

**SKRIPSI**

**ANTIGENITAS *Brucella abortus* STRAIN 19 TERHADAP  
ANTIBODI POLIKLONAL DENGAN METODE  
*WESTERN BLOT***



**Oleh :**

**NOVALIA DEWI**  
**NIM. 060413304**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2008**

**ANTIGENITAS *Brucella abortus* STRAIN 19 TERHADAP  
ANTIBODI POLIKLONAL DENGAN METODE  
WESTERN BLOT**

Skripsi  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan  
Pada  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

NOVALIA DEWI  
Nim 060413304

Menyetujui  
Komisi Pembimbing



(Emile Bambang S.T., M.S., Drh)  
Pembimbing pertama



(Hermin Ratnani, M.Kes., Drh)  
Pembimbing kedua

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

### **ANTIGENITAS *Brucella abortus* STRAIN 19 TERHADAP ANTIBODI POLIKLONAL DENGAN METODE WESTERN BLOT**

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, 31 Juli 2008



NOVALIA DEWI  
NIM 060413304

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal: 7 Juli 2008

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua	:	Dr. Wurlina Meles,M.Kes.,drh
Sekretaris	:	Retno Bijanti,M.S.,drh
Anggota	:	Rr. Ratih Ratnasari,SU.,drh
Pembimbing I	:	Emile Bambang S.T.,M.S.,drh
Pembimbing II	:	Hermin Ratnani,M.Kes.,drh

Telah diuji pada

Tanggal : 29 Juli 2008

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Wurlina Meles, M.Kes., drh  
Anggota : Retno Bijanti, M.S., drh  
: Rr. Ratih Ratnasari, SU., drh  
: Emile Bambang S.T., M.S., drh  
: Hermin Ratnani, M.Kes., drh

Surabaya, 31 Juli 2008

Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Dekan,  
  
Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh  
NIP.130 687 305

**ANTIGENICITY STRAIN 19 OF *Brucella abortus* TO POLYCLONAL  
ANTIBODY  
USING WESTERN BLOT METHODS**

Novalia Dewi

**ABSTRACT**

The objectives of this research were to detect antigenic strain 19 of *Brucella abortus* based on specific protein molecular weight characteristic.

Polyclonal antibody was produced by injecting subcutaneous the suspension which consist of *Brucella abortus* S-19 and *Complete Freund's Adjuvant* to male rabbit.

The *booster* had been done for six times with ten days interval by injecting suspension tha contain of *Brucella abortus* S-19 and *Incomplete Freund's Adjuvant* Blood sampling was collected from male rabbit in order to get polyclonal antibody anti *Brucella abortus* S-19, ten days after the last *booster*.

Fractination of protein antigen base on molecul weight was performed by using SDS PAGE technique.

*Western Blot* technique was conducted to find out antigenicity of *Brucella abortus* S-19 to antibody polyclonal anti *Brucella abortus* S-19.

The results of this reseach showed that there are four bands of protein from *Brucella abortus* S-19 which were recognized antibody with molecul weight of 64,2 kDa, 23,9 kDa, 21,2 kDa, and 19,0 kDa.

**Key words** : *Brucella abortus* S-19, Protein, *Western Blot*

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Antigenitas *Brucella abortus* S19 Terhadap Antibodi poliklonal dengan Metode *Western Blot*.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

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

Dosen pembimbing pertama Emile Bambang S.T., M.S., Drh dan Dosen pembimbing kedua Hermin Ratnani, M.Kes., Drh atas segala bantuan, saran dan bimbingannya sampai dengan terselesaikannya penulisan skripsi ini.

Dr. Wurlina Meles, M.S., Drh selaku ketua penguji, Retno Bijanti, M.S., Drh selaku sekretaris penguji dan Rr. Ratih Ratnasari, SU., Drh selaku anggota penguji.

M. Gandul Atik Yuliani, M.Kes., Drh sebagai pembimbing penelitian yang telah memberikan bantuan, saran, bimbingan serta membantu penyempurnaan tulisan ini. Mbak Helen sebagai pembimbing dalam pelaksanaan *Western Blot* di TDC.

Kepala Pusat Veterinaria farma (PUSVETMA) Surabaya, Kepala Tropical Disease Center (TDC) dan Kepala Laboratorium Patologi Klinik Fakultas kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, atas fasilitas yang diberikan selama penelitian.

Keluarga yang sangat penulis cintai ayahanda Sukasmono dan ibunda Nurul Hidayati Ulfa, mama Wati, kakak Bambang Hermanto, serta adik Dwi Novianto, Dani Widianteri, Kiky, Marsha atas doa, kasih sayang, dukungan dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.

Rekan Penelitian Umar Syamsudin, Desty Apritya, Katerine A atas kerjasamanya selama penelitian. Silvia , Dianti , Yuslina , Laksmi , Veronika , teman-teman KKNBK ke-37 kelurahan Keputih dan teman-teman angkatan 2004 terima kasih atas segala perhatian, bantuan dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.

Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penyelesaian tulisan ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran dari pembaca sangat penulis harapkan. Semoga penulisan skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Surabaya, 31 Juli 2008

Penulis

## DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
ABSTRACT.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Landasan Teori.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 <i>Brucellosis</i> .....	5
2.1.1 Sejarah Penyakit <i>Brucellosis</i> .....	6
2.1.2 Cara Penularan <i>Brucellosis</i> .....	6
2.1.3 Kerugian Ekonomis.....	7
2.1.4 Gejala Klinis <i>Brucellosis</i> .....	8
2.2 <i>Brucella abortus</i> .....	9
2.2.1 Klasifikasi <i>Brucella abortus</i> .....	9
2.2.2 Morfologi dari <i>Brucella abortus</i> .....	10
2.2.3 Strain <i>Brucella abortus</i> .....	11
2.2.4 Membran Protein <i>Brucella abortus</i> .....	11
2.3 Diagnosis Penyakit Akibat <i>Brucella abortus</i> .....	12
2.4 Pencegahan dan Penanggulangan <i>Brucellosis</i> .....	13
2.5 Vaksin.....	14
2.6 Hewan Coba.....	15
2.7 Teknik Pengambilan Darah.....	15
2.8 Sistem Imun.....	15
2.8.1 Antigen.....	16
2.8.2 Antibodi.....	17

2.8.3 Antibodi Poliklonal.....	18
2.8.4 Imunisasi.....	18
2.8.5 <i>Adjuvant</i> .....	20
2.8.6 Dosis Injeksi.....	20
2.9 Imunobloting.....	21
2.9.1 SDS PAGE.....	21
2.9.2 <i>Western Blot</i> .....	22
 BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	 24
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	24
3.2 Materi Penelitian.....	24
3.2.1 Bahan Penelitian.....	24
3.2.2 Alat Penelitian.....	25
3.3 Metode Penelitian.....	25
3.3.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal.....	25
3.3.2 SDS PAGE.....	26
3.3.3 Analisis Protein <i>Brucella abortus</i> dengan Metode <i>Western Blot</i> .....	27
3.4 Variabel Penelitian.....	28
3.5 Kerangka Konseptual Penelitian.....	29
 BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	 30
 BAB 5 PEMBAHASAN .....	 32
5.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal.....	32
5.2 Analisa Berat Molekul <i>Brucella abortus</i> S-19 dengan Metode <i>Western Blot</i> .....	34
 BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN .....	 37
6.1 Kesimpulan .....	37
6.2 Saran .....	37
 RINGKASAN.....	 38
 DAFTAR PUSTAKA.....	 39
 LAMPIRAN.....	 43

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Foto elektron <i>Brucella abortus</i> strain 19.....	11
2.2 Model kuman gram negatif.....	12
3.1 Bagan alur penelitian.....	29
4.1 Hasil analisis protein <i>Brucella abortus</i> dengan metode <i>western blot</i> ...	30

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan massa molekul relatif <i>Brucella abortus</i> S19 dengan metode <i>western blot</i> .....	43
2. Teknik <i>western blot</i> .....	45
3. Gambar peralatan penelitian.....	47

## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

<b>APS</b>	= Amonium Persulfat
<b>BB</b>	= Berat badan
<b>BM</b>	= Berat Molekul
<b>CFA</b>	= Complete Freund's Adjuvant
<b>CO<sub>2</sub></b>	= Karbon Dioksida
<b>ELISA</b>	= enzyme-linked immunosorbent assay
<b>gr</b>	= Gram
<b>HCL</b>	= Asam Klorida
<b>IFA</b>	= Incomplete Freund Adjuvant
<b>IgA</b>	= Imunoglobulin A
<b>IgD</b>	= Imunoglobulin D
<b>IgE</b>	= Imunoglobulin E
<b>IgG</b>	= Imunoglobulin G
<b>IgM</b>	= Imunoglobulin M
<b>IM</b>	= Intra mskular
<b>IV</b>	= intra vena
<b>kDa</b>	= KiloDalton
<b>kg</b>	= kilogram
<b>mA</b>	= mili Ampere
<b>mg</b>	= mili gram
<b>ml</b>	= mili liter
<b>mm</b>	= mili meter
<b>MRT</b>	= Milk Ring Test
<b>PBS</b>	= Phospat Buffer Saline
<b>RBT</b>	= Rose Bengal Test
<b>rpm</b>	= rotation per minute
<b>SAT</b>	= Serum Agglutination Test
<b>SCA</b>	= Simon Citrate Agar
<b>SIM</b>	= Sulfit Indol Motility
<b>SDS-PAGE</b>	= Sodium Dodecyl Sulphate Poliacrilamid Gel Electrophoresis
<b>PBS</b>	= Phosfat Buffer Saline
<b>TSA</b>	= Tryptone Soya Agar
<b>TEMED</b>	= Tetrametil etilendiamin
<b>V</b>	= Volt
<b>%</b>	= Persen
<b>µg</b>	= Mikro gram
<b>µl</b>	= Mikro liter

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

*Brucellosis* merupakan penyakit menular pada sapi, domba, kambing, babi yang disebabkan oleh *Brucella sp* (Timoney *et al.*, 1998) namun yang menyerang sapi adalah *Brucella abortus* (Akoso, 1994). *Brucellosis* merupakan penyakit yang bersifat zoonosis yang sangat merisaukan peternak dan menjadi permasalahan nasional (Hardjopranjoto, 1995) karena *Brucellosis* tersebut dapat menular ke manusia menyebabkan penyakit yang dikenal dengan istilah *Undulant Fever* atau *Malta Disease's* (Timoney *et al.*, 1998). Hal ini juga disebutkan oleh OIE (*Office International de Epizooties*) bahwa *Brucellosis* termasuk dalam daftar B, karena penularan penyakit ini berpengaruh terhadap sosial ekonomi atau kesehatan masyarakat di dalam suatu negara dan perdagangan internasional pada hewan maupun produk hewan.

Kerugian ekonomi tersebut dapat berupa keluron, gangguan alat reproduksi yang dapat menyebabkan kemajiran, sedangkan pada sapi perah terjadi penurunan produksi susu (Akoso, 1994).

Di Indonesia penyakit tersebut termasuk dalam daftar penyakit menular yang harus dicegah dan diberantas sejak tahun 1959 (Subronto, 2003). Kejadian *Brucellosis* telah ditemukan di beberapa pulau di Indonesia antara lain pulau Jawa, Sulawesi, Sumatera termasuk juga kawasan Nusa Tenggara kecuali pulau Bali (Putra, 2001). Penyebaran penyakit tersebut perlu mendapatkan tindakan penanganan dan pencegahan. Program penanggulangan *Brucellosis* memerlukan

data penunjang yang akurat seperti data populasi, cara beternak, peta wilayah dan sebagainya agar representatif sampel mudah ditetapkan sehingga diperoleh informasi yang lebih lengkap untuk menentukan tingkat prevalensi *Brucellosis* pada peternakan sapi di Indonesia (Harrigan and Wilki, 1998; Alton *et al*, 1998).

Usaha membasmi *Brucellosis* pada sapi, digunakan vaksinasi pedet dengan vaksin galur 19 dan pemotongan hewan positif terinfeksi berdasarkan hasil uji serologis. Galur 19 *Brucella abortus* merupakan vaksin hidup. Di dalam tubuh penderita, sel kuman mampu merangsang antibodi dalam waktu yang lama, sehingga sulit membedakan antara kekebalan terhadap galur 19 dan kekebalan akibat infeksi alam. Selain itu, beberapa sapi dewasa mempunyai antibodi anti *Brucella* berkadar rendah walaupun tidak ada infeksi. Interpretasi hasil serologis yang benar penting dalam membantu diagnosa (Tizard, 1988).

Teknik uji serologis yang banyak dipakai adalah uji RBT (*Rose Bengal Test*), uji pengikatan komplemen atau *Complement fixation Test* (CFT), dan MRT (*Milk Ring Test*). Uji serologis ini didasarkan pada adanya antibodi. Antibodi terhadap *Brucellosis* dapat ditemukan dalam serum darah, air susu, cairan mucus dan plasma seminalis (Meles, 2007).

Di dalam penelitian ini dilakukan pengujian terhadap antigenitas *Brucella abortus* strain 19 yang terdapat dalam vaksin aktif dengan menggunakan metode *western blot*. Menurut Rantan (2003) metode ini sangat efektif digunakan untuk mendeteksi antigen yang mempunyai berat molekul kecil dan banyak mengandung protein.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan diatas adalah bagaimanakah hubungan antara antigenitas dari *Brucella abortus* S19 terhadap antibodi poliklonal kelinci dengan menggunakan metode *western blot*?

## 1.3 Landasan Teori

Penggunaan vaksin aktif seperti pada vaksin strain 19 mempunyai keunggulan daya imunitas yang kuat (Tizard, 1988).

Vaksin yang secara luas digunakan untuk *Brucellosis* adalah vaksin hidup *Brucella abortus* strain 19 (Subronto, 2003). Strain 19 memiliki keunggulan antara lain bersifat halus, aerotoleran, patogenitasnya rendah dan dapat tumbuh tanpa CO<sub>2</sub> (Alton *et al.*, 1988).

Antibodi poliklonal sering digunakan untuk *blotting* karena mempunyai daya afinitas yang kuat (Rantam, 2003).

*Western Blot* digunakan untuk mendeteksi berat molekul dari campuran antigen (Rantam, 2003).

## 1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *Western blot* bertujuan untuk mendeteksi antigenitas bakteri yang berasal dari vaksin *Brucella abortus* strain 19 (BRUCIVET) berdasarkan ikatan antigen dan antibodi ditunjukkan dengan berat molekul yang terdapat pada pita.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah memberikan informasi atau data ilmiah hasil fraksinasi protein *Brucella abortus* S-19 menggunakan metode *western blot* tersebut dapat menentukan ikatan antigen dan antibodi berdasarkan berat molekul (kDa) yang nantinya berpengaruh terhadap kualitas vaksin tersebut.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Brucellosis*

*Brucellosis* memiliki nama lain yaitu *Undulant fever*, *Malta fever*, *Gibraltar fever*, *Mediterranean fever*, *Contagious abortion*, *Abortion fever*, *Infectious abortion*, *Epizootic abortion*, *Bang's disease* (Public Health Laboratory Network, 2004).

*Brucellosis* adalah penyakit infeksius yang disebabkan oleh bakteri dari genus *Brucella*. Anggota dari genus *Brucella* pertama kali diisolasi pada tahun 1887 oleh David Bruce dari limpa pasien yang mati karena demam Mediteranean atau demam Malta. Organisme ini kemudian disebut *Brucella melitensis* sepuluh tahun kemudian, tepatnya 1897, seorang dokter hewan, Frederick Bang, mengisolasi dan memberi nama kuman *Brucella abortus* dari fetus sapi yang diabortuskan. *Brucella suis* diisolasi pada 1914 oleh Jacob Traum dari bahan abortus babi, sedangkan berturut-turut *Brucella ovis* dan *Brucella canis* ditemukan pertama kali pada 1956 dan 1969. Kuman *Brucella* berbentuk batang kecil atau coccoid, tidak berspora, tidak berflagella dan bersifat gram negatif. Kuman *Brucella* merupakan kuman patogen yang intraselluler (Timoney *et al.*, 1998; Toth, 2004).

*Bovine brucellosis* adalah kuman yang menyerang sapi betina. Penyakit ini mudah dikenal karena menyebabkan keguguran pada umur kebuntingan tua dan diikuti dengan tingkat kemajiran yang tinggi. *Keluron* dapat terjadi satu, dua atau tiga kali, kemudian lahir normal. Pada sapi jantan target organ *Brucella* adalah vesikula seminalis, ampula, testis dan epididymis (Quinn *et al.*, 2002).

### **2.1.1 Sejarah Penyakit *Brucellosis***

Kejadian *Brucellosis* pada sapi meliputi seluruh bagian dunia. Penyakit tersebut telah dapat diberantas di negara-negara Skandinavia, sedangkan kejadian penyakit di negara-negara Eropa lainnya, Amerika Utara dan Australia sudah sangat menurun (Subronto, 2003).

*Brucellosis* sudah lama dikenal di Indonesia terutama sejak di Jawa ditemukan kasus pada sapi perah oleh Donker-Voet menjelang Perang Dunia II. Dari waktu ke waktu, penyakit ini semakin menyebar ke banyak tempat di Indonesia (Akoso, 1994).

Kejadian *Brucellosis* di Indonesia pada tahun 1976 dilaporkan ada delapan propinsi yang terkena dan meningkat lagi pada tahun 1986 dengan adanya laporan 24 propinsi yang terkena. Kejadian tertinggi ada di Sulawesi Selatan yang disusul oleh propinsi Nusa Tenggara Timur. Kejadian tersebut disebabkan adanya pengembangan industri sapi potong dan sapi impor (Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur, 2006).

Penyebaran *Brucellosis* pada sapi perah di pulau Jawa antara lain ditemukan di Jakarta, Semarang, Kodya Yogyakarta, Bantul, Pasuruan, Kediri, Blitar, Surabaya, Probolinggo dan Malang (Akoso, 1994).

### **2.1.2 Cara Penularan *Brucellosis***

Penularan *Brcellosis* dalam suatu peternakan bersifat endemik, bila suatu daerah tertular dan daerah tersebut memiliki populasi ternak yang sangat banyak

dalam waktu singkat sapi-sapi yang ada dalam daerah tersebut akan terinfeksi *Brucella* (Dinas Peternakan Jawa Timur, 2006).

Penyakit ini dapat ditularkan dari individu satu ke individu yang lain dengan cara kontak langsung dengan cairan tubuh penderita atau melalui perantara alat genital. Infeksi juga dapat terjadi melalui pencernaan yaitu bila pakan atau minuman tercemar oleh selaput janin atau cairan yang keluar dari rahim penderita *Brucellosis*. Penularan juga dapat melalui inseminasi buatan (IB) bila mani yang digunakan tercemar oleh *Brucella abortus* (Subronto, 2003; WHO, 1971).

Penyebaran dan penularan penyakit karena adanya pembebasan bakteri dalam jumlah besar melalui air susu, saluran kemih dan feses atau penularan dapat juga melalui lendir yang dikeluarkan setelah melahirkan. Penularan kepada pedet dimungkinkan berasal dari air susu pada waktu pedet menyusu induknya (Subronto, 2003).

Penularan *Brucellosis* dapat juga dengan cara kontak langsung dengan hewan yang terinfeksi, fetus hasil abortusan dari hewan yang terinfeksi *Brucella abortus*, *discharge* vagina dan membran plasenta. Selain itu hewan ternak dapat tertular *Brucellosis* karena menelan bahan makanan dan minuman yang sudah terkontaminasi oleh mikroorganisme (Wikkimedia, 2007).

### **2.1.3 Kerugian Ekonomis**

*Brucellosis* dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat besar meskipun mortalitas akibat penyakit ini relatif kecil. Kerugian ekonomi ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor antara lain keluron atau anak lahir lemah dan

mati, kemajiran akibat terjadinya gangguan reproduksi, pada sapi perah terjadi penurunan produksi susu (Dinas Peternakan Jawa Timur, 2006).

Indonesia pernah tertular *Brucellosis* pada tahun 1981 dan mengalami kerugian sebesar 5 milyar rupiah pertahun. Pada tahun 1996 kerugian diperkirakan sebesar 34 juta rupiah pertahun dengan populasi sapi dan kerbau berkisar 2010 ekor. Dengan kejadian tersebut dapat disimpulkan kejadian *Brucellosis* dapat mengganggu pendapatan petani dan peternak dan menyebabkan kerugian pada negara karena harus mencukupi kebutuhan daging dan susu dalam negeri melalui impor (Putra dkk, 2001).

#### **2.1.4 Gejala Klinis *Brucellosis***

*Brucella abortus* menyerang sapi betina pada umur yang sudah siap untuk dikawinkan. Penyakit ini dapat diketahui atau dikenali karena dapat menyebabkan keguguran pada sapi yang sedang bunting tua, plasentitis dan biasanya diikuti dengan kemajiran pada hewan tersebut. Sedangkan pada sapi jantan dapat terinfeksi *Brucella abortus* tetapi bakteri tersebut menyerang vesikula seminalis, testis dan epididymis (Quinn *et al.*, 2002).

Hewan yang menderita penyakit *Brucellosis* apabila dilakukan tindakan bedah bangkai maka dapat diketahui adanya penebalan pada plasenta dengan bercak-bercak pada lapisan chorio dan lapisan janin berwarna keruh kuning kecoklatan dan biasanya terdapat campuran nanah. Pada hewan jantan akan diketahui adanya nekrosis jaringan, orchitis, epididymitis, dan seminal vesikulitis (Akoso, 1994; Offices International des Epizooties, 2000).

Gejala awal dari penyakit tersebut adanya keluron atau keguguran yang terjadi di masa pertengahan kebuntingan pada hewan yang terinfeksi (Subronto, 2003). Gejala klinis pada hewan yang menderita *Brucellosis* dapat menyebabkan kemajiran pada temporer atau permanen dan anak yang dilahirkan keadaannya lemah kemudian mati. Apabila anak yang dilahirkan selamat maka akan mengalami oedema subkutan, pembesaran hati dengan warna kuning kecoklatan, *fibrous pleuritis* dan *focal pneumonia* (Offices International des Epizooties, 2000).

Gejala pada manusia adalah demam *intermitten* yang disebut dengan *Undulant Fever* (Syarif dan Sumoprastowo, 1985). Manusia yang tertular penyakit tersebut umumnya yang berhubungan dengan hewan ternak seperti petani, peternak, dokter hewan dan orang yang bekerja pada rumah potong hewan. Manusia dapat tertular *Brucellosis* dengan meminum susu yang belum dimasak (WHO, 1971). *Brucellosis* pada manusia disebabkan karena meminum susu yang tidak dipasteurisasi, kontak dengan *discharge* hewan yang terinfeksi atau fetus abortus dari induk yang terinfeksi *Brucella abortus*. Gejala klinis pada manusia karena kejadian *Brucellosis* adalah demam *intermitten* atau demam tidak menentu dengan durasi yang bervariasi, sakit kepala, lemah, berkeringat, penurunan berat badan, merasa kedinginan, sakit sekujur badan (European Molecular Laboratory; 2006).

## **2.2 *Brucella abortus***

### **2.2.1 Klasifikasi *Brucella abortus***

Menurut Ryan (2004) klasifikasi dari *Brucella abortus* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria

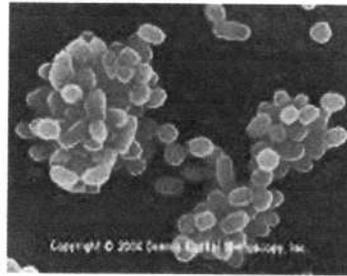
Phylum	: Proteobacteria
Klas	: Alphaproteobacteria
Ordo	: Rhizobiales
Famili	: Brucellaceae
Genus	: Brucella
Spesies	: <i>Brucella abortus</i>

### 2.2.2 Morfologi dari *Brucella abortus*

*Brucella abortus* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang kecil atau coccoid berukuran 0,5-0,7 x 0,6-1,5 mikrometer, non motil, tidak berspora, tidak berflagella dan tidak berkapsul. Kuman *Brucella* merupakan kuman patogen yang intraselluler, sehingga mampu berkembang biak di dalam sel fagosit seperti neutrofil dan makrofak inang (Marth and Steele, 2001; Timoney *et al.*, 1998).

Dua jenis antigen yang stabil pada spesies *Brucella* yaitu antigen M dan antigen A. Antigen M adalah antigen yang terdapat pada *Brucella militensis* sedangkan antigen A merupakan antigen yang predominan pada spesies *Brucella abortus* (Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur, 2006; Karsinah dkk, 1994).

*Brucella abortus* adalah kuman *aerobe* tetapi beberapa strain memerlukan lima sampai sepuluh persen CO<sub>2</sub> untuk pertumbuhannya (Quinn *et al.*, 2002). *Brucella abortus* hidup berpasangan atau bergerombol. Pada pewarnaan gram terlihat berwarna merah dengan latar belakang biru. Perbenihan pada media *triptycase* atau *tryptone soya agar* bakteri ini membentuk koloni-koloni *smooth*, basah, jernih atau sedikit keruh (Karsinah dkk, 1994).



**Gambar 2.1 Foto elektron *Brucella abortus***

(Sumber : Kunkel, 2004, Dennis Kunkel Microscopy, Inc.)

### **2.2.3 Strain *Brucella abortus***

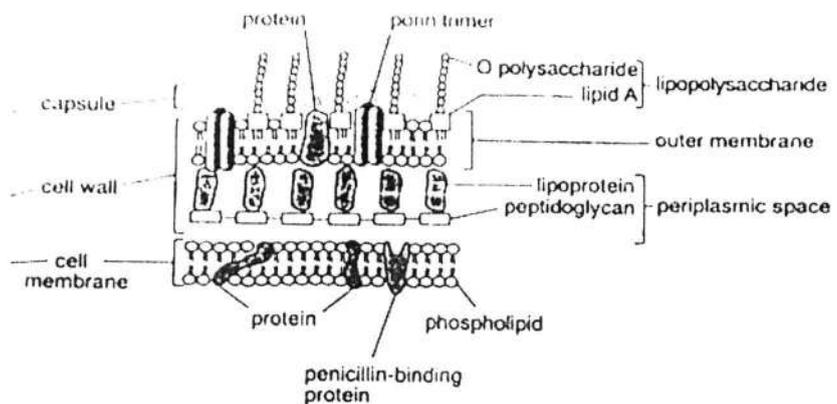
Beberapa macam strain *Brucella abortus*, diantaranya *Brucella abortus* strain patogen (Biotipe I), apatogen (S19, S99, S1119-3) dan aspesifik (*atypical biotype*). Strain 19 (S19) memiliki beberapa keunggulan antara lain bersifat halus, aerotoleran, patogenesisitas rendah, dapat tumbuh tanpa CO<sub>2</sub>, sehingga strain ini banyak diciptakan untuk vaksin maupun antigen diagnostik (Alton *et al.*, 1988). Strain lain yang dapat digunakan sebagai vaksin adalah S1119-3 (USDA) dan S99 (Weybridge) (OIE, 204).

### **2.2.4 Membran Protein *Brucella abortus***

Dinding sel kuman gram negatif mengandung tiga polimer yang terletak di luar lapisan peptidoglikan yaitu lipoprotein, selaput luar dan lipopolisakarida (Jane, 1992)

Molekul lipoprotein terdiri dari lipid yang terikat pada selaput luar dan senyawa protein mengandung 57 asam amino. Protein ini berhubungan dengan peptidoglikan melalui rantai samping peptidoglikan (tetrapeptida). Pada selaput

luar terdapat protein utama dan protein minor. Protein utama menembus kedua sisi selaput luar bergabung dengan lipoprotein dan terikat dengan peptidoglikan, sedangkan protein minor di dalam selaput luar berfungsi sebagai pengangkut (Jametz *et al.*, 1982). Protein pada dinding sel kuman gram negatif mempunyai berat molekul 28 – 43 kD. Bagian lapisan lipoprotein mengandung asam amino yang terdiri dari tripsin, lisin, tirosin, arginin dan leusin (Wolfgang *et al.*, 1992)



**Gram-negative bacterium**

**Gambar 2.2 Model kuman Gram negatif**

(Sumber: Quinn *et al.*, 2002)

### 2.3 Diagnosis Penyakit akibat *Brucella abortus*

Diagnosa terhadap penyakit *Brucellosis* dapat dilakukan secara bakteriologis dan serologis. Secara bakteriologis dapat dilakukan dengan isolasi dan identifikasi kuman yang berasal dari bahan-bahan yang dicurigai. Bahan-bahan tersebut biasanya berasal dari fetus yang diabortikan, plasenta, eksudat uterus, susu atau cairan abses. Diagnosa yang hanya berdasarkan gejala klinis sangat tidak mungkin

spesifik walaupun pada ternak dijumpai gejala klinis penyakit (Timoney *et al.*, 1988; Quinn *et al.*, 2002).

Pemeriksaan serologis dapat dilakukan beberapa uji diantaranya *Brucella Milk Ring Test* (MRT), *Rose Bengal Test* (RBT), CFT, *Indirect ELISA*, *Competitif ELISA* (menggunakan antibodi monoklonal), *Immunoblotting*, *Serum Agglutination Test* (SAT). Uji PCR juga dapat digunakan untuk diagnosa *Brucellosis* hewan sebagai metode molekuler (Alton *et al.*, 1988 ; Jawetz *et al.*, 1990 ; Quinn *et al.*, 2002).

Diagnosis penyakit dapat dilakukan dengan uji secara serologis atau bakteriologis dengan melakukan kultur dari sampel hewan seperti fetus hasil abortusan, plasenta, eksudat uterus, susu atau cairan abses yang diduga menderita *Brucellosis* pada media seperti *Simon Citrate Agar*, *Urea*, *Sulfit Indol Motility* (SIM). Cara yang dapat dipakai selain kultur pada media dapat dilakukan pewarnaan gram. Apabila hewan tersebut menderita penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Brucella* maka hasil pewarnaan sampel yang mengandung mikroba dari hewan tersangka tersebut akan bewarna merah atau menunjukkan hasil positif pada pewarnaan gram (Morgan *et al.*, 1978 ; Alton *et al.*, 1975).

#### **2.4 Pencegahan dan Penanggulangan *Brucellosis***

*Brucella* adalah bakteri intraselluler oleh karena itu terlindungi dari daya pertahanan tubuh sapi dan aktivitas antibiotika. Pada hakekatnya tidak ada obat yang baik untuk pengobatan *Brucellosis*, apabila penyakit tersebut sudah kronis akan membutuhkan waktu yang lama dan dosis yang besar. Oleh karena itu

pengobatan dipandang tidak ekonomis, walaupun sapi penderita dapat sembuh secara alami (Hardjopranto, 1995).

Terapi menggunakan antibiotik dapat diberikan pada penderita *brucellosis*. Antibiotik yang biasa digunakan adalah streptomycin yang dapat bekerja sinergis dengan penicillin dan tetracyclin. Penicillin memiliki sifat bakteriostatik terhadap *Brucella* dengan dosis dibawah 50µg/ml sedangkan pemberian streptomycin sebagai obat tunggal tidak dapat mencegah multiplikasi dari *Brucella* (Richardson and Jane Holt, 1962).

Antibiotik lain yang juga efektif untuk mengobati *brucellosis* seperti golongan *aminoglycoside*, *rifampicin* 5mg/kg BB secara *intra muscular* (IM), *gentamicin*, *doxycycline* 100mg dua kali sehari secara IV selama 45 hari atau dapat juga dikombinasi dengan *rifampicin* dengan dosis 2,5 sampai 5 mg/kg BB selama enam bulan (Wikimedia, 2007).

## 2.5 Vaksin

Ada dua macam vaksin yang digunakan dalam imunisasi aktif yaitu vaksin hidup dan vaksin mati (inaktif), keduanya mempunyai kelebihan dan kekurangan. Vaksin aktif bersifat imunitas kuat, tidak memerlukan *adjuvant*, tidak stabil dalam penyimpanan, dan dapat bereplikasi di dalam sel. Vaksin mati bersifat baik dalam penyimpanan tidak bereplikasi di dalam tubuh sehingga cenderung menghasilkan tanggap kebal yang lebih rendah dibandingkan dengan vaksin hidup (Tizard, 1988).

## 2.6 Hewan Coba

Pemilihan spesies hewan didasarkan pada jumlah serum yang dibutuhkan dan hewan coba yang tersedia. Kelinci biasanya lebih disukai, karena hewan ini murah, gampang dipelihara, daya tahannya yang tinggi dan mudah untuk diambil darahnya. Lebih dari 100 ml darah dapat dikumpulkan perminggu tanpa pengaruh yang merugikan (Smith, 1995). Produksi antibodi dengan menggunakan hewan jantan dapat memproduksi antibodi lebih banyak dibandingkan dengan betina, karena pada betina lebih cepat terjadi pengotoran urin dan kotorannya (Rantam, 2003).

## 2.7 Teknik Pengambilan Darah

Menurut Rantam (2003), setiap hewan coba mempunyai spesifitas yang berbeda dalam teknik pengambilan darah. Hewan coba kelinci paling baik pengambilan darah telinga atau lebih dikenal dengan vena aurikularis. Darah kelinci dalam setiap pengambilan dapat dikoleksi sampai dengan 10 ml.

## 2.8 Sistem Imun

Imunitas (kekebalan) merupakan jawaban reaksi tubuh terhadap bahan asing secara molekuler maupun seluler (Rantam, 2003). Pada proses ini terjadi serangkaian mekanisme yang meliputi pengenalan, penempatan, netralisasi dan eliminasi bahan-bahan dari dalam tubuh. Secara garis besar mekanisme kekebalan terbagi menjadi dua, yaitu:

1. *innate immunity* (sistem imun tidak spesifik)

## 2. *adaptive immunity* (sistem imun spesifik)

*Innate immunity* adalah pertahanan yang didapat karena adanya respon yang tidak spesifik dan merupakan bagian dari sistem imun yang berfungsi sebagai barrier terdepan pada awal terjadinya infeksi penyakit. Perangkat imun yang berperan pada sistem imun tidak spesifik ini adalah makrofag, sel darah merah, sel asesoris, monosit, NK (*Natural Killer Cell*), sel sitotoksik dan sekresi lisosom.

*Adaptive immunity* merupakan sistem pertahanan tubuh lapis kedua, apabila *innate immunity* tidak mampu mengeliminasi agen penyakit. Hal ini terjadi akibat fagosit tidak mengenali agen infeksius. Penanggulangannya diperlukan molekul spesifik yang akan berikatan langsung dengan agen infeksius yang dikenal dengan antibodi, sehingga dapat menstimulir proses fagositosis (Rantam, 2003). Pada sistem imun spesifik, kekebalan dapat ditingkatkan baik kualitas maupun kuantitas dengan stimulasi berulang dari molekul asing yang sama (Artama, 1992).

### 2.8.1 Antigen

Menurut Rantam (2005), antigen adalah substansi yang dapat dikenali dan diikat dengan baik oleh sistem imun. Bagian dari antigen yang secara langsung berikatan dengan molekul reseptor (seperti antibodi) dikenal dengan nama epitop. Hal ini menandakan bahwa antigen mempunyai beberapa epitop (determinan antigen).

Antigen juga disebut imunogen merupakan bahan yang dapat bereaksi dengan antibodi yang sudah ada tanpa memperhatikan kemampuannya untuk merangsang

produksi antibodi. Secara fungsional antigen dibagi menjadi imunogen dan haptan. Haptan adalah bahan yang mempunyai berat molekul rendah sehingga tidak imunogenik, dapat menjadi imunogenik bila berikatan dengan molekul yang lebih besar, dan karena dapat berikatan dengan antibodi maka senyawa ini dianggap antigenik (Tizard, 1988; Baratawidjaja, 2004). Di dalam tubuh, antigen merangsang timbulnya respon imun humoral sehingga menyebabkan timbulnya kekebalan (antibodi). Antibodi tersebut dapat ditera sehingga diketahui titernya. Antigen yang diberikan akan mempengaruhi titer antibodi dan lamanya antibodi yang terbentuk (Tizard, 1988).

Daniel *et al.*, (1997) menyatakan bahwa antigen adalah benda asing yang diukur dengan keberhasilan dalam mengikat antibodi, sedangkan imunogen merupakan bagian antigen yang diukur kemampuannya untuk merangsang sistem imun. Aboul *et al.*, (2002) menyatakan bahwa struktur imunogen sangat ditentukan oleh kuat tidaknya keserasian bentuk, makin konstan keserasian bentuknya makin kuat sifat imunogenitasnya.

### **2.8.2 Antibodi**

Antibodi adalah immunoglobulin yang disekresi oleh sel B yang teraktivasi oleh antigen. Semua molekul antibodi mempunyai empat rantai polipeptida dasar yang terdiri dari dua rantai berat (*heavy chain*) dan dua rantai ringan (*light chain*) yang identik dan dihubungkan satu sama lain oleh ikatan disulfida (Rantam, 2003).

Ada dua jenis rantai ringan ( $\kappa$  dan  $\lambda$ ) yang terdiri dari 230 asam amino serta lima jenis rantai berat yang tergantung pada kelima jenis imunoglobulin yaitu IgM, IgG, IgA, IgE, IgD. IgM merupakan antibodi dalam respon imun primer terhadap kebanyakan antigen. Kebanyakan sel B mengandung imunoglobulin M pada permukaannya sebagai reseptor antigen. IgM dibentuk paling dahulu pada respon imun primer dibanding IgG (Baratawidjaja, 2002).

### 2.8.3 Antibodi Poliklonal

Produksi serum hiperimun (antiserum) melalui imunisasi yang diberikan terhadap hewan dengan suatu imunogen yang spesifik untuk mendapatkan antibodi terhadap imunogen. Antibodi didapat dengan jalan mengumpulkan sampel darah dari hewan yang diimunisasi. Antibodi yang didapat dari hiperimunisasi dikenal sebagai antibodi poliklonal (Smith, 1995).

Antibodi yang digunakan untuk *Western blot* harus mempunyai spesifitas tinggi dan daya ikat yang stabil. Antibodi poliklonal sering digunakan untuk *blotting* karena mempunyai afinitas yang tinggi terhadap antigen tetapi mengandung antibodi yang nonspesifik berikatan dengan antigen yang tidak spesifik yang merupakan bagian dari mikrobial. Oleh karena itu antibodi poliklonal sering purifikasi terlebih dahulu (Rantam, 2003).

### 2.8.4 Imunisasi

Ada dua cara untuk membuat hewan kebal terhadap penyakit menular. Cara pertama adalah vaksinasi pasif, yaitu dengan memindahkan antibodi dari hewan

resisten ke hewan yang rentan. Antibodi tersebut dapat memberikan perlindungan yang cepat, tetapi karena cepat dikatabolisis, perlindungan ini makin berkurang dan akhirnya resipien menjadi rentan lagi terhadap infeksi berulang-ulang. Cara kedua adalah vaksinasi aktif, yang melibatkan pemberian antigen pada hewan sehingga akan ditanggapi dengan meningkatkan tanggap kebal protektif berperantara antibodi atau sel atau kedua-duanya. Vaksinasi ulang atau keterpaparan pada infeksi akan mengakibatkan tanggap kebal sekunder. Kerugian dari bentuk imunisasi ini ialah bahwa perlindungan tidak dibentuk segera, namun sekali terbentuk akan berlangsung lama dan berkemampuan perangsangan ulang (Tizard, 1988).

Imunisasi merupakan suatu teknik dengan pemanfaatan sistem imun spesifik yaitu dengan tidak melalui kontak langsung terhadap suatu antigen, akan tetapi hanya dengan bagian tertentu dari antigen tersebut yang bersifat imunogen dalam rangka mendapatkan suplai antibodi terhadap imunogen (antigen tersebut). Antigen akan menstimulasi sejumlah sel reseptor pada beberapa klon sel limfosit B yang sesuai dengan antigen determinan yang masuk untuk mensintesis antibodi spesifik. Antibodi yang dibebaskan mempunyai kespesifikan yang heterogen. Antibodi yang didapatkan dari imunisasi ini dikenal sebagai antibodi poliklonal.

Imunisasi berulang dengan selang waktu tertentu akan meningkatkan respon suatu individu. Penyuntikan suatu molekul antigen berarti akan menstimulir sejumlah klon sel limfosit B yang menyebabkan masing-masing sel akan berploriferasi dan berdiferensiasi menjadi imunoblast dan sentroblast. Imunoblast akan berkembang menjadi limfoblast dan dideterminasi menjadi sel plasma yang

tidak lagi membelah sebagai pabrik antibodi. Sentroblast akan menjadi sel memori yang dapat meningkatkan respon imun pada kontak berikutnya dengan antigen yang sama (Artama, 1992).

### 2.8.5 Adjuvant

Menurut Smith (1995) secara umum *adjuvant* yang digunakan dalam produksi serum hiperimun atau poliklonal antibodi adalah *adjuvant Freund* baik *Freund* lengkap (*complete*) maupun tidak lengkap (*incomplete*). *Adjuvant* lengkap digunakan sebagai injeksi pertama dan untuk injeksi *booster* digunakan *adjuvant* tidak lengkap.

*Adjuvant* adalah substansi-substansi tertentu yang dapat meningkatkan secara tidak spesifik efektifitas imunologis dari agen pengimunisasi. *Adjuvant* mempunyai sifat-sifat tertentu sebagai karakteristiknya terutama membuat depo antigen dan melepas antigen sedikit demi sedikit sehingga memperpanjang pemaparan antigen dengan sistem imun dan memacu sistem imun dengan afinitas tinggi (Baratawidjaja, 2002). *Freund's Adjuvant* terdiri atas campuran minyak mineral dan pengemulsi dengan mikobakteria (CFA) atau tanpa mikobakteria (IFA) (Smith, 1995).

### 2.8.6 Dosis Injeksi

Menurut Smith (1995), dosis antigen yang dianjurkan untuk imunisasi awal antara satu sampai sepuluh milligram. Dosis antigen yang lebih rendah akan

menghasilkan antibodi dengan afiditas lebih tinggi daripada dosis antigen yang lebih tinggi.

## 2.9 Immunoblotting

### 2.9.1 *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

*Polyacrilamide* merupakan matrik pilihan untuk memisahkan protein yang berat molekulnya antara 500-250.000 Dalton. Gel poliakrilamid dibentuk melalui terbentuknya ikatan silang antara rantai poliakrilamid. Rantai ini terbentuk dari polimerasi monomer *acrylamide*  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$  menjadi rantai poliakrilamid yang panjang. Polimerasi dikatalis oleh *ammonium persulphat* (APS) yang didalam larutan terbentuk radikal bebas. Sesudah diaktifkan oleh radikal bebas, *acrylamide* bereaksi dengan *acrylamide* yang lainnya untuk membentuk suatu rantai polimer yang panjang (Sutiman dkk, 1996).

SDS-PAGE, protein di elektroforesis dalam detergen ionik, yaitu *Sodium Dodecyl Sulfate*. Detergen ini akan mengikat residu hidrophobik dari bagian belakang peptida, salah satu dari setiap asam amino, sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Dengan demikian protein SDS-komplek migrasi melalui poliakrilamid tergantung dari berat molekulnya. Ada dua sistem pada SDS yaitu kontinyu (*Weber and Osbon*) dan diskontinyu (*Laemmli*). Pada sistem kontinyu campuran protein dilapiskan pada bagian atas (*bands* pada bagian atas *separating gel*) sehingga kelemahan pada sistem ini akan terjadi resolusi dengan sampel sedangkan pada sistem diskontinyu protein migrasi dengan cepat melalui

pelarut ion pada *stacking gel* dan *separating gel*. Protein terkonsentrasi pada garis yang tipis berupa pita atau *band* yang tipis (Rantam, 2003).

Manfaat dari penggunaan PAGE adalah melapisi polipeptida dengan muatan negatif sehingga semua elektroforesis bergerak menuju anoda dan menutupi muatan alami dari sub unit sehingga semua elektroforesis secara sempurna dan teratur menurut berat molekulnya dan bukan berdasarkan atas muatan asalnya (Robert, 2003).

### 2.9.2 Western Blot

Blotting merupakan teknik untuk mentransfer zona separasi protein, DNA atau RNA dari gel hasil elektroforesis ke membran (biasanya dipakai adalah nitrocelulosa atau NC). Matriks inilah yang akan mengikat molekul yang ditransfer sehingga menjadi imobil (Sutiman dkk, 1996).

Terdapat tiga cara bagaimana agar protein ditransfer dari gel ke matriks imobil, yaitu melalui difusi sederhana, aliran pelarut atau dibawah pengaruh medan listrik. Proses transfer DNA ke NC melalui prosedur aliran pelarut disebut *Southern blotting*. Bila digunakan kertas DBM (*diazobensiloksimetil*) dan masih menggunakan aliran pelarut yang dinamakan *Northern blotting*, sedangkan transfer protein dan asam nukleat pada NC dinamakan *western blot* (Sutiman dkk, 1996).

Imunoblotting yang digunakan pada penelitian ini adalah *western blot*, karena yang ditransfer pada metode ini adalah protein. Imunoblotting merupakan suatu metode yang umum digunakan untuk mentransfer protein dari SDS-PAGE ke

membran nitroselulose (Kresna, 2001). Keuntungan metode ini adalah membran nitroselulose setelah direaksikan dengan substrat, pencucian dan pereaksian dengan antibodi dapat disimpan selama beberapa bulan selain itu juga dengan metode ini mudah dilakukan pengecatan protein *autoradiography*, *calorimetric* pada uji enzim dan *ligand binding assay* (Rantam, 2003).

## BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di kandang hewan coba, Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi, Laboratorium Patologi Klinik Veteriner, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan, *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga serta Laboratorium Zoonosis bagian *Brucella* Pusvetma pada bulan Juni sampai dengan Desember 2007.

### 3.2 Materi Penelitian

#### 3.2.1 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan bahan penelitian yaitu vaksin aktif *Brucella abortus* strain 19 (BRUCIVET) yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya, kelinci jantan (*Oryctolagus cuniculus*) umur tiga bulan dengan berat  $\pm$  3 kg yang telah diimunisasi dan diambil serum darahnya untuk mendapatkan antibodi poliklonal, *Phospat Buffer Saline* (PBS) tween, acrylamide, bisacrylamide, Tris HCL pH 6,8 dan pH 8,8, *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 10%, aquadest, *Ammonium Persulphate* (APS), *tetramethylendiamin* (TEMED), laemmli buffer, butanol, electrophoresis buffer, NaOH 0,36%, asam asetat 7,5%, glutaraldehid 5%, NH<sub>3</sub> 25 %, methanol, buffer transblot, , konjugat *anti-rabbit*, substrat *western blue*, membran *nitrocelulose*, Tris aminomethan, glycin, *Freund's Adjuvant Complete* (SIGMA), *Incomplete Freund's Adjuvant* (SIGMA) sebagai *adjuvant* vaksin, *creamer* 4%.

### 3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan meliputi tabung reaksi, botol *Roux*, *microcup*, *sentrifuge*, pipet *eppendorf*, *beker glass*, *sonikator*, *pH meter*, *chamber SDS-PAGE* tipe *biometra*, *glass plate*, *comb*, *cutter*, *shaker*, *refrigerator*, kertas *whatmann*, *Mikroskop*, *Electrophoresis equipment* (SDS Page), *inkubator*, *rapid trans-blot two dimension*, *sprit disposable* berbagai ukuran, *aluminium foil*, pencatat waktu (*timer*), kamera digital, kapas.

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal

Antibodi poliklonal dibuat dengan cara menyuntikkan vaksin aktif *Brucella abortus* S19 yang dicampur dengan *adjuvant* pada kelinci.

Tahap pertama dilakukan imunisasi dengan menyuntikkan vaksin aktif *Brucella abortus* S19 sebanyak 0,25 ml yang dicampur dengan 0,25 mililiter larutan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dengan perbandingan 1:1 pada kelinci secara subkutan.

Dua minggu kemudian dilakukan *booster* (imunisasi ulang) pertama dengan menginjeksikan vaksin aktif *Brucella abortus* S19 sebanyak 0,25 mililiter dalam *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) 0,25 mililiter secara subkutan. Sepuluh hari berikutnya *booster* kedua dilaksanakan, komposisi bahan yang dipakai seperti *booster* pertama. *Booster* dilakukan sebanyak enam kali dengan interval sepuluh hari.

Sepuluh hari setelah imunisasi dilakukan pengambilan darah kelinci melalui vena auricularis sebanyak 1 sampai 3 ml sebelum dan sesudah *booster*, kemudian darah disentrifus untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi poliklonal kemudian serum disimpan dalam freezer yang akan direaksikan dengan membran *nitrocelulose* pada metode *western blot*.

### 3.3.2 SDS-PAGE

Analisis whole protein dari *Brucella abortus* S19 yang berasal dari vaksin aktif dilakukan dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS Page) dengan komposisi *separating gel* 12% (30% acrylamide atau 8% bis-acrylamid 7,9 ml ; 5ml 1,5 M Tris-HCl pH 8.8 ; 0,2 ml SDS 10 %; 6,9 ml aquadest, 5 µl TEMED dan 40 µl APS 10% dan *stacking gel* 6 % (1,7 ml 30% acrylamide atau 0,8 % bis-akrilamid ; 2,5 ml 0,5 M Tris HCl pH 6,8; 0,1 ml SDS 10 %; 5,66 ml *aquadest*; 10 µl TEMED dan 50 µl APS 10%). Setelah larutan *separating gel* 12% dimasukkan dalam gel plate pada posisi vertikal kemudian di atasnya diberi butanol sampai mengeras dan kemudian butanol dibuang. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* 6% dan setelah itu dimasukkan *comb* dan ditunggu sampai kering. *Plate* berisi gel kemudian dipasang pada Biometra dan dituangkan electrophoresis buffer (30,29 g Tris aminomethan; 144,13 g glysin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest) sebanyak 10 µg sampel berupa vaksin aktif *Brucella abortus* S19 ditambah *Laemmli buffer* sama banyak. Kemudian sampel didenaturasi dengan *Laemmli buffer* (pH 6,8 Tris-HCl 1ml, gliserin 0,8 ml, SDS 10% 1,6 ml, *bromofenolblue* 0,5 % 0,4 ml,

merkptoetanol 5 % 50  $\mu$ l, aquadest 3,8 ml) pada pemanasan 100°C selama 5 menit, kemudian dimasukkan ke dalam sumuran *stacking gel*. Electrophoresis dinyalakan dengan tegangan 125 V dan kuat arus 40 mA selama 1 jam.

### 3.3.3 Analisis Protein *Brucella abortus* dengan Metode *Western Blot*

Gel yang telah mengandung fragmen protein kemudian ditransfer ke membran *nitrocelulose* dengan cara memotong kertas *whatmann* dan membran *nitrocelulose* sesuai dengan lebarnya gel. Kertas *whatmann* direndam terlebih dahulu dalam larutan *trans blot* PH 8,3. Kemudian menyusun kertas *whatmann*, membran dan gel dengan urutan dari atas yaitu 5 lembar kertas saring, membran *nitrocelulose*, gel dan 5 lembar kertas saring. Katoda berada di atas dan anoda berada di bawah, selanjutnya dilakukan running dengan tegangan 15 V dan kuat arus 80 mA selama 30 menit. Setelah itu, membran dikeluarkan dan dicuci dalam PBS Tween sebanyak tiga kali selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan *blotting*.

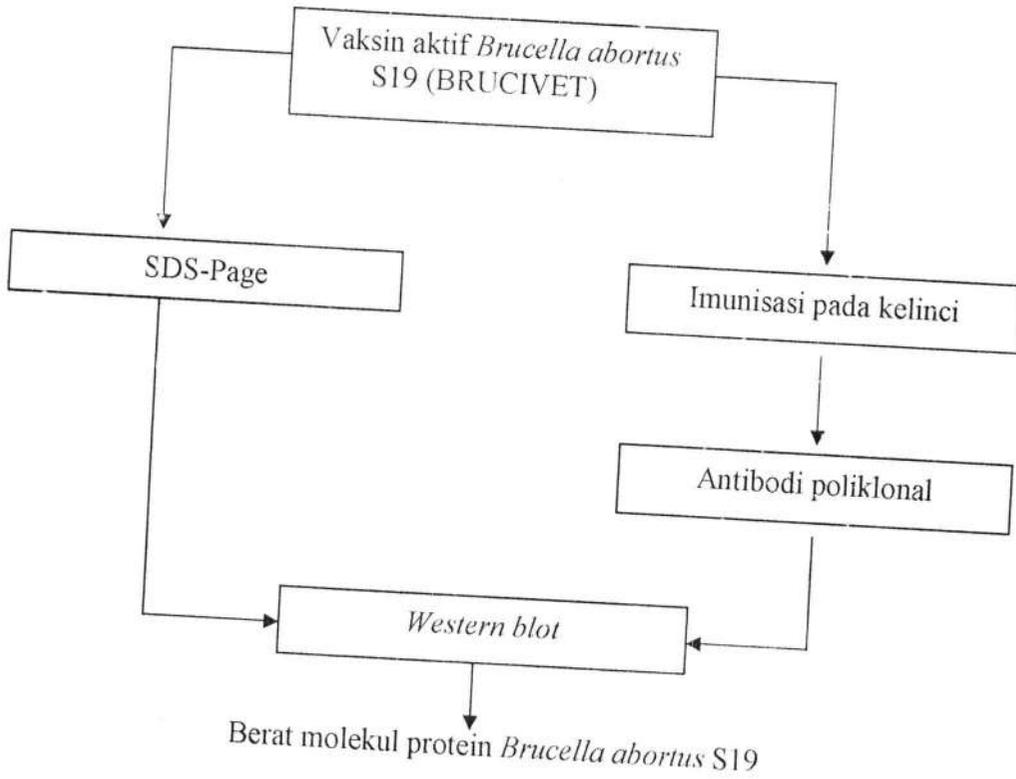
Membran *nitrocelulose* diblok dengan *creamer* 4% kemudian dicuci dengan larutan PBS Tween. Direaksikan dengan antibodi poliklonal anti *Brucella abortus* S19 selama 1,5 jam yang didapatkan dari pengambilan darah setelah *booster* ke 3 dan 4 sebanyak yang telah diencerkan dengan perbandingan 1:100. Setelah itu dilakukan pencucian dengan larutan PBS *tween*, kemudian ditambahkan konjugat *anti-rabbit* yang dilabel *alkalin fosfatase* lalu dicuci dengan larutan PBS *tween*. Selanjutnya diberi substrat *western blue*. Akhirnya dikeringkan di udara pada suhu ruang.

### 3.4 Variabel Penelitian

Penelitian ini diklasifikasikan dalam bentuk eksperimental laboratoris. Masing-masing memiliki tahapan pelaksanaan tanpa perhitungan statistika. Dalam penelitian ini variabel yang digunakan yaitu:

- Variabel bebas adalah dosis *brucella abortus* S19 yang disuntikkan ke kelinci.
- Variabel tergantung adalah berat molekul dari *Brucella abortus* S19

### 3.5 Kerangka Konseptual Penelitian

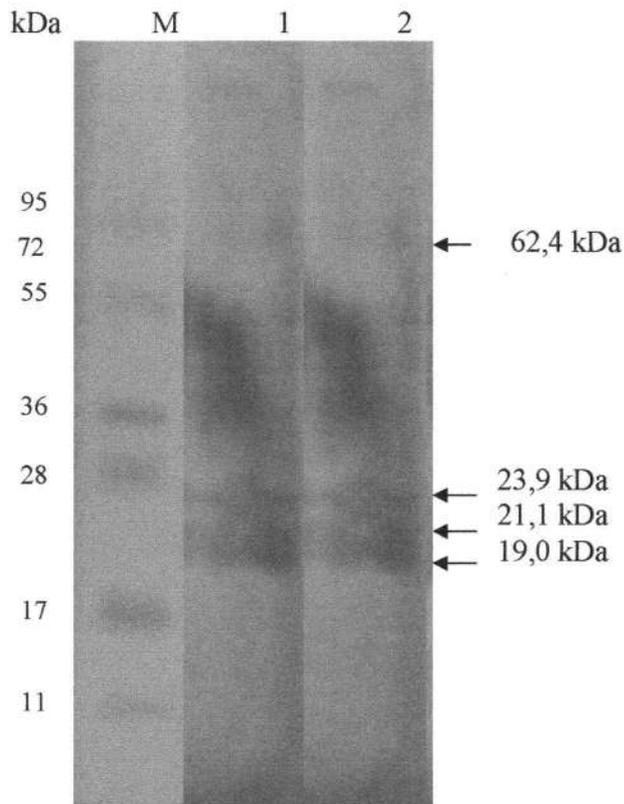


Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

## BAB IV HASIL PENELITIAN

### Hasil Analisis Protein *Brucella abortus* S19 dengan Menggunakan Metode *Western Blot*

Untuk mengetahui berat molekul protein *Brucella abortus* S19 menggunakan teknik *western blot*.



Gambar 4.1 Hasil fraksinasi protein *Brucella abortus* S19 dengan menggunakan teknik imunobloting (*Western blot*)

Keterangan :  
Kolom M = Marker  
Kolom 1 = Protein *Brucella abortus* S19  
Kolom 2 = Protein *Brucella abortus* S19

Hasil analisis protein *Brucella abortus* strain 19 tersebut diperoleh empat pita protein yaitu massa molekul relatif 62,4 kDa terletak antara marker 95-72 kDa. Protein dengan massa molekul 23,9 kDa terletak antara marker 28-17 kDa. Protein dengan massa molekul 21,1 kDa terletak antara marker 28-17 kDa. Protein dengan massa molekul 19,0 kDa terletak antara 28-27 kDa.

## BAB V PEMBAHASAN

### 5.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal

Prosedur imunisasi pada kelinci, *complete adjuvant* diberikan saat pertama kali penyuntikan, sedangkan penyuntikan berikutnya menggunakan *incomplete adjuvant* (Meyer and Walker, 1987). Hal ini sejalan dengan yang dikatakan oleh Franks (1988), bahwa pada penyuntikan pertama untuk mendapatkan respon imun yang cukup sebaiknya ditambahkan *complete adjuvant*. Setelah imunisasi yang pertama, dua minggu kemudian dilakukan *booster* dengan jumlah antigen yang sama namun menggunakan *incomplete adjuvant* (Bellanti, 1993). Beberapa peneliti menganjurkan bahwa dosis *booster* yang digunakan bisa separuh dari dosis pertama dan bisa diberikan melalui rute yang sama walaupun pada lokasi yang berbeda (Smith, 1995). Pada penelitian dosis *booster* yang diberikan sama dengan dosis pertama. Jika dosis pada imunisasi pertama diberikan dalam *Complete Freund's Adjuvant* (CFA), maka pada imunisasi ulang (*booster*) diberikan dalam *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) untuk menghindari reaksi hipersensitifitas yang hebat pada hewan coba (Smith, 1995).

Pemberian vaksinasi dilakukan secara subkutan lebih cepat diserap dibandingkan peroral (Handijatno dkk, 1990). Pada penyuntikan secara subkutan, depo tersebut *direlease* dan diabsorpsi sedikit demi sedikit, sehingga antigen dipaparkan kepada sel plasma secara perlahan-lahan. Hal ini dapat memperpanjang penyimpanan antigen dalam tubuh dan antigen tidak segera difagositosis oleh tubuh (Franks, 1988) Adanya minyak yang terdapat pada

*adjuvant* mendorong terjadinya jaringan granuloma di sekitar tempat penyuntikan, antigen dilepaskan perlahan-lahan dari fase air dalam emulsi sehingga terbentuk suatu depo. Bagian aktif dari mikobakteria (CFA) adalah muramil dipeptida akan meningkatkan aktifitas tersebut diatas. CFA juga berfungsi meningkatkan imunoglobulin G (IgG) daripada imunoglobulin M (IgM) (Tizard, 1988).

Pada minggu pertama setelah vaksinasi, antibodi sudah dapat ditera (Handijatno dkk, 1990). Hal ini sejalan dengan yang dikatakan oleh Franks (1988), bahwa pada penyuntikan pertama untuk mendapatkan respon imun yang cukup sebaiknya ditambahkan *complete adjuvant*. Setelah imunisasi yang pertama, dua minggu kemudian dilakukan *booster* dengan jumlah antigen yang sama namun menggunakan *incomplete adjuvant* (Bellanti, 1993). Imunisasi dilakukan *booster* (penyuntikan berulang) dengan tujuan untuk meningkatkan jumlah antibodi (Tizard, 1988) Penyuntikan kedua akan dapat meningkatkan jumlah antibodi melalui pengaruh sel memori untuk membelah dan berdiferensiasi menjadi plasma untuk memproduksi antibodi melalui kontak kedua antigen yang sama. Demikian pula *booster* kedua dilakukan dua minggu setelah *booster* pertama dengan tujuan untuk mempertahankan reaksi pembentukan antibodi setelah *booster* pertama, sebab jumlah antibodi dapat ditemukan dengan cepat (dua sampai tiga hari) ke tingkat yang tinggi setelah dilakukan *booster* kedua dan sebelum akhirnya menurun kembali dengan lambat (Tizard, 1988). Sistem pembentukan antibodi dirangsang kembali dengan adanya *booster* kedua karena sistem pembentukan antibodi memiliki kemampuan untuk mengingat

keterpaparan dengan suatu antigen sebelumnya dan penyuntikan antigen yang berulang tidak menyebabkan tanggap kebal.

Rata – rata titer antibodi tertinggi ditunjukkan pada minggu pertama hingga minggu ketiga. Pada minggu kedua dan ketiga titer antibodi mengalami peningkatan baik pada perlakuan vaksin aktif dan pada perlakuan vaksin inaktif karena masih ada pengaruh adanya antigen didalam tubuh sedangkan kerusakan antibodi masih sedikit (Handijatno dkk, 1990). Setelah minggu ketiga rata – rata titer antibodi mengalami penurunan. Hal ini disebabkan antibodi yang terbentuk sedikit dan kerusakan antibodi di dalam tubuh mengalami peningkatan (Saraswati, 2004). Hal tersebut juga didukung oleh pendapat Volks (1993) bahwa produksi antibodi mencapai puncak dalam 2 sampai 3 minggu. Hasil inunisasi pada kelinci adalah antibodi poliklonal, yang akan digunakan sebagai bahan untuk *western blot*.

## **5.2 Analisis Berat Molekul Protein *Brucella abortus* S19 dengan Metode *Western Blot***

Pelczar *et al* (1988) menyatakan bahwa terdapat dua kelompok senyawa yang dijumpai secara alamiah yang jelas bersifat imunogenik artinya mempunyai kemampuan untuk merangsang respon kekebalan senyawa yang dimaksud ialah protein dan polisakarida. Protein pada umumnya lebih efektif dalam merangsang pembentukan antibodi dibandingkan dengan polisakarida. Oleh karena itu pada penelitian ini menggunakan metode *western blot* untuk mendeteksi berat molekul protein.

Pada *western blot* tahap pertama dilakukan pemisahan protein dengan SDS-PAGE dan selanjutnya diransfer ke membran *nitrocelulose* yang sesuai dan akhirnya dilabel dengan antibodi dan divisualisasikan dengan pewarnaan yang diinginkan seperti *Fast-Red* atau *Commasie blue* (Rantam, 2003). Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan SDS-PAGE tersebut adalah kemurnian isolat, kebersihan isolat dan konsentrasi protein dalam ekstrak. Isolat yang murni akan menghasilkan pita protein yang baik, tidak terdapat pita protein yang menggelembung sehingga dapat mempermudah analisis berat molekul (BM) pada pita yang terbentuk. Kebersihan isolat mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk dalam gel, pita terlihat tajam dengan gel yang terang sehingga mempengaruhi analisis protein dan dokumentasi. Konsentrasi protein ekstrak mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada proses analisis maupun karakterisasi protein juga kecepatan pembentukan pita protein (Kusnoto, 2003).

Menurut Burnette (1981) teknik ini memungkinkan deteksi protein dengan sensitivitas tinggi karena protein dipisahkan dalam volume kecil. Keuntungan teknik ini adalah cepat, efisiensi pemindahannya tinggi dan beberapa gel dapat dipindahkan dalam waktu yang sama. Dalam penelitian ini metode *western blot* digunakan untuk mendeteksi berat molekul protein dapat terlihat pada pita karena antigen mampu mengenali antibodi.

Pada penelitian ini dihasilkan pita protein yaitu 62,4 kDa, 23,9 kDa, 21,1 kDa, 19,0 kDa. Hal ini sesuai dengan Lin (1995) protein *Brucella abortus* dapat diukur dengan uji sintesis protein, berat molekul yang dapat dinilai 62 kDa, 28 kDa, 24 kDa, 17 kDa .

Pita pertama terjadi pada protein 62,4 kDa menggambarkan protein yang mampu dikenali antibodi. Hal ini menunjukkan protein tersebut dapat menginduksi antibodi terlihat munculnya band. Sesuai dengan pernyataan Tizard (1988) bahwa protein merupakan antigen terbaik karena ukuran dan kerumitan strukturnya.

Pita kedua, ketiga, dan keempat masing-masing adalah 23,9 kDa, 221,1 kDa, 19,0 kDa. Pita protein ini menunjukkan bentuk garis yang jelas, sehingga terdapat kemungkinan merupakan imunodominan sehingga mampu memicu respon imun dalam bentuk antibodi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Stevens *et al* (1994) bahwa protein dengan berat 18-27 kDa merupakan imunodominan pada *Brucella abortus* S2308.

Menurut Cloeckert (1992) Protein pertama yang telah berhasil diisolasi dari serum darah hewan terinfeksi dan berpotensi sebagai protein yang memiliki sifat imunogenik yang berperan penting dalam infeksi *Brucella abortus* adalah protein dengan berat molekul antara 36-38 kDa. Protein dengan berat molekul yang besar merangsang respon imun yang kuat, sedangkan pada peptida yang kecil, dianggap menyerupai atau identik dengan peptida natif, sehingga tidak dikenal sebagai benda asing karena itu tidak imunogenik (Burgess, 1995)

Salah satu faktor yang menentukan antigenitas suatu zat adalah besarnya molekul. Molekul yang mempunyai berat molekul besar lebih antigenik dibandingkan dengan berat molekul yang kecil walaupun antigenitas juga ditentukan dari kompleksitas fisiokimiawi suatu zat (Tizard, 1988).

## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Antigenitas *Brucella abortus* S19 terhadap antibodi poliklonal kelinci yang telah diimunisasi dengan *Brucella abortus* S-19 dengan metode *western blot* menunjukkan adanya pita pada membran nitroselulose dan didapatkan empat pita protein yaitu 62,4 kDa, 23,9 kDa, 21,1 kDa, 19,0 kDa.

### 6.2 Saran

Metode *western blot* dapat digunakan sebagai salah satu uji untuk mengetahui kualitas vaksin berdasarkan ikatan antigen dan antibodi yang spesifik. Pelaksanaan metode *western blot* akan lebih tepat dan akurat hasilnya apabila sebelumnya dilaksanakan uji ELISA yang berfungsi untuk mengetahui titer antibodi yang tinggi.

## RINGKASAN

**Novalia Dewi.** Antigenitas *Brucella abortus* Strain 19 Terhadap Antibodi Poliklonal dengan Metode *Western Blot*. (Di bawah bimbingan bapak Emile Bambang S.T,M.s.,Drh selaku dosen pembimbing pertama dan ibu Hermin Ratnani,M.Kes.,Drh selaku dosen pembimbing kedua).

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan: bagaimanakah hubungan antara antigenitas dari *Brucella abortus* S19 terhadap antibodi poliklonal dengan menggunakan metode *Western Blot*. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi antigenitas bakteri yang berasal dari vaksin *Brucella abortus* strain 19 (BRUCIVET) berdasarkan ikatan antigen dan antibodi ditunjukkan dengan berat molekul yang terdapat pada pita.

Hewan coba yang digunakan adalah kelinci jantan (*Oryctolagus cuniculus*) berumur tiga bulan yang belum mendapat vaksinasi. *Brucella abortus* S19 diperoleh dari vaksin aktif kuman PUSVETMA kemudian kuman disuntikkan pada kelinci bersama *adjuvant* untuk memperoleh antibodi poliklonal. Hasil imunisasi pada kelinci yaitu antibodi poliklonal kemudian dianalisis menggunakan metode *western blot*. Pada penelitian ini dihasilkan empat pita protein yaitu 62,4 kDa, 23,9 kDa, 21,1 kDa, 19,0 kDa.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aboul Saound. SM., Gergis SM., El-Seedy., Nahed Ik and abd el-Ghani MA. 2002. Prophylactic Effect of *Salmonella enteridis* Vaccines in Chickens. <File://A:/s=enteridis.htm>. Internet 04/07/02
- Akoso, B.T. 1994. Kesehatan Sapi. Penerbit Kanisius. Hal. 74-77.
- Alton, G.G., Lois M. Jones, R.D Angus, J.M Verger. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory Institute National de la Recherche Agronomique. Paris.
- Artama, W.T. 1992. Antibodi monoklonal, Teori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan. PAU-Bioteknologi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. Hal 8-9 dan 28-31.
- Baratawidjaja, K.G., 2006. Immunologi dasar. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bellanti, J.A. 1993. Immunologi III. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Burgess, G.W. 1995. Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. Gadjah Mada University Press.
- Burnette, W.N. 1981. "Western Blotting" Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulphate polyacrilamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radioiodinated Proteins. Anal Biochem.
- CloECKaert, A. kerkhofs, P. Limet, J.N. 1992. Antibody Response to Brucella Outer Membrane Proteins in Bovine Brucellosis: Immunoblot Analysis and Competitive Enzym-Linked. Immunsorbent Assay Using Monoclonal Antibodies. Journal Clinical Microbiology. Belgium. 30(12): 3168-3174. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi.?&pubmedid=1452700>
- Daniel., TristanG and Parslow. 1997. Medical Immunology. 9<sup>th</sup>. Ed. Epleton and Lange. A Simon and Schueter Company. Printed in The United Stateof America.
- Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur, 2006. Kebijakan Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur Dalam Upaya Pemberantasan Brucellosis Di Jawa Timur. Disampaikan pada Rapat Koordinasi Teknis Nasional Pemberantasan Brucellosis se JawaTimur

- European Molecular Laboratory. 2006. Bacteria Genomes - BRUCELLA ABORTUS causes Brucellosis (spontaneous abortion in cattle and undulant fever in humans).  
<http://iai.asm.org/cgi/content/full/73/5/2873>.
- Fank, F. 1988. Characterization of Proteins. Pafra Ltd. United Kingdom. 415-425.
- Handijatno, D. 2003. Pencegahan Dan Penanggulangan Brucellosis Pada Sapi Perah. Disampaikan dalam Rakor Pemberantasan Brucellosis Di Jawa Timur. Hal 1-3.
- Hardjopranto, S. H., 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 215-219.
- Harrigan, W.F., Wilki. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology 3<sup>rd</sup> edition. Academic Press. Hal. 133-134, 209-210.
- Jametz, E., Melnick J.L., and Adelberg E.A. 1980. Review of Medical Microbiology. 14<sup>th</sup>. Ed. Lange Medical Publications. Los Altos Chicago.
- Jane Taylor. 1992. Micro Organisms and Biotechnology. University of Bath. Science 16-19. 2<sup>nd</sup>. Ed. Thomas Nelson and Sons Ltd. Hongkong.
- Jawetz, E., Joseph L. Melnick and Edward A. Adelberg. 1990. Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan. EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. Hal. 7-33, 193-204, 311-313.
- Karsinah, Lucky H.M., Suharto., Mardiasuti, H.W. 1994. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi Revisi. Binarupa Aksara. Jakarta. Hal 188-190.
- Kresno, S.B. 2001. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Fakultas kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 657.
- Kunkel, D. 2004. Scientific Stock Photodraphy of Biological.  
<http://www.denniskunkel.com/DK/DK/bakteria/96554G.html>
- Kusnoto. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunogenik Larva stadium II *Toxocara cati* Isolat lokal. Tesis. Progam Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lin, J., and Ficht, T.A. 1995. Protein Synthesis in Brucella abortus Induced during Macrophage Infection. Department of Veterinary Pathobiology. College of Veterinary Medicine. Texas. Hal 1-3.
- Marth. E.H., Steele, J.L. 2001. Applied Dairy Microbiology. Marcel Dekker. Hal 44-45, 430-435.

- Meles. W. 2007. Penyakit Sapi Perah Disebabkan Faktor Makanan. Laboratorium Kebidanan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Meyer R.J., and J.H. Walker. 1987. Imunochemical Methods in Cell and Molekuler Biologi. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanich Publisher.
- Morgan, B. 1978. Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human *brucellosis* in adults: 16 years' experience in an endemic area. <http://www.sgm.ac.uk/>.
- OIE. 2000. Manual of Diagnostic test and Vaccines for Animals. Office International des Epizooties. Reference Laboratories for Bovine Brucellosis.
- Public Health Laboratory Network, 2004. Brucellosis Laboratory Case Definition. Australian Government Department of Health and Ageing. <http://www.dhac.gov.au/internet/wems/publishing.html>
- Pelczar, M.J., E.C.S. Chan.1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi 2. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Putra, A.A.G., Muthalib, A., Arsani, N.M., Sunarya, G.M., Yuwana, W.S. 2001. Evaluasi Pemberantasan Brucellosis Pada Sapi/Kerbau Di Pulau Lombok. Data Surveillance s/d Bulan September 2001. Disampaikan Pada Workshop Nasional Brucellosis.
- Quinn, P.J., B.K. Markey, M.E. Carter, W.J. Donnelly and F.C. Leonard. 2002. Veterinary Micobiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing. Great Britain. Hal. 162-167.
- Rantam, F.A. 2003. Metode Immunologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Richardson, M., Jane N. Holt. 1962. Synergistic Action of Streptomycin With Other Antibiotics on Intracellular *Brucella Abortus* In Vitro. American Society For Microbiology (ASM). USA.
- Robert, F. W. 2003. Molecular Biology 2<sup>nd</sup> Edition. International Edition. Migraw-Hill.
- Ryan KJ; Ray CG (editors). 2004. Sherris Medical Microbiology, 4<sup>th</sup> ed., McGraw Hill. <http://en.wikipedia.org/wiki/Brucella>
- Saraswati, E. Efektivitas Vaksin *Brucella abortus* S-19 pada Kelinci. Skripsi. Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.

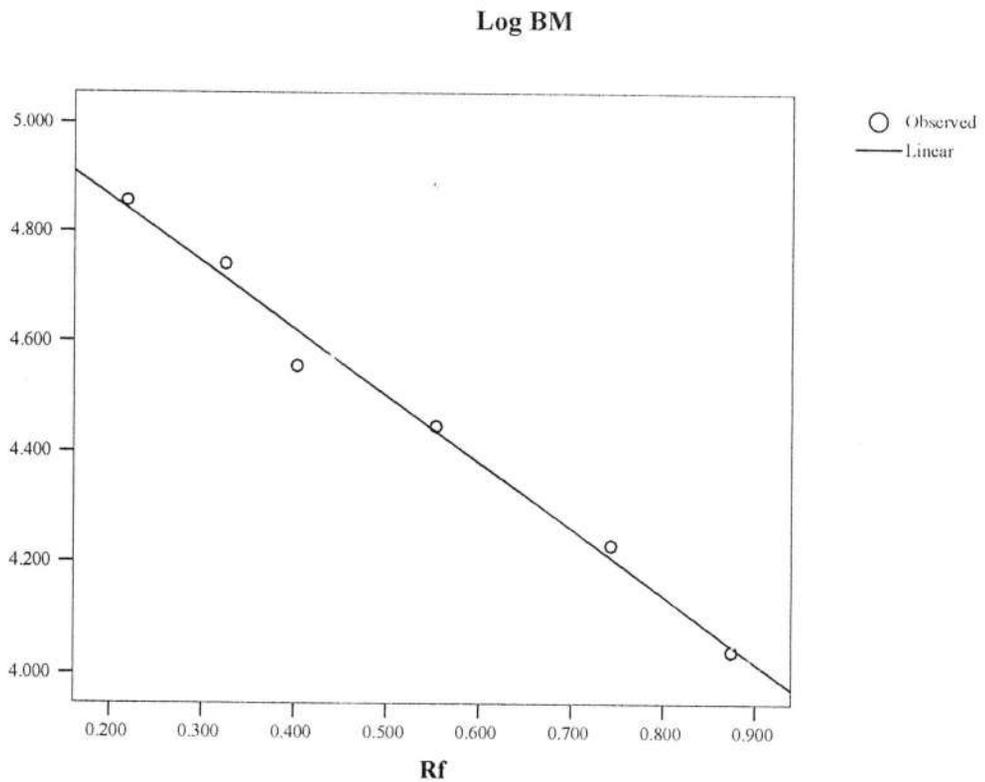
- Smith, J.R. 1995. Produksi Serum Hiperimun. Dalam: Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian (Burgess, G.W. ed.). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 20, 23-24 dan 28-30.
- Stevens, M. G., S. C. Olsen, dan N. F. Cheville. 1994. Lymphocyte proliferation in response to immunodominant antigens of *Brucella abortus* 2308 and RB51 in strain2308-infect cattle. *Infect. Immune.* 62:4646-4649.
- Subronto, I.T. 2003. Ilmu Penyakit Ternak I. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 464-485.
- Syarief, M. Z. dan Sumoprastowo, R. M. 1985. Ternak Perah. C. V Yasaguna. Jakarta. Hal. 154-155.
- Timoney, J.F., James H. Gillespie, Frederic W. scott and Jeffrey E. Barlough. 1988. *Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animal*. Eighth Edition. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press. London, hal. 135-151.
- Tizard, I. 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Airlangga University Press. Surabaya.
- Volk, W.A. Wheeler, M.f. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Erlangg. Jakarta. Hal 213.
- Wikimedia. 2007. Free Encyclopedia Facts About *Brucellosis*.
- WHO. 1971. Joint FAO/WHO Expert. Committee on Brucellosis. Fifth Report. Geneva. Hal. 37-47.
- Wolfgang, K.J., Willet.H.P., Amos D.d., Willfeet.C.M. 1992. *Zinsser microbiology*. 19<sup>th</sup>. Ed. Prentice Hall International Inc. Appleton and Lange. USA.

**Lampiran 1. Perhitungan massa Molekul Relatif (MR) *Brucella abortus* S19  
 Dengan metode *western blot* menggunakan regresi *linear***

Rf =  $\frac{\text{Jarak yang dipindahkan oleh protein sampel}}{\text{Jarak yang dipindahkan oleh bahan pembawa}}$

Jarak <i>band</i> pd marker	Rf	BM (y KDa)	BM (y Da)	log y (Da)
22,5	0,218	72,0	72000	4,857
33,5	0,325	55,0	55000	4,740
41,5	0,403	36,0	36000	4,556
57,0	0,553	28,0	28000	4,447
76,5	0,743	17,0	17000	4,230
90,0	0,874	11,0	11000	4,041

Panjang gel = 103 mm



## Regression

Variables Entered/Removed<sup>b</sup>

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf <sup>a</sup>	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Log BM

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.994 <sup>a</sup>	.988	.985	.037197

a. Predictors: (Constant), Rf

ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.466	1	.466	336.989	.000 <sup>a</sup>
	Residual	.006	4	.001		
	Total	.472	5			

a. Predictors: (Constant), Rf

b. Dependent Variable: Log BM

Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5.106	.037		136.460	.000
	Rf	-1.209	.066	-.994	-18.357	.000

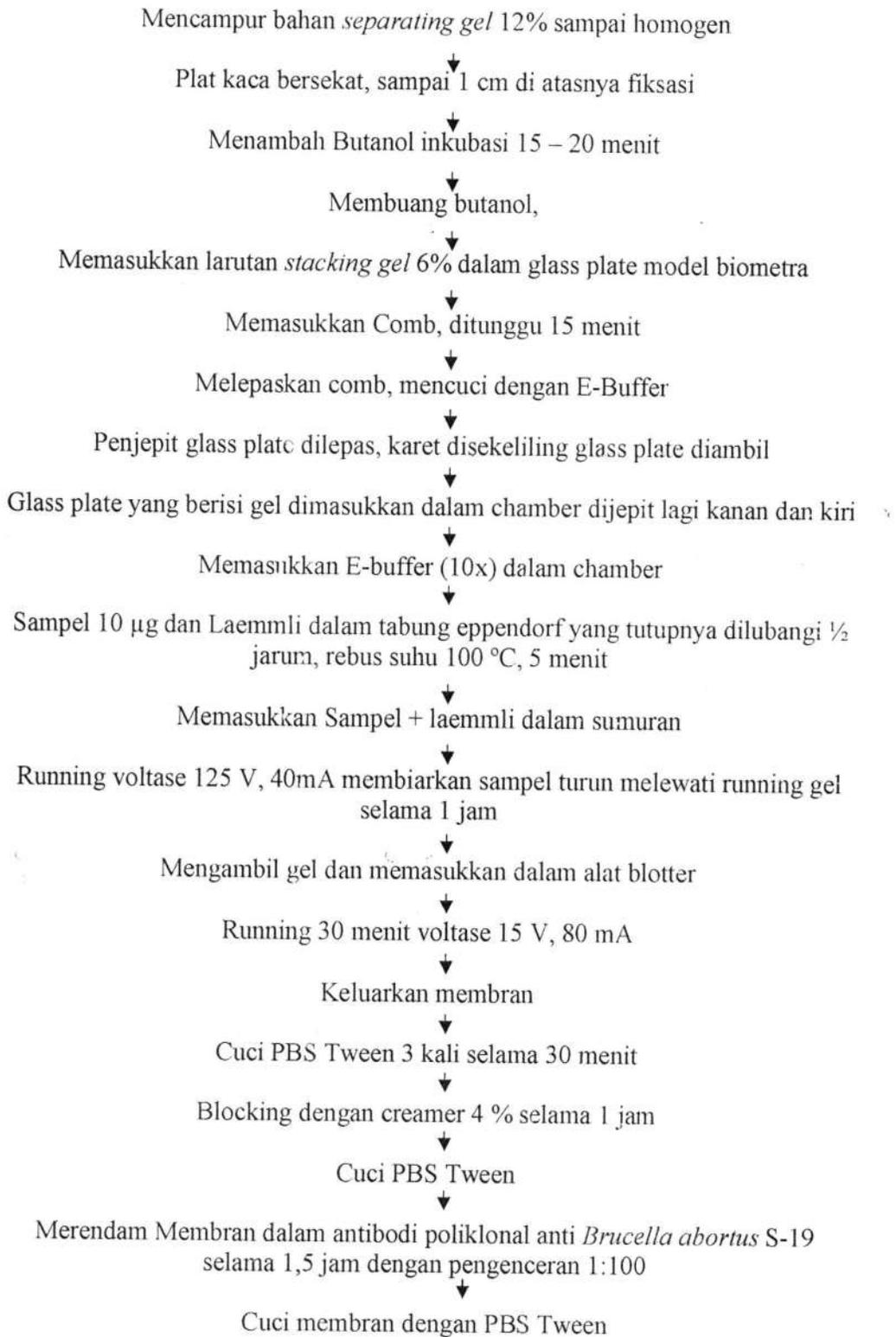
a. Dependent Variable: Log BM

## Penghitungan BM Protein pada Sampel

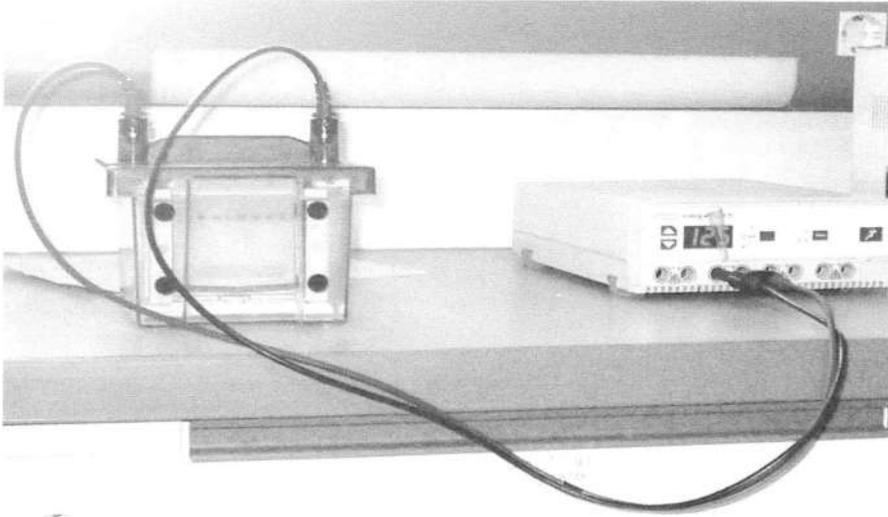
Jarak sampel	RF	$y = 5,106 - 1,209x$	Antilog y (BM Da)	BM kDa
26,5	0,257	4,795	62373,5	62,4
62,0	0,602	4,378	23878,0	23,9
66,5	0,646	4,325	21134,9	21,1
70,5	0,684	4,278	18967,1	19,0

Panjang gel = 103

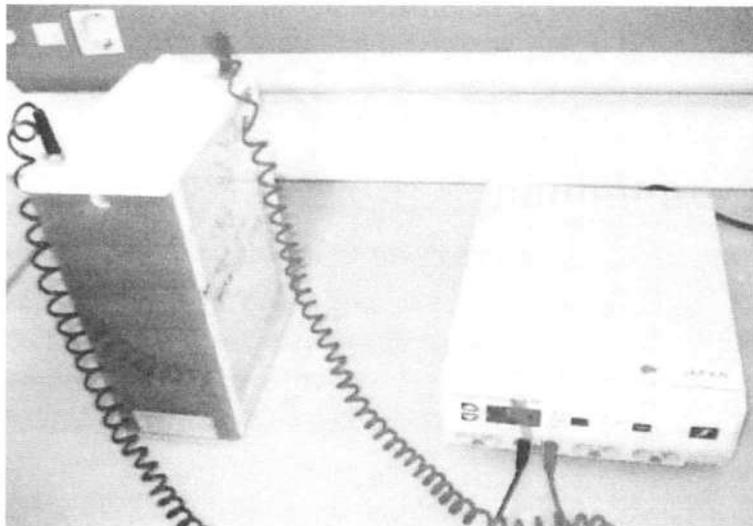
## Lampiran 2. Teknik *Western Blot*



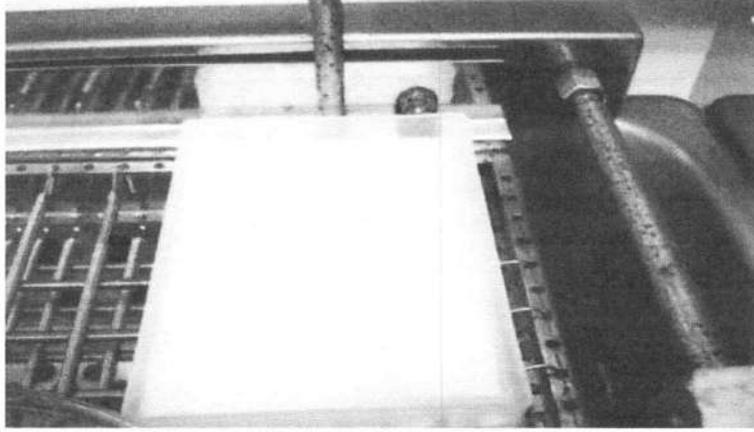
Merendam membran dalam konjugat anti rabbit yang telah dilabel oleh alkalin  
posphatase  
↓  
Mencuci membran dengan PBS Tween  
↓  
Merendam dengan substrat western blue

**Lampiran 3. Gambar Peralatan Penelitian**

Gambar 4.1 SDS-PAGE *equipment*



Gambar 4.2 Alat Blotting



Gambar 4.3 Tahap Pencucian



Gambar 4.3 Sentrifuge