosis. OIE Terrestrial Manual** 2009. Pp 1-3.

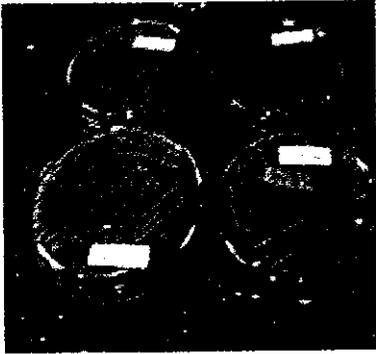
Quinn,P.J., B.K.Markey, M.E Carter, W.J.Donnely and F.C.Leonar. 2002. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease.** Blackwell Publishing. Great Britain.

Rantam, F., A. 2003. **Metode Immunologi.** Airlangga University Press. Surabaya. Hal 3 – 11.

Samkhan, D.H. Susanta, R. Ikaratri, Sri Niati, Tri Parmini dan M.F. Isnaini. 2012. **Survei Seroepidemiologi Brucellosis pada Sapi Perah di Wilayah Layanan Balai Besar Veteriner Wates Tahun 2012.** Buletin Laboratorium Veteriner, Balai Besar Veteriner Wates. 12 (4) . Hal. 18 – 22.

### Lampiran 1 : Foto Pendukung Penelitian

1. Koloni *Brucella abortus* S19 dan *Brucella abortus* isolat lokal



2. Hewan coba yang digunakan penelitian.



3. Macam adjuvant CFA dan IFA



**Lampiran 2. Hasil Analisis Statistik**

**General Linear Model**

**Within-Subjects Factors**

Measure: MEASURE\_1

Minggu	Dependent Variable
1	Minggu1
2	Minggu2
3	Minggu3
4	Minggu4

**Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
1	P0	10
perlakuan 2	P1	10
3	P2	10

**Descriptive Statistics**

	perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Minggu1	P0	5.4625	.33359	10
	P1	14.2000	.64064	10
	P2	15.4250	.49721	10
	Total	11.6958	4.53811	30
Minggu2	P0	5.7125	.56841	10
	P1	14.7500	.76603	10
	P2	16.2000	.49721	10
	Total	12.2208	4.75722	30
Minggu3	P0	5.7250	.55528	10
	P1	15.5125	.57267	10
	P2	16.9500	.67495	10
	Total	12.7292	5.10589	30
Minggu4	P0	5.8750	.48591	10
	P1	16.3500	.45947	10
	P2	18.9000	1.56436	10
	Total	13.7083	5.81016	30

Multivariate Tests<sup>a</sup>

Effect		Sig	F	Hypothesis df	Error df
Minggu	Pillai's Trace	.000	116.429 <sup>b</sup>	3.000	25.000
	Wilks' Lambda	.000	116.429 <sup>b</sup>	3.000	25.000
	Hotelling's Trace	.000	116.429 <sup>b</sup>	3.000	25.000
	Roy's Largest Root	.000	116.429 <sup>b</sup>	3.000	25.000
Minggu * perlakuan	Pillai's Trace	.000	10.956	6.000	52.000
	Wilks' Lambda	.000	15.205 <sup>b</sup>	6.000	50.000
	Hotelling's Trace	.000	20.193	6.000	48.000
	Roy's Largest Root	.000	40.138 <sup>c</sup>	3.000	26.000

a. Design: Intercept + perlakuan

Within Subjects Design: Minggu

b. Exact statistic

c. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE\_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F
Minggu	Sphericity Assumed	66.175	3	22.058	136.8
	Greenhouse-Geisser	66.175	1.425	46.440	136.8
	Huynh-Feldt	66.175	1.593	41.533	136.8
	Lower-bound	66.175	1.000	66.175	136.8
Minggu * perlakuan	Sphericity Assumed	27.570	6	4.595	28.9
	Greenhouse-Geisser	27.570	2.850	9.674	28.9
	Huynh-Feldt	27.570	3.187	8.652	28.9
	Lower-bound	27.570	2.000	13.785	28.9
Error(Minggu)	Sphericity Assumed	13.056	81	.161	
	Greenhouse-Geisser	13.056	38.474	.339	
	Huynh-Feldt	13.056	43.019	.303	
	Lower-bound	13.056	27.000	.484	

**Tests of Within-Subjects Contrasts**

Measure: MEASURE\_1

Source	Minggu	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F
Minggu	Level 1 vs. Level 2	8.269	1	8.269	88.200
	Level 2 vs. Level 3	7.752	1	7.752	126.612
	Level 3 vs. Level 4	28.763	1	28.763	58.605
Minggu * perlakuan	Level 1 vs. Level 2	1.388	2	.694	7.400
	Level 2 vs. Level 3	3.689	2	1.844	30.122
	Level 3 vs. Level 4	16.501	2	8.251	16.810
Error(Minggu)	Level 1 vs. Level 2	2.531	27	.094	
	Level 2 vs. Level 3	1.653	27	.061	
	Level 3 vs. Level 4	13.252	27	.491	

**Tests of Between-Subjects Effects**

Measure: MEASURE\_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	4754.141	1	4754.141	12786.609	.000
perlakuan	726.944	2	363.472	977.584	.000
Error	10.039	27	.372		

**Estimated Marginal Means**

**Perlakuan :**

**Estimates**

Measure: MEASURE\_1

perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
P0	5.694	.193	5.298	6.089
P1	15.203	.193	14.807	15.599
P2	16.869	.193	16.473	17.264

**Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for	
					Lower Bound	Upper Bound
P0	P1	-9.509 <sup>*</sup>	.273	.000	-10.069	
	P2	-11.175 <sup>*</sup>	.273	.000	-11.735	
P1	P0	9.509 <sup>*</sup>	.273	.000	8.950	
	P2	-1.666 <sup>*</sup>	.273	.000	-2.225	
P2	P0	11.175 <sup>*</sup>	.273	.000	10.615	
	P1	1.666 <sup>*</sup>	.273	.000	1.106	

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

**Univariate Tests**

Measure: MEASURE\_1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	726.944	2	363.472	977.584	.000
Error	10.039	27	.372		

The F tests the effect of perlakuan. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

**Minggu :**

**Estimates**

Measure: MEASURE\_1

Minggu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	11.696	.092	11.506	11.885
2	12.221	.113	11.988	12.453
3	12.729	.110	12.503	12.955
4	13.708	.179	13.340	14.076

**Pairwise Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

(I) Minggu	(J) Minggu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for Differer	
					Lower Bound	Upper Bou
1	2	-.525*	.056	.000	-.640	
	3	-1.033*	.059	.000	-1.155	
	4	-2.013*	.139	.000	-2.297	
2	1	.525*	.056	.000	.410	
	3	-.508*	.045	.000	-.601	
	4	-1.488*	.142	.000	-1.779	
3	1	1.033*	.059	.000	.911	
	2	.508*	.045	.000	.416	
	4	-.979*	.128	.000	-1.242	
4	1	2.013*	.139	.000	1.728	
	2	1.488*	.142	.000	1.196	
	3	.979*	.128	.000	.717	

Based on estimated marginal means

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

**Multivariate Tests**

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	.933	116.429 <sup>a</sup>	3.000	25.000	.000
Wilks' lambda	.067	116.429 <sup>a</sup>	3.000	25.000	.000
Hotelling's trace	13.972	116.429 <sup>a</sup>	3.000	25.000	.000
Roy's largest root	13.972	116.429 <sup>a</sup>	3.000	25.000	.000

Each F tests the multivariate effect of Minggu. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

a. Exact statistic

## 4. perlakuan \* Minggu

Measure: MEASURE\_1

perlakuan	Minggu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
P0	1	5.463	.160	5.134	5.791
	2	5.713	.196	5.310	6.115
	3	5.725	.191	5.334	6.116
	4	5.875	.311	5.238	6.512
P1	1	14.200	.160	13.872	14.528
	2	14.750	.196	14.347	15.153
	3	15.513	.191	15.121	15.904
	4	16.350	.311	15.713	16.987
P2	1	15.425	.160	15.097	15.753
	2	16.200	.196	15.797	16.603
	3	16.950	.191	16.559	17.341
	4	18.900	.311	18.263	19.537

**Lampiran 3. Personalia Tenaga Peneliti**

<b>Nomor</b>	<b>Nama Personalian</b>	<b>Kualifikasi</b>
1.	Didik Handijatno, Drh., M.S., Ph.D.	Ketua Peneliti
2.	Dr. Hani Plumeriastuti, Drh., M. Kes.	Anggota Peneliti
3.	Wiwiek Tyasningsih, Drh., M. Kes.	Anggota Peneliti
4.	Deny Hindarto, Amd.	Laboran
5.	Sugiri	Teknisi

**1. Ketua Peneliti**

- a. Nama Lengkap : Dr. Didik Handijatno, M.S., drh.
- b. Jenis Kelamin : L
- c. NIP : 19541018 198103 1 001
- d. Disiplin Ilmu : Biologi Molekuler
- e. Pangkat/Golongan : Pembina Tk I/IV-A
- f. Jabatan fungsional : Lektor Kepala
- g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan
- h. Waktu Penelitian : 10 jam/minggu

**2. Anggota Peneliti 1**

- a. Nama Lengkap : Dr. Hani Plumeriastuti, Drh., M.Kes.
- b. Jenis Kelamin : P
- c. NIP : 19590808 198701 2 001
- d. Disiplin Ilmu : Patologi Veteriner
- e. Pangkat/Golongan : Penata Tk. I / III-d
- f. Jabatan fungsional : Lektor
- g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan
- h. Waktu Penelitian : 10 jam/minggu

3. Anggota Peneliti 2

- a. Nama Lengkap : Wiwiek Tyasningsih, M.Kes., drh
- b. Jenis Kelamin : P
- c. NIP : 19620328 198803 2 001
- d. Disiplin Ilmu : Bakteriologi
- e. Pangkat/Golongan : Penata Tk. 1/III-D
- f. Jabatan fungsional : Lektor
- g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan
- h. Waktu Penelitian : 10 jam/minggu

**Luaran Penelitian :**

Publikasi Jurnal Nasional Tidak Terakreditasi "Veterinaria Medika"  
ISSN 1979-1305