

**SKRIPSI**

**KARAKTERISASI LIPOPOLISAKARIDA *Brucella abortus* S19 DENGAN  
UJI *INDIRECT SANDWICH* ELISA DAN UJI *DOT BLOT***



Oleh :

TRI HANDAYANI  
PASURUAN – JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2005**

**KARAKTERISASI LIPOPOLISAKARIDA *Brucella abortus* S19 DENGAN  
UJI INDIRECT SANDWICH ELISA DAN UJI DOT BLOT**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

TRI HANDAYANI  
NIM 069812602

**Menyetujui**

**Komisi Pembimbing,**



(Didik Handijatno, M.S., Drh.)

**Pembimbing Pertama**



(Rr. Ratih Ratnasari, S.U., Drh.)

**Pembimbing Kedua**

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Menyetujui

Panitia Penguji,



Jola Rahmahani, M.Kes., Drh.

**Ketua**



Suryanie Sarudji, M.Kes., Drh

**Sekretaris**



Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., Drh.

**Anggota**



Didik Handijatno, M.S., Drh

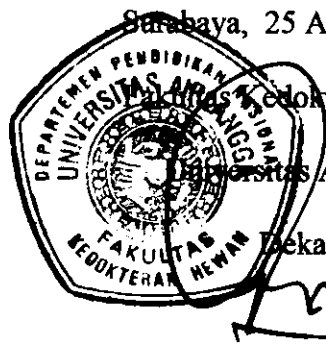
**Anggota**



Rr. Ratih Ratnasari, S.U., Drh.

**Anggota**

Surabaya, 25 Agustus 2005



Surabaya, 25 Agustus 2005

Universitas Airlangga

Fakultas Kedokteran Hewan

Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh.

NIP. 130 687 297

## KARAKTERISASI LIPOPOLISAKARIDA *Brucella abortus* S19 DENGAN UJI INDIRECT SANDWICH ELISA DAN UJI DOT BLOT

Tri Handayani

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi lipopolisakarida (LPS) *Brucella abortus* Strain19 dengan menggunakan uji *indirect sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dan uji *dot blot* serta mengetahui ada atau tidaknya perbedaan determinan antigen antara LPS *Brucella abortus* S19 dan LPS *Escherichia coli*.

LPS diisolasi dari *B.abortus* S19 dengan cara ekstraksi fenol. Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit jantan umur enam minggu sebanyak 14 ekor yang diinjeksi secara subkutan dengan LPS *B.abortus* S19 ditambah *Complete Freund Adjuvant* (CFA) pada injeksi pertama dan *Incomplete Freund Adjuvant* (IFA) pada injeksi ulang serta kelinci jantan empat ekor umur dua bulan yang diinjeksi secara subkutan dengan *B.abortus* S19 aktif. Dua minggu setelah *booster* terakhir dilakukan pengambilan darah untuk diambil serumnya yang mengandung antibodi poliklonal. Antibodi poliklonal selanjutnya digunakan untuk mendeteksi LPS *B.abortus* S19 dengan uji *indirect sandwich* ELISA dan uji *dot blot*. Kontrol negatif dilakukan dengan larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) dan juga dilakukan uji reaksi silang antara antibodi yang telah dimurnikan tersebut dengan LPS dari *E.coli*. Pada *indirect sandwich* ELISA, dilihat *Optical Density* (OD) sedangkan pada uji *dot blot*, adanya bintik berwarna ungu (*dot*) menunjukkan spesifikasi dari LPS.

Hasil penelitian ini menunjukkan LPS *B.abortus* S19 dapat dideteksi pada kadar 270,8 µg dengan uji *indirect sandwich* ELISA dan pada kadar 10 pg dengan uji *dot blot* serta menunjukkan adanya perbedaan determinan antigen antara LPS *B.abortus* S19 dan LPS *E.coli*.

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah berkat rahmat Allah SWT yang telah memberikan karunia, taufik dan hidayahnyaNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang merupakan salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dalam penulisan skripsi yang berjudul “Karakterisasi Lipopolisakarida *Brucella abortus* Strain 19 dengan Uji *Indirect* ELISA dan Uji *Dot Blot* ” penulis mencoba untuk mendeteksi LPS *Brucella abortus* Strain 19 dengan menggunakan uji *indirect sandwich* ELISA dan uji *dot blot* serta untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan determinan antigen antara LPS *Brucella abortus* dan LPS *Eschericia coli* berdasarkan nilai OD.

Penulis menyadari bahwa dari awal pelaksanaan penelitian hingga terselesaikannya penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan banyak pihak, untuk itu pada kesempatan ini dengan penuh rasa hormat penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh., sebagai dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
2. Didik Handijatno, M.S., Drh. dan Rr. Ratih Ratnasari, S.U., Drh. sebagai dosen pembimbing atas perhatian dan bimbingannya sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.

3. Rr. Ratih Ratnasari, S.U., Drh., Suwarno, M.Si., Drh dan Jola Rahmahani, M.Kes., Drh. sebagai Tim Due Like atas kesempatan yang telah diberikan dan bimbingannya selama pelaksanaan penelitian serta penyelesaian skripsi ini.
4. Jola Rahmahani, M.Kes., Drh., Suryanie Sarudji, M.,Kes., Drh. serta Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., Drh. sebagai dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran selama penulisan skripsi ini.
5. Endang Suprihati, M.S, Drh sebagai dosen wali dan seluruh dosen Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah membantu dan membekali ilmu selama perkuliahan.
6. Program Due Like Batch sebagai penyanggah dana.
7. Seluruh dosen dan karyawan Laboratorium Virologi dan Imunologi, Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga dan Laboratorium Zoonosis Bagian Brucella Pusat Veterinaria Farma Surabaya, yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu, atas bantuan dan kerjasamanya selama pelaksanaan penelitian.
8. Seluruh keluarga yang penulis cintai: Suami Bambang Dwi Irawan atas kesabaran dan pengertiannya, Ayah (alm.) Dulhasan atas dorongan semangat dan kasih sayangnya, Ibu Sri Sulastri atas cinta dan do'a yang tiada pernah putus, kakak penulis Diana Sari dan Hendriyanto serta

keponakanku Alif dan Aisyah yang telah menambah keceriaan dalam keluarga.

9. Sahabat-sahabat penulis: Fifin, Nunuk, Prapti, Erna, Dina, Heni, Husni, Dini, Lidya, Arifa, Icha atas segala bantuan dan dukungannya, rekan-rekan MU 12 yang telah memberikan suasana yang sangat kondusif, rekan-rekan penelitian Iffah, Ilham dan Tri Dian atas kerjasamanya, rekan MENWA UNAIR serta angkatan 98 yang selalu memberikan motivasi.
10. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung.

Semoga Allah SWT senantiasa membalas budi baik yang telah diberikan oleh mereka kepada penulis. Amin.

Akhir kata, semoga skripsi ini berguna bagi perkembangan Ilmu dan Pengetahuan, khususnya di bidang Kedokteran Hewan. Amin.

Surabaya, Agustus 2005

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Landasan Teori.....	4
1.4. Tujuan Penelitian.....	5
1.5. Manfaat Penelitian .....	6
1.6. Hipotesis Penelitian .....	6
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Brucellosis .....	7
2.1.1 Penyebab .....	7
2.1.2 Epidemiologi .....	7
2.1.3 Penularan .....	8
2.1.4 Gejala Klinis .....	8
2.1.5 Diagnosis .....	9
2.1.6 Pencegahan .....	9
2.2 <i>Brucella abortus</i> .....	9
2.3 Strain <i>Brucella abortus</i> .....	10



2.4	Serodiagnosis Brucellosis .....	11
2.4.1	<i>Serum Agglutination Test (SAT)</i> .....	12
2.4.2	<i>Complement Fixation Test (CFT)</i> .....	13
2.4.3	<i>Rose Bengal Test (RBT)</i> .....	13
2.4.4	<i>Milk Ring Test (MRT)</i> .....	14
2.4.5	<i>Enzyme Linked Imunosorbent Assay (ELISA)</i> .....	15
2.4.5.1	<i>Direct ELISA</i> .....	15
2.4.5.2	<i>Indirect ELISA</i> .....	16
2.4.5.3	<i>Sandwich ELISA</i> .....	16
2.5	Antigen Bakteri.....	17
2.5.1	Lipopolisakarida (LPS) .....	18
2.6	Metode Pemisahan LPS .....	20
2.7	Respon Imun Terhadap LPS <i>Brucella abortus</i> .....	21
2.8	Uji <i>Dot Blot</i> .....	22
2.9	Vaksin <i>Brucella</i> .....	23
2.9.1	Vaksin <i>Brucella abortus</i> Strain 19.....	23
2.9.2	Vaksin <i>Brucella abortus</i> Strain 45/20 .....	24
2.9.3	Vaksin <i>Brucella abortus</i> Strain RB5 .....	25
III.	MATERI DAN METODE PENELITIAN .....	27
3.1.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	27
3.2.	Bahan dan Materi Penelitian.....	27
3.2.1	Hewan Percobaan.....	27
3.2.2	Bahan Penelitian .....	27

3.2.3	Alat Penelitian.....	28
3.2.4	Kandang Penelitian.....	28
3.2.5	Pakan.....	29
3.3.	Metode Penelitian.....	29
3.3.1	Pembiakan <i>B.abortus</i> S19.....	29
3.3.2	Isolasi LPS <i>B.abortus</i> S19.....	30
3.3.3	Pembuatan Antibodi Poliklonal terhadap <i>B.abortus</i> S19	31
3.3.4	Pembuatan Antibodi Poliklonal terhadap LPS <i>B.abortus</i> S19.....	31
3.3.5	Karakterisasi LPS dengan Uji <i>Indirect Sandwich</i> ELISA	32
3.3.6	Karakterisasi LPS dengan Uji <i>Dot Blot</i> .....	34
3.4	Peubah yang diamati.....	35
IV.	HASIL PENELITIAN.....	36
4.1	Pembiakan <i>B.abortus</i> S19.....	36
4.2	Isolasi LPS <i>B.abortus</i> S19.....	37
4.3	Antibodi Poliklonal terhadap <i>B.abortus</i> S19 .....	37
4.4	Antibodi Poliklonal terhadap LPS <i>B.abortus</i> S19 .....	37
4.5	Karakterisasi LPS dengan Uji <i>Indirect Sandwich</i> ELISA.....	38
4.6	Karakterisasi LPS dengan Uji <i>Dot Blot</i> .....	39
V.	PEMBAHASAN .....	40
5.1	Isolasi LPS <i>B.abortus</i> S19.....	40
5.2	Antibodi Poliklonal terhadap <i>B.abortus</i> S19 dan LPS <i>B.abortus</i> S19.....	41

5.3	Karakterisasi LPS dengan Uji <i>Indirect Sandwich</i> ELISA.....	43
5.4	Karakterisasi LPS dengan Uji <i>Dot Blot</i> .....	44
VI.	KESIMPULAN DAN SARAN .....	46
6.1	Kesimpulan .....	46
6.2	Saran .....	46
	RINGKASAN .....	47
	DAFTAR PUSTAKA.....	49
	LAMPIRAN	

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Hasil Ekstraksi LPS <i>B.abortus</i> S19 pada Media <i>Potato Agar</i> (PA) .....	37
4.2 Nilai Kisaran <i>Optical Density</i> (OD) dan Titer Antibodi Poliklonal terhadap <i>B.abortus</i> S19 dengan Teknik <i>Indirect</i> ELISA .....	37
4.3 Nilai Kisaran <i>Optical Density</i> (OD) dan Titer Antibodi Poliklonal terhadap LPS <i>B.abortus</i> S19 dengan Teknik <i>Indirect</i> ELISA .....	37
4.4 Hasil Karakterisasi LPS dengan Menggunakan Uji <i>Indirect Sandwich</i> ELISA .....	38

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Lipopolisakarida Bakteri Gram Negatif.....	19
3.1 . ELISA reader.....	33
4.1 Pembiakkan <i>B.abortus</i> S19 pada Media <i>Potato Agar</i> (PA).....	36
4.2 Pewarnaan Gram <i>B.abortus</i> S19 .....	36
4.3 Hasil Identifikasi LPS <i>B.abortus</i> S19 terhadap Antibodi Kelinci dan Mencit dengan Uji <i>Dot Blot</i> .....	39
5.1 Spektrofotometer .....	41

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1 Diagram Metode Penelitian.....	52
Lampiran 2 Diagram Uji <i>Indirect Sandwich</i> ELISA.....	53
Lampiran 3 Diagram Uji <i>Dot Blot</i> .....	54
Lampiran 4 Bahan-bahan Uji <i>Indirect Sandwich</i> ELISA.....	55
Lampiran 5 Bahan-bahan Uji <i>Dot Blot</i> .....	56
Lampiran 6 Bahan-bahan <i>Potato Agar</i> .....	57
Lampiran 7 Penghitungan Dosis Vaksinasi pada Kelinci dan Mencit .....	58
Lampiran 8 Cara Pembuatan NaOH 4 M dan Perhitungan Kadar LPS pada Larutan yang Diencerkan .....	59
Lampiran 9 Vaksinasi pada Kelinci dan Mencit melalui Subkutan.....	60

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Brucellosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme yang termasuk dalam genus *Brucella*, penyakit ini dapat menular dari hewan ke manusia sehingga penyakit ini dikenal bersifat zoonosis. Penyakit Brucellosis telah menyebar diseluruh dunia, di Indonesia sendiri penyakit ini pada sapi telah dimasukkan dalam daftar penyakit menular yang harus dicegah dan diberantas sejak tahun 1959 (Subronto, 2003). Pencegahan dan pemberantasan memang sangat perlu untuk dilakukan karena selain bersifat zoonosis, penyakit ini dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat besar berupa keluron, anak lahir lemah kemudian mati dan gangguan alat reproduksi yang dapat menyebabkan kemajiran serta pada sapi perah terjadi penurunan produksi susu (Akoso, 1996).

Pencegahan penyakit Brucellosis pada petani peternak dapat dilakukan dengan mengkombinasikan antara kebersihan, manajemen beternak yang baik dan vaksinasi (Akoso, 1996). Untuk vaksinasi, vaksin yang sekarang digunakan secara luas adalah vaksin hidup *Brucella abortus* S19. Strain 19 memiliki beberapa keunggulan antara lain : bersifat halus, aerotoleran, patogenesitas rendah, dapat tumbuh tanpa CO<sub>2</sub> dan bersifat stabil (Alton *et al.*, 1998). Sedangkan dalam program pemberantasan pada umumnya disetujui bahwa prinsip uji dan potong merupakan cara terakhir yang dilakukan (Subronto, 2003).

Pencegahan dan pemberantasan Brucellosis di Indonesia memang sudah dilakukan sejak lama namun masih saja ada beberapa wilayah yang belum bebas



penyakit ini, maka untuk mengendalikan dan memberantas penyakit tersebut, diagnosis yang cepat dan akurat sangat diperlukan. Diagnosis dapat berdasarkan pada sejarah penyakit, gejala klinis, perubahan pasca mati, isolasi dan identifikasi terhadap kuman penyebab serta uji serologis. Uji serologis terhadap Brucellosis bermacam-macam, antara lain Uji Aglutinasi Serum (*Serum Agglutination Test/ SAT*), Uji Ikat Komplemen (*Complement Fixation Test/CFT*), Uji Rose Bengal (*Rose Bengal Test/RBT*), Uji Cincin Air Susu (*Milk Ring Test/MRT*), dan Uji Kadar Imunosorbent Terikat Enzim (*Enzyme-Linked Imunosorbent Assay/ ELISA*). ELISA telah dilaporkan bahwa lebih sensitif 10 sampai 10.000 kali dibandingkan uji serologis konvensional (Spencer, 1995). Uji serologis yang dilakukan biasanya disesuaikan dengan kebutuhan dan tujuan yang diinginkan, misalnya MRT digunakan untuk *screening test* pada kelompok sapi perah, RBT untuk individual yang dilanjutkan dengan CFT atau uji ELISA bila membutuhkan tingkat sensitivitas yang tinggi (Subronto, 2003; Rantam, 2003).

Salah satu kelemahan dari uji serologis adalah penggunaan antigen utuh (*whole molecule*) sebagai komponen kit diagnostiknya, sehingga seringkali terjadi reaksi silang dengan bakteri lain yang mengakibatkan reaksi positif palsu, sebagai contoh Brucellosis dan Tuberculosis. Untuk mengatasi kendala tersebut, maka diperlukan antigen yang lebih spesifik. Untuk itu antigen harus memenuhi syarat-syarat tertentu seperti antigen harus antigenik dan menginduksi respon antibodi pada inangnya serta antigen harus unik agar mempunyai spesifisitas yang tinggi (Rantam, 2003).

Struktur *B.abortus* tergolong unik dan tidak seperti bakteri Gram negatif lainnya. Pada permukaan luar bakteri *B.abortus* tidak memiliki pili dan tidak

berkapsul, permukaan luarnya terdiri dari dua komponen yang telah diidentifikasi sebagai faktor virulensi yang potensial yaitu protein membran luar (*Outer Membran Protein/OMP*) dan lipopolisakarida (LPS) (Quin *et al.*, 2002). Lipopolisakarida merupakan komponen terbesar antigen dari membran luar bakteri Gram negatif dan merupakan antigen potensial yang dapat secara langsung menginduksi respon imun sel B sehingga memacu terbentuknya antibodi (Alonso-Urmeneta *et al.*, 1998; Forestier *et al.*, 1999).

Rantam (2003) menuliskan bahwa Lipopolisakarida (LPS) dapat digunakan sebagai salah satu antigen alternatif pengganti dari sel utuh pada uji ELISA, namun penelitian yang lebih lanjut tentang hal tersebut belum banyak diteliti.

Hal inilah yang mendorong peneliti mempelajari LPS lebih lanjut terutama LPS *Brucella abortus* S19. Pemakaian LPS *E.coli* pada penelitian ini untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan determinan antigen antara LPS *B.abortus* dengan LPS *E.coli*, karena telah diketahui bahwa *B.abortus* dan *E.coli* merupakan kuman Gram negatif. Dengan diketahui ada atau tidaknya perbedaan determinan antigen maka dapat diketahui ada atau tidaknya reaksi silang pada kedua bakteri tersebut. Pemilihan uji *indirect sandwich* ELISA dan uji *dot blot* dalam penelitian ini dikarenakan kedua uji tersebut mempunyai tingkat sensitivitas yang tinggi (Rantam, 2003).

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan oleh pihak yang terkait sehingga dalam jangka panjang LPS *B.abortus* S19 dapat dijadikan antigen yang lebih spesifik pada uji ELISA dalam penegakan diagnosis Brucellosis.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah LPS *B.abortus* S19 dapat dideteksi menggunakan uji *indirect sandwich* ELISA dan uji *dot blot* ?
2. Berdasarkan nilai OD pada uji *indirect sandwich* ELISA, apakah terdapat perbedaan determinan antigen antara LPS *B.abortus* S19 dan LPS *E.coli* ?

## 1.3 Landasan Teori

Brucellosis pada sapi umumnya disebabkan *B.abortus*. Infeksi pada sapi betina dapat mengakibatkan plasentitis yang diikuti abortus pada masa kebuntingan 5 sampai 8 bulan (Nielsen dan Duncan, 1990).

Vaksin yang secara luas digunakan untuk Brucellosis adalah vaksin hidup *Brucella abortus* S19 (Subronto, 2003). Strain 19 memiliki beberapa keunggulan antara lain bersifat halus, aerotoleran, patogenesitas rendah dan dapat tumbuh tanpa CO<sub>2</sub> (Alton *et al.*, 1988).

*Brucella abortus* S19 memiliki LPS pada dinding sel yang merupakan bagian terbesar antigen permukaan yang dapat menjadi dasar untuk klasifikasi serologis dan penolong penting pada diagnosis. LPS juga memainkan peran penting dalam menstabilkan membran luar serta bertindak sebagai reseptor untuk bakteriofag (Arbutthnott *et al.*, 1995). Lipopolisakarida tersusun atas tiga daerah yang berbeda, yaitu lipid A, teras R dan rantai samping O. Lipid A adalah daerah membran hidrofobik yang merupakan daerah pengikat LPS dan merupakan komponen beracun. Melekat pada lipid A adalah daerah oligosakarida teras R

yang merupakan rantai pendek gula meliputi asam keto deoksioktonik dan heptose. Rantai samping O yang hidrofilik terdiri atas banyak perulangan unit tetra atau penta sakarida (Hirst, 1995).

Lipopolisakarida dapat dipisahkan dari dinding sel *Brucella abortus* S19 dengan menggunakan metode ekstraksi fenol/air. Metode tersebut mampu mengekstraksi LPS bentuk S dan R dari berbagai bakteri. Hasil akhir yang diperoleh adalah 1-2% berat kering bakteri (Spencer, 1995).

Imunogenesitas polisakarida ditentukan oleh berat molekul. Antigen dengan berat molekul lebih dari 90 kDa merupakan imunogen kuat dan yang kurang dari 80 kDa bersifat non imunogenik (Hirst, 1995). Dalam hal antigenesitas, LPS dapat mengenali antibodi yang dibentuk terhadapnya berdasarkan reaksi antigen-antibodi. Reaksi ini menjadi dasar didalam menentukan sensitivitas dan spesifisitas uji diagnosis (Nielsen, 2002).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mendeteksi antigen LPS *B.abortus* S19 dengan menggunakan uji *indirect sandwich* ELISA dan uji *dot blot*.
2. Mengetahui ada atau tidaknya perbedaan determinan antigen antara LPS *B.abortus* S19 dan LPS *E.coli*.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang beberapa karakter LPS *Brucella abortus* S19 yang nantinya dapat dikembangkan oleh peneliti lainnya sehingga dalam jangka panjang LPS *B.abortus* S19 dapat digunakan sebagai antigen pada uji ELISA khususnya dan uji serologis lainnya pada umumnya.

### 1.6 Hipotesis Penelitian

1. Lipopolisakarida *Brucella abortus* 19 dapat dideteksi menggunakan uji *indirect sandwich* ELISA dan uji *dot blot*.
2. Terdapat perbedaan determinan antigen antara lipopolisakarida *Brucella abortus* S19 dan lipopolisakarida *Escherichia coli*.

## **BAB II**

# **TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Brucellosis

Brucellosis merupakan penyakit hewan menular yang menyerang sapi, kambing, domba, babi dan dapat menular pada manusia. Pada sapi penyakit Brucellosis dikenal dengan sebutan penyakit “Keluron Menular” sedangkan pada manusia penyakitnya dikenal dengan sebutan “*Undulan Fever*” atau “*Malta Fever*” (Handijatno, 2003).

##### 2.1.1 Penyebab

Penyebab Brucellosis adalah bakteri yang termasuk genus *Brucella*. Pertama kali ditemukan oleh Bruce pada tahun 1887 di pulau Malta yang dikenal dengan nama *Micrococcus melitensis*. Genus *Brucella* memiliki tujuh spesies, yaitu: *Brucella melitensis* (Kambing dan Domba), *Brucella suis* (Babi), *Brucella abortus* (Sapi), *Brucella ovis* (Domba), *Brucella canis* (Anjing), *Brucella neotomae* (Hewan pengerat kayu, seperti Tikus dan Berang-Berang), *Brucella maris* (Mamalia laut seperti Lumba-lumba dan Paus) (Forestier *et al.*, 1999).

##### 2.1.2 Epidemiologi

Penyebaran penyakit Brucellosis pada sapi meliputi seluruh bagian dunia. Di beberapa Negara, khususnya Eropa Selatan dan Asia Barat dimana banyak sapi dikandangan secara tertutup dengan domba dan kambing, infeksi dapat

disebabkan oleh *Brucella melitensis*. Di negara – negara Asia, kejadian rata – rata penyakit hanya beberapa persen saja dan dikandang – kandang tertentu kejadiannya mencapai 50 – 60 %. Penyakit Brucellosis pada sapi telah diketahui tersebar luas di berbagai propinsi di Indonesia yang mungkin berasal dari sapi yang diimpor (Subronto, 2003).

### 2.1.3 Penularan

Penularan Brucellosis dapat terjadi melalui pencernaan, pernafasan atau kulit yang luka, sedangkan penularan melalui perkawinan jarang terjadi (Handijatno, 2003).

### 2.1.4 Gejala Klinis

Brucellosis pada sapi terutama dipengaruhi oleh umur sapi tersebut pada waktu terinfeksi, jumlah kuman dan tingkat virulensinya. Anak sapi betina yang lahir dari induk terinfeksi akan terus menyimpan bibit penyakit sampai mencapai usia dewasa. Gejala utama adalah keguguran janin antara bulan 5 sampai 8. Pada kejadian tertentu, anak sapi dapat lahir sempurna tetapi lemah atau hanya terjadi plasenta tertinggal (*Retensia sekundinae*). Tertinggalnya plasenta yang disertai proses infeksi dapat menyebabkan sapi menjadi steril. Pada hewan muda gejalanya sangat ringan atau bahkan tidak ada. Pada sapi jantan, penyakit Brucellosis dapat menyebabkan radang testis (*Orchitis*) (Akoso, 1996). Brucellosis pada manusia mempunyai gejala-gejala seperti panas yang naik-turun,



rasa tidak enak badan, pegal-pegal dan nyeri otot atau sendi. Pada manusia, Brucellosis tidak menunjukkan gejala aborsi (Quinn *et al.*, 2002).

### 2.1.5 Diagnosis

Diagnosis terhadap penderita Brucellosis di lapangan dapat berdasarkan sejarah penyakit, tanda klinis dan perubahan pasca mati sedangkan diagnosis di laboratorium dapat dilakukan isolasi – identifikasi terhadap kuman penyebab dan uji serologis (Handijatno, 2003).

### 2.1.6 Pencegahan

*Brucella* adalah bakteri intraselluler, karena itu terlindung dari daya pertahanan tubuh sapi dan aktivitas antibiotika sehingga pengobatan dipandang kurang efektif dan tidak ekonomis. Pencegahan penyakit Brucellosis lebih diutamakan daripada pengobatan. Pencegahan dapat dilakukan dengan menjaga kebersihan, manajemen beternak yang baik, program vaksinasi yang intensif dan terjadwal pada semua sapi betina di daerah tertular serta melakukan pengawasan dengan membuat peraturan yang ketat seperti menanggukkan penjualan sapi yang positif secara serologis (Handijatno, 2003)

## 2.2 *Brucella abortus*

*Brucella* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek atau coccobacilli, berujung tumpul dengan ukuran panjang 0.6 - 1.5  $\mu\text{m}$  dan lebar 0.5-0.7  $\mu\text{m}$ . *Brucella* bersifat fakultatif intraselluler, *non motile*, tidak membentuk

spora, serta tidak mempunyai kapsul. *Brucella* biasanya hidup tunggal, jarang ditemukan hidup berpasangan atau bergerombol. Pada pewarnaan Gram terlihat berwarna merah dengan latar belakang jernih. Pada uji biokimia indol negatif, oksidase positif, katalase positif, urea positif, dapat mereduksi nitrat, sitrat negatif, tidak tumbuh atau kurang subur tanpa adanya CO<sub>2</sub> (Alton *et al.*, 1988; OIE, 2004). *Brucella abortus* dapat diekresikan lewat urin atau air susu (OIE, 2004).

### 2.3 Strain *Brucella abortus*

Berdasarkan sensitivitasnya terhadap zat warna Basic Fuchsin-Thionin dan reaksi terhadap antisera monospesifik A dan M, serta kebutuhan CO<sub>2</sub> dikenal *B. abortus* strain patogen (Biotype I), apatogen (S19, S99, S119-3), dan aspesifik (*atypical biotype*). Strain 19 (S19) memiliki beberapa keunggulan antara lain bersifat halus, aerotoleran, patogenitas rendah, dapat tumbuh tanpa CO<sub>2</sub>, sehingga dari strain ini diciptakan vaksin maupun antigen diagnostik (Alton *et al.*, 1988; Alton *et al.*, 1998).

*Brucella abortus* S19 memiliki sifat-sifat normal dari biotype-1, tetapi tidak memerlukan CO<sub>2</sub> untuk pertumbuhannya, tidak tumbuh dengan adanya benzyl penicillin (3 µg/ml), thionin blue (2 µg/ml) dan erythritol (1 mg/ml) dan L-glutamat. *Brucella abortus* Strain RB51 berpermukaan kasar, tumbuh dengan adanya rifampicin (250 µg/ml) dan tidak menghasilkan O-polisakarida. Kedua strain ini banyak digunakan sebagai vaksin pada sapi (OIE, 2004).

## 2.4 Serodiagnosis Brucellosis

Dalam usaha membasmi Brucellosis pada sapi, banyak negara-negara di dunia telah menggunakan cara vaksinasi pada masa pedet dengan vaksin *Brucella abortus* S19 bersama dengan uji serologis dan pemotongan hewan tertular. Vaksin *B.abortus* S19 adalah vaksin hidup maka proses vaksinasi dapat dianggap sebagai infeksi yang terkontrol. Karena itu sukar membedakan antara tanggap kebal yang ditimbulkan vaksinasi dengan *B.abortus* S19 dan tanggap kebal yang ditimbulkan oleh infeksi alam. Untuk mengetahui perbedaan ini, vaksinasi biasanya hanya diberikan pada anak sapi betina berumur antara 2 sampai 10 bulan ( 3 sampai 6 bulan di Inggris, 3 sampai 9 bulan di Kanada, 2 sampai 6 bulan untuk anak sapi perah di Amerika Serikat dan 2 sampai 10 bulan untuk anak sapi pedaging di Amerika Serikat) dengan harapan antibodi dalam serum telah menurun ke tingkat rendah pada waktu pengujian serologis sewaktu dewasa. Bila antibodi ditemukan berkadar tinggi pada hewan dewasa kemungkinan akibat dari infeksi dan bila berkadar rendah kemungkinan akibat baru saja terinfeksi atau vaksinasi sewaktu pedet. Karena itu, interpretasi hasil serologis yang benar dari hewan yang menunjukkan antibodi berkadar rendah adalah penting. Penafsiran hasil uji serologis juga perlu dikonfirmasi dengan uji diagnosa lainnya agar diagnosa yang dilakukan dapat lebih tepat (Tizard, 1988). Berikut ini adalah beberapa uji serologis yang dapat digunakan untuk diagnosis Brucellosis:

#### 2.4.1 Uji Aglutinasi Serum (*Serum Agglutination Test/SAT*)

SAT dipandang penting dilakukan bila kandungan antibodi *Brucella* ingin diketahui dalam International Unit untuk kepentingan ekspor maupun perijinan lainnya. Uji ini, terutama menemukan antibodi aglutinasi subklas IgM dan IgG<sub>2</sub>. Pada beberapa kejadian yang kronik, SAT tidak menyakinkan atau bahkan memberikan hasil negatif palsu. Hal ini dikarenakan sebagian besar immunoglobulin yang dihasilkan dalam tanggap kebal terhadap infeksi *Brucella* adalah IgG<sub>1</sub>. IgG<sub>1</sub> bukan hanya aglutinator jelek tetapi dalam jumlah berlebihan kemungkinan besar menutupi aktivitas aglutinasi Ig M. Reaksi positif palsu dapat diakibatkan karena sisa antibodi yang dihasilkan setelah vaksinasi sewaktu pedet. Antigen yang digunakan dalam SAT dibakukan terhadap Standar International Antiserum *Brucella abortus* yang menghasilkan aglutinasi 50% apabila direaksikan dengan antibodi 1.54 I.U. tiap mililiter. Dengan menggunakan antigen baku serta serum referensi yang telah diketahui kandungan antibodinya, kandungan antibodi seekor hewan dapat diketahui dan dinyatakan dalam International Unit (I.U.). Menurut *FAO Expert Committee on Brucellosis*, nilai diagnostik minimum adalah 100 I.U./ml untuk sapi-sapi yang tidak divaksin dan 200 I.U./ml untuk sapi-sapi yang divaksin dengan strain 19 pada umur delapan bulan atau kurang. Nilai yang lebih rendah dari setengah nilai di atas yaitu 50 I.U./ml untuk sapi-sapi yang tidak divaksin dan 100 I.U./ml untuk sapi-sapi yang divaksin, harus dianggap sebagai *tersangka* dan hewan-hewan tersebut harus diuji ulang setelah 60 hari (Tizard, 1996; Subronto, 2003).

#### 2.4.2 Uji Ikat Komplemen (*Complement Fixation Test/CFT*)

CFT memiliki ketepatan dan kepekaan yang lebih besar daripada SAT. Karena beberapa unsur CFT mungkin menurun aktivitasnya, adanya kontrol, pembakuan dan supervisi yang cukup sangat diperlukan. Serum yang tercemar baik secara bakteriologik maupun kimiawi dapat mengikat komplemen tanpa adanya antigen sehingga dalam reaksi uji komplemen menghasilkan reaksi yang palsu. Apabila seekor pedet divaksin dengan vaksin strain 19, titer ikat komplemennya biasanya menjadi negatif selama sekitar tiga bulan setelah vaksinasi. Dalam SAT serum pedet tersebut bereaksi positif. Nilai-nilai SAT hewan-hewan yang tertular secara kronik mengalami penurunan sedangkan nilai CFT yang bersifat diagnostik tetap dapat diamati untuk masa yang lama. CFT sangat berguna untuk membedakan reaksi antibodi setelah vaksinasi yang belum lama dilakukan dengan reaksi tubuh terhadap infeksi. Uji ini juga sangat berguna untuk menentukan hewan-hewan yang tertular secara kronik (Tizard, 1996; Subronto, 2003).

#### 2.4.3 Uji Rose Bengal (*Rose Bengal Test/RBT*)

Antigen RBT terdiri atas sel-sel *Brucella* yang diwarnai dengan rose bengal kemudian disuspensikan di dalam larutan penyangga pada pH 3.6. Uji dilakukan dalam suhu ruangan pada pelat yang digoyang-goyangkan dengan mesin atau secara manual selama empat menit dengan menggunakan serum dan antigen yang jumlahnya sama. Reaksi yang diamati diberi nilai dalam empat tingkatan, yaitu mulai dari nol sampai penggumpalan kasar yang sempurna. Hasi-hasil RBT

ternyata mempunyai banyak kecocokan dengan hasil-hasil CFT. Apabila tingkat kejadian penyakit hanya rendah dan vaksinasi pada pedet dengan strain 19 banyak dilakukan, uji ini mempunyai kepekaan yang terlalu tinggi. Untuk menghindari terlalu banyak hewan yang harus dikeluarkan, serum yang bereaksi positif dalam RBT diuji ulang dengan CFT. RBT banyak digunakan sebagai uji untuk penyaringan adanya reaktor Brucellosis (Subronto, 2003; OIE, 2004).

#### 2.4.4 Uji Cincin Air susu (*Milk Ring Test/MRT*)

Sebagai antigen dalam uji serologis ini digunakan suspensi kuman *Brucella abortus* yang telah dimatikan dan diwarnai dengan hematoksilin. Agar antigen tersebut dapat tahan lama perlu ditambahi fenol. Antigen digunakan untuk mengetahui adanya antibodi terhadap *Brucella abortus* dalam air susu. MRT memiliki kepekaan yang sangat tinggi, air susu yang positif yang telah diencerkan dengan air susu yang negatif yang berasal dari hewan yang tidak tertular, masih tetap dapat dikenali. Uji tersebut sangat berguna untuk menguji contoh air susu yang diambil dari kiriman peternak, sehingga kelompok sapi yang tertular dapat diketahui serta untuk memonitor program pengendalian penyakit. MRT dapat menghasilkan reaksi positif palsu apabila uji tersebut dilakukan pada: (1) air susu yang berasal dari sapi yang tidak tertular tetapi sapi tersebut telah divaksin dengan vaksin strain 19 dalam waktu tiga bulan terakhir, (2) air susu yang menderita radang ambing, (3) air susu yang mengandung kolostrum, (4) air susu yang berasal dari sapi-sapi yang dikeringkan pada masa akhir laktasi, (5) air susu yang baru saja diambil dari sapi, untuk pelaksanaan uji ini air susu harus disimpan

dingin selama 12 jam. Sedangkan hasil-hasil negatif palsu diperoleh apabila: (1) air susu yang diperiksa disimpan terlalu lama, (2) air susu dipanasi 45°C atau lebih, (3) air susu telah dikocok terlalu kuat. Pada dasarnya MRT merupakan uji untuk mengenal adanya Brucellosis dalam suatu peternakan (Subronto, 2003).

#### **2.4.5 Uji Kadar Imunosorbent Terikat Enzim (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay/ELISA*)**

ELISA merupakan salah satu uji serologis yang saat ini banyak dimanfaatkan untuk berbagai tujuan. Dalam penyakit infeksi, ELISA dapat diarahkan untuk mendeteksi adanya antigen atau terhadap antibodinya. Pada penyakit non-infeksi, ELISA dapat digunakan untuk evaluasi program vaksinasi, memonitor hormon, obat-obatan, antibiotika, toksin ataupun penyakit autoimun. ELISA diperkenalkan pertama kali oleh Engvall dan Perlmann (1971) dan kini telah banyak mengalami perkembangan sesuai dengan tujuan asainya (Suwarno dkk, 2003). ELISA telah dilaporkan bahwa lebih sensitif 10 - 10.000 kali dibanding uji serologis yang konvensional (Spencer, 1995). ELISA biasanya digunakan untuk tes skrining pada Brucellosis (Alton *et al.*, 1988). Berikut ini adalah beberapa model dari ELISA:

##### **2.4.5.1 *Direct ELISA***

Teknik ini merupakan konfigurasi paling sederhana. Antigen secara langsung diadsorbikan ke suatu substrat padat. Permukaan substrat dicuci dan antibodi yang ditempel dengan enzim digunakan untuk menunjukkan adanya antigen. Hasilnya dapat dibaca setelah penambahan substrat. Kekurangan teknik ini

berkaitan dengan sifat pengikatan substrat padat dan kualitas antibodi indikator, sedangkan keuntungannya adalah kesederhanaan sistem. Teknik ini banyak dimanfaatkan untuk skrining antigen seperti imunoglobulin pada serum janin sapi (Burgess, 1995).

#### **2.4.5.2 Indirect ELISA**

Teknik ini merupakan konfigurasi paling sederhana yang dapat digunakan untuk mengukur titer antibodi. Antigen teradsorpsi pada substrat padat. Antibodi primer tidak berlabel dan dapat diperoleh dari serum atau bermacam cairan tubuh lain. Antibodi sekunder terikat pada enzim yang sesuai. Antibodi ini biasanya disebut sebagai konjugat. Hasil akan tampak bila ditambahkan substrat. Aktivitas dari enzim yang terikat berbanding terbalik dengan kadar antibodi yang terdapat dalam sampel. Aplikasi dari teknik ini antara lain sebagai penentu antibodi dari *Brucella*, *Salmonella*, *Mycobacterium* dll (Burgess, 1995; Suwarno dkk, 2003).

#### **2.4.5.3 Sandwich ELISA**

*Sandwich* ELISA adalah model tes ELISA yang menggunakan perangkat tiga macam antibodi. Antibodi pertama biasanya menggunakan antibodi monoklonal yang dilapiskan pada mikroplate dan selanjutnya direaksikan dengan antigen. Setelah dilakukan pencucian baru ditambahkan antibodi kedua atau sample serum yang akan dideteksi dan selanjutnya direaksikan dengan antibodi ketiga yaitu fragmen imunoglobulin anti imunoglobulin yang akan dideteksi. Model ini sering digunakan untuk mendeteksi antigen selain pada serum, plasma



juga antigen maupun antibodi pada cairan serebrospinal, cairan ludah dan sekresi air mata. Model ini karena mempunyai tingkat spesifisitas dan sensitivitas lebih tinggi dibandingkan dengan kedua model diatas, maka sering digunakan untuk mendeteksi antigen dan antibodi yang mempunyai konsentrasi lebih rendah dibandingkan dengan kedua model ELISA di atas (Rantam, 2003).

## **2.5 Antigen Bakteri**

Bakteri mempunyai struktur yang cukup kompleks, sehingga untuk mendeteksi antigen dari infeksi bakteri cukup sulit. Hal ini dikarenakan pada beberapa bakteri yang mempunyai struktur yang homogen seperti bakteri golongan Gram negatif. Berdasar kompleksitas tersebut menyebabkan terjadinya reaksi silang satu sama lain. Untuk menghindari reaksi yang tidak dikehendaki, maka pada uji serologis khususnya uji ELISA diperlukan material yang mempunyai spesifisitas tinggi, salah satunya dengan menyediakan antigen yang spesifik. Antigen yang digunakan harus memenuhi syarat-syarat tertentu seperti: antigen harus antigenik dan menginduksi respon antibodi pada inangnya, respon antibodi harus sedemikian rupa, sehingga hewan yang terinfeksi/diinjeksi dapat diketahui dengan kata lain metode uji harus sensitif serta antigen harus unik agar mempunyai spesifisitas yang tinggi (Rantam, 2003).

Rantam (2003) menyebutkan secara umum ada beberapa macam antigen dari bakteri:

1. Bakteri utuh
2. Bakteri utuh yang dirusak secara mekanis, fisik atau kimiawi seperti penggerusan dan pengocokan
3. Ekstrak kasar bakteri yang dirusak dengan cara pemusingan
4. Senyawa kimia murni atau setengah murni

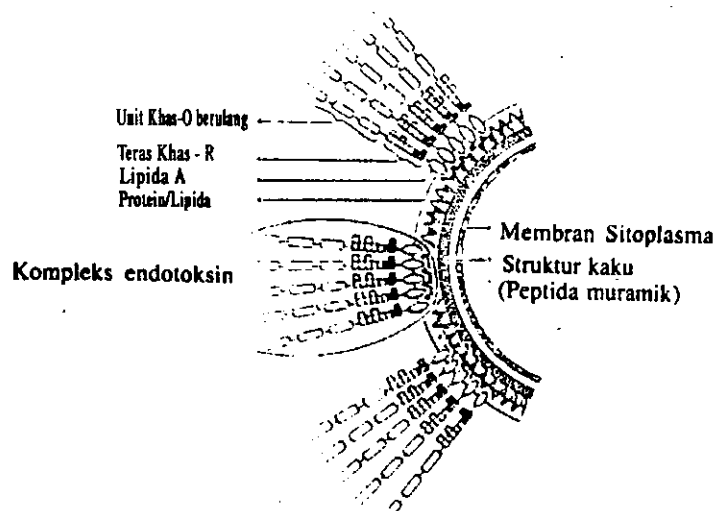
Target antigen yang dapat digunakan untuk uji ELISA antara lain dinding sel bakteri Gram positif, *lipopolisakarida*, glikolipid, peptidoglikan, flagela dan protein membran luar.

### 2.5.1 Lipopolisakarida (LPS)

LPS merupakan sebagian terbesar antigen permukaan pada banyak bakteri Gram-negatif dan oleh karena itu menjadi dasar untuk klasifikasi serologis berbagai spesies bakteri dan merupakan penolong penting pada diagnosis. LPS juga penting dalam menstabilkan membran luar, penting untuk aktivitas biologi, serta bertindak sebagai reseptor untuk berbagai bakteriofag. LPS adalah mitogen sel B yang kuat dan berperan sebagai adjuvan, terutama untuk OMP (*Outer Membran Protein*) (Hirst, 1995).

LPS terdiri dari tiga daerah berbeda, yakni lipid A, teras R dan rantai samping O. Lipid A adalah membran hidrofobik yang merupakan daerah pengikat LPS dan berperan sebagai komponen beracun. Melekat pada lipid A adalah daerah oligosakarida teras R yang merupakan rantai pendek gula meliputi

asam ketodeoksioktonik dan heptose. Rantai samping O yang hidrofilik terdiri atas banyak perulangan unit tetra atau penta sakarida, mempunyai baik teras dasar bagian luar maupun unit permukaan (Gambar 2.1). Galur yang tidak mempunyai LPS berpermukaan halus, lebih mudah diserang oleh antibodi dan komplemen penyebab lisis atau fagositosis melalui polisakarida teras bagian luar yang terbuka (Hirst, 1995).



**Gambar 2.1. Lipopolisakarida bakteri Gram negatif**

Komponen lipid A dari LPS sifatnya relatif konstan pada kebanyakan spesies bakteri dan bertanggung jawab terhadap aktivitas endotoksik LPS. Pada daerah oligosakarida teras R lebih beragam, berbeda antar genus. Ciri daerah teras adalah ketodeoksioktonat (KDO) yang nampaknya unik untuk LPS sebagai tempat penambat oligosakarida teras R pada lipid A. Daerah teras memang mempunyai spesifisitas imunogenik-spesifisitas R. Ini adalah antigen R yang terdapat pada *Brucella* tipe kasar yang memperlihatkan reaksi silang dengan galur-galur kasar tetapi tidak bereaksi silang dengan galur halus. Demikian juga pada genus lain, determinan terdapat di dalam daerah oligosakarida teras.

Determinan ini tidak dijumpai secara alami karena mutan R muncul di alam dengan frekuensi rendah dan pada galur halus determinan tersebut tetap tidak diekspresikan karena imunodominansi daerah polisakarida O-spesifik. Daerah O-spesifik tersusun dari unit polisakarida berulang yang terdiri atas cabang utama lurus pendek dengan satu atau tanpa cabang pengganti. Keragaman antigenik daerah ini sangat besar, dengan spesifisitasnya ditentukan oleh sifat cabang pengganti dan konfigurasi ikatan serta pengganti sekunder. Antigen A dan M *Brucella* terletak di daerah O-spesifik LPS galur halus (Hirst, 1995).

## 2.6 Metode Pemisahan LPS

LPS tipe *Smooth* (S) dari *B. abortus* terdapat pada fase fenol sedangkan tipe *Rough* (R) terdapat pada fase berair, artinya tipe S dapat dipisahkan dengan fenol sedangkan tipe R dapat dipisahkan dengan air. Stiller dan Nielsen (1983) menguraikan metode mudah untuk menyiapkan LPS *B. abortus* dari fase fenol. LPS kasar diekstraksi dari fenol melalui pengendapan dengan metanol dingin yang dibuat jenuh dengan natrium asetat. Setelah didialisis dengan akuades larutan LPS dibuat menjadi 0.25 M dalam NaOH, diinkubasikan selama satu jam pada suhu 56<sup>0</sup> C dan dinetralkan dengan asam asetat. Perlakuan dengan basa mengakibatkan pemisahan ikatan ester dari asam lemak berantai panjang yang terikat pada bagian lipid A dan karena itu menurunkan hidrofobisitas (Spencer, 1995).

Spencer (1995) juga menuliskan bahwa preparat kasar LPS dapat diekstraksi dari bakteri utuh dengan memasukkannya dalam autoklaf atau menambahkan

EDTA yang menghancurkan struktur membran luar. Hasil LPS yang terkontaminasi dengan polisakarida, asam nukleat dan protein yang larut karena pemanasan dipisahkan dari kotoran sel dengan sentrifugasi berkecepatan tinggi.

## **2.7 Respon Imun terhadap LPS *B. Abortus***

Antigen LPS merupakan antigen T-independent, dikarakterisasi sebagai zat polimerik yang mempunyai banyak determinan secara identik dan relatif tahan terhadap penghancuran. Respon imun terhadap LPS dikarakterisasi oleh produksi antibodi hampir seluruhnya dari kelas Ig M, dengan sedikit atau tidak sama sekali produksi Ig G dan tidak ada memori imunologik. Disamping tidak memerlukan sel T, respon imun LPS juga tidak tergantung fungsi makrofag (Bellanti, 1993; Tizard, 1995).

Antigen LPS bersifat mitogenik pada sel B tikus dan mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan sel B secara non-spesifik. Aktivasi semacam ini menghasilkan respon poliklonal, dimana banyak klon sel B diaktifkan pada keadaan tidak ada antigen spesifik. Namun demikian, LPS juga dapat memberikan isyarat spesifik yang dikenal oleh reseptor Ig dan mempengaruhi diferensiasi dan proliferasi klon (Bellanti, 1993).

Pemberian LPS dosis tinggi memicu sel B untuk menghasilkan antibodi. Pada dosis rendah, LPS dapat bereaksi dengan klon sel B yang telah siap memproduksi antibodi anti LPS. Pemberian vaksin *B.abortus* S19 pada sapi, menghasilkan Ig M yang dapat mencapai konsentrasi maksimum setelah dua minggu sedangkan Ig G dijumpai dalam jumlah kadar yang rendah setelah empat

sampai enam minggu. Respon antibodi yang timbul pada sapi dewasa didominasi oleh Ig M, Ig G<sub>1</sub>, dan sedikit Ig G<sub>2</sub> (Hirst, 1995; Olsen, 2002).

## 2.8 Uji *Dot Blot*

*Blotting* merupakan teknik untuk mentransfer pita protein. DNA atau RNA dari gel hasil elektroforesis ke matrix membran (biasanya dipakai nitroselulosa, PVDF atau nilon). Matrix inilah yang mengikat molekul yang ditransfer. Metode imunoblotting dilakukan untuk identifikasi dan klasifikasi terhadap spesifisitas protein dengan antibodinya. Metode ini merupakan kelanjutan identifikasi protein dengan metode elektroforesis, karena khususnya metode western blot (WB) didahului dengan running gel dengan SDS PAGE yang dilanjutkan transfer protein pada membran yaitu PVDF (Polyvinil Diode Flourie) maupun Nitrocellosa (NC). Selain metode WB juga dikenal metode *dot blot* (Aulanni'am, 2004).

*Dot Blotting* merupakan suatu metode pengujian yang mudah untuk mendeteksi keberadaan antigen. Metode ini lebih cepat karena tanpa didahului SDS PAGE, melainkan protein yang akan diuji langsung ditetaskan pada membran, diuji dengan antibodi hasil produksi hewan coba yang telah diimunisasi dengan antigen. Tidak seperti pada elektroforesis, *dot blot* hanya memberikan informasi tentang keberadaan antigen, tidak untuk menentukan berat molekul. Namun demikian estimasi konsentrasi antigen dapat diketahui pada *blots* tersebut, tetapi jarang akurat karena sulit untuk dikatakan akurat terhadap warna yang

timbul pada blots tersebut. Metode ini cukup baik untuk digunakan uji atau skrining dengan sampel yang cukup banyak (Rantam, 2003; Aulanni'am, 2004).

Membran yang dipakai pada metode *dot blotting* biasanya adalah membran nitroselulosa karena membran ini mempunyai kapasitas pengikatan yang tinggi, sedangkan untuk membran yang lain seperti membran nilon atau PVDF memiliki beberapa kelemahan yaitu untuk membran nilon apabila protein yang akan diuji bersifat hidrofilik maka akan mempunyai daya ikat yang lemah. Membran PVDF mempunyai daya pengikat yang tinggi tetapi agak kesulitan dalam transfer protein bila dibandingkan dengan membran nitroselulose (Aulanni'am, 2004).

Antibodi poliklonal sering digunakan untuk *blotting* karena mempunyai afinitas yang tinggi terhadap antigen, tetapi mengandung antibodi yang non spesifik berikatan dengan antigen yang tidak spesifik yang merupakan bagian dari mikrobial. Oleh karena itu antibodi poliklonal sering dilakukan purifikasi terlebih dahulu (Rantam, 2003).

## **2.9 Vaksin Brucella**

### **2.9.1 Vaksin *Brucella abortus* Strain 19**

Bakteri *Brucella abortus* S19 merupakan biotipe I *Brucella abortus* yang memiliki kekhususan karena pertumbuhannya dihambat oleh thionin blue (1:500.000), eritritol dan penisilin 5 IU/ml. Untuk pertumbuhan kuman *Brucella abortus* S19 tidak memerlukan karbondioksida. *Brucella abortus* S19 juga bersifat stabil dan mempunyai patogenesisitas yang rendah terhadap sapi serta cukup memberikan proteksi terhadap keguguran. Nilai protektifitas dapat

mencapai 70-80%, akan tetapi resiko terhadap keguguran rendah (Anonimus, 1996; Subronto, 2003).

Untuk persiapan pembuatan vaksin, pertumbuhan bakteri di laboratorium harus diawasi dengan teliti agar tidak mengalami mutasi yang tidak dikehendaki. Di dalam praktek, vaksin digunakan dalam bentuk vaksin hidup basah atau dalam keadaan kering beku. Vaksin harus disimpan hati-hati di tempat yang dingin, terhindar dari sinar matahari dan digunakan sebelum masa kadaluwarsa vaksin. Tiap dosis vaksin mengandung lebih kurang  $5 \times 10^{10}$  kuman hidup. Vaksinasi dilakukan dengan menyuntikkan vaksin secara subkutan. Pada pedet dan sapi yang tidak bunting vaksin akan menimbulkan reaksi lokal yang ringan, sedang pada sapi bunting dapat menyebabkan keluron. Vaksinasi masa pedet yang efektif dapat menghasilkan kekebalan untuk waktu tujuh kali kebuntingan. Vaksinasi ulangan tidak akan mempertinggi kekebalan tetapi justru akan menyebabkan komplikasi dalam uji serologis karena terbentuknya titer antibodi yang persisten. *Brucella abortus* S19 tidak menyebar dari satu hewan ke hewan yang lain, dan juga tidak akan bersarang di dalam ambing. *Brucella abortus* S19 untuk pejantan dapat menurunkan fertilitas, pembebasan kuman secara persisten dari saluran kelaminnya, radang testis dan pembentukan aglutinin yang sifatnya persisten (Subronto, 2003).

### **2.9.2 Vaksin *Brucella abortus* Strain 45/20**

Pada mulanya galur kuman ini berupa sebagai “ galur kasar (*rough*) “ yang dilemahkan. Vaksin yang dibuat dari kuman tersebut disuntikkan dalam keadaan



hidup seperti halnya pada strain 19. Karena kurang stabil serta adanya kemungkinan kuman menjadi virulen kembali, akhirnya vaksin tersebut tidak lagi digunakan. Kemudian vaksin serupa telah dibuat lagi dalam bentuk “ *killed vaccine in adjuvant base* “, yang untuk imunisasi diperlukan dua suntikan. Beberapa negara tegas-tegas tidak mengizinkan penggunaan vaksin 45/20 tersebut, sedang beberapa negara lain membatasi penggunaan vaksin hanya untuk keadaan tertentu saja. Vaksin 45/20 dapat digunakan untuk tujuan anamnestic, yaitu untuk mengetahui infeksi laten pada sapi reaktor yang tingkatnya rendah (Subronto, 2003).

### **2.9.3 Vaksin *Brucella abortus* Strain RB51**

Sejak tahun 1996, *Brucella abortus* Strain RB51 telah menjadi vaksin resmi untuk mencegah Brucellosis pada ternak di beberapa negara. *Brucella abortus* RB51 mempunyai morfologi/bentuk kasar, tumbuh pada media yang mengandung rifampicin (250 µg/ml) dan tidak menghasilkan O-polisakarida. Di Amerika, sapi divaksinasi pada umur 4 – 12 bulan secara subkutan dengan dosis 1 sampai  $3,4 \times 10^{10}$  CFU/ml yang berisi kuman hidup. Vaksinasi pada ternak diatas umur 12 bulan harus dibawah pengawasan pihak yang berwenang dan direkomendasikan dengan dosis  $1 \times 10^9$  CFU/ml. Telah dilaporkan bahwa pemberian RB51 dengan dosis tinggi secara intravena pada ternak dapat menyebabkan plasentitis dan juga bakteri dapat dikeluarkan dalam air susu. Pada pengalaman di lapangan vaksinasi pada ternak bunting dapat menyebabkan abortus. Dari beberapa pengamatan tersebut, maka vaksinasi pada ternak bunting harus dihindari. Untuk mengurangi

efek samping dari strain RB51 dapat dilakukan dengan mengurangi dosis, yaitu dengan dosis  $1 \times 10^9$  CFU/ml kuman hidup. Pengurangan dosis dapat dilakukan bila vaksinasi pada hewan dewasa sedangkan pada pedet tetap dengan dosis standar, yaitu 1 sampai  $3,4 \times 10^{10}$  CFU/ml kuman hidup. Sebagai informasi tambahan, strain RB51 ini dapat menginfeksi manusia sedangkan strain ini merupakan strain yang tahan terhadap rifampicin padahal diketahui rifampicin merupakan salah satu antibiotik pilihan untuk mengobati Brucellosis pada manusia (OIE, 2004).

**BAB III**  
**MATERI DAN METODE PENELITIAN**

## BAB III

### MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama lima bulan mulai Juli sampai November 2004, bertempat di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi, Laboratorium Virologi dan Imunologi, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya dan Tropical Disease and Research Center (TDC) Universitas Airlangga Surabaya serta di Laboratorium Zoonosis bagian Brucella Pusvetma Surabaya.

#### 3.2 Bahan dan Materi Penelitian

##### 3.2.1 Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci jantan umur dua bulan sebanyak empat ekor untuk menghasilkan antibodi poliklonal terhadap *B.abortus* S19 dan mencit jantan umur enam minggu sebanyak 14 ekor untuk menghasilkan antibodi poliklonal terhadap LPS *B.abortus* S19. Dipilih kelinci dan mencit karena hewan ini murah, mudah dipelihara, daya tahannya tinggi dan mudah diambil darahnya (Burgess, 1995).

##### 3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini meliputi: Vaksin *Brucella abortus* S19 aktif (BRUCIVET) yang diperoleh dari Pusvetma Surabaya,

LPS *Brucella abortus* S19 yang diperoleh dengan cara ekstraksi fenol, antibodi *Brucella abortus* S19 aktif dari kelinci yang diinjeksi secara subkutan, antibodi LPS *Brucella abortus* S19 dari mencit yang diinjeksi secara subkutan, LPS *E.coli* yang diperoleh dengan cara ekstraksi fenol, *Freund's Adjuvant Complete* (CFA), *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA), larutan fenol, *Potato Agar* (PA), *Carbonate buffer*, *Blocking buffer*, NaCl-Triton x, konjugat, substrat, NaOH 3 N untuk *stopper*, Alkohol 70%, larutan PZ, aquades dan kapas, *Washing buffer*, *Tris Buffer Saline* (TBS).

### 3.2.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini terdiri dari: Spuit ukuran 1ml, spuit ukuran 5 ml, mikroplate, mikropipet, *beaker glass*, erlenmeyer, timbangan elektrik, inkubator, *freezer*, *ELISA reader*, spektrofotometer, autoklave, aluminium foil, plastik ciling, pipet, *stirrer*, pengukur pH, pencatat waktu (*timer*), tabung sentrifus, pipet *ependorf*, *ependorf tube*, gelas ukur, kassa steril, *microcup*.

### 3.2.4 Kandang Penelitian

Kandang yang digunakan dalam penelitian ini diletakkan dalam ruangan. Kandang kelinci terbuat dari kawat kasa berbentuk bujur sangkar. Kandang mencit, digunakan kotak plastik (*box*) yang dipisah menjadi dua dengan menggunakan pembatas kawat kasa. Dasar kotak plastik tersebut diberi sekam

yang diganti setiap dua minggu sekali. Setiap kotak plastik berisi empat ekor mencit. Air minum baik pada kelinci maupun pada mencit selalu disediakan.

### 3.2.5 Pakan

Jenis pakan kelinci yang diberikan antara lain jagung muda, ketela rambat, wortel dan juga konsentrat (pellet) sedangkan untuk mencit hanya diberikan pellet BR1511 setiap hari.

## 3.3 Metode Penelitian

### 3.3.1 Pemiakan *Brucella abortus* S19

*Brucella abortus* S19 dibiakkan pada media *Potato Agar* (PA) yang ditempatkan pada botol-botol besar dan diinkubasi selama dua hari. Pada penelitian ini dipilih media PA (*Potato Agar*) karena pembuatan media ini lebih murah dibandingkan media TSA (*Tryptone Soy Agar*) yang merupakan media yang biasa digunakan untuk pembiakan *B.abortus*. Pemakaian media dalam botol dikarenakan adanya beberapa kelebihan dibandingkan pada cawan Petri. Kelebihan penanaman pada botol adalah kapasitas satu botol setara dengan enam cawan Petri, sehingga bakteri yang berkembangbiakpun dapat lebih banyak daripada satu cawan Petri. Hal itu membuat media botol lebih efisien. Selain kapasitasnya, cara penanaman pada media botol juga lebih mudah. Hal ini disebabkan pada media botol mempunyai mulut yang menyempit sehingga penanaman bakteri dilakukan dengan cara disemprot, cara ini diharapkan mengurangi kontaminasi dari bakteri lain. Berbeda dengan media pada cawan Petri yang pembiakannya dengan cara *distreak*, penanamannya memerlukan ketrampilan lebih karena bila tidak terampil, kurang hati-hati maka adanya

kontaminasi bakteri lain dapat terjadi. Pemiakan *Brucella abortus* S19 dilakukan di Pusvetma Surabaya.

### 3.3.2 Isolasi LPS *Brucella abortus* S19

Biakan *Brucella abortus* S19 pada botol ( empat botol ) yang telah berumur dua hari pada PA ditambahkan 0.5% fenol dingin ( $4^{\circ}\text{C}$ ) sebanyak 20 ml/botol. Koloni dipanen dengan cara menambah fenol dingin ke dalam botol dan dikocok-kocok, larutan yang didapat kemudian disaring dengan kain kasa rangkap empat yang steril. Hasil saringan dibagi pada beberapa tabung sentrifus yang steril dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan dibuang dan presipitat pada masing-masing tabung ditambah kembali dengan 0.5% fenol dingin ( $4^{\circ}\text{C}$ ) sebanyak 2 ml selanjutnya semua presipitat tadi dimasukkan pada satu tabung dan diresuspensi sebanyak dua sampai tiga kali. Presipitat yang didapat selanjutnya ditimbang untuk mengetahui berat kering. Setelah ditimbang presipitat ditambahkan dengan aquadestilata dan dimasukkan dalam autoclave dengan tekanan 20 atm pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ . Kemudian larutan tersebut disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang mengandung LPS diambil kemudian difiltrasi dengan menggunakan saringan yang mempunyai membran  $0.45\ \mu\text{m}$ . Hasil filtrasi selanjutnya ditambahkan larutan NaOH 4 M sehingga diperoleh larutan 0.25 M kemudian dipanaskan pada *water bath* dengan suhu  $56^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam. Setelah larutan dingin kemudian ditambahkan asam asetat glacial sampai pH 7,0, selanjutnya ditambahkan dengan empat volume etanol pekat (96%) dan dibiarkan selama 24 sampai 48 jam di dalam lemari es (suhu  $4^{\circ}\text{C}$ ). Setelah itu presipitat diambil dengan disentrifus selama 10 menit

dengan kecepatan 8000 rpm kemudian presipitat tersebut ditambahkan *distilled water* (kurang lebih 0,2 ml) dan didialisis selama semalam (suhu 4°C). Tahap akhir dilakukan *freeze dried* atau langsung dapat digunakan untuk penelitian (Alton *et al.*, 1988).

### 3.3.3 Pembuatan Antibodi Poliklonal terhadap *Brucella abortus* S19

Pembuatan antibodi poliklonal terhadap *B.abortus* S19 utuh dibuat dengan cara menyuntikkan *Brucella abortus* S19 aktif dengan dosis setengah dari dosis sapi yaitu sekitar 20 sampai 60x10<sup>9</sup>/0,5 ml pada kelinci jantan umur dua bulan sebanyak empat ekor melalui subkutan. Vaksinasi ulang dilakukan sebanyak tiga kali dengan interval dua minggu. Dua minggu setelah *booster* terakhir dilakukan pemanenan darah melalui jantung dengan sebelumnya kelinci dibius dulu dengan kloroform. Darah hasil panen ditampung pada tabung reaksi yang steril kemudian didiamkan sebentar dalam posisi miring (sekitar 35°) untuk memisahkan serum dan eritrosit. Setelah terpisah, serum kemudian diambil dan dimasukkan pada tabung sentrifus dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm untuk mendapatkan antibodi poliklonal terhadap *B.abortus* S19 yang siap digunakan.

### 3.3.4 Pembuatan Antibodi Poliklonal terhadap LPS *B.abortus* S19

Pembuatan antibodi poliklonal terhadap LPS *B.abortus* S19 dibuat dengan cara menyuntikkan LPS *B.abortus* S19 dengan dosis 50 µg/ekor secara subkutan pada mencit jantan dengan umur enam minggu sebanyak 14 ekor (Harlow and Lane, 1988). Pada penyuntikan LPS *B.abortus* S19 ditambahkan CFA pada

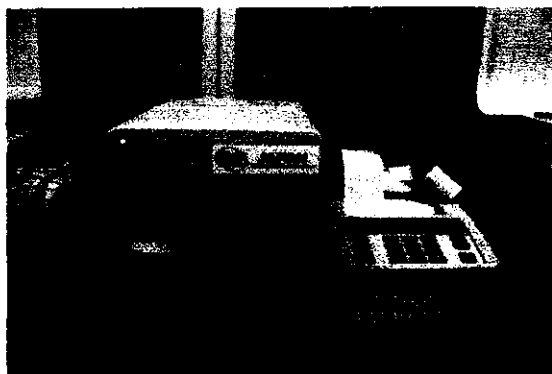


penyuntikan pertama dan IFA pada penyuntikan ulang (*Booster*). Penyuntikan dilakukan sebanyak tiga kali dengan interval dua minggu. Pengambilan darah dilakukan lewat jantung dengan sebelumnya mencit dibius dulu dengan kloroform. Darah hasil panen ditampung pada *microcup* yang steril kemudian didiamkan sebentar dalam posisi miring (sekitar  $35^{\circ}$ ) untuk memisahkan serum dan eritrosit. Setelah terpisah, serum kemudian diambil dan dimasukkan pada tabung sentrifus dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm untuk mendapatkan antibodi poliklonal terhadap LPS *B.abortus* S19 yang siap digunakan.

### 3.3.5 Karakterisasi LPS dengan *Indirect Sandwich ELISA*

Untuk karakterisasi LPS *B.abortus* S19 menggunakan uji *indirect sandwich ELISA* dilakukan dengan cara: (1) Melakukan coating antibodi primer (antibodi *B.abortus* S19 utuh dari kelinci) yaitu dengan melakukan pengenceran antibodi primer 1/100 kemudian dimasukkan pada mikroplate. Setiap sumuran mikroplate diisi sebanyak 100  $\mu$ l dan dibiarkan selama semalam pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ , setelah itu dicuci dengan NaCl-Triton sebanyak tiga kali selama satu menit. (2) Melakukan blocking. Blocking dilakukan dengan memasukkan 200  $\mu$ l blocking buffer pada setiap sumuran mikroplate dan didiamkan pada suhu kamar kemudian dicuci dengan NaCl-Triton sebanyak tiga kali selama satu menit. (3) Memasukkan antigen LPS *B.abortus* S19 dan LPS *E.coli* serta PBS sebagai kontrol negatif pada sumuran mikroplate. LPS *B.abortus* S19 dan LPS *E.coli* dilakukan pengenceran 1/100 dan 1/200 dan dimasukkan pada sumuran mikroplate yang berbeda. Setiap

sumuran diisi sebanyak 100  $\mu$ l selanjutnya didiamkan selama satu jam pada suhu kamar kemudian dicuci dengan NaCl-Triton sebanyak tiga kali selama satu menit. (4) Memasukkan antibodi sekunder (antibodi LPS *B.abortus* S19 dari mencit). Antibodi sekunder diencerkan dengan pengenceran 1/2500 dan dimasukkan pada mikrolate. Setiap sumuran 100  $\mu$ l dan diiamkan pada suhu kamar selama satu jam selanjutnya dicuci dengan NaCl-Triton tiga kali satu menit. (5) Memasukkan konjugat (konjugat *goat anti mouse* yang dilabel enzim alkalin fosfatase) pada sumuran mikrolate dengan pengenceran 1/5000. Selanjutnya didiamkan pada suhu kamar selama satu jam dan dicuci dengan NaCl-Triton sebanyak tiga kali selama satu menit. (6) Memasukkan substrat. Substrat yang biasa dipakai untuk enzim alkalin fosfatase adalah PNPP (2,5 mM). Satu tablet substrat dapat diencerkan dengan 15 ml substrat buffer. Substrat yang telah diencerkan dimasukkan pada setiap sumuran 100  $\mu$ l selanjutnya didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar di ruang gelap. Reaksi dihentikan dengan memasukkan NaOH 3 N sebanyak 50  $\mu$ l pada setiap sumuran. Terakhir, selanjutnya hasil dibaca dengan ELISA reader pada 405 nm. Tahapan cara kerja uji *indirect sandwich* ELISA dapat dilihat pada Lampiran 2.



**Gambar 3.1 ELISA reader**

### 3.3.6 Karakterisasi LPS *B.abortus* S19 dengan *Dot Blot*

Karakterisasi LPS *B.abortus* S19 dengan uji *dot blot* dilakukan dengan cara :

(1) Merendam kertas membran nitroselulose (NCM) dalam larutan TBS selama 15 menit dan dikeringkan dengan diangin-angin selama lima menit. Selanjutnya pada kertas NCM diteteskan 2  $\mu$ l antigen LPS *B.abortus* S19 (masing-masing tetes diberikan dengan kadar LPS *B.abortus* S19 yang berbeda, yaitu 1000 pg, 100 pg, 10 pg dan 1 pg) dan dibiarkan selama lima menit pada suhu ruang. (2) Membloking dengan buffer blocking 3% skim dan didiamkan selama 30 sampai 60 menit kemudian dicuci dengan TBS-T sebanyak 3 kali selama 5 menit dan dikeringkan. (3) Menambahkan antibodi primer (anti-LPS *B.abortus* S19 asal mencit atau anti *B.abortus* utuh asal kelinci) dengan pengenceran 1/100 sebanyak 5 ml dalam TBS-T yang mengandung 1% skim milk dan diletakkan diatas shaker selama 1 sampai 2 jam kemudian kertas NCM dicuci dengan TBS-T sebanyak 3 kali selama 5 menit. (4) Menambahkan antibodi sekunder (konjugat *goat anti mouse* atau konjugat *goat anti rabbit* ) dengan pengenceran 1/10000 sebanyak 5 ml dalam TBS-T yang mengandung 1% skim dan diletakkan diatas shaker selama satu jam. Selanjutnya kertas NCM dicuci dengan TBS-T sebanyak 3 kali dan dilanjutkan dengan TBS tanpa Tween sebanyak 3 kali. (5) Menambah substrat western blue sebanyak 25  $\mu$ l. Untuk menghentikan reaksi dicuci dengan air. Tahapan kerja uji *dot blot* dapat dilihat pada lampiran 3.

### 3.4 Peubah yang diamati

Pada uji *indirect sandwich* ELISA, peubah yang diamati adalah dengan melihat nilai *optical density* (OD) dari antigen LPS *B. abortus* yang dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm sedangkan pada uji *dot blot*, peubah yang diamati adalah dengan melihat adanya bentukan *dot* berwarna ungu pada NCM (*Nitro Cellulose Membran*).

## **BAB IV**

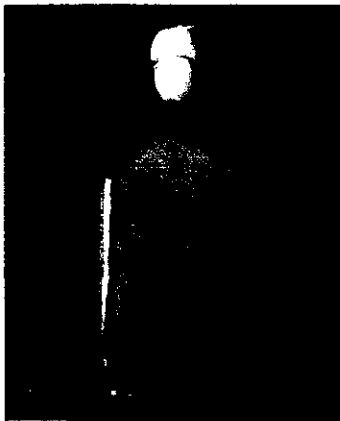
### **HASIL PENELITIAN**

## BAB IV

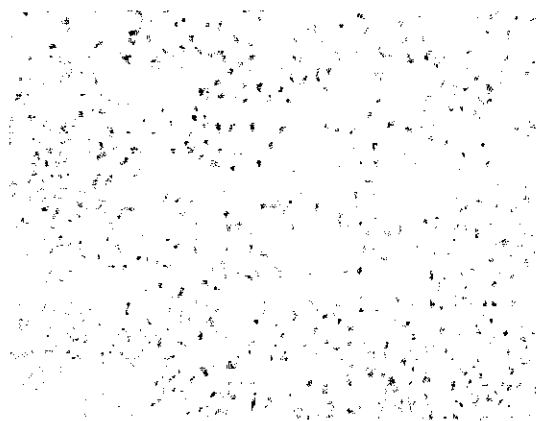
### HASIL PENELITIAN

#### 4.1 Pembiakkan *Brucella abortus* S19

Pada penelitian ini *B. abortus* S19 dibiakkan pada media *Potato Agar* (PA). Penanaman pada biakan PA dengan metode ulas menghasilkan biakan difus dengan ketebalan merata berwarna krem (Gambar 4.1). Hasil pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan Gram menunjukkan, bahwa *B. abortus* S19 terlihat berwarna merah dengan latar belakang jernih, bentuk *coccobacilli*, berpasangan atau bergerombol (Gambar 4.2)



**Gambar 4.1**  
Pembiakan *B. abortus* S19  
pada *Potato Agar*



**Gambar 4.2**  
Pewarnaan Gram *B. abortus* S19

#### 4.2 Isolasi LPS *B.abortus* S19

Hasil isolasi LPS *B. abortus* S19 dengan teknik ekstraksi fenol menghasilkan data seperti tampak pada Tabel 4.1

**Tabel 4.1 Hasil ekstrasi LPS *B.abortus* S19 pada media PA**

Jenis Media	Jumlah botol (buah)	Volume LPS (ml)	Kadar LPS ( $\mu\text{g/ml}$ )
PA	4	3,0	5,416

#### 4.3 Antibodi Poliklonal terhadap *B.abortus* S19

Hasil pembuatan antibodi poliklonal pada kelinci yang diinjeksi dengan *B.abortus* S19 dapat dilihat pada Tabel 4.2 .

**Tabel 4.2 Nilai Kisaran *Optical Density* (OD) dan Titer Antibodi Poliklonal terhadap *B.abortus* S19 dengan Teknik *Indirect ELISA***

Hewan	Antibodi Poliklonal	
	Kisaran OD	Kisaran titer
Kelinci	0,276- 0,406	640-5120
Kelinci kontrol negatif	0,026	-

#### 4.4 Antibodi Poliklonal terhadap LPS *B.abortus* S19

Hasil pembuatan antibodi poliklonal pada mencit yang diinjeksi dengan LPS *B.abortus* S19 dapat dilihat pada Tabel 4.3.

**Tabel 4.3 Nilai Kisaran *Optical Density* (OD) dan Titer Antibodi Poliklonal terhadap LPS *B.abortus* S19 dengan Teknik *Indirect ELISA***

Hewan	Antibodi Poliklonal	
	Kisaran OD	Kisaran titer
Mencit	0,164 - 0,402	320 - 5120
Mencit kontrol negatif	0,020	-

#### 4.5 Karakterisasi LPS dengan *Indirect Sandwich* ELISA

Hasil karakterisasi LPS dengan teknik *indirect sandwich* ELISA dapat dilihat pada Tabel 4.4.

**Tabel 4.4 Hasil Karakterisasi LPS Menggunakan Teknik *Indirect Sandwich* ELISA**

Asal LPS	Pengenceran	Nilai OD
<i>B.abortus</i>	1/100	0,308
	1/200	0,312
<i>E.coli</i>	1/100	0,118
	1/200	0,104
PBS	1/100	0,005
	1/200	0,013

Pada uji *indirect sandwich* ELISA yang digunakan sebagai antibodi pelapis (antibodi primer) adalah antibodi poliklonal kelinci anti *B. abortus* utuh aktif dan sebagai antibodi penangkap (antibodi sekunder) adalah antibodi poliklonal mencit anti LPS *B. abortus*, serta sebagai konjugat (antibodi tersier) adalah *goat antimouse* yang dilabel dengan enzim alkaline fosfatase. Cara pembacaan tabel 4.2 sebagai berikut : Pada pengenceran antibodi pelapis 1/100, LPS *B.abortus* S19 1/100, antibodi penangkap 1/2500, konjugat 1/5000 didapatkan nilai *mean* OD 0,308. Pada pengenceran antibodi pelapis 1/100, LPS *B.abortus* S19 1/200, antibodi penangkap 1/2500, konjugat 1/5000 didapatkan nilai *mean* OD 0,312. Pada pengenceran antibodi pelapis 1/100, LPS *E. coli* 1/100, antibodi penangkap 1/2500, konjugat 1/5000 didapatkan nilai OD 0,118, begitu seterusnya.



#### 4.6 Karakterisasi LPS dengan *Dot Blot*

Pada Gambar 4.3 ditampilkan hasil karakterisasi LPS dengan menggunakan antibodi kelinci dan mencit anti-LPS dan *B. abortus* utuh.

Dosis LPS / Spot (pg)	Pengenceran Antibodi 1/100					
	Kelinci			Mencit		
	Ab aktif	Ab LPS	Kontrol	Ab aktif	Ab LPS	Kontrol
1000	●	●		●	●	
100	●	●		●	●	
10	●	●		●	●	
1						

**Gambar 4.3** Hasil identifikasi LPS *B. abortus* S19 terhadap antibodi kelinci dan mencit dengan uji *Dot Blot*.

# **BAB V**

## **PEMBAHASAN**

## BAB V

### PEMBAHASAN

#### 5.1 Isolasi LPS *B. abortus* S19

Pemisahan LPS dari dinding sel *B. abortus* sangat penting untuk menentukan tingkat kemurniannya. Kemurnian LPS sangat menentukan daya imunogenesitas dan antigenesitasnya. Imunogenesitas dapat diartikan sebagai sifat sesuatu zat (imunogen) yang memberikan zat tersebut kemampuan membangkitkan respon imun spesifik. Kemampuan ini terdiri dari pembentukan antibodi, pengembangan imunitas seluler atau kedua-duanya. Antigenesitas adalah sifat zat (antigen) yang memungkinkan zat tersebut bereaksi dengan produk-produk dari respon imun spesifik (Bellanti, 1993; OIE, 2004).

Berkaitan dengan imunogenesitas, antigen LPS di dalam memicu sel dapat bertindak sebagai mitogen sel B yakni mengaktifkan sel B secara non spesifik. Selain itu, LPS didalam mengaktifkan sel B tidak memerlukan bantuan sel T maupun makrofag. Akibat aktivasi LPS, sel B akan menghasilkan respon poliklonal dan dihasilkan Ig M dalam jumlah berlebihan (Olsen, 2002).

Dalam hal antigenesitas, LPS dapat mengenali antibodi yang dibentuk terhadapnya berdasarkan reaksi antigen – antibodi. Reaksi ini menjadi dasar didalam menentukan sensitivitas dan spesifisitas uji diagnostis (Nielsen, 2002). Menurut OIE (2004) penggunaan LPS sebagai antigen pada teknik ELISA dapat meningkatkan sensitivitas uji didalam mendeteksi antibodi anti-*Brucella abortus* dibanding uji konvensional.

Pemisahan LPS dari dinding sel *Brucella abortus* pada penelitian ini menggunakan metode ekstraksi fenol/air. Metode ekstraksi fenol/air digunakan dalam penelitian ini dikarenakan metode ini mampu mengekstraksi LPS bentuk halus (Smooth/S) maupun kasar (Rough/R) dan LPS yang dihasilkan memiliki tingkat kemurnian yang tinggi (OIE, 2004).

Tabel 4.1 menggambarkan hasil perolehan ekstraksi LPS pada media PA dengan teknik ekstraksi fenol. Hasil ekstraksi LPS yang telah dimurnikan selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar LPS dengan alat spektrofotometer (Gb. 5.1). Dari pembacaan hasil tersebut diperoleh kadar LPS adalah 5,416 g %. Angka ini akan bermanfaat dalam penentuan dosis pada pembuatan antibodi poliklonal terhadap LPS *B.abortus* dan dosis antigen pada uji *indirect sandwich* ELISA dan uji *dot blot*.



**Gambar 5.1 Spektrofotometer**

## **5.2 Antibodi Poliklonal terhadap *B.abortus* S19 dan LPS *B.abortus* S19**

Tabel 4.2 dan Tabel 4.3 memperlihatkan respons pembentukan antibodi pada kelinci yang diinjeksi *B.abortus* S19 utuh dan pada mencit yang diinjeksi LPS *B.abortus* S19. Pembentukan respons imun dipengaruhi oleh lima faktor

yaitu: 1) Sifat alam imunogen; seperti ukuran, struktur agen pengimunisasi, berat molekul serta kemurnian antigen. 2) Adjuvan; adalah substansi-substansi tertentu yang meningkatkan secara non spesifik efektifitas imunologis agen pengimunisasi. 3) Hewan coba; pemilihan hewan harus disesuaikan dengan kebutuhan hasil yang diharapkan dan juga harus diperhatikan perbedaan antibodi bila menggunakan dua hewan coba. 4) Rute injeksi; pemilihan adjuvan sangat mempengaruhi rute injeksi. Imunogen yang terlarut sebaiknya diberikan secara subkutan atau intraperitoneal. Sebagai alasan perbedaan masing-masing rute injeksi adalah bagaimana cepatnya imunogen dibersihkan dari tempat injeksi dan kecenderungan melewati pusat limfosit yang penting. 5) Dosis; dosis antigen yang lebih rendah akan menghasilkan antibodi dengan afiditas lebih tinggi (Smith, 1995).

Pada kelinci penggunaan dosis 0,5 ml/ekor ( 20 sampai  $60 \times 10^9$  sel utuh ) dengan tiga kali imunisasi (interval dua minggu) dan pengujian antibodi satu minggu pasca imunisasi terakhir, memberikan nilai OD antara 0,276 sampai 0,406 dengan titer antara 640 sampai 5120 sedangkan pada mencit dengan dosis 0,15 ml/ekor (50  $\mu$ g LPS *B.abortus* S19) dengan tiga kali imunisasi dan penambahan adjuvan memberikan nilai OD 0,164 sampai 0,402 dengan titer antara 320 sampai 5120. Hasil tersebut menunjukkan pembentukan antibodi terhadap *B.abortus* S19 dan LPS *B.abortus* S19 pada kelinci dan mencit menghasilkan titer yang cukup tinggi sehingga dapat digunakan untuk uji *indirect sandwich* ELISA dan uji *dot blot*.

Pada penelitian ini dipilih antibodi poliklonal karena mempunyai tingkat sensitivitas yang tinggi dan mempunyai jangkauan spesifisitas yang luas. Selain itu antibodi poliklonal adalah reagen yang relatif stabil (Smith, 1995). Pembuatan antibodi poliklonal terhadap LPS *B.abortus* S19 dilakukan pada mencit untuk menghindari adanya reaksi silang pada uji *indirect sandwich* ELISA (Suwarno, 2003). Pada pembuatan antibodi poliklonal terhadap *B.abortus* S19 aktif tidak menggunakan adjuvan, hal ini dikarenakan bakteri utuh merupakan imunogen yang kuat sehingga diperkirakan antibodi yang didapat cukup banyak tanpa ada bantuan dari adjuvan. Pada pembuatan antibodi poliklonal ini dilakukan injeksi *booster* untuk mempertahankan titer antibodi, diharapkan dengan injeksi *booster* akan didapatkan antibodi dengan titer dan afiditas yang paling tinggi.

### 5.3 Karakterisasi LPS dengan *Indirect Sandwich* ELISA

Pada penelitian ini, untuk mengetahui karakter LPS *Brucella abortus* S19 digunakan uji *indirect sandwich* ELISA karena tingkat sensitivitas laboratorik lebih diutamakan daripada kecepatan uji. Suwarno, dkk (2003) menuliskan bahwa uji *indirect sandwich* ELISA mempunyai tingkat sensitivitas yang lebih tinggi daripada *direct* ELISA, *indirect* ELISA dan *direct sandwich* ELISA. Pada uji *indirect sandwich* ELISA, untuk menghindari reaksi silang dengan antibodi pertama maka antibodi kedua harus berasal dari spesies hewan yang berbeda, karena itu pada penelitian ini dipilih antibodi pertama berasal dari kelinci dan antibodi kedua berasal dari mencit.

Pada karakterisasi LPS *B.abortus* S19 dengan teknik *indirect sandwich* ELISA (tabel 4.2) terlihat bahwa nilai OD tertinggi didapatkan pada pengenceran LPS *B. abortus* S19 1/200 atau setara dengan kadar LPS *B.abortus* S19 270,8 µg. Hal ini menunjukkan bahwa pengenceran LPS *B.abortus* S19 1/200 lebih sensitif daripada pengenceran LPS *B.abortus* S19 1/100 dengan pengenceran antibodi primer, antibodi sekunder, konjugat yang sama yaitu antibodi primer pada pengenceran 1/100, antibodi sekunder 1/2500 dan konjugat 1/5000.

Pada tabel 4.2 juga terlihat nilai OD antara LPS *B.abortus* S19 dan LPS *E.coli* berbeda sangat jauh (Nilai OD LPS *B.abortus* S19 lebih tinggi dua kali dari nilai OD LPS *E.coli*). Hal ini menunjukkan LPS *B.abortus* S19 dan LPS *E.coli* mempunyai struktur yang berbeda sehingga antibodi primer maupun antibodi sekunder hanya dapat bereaksi secara spesifik dengan LPS *B.abortus* S19 dan tidak dapat mengenali LPS *E.coli*. Perbedaan struktur dari LPS antara *B. abortus* S19 dan *E. coli* menyebabkan perbedaan determinan antigen. Secara morfologi dinding sel bakteri Gram negatif tersusun atas kompleks lipopolisakarida yang terlihat sama, tetapi masing-masing memiliki struktur antigen yang berbeda (Hirst, 1995). Reaksi silang antara LPS *E. coli* dan LPS *B. abortus* tidak tampak pada penelitian ini.

#### 5.4 Karakterisasi LPS dengan *Dot Blot*

Pada Gambar 4.3 terlihat, antibodi kelinci atau mencit pada pengenceran 1/100, baik yang diinjeksi dengan *B. abortus* utuh maupun LPS, sama-sama masih bisa menunjukkan noda ungu (dot) sampai pada kadar 10 pg sedangkan pada

kadar LPS 1 pg sudah tidak ada noda ungu (dot). Hal ini berarti LPS *B.abortus* S19 (antigen) dapat dikenali oleh antibodi kelinci atau mencit sampai pada kadar 10 pg dengan memberikan noda ungu (dot) yang merupakan kompleks dari antigen – antibodi primer – antibodi sekunder yang terlabeli oleh enzim alkalin fosfatase dengan substrat *western blue* sedangkan tidak adanya kompleks dari antigen – antibodi primer – antibodi sekunder yang terlabeli oleh enzim alkalin fosfatase seperti pada kadar LPS *B.abortus* S19 1 pg ditunjukkan dengan tidak adanya noda ungu (dot).

Hasil diatas menunjukkan bahwa teknik *dot blot* jauh lebih sensitif dibanding teknik *indirect sandwich* ELISA di dalam mendeteksi LPS. Pada kadar LPS 10 pg teknik *dot blot* masih menunjukkan hasil positif, sementara pada *indirect sandwich* ELISA reaksi positif pada kadar LPS 270,8 µg.



**BAB VI**  
**KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik beberapa kesimpulan:

- 1) LPS *B.abortus* S19 dapat dideteksi pada kadar 270,8 µg dengan uji *indirect sandwich* ELISA dan pada kadar 10 pg dengan uji *dot blot*.
- 2) Berdasarkan nilai OD pada uji *indirect sandwich* ELISA, terdapat perbedaan determinan antigen antara LPS *B.abortus* S19 dan LPS *E.coli*.

#### 6.2 Saran

- 1) Penggunaan LPS *B.abortus* S19 sebagai komponen kit diagnostik pada uji ELISA khususnya dan uji serologis pada umumnya karena memiliki daya antigenesitas yang cukup tinggi.
- 2) Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui adanya reaksi silang antara LPS *B.abortus* S19 dengan *B.abortus* strain lapangan atau terhadap bakteri Gram negatif lainnya.

## RINGKASAN

Brucellosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme yang termasuk genus *Brucella*, penyakit ini dapat menular dari hewan ke manusia sehingga penyakit ini dikenal bersifat zoonosis. Pencegahan dan pemberantasan perlu dilakukan karena selain bersifat zoonosis, penyakit Brucellosis dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat besar. Pencegahan dapat dilakukan dengan vaksinasi sedangkan dalam program pengendalian dapat dilakukan dengan mendiagnosis dengan cepat dan akurat hewan yang dicurigai sehingga dapat dilakukan tindakan lanjutan yang tepat. Dalam program pemberantasan, uji dan potong merupakan cara terakhir yang dilakukan. Salah satu cara diagnosis yang dapat dilakukan adalah dengan uji serologis. Uji serologis diketahui memiliki ketepatan yang lebih akurat dibandingkan cara diagnosis lainnya. ELISA merupakan salah satu uji serologis yang memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi, namun uji ini juga dapat membuat kesalahan pada hasilnya karena adanya reaksi silang dalam ujinya akibat pemakaian antigen yang kurang sensitif. LPS sebagai salah satu bagian dari dinding sel dapat digunakan sebagai antigen yang lebih spesifik daripada sel utuh yang biasa digunakan pada uji ELISA, tetapi penelitian yang lebih lanjut tentang LPS belum banyak diteliti. Maka dari itu penelitian ini dibuat untuk mendeteksi LPS *B.abortus* S19 yang diuji dengan uji *indirect sandwich* ELISA dan uji *dot blot*. Penggunaan LPS *E.coli* dalam penelitian ini untuk mengetahui apakah ada reaksi silang antar *B.abortus* dan *E.coli* karena telah diketahui keduanya kuman Gram negatif. Dipilih uji

*indirect sandwich* ELISA dan uji *dot blot* karena mempunyai tingkat sensitivitas yang tinggi. Diharapkan hasil penelitian dapat dimanfaatkan oleh pihak yang terkait sehingga dalam jangka panjang LPS *B.abortus* S19 dapat digunakan sebagai antigen diagnostik pada penegakan Brucellosis.

Penelitian ini dimulai dengan membiakkan *B.abortus* S19 pada media Potato Agar dan memisahkan LPS dari dinding sel *B.abortus* S19 dengan teknik ekstraksi fenol. Selanjutnya dibuat antibodi poliklonal terhadap *B.abortus* S19 dengan menyuntikkan *B.abortus* S19 aktif pada kelinci dan antibodi poliklonal terhadap LPS *B.abortus* S19 dengan menyuntikkan LPS *B.abortus* S19 pada mencit. Kedua antibodi poliklonal ini digunakan untuk karakterisasi LPS *B.abortus* S19 pada uji *indirect sandwich* ELISA dan uji *dot blot*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa LPS *B.abortus* dapat dideteksi pada kadar 270,8 µg dengan uji *indirect sandwich* ELISA dan pada kadar 10 pg dengan uji *dot blot*. Berdasarkan nilai OD pada uji *indirect sandwich* ELISA, diketahui bahwa terdapat perbedaan perbedaan determinan antigen antara LPS *B.abortus* S19 dan LPS *E.coli*.

## DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

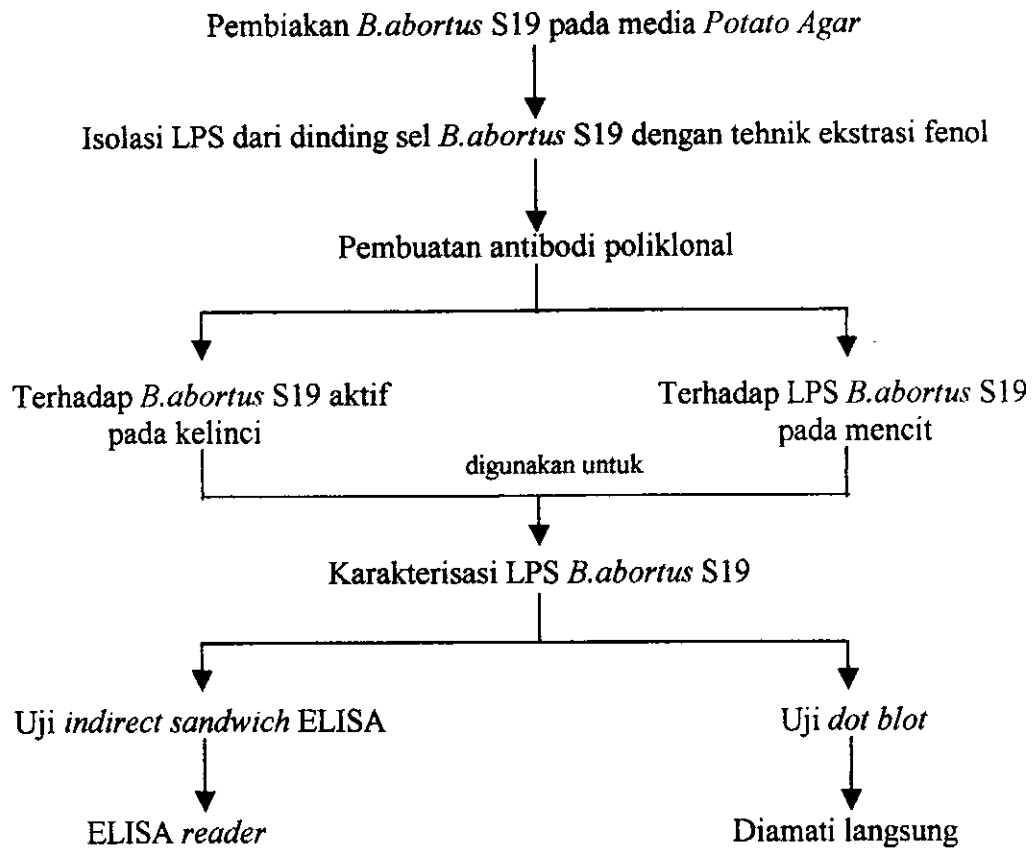
- Akoso, B.T. 1996. Kesehatan sapi. Kanisius. Jakarta.
- Alton, G.G., L.M. Jones and D.E. Pietiz. 1988. Laboratory Techniques in Brucellosis. 3<sup>rd</sup>Ed. WHO. Genewa. Switzerland.
- Alton, G.G., L.M. Jones, R.D. Angus and J.M. Verger. 1998. Techniques for The Brucellosis Laboratory. INRI. Paris. Franch.
- Anonimus. 1996. Buku Panduan Pelaksanaan dan Pengendalian Brucellosis di Indonesia. Direktorat Bina Kesehatan Hewan I Dirjen Peternakan Jakarta.
- Arbuthnott, J.P., P. Owen and R.J Russel. 1995. Bacterial Antigen in Topley and Wilson's Principles of Bacterology, Virology and Immunology. 8<sup>th</sup>Ed. Edward Arnold. London.
- Aulanni'am. 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya Press. Hal. 76-80.
- Baratawidjaja, K.G. 1991. Imunologi Dasar. Edisi kedua. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Bellanti, J.A. 1993. Imunologi III. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Burgess, G.W. 1995. Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Forestier, C., E. Moreno, S. Meresse, A. Phalipon, D. Olive, P. Sansonetti, J.P. Gorvel. 1999. Interaction of Brucella abortus Lipopolysaccharide With Major Histocompatibility Complex Class II Molecules in B Lymphocytes. American Society for Microbiology.
- Handijatno, D. 2003. Pencegahan dan Penanggulangan Brucellosis pada Sapi perah. Raker Pemberantasan Brucellosis di Jawa Timur.
- Hardjoprajoto, S. 1995. Ilmu Kemajiran pada Ternak. Airlangga University Press. Hal. 218.
- Harlow, E.N. and D. Lane. 1996. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory. USA.
- Hillman, B. 1996. Proper Use of Calfhood Vaccination in Brucellosis Eradication. Idaho Department of Agriculture.

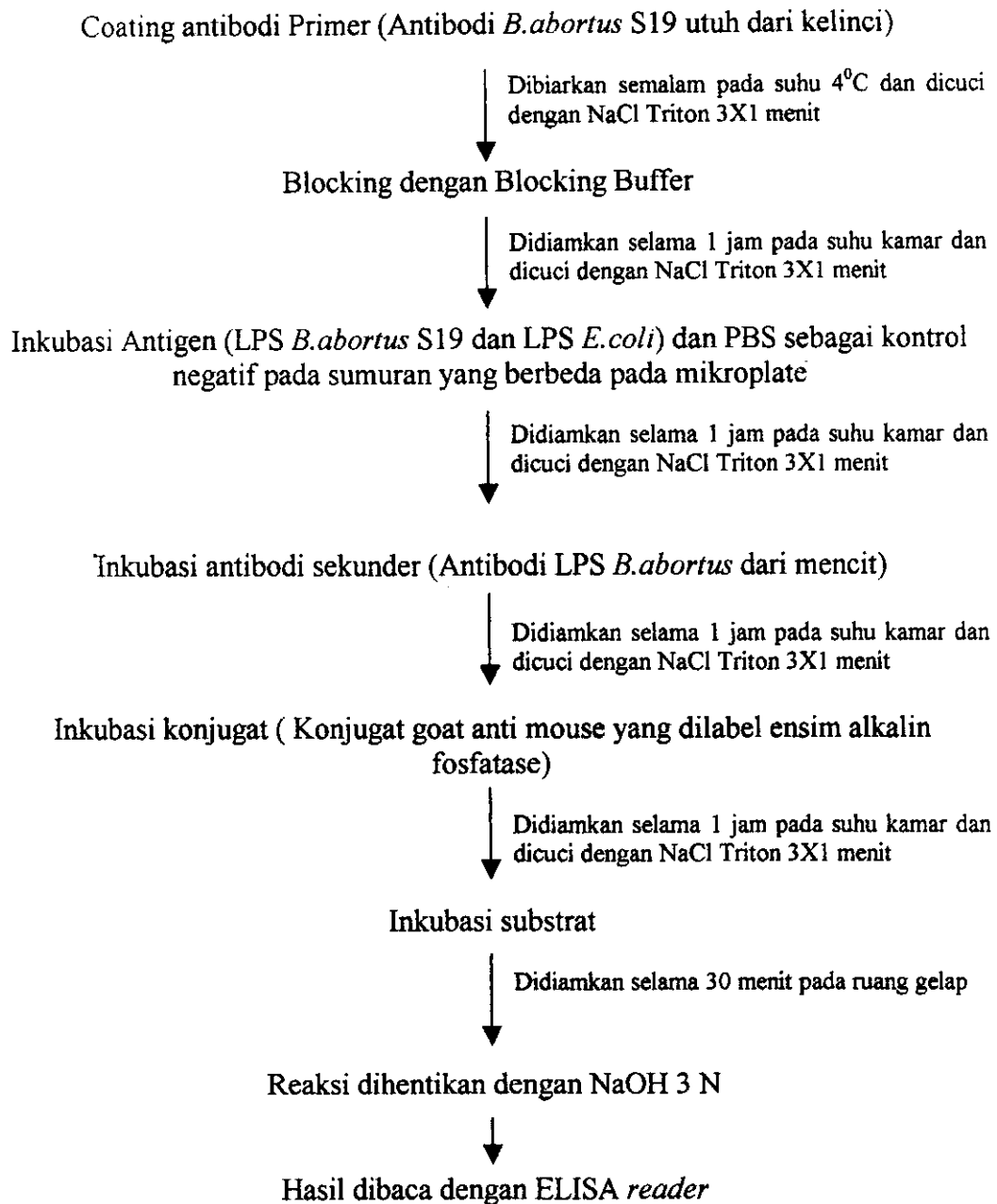
- Hirst, R.G. 1995. Antigen Bakteri. dalam: G.W. Burgess (Ed.). Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 357-374.
- Jawetz, E., J.L. Melnick, E.A. Adelberg. 1990. Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan. EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Nielsen, K. and R.J. Duncan. 1990. Animal Brucellosis. CRC Press. Boston. USA.
- Nielsen, K. 2002. Diagnosis of Brucellosis by Serology. Veterinary Microbiology. Hal. 90, 447-459.
- Office International des Epizooties (OIE). 2004. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE. References Laboratories for Bovine Brucellosis. [www.unav.es/microbial/Brucellosis2003proceeding.pdf](http://www.unav.es/microbial/Brucellosis2003proceeding.pdf)
- Pelczar, M.J. and E.C.S. Chan. 1988. Dasar-dasar Mikrobiologi. Universitas Indonesia Press. Jakarta. Hal. 576-584.
- Pelczar, M.J., E.C.S. Chan, N.R. Krieg. 1993. Microbiology Concepts and Applications. Mc Graw-Hill. Hal. 513, 543.
- Quin, P.J, B.K. Markey, M.E. Carter, W.J. Donnelly and F.C. Leonard. 2002. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing. Hal. 163-167.
- Rantam, F.A. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 79-93.
- Schelgel, H. G. 1994. Mikrobiologi umum. Edisi Keenam. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 56-61.
- Schurig, G.G. 2002. *Brucella abortus* Vaccines: Smooth and Rough Strains. Brunet Publications. Virginia. U.S.A.
- Smith, J.R. 1995. Produksi Serum Heperimun. dalam: G.W. Burgess (Ed.). Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 15-30.
- Spencer, T.L. 1995. ELISA dan Serologi Bakteri. dalam: G.W. Burgess (Ed.). Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 425-430.

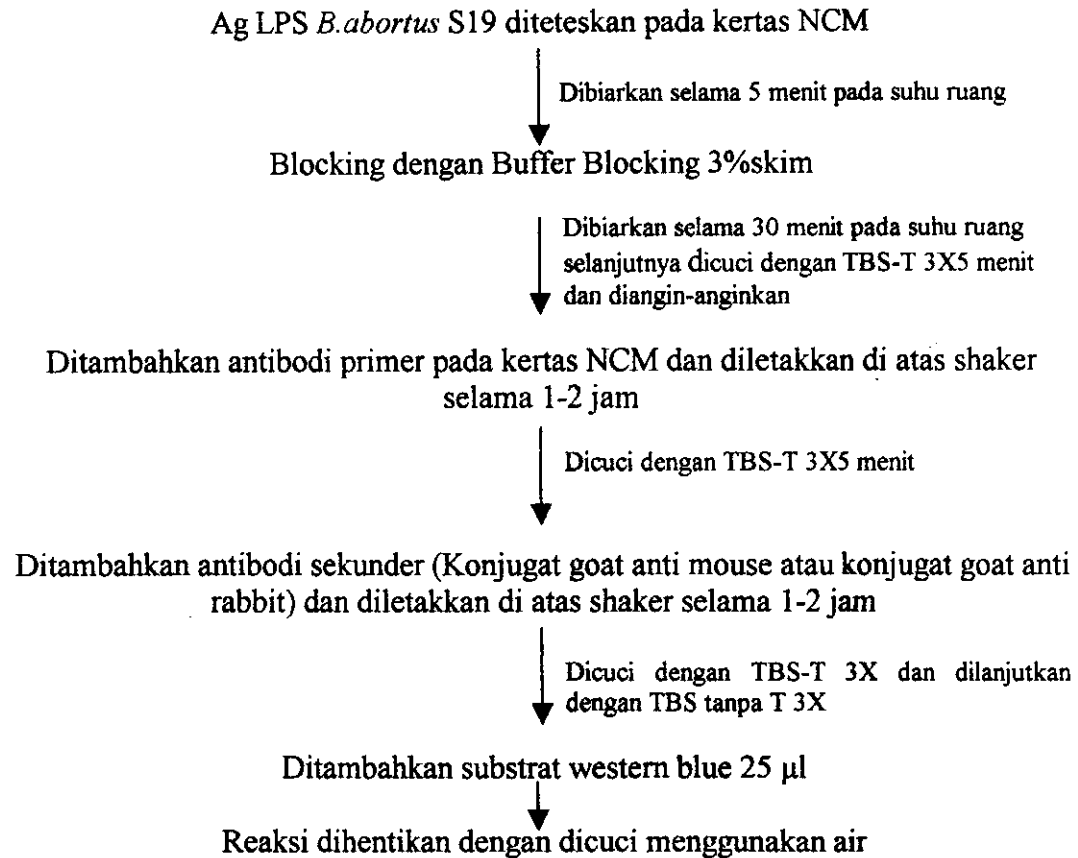
- Spencer, T.L. 1995. Penyiapan Antigen Bakteri untuk ELISA dalam: G.W. Burgess (Ed.). Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 425-430.
- Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Indonesia. 1994. Mikrobiologi Kedokteran. Binarupa Aksara.
- Subronto. 2003. Ilmu Penyakit Ternak Mamalia. Edisi II. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 528-549.
- Suwarno, R. Ernawati, A.P. Rahardjo, N. Sianita, J. Rahmani dan F.A. Rntam. 2003. Prinsip Dasar, Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji ELISA. Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Timoney, J.F., J.H. Gillespie, F.W., Scott, J.E. Barlough. 1988. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animals. Edisi VIII. Comstoc Publishing. Hal. 135-143.
- Tizard, I. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner. Airlangga University Press. Surabaya.
- Ugalde, J.E, C. Czibener, M.F. Feldmen and R.A. Ugalde. 2000. Identification and Characterization of The *Brucella abortus* Phosphoglucomutase Gene: Role of Lipopolysaccharide in Virulence and Intracellular Multiplication. American Society for Microbiology.
- Urmeneta, B.A., C. Marin, V. Aragon, J.M. Blasco, R. Diaz and I. Moriyon. 1998. Evaluation of Lipopolysaccharides and Polisaccharides of Different Epitopic Structure in The Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Brucellosis in Small Ruminant and Cattle. Departamento de Microbiologia, Universidad de Navarra. Spain.



# LAMPIRAN

**Lampiran 1. Diagram Metode Penelitian**

**Lampiran 2. Diagram alir uji *Indirect Sandwich ELISA***

**Lampiran 3. Diagram Alir Cara Kerja uji *Dot Dlot***

6

**Lampiran 4. Bahan-bahan yang digunakan dalam Uji *Indirect Sandwich* ELISA****BAHAN UJI *INDIRECT SANDWICH* ELISA****1. BLOCKING BUFFER**

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : 1,53 gram  
NaHCO<sub>3</sub> : 2,93 gram  
Aquades *ad* 1 liter  
Pada PH 9,6

**2. CARBONATE BUFFER**

→ PBS-Tween – BSA PH 7,4  
BSA 0,5 gram  
PBS-Tween *ad* 100 ml

**3. WASHING BUFFER**

→ NaCl-Triton x  
NaCl = 0,9 gram  
Triton x-100 = 0,05 ml  
NaN<sub>3</sub> = 20 mg  
Aquades *ad* 100 ml

**4. SUBSTRAT BUFFER**

MgCl<sub>2</sub> = 10 mg  
Diethanolamin = 9,7 ml  
NaN<sub>3</sub> = 20 mg  
HCl pekat sampai PH 9,8  
Aquades *ad* 100 ml

**Lampiran 5. Bahan-bahan yang digunakan dalam Uji Dot Blot****BAHAN UJI DOT BLOT****I. TRIS BUFFER SALINE (TBS)**

Tris-HCl 0,02 M = 0,315 gram  
NaCl 0,5 M = 2,922 gram  
Aquadess *ad* 100 ml  
Pada PH 7,5

**II. TBS-TWEEN = WASHING**

Tris-HCl = 0,315 gram  
NaCl = 2,922 gram  
Tween-20 0,05% = 0,05 ml

**III. BLOCKING BUFFER**

NaCl 0,9% = 0,9 gram  
Tris HCl 10 Mm = 0,157 gram  
Skim 3% = 3 gram  
Aquadess 100 ml  
Pada PH 7,4

**Lampiran 6. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan Potato Agar****BAHAN POTATO AGAR**

Kentang tua dan bagus	= 1,75 Kg
Agar	= 25 gram
Peptone	= 10 gram
<i>Beef extract</i>	= 5 gram
Sodium Chloride	= 5 gram
Glycerol	= 20 ml
Aquades	= 1000 ml
Pada PH 6,8 – 7,2	

## Lampiran 7. Penghitungan Dosis Imunisasi pada Kelinci dan Mencit

### 1. Imunisasi LPS *Brucella abortus* S19 pada mencit

Dosis kadar LPS untuk mencit = 50 µg /ekor

Volume injeksi = 0,3 ml /ekor yang terdiri dari 0,15 ml LPS dalam PBS dan CFA/IFA 0,15 ml.

Hasil pemeriksaan , kadar LPS yang didapat = 5,416 g %

Dosis untuk 20 ekor mencit → (50 µg/ekor/0.15 ml) x 20 ekor  
= 1000 µg/ 3 ml

Kadar LPS = 5,416 g/100 ml

= 5416 mg/100 ml

= 54,16 mg/ml

= 54160 µg/1000 µl

Kadar LPS yang dibutuhkan 1000 µg/3 ml

54160 µg → 1ml

1000 µg → x ml

x = 1000/54160

x = 0,01846 ml ≈ 0,02 ml

Jadi PBS yang ditambahkan : 3 ml – 0,02 ml = 2,98 ml

Cara persiapan bahan untuk injeksi LPS *Brucella abortus* S19 pada mencit:

- LPS *Brucella abortus* S19 diambil sebanyak 0,02 ml dan dimasukkan ke dalam larutan PBS sebanyak 2,98 ml.
- Larutan tersebut ditambahkan CFA/IFA sebanyak 3 ml.
- Bahan siap diinjeksikan pada mencit dengan volume 0,3 ml / ekor.

### 2. Imunisasi *Brucella abortus* S19 pada kelinci

Kadar *Brucella abortus* S19 aktif pada vaksin

= 40 - 120 x 10<sup>9</sup> / dosis

= 40 - 120 x 10<sup>10</sup> / 10 dosis

= 40 - 120 x 10<sup>11</sup> / 10 ml

= 4 - 12 x 10<sup>10</sup> / ml

Volume injeksi pada kelinci = 0,5 ml/ ekor

Jadi dosis injeksi = 20 - 60 x 10<sup>9</sup> / 0,5 ml / ekor

Cara persiapan bahan untuk injeksi *Brucella abortus* S19 pada kelinci:

- Vaksin satu vial diencerkan dengan larutan PBS sebanyak 10 ml.
- Larutan tersebut diambil 2 ml dan ditambahkan lagi dengan PBS sebanyak 2 ml
- Bahan siap diinjeksikan pada kelinci dengan volume 0,5 ml/ ekor.



### Lampiran 8. Cara Pembuatan NaOH 4 M dan Perhitungan Kadar LPS pada Larutan yang Diencerkan

#### 1. Pembuatan NaOH 4 M

Dalam etiket bubuk NaOH tertulis 40 g / mol

$$M = 40 \text{ g / mol}$$

$$1 \text{ M} = 40 \text{ g / liter}$$

$$4 \text{ M} = 160 \text{ g / liter}$$

$$\rightarrow 160 \text{ g / 1000 ml}$$

$$\rightarrow 8 \text{ g / 50 ml}$$

Jadi 8 gram kristal NaOH dilarutkan dalam 50 ml aquades maka akan terbentuk larutan NaOH 4 M.

#### 2. Perhitungan kadar LPS pada larutan yang diencerkan

LPS yang diencerkan 1/200

$$\text{Kadar LPS} = 5,416 \text{ g / 100 ml}$$

$$= 5416 \text{ mg / 100 ml}$$

$$= 54,16 \text{ mg / ml}$$

$$\text{LPS 1/200} \rightarrow 54,16 \text{ mg / ml}$$

$$\rightarrow 54,16 \text{ mg / 200}$$

$$= 0,2708 \text{ mg}$$

$$= 270,8 \text{ } \mu\text{g}$$

**Lampiran 9. Imunisasi Melalui Subkutan pada Kelinci dan Mencit**



**Gambar 1 Imunisasi pada kelinci melalui subkutan**



**Gambar 2 Imunisasi pada mencit melalui subkutan**