



LAPORAN PENELITIAN
DIPA PNBP UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 2007

KARAKTERISASI OUTER MEMBRAN PROTEIN Brucella Abortus S-19 DENGAN TEKNIK IMUNOBLOTTING

Peneliti:

Retno Bijanti, MS.,drh.
Rr. Ratih Ratnasari, SU.,drh.
M. Gandul Atik Yuliani, M.Kes.,drh.

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh DIPA Penerimaan Negara Bukan Pajak
Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2007
SK Rektor Universitas Airlangga Nomor 4960/J03/PG/2007
Tanggal 4 Juni 2007
Nomor Kontrak 678/J03.2/PG/2007
Tanggal 7 Juni 2007
Nomor Urut: 40

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

November, 2007

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN**

1. a. Judul Penelitian	: Karakterisasi Outer Membran Proteins <i>Brucella abortus</i> S-19 Dengan teknik Immunoblotting
b. Macam Penelitian	: <input checked="" type="checkbox"/> Fundamental, <input type="checkbox"/> Terapan, <input type="checkbox"/> Pengembangan
2. Kepala Proyek Penelitian	:
a. Nama lengkap dengan Gelar	: Retno Bijanti, MS.,Drh
b. Jenis Kelamin	: Perempuan
c. Pangkat/golongan dan NIP	: Pembina/IV-a/130 934 630
d. Jabatan sekarang	: Lektor Kepala
e. Fakultas/Jurusan/Puslit	: Kedokteran Hewan
f. Univ./Ins./Akademi	: Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu Yang diteliti	: Patologi Klinik Veteriner
3. Jumlah Peneliti	: 3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian	: FKH Unair
5. Kerjasama dengan Instansi Lain	
a. Nama Instansi	: -
b. Alamat	: -
6. Jangka Waktu Penelitian	: 5 (lima) Bulan
7. Biaya yang diperlukan	: Rp. 7.500.000,-
8. Hasil Seminar Penelitian	
a. Dilaksanakan Tanggal	:
b. Hasil Penelitian	: <input type="checkbox"/> Baik sekali <input checked="" type="checkbox"/> Baik <input type="checkbox"/> Sedang <input type="checkbox"/> Kurang

Surabaya, 22 Oktober 2007



Mengetahui / Mengesahkan:
a.n Rektor

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Prof. Dr.H. Sarmanu, MS
NIP. 130 701 125

RINGKASAN**KARAKTERISASI OUTER MEMBRAN PROTEIN *Brucella Abortus S-19*
BERDASARKAN BERAT MOLEKUL DENGAN TEKNIK IMUNOBLOTTING**

(Retno Bijanti, Rr. Ratih Ratnasari dan M. Gandul Atik Yuliani 2007, 27 halaman)

Penegakan diagnosis penyakit *Brucellosis* memerlukan suatu uji dengan sensitifitas tinggi, sehingga dapat mengetahui strain penyakit *Brucellosis* pada hewan. Penelitian ini merupakan riset biomolekuler karena dengan penemuan *Outer Membrane Protein* sebagai bahan yang bersifat antigenik ini nantinya dapat dipakai sebagai bahan produk kit diagnostik spesifik

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakter Outer Membran Protein *B. Abortus S-19* berdasarkan daya imunogenesitasnya sehingga didapatkan protein yang bersifat imunogenik

Karakterisasi protein antigen berdasarkan berat molekul dapat dilakukan analisis protein dengan menggunakan SDS-PAGE, sedangkan untuk mengetahui protein *Brucella abortus* yang mempunyai sifat imunogenik dilakukan dengan teknik *Western-blotting*.

Penanaman pada biakan *Potato's Agar (PA)* menghasilkan biakan difus dengan ketebalan merata berwarna krem, pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan gram terlihat berwarna merah dengan latar belakang jernih, berbentuk *coccobacilli*, berpasangan atau bergerombol dan uji biokimia diperoleh: indol negatif, sitrat negatif, oksidase positif, katalase positif dan urea positif. Hasil karakterisasi profil protein OMP *B. abortus S-19* yaitu :menunjukkan adanya pita protein dengan BM 66,2 kDa, 55,2 kDa, 45,1 kDa, 40,8 kDa, 35,5 kDa, 34,8 kDa, 24,7 kDa, 22,3 kDa, 20,6 kDa, 18,8 kDa, 17,5 kDa dan BM.14,5 kDa. Sedangkan hasil Karakterisasi dengan Western-Blotting menunjukkan terjadi ikatan antara protein antigenik dengan antibodi spesifik adalah protein dengan BM 37,8 kDa. sehingga memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan diagnostik

**(Fakultas Kedokteran Hewan Dibiayai oleh DIP A PNBP Universitas Airlangga
2006 Nomor SK. Rektor Nomor : 4960/JO3/PG/2007 Tanggal: 4 Juni 2007)**

SUMMARY

CHARACTERIZATION OUTER MEMBRANE PROTEIN *Brucella Abortus S-19* BASED ON MOLECULAR WEIGHT USING IMMUNOBLOTTING TECHNIQUE

(Retno Bijanti, Rr. Ratih Ratnasari dan M. Gandul Atik Yuliani 2007, 27 pages)

Diagnosis of *Brucellosis* disease needs a high sensitivity test to find out *Brucellosis* strain on animal. This biomolecular research revealed antigenic *Outer Membrane Protein* which is able to produce spesific diagnostic kit.

This research aimed to find out characterization *Outer Membrane Protein B. Abortus S-19* based on immunogenicity to obtain immunogenic protein.

Characterization of antigenic protein based on molecular weight is accomplished by protein analysis using SDS-PAGE technique, while *Western-blotting* technique is done to find out immunogenic protein of *Brucella abortus*.

Brucella abortus shows diffuse cream-coloured culture with same thickness on *Potato's Agar Plate*. Microscopic examination using gram colouring technique shows red, paired coccobacilli with clear background. Biochemistry test reveals negative indol test, negative citrate test, positive oxidative test, positive catalase test and positive urea test. Profile characterization outer membrane protein of *B. Abortus S-19* showed protein ribbon with mollecular weight 66,2 kDa, 55,2 kDa, 45,1 kDa, 40,8 kDa, 35,5 kDa, 34,8 kDa, 24,7 kDa, 22,3 kDa, 20,6 kDa, 18,8 kDa, 17,5 kDa and BM.14,5 kDa. Characterization using *Western-Blotting* technique shows protein molecular weight 37,8 kDa has antigenic protein binding with specific antibody, therefore potential to be developed as a diagnostic kit.

**(Faculty of Veterinary Medicine Funded by DIP A PNBP Airlangga University 2007
Nomor SK. Rektor Nomor : 4960/JO3/PG/2007 June 4th 2007)**

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur Alhamdulillah penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT. atas karunia yang telah dilimpahkan-Nya hingga penyusunan laporan hasil penelitian dengan judul **Karakterisasi Outer Membran Proteins *Brucella abortus* S-19 Dengan teknik Immunoblotting** telah terselesaikan tepat waktu

Ucapan terima kasih yang tak terhingga penulis sampaikan kepada Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan izin untuk melaksanakan penelitian ini.

Akhirnya untuk kesempurnaan penulisan laporan penelitian ini penulis mengharapkan kritik dan saran para pembaca dengan harapan laporan hasil penelitian ini bermanfaat bagi yang memerlukan khususnya untuk bidang Kedokteran Hewan dan Peternakan.

Surabaya, 22 Oktober 2007

Peneliti

DAFTAR ISI

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
SUMMARY.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1. Brucella abortus.....	3
2.2. Outer Membran Proteins.....	4
2.3. Karakterisasi Profil Protein.....	5
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	6
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	8
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	13
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	19
DAFTAR PUSTAKA.....	20

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hasil pembiakan dan Pemeriksaan mikroskop <i>B. abortus S-19</i>	13
2. Hasil uji Biokimia kuman <i>B. abortus S-19</i>	14
3. Ekstraksi Protein dari <i>B. abortus S-19</i>	15
4. Imunisasi suspensi <i>Outer Membran Proteins B. abortus S-19</i> pada kelinci.....	16
5. Profil protein OMP <i>B. abortus S-19</i> dengan tekni SDS-PAGE 12%...	17
6. Uji <i>western blot Outer Membran Protein B. abortus S-19</i>	17

BAB I

PENDAHULUAN

1. 1. Latar Belakang Penelitian:

Brucella abortus S-19 merupakan salah satu strain *Brucella abortus* yang bersifat halus, patogenitas rendah, dapat tumbuh tanpa CO₂, sehingga strain ini dapat dibuat vaksin maupun antigen diagnostik dengan mengisolasi *Outer Membran Proteins* dari kuman *Brucella abortus S-19*. Menurut Quinn, *et al* (2002) pada permukaan luar *Brucella abortus* terdiri dari dua komponen yang telah diidentifikasi sebagai faktor virulensi yang potensial yaitu protein membrane luar (*Outer Membran Proteins*) dan lipopolisakarida (LPS)

Penegakan diagnosis penyakit *Brucellosis* memerlukan suatu uji dengan sensitifitas tinggi, sehingga dapat mengetahui strain penyakit *Brucellosis* pada hewan penderita. Selama ini diagnosis terhadap penyakit *Brucellosis* dilapangan berdasarkan sejarah penyakit, tanda klinis dan perubahan pasca mati, sedangkan diagnosis di laboratorium dilakukan isolasi dan identifikasi terhadap kuman penyebab dan uji serologis. Salah satu kelemahan dari uji serologis adalah penggunaan antigen utuh (*Whole molecule*) sebagai komponen diagnostiknya, sehingga seringkali terjadi reaksi silang dengan bakteri lain dan mengakibatkan terjadi reaksi positif palsu. Untuk mengatasi kendala tersebut, maka diperlukan antigen yang lebih spesifik harus bersifat antigenik dan mempunyai spesifitas yang tinggi (Rantam, 2003)

Penelitian ini merupakan riset biomolekuler karena dengan penemuan *Outer Membrane Protein* sebagai bahan yang bersifat antigenik ini nantinya dapat dipakai sebagai bahan produk kit diagnostik spesifik yang diharapkan dapat membantu dalam

menegakkan diagnosa yang akurat, cepat dan dapat segera melakukan tindakan pencegahan (preventif), pengendalian serta sekaligus menghindari peternak dari kerugian ekonomis yang besar dan sekaligus pencegahan penularan terhadap manusia yang disebabkan oleh penyakit *Brucellosis* dan merupakan penyakit Zoonosis.

Elektroforesis merupakan metode yang digunakan untuk karekterisasi protein antigen berdasarkan berat molekul biasanya yang dipakai adalah *Sodium Dodecyl Sulphate Polyakrylamide Gel Electrophoresis*. (SDS-PAGE). Metode ini untuk mengetahui zat-zat yang mempunyai berat molekul tertentu bersifat imunogenik. Menurut Subowo, 1993 menyatakan bahwa zat-zat yang mempunyai berat molekul lebih kecil dari 10.000 bersifat imunogenik lemah atau tidak imunogenik, sedangkan zat-zat yang merupakan protein dengan BM lebih besar dari 10.000 kebanyakan merupakan imunogen yang sangat poten. *Polyakrylamide Gel Electrophoresis*. (SDS-PAGE) merupakan standar metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur subunit dan kemurnian protein. (Rantam, 2003). Karakterisasi Outer Membrane Protein dilakukan dengan teknik Immunoblotting (Western Blotting). Protein spesifik hasil blotting merupakan protein yang bersifat imunogenik dan dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan kit diagnostic.

1.2. Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut : Bagaimana karakterisasi Outer Membran Protein dari *Brucella abortus* S-19 dengan teknik Immunoblotting

BAB II

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

2.1. *Brucella abortus*

Brucella merupakan bakteri gram negative berbentuk *coccobacilli*, berujung tumpul dengan ukuran panjang 0,6-1,5 μm dan lebar 0,5-0,7 μm . *Brucella* bersifat non motil karena tidak membentuk spora serta tidak mempunyai flagella, villi, atau kapsul, hidup berpasangan atau bergerombol. Pada pewarnaan gram negative terlihat berwarna merah dengan latar belakang biru, sedangkan pada uji biokimia indol negative, oksidase positif, katalase positif, urea positif, dapat mereduksi nitrat, sitrat negative, tidak tumbuh atau kurang subur tanpa adanya CO_2 (Alton *et al*, 1988; OIE, 2004).

Brucellosis adalah penyakit pada ternak yang bersifat zoonosis dan disebabkan oleh *Brucella abortus*. Penyakit ini dapat menyebabkan kerugian ekonomis yang sangat besar walaupun mortalitasnya rendah, karena infeksi pada sapi betina dapat menyebabkan plasentitis sehingga terjadi keguguran pada masa kebuntingan 5-9 bulan, anak hewan yang dilahirkan lemah kemudian mati dan terjadi gangguan alat reproduksi yang mengakibatkan kemajiran temporer atau permanen (Nielsen dan Duncan, 1990; Corner, 1993). Meningkatnya kasus *Brucellosis* pada sapi di Indonesia disebabkan karena kecenderungan meningkatnya populasi dan tingginya lalu lintas sapi antar daerah, maka di Indonesia penyakit ini termasuk dalam daftar penyakit menular yang harus dicegah dan diberantas sejak tahun 1959 (Hardjopranjoto, 1995; Subronto, 2003).

Cara penularan penyakit *Brucellosis* yang paling sering terjadi melalui pencernaan tetapi dapat juga melalui kontak kelamin (veneral contact), penetrasi melalui

kulit yang luka, pernafasan dan penularan melalui plasenta dari induk ke anak. Pada plasenta sapi terdapat senyawa erythritol, suatu polihidrik alkohol, yang berperan sebagai faktor pertumbuhan kuman *Brucella* dalam konsentrasi yang tinggi, sehingga proliferasi organisme pada hewan bunting dapat menyebabkan plasentitis dan diikuti dengan abortus. Bahan ini juga ditemukan pada organ lain seperti glandula mammae dan epididimis yang merupakan target organ kuman *Brucella* (Quinn *et al.*, 2002). Diagnosis di Laboratorium dapat dilakukan isolasi-identifikasi terhadap kuman dari bahan yang diduga terinfeksi, yaitu air susu, air ketuban dan bahan-bahan yang dicurigai dan dapat dilakukan pembiakan pada media *Trypcase Soy Agar (TSA)* yang ditambah dengan *Bacitracin, Polymixin, Vancomycin* (Jawetz, *et al.*, 2002)

Salah satu strain atau galur yang dimiliki oleh *Brucella abortus* adalah strain 19 (S-19). *Brucella abortus S-19* memiliki sifat-sifat normal dari biotype-1, tetapi tidak memerlukan CO₂ untuk pertumbuhannya, tidak tumbuh dengan adanya benzyl penicillin (3 µg/ml), thionin blue (2 µg/ml), dan erythritol (1 mg/ml) serta L-glutamat (OIE, 2004). Kuman *Brucella abortus S-19* dapat menyebar dari satu hewan ke hewan lain dan dapat menyebabkan fertilitas, orkhitis serta epididimitis pada hewan jantan (Subronto, 2003)

2.2. Outer Membran Proteins

Struktur bakteri *Brucella abortus* tergolong unik dan tidak seperti bakteri gram negative lainnya dimana permukaan luarnya tidak memiliki villi dan tidak berkapsul akan tetapi terdiri dari dua komponen yang telah diidentifikasi sebagai vaktor virulensi yang potensial yaitu : Lipopolisakarida (LPS) dan Outer Membran Protein (OMP) (Quinn *et al.*, 2002). OMP bakteri gram negatif merupakan antigen potensial yang dapat secara

langsung menginduksi respon imun spesifik humoral yaitu sel B limfosit sehingga lebih cepat memacu terbentuknya antibodi (Alonso-Urmeneta *et al*, 1998; Forestier *et al*, 1999). Protein ini juga berperan dalam menunjukkan adanya sifat imunogenik pada berat molekul tertentu. Karakteristik dari kuman gram negative adalah dikelilingi dengan selaput membrane luar yang merupakan selaput ganda fosfolipid. Protein selaput membran luar berfungsi dalam proses conjugasi kuman dalam mengendalikan replikasi DNA dan pembelahan sel, selain itu juga berfungsi sebagai penghalang difusi molekul besar serta sebagai pelindung untuk enzim hidroliti (Jawetz, *et al* ., 2002)

2.3. Karakterisasi Profil Protein

Protein merupakan suatu rantai peptida atau polipeptida dengan berat molekul berkisar antara 10^5 - 10^6 Dalton. Beberapa fungsi protein adalah sebagai katalisator atau enzim (ribonuklease, tripsin), pengangkut dan penyimpanan, penyebab gerakan, pendukung system kekebalan. Protein adalah molekul yang amphoteric mengandung kedua group karboksil negative dan group amino positif. Ultrasentrifugasi dapat digunakan untuk memisahkan molekul protein menurut berat molekulnya (Driyer, 1993)

Menurut Driyer, 1993, protein sederhana yang bergabung dengan komponen yang bukan protein atau yang bukan asam amino, biasanya disebut dengan gugus prosthetic. Sebagai contoh protein gabungan adalah: *lipoprotein* gugus prostetikanya adalah lemak (didalam plasma darah dan kuning telur); *Nukleoprotein*, gugus prostetikanya adalah asam nukleat (dalam nucleus sel, kromosom dan virus); *Kromoprotein*, gugus prostetikanya adalah Fe porfirin (hemoglobin, sitokrom); *Metaprotein*, gugus prostetikanya

adalah Fe, Zn atau Cu (dalam transferin darah, feritin, anhidrose karbonat) dan Fosfoprotein, gugus prostetikanya adalah fosfat (kasein dalam susu, vitellin dalam telur)

Karakterisasi protein antigen berdasarkan berat molekul dapat dilakukan analisis protein dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). *polyacrilamid gel electrophoresis* (PAGE) adalah merupakan standar metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur subunit dan kemurnian protein (Rantam, 2003). Untuk mengetahui protein *Brucella abortus* yang diperoleh mempunyai sifat imunogenik, maka perlu dilakukan pengujian dengan menggunakan teknik *Western-blotting* dimana hasil elektroforesis (SDS-PAGE) di transfer pada *membrane nitrocellulose*

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan Penelitian:

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakter Outer Membran Protein *B. Abortus* S-19 berdasarkan daya imunogenesitasnya yang nantinya setelah didapatkan protein yang bersifat imunogenik, dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan kit diagnostik bagi penyakit *Brucellosis*

Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini secara teoritis dapat memberikan masukan bagi dunia kedokteran hewan mengenai karakter OMP *B. Abortus* S-19, baik menimbulkan respon imun (imunogenesitas) maupun di dalam reaksinya terhadap antibodi yang ditimbulkan (antigenesitas). Selain itu secara praktis hasil penelitian ini sangat bermanfaat bagi para pengguna jasa, utamanya dalam diagnosis *Brucellosis* dengan aplikasi melalui teknik *Western Blotting*.

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Pemiakan *B.abortus S-19* dan Uji Biokimia

B.abortus S-19 dibiakan pada *Trypticase Soy Agar* (TSA) pada cawan petri dan *Potato Agar* (PA) yang ditempatkan pada botol besar dan diincubasi selama 2 hari . Kelebihan penanaman pada botol adalah lebih efisien dan mudah serta kapasitasnya lebih besar dibandingkan dengan cawan petri, sehingga bakteri yang berkembangbiakpun menjadi lebih banyak dari pada satu cawan petri. Pemiakan *B.abortus S-19* dilakukan di Pusvetma Surabaya, sedangkan untuk uji biokimia dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga meliputi pemeriksaan indol, sitrat, oksidase, katalase dan urea.

4.2. Isolasi *Outer Membran Protein B. abortus S-19*

Pembuatan homogenat dilakukan dengan teknik Sonikasi. *B.abortus S-19* dicuci dengan PBS dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit. Pelet *B.abortus S-19* dilarutkan dengan PBS 1 ml kemudian disonikasi pada 20 Hz selama 3x3 menit dengan interval waktu 1 menit. Supernatan diambil dan dipusingkan kembali pada 8000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh selanjutnya disimpan untuk bahan analisis protein. Pengukuran kadar protein dilakukan dengan metode bradford.

4.3. Pembuatan Antibodi Poliklonal terhadap OMP *B. abortus S-19*

Pembuatan Antibodi Poliklonal terhadap OMP *B. abortus S-19* dengan cara penyuntikan suspensi OMP *B. abortus S-19* dengan dosis 50-100 μ l setiap ekor secara subcutan pada kelinci jantan umur 3 bulan sebanyak 4 ekor, penyuntikan pertama OMP *B. abortus S-19* ditambahkan dengan *complete Freund's adjuvant* (CFA) sama banyak kemudian pada penyuntikan ulang (booster) dilakukan dengan menambahkan *incomplete Freund's adjuvant* sama banyak diulang sebanyak 5 kali dengan dosis yang sama. Booster pertama 2 minggu kemudian setelah itu interval 10 hari. Pengambilan darah dilakukan melalui cuping telinga pada vena auricularis menggunakan spuit disposable 5 ml, kemudian darah dimasukkan dalam tabung reaksi yang steril didiamkan sebentar dalam posisi miring kemudian dicentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm untuk mendapatkan antibodi poliklonal terhadap OMP *B. abortus S-19* yang siap digunakan.

4.4. Karakterisasi Protein *B. abortus S-19* dengan SDS-PAGE

Bertujuan untuk melihat pola berat molekul dari protein *B. abortus* Tahapan pertama *running gel* disiapkan dahulu, dengan cara menuangkan larutan *acrylamide* 15% diantara celah plat kaca elektroforesis dan di ratakan permukaannya dengan butanol 50%. Setelah larutan *acrylamide* 15% membeku, butanol dibuang dan dicuci dengan *aquadest*, selanjutnya membuat *stacking gel* yaitu menuangkan larutan *acrylamide* 3% diatas *acrylamide* 15% yang sudah membeku, lalu sisir segera diletakkan untuk membuat sumuran tempat aplikasi sampel. Setelah *acrylamide* 3% membeku, plat kaca dirangkai

pada perangkat elektroforesis, dan *buffer* elektroda dituang pada alat elektroforesis. Sampel *B. abortus* hasil isolasi ditambahkan *laemly buffer* dengan perbandingan 3:1. Sebelum di-*loading* pada gel, terlebih dahulu sampel dilakukan denaturasi. Denaturasi dilakukan dengan pemanasan suhu 100° Celsius selama lima menit, selanjutnya 20 µl sampel termasuk kontrol positif dalam *laemly buffer* di aplikasikan ke dalam tujuh sumuran sedangkan satu sumuran lain sebagai kontrol yaitu di isi dengan lima µl marka protein (*Color BurstTM Electrophoresis Markers*, No. C.4105). Perangkat alat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* 100 volt dan 40 miliamper selama kurang lebih dua jam. Setelah sampel hampir mencapai tepi bawah gel, selanjutnya gel beku yang telah mengandung fraksi protein diambil dengan cara memisahkan plat kaca. Gel kemudian dicuci dengan larutan pencuci yang terdiri dari metanol 50% 25 ml, asam asetat 10% 3,7 ml dan *aquadest ad* 100 ml. Gel dicuci dengan cara digoyang diatas *shaker* selama 30 menit, kemudian dilakukan pencucian ulang menggunakan larutan yang sama, tetapi kandungan metanol dikurangi menjadi 2,5 ml dan penambahan asam asetat menjadi 37,5 ml dari sebelumnya kemudian ditambahkan *aquadest* selama 30 menit. Pencucian berikutnya dengan larutan *glutaraldehyde* 10% dan *aquadest* selama 30 menit. Setelah dicuci, gel diwarnai dengan cara dicelup pada *Commasie Blue* selama 15 menit, kemudian dilakukan pencucian dengan *aquadest* sebanyak dua kali masing-masing 100 ml selama dua menit, selanjutnya diberikan larutan pengembang warna yang terdiri dari *formaldehyde* 3,7% sejumlah 50 µl, *zytroensauce* 5% 100 µl dan *aquadest* 100 ml. Tahap selanjutnya gel dicuci kembali dengan *aquadest* sebanyak dua kali masing-masing 100 ml selama dua menit. Apabila pita (*band*) protein sudah terlihat maka reaksi difiksasi dengan menambahkan asam asetat 10%. Hasil gel yang telah menunjukkan adanya *band*

protein, selanjutnya disimpan dalam larutan gliserol 10% sebanyak 10 ml dalam *aquadest* 100 ml agar gel tidak rusak. Dokumentasi dilakukan dengan menggunakan peralatan *scan* yang dihubungkan dengan komputer. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan *band* protein dimaksud dengan standar yaitu marka protein (*Color Burst™ Electrophoresis Markers*, No. C.4105) (Axelsen, 1983).

4.5. Karakterisasi Outer Membran Protein *B. abortus* S-19 dengan Western-Blott.

Selain dilakukan pengecatan, hasil elektroforesis (SDS-PAGE) di transfer pada *membrane nitrocellulose* untuk kepentingan *Western-blotting*. Potongan *membrane nitrocellulose* dimasukkan ke dalam cawan petri. Sampel sejumlah lima μ l di teteskan pada *membrane nitrocellulose*, kemudian di tunggu sampai kering pada suhu ruang. *Membrane nitrocellulose* di *blocking* dengan BSA 1% dalam TBS Tween 0,5%, lalu di inkubasi pada suhu kamar selama dua jam atau semalam pada suhu 4° Celsius. *Membrane nitrocellulose* dicuci dengan TBS Tween 0,05% sejumlah lima kali, masing-masing 10 menit dengan *shaker*. Antibodi primer yang sudah diencerkan 20 kali ditambahkan ke dalam cawan petri yang mengandung *membrane nitrocellulose* dan *buffer* kemudian di inkubasi selama satu jam pada suhu kamar dengan *shaker*. Setelah inkubasi *membrane nitrocellulose* dicuci dengan TBS Tween 0,05% sejumlah lima kali, masing-masing 10 menit dengan *shaker*. Antibodi sekunder (*IgG anti rabbit alkaline phosphatase conjugate*) dengan perbandingan (1:3.000) ditambahkan dalam cawan petri yang mengandung *membrane nitrocellulose* dan *buffer* kemudian di inkubasi selama satu jam pada suhu kamar dengan *shaker*. *Membrane nitrocellulose* dicuci dengan TBS Tween 0,05% sejumlah lima kali, masing-masing 10 menit kemudian ditambahkan substrat *nitro*

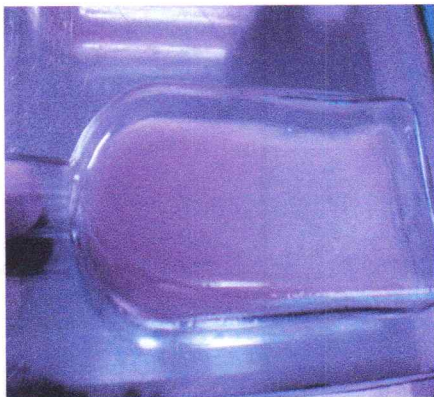
blue tetrazolium (NBT) 60 μ l dan *5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate* (BCIP) 30 μ l dalam *buffer* substrat. Setelah 10 menit amati hasilnya, kemudian semua substrat dibuang dan dicuci dengan *aquadest* dan *membrane nitrocellulose* disimpan sebagai dokumentasi.

BAB V

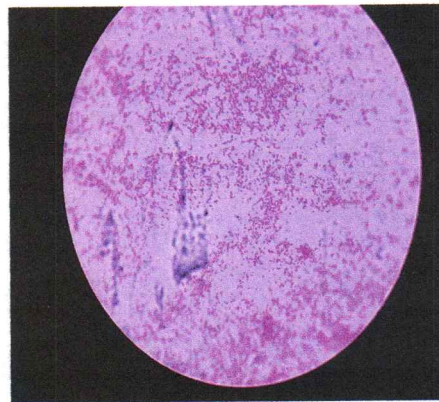
HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Pemiakan Kuman *B. abortus S-19* dan Uji Biokimia

Pada penelitian ini kuman bakteri *B. abortus S-19* dibiakkan pada *Trypticase Soy Agar* (TSA) pada cawan petri dengan metode *streak* menghasilkan koloni kuman yang kecil dan halus dengan tepi rata, jernih dan mengkilat. Penanaman pada biakan *Potato's Agar* (PA) dengan metode tuang menghasilkan biakan difus dengan ketebalan merata berwarna krem. Hasil pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan gram menunjukkan bahwa bakteri *B. abortus S-19* terlihat berwarna merah dengan latar belakang jernih, berbentuk *coccobacilli*, berpasangan atau bergerombol. Hasil pembiakan kuman dan pewarnaan gram dapat dilihat pada Gambar 1.



A

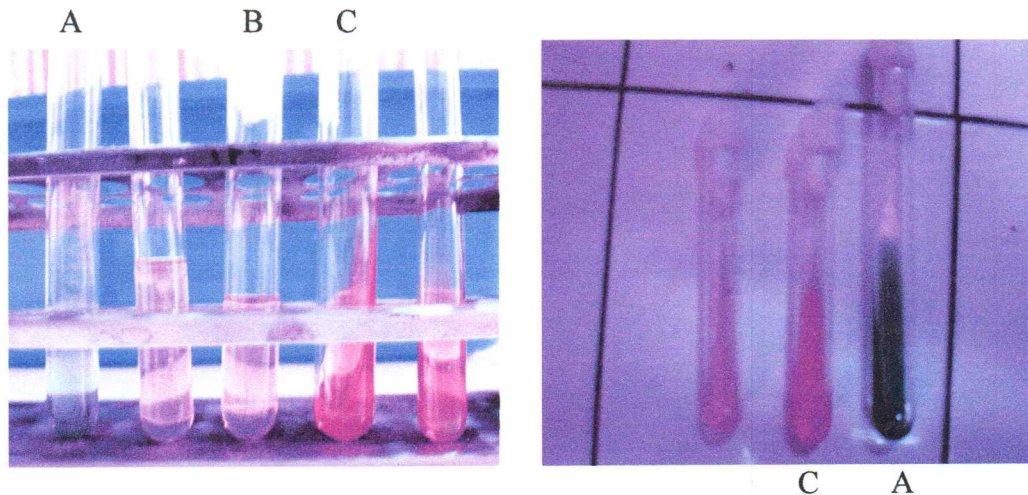


B

Gambar 1. Hasil pembiakan kuman *B. abortus S-19*, pada media *Potato's Agar* (A) dan Pemeriksaan mikroskop dengan pewarnaan gram (B)

Hasil penelitian uji biokimia diperoleh: indol negatif, sitrat negatif, oksidase positif, katalase positif dan urea positif dapat dilihat pada gambar 2. Dari hasil uji

biokimia, morfologi dan pewarnaan gram yang didapat menunjukkan bahwa biakan kultur *B. abortus S-19* tidak terkontaminasi dengan kuman lain, sehingga biakan kultur dapat dilanjutkan untuk karakterisasi profil proteinnnya.



Gambar 2. Hasil uji Biokimia kuman *B. abortus S-19*: Sitrat negatif (A), Indol negatif (B), Urea positif (C)

5.2. Isolasi Outer Membran Protein *B. abortus S-19*

Ekstraksi Protein dari *B. abortus S-19* dilakukan dengan sonikasi dan penambahan Tween, dengan tujuan untuk memecah ikatan protein dari dinding sel kuman *B. abortus S-19*, sehingga dapat diekstraksi protein struktural pada bagian luar dari sel atau *Outer Membran Proteins* (OMP) kuman *B. abortus S-19*. Supernatan hasil ekstraksi ditampung dalam *microtube*, kemudian kandungan protein yang ada diukur dengan cara *Bradford* dihasilkan kadar.protein sebesar 3,84 g%. Pemisahan *Outer Membran Protein* dari sel *B. abortus S-19* sangat penting untuk menentukan tingkat kemurniannya, kemurnian OMP sangat menentukan daya imunogenitas dan antigenitasnya. Protein ini juga berperan dalam menunjukkan adanya sifat Imunogenik pada berat molekul tertentu.



Gambar 3. Ekstraksi Protein dari *B. abortus S-19*

5.3. Pembuatan Antibodi Poliklonal terhadap OMP *B. abortus S-19*

Pada penelitian ini dipilih antibodi poliklonal karena mempunyai tingkat sensitivitas yang tinggi dan mempunyai jangkauan spesifitas yang luas serta merupakan reagen yang relatif stabil (Smith, 1995). Pada pembuatan antibodi poliklonal terhadap OMP *B. abortus S-19* menggunakan adjuvant, hal ini karena adjuvant mempunyai sifat-sifat tertentu sebagai karakteristiknya terutama membuat depo antigen dan melepas antigen sedikit demi sedikit sehingga memperpanjang perjalanan antigen dengan sistem imun serta dapat memacu sistem imun dengan afinitas yang tinggi (Baratawidjaja, 2002).

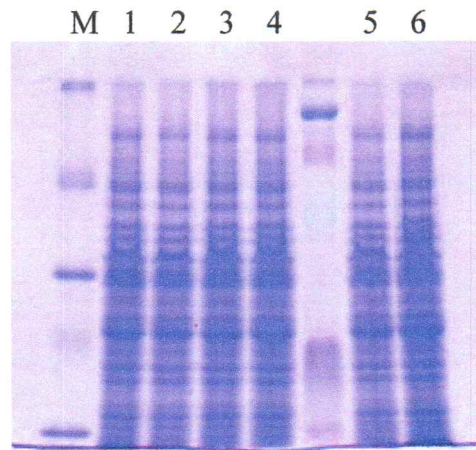
Pada penelitian ini penyuntikan suspensi OMP *B. abortus S-19* pada kelinci secara subcutan dengan menggunakan *complete Freund's adjuvant* dan *incomplete Freund's adjuvant* yang digunakan untuk booster. Hal ini sesuai dengan pendapat dari Tizzard (1995) yang mengatakan bahwa cara yang terbaik pemberian antigen dalam *complete Freund's adjuvant* dan *incomplete Freund's adjuvant* adalah secara subcutan.



Gambar 4. Imunisasi suspensi *Outer Membran Proteins B. abortus S-19* pada kelinci jantan umur 3 bulan

5.4. Karakterisasi Profil Protein OMP *B. abortus S-19* dengan SDS-PAGE

Hasil karakterisasi profil protein OMP *B. abortus S-19* yaitu :menunjukkan adanya pita protein dengan BM 66,2 kDa,55,2 kDa, 45,1 kDa, 40,8 kDa, 35,5 kDa, 34,8 kDa, 24,7 kDa, 22,3 kDa, 20,6 kDa, 18,8 kDa, 17,5 kDa dan BM.14,5 kDa, Hasil analisis berdasarkan berat molekulnya pada penelitian ini, maka isolat OMP *B. abortus S-19* dikatagorikan sebagai protein yang mempunyai kemampuan imunogenik, karena memenuhi syarat untuk dijadikan imunogen. Hal ini sesuai dengan pendapat dari Bellanti (1985) bahwa imunogen yang efektif mempunyai berat molekul (BM) lebih besar dari 10.000 Da. Sedangkan menurut Clobckaert, (1992) OMP Brucella dengan BM 36-38 kDa sensitif untuk mendeteksi hewan yang terinfeksi brucella.

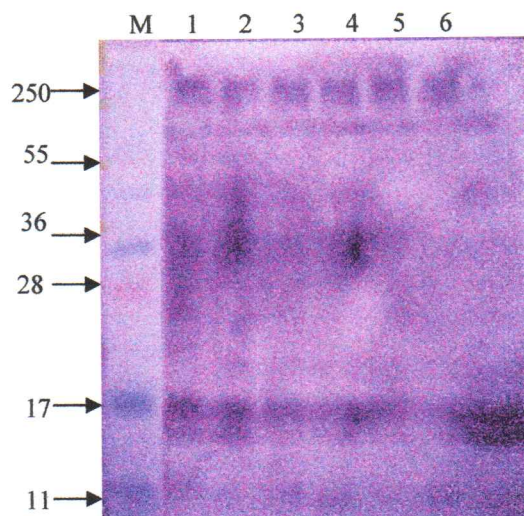


Gambar 5. Profil protein OMP *B. abortus S-19* dengan tekni SDS-PAGE 12%

Keterangan: M = Marker
1,2,3,4,5,6 = Sampel

5.5. Karakterisasi *Outer Membran Protein B. abortus S-19* dengan Western-Blotting

Hasil Karakterisasi *Outer Membran Protein B. abortus S-19* dengan Western-Blotting menunjukkan adanya protein yang dikenali oleh antibodinya, yaitu protein dengan berat molekul 165.6 kDa, 62.2 kDa, 37.8 kDa, 14.3 kDa dan 13.3 kDa



Gambar. 6. Uji *western blot Outer Membran Protein B. abortus S-19* dengan antibodi hasil induksi pada kelinci

Ternyata hasil uji *western blot* yang terjadi ikatan antara protein antigenik dengan antibodi spesifik adalah protein dengan berat molekul 37,8 kDa yang bisa dikembangkan sebagai kit diagnostik. Protein dengan berat molekul 37,8 kDa adalah antigen yang bersifat spesifik karena dapat dikenali dan mampu menginduksi respon imun. Hal ini sesuai dengan pendapat Clobckaert, (1992) bahwa OMP *Brucella* dengan BM 36-38 kDa sensitif untuk mendeteksi hewan yang terinfeksi brucella.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Berdasarkan analisis Profil Protein *B. abortus S-19* dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa ada beberapa pita (*band*) yang dominan meliputi BM 66,2 kDa, 55,2 kDa, 45,1 kDa, 40,8 kDa, 35,5 kDa, 34,8 kDa, 24,7 kDa, 22,3 kDa, 20,6 kDa, 18,8 kDa, 17,5 kDa dan BM.14,5 kDa
2. Hasil Karakterisasi *Outer Membran Protein B. abortus S-19* dengan Western-Blotting menunjukkan adanya protein yang dikenali oleh antibodinya , yaitu protein dengan berat molekul 165.6 kDa, 62.2 kDa, 37.8 kDa, 14.3 kDa dan 13.3 kDa
3. Berdasarkan karakterisasi OMP *B. abortus S-19* dengan Western Blotting diperoleh protein spesifik dengan berat molekul 37,8 kDa yang mempunyai sifat antigenik sehingga memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan diagnostik.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan kesimpulan, maka dapat disarankan : Protein dengan BM 37,8 kDa dapat diteliti lebih lanjut dengan dilakukan elusi untuk mengetahui imunogenitasnya pada hewan coba untuk dikembangkan sebagai bahan diagnostik laboratoris untuk deteksi lapangan

DAFTAR PUSTAKA

- Alonso- Urmeneta, B., C. Marin., V.Aragon., J.M. Blasco., R. Diaz and I. Mariyon. 1998. Evaluation of Lipopolysaccharides and Polysaccharides of Different Epitopic Structures in the Indirect ELISA for Diagnosis of Brucellosis in Small Ruminant and cattle. www.cdli.sam.org/cgi/content/full/5/6/749.
- Alton, G.G., L.M. Jones and D.E. Pietiz. 1988. Laboratory Techniques in Brucellosis. 3rd Ed. WHO, Geneva, Switzerland.
- Baratawidjaja, K.G. 2002. *Imunologi Dasar*. Edisi Kelima. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Cloekaert, A., P. Kerkhofs., J.N. Limet. 1992. Antibody Response to *Brucella* Outer Membrane Proteins in Bovine Brucella : Immunoblot Analysis and Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, Dec.1992. Vol 30.No 12 p.3168-3174
- Corner, L.A. 1993. Bovine Brucellosis in Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Disease. Standing Committee on Agriculture and Resource Management, Australia.
- Driyer, R.L. 1993. *Biokimia Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Forestier, C., Edgard Moreno., Javier Pizarro-Cerda and Jean-Pierre Gorvel. 1999. Lysosomal Accumulation and Recycling of Lipopolysaccharide to the Cell Surface of Murine Macrophages, an In vitro and In Vivo Study. www.jimmunol.org/cgi/content/full/162/11/6784
- Hardjopranjoto, SH. 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, 2002. Review of Medical Microbiology. Large Medical Publication Drawer L California, pp 21-23
- Nielsen, K and R.J. Duncan. 1990. Animal Brucellosis By Serology. *Vet. Microbiol.* 90:447-459.
- OIE. 2004. *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal*. OIE. References Laboratories for Bovine Brucellosis.

- Quinn, P.J., B.K. Harkey., M.E. Corter., W.J. Donnelley and F.C. Leonard. 2002. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. Blackwell Publishing. Great Britain. Hal 3-11, 162-167
- Rantam,F.A.2003. **Metode Imunologi**. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 11, 145
- Smith, J.R. 1995. **Produksi Serum Hiperimun**. Dalam : **Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian** (Burgess, G.W.) Gajah Mada University Press Yogyakarta.
- Subowo, 1993. **Imunologi Klinik**. Penerbit Angkasa Bandung, Indonesia
- Subronto,2003. **Ilmu Penyakit Ternak Mamalia**. Edisi II. Gajah Mada University Press. Yogyakarta
- Tizzard, I. 1995. **Pengantar Imunologi Veteriner**. WB. Saunders Company. Philadelphia

Lampiran 1. Analisis Regresi (Rf) Terhadap Pita Protein Hasil SDS-PAGE *Whole-Protein*

Penghitungan Nilai Rf untuk Mencari Hubungan antara Rf dan Log BM 9 Dalton

Jarak marker	Rf*	BM (y Kda)	BM (y Da)	log y (Da)
19.0	0.164	97.4	97400	4.989
33.0	0.284	66.2	66200	4.821
46.0	0.397	45.0	45000	4.653
70.0	0.603	31.0	31000	4.491
86.5	0.746	21.5	21500	4.332
112.5	0.970	14.4	14400	4.158

Panjang Gel = 116mm; *RF = jarak/panjang gel

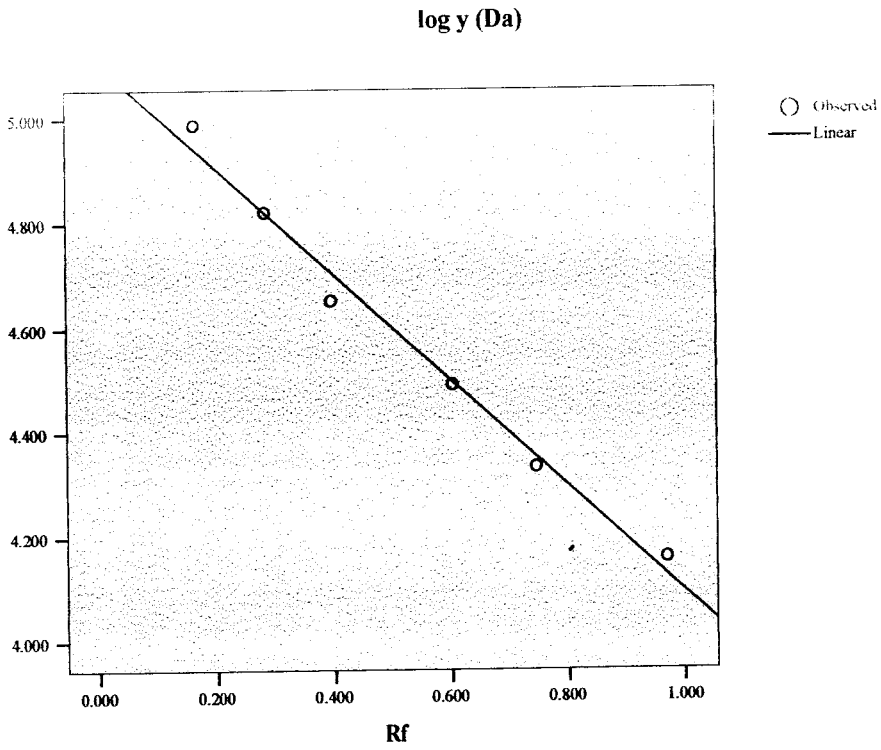
Summarize

Case Summaries^a

	jarak	Rf	log y (Da)
1	19,0	,164	4,989
2	33,0	,284	4,821
3	46,0	,397	4,653
4	70,0	,603	4,491
5	86,5	,746	4,332
6	112,5	,970	4,158
Total N	6	6	6
Sum	367,0	3,164	27,445
Mean	61,167	,52730	4,57413
Std. Deviation	35,0894	,302495	,308872

a. Limited to first 100 cases.

Curve Fit



Regression

Variables Entered/Removed^d

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: log y (Da)

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,993 ^a	,986	,983	,040279

a. Predictors: (Constant), Rf

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	,471	1	,471	290,018	,000 ^a
	Residual	,006	4	,002		
	Total	,477	5			

a. Predictors: (Constant), Rf

b. Dependent Variable: log y (Da)

Coefficients^c

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5,109	,035		144,135	,000
	Rf	-1,014	,060	-,993	-17,030	,000

a. Dependent Variable: log y (Da)

Penghitungan BM sample

Jarak sampel	Rf	log y Da	BM (antilog y) Da	BM Kda
33.0	0.284	4.821	66221.7	66.2
42.0	0.362	4.742	55207.7	55.2
52.0	0.448	4.654	45081.7	45.1
57.0	0.491	4.611	40831.9	40.8
60.0	0.517	4.585	38459.2	38.5
65.0	0.560	4.541	34753.6	34.8
72.0	0.621	4.480	30199.5	30.2
82.0	0.707	4.392	24660.4	24.7
87.0	0.750	4.349	22335.7	22.3
91.0	0.784	4.314	20606.3	20.6
95.5	0.823	4.274	18793.17	18.8
99.0	0.853	4.244	17538.8	17.5
108.5	0.935	4.161	14487.7	14.5

$$*y = 5.109 - 1.014 x$$

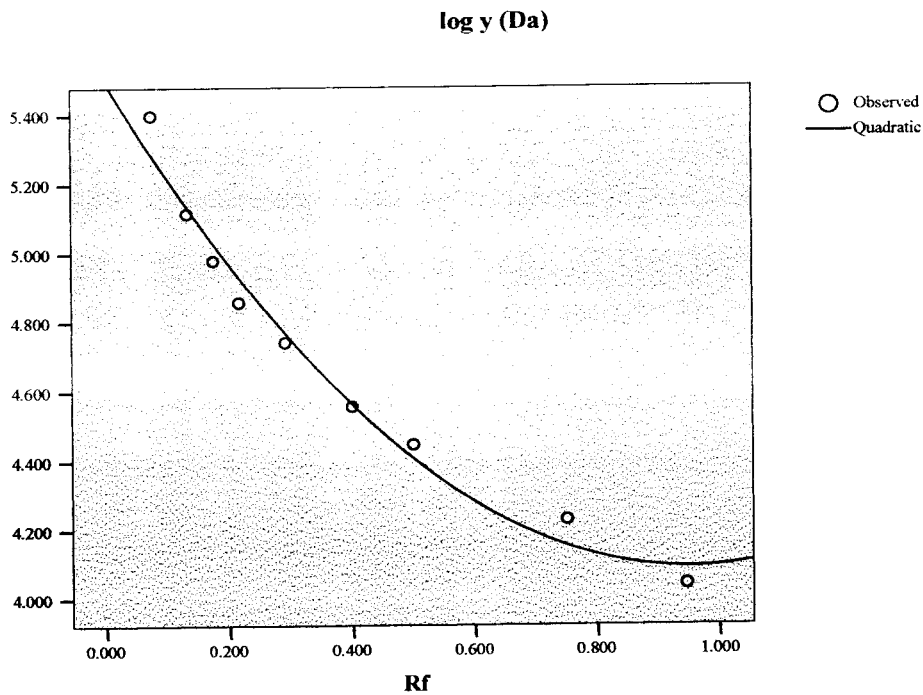
Lampiran 2. : Western Blotting

Summarize

Case Summaries ^a

		jarak	Rf	log y (Da)
1		9.0	.075	5.398
2		16.0	.133	5.114
3		21.0	.175	4.978
4		26.0	.217	4.857
5		35.0	.292	4.740
6		48.0	.400	4.556
7		60.0	.500	4.447
8		90.0	.750	4.230
9		113.5	.946	4.041
Total	N	9	9	9
	Sum	418.5	3.488	42.361
	Mean	46.500	.38756	4.70678
	Std. Deviation	35.5405	.296208	.433250

a. Limited to first 100 cases.



Quadratic**Model Summary**

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
.989	.979	.972	.072

The independent variable is Rf.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1.470	2	.735	140.268	.000
Residual	.031	6	.005		
Total	1.502	8			

The independent variable is Rf.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf	-2.964	.374	-2.026	-7.919	.000
Rf**2	1.559	.363	1.100	4.298	.005
(Constant)	5.500	.071		76.926	.000

Penghitungan BM pada Sampel

jarak	Rf	Log y* kDa	BM y Da	BM y kDa
12.0	0.100	5.219	165577.0	165.6
33.5	0.279	4.794	62230.0	62.2
47.0	0.392	4.578	37844.3	37.8
90.0	0.750	4.154	14256.1	14.3
97.0	0.808	4.123	13273.9	13.3

$$*y = 5,5 - 2,964 x + 1,559 x^2$$