

# SKRIPSI

**EFEKTIVITAS PENCUCIAN WHOLE MEMBRANE TERHADAP  
KADAR OUTER MEMBRANE PROTEIN (OMP)  
*Brucella abortus* S-19 DIUKUR DENGAN  
METODE BRADFORD PROTEIN ASSAY**



Oleh :

**KATERINE ARYNIARSIH**

**NIM 060513489**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2008**

**Efektivitas Pencucian *Whole Membrane* Terhadap Kadar  
*Outer Membrane Protein (OMP) Brucella abortus S-19*  
Diukur Dengan Metode *Bradford Protein Assay***

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

**KATERINE ARYNIARSIH**

**NIM 060513489**

**Menyetujui**

**Komisi Pembimbing**



**(R. Budi Utomo, MSi., drh)**

**NIP. 130 701 129**

**Pembimbing pertama**



**(Dr. Widjiati, MSi., drh)**

**NIP. 131 877 882**

**Pembimbing kedua**

**PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**EFEKTIVITAS PENCUCIAN *WHOLE MEMBRANE* TERHADAP KADAR  
*OUTER MEMBRANE PROTEIN (OMP) Brucella abortus S-19* DIUKUR  
DENGAN METODE *BRADFORD PROTEIN ASSAY***

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, Agustus 2008



Katerine Aryniarsih  
NIM 060513489

Telah diuji pada

Tanggal : 14 Agustus 2008

**KOMISI PENGUJI SKRIPSI**

**Ketua** : Dr. Imam Mustofa, M.Kes., drh

**Anggota** : Retno Bijanti, M.S., drh

Wiwiek Tyasningsih, M.Kes., drh

R. Budi Utomo, M.Si., drh

Dr. Widjiati, M.Si., drh

Surabaya, 27 Agustus 2008

Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D.,Drh.  
NIP. 130 687 305

EFFECTIVENESS OF WASHING WHOLE MEMBRANE TO LEVEL OF  
OUTER MEMBRAN PROTEIN (OMP) *Brucella abortus* S-19 MEASURED BY  
BRADFORD PROTEIN ASSAY METHOD

Katerine Aryniarsih

ABSTRACT

The purpose of the research is to see the effectiveness from washing whole membrane to level of outer membrane protein *Brucella abortus* S-19 is measured by Bradford Protein Assay method. The sample being used in this research is the stock of whole membrane active bacteria *Brucella abortus* S-19 from Pusvetma Surabaya. To ensure its purity, bacteria was grown at Potato Agar. The sample was washed using PBS followed by centrifugation for 25 minutes with 5000 rpm speed to get the residue bacteria. Sonication of the whole membrane is done with an ultra homogenizer, which aimed to break the wall of a bacteria cell in order to get the outer membrane protein (OMP). Then the OMP is added to PBS and it was centrifugated. The level of the OMP was counted by adding the standard formula BSA and reagent Bradford to be measured by Bradford protein assay with 595 nm. The results of research showed that the numerical of Bradford counted were 3,84 g% and 3,42 g% at once washing, 3,45 g% and 3,39 g% at twice washing and the last at three times washing showed that the results 3,25 g% and 3,24 g%. Result showed that the number of washing did not give effect to level of the protein from OMP *Brucella abortus* S-19.

**Key words** : washing whole membrane, OMP, *Brucella abortus* S-19, Bradford Protein Assay

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Efektivitas Pencucian *Whole Membrane* Terhadap Kadar *Outer Membrane Protein (OMP) Brucella abortus S-19* Diukur Dengan Metode *Bradford Protein Assay***. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh atas kesempatannya mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak R. Budi Utomo, MSi.,drh sebagai pembimbing pertama dan Ibu Dr.Widjiati, MSi., drh sebagai pembimbing kedua atas saran dan bimbingannya dalam penulisan proposal seminar hasil ini.

Bapak Dr. Imam Mustofa, M.Kes., drh. selaku ketua penguji, Ibu Retno Bijanti, M.S.,drh. selaku sekretaris penguji dan dosen ketua penelitian, Ibu Wiwiek Tyasningsih, M.Kes., drh selaku anggota penguji.

Ibu M. Gandul Atik Yuliani, M.Kes., drh, Ibu Ratih Ratnasari , SU., drh yang sangat membantu penulis dalam penelitian dan telah memberi banyak masukan demi perbaikan dalam penyusunan proposal hasil dan Ibu Jola Rahmahani, drh. selaku dosen wali atas dorongan semangat dan bimbingannya selama ini.

Klinik Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Kepala *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga,

Kepala Pusat Veterinaria Farma Surabaya dan seluruh staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Kedua orang tuaku H.Sunardi dan Hj.Isturiningsih dan kakakku tercinta Didik Istiardi yang telah memberikan segalanya, bantuan, doa, dorongan semangat dan semua yang tak tergantikan. Keluarga besar Kutoarjo, Klaten, teman satu penelitian Desty, Novalia, Umar dan teman-teman seperjuangan Laksmi, Wulan, Renti, Tyas, Rizky, angkatan 2004 yang tidak bisa di sebutkan satu persatu, anak-anak MT6A atas (Ari, Atik, Neny, Widya) dan teman-teman KKN ke-37 terimakasih atas semangat yang diberikan dan persahabatan yang indah selama ini.

Akhirnya penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, sehingga penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang berguna untuk penyempurnaan skripsi ini. Harapan penulis semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan terutama dibidang kedokteran hewan dan bagi masyarakat pada umumnya.

Surabaya, Agustus 2008

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERNYATAAN .....	ii
HALAMAN IDENTITAS .....	iii
ABSTRACT.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG .....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Landasan Teori.....	6
1.4 Tujuan Penelitian .....	7
1.5 Manfaat Penelitian .....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	8
2.1 Brucellosis.....	8
2.2 <i>Brucellosis abortus</i> .....	9
2.2.1 Klasifikasi .....	9
2.2.2 <i>Brucella abortus</i> S-19 .....	10
2.2.3 Morfologi dan Sifat Pewarnaan.....	10
2.2.4 Sifat Biakan.....	11
2.2.5 Pencegahan, Pengobatan dan Pemberantasan Brucellosis.....	12
2.3 Pencucian <i>Whole Membrane</i> dan Sonikasi.....	13
2.4 <i>Outer Membrane Protein</i> .....	14
2.5 <i>Bradford Protein Assay</i> .....	16
BAB 3 MATERI DAN METODE.....	18
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	18
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	18
3.3 Metode Penelitian .....	19
3.3.1 Pencucian <i>Whole Membrane</i> .....	19
3.3.2 Pemisahan OMP <i>Brucella abortus</i> S-19 dengan Teknik sonikasi .....	19
3.3.3 Penentuan Kadar OMP dengan metode <i>Bradford Protein Assay</i> .....	20
3.4 Kerangka operasional.....	22



BAB 4 HASIL PENELITIAN .....	23
BAB 5 PEMBAHASAN .....	24
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	27
6.1 Kesimpulan .....	27
6.2 Saran .....	27
RINGKASAN .....	28
DAFTAR PUSTAKA .....	30
LAMPIRAN .....	34

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4 Hasil pembacaan spektrofotometer <i>outer membrane protein</i> (OMP) <i>Brucella abortus</i> S-19 .....	23

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar	Halaman
2.1 Gambaran Mikroskopik <i>Brucella abortus</i> .....	11
2.2 Biakan <i>Brucella abortus</i> S-19 Pada Media TSA.....	12
2.3 Model Dinding Sel Bakteri Gram negatif.....	16
2.4 Skema Reaksi Reagen Bradford.....	17

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Uji kemurnian stok <i>Brucella abortus</i> S-19.....	34
2. Alur Pencucian <i>Whole Membrane</i> .....	35
3. Alur Pemisahan OMP <i>Brucella abortus</i> S-19 dari <i>Whole Membrane</i> dengan Teknik sonikasi .....	36
4. Penghitungan Hasil Pemeriksaan Kadar Protein OMP <i>Brucella abortus</i> S-19 .....	37
5. Perhitungan hasil pembacaan spektrofotometer dengan menggunakan ANOVA.....	38
6. Gambar Peralatan Penelitian.....	40

**SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG**

<b>BCA</b>	: Bicinchonic Acid
<b>BSA</b>	: Bovine Serum Albumin
<b>CFT</b>	: Complement Fixation Test
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Carbon Dioksida
<b>ELISA</b>	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>g%</b>	: Gram persen
<b>kHz</b>	: Kilo Herzt
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton
<b>LPS</b>	: Lipopolisakarida
<b>mg</b>	: mili gram
<b>MHz</b>	: Mega Herzt
<b>μl</b>	: Mikro liter
<b>ml</b>	: Mili liter
<b>MRT</b>	: Milk Ring Test
<b>NaCl</b>	: Natrium Clorida
<b>nm</b>	: Nano meter
<b>OIE</b>	: Office International des Epizooties
<b>OMP</b>	: Outer Membrane Protein
<b>PA</b>	: Potato Agar
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffer Saline
<b>RBT</b>	: Rose Bengal Test
<b>S-19</b>	: Strain 19
<b>SAT</b>	: Serum Agglitination Test
<b>SIM</b>	: Sulfit Indol Motility
<b>TSA</b>	: Trypticase Soy Agar
<b>UV</b>	: Ultra Violet
<b>WHO</b>	: World Health Organization

# **BAB 1**

# **PENDAHULUAN**

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki potensi peternakan yang cukup menjanjikan. Letak geografis yang mendukung menyebabkan banyak penduduk Indonesia memilih untuk beternak, khususnya penduduk yang berada di daerah pedesaan. Mereka beranggapan bahwa ternak merupakan tabungan masa depan. Namun ada beberapa kendala yang sering dihadapi oleh peternak yaitu salah satunya adalah adanya penyakit yang dapat menyebabkan kerugian ekonomi berupa penurunan produktifitas ternak betina dan infertilitas pada pejantan. Salah satu contohnya adalah penyakit brucellosis, penyebabnya yang diketahui selama ini merupakan bakteri dari genus *Brucella*. Pada sapi dan manusia kejadian brucellosis umumnya disebabkan oleh spesies *Brucella abortus*. Selain itu bakteri *Brucella* dapat juga menginfeksi kuda, anjing, babi, dan domba. Brucellosis mempunyai nama lain diantaranya *Undulant fever*, *Malta fever*, *Gibraltar fever* (pada manusia), *Mediterranean fever*, *Contagious abortion*, *Abortion fever*, *Infectious abortion*, *Epizootic abortion*, *Bang's disease* (pada sapi), dan *Ram epididymitis* (pada domba) (Gilsdorf, 1996 ;Subronto, 2003).

Kejadian penyakit brucellosis bersifat zoonosis dan penyebarannya *wideworld* atau dapat tersebar diseluruh dunia. Brucellosis merupakan penyakit pandemik kecuali Inggris dan Australia, dan prevalensinya tinggi di negara yang tidak melakukan pasteurisasi pada produk sapi perah, khususnya daerah Eropa

bagian Mediterranean , Timur Tengah, dan Amerika bagian Selatan. Brucellosis sudah lama dikenal di Indonesia terutama sejak ditemukannya kasus di Pulau Jawa pada sapi perah. Prevalensi brucellosis tinggi di daerah Nusa Tenggara Timur dan Sulawesi Selatan, sedangkan di daerah transmigrasi seperti Kalimantan dan Sumatera prevalensinya relatif rendah (Boschioli *et al* ., 2004 ; World Animal Health, 2004).

Infeksi *Brucella abortus* pada sapi betina menyebabkan terjadinya keguguran yang dikenal dengan penyakit keluron menular, *Contagious Abortion*, atau *Epizzotic Abortion* dan biasanya sapi yang terinfeksi akan mengalami abortus hanya sekali, umumnya pada kebuntingan yang pertama kali. Sedangkan pada kebuntingan berikutnya sapi tidak abortus, namun kuman *Brucella* tetap tinggal di uterus dan susu (sebagai carier) (Nielsen dan Duncan, 1990; Corner, 1993; Richey dan Harrell, 1996).

Pada manusia bakteri *Brucella abortus* dapat menyebabkan *undulant fever*. Setiap tahun kasus brucellosis kurang lebih mencapai 500.000 kasus di seluruh dunia (WHO) dan penyakit ini sering ditandai dengan gejala demam *intermittent*, sakit kepala, keletihan, tulang sendi terasa sakit, gangguan kejiwaan, dan gejala lainnya. Manusia dapat tertular dari produk hewan yang terinfeksi seperti susu, biasanya susu yang tidak terpasturisasi dengan baik dan organ hewan yang terinfeksi. Orang yang memiliki resiko tinggi terinfeksi *Brucella* adalah para pemilik hewan, dokter hewan, penyembelih hewan dan orang yang suka mengkonsumsi susu yang tidak terpasturisasi dengan baik dan produk sapi perah lainnya, dan pemerah susu. Tingkat prevalensi kejadian brucellosis pada manusia



hampir sama dengan infeksi pada hewan *reservoir*. Program pemberantasan brucellosis pada hewan akan menyebabkan kasus pada manusia juga berkurang.

Di Indonesia kecenderungan meningkatnya populasi dan seringnya terjadi perpindahan sapi perah merupakan penyebab utama meningkatnya kasus brucellosis, maka penyakit tersebut pada sapi dimasukkan dalam daftar penyakit menular yang harus dicegah dan diberantas sejak tahun 1959. Pada daerah yang mempunyai populasi sapi yang padat, memiliki kecenderungan penularan penyakit lebih cepat. Dilaporkan bahwa setiap kali sapi penderita mengalami keguguran atau melahirkan anak, sejumlah kuman yang dihasilkan mampu menginfeksi sekitar 600.000 ekor ternak di sekitarnya. Sapi dalam suatu peternakan dapat tertular karena peternak memasukkan sapi baru yang berasal dari luar, baik jantan maupun betina bahkan pedet maupun dewasa dan sapi yang dalam keadaan bunting menderita infeksi secara laten. Kurangnya diagnosa dini pada penderita brucellosis juga merupakan salah satu penyebab meningkatnya kasus penyakit ini (Geong, 2002; Subronto, 2003).

Brucellosis dapat menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup besar, yang diakibatkan abortus, kematian dan kelemahan pedet, infertilitas, jarak antara kelahiran (*calving interval*) menjadi panjang, sterilitas, penurunan produksi susu serta biaya pengobatan dan pemberantasan yang cukup mahal. Bila anak sapi yang lahir dari induk penderita dapat bertahan hidup, maka umumnya anak sapi tersebut sangat peka terhadap penyakit dan cenderung mengalami kekerdilan. Dilaporkan paling sedikit 37 % sapi yang tertular brucellosis mengalami keguguran tiap tahun. Di Indonesia kerugian ekonomi yang ditimbulkan oleh

brucellosis pada sapi potong berkisar Rp 138,5 Milyar per tahunnya (Geong, 2002; Direktorat Kesehatan Hewan dan Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan, 2004).

Semakin meningkatnya angka kejadian brucellosis maka perlu dilakukan tindakan diagnosis dini untuk membantu dalam upaya pencegahan, penyebaran dan penanggulangan penyakit. Selama ini diagnosa didasarkan pada sejarah penyakit, gejala klinis, perubahan pasca mati, isolasi dan identifikasi terhadap kuman penyebab serta melakukan uji serologis. Pada sapi sering kali tidak menunjukkan gejala klinis sehingga para peternak tidak dapat melakukan pengobatan secara dini. Uji serologi yang dapat digunakan untuk diagnosis antara lain uji Aglutinasi Serum (*Serum Agglutination Test/SAT*), uji Ikat Komplemen (*Complement Fixation Test/CFT*), uji Rose Bengal (*Rose Bengal Test/RBT*), dan uji Cincin Air Susu (*Milk Ring Test/MRT*). Bakteri *Brucella* mempunyai stuktur yang cukup kompleks, sehingga untuk mendeteksi antigen dari infeksi bakteri dapat dengan ELISA namun terkadang mendapat kesulitan karena stuktur yang kompleks sehingga sering terjadi reaksi silang satu sama lain. umumnya antigen yang digunakan sebagai materi kit diagnostik untuk uji serologi berupa antigen utuh (*whole membrane*), sehingga seringkali terjadi reaksi positif palsu dan memiliki sensitifitas dan spesifitas yang rendah. Untuk menghindari reaksi yang tidak dikehendaki maka diperlukan material yang mempunyai spesifitas tinggi (Rantam, 2003).

Melihat kendala tersebut maka dilakukan penelitian untuk membuat antigen diagnostik dengan menggunakan komponen protein membran luar atau

*outer membrane protein* (OMP) yang merupakan bagian dari *whole membrane Brucella abortus* S19 yang digunakan sebagai sarana pendeteksi antibodi. OMP digunakan karena memiliki sifat yang spesifik, sensitif dan lebih aman bila dibandingkan dengan *whole membrane*. Akhir-akhir ini uji penyakit yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif dengan menggunakan OMP telah dikembangkan di beberapa negara termasuk Indonesia, tetapi sampai saat ini belum dilakukan sebagai pemeriksaan rutin mengingat masih perlunya dilakukan penelitian yang lebih lanjut. Untuk mendapatkan OMP maka dilakukan proses sonikasi *whole membrane* yang sebelumnya *whole membrane* tersebut didahului dengan pencucian menggunakan PBS, umumnya pencucian hanya dilakukan sekali atau ada juga beberapa peneliti yang melakukan pencucian sebanyak dua kali. Melihat adanya perbedaan jumlah pencucian tersebut maka peneliti ingin mengetahui pengaruhnya terhadap kadar OMP yang nantinya akan dihitung kadar proteinnya (Muliawan dan Surjawidjaja, 1999; Quinn *et al.*, 2002; Widjajanto, 2004).

Pengukuran kadar protein *outer membrane protein* dapat dilakukan dengan menggunakan metode *colorimetric* diantaranya yaitu *Lowry*, *Bicinchonic acid (BCA)* dan *Bradford*, dari semua metode pengukuran protein tersebut yang paling umum digunakan adalah metode *Bradford protein assay* karena memiliki keunggulan dibandingkan metode yang lain yaitu mudah dilakukan dengan bahan-bahan yang lebih sederhana, cepat, spesifisitas untuk protein lebih tinggi, sangat sensitif dan murah. Hasil dari pengukuran ini nantinya digunakan sebagai dasar

untuk menentukan dosis OMP yang akan diimunisasikan pada kelinci percobaan (Bradford, 1976 ; Kin Yu Chen dan Bruce, 1993).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan di atas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut;

Bagaimanakah efektifitas pencucian *whole membrane* terhadap kadar *outer membrane protein*(OMP) *Brucella abortus* S-19 diukur dengan menggunakan metode *Bradford Protein Assay*?

## 1.3 Landasan teori

Brucellosis adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Brucella spp* dan bersifat zoonosis. Brucellosis pada sapi umumnya disebabkan *Brucella abortus*. Penyakit ini mampu menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar karena dapat menyebabkan infertilitas temporer maupun permanen serta menurunnya produksi susu (Laing, 1997)

Pencucian dengan PBS pada *whole cell* digunakan untuk membersihkan endapan bakteri dari nutrisi pembiakan dan menginduksi munculnya protein terlarut sehingga akan diperoleh konsentrasi protein yang kuat saat dibaca dengan spektrofotometer (Portnoy *et al.*, 1999).

Permukaan luar dinding sel bakteri Gram negatif (*outer membrane*) terdiri dari 2 komponen yang telah diidentifikasi sebagai faktor virulensi yang potensial yaitu protein membran luar (*Outer Membran Protein/OMP*) dan Lipopolisakarida

dipisahkan dari *whole membrane*. *Outer membrane protein* *Brucella* telah banyak diteliti dalam usaha mendapatkan antigen yang dapat digunakan untuk diagnosa maupun untuk vaksinasi terhadap kejadian brucellosis. Bradford merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk menentukan kadar protein karena sensitifitas dan keakuratan tinggi bila digunakan untuk pengukuran protein terlarut. (Kin Yu Chen dan Bruce, 1993; Quinn *et al.*, 2002).

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk melihat efektifitas pencucian *whole membrane* terhadap kadar *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* S-19 diukur dengan menggunakan metode *Bradford Protein Assay*.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan informasi tentang efektifitas penambahan jumlah pencucian terhadap kadar *outer membrane protein* *Brucella abortus* S-19 yang diukur dengan metode *Bradford protein assay*. OMP dihitung kadar proteinnya untuk menentukan dosis OMP yang akan diimunisasikan pada kelinci percobaan.

## **BAB 2**

# **TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Brucellosis

Brucellosis adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri dari genus *Brucella*. *Brucella* pertama kali diisolasi oleh Sir David Bruce pada tahun 1887 dari seorang penderita di pulau Malta sehingga penyakitnya dikenal dengan nama demam Malta/Mediterranean pada manusia dan bakteri penyebabnya diberi nama *Micrococcus melitensis* (sekarang *Brucella melitensis*). Bakteri *Brucella* pada sapi yang berhasil diisolasi dari plasenta sapi yang mengalami abortus oleh Bang pada tahun 1897, kemudian bakteri tersebut diberi nama *Brucella abortus* dan penyakitnya dikenal dengan nama *Bang's disease* atau *Contagious abortion*. Sedangkan Traum juga menemukan bakteri serupa pada tahun 1914 pada babi yang dinamainya *Brucella suis* (Merchant dan Packer, 1971).

Ada enam spesies yang termasuk dalam golongan genus *Brucella* yaitu *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*. Klasifikasinya didasarkan pada patogenitas dan *host*nya. Seperti kejadian suatu penyakit brucellosis pada kambing utamanya disebabkan oleh spesies *B. melitensis*, *B. abortus* pada sapi, *B. ovis* pada domba, *B. suis* yang menyerang hewan babi, dan *B. canis* pada anjing, sedangkan *B. neotomae* sering menyerang hewan pengerat kayu seperti tikus dan berang-berang. Baru-baru ini dua spesies baru dimasukkan dalam spesies tambahan pada genus *Brucella* yaitu *Brucella cetaceae* dan *Brucella pinnipediae* yang diisolasi dari mamalia laut *cetacea* dan *pinnipeds* secara berturut-turut (Cardoso *et al.*, 2006).

Brucellosis pada sapi umumnya disebabkan oleh *Brucella abortus* dengan nama lain *Bacillus abortus* atau *Bang's bacillus*. *Brucella* jenis ini bersifat sangat patogen dan memiliki area penyebaran yang luas. Sapi merupakan induk semang definitif (*host*) dan predileksinya di organ reproduksi baik betina maupun jantan dan jaringan retikulumendotelial sehingga dapat terjadi lesi pada saluran alat reproduksi, *retained placenta*, orchitis, dan epididimitis. Bila sapi yang terinfeksi sedang bunting maka *Brucella abortus* akan masuk ke uterus, pada kebuntingan pertama akan menyebabkan plasentitis dan diikuti terjadinya abortus. Sapi abortus biasanya terjadi setelah bulan kelima dari masa kebuntingan. *Brucella abortus* dapat diekskresikan melalui urin dan air susu (Timoney *et al.*, 1988; Hardjopranjoto, 1995; OIE, 2004).

## 2.2 *Brucella abortus*

### 2.2.1 Klasifikasi

Klasifikasi bakteri *Brucella abortus* menurut Ryan (2004), sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Alphaproteobacteria
Ordo	: Rhizobiales
Famili	: Brucellaceae
Genus	: <i>Brucella</i>
Spesies	: <i>Brucella abortus</i>

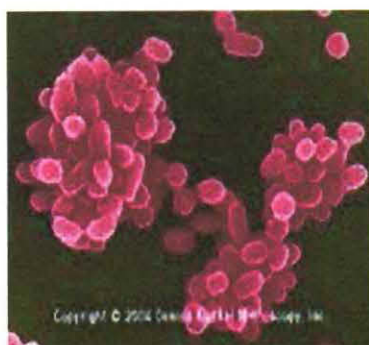


### 2.2.2 *Brucella abortus* S-19

*Brucella abortus* S-19 merupakan salah satu strain/galur yang dimiliki oleh *Brucella abortus* dan dapat diisolasi dari susu serta masih memiliki kemampuan untuk menyebabkan keluron pada sapi bunting bila disuntikkan pada sapi tersebut. *Brucella abortus* S-19 memiliki beberapa keunggulan diantaranya koloni bersifat halus, aerotoleran, apatogen atau patogenitasnya rendah dan dapat tumbuh tanpa CO<sub>2</sub> sehingga dapat digunakan untuk vaksin maupun antigen diagnostik, umumnya vaksin *Brucella abortus* dari strain 19 adalah vaksin hidup (Alton *et al.*, 1988).

### 2.2.3 Morfologi dan Sifat Pewarnaan

*Brucella abortus* strain 19 merupakan bakteri Gram negatif, bentuknya seperti batang bulat (coccobacillus) ataupun batang pendek dengan ukuran antara 0,6-1,5 x 0,5-0,7 µm (gambar 2.1), tidak berspora, non motil, tidak berkapsul dan fakultatif aerobik (dapat hidup dengan atau tanpa oksigen) dan tahan terhadap kering. Pada beberapa *host* *Brucella* bersifat fakultatif intraselluler patogen. Pewarnaan Gram dengan metode ulas menghasilkan warna merah yang menunjukkan bakteri Gram negatif dan *Brucella abortus* sering ditemukan hidup berpasangan atau bergerombol (Gilsdrof, 1996; Vemulapalli, 2000).

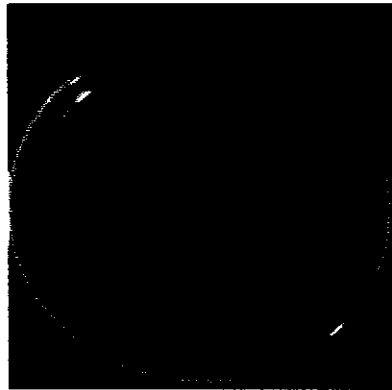


Gambar 2.1 Gambaran Mikroskopik *Brucella abortus* (Sumber : Kunkel, 2004).

#### 2.2.4 Sifat Biakan

*Brucella abortus* dapat diisolasi dari susu, air ketuban, dan dapat dilakukan pembiakan pada *Serum Dextrose Agar* (SDA), media *Potato Agar* (PA), *Trypticase Soy Agar* (TSA), *Trytose Thiamine Agar* dan *Blood Agar* (Marchant dan Packer, 1971). *Brucella abortus* adalah bakteri fakultatif intraselluler aerob, tetapi ada beberapa strain dari bakteri tersebut membutuhkan 5% sampai 10% CO<sub>2</sub> untuk pertumbuhannya. Media yang paling umum digunakan untuk perbenihan bakteri adalah dengan media *Potato Agar* yang diinkubasi selama 24 jam dengan temperatur 37°C sedangkan waktu untuk perbenihan bakteri pada *Trypcase Soy Agar* berkisar 48 jam dan diinkubasikan pada suhu 37 °C. Temperatur 37 °C merupakan temperatur optimum, pertumbuhan terjadi pada temperatur antara 20<sup>0</sup> sampai 40 °C, pH optimal berkisar 6,6-7,4 dan semua strain dari *Brucella* tidak tahan terhadap temperatur 56 °C, dan pada suhu lebih dari 85 °C mampu membunuh bakteri *Brucella*. Pada uji biokimia *Sulfit Indol Motility* (SIM) menunjukkan hasil yang negatif, oksidase positif, katalase positif, *Simon Citrate Agar* menunjukkan hasil negatif dan urea

positif, pada media TSA terlihat koloni kecil dan berwarna krem (gambar 2.2)(Corbel *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2002; Abtahi *et al.*, 2003).



Gambar 2.2 Biakan *Brucella abortus* strain 19 pada media TSA

#### 2.2.5 Pencegahan, Pengobatan dan Pemberantasan Brucellosis

Pencegahan lebih diutamakan dari pada pengobatan. Pencegahan dapat dilakukan dengan pengawasan dengan membuat peraturan yang melarang penjualan sapi yang positif secara serologis, dan program yang intensif dan terjadwal pada semua sapi di daerah tertular. Pengawasan juga baik dilakukan dengan pemotongan sapi yang sudah kronis, sanitasi yang lebih baik dan dilakukan vaksinasi untuk hewan dewasa dan pedet.

Vaksinasi biasanya hanya diberikan pada anak sapi betina yang berumur antara 6 sampai 9 bulan dengan harapan antibodi dalam serum telah menurun ke tingkat rendah pada waktu pengujian serologi sewaktu dewasa. Bila seekor pedet divaksin sebelum mencapai umur 6 bulan, meskipun tetap kebal, pedet tersebut kehilangan antibodi untuk uji aglutinasi serum dan ikut komplemen selama 12 bulan. Penyuntikan setelah pedet berumur 9 bulan mengakibatkan antibodi yang

lebih persisten sifatnya, dan dapat menimbulkan masalah dalam menafsirkan hasil serologi. Penafsiran hasil uji serologis juga perlu dikonfirmasi dengan uji diagnosa lain agar diagnosa yang dilakukan dapat lebih tepat (Tizard, 1988; Subronto, 2003).

Vaksin yang dapat digunakan adalah vaksin *Brucella abortus* strain 19 yaitu bentuk vaksin hidup dan vaksin kuman mati strain 45/20 yang diberi adjuvan. Vaksinasi pada masa pedet bertujuan untuk menurunkan reaktor sampai sebesar 2-4% saja. Sedangkan pada sapi yang bunting tidak boleh divaksinasi karena akan diikuti dengan abortus tetapi angka kejadian sangat kecil sekitar 1-2,5% dari seluruh kejadian abortus (Gery, 2004).

*Brucella* adalah bakteri intraseluler, sehingga terlindung dari daya tubuh sapi dan aktifitas antibiotika. Pada hakekatnya tidak ada obat yang baik untuk pengobatan brucellosis. Pengobatan dipandang tidak efisien, walaupun hanya berkisar 15% saja sapi yang dapat sembuh secara alami. *Brucella abortus* merupakan bakteri yang resisten terhadap penicillin. Pengobatan dapat dilakukan dengan antibiotika seperti kombinasi *long-acting oxitetracycline* 25 mg/kg, *streptomycin* 25 mg/kg, dan *oxytetracycline intramammary infusion* untuk sapi perah dengan dosis 20 ml/puting susu selama 4 hari (Radwan *et al.*, 1993; Hardjopranjoto, 1995; Corbel *et al.*, 2002).

### 2.3 Efektivitas Pencucian *Whole Membrane* dan Sonikasi

*Whole membrane* merupakan sel utuh bakteri. *Whole membrane* terdiri dari beberapa bagian salah satunya membran luar yang mengandung OMP. OMP

diperoleh setelah dilakukan metode sonikasi. *Whole membrane* yang akan disonikasi sebaiknya dicuci terlebih dahulu atau *washing* menggunakan *washing buffer*, umumnya dengan PBS. Hal ini dilakukan jika bahan yang akan dianalisis protein mengandung reagen, maka bahan sampel tersebut perlu dilakukan pemurnian atau untuk mendapatkan supernatan dan *pellet* yang mengandung protein terlarut. Pencucian dianggap cara yang efektif bila bahan yang akan dianalisis kadar proteinnya bersih dari nutrisi pembiakan (stabilizer) sehingga tidak meyulitkan/membuat rancu pembacaan kandungan proteinnya dengan spektrofotometer namun antigen yang berikatan dengan dinding sel utuh bakteri tidak banyak yang terlepas saat dilakukan pencucian (Widjajanto, 2004; Suryadi dkk, 2006).

Sonikasi merupakan metode yang digunakan untuk memecah dinding sel bakteri untuk mendapatkan bagian sel tertentu. Cara kerjanya dengan menggunakan frekwensi gelombang suara yang tinggi berkisar antara 18 kHz-1MHz (Chaplin, 2004).

#### **2.4 Outer Membrane Protein**

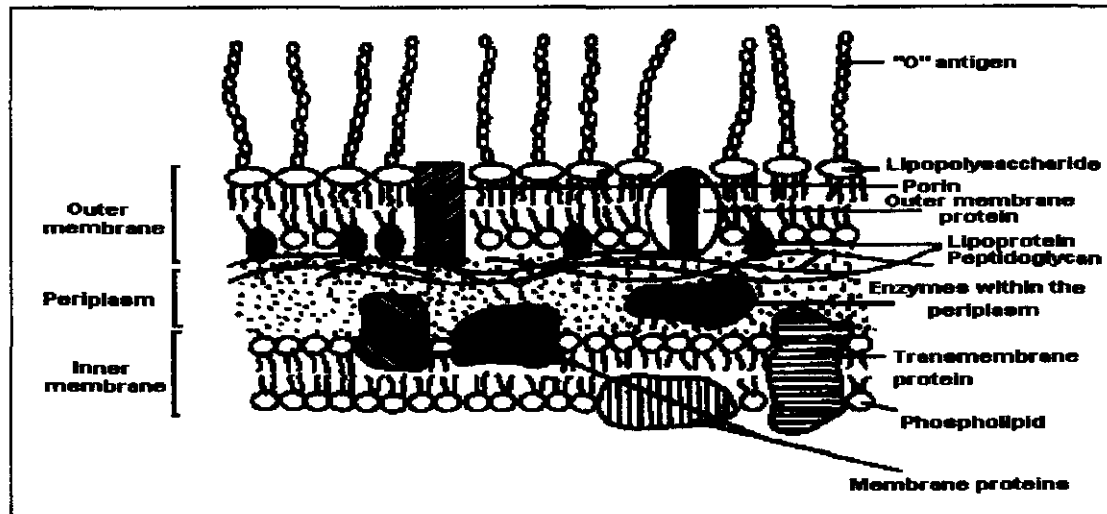
Protein ditemukan oleh Jöns Jakob Berzelius pada tahun 1838. Protein (akar kata *protos* dari bahasa Yunani yang berarti "yang paling utama") adalah senyawa organik kompleks berbobot molekul tinggi yang merupakan polimer dari monomer asam amino yang dihubungkan satu sama lain dengan ikatan peptida. Menurut Albert *et al* (1994) protein adalah polimer asam amino yang panjang dan linier, dalam gabungan kepala dengan ekor melalui ikatan peptid antara gugus

asam karboksilat pada satu asam amino dan gugus amino pada asam amino yang lain. Molekul Protein mengandung karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen dan kadang kala sulfur serta fosfor. Protein berperan penting dalam struktur dan fungsi semua sel makhluk hidup dan virus.

Sebagian besar strain *Brucella* membutuhkan media kompleks yang mengandung beberapa asam amino, thiamin, nicotinamid dan ion magnesium. Dinding sel *Brucella abortus* terdiri dari stuktur kompleks dengan kandungan protein paling sedikit 75 protein. Asam amino, alanin, arginin, aspartik, asam glutamik, glisin, histidin, leusin/isoleusin, lisine, fenilalamin, prolin, serin, threonin dan tirosin diidentifikasi sebagai komponen murni dinding sel strain halus genus *Brucella* salah satunya *Brucella abortus* S-19 (Corbel *et al.*, 2002).

*Brucella abortus* strain 19 merupakan salah satu contoh bakteri Gram negatif, yang memiliki dinding sel kompleks yang tersusun dari 2 komponen penting yaitu lapisan *outer membrane* dan *inner membrane*, periplasma diantara kedua lapisan tersebut. *Outer membrane* merupakan lapisan paling luar dari dinding bakteri yang terdiri dari lapisan lipid dengan kadar rata-rata 11-22% seperti utamanya Lipopolisakarida (LPS), *outer membrane protein* (OMP) dan pada bagian inner tersusun fosfolipid dan lipoprotein, sedangkan periplasma berisi lapisan peptidoglikan yang terdapat protein dan enzyme. Lapisan fosfolipid, *outer membrane protein* dan lipopolisakarida membentuk 80% dari dinding sel bakteri utuh. Komponen utama yang terpenting dari dinding sel adalah lapisan lipopolisakarida, yang terdiri dari rantai polisakarida spesifik yang menentukan

sifat antigenik dan aktifitas endotoksin (Karsinah dkk. 1994; Heritage, 2004; Kuchn dan Nicole, 2005).



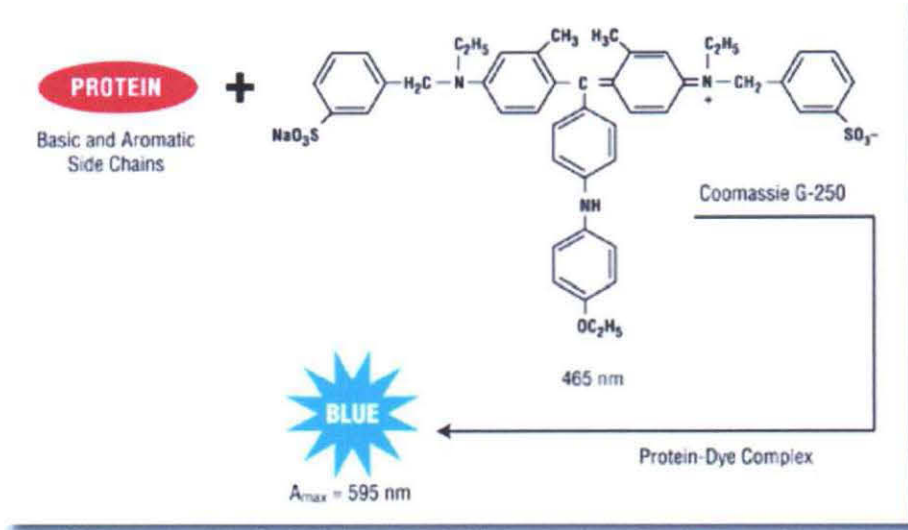
Gambar 2.3 Model dinding sel bakteri Gram negatif (Sumber :Heritage, 2004)

Protein membran luar atau *outer membrane protein* yang terletak pada permukaan bakteri Gram negatif ternyata merupakan antigen penting dalam menginduksi suatu respon imun spesifik. Protein membran yang dianalisis dengan immunoblotting menggunakan ekstrak sel *B. abortus* atau *B. melitensis* dan ELISA, menunjukkan berat molekul dari outer membrane protein (OMP) 10; 16,5; 19; 25; 36 sampai 38, dan 89 kDa. (Cloeckaert *et al.*, 1992 ; Muliawan dan Surjawidjaja, 1999).

## 2.5 Bradford Protein Assay

*Bradford protein assay* merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi/kadar protein dalam suatu larutan. Metode ini umum digunakan di banyak laboratorium untuk menentukan protein yang berisi pecahan sel dan menilai konsentrasi protein untuk electrophoresis gel. Metode ini

sederhana hanya memerlukan satu macam reagen, cepat hanya memerlukan waktu sekitar 5 menit, murah dan sensitif (Mikkelsen dan Eduardo, 2004).



Gambar 2.4 Skema reaksi reagen Bradford (Sumber : Thermo Scientific, 2008)

Pengukuran intensitas warna yang dihasilkan dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. *Coomassie brilliant blue solution* digunakan sebagai reagen yang melapisi protein. Intensitas warna yang dihasilkan dipengaruhi oleh banyaknya ikatan peptide dalam protein. *Coomassie brilliant blue solution* utamanya bereaksi dengan residu arginin dan sedikit bereaksi dengan *basic* residu (histidin dan lisin) dan *aromatic* residu (tirosin, triptofan, dan fenilalanin). Bradford lebih sensitive pada *bovine serum albumin* (BSA) dibandingkan rata-rata protein yang lain dan BSA digunakan sebagai standar dari hasil pengukuran absorbansi larutan, sehingga konsentrasi protein dari sampel ditentukan oleh perbandingan dari protein standar dengan menggunakan BSA (Bradford, 1976; Mikkelsen dan Eduardo, 2004).



## **BAB 3**

# **MATERI DAN METODE**

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya tempat pembiakan *Brucella abortus*, Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Laboratorium Patologi Klinik, Laboratorium Biomolekuler Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga serta di *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga yang dilaksanakan pada bulan Juni sampai bulan September 2007.

### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Penelitian ini menggunakan stok *Brucella abortus* S-19 aktif (BRUCIVET) kering beku yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

Bahan yang digunakan antara lain stok *Brucella abortus* S-19 aktif (*whole membrane*), *Phospat Buffer Saline* (PBS), 0,5 mg/ml *Bovine Serum Albumin* (Sigma), reagen Bradford ( *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Catalog number* 500-0006), 0,15 M NaCl, albumin, dan air es.

Alat yang digunakan meliputi sentrifuse, tabung sonikasi, ultrasonikator (*ultrasonic homogenizer*), *Refrigerated centrifuge* (himac SCR 20B “Hitachi”), *microcup*, tabung mikrosentrifuse, spektrofotometer (UV-1601 “Shimadzu”), dan pencatat waktu (*timer*).

### 3.3 Metode Penelitian

Sampel yang digunakan merupakan stok *Brucella abortus* strain 19 bentuk kering beku yang diperoleh dari Pusvetma Surabaya. Sampel bakteri bentuk kering beku dilarutkan dengan penambahan PBS sehingga menjadi suspensi bakteri, untuk memastikan stok *Brucella abortus* tersebut murni atau tidak maka dilakukan pembiakkan pada media TSA di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Sampel tersebut kemudian dicuci dengan tiga macam pencucian, pencucian dilakukan di laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Tahap selanjutnya adalah tahap sonikasi untuk memperoleh *outer membrane protein*. OMP yang diperoleh diukur kadar proteinnya dengan metode *Bradford protein assay* yang dibaca menggunakan alat spektrofotometer U.V (UV-1601 “Shimadzu”) dengan panjang gelombang 595 nm semuanya dilakukan di *Tropical Disease Center*.

#### 3.3.1 Pencucian *Whole Membrane*

Pencucian ini bertujuan untuk memperoleh protein yang bersih tidak bercampur dengan stabilizer, pencucian menggunakan PBS. Disediakan enam buah tabung sonikasi yang diberi label A1, A2, B1, B2, C1, dan C2 lalu sampel bakteri *Brucella abortus* S-19 aktif yang sudah berbentuk suspensi (bakteri kering beku 2 mg + PBS 20 ml) dimasukkan dalam 6 tabung sonikasi tersebut masing-masing tabung sebanyak 2 ml untuk kemudian disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit ini yang disebut dengan pencucian satu kali (tabung

A1 dan A2), kemudian lakukan pencucian lagi pada tabung B1, B2, C1 dan C2 dengan cara supernatan dari keempat tabung tersebut dibuang dan pelletnya ditambahkan 2 ml PBS lagi dan lakukan cara yang sama seperti pada pencucian pertama yaitu sentrifuse 5000 rpm selama 20 menit, kemudian lakukan lagi hal yang sama sekali lagi pada tabung C1 dan C2 (pencucian ketiga) untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan dari banyaknya pencucian terhadap kadar protein yang diperoleh.

### 3.3.2 Pemisahan OMP *Brucella abortus* S19 dari *Whole Membrane* dengan Teknik Sonikasi

Tiap perlakuan pencucian nantinya akan disonikasi dengan *ultrasonic homogenizer* frekwensi 25 kHz selama 3x3 menit (3 kali sonikasi setiap sonikasi 3 menit) dan setiap 3 menit sonikasi dihentikan selama 1 menit. Selama proses sonikasi tabung sonikasi yang berisi 2 ml sampel suspensi *Brucella abortus* S-19 dimasukkan dalam wadah yang telah diisi dengan air dingin (air bercampur es dan garam), usahakan agar jarum sonikator tidak menyentuh dasar tabung karena dapat menyebabkan tabung pecah. Kemudian supernatan yang diperoleh disentrifugasi dengan memakai *Refrigerated centrifuge* (Himac SCR 20B "Hitachi") dengan kecepatan 12000 rpm selama 20 menit, sehingga akan diperoleh *pellet*, *pellet* ini yang kemudian dibuang dan cairan bening yang berada di atasnya yang disebut supernatan diambil. Cairan bening ini merupakan OMP yang telah dipisah dengan *whole membrane* dan dimasukkan dalam *microcup* untuk disimpan sebagai bahan analisis protein (Widjajanto, 2004).

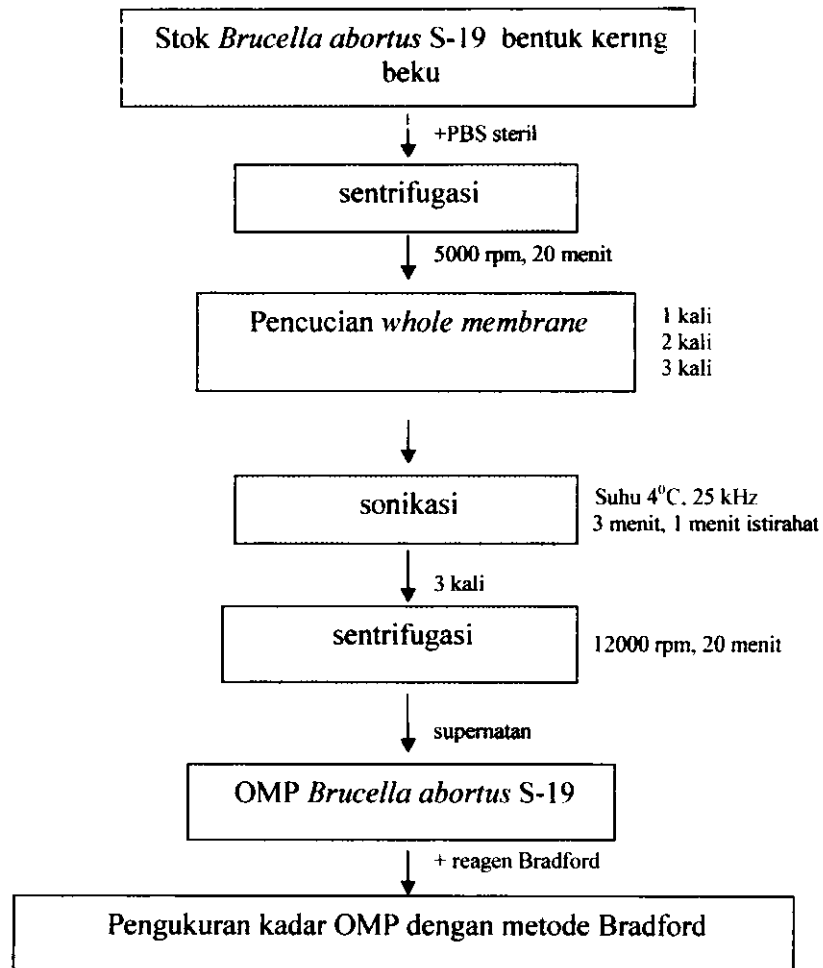
### 3.3.3 Penentuan Kadar OMP *Brucella abortus* S-19 dengan Metode *Bradford Protein Assay*

Penentuan kadar protein spesifik *Brucella abortus* S-19 dilakukan dengan menggunakan metode *Bradford Protein Assay* dengan penambahan larutan standar protein (BSA) dan dibaca dengan spektrofotometer U.V visible (UV-1601) dengan panjang gelombang 595 nm.

Sediakan delapan tabung mikrosentrifuse, 6 tabung masing-masing diisi 100 µl sampel suspensi bakteri yang akan diperiksa kadar protein *outer membrane* proteinnya ditambahkan dengan reagen Bradford (1 ml *coomassie brilliant blue solution*; 0,5 mg/ml BSA; 100 µl 0,15 M NaCl), satu tabung untuk blanko dan satu tabung lagi untuk larutan standar. Larutan standar berisi standar albumin (BSA) dengan konsentrasi standart albuminnya yang tertera 4,38 g %. Diamkan selama 2 menit pada suhu ruangan, kemudian intensitas warna yang dihasilkan dibaca dengan spektrofotometer dan dihitung kadar proteinnya (Bradford, 1976).

### 3.4 Kerangka Operasional

Untuk memperjelas gambaran penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada skema di bawah ini



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

## **BAB 4**

# HASIL PENELITIAN

## BAB 4 HASIL PENELITIAN

*Outer membrane protein Brucella abortus* S-19 yang diperoleh setelah sonikasi *whole membrane* dengan tiga macam pencucian, konsentrasi proteinnya diukur dengan metode *Bradford protein Assay* dengan menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm didapatkan hasil  $p > 0,05$ . Perhitungan selengkapnya dapat di lihat pada lampiran 6.

Tabel. Hasil pembacaan spektrofotometer *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* S-19.

Perlakuan	$\bar{x} \pm SD$
Pencucian 1x (A)	$3,52 \pm 0,45$
Pencucian 2x (B)	$3,42 \pm 0,04$
Pencucian 3x (C)	$3,245 \pm 0,01$



**BAB 5**  
**PEMBAHASAN**

## BAB 5 PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan sampel kering beku *Brucella abortus* S-19. Sampel *Brucella* tersebut dibuat suspensi dengan penambahan PBS dan kemudian disentrifugasi, ini yang disebut dengan pencucian. Pencucian dilakukan dengan tiga macam yaitu pencucian sekali, dua dan tiga kali pencucian ini untuk melihat perbedaan dari hasil ketiga pencucian tersebut terhadap kadar protein OMP yang dihasilkan. Pencucian dilakukan untuk memperoleh protein murni dari sampel bakteri yang dipisahkan dari stabilizer. Kemudian dilakukan sentrifus kembali, sentrifugasi berfungsi untuk memisahkan sel-sel dari suatu suspensi campuran sel dengan memanfaatkan perbedaan fisik sel (penguraian sel) sehingga akan didapat kuman yang cukup banyak yang diperoleh dari *pellet* yang merupakan endapan kuman. Kemudian dilakukan pemecahan pada membran sel bakteri dengan cara sonikasi. (Albert *et al.*, 1994; Widjajanto, 2004).

Sonikasi dilakukan dengan memasukkan tabung yang berisi sampel suspensi bakteri pada wadah yang dingin dengan suhu berkisar 4 °C hal ini bertujuan agar selama proses sonikasi protein tidak rusak, karena efek ultra sonikasi menimbulkan panas dan panas tersebut yang akan berpengaruh terhadap protein kuman. Sonikasi bertujuan supaya ikatan protein dari dinding sel kuman *Brucella abortus* S-19 dapat diekstraksikan protein struktural pada bagian luar dari sel yaitu OMP. OMP merupakan suatu bentuk protein yang menyusun suatu sel

yang bersifat imunogen karena terbentuk lebih dari 20 macam asam amino yang dapat merupakan epitop khusus. Epitop ini yang bertugas untuk rangsangan antibodi. OMP disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 rpm dengan penambahan PBS maka akan diperoleh bentuk suspensi protein dalam PBS sebagai protein terlarut (supernatan). Pengukuran kadar protein dari OMP menggunakan bagian supernatan karena memiliki berat molekul yang lebih kecil. Alat yang digunakan spektrofotometer sehingga diperlukan larutan standar BSA dalam pengukurannya dan apabila ingin mendapatkan protein spesifik perlu diadakan pengukuran berat molekul terhadap protein terlarut tersebut. (Widjajanto, 2004)

Kadar protein OMP dihitung secara kuantitatif dengan menggunakan metode *Bradford protein assay* dengan rekaman standar spektrum 595 nm. Prinsip kerja metode Bradford adalah protein akan berikatan dengan reagen Bradford yaitu *commassie brilliant blue solution* yang akan bereaksi dengan arginin dan ikatan peptida dan akan merubah warna reagen menjadi lebih gelap, intensitas warna yang dihasilkan paling baik diukur dengan panjang gelombang 595 nm yaitu frekwensi absorbansi maksimum pada *blue dye* menggunakan spektrofotometer. Frekwensi tersebut merupakan absorbansi terbaik menunjukkan konsentrasi protein tertinggi.

Hasil perhitungan pembacaan dari spektrofotometer menunjukkan angka rata-rata pada pencucian sekali 3,52 g%, dua kali 3,42 g% dan pada pencucian sebanyak tiga kali 3,245 g%. Hasil ini sepintas dapat dilihat bahwa konsentrasi atau kadar protein *outer membrane* protein dari *Brucella abortus* S-19 yang dicuci

sekali nilainya tertinggi, sedangkan pada pencucian kedua dan ketiga menunjukkan adanya penurunan konsentrasi protein. Namun saat dihitung menggunakan metode penghitungan anova (lampiran 5) menunjukkan bahwa ketiga macam pencucian tersebut tidak berbeda nyata/tidak bermakna ( $p>0,05$ ), dengan demikian pencucian *whole membrane* bakteri *Brucella abortus* S-19 dengan PBS tidak memberikan efek terhadap kadar protein OMP yang diperoleh meskipun dilakukan penambahan jumlah pencucian sebanyak dua maupun tiga kali. Hal ini menunjukkan OMP bakteri *Brucella abortus* S-19 terikat kuat pada dinding sel bakteri, sehingga tidak ikut terbilas saat *whole membrane* bakteri dicuci dengan PBS (Bradford, 1976; Suryadi dkk, 2006).

## **BAB 6**

# **KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa ternyata penambahan jumlah pencucian yang umumnya dilakukan sekali menjadi dua dan tiga kali pencucian tidak memberikan efek terhadap kadar protein OMP *Brucella abortus* S-19 yang diukur dengan metode *Bradford protein assay*.

### 6.2 Saran

Pencucian *whole membrane* menggunakan PBS dengan tujuan membersihkan/memisahkan *whole membrane* bakteri *Brucella abortus* S-19 dari stabilizer tidak perlu dilakukan pencucian berulang kali.

# RINGKASAN

## RINGKASAN

Brucellosis adalah penyakit yang disebabkan bakteri dari genus *Brucella*, pada sapi dan manusia kejadian brucellosis umumnya disebabkan oleh *Brucella abortus*. Brucellosis dapat menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup besar, yang diakibatkan abortus, kematian dan kelemahan pedet, infertilitas, jarak antara kelahiran (*calving interval*) menjadi panjang, sterilitas, penurunan produksi susu serta biaya pengobatan dan pemberantasan yang mahal (Hardjopranjoto, 1995).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat efektifitas pencucian terhadap kadar *outer membrane protein (OMP) Brucella abortus* S-19 diukur dengan menggunakan metode *Bradford Protein Assay*.

Sampel yang digunakan berupa stok kering beku *Brucella abortus* strain 19, untuk memastikan *Brucella abortus* tersebut murni/tidak maka dilakukan pembiakan pada media *Potato Agar* di Pusvetma Surabaya. Sampel tersebut kemudian di cuci dengan tiga macam pencucian lalu disonikasi dengan frekwensi 25 kHz selama 3 menit dengan dihentikan selama 1 menit, proses ini dilakukan sebanyak 3 kali untuk memperoleh *outer membrane protein*. OMP yang diperoleh kemudian diukur kadar proteinnya dengan metode *Bradford protein assay* yang dibaca dengan alat spektrofotometer U.V (*Ultra Violet*) dengan panjang gelombang 595 nm.

Protein akan berikatan dengan reagen Bradford yaitu *commassie brilliant blue solution* yang akan bereaksi dengan ikatan peptida dan akan merubah warna reagen menjadi lebih gelap dan untuk mengukur intensitas warna yang dihasilkan



digunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. Hasil pengukuran kadar *outer membrane protein* (OMP) menunjukkan tiga macam pencucian yang dilakukan tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ), ternyata penambahan jumlah pencucian yang umumnya dilakukan sekali menjadi dua dan tiga kali pencucian tidak efektif terhadap kadar OMP *Brucella abortus*S-19 yang diukur dengan metode *Bradford protein assay*

# DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Alton, G.G., L.M. Jones, and D.E. Pietiz. 1988. *Laboratory Techniques in Brucellosis*. 3<sup>rd</sup>Ed. WHO. Geneva. Switzerland.
- Abtahi, H., A.H. Salmanian., S. Rafati., G.H. Nejad and Z.H. Hassan. 2004. High Level Expression of Recombinant Ribosomal Protein (L7/L12) from *Brucella abortus* and Its reaction with Infected Human Sera. *Iran. Biomed. J.* 8 (1): 13-18
- Alberts, B., B. Dennis., L.Julian., R.Martin., R.Keith., and D.W. James. 1994. *Biologi Molekuler Sel*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Baratawidjaja, K.G. 2006. *Immunologi Dasar*. Edisi ke-7. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Boschiroli, M.L., V. Foulongne., O'Callaghan. 2001. Brucellosis: a Worldwide Zoonosis. *Current Opinion in Microbiology*. 2001; 4(1): 58 - 64. [PubMed: 11173035].
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254
- Cardoso P.G., C.M. Gilson., A. Vasco., and C.O.Aergio. 2006. *Brucella spp Noncanonical LPS: Structure, Biosynthesis, and Interaction with Host Immune System*. *Microbial Cell Factories*.
- Chaplin, M. 2004. *Ultrasonic cell disruption*. Faculty of Engineering, Science and Built Environment. London South Bank University. UK
- Cloekaert, A., P. Kerkhofs and J.N. Limet. 1992. Antibody Response to *Brucella* Outer Membrane Proteins in Bovine Brucellosis: Immunoblot Analysis and Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies. *J Clin Microbiol.* 30 (abstr.): 3168–3174.
- Corbel, M.J and W.J. Morgan Brinly. 2002. Brucellosis. In: Noel. R. Krieg. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1*. William Wilkins London. Britain
- Corner, I.A. 1993. *Bovine Brucellosis in Australian Standard Diagnostic Techniques of Animal Disease*. Standing Committee on Agriculture and Resource Management. Australia.

- Direktorat Kesehatan Hewan Direktorat Jendral Bina Produksi Peternakan. 2004.
- Geong Maria. 2002. Brucellosis : Batas Ekspor Sapi Bibit dari Timor. Pos Kupang. 30 Agustus. Hal. 4
- Gery, A.S. 2004. The Immune Respon to Brucella. Depertement of Animal Health and Biomediacal Science Union of Wisconsin Meddison. Meddison
- Giltsdorf, M.J. 1996. USDA Announces Final Rule for Brucellosis Regulation. USDA 4700 River Road. Riverdale. Washington.
- Hardjopranjoto S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya.
- Heritage, J. 2004. Medical Microbiology - A Brief Introduction. University of Leed.
- Karsinah., Lucky H.M., Suharto., dan H.W. Mardiasuti. 1994. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi Revisi. Indonesia University Press. Jakarta
- Kin-Yu Chan and P.W. Bruce. 1993. American Association of Cereal Chemists, Inc. Vol 70(1):27-28
- Laing, J.A. 1997. Fertility and Infertility in Domestic Animals.3<sup>rd</sup> Ed. The English Language Society and Bailliere Tindall.p.194-196
- Merchant, I.A and R.A. Packer. 1971. Veterinary Bacteriology and Virologi. The Iowa State University Press.
- Mikkelsen, S.R and C. Eduardo. 2004. Chapter I Spectroscopic Methods for Matrix Characterization. Binnalytical Chemistry. ISBN 0-471-54447-7
- Muliawan, S.Y dan J.E Surjawidjaja. 1999. Diagnosis Dini Demam Tifoid dengan Manggunakan Protein Mambran Luar *S.typhi* sebagai Antigen Spesifik. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti. Jakarta. Hal. 11-13
- Kuchn, M.J and C.K. Nicole. 2005. Bacterial Outer Membrane Vesicles and the Host Pathogen Interaction. ISSN 0890-9369
- Kunkel, O. 2004. Scientific Stock Photography of Biological. [Http://www.denniskunkel.com/DK/bacteria/96554G.Html](http://www.denniskunkel.com/DK/bacteria/96554G.Html). [20 Mei 2008]
- Nielsen, K. and R.J. Duncan. 1990. Animal Brucellosis. CRC Press. Boston. USA.

- OIE. 2004. Manual of Diagnostic Test and Vaccination for Terrestrial Animals. OIE. References Laboratories for Bovine Brucellosis.
- Portnoy., A. Daniel., Higgins., and E. Derren. 1999. Bacteria Expressing Non Secreted Cytolysin Intracellular Microbial delivery Vehicles to Eukaryotic Cell. United State Paten 6004815
- Quinn, P.J, B.K. Markey, M.E. Cater, W.J. Donnely and F.C. Leonard. 2002. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing. p. 163-167.
- Radwan A.I., S.I. Bekairi, A.M. al-Bokmy, P.V. Prasad, O.M. Mohamed, S.T. Hussain. 1993. Successful therapeutic regimens for treating *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infections in cows. Rev Sci Tech. 12(3): 909 - 922. [PubMed: 8219341]
- Rantam. F.A.2003. Metode Immunologi. Airlangga University. Surabaya.
- Richey, E.J. and C. D. Harrell. 1996. *Brucella Abortus* Disease (Brucellosis) in Beef Cattle. University of Florida.USA
- Ryan, K.J.,and C.G. Ray. 2004. Sherries Microbiology. 4<sup>th</sup> Ed. ISBN 0-8385-8529-5
- Subronto. 2003. Ilmu Penyakit Ternak Mamalia. Edisi I. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 528-549.
- Suryadi, Y.,I. Manzila., A. Akhdiya., dan E. Pratiwi. 2006. Produksi dan Evaluasi Antibodi Poliklonal untuk Deteksi Toksin *Photorhabdus* spp. Jurnal Agro Biogen 2(1): 16-23
- Thermo Scientific. 2008. Coomassie Plus - The Better Bradford Assay. <http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=02020104> [14 April 2008]
- Timoney, J.F., J.H. Gillespie., F.W Scott., and J.E. Barlough. 1988. Microbiology and Infections Disease of Domestic Animals. 8<sup>th</sup> Ed. Comstock Publishing Associates. London. Page 135-151
- Tizard, I. 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Airlangga University Press. Surabaya.
- Vemulapalli, T.H. 2000. Genetic and Immunological Analyses of a *Brucella abortus* Protein Exhibiting Lectin-Like Properties [M.sc. Thesis]. Virginia Polytechnic Institute.

Widjajanto, S. 2004. Pengaruh Pemberian Protein Imunogenik Membran Luar Kuman *Salmonella pullorum* S-11 tanpa Booster Pada Ayam Petelur dalam Jurnal Penelitian Medika Eksakta Vol.5 Hal 13

# LAMPIRAN

**Lampiran 1. Uji kemurnian stok bakteri *Brucella abortus* S-19**

Stok *brucella abortus* S-19 bentuk kering beku + PBS



Suspensi



Tanam pada media TSA dengan cara streak  
Inkubasi 37<sup>0</sup>C selama 3 hari



Hasil Penanaman *Brucella abortus* S-19 pada TSA  
tampak koloni kecil, halus dan berwarna krem.



pemeriksaan dengan Uji biokimia (Urea, SIM, Simmons citrate agar)



pemeriksaan mikroskopik dengan pewarnaan Gram



cocco bacilus, berpasangan atau bergerombol, dan berwarna merah (Gram negatif)



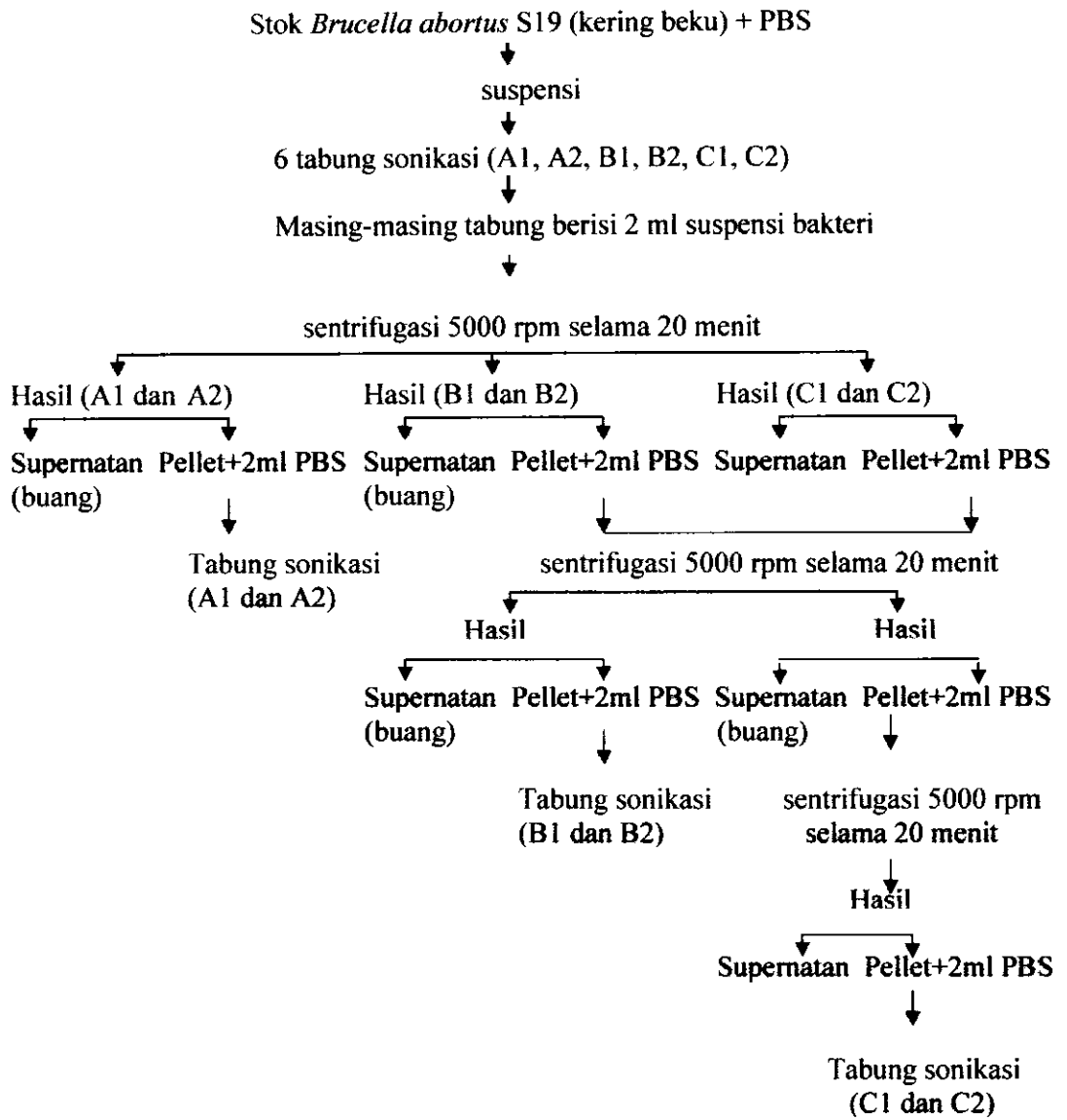
positif

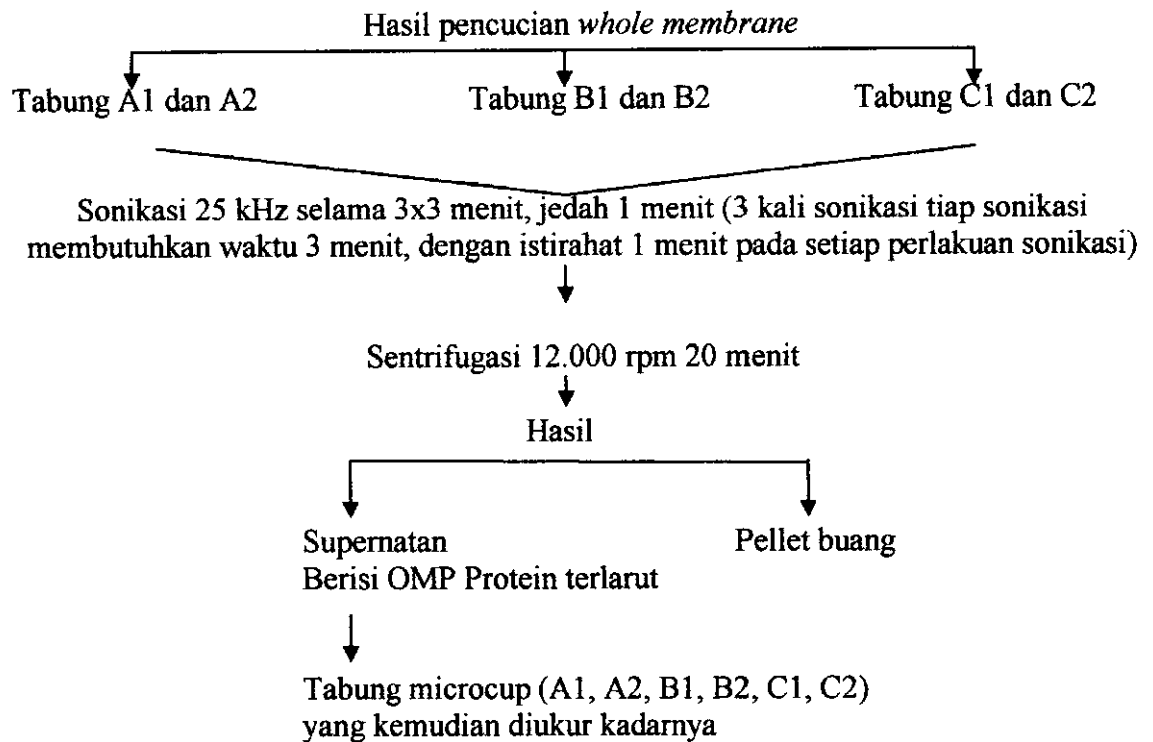


pencucian suspensi bakteri yang dilanjutkan sonikasi



## Lampiran 2. Pencucian *whole membrane*



**Lampiran 3. Pemisahan OMP *Brucella abortus* S19 dari Whole membrane dengan Teknik Sonikasi**

#### Lampiran 4: Pemeriksaan kadar protein *Brucella abortus* S-19

Data pembacaan kadar *Brucella abortus* S19 dengan spektrofotometer U.V (*ultra violet*) *visibe* dengan panjang gelombang 595 nm.

Sampel No.	Asb	ket
1	0,000	Blanko
2	0,466	A1
3	0,392	A2
4	0,420	B1
5	0,412	B2
6	0,395	C1
7	0,394	C2
8	0,532	standar

Kadar total protein (gr%) =  $\frac{\text{Absorban sampel} \times \text{konsentrasi standar protein}}{\text{Absorban standar}}$

$$\text{Tabung A1} = \frac{0,466 \times 4,38 \text{ gr}\%}{0,532} = 3,84 \text{ gr}\%$$

$$\text{Tabung A2} = \frac{0,392 \times 4,38 \text{ gr}\%}{0,532} = 3,2 \text{ gr}\%$$

$$\text{Tabung B1} = \frac{0,420 \times 4,38 \text{ gr}\%}{0,532} = 3,45 \text{ gr}\%$$

$$\text{Tabung B2} = \frac{0,412 \times 4,38 \text{ gr}\%}{0,532} = 3,39 \text{ gr}\%$$

$$\text{Tabung C1} = \frac{0,395 \times 4,38 \text{ gr}\%}{0,532} = 3,25 \text{ gr}\%$$

$$\text{Tabung C2} = \frac{0,394 \times 4,38 \text{ gr}\%}{0,532} = 3,24 \text{ gr}\%$$

**Lampiran 5. Perhitungan hasil pembacaan spektrofotometer dengan menggunakan ANOVA**

**Summarize**

**Case Summaries<sup>a</sup>**

			Kadar Protein
Perlakuan A	1		3.84
	2		3.20
	Total	N	2
		Sum	7.04
		Mean	3.5200
		Std. Deviation	.45255
B	1		3.45
	2		3.39
	Total	N	2
		Sum	6.84
		Mean	3.4200
		Std. Deviation	.04243
C	1		3.25
	2		3.24
	Total	N	2
		Sum	6.49
		Mean	3.2450
		Std. Deviation	.00707
Total	N		6
		Sum	20.37
		Mean	3.3950
		Std. Deviation	.23839

a. Limited to first 100 cases.

**Oneway****Descriptives****Kadar Protein**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
A	2	3.5200	.45255	.32000	3.20	3.84
B	2	3.4200	.04243	.03000	3.39	3.45
C	2	3.2450	.00707	.00500	3.24	3.25
Total	6	3.3950	.23839	.09732	3.20	3.84

**ANOVA****Kadar Protein**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.078	2	.039	.563	.620
Within Groups	.207	3	.069		
Total	.284	5			

**Post Hoc Tests****Kadar Protein****Duncan<sup>a</sup>**

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05
		1
C	2	3.2450
B	2	3.4200
A	2	3.5200
Sig.		.369

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

**Lampiran 6. Gambar Peralatan Penelitian**



a



b

Gambar 6.1 Sentrifugasi (a,b)



Gambar 6.2 Sonikator



Gambar 6.3 Spektrofotometer UV