

SKRIPSI

**DETEKSI OUTER MEMBRAN PROTEIN *Brucella abortus*
ISOLAT LOKAL YANG BERASAL DARI SAPI PERAH
DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION
(PCR)**



Oleh :

NENLI PRABOWO

NIM 060610173

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2011**

DETEKSI OUTER MEMBRAN PROTEIN *Brucella abortus* ISOLAT LOKAL YANG BERASAL DARI SAPI PERAH DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk menempuh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

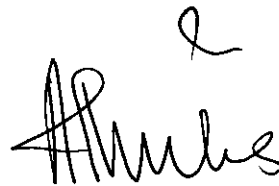
Oleh :

NENLI PRABOWO
NIM 060610173

Menyetujui,
Komisi Pembimbing



Sri Chusniati, drh., M.Kes
Pembimbing Pertama



Dr. Abdul Samik, drh., M.Si
Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**DETEKSI OUTER MEMBRAN PROTEIN *Brucella abortus* ISOLAT
LOKAL YANG BERASAL DARI SAPI PERAH DENGAN METODE
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**

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, 12 Januari 2011



Nenli Prabowo
NIM 060610173

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 12 januari 2011

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Pudji Sianto, drh., M.Kes

Sekretaris : Dr. C.A. Nidom, drh., MS

Anggota : Adi Prijo Rahardjo, drh., M.Kes

Pembimbing I : Sri Chusniati, drh., M.Kes

Pembimbing II : Dr. Abdul Samik, drh., M.Si

Telah diuji pada

Tanggal : 26 Januari 2011

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Pudji Sianto, drh., M.Kes

Anggota : Dr. C.A. Nidom, drh., MS

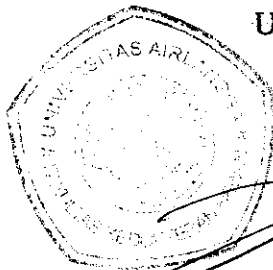
Adi Prijo Rahardjo, drh., M.Kes

Sri Chusniati, drh., M.Kes

Dr. Abdul Samik, drh., M.Si

Surabaya, 7 Februari 2011

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh
NIP.195312161978062001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul:

"Deteksi Outer Membran Protein *Brucella Abortus* Isolat Lokal Yang Berasal Dari Sapi Perah Dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)"

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., Drh. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Sri Chusniati, drh., M.Kes selaku dosen pembimbing pertama dan Dr. Abdul Samik, drh., M.Si selaku pembimbing kedua, bersedia memberikan bimbingan, saran, dan nasehat yang berguna selama penelitian serta dalam penyusunan naskah Skripsi ini.

Rr. Ratih Ratnasari, drh., SU selaku dosen penelitian yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti penelitian mengenai *Brucella abortus* ini.

Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes selaku ketua penguji, Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., MS selaku sekretaris penguji, dan Adi Prijo Rahardjo, drh., M.Kes selaku anggota, atas saran yang membangun dalam penyusunan skripsi.

Dr. Suwarno, drh., M.Si yang telah membantu dan memberikan saran dalam penelitian, staf laboratorium bakteriologi dan mikologi, serta staf laboratorium virologi dan imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Seluruh staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak Anung Sunarno dan Ibu Sukinem yang telah membesarkan dan mendidik saya, saudara saya tercinta, mas Pur, mbak Rum, mbak Sri, mas Wardi, mbak Heri, mas Rian, mas Toyo, mbak Indah, mas Tono dan mbak Nefi dan seluruh keluarga atas doa, semangat dan dukungan yang telah diberikan sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.

Seluruh rekan-rekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah membantu, mbak Fitri serta teman-teman angkatan 2006. Sahabat terbaikku, Elsitia Ria Prasetyani, Nian Nurvita Dewi, Septa Budi Wanarto, Riski Arya Pradikta, Febry K.E.S., Arif Fachrudin, atas bantuan, dukungan, semangat dan doanya.

Semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu-persatu yang telah mendukung baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penulisan ini.

Surabaya, Januari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN IDENTITAS.....	v
ABSTRACT.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Landasan Teori.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Klasifikasi <i>Brucella abortus</i>	7
2.2 <i>Brucella abortus</i>	7
2.3 Brucellosis.....	9
2.3.1 Cara Penularan.....	9
2.3.2 Patogenesis.....	10
2.3.3 Gejala Klinis.....	11
2.3.4 Diagnosa Penyakit.....	12
2.3.5 Penanggulangan dan Pemberantasan Brucellosis....	13
2.4 Outer Membran Protein.....	13
2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	15
2.6 Komponen PCR.....	16
2.6.1 Primer.....	16
2.6.2 DNA Template.....	17
2.6.3 Taq DNA Polymerase.....	17
2.6.4 Buffer PCR.....	17
2.6.5 Nucleotide (dNTP).....	18
2.6.6 Konsentrasi Mg^{2+}	18
2.6.7 Thermal Cycler.....	19
2.7 Elektroforesis.....	19
BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Jenis Penelitian.....	20
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	20
3.3 Materi Penelitian.....	20
3.3.1 Sampel Penelitian.....	20
3.3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	21

3.4 Metode Penelitian.....	21
3.4.1 Uji biokimia.....	21
3.4.1.1 Uji katalase.....	21
3.4.1.2 Uji urease.....	22
3.4.1.3 Uji indol.....	22
3.4.1.4 Uji citrate.....	22
3.4.1.4 Uji H ₂ S.....	22
3.4.2 Isolasi DNA.....	22
3.4.3 Amplifikasi DNA PCR.....	23
3.4.4 Elektroforesis PCR.....	24
Kerangka Operasional.....	25
BAB 4 HASIL.....	26
BAB 5 PEMBAHASAN.....	29
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1 Kesimpulan.....	34
6.2 Saran.....	34
RINGKASAN.....	35
DAFTAR PUSTAKA.....	38
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.2	Foto elektron <i>Brucella abortus</i>	8
2.5	Tahap pelipatgandaan DNA.....	15
4.1.1	Uji katalase.....	26
4.1.2	Uji indol, citrate, dan urease.....	26
4.1.3	Uji H ₂ S.....	27
4.2	Hasil PCR <i>Brucella abortus</i>	28

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Primer yang digunakan untuk PCR OMP Brucella abortus.....	23

DAFTAR SINGKATAN

A	: <i>Adenine</i>
AGE	: <i>Agarose Gel Elektroforesis</i>
bp	: <i>base pairs</i>
BAM	: <i>Brucella Agar Media</i>
BBV	: <i>Balai Besar Veteriner</i>
BMRT	: <i>Brucella Milk Ring Test</i>
C	: <i>Cytosine</i>
CO ₂	: <i>Karbondioksida</i>
°C	: <i>Derajat Celcius</i>
CFT	: <i>Complement Fixation Test</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	: <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i>
dATP	: <i>Deoxyadenine Triphosphate</i>
dCTP	: <i>Deoxycytosine Triphosphate</i>
dGTP	: <i>Deoxyguanine Triphosphate</i>
dTTP	: <i>Deoxythymine Triphosphate</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	: <i>Food and Agriculture Organization</i>
G	: <i>Guanine</i>
H ₂ S	: <i>Hydrogen Sulfide</i>
kDa	: <i>kilo Dalton</i>
LPS	: <i>Lipo polisakarida</i>
MRT	: <i>Milk Ring Test</i>
Mg	: <i>Magnesium</i>
mM	: <i>mikromolar</i>
mm	: <i>milimeter</i>
µl	: <i>mikroliter</i>
NaOH	: <i>Natrium Hidroksida</i>
NCBI	: <i>National Center of Biotechnology Information</i>
NFW	: <i>Nuclease Free Water</i>
NTB	: <i>Nusa Tenggara Barat</i>
NTT	: <i>Nusa Tenggara Timur</i>
OIE	: <i>Office Internatinal de Epizooties</i>
OMP	: <i>Outer Membran Protein</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RBT	: <i>Rose Bengal Test</i>
RNA	: <i>Ribo Nucleic Acid</i>
SAT	: <i>Serum Agglutination Test</i>
SCA	: <i>Simons Citrate Agar</i>
SIM	: <i>Sulfide indol motility</i>
T	: <i>Thymine</i>
TAE	: <i>Tris Acetate EDTA</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Populasi sapi perah di Indonesia setiap tahun semakin meningkat, hal ini dipicu oleh kebijakan Uni Eropa dan beberapa negara penghasil susu yang mengurangi subsidi bagi usaha peternakan sapi perah, sehingga tidak ada insentif bagi peternak negara asing untuk mengembangkan usahanya. Kondisi ini menguntungkan bagi peternak sapi perah Indonesia karena akan terjadi peluang untuk meningkatkan posisi tawar kepada industri pengolahan susu. Hal inilah yang mendorong peternak sapi perah untuk tetap mempertahankan usahanya dalam bidang peternakan sapi perah (Nazaruddin, 2009).

Banyak kendala yang dihadapi para peternak untuk mempertahankan dan memajukan usaha peternakan sapi perah mulai dari pakan, lingkungan dan penyakit. Penyakit yang menyerang sapi perah salah satunya adalah brucellosis (Nazaruddin, 2009).

Brucellosis merupakan penyakit hewan menular yang secara primer menyerang sapi, kambing, babi dan manusia. Brucellosis disebabkan bakteri *Brucella abortus* (Subronto, 2003). Keguguran atau keluron karena *Brucella abortus* umumnya terjadi dari bulan ke-6 sampai ke-9 periode kebuntingan. Kejadian abortus berkisar antara 5-90% di dalam suatu kelompok ternak tergantung pada berat ringan infeksi, daya tahan hewan bunting, dan virulensi organisme (Toelihere, 1985). Kejadian brucellosis cenderung semakin meningkat baik dari segi jumlah maupun dalam penyebarannya. Hal ini tentu sangat

mengancam pertumbuhan peternakan (sapi dan kerbau). Kecenderungan meningkatnya kasus brucellosis lebih sering terjadi akibat peningkatan populasi dan perpindahan sapi perah, oleh karena itu di Indonesia penyakit tersebut pada sapi dimasukkan dalam daftar penyakit menular yang harus dicegah dan diberantas sejak tahun 1957 (Hardjopranjoto, 1995 ; Subronto, 2003).

Brucellosis sudah lama dikenal di Indonesia terutama sejak ditemukannya kasus di Jawa dimana *Brucella abortus* menyerang sapi perah. Penyakit tersebut menyerang hewan yang ada disekitarnya dan dapat menyebar dengan cepat ke berbagai tempat di Indonesia. Kejadian Brucellosis di Indonesia terdapat di Jakarta, Jawa Barat, Jawa Tengah , Jawa Timur, NTB, NTT, Sulawesi Selatan dan Aceh (Subronto, 2003).

Penyakit ini dapat mengakibatkan kerugian ekonomis yang sangat besar, walaupun mortalitasnya rendah. Pada ternak kerugian dapat berupa keluron, anak hewan yang dilahirkan lemah kemudian mati, terjadi gangguan pada alat-alat reproduksi yang mengakibatkan kemajiran temporer atau permanen. Kerugian pada sapi perah berupa turunya produksi susu (Tizzard, 1988), sedangkan pada hewan jantan dapat menyebabkan orchitis dan epididimitis (Hardjopranjoto, 1995).

Pemeriksaan secara laboratorium dapat dilakukan dengan beberapa uji serologis. Uji serologis yang biasanya digunakan untuk diagnosis *Brucellosis* yang berasal dari sampel susu atau serum penderita adalah : *Brucella Milk Ring*

Test (MRT), Rose-Bengal Test (RBT), Complement-Fixation Test (CFT), Serum Agglutination Test (SAT), Indirect ELISA (Quinn, et al., 2002).

Menurut Matar *et al.*, yang dikutip oleh Susan (2006) diagnosis *Brucellosis* dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dapat dilakukan tetapi metode ini memerlukan standarisasi dan perlu evaluasi lebih lanjut. Tetapi menurut Klavezas, *et al.*, (1995) PCR merupakan metode yang sangat akurat untuk deteksi *Brucella spesies* dari isolat bakteri, dan cairan tubuh penderita.

Sejak pertama kali ditemukan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)* oleh Mullis, telah berkembang pesat dalam menyingkap rahasia kehidupan (Mullis *et al.*, 1986 yang dikutip oleh Nidom dan de Vries, 2007). *Polymerase Chain Reaction* merupakan metode sintesis asam nukleat secara *in vitro* dengan bantuan enzim untuk melipatgandakan (amplifikasi) fragmen DNA (Suwarno, 2007). Dengan teknik ini dapat diketahui panjang DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) dari gen *outer membrane protein* bakteri *Brucella abortus*.

Struktur bakteri *Brucella abortus* tergolong unik tidak seperti bakteri Gram negatif lainnya. Permukaan luar bakteri tidak mempunyai fli dan tidak berkapsul, terdiri dari dua komponen yang telah diidentifikasi sebagai faktor virulensi yang potensial yaitu protein *Outer membrane protein (OMP)* dan Lipopolisakarida(LPS) (Quinn *et al.*,2002). Karakteristik bakteri gram negatif adalah dikelilingi oleh selaput membran luar yang berfungsi dalam proses konjugasi bakteri dalam mengendalikan replikasi DNA dan pembelahan sel.

Selaput membran luar juga berfungsi sebagai penghalang difusi molekul besar serta pelindung dari enzim hidrolitik (Jawetz, *et al.*, 2002).

Outer membrane protein (OMP) bakteri Gram negatif merupakan antigen potensial yang dapat secara langsung menginduksi respon imun spesifik humoral yaitu sel limfosit B sehingga lebih cepat memacu terbentuknya antibodi (Forestier *et al.*, 2005). Protein ini juga berperan dalam menunjukkan sifat imunogenik pada berat molekul tertentu (Jawetz *et al.*, 2002). Menurut penelitian Utomo dan Ratnasari (2008), *Outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* S-19 dengan berat molekul 37,2 kDa mempunyai sifat imunogenik. Dapat diasumsikan bahwa *Outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* isolat lokal juga bersifat imunogenik yang nantinya dapat dipakai sebagai kandidat vaksin subunit yang aman dan tidak menimbulkan keguguran apabila diberikan pada sapi yang sedang bunting.

Penggunaan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk deteksi *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* telah banyak diteliti dalam usaha mendapatkan antigen yang dapat diandalkan baik untuk diagnosis maupun untuk vaksin terhadap Brucellosis. Salehi *et al.*, (2006) menggunakan primer omp2a untuk amplifikasi outer membran protein *Brucella abortus* dan menghasilkan 1100 pasangan basa. Rincon *et al.*, (1997), menggunakan primer 2ab5 dan 2ab200 dalam proses PCR. Penelitian yang dilakukan oleh Rincon *et al.*, menghasilkan panjang DNA 200 bp.

Berdasarkan latar belakang inilah yang mendorong peneliti melakukan penelitian untuk mendeteksi *outer membrane protein (OMP) Brucella abortus* isolat lokal.

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang diatas dapat dirumuskan permasalahan : Apakah *outer membrane protein (OMP) Brucella abortus* isolat lokal yang bersal dari sapi perah dapat dideteksi dengan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

1.3 Landasan teori

Penyakit brucellosis, *Bangs disease* atau penyakit abortus pada sapi disebabkan oleh *Brucella abortus* (Akoso, 1996 ; Public Health Laboratory Network, 2004). *Brucella abortus* bersifat Gram negatif, tidak berspora, berbentuk kokobasilus dengan panjang 0,6 - 1,5 μm , tidak berkapsul, tidak berflagella sehingga tidak bergerak (non motil) (Quinn *et al.*, 2002). *Outer membrane protein (OMP) Brucella* pertama kali diidentifikasi pada awal tahun 1980 dan diklasifikasikan menurut masa molekulernya (Salehi *et al.*, 2006). *Outer membrane protein (OMP)* bakteri Gram negatif merupakan antigen potensial yang dapat secara langsung menginduksi respon imun spesifik humoral yaitu sel limfosit B sehingga lebih cepat memacu terbentuknya antibodi (Forestier *et al.*, 2005).

Reaksi Polimerase Berantai atau dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction* (PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro*. Metoda PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya (Fatchiyah *et al.*, 2006).

1.4 Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bahwa *Brucella abortus* isolat lokal yang dideteksi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) memiliki *outer membrane protein*.

1.5 Manfaat penelitian

Beberapa manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah :

- Memberikan informasi bahwa *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* isolat lokal dapat dideteksi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik.
- Dapat memberi manfaat bagi ilmu pengetahuan yaitu bakteriologi khususnya *Brucella abortus* tentang penentuan *outer membrane protein* (OMP) imunogen kuman sebagai bahan vaksin.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi *Brucella abortus*

Menurut Dwidjoseputro (1995) klasifikasi bakteri *Brucella abortus* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Protopytha
Klass	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Subordo	: Eubacteriineae
Famili	: Brucelaceae
Genus	: <i>Brucella</i>
Spesies	: <i>Brucella Abortus</i>

2.2 *Brucella abortus*

Brucella abortus bersifat Gram negatif, tidak berspora, berbentuk kokobasilus dengan panjang 0,6 - 1,5 μm , tidak berkapsul, tidak berflagella sehingga tidak bergerak (non motil) (Quinn *et al.*, 2002). Pada pewarnaan Gram terlihat berwarna merah, berpasangan atau bergerombol, sedangkan pada uji biokimiawi menunjukkan indol negatif, katalase positif, urea positif, sitrat negatif,

tidak tumbuh atau kurang subur tanpa adanya CO₂ (OIE,2004). Dalam media biakan, koloni kuman brucella berbentuk seperti setetes madu bulat, halus, permukaannya cembung dan licin, mengkilap serta tembus cahaya dengan diameter 1 - 2 mm. Pada pengecatan Gram, kuman terlihat sendiri-sendiri, berpasangan atau membentuk rantai pendek (Alton,1998; OIE, 2004).

Secara biokimia, kuman *Brucella* dapat mereduksi nitrat, menghidrolisis urea, dan tidak membentuk sitrat tetapi membentuk H₂S. Pertumbuhan bakteri memerlukan temperatur 20 - 40°C dengan penambahan karbondioksida (CO₂) 5 - 10% (Alton, 1998).

Kuman brucella bersifat intraseluler yaitu kuman mampu hidup dan berkembang biak dalam set fagosit, memiliki 5-guanosin monofosfat yang berfungsi menghambat efek bakterisidal dalam neutrofil, sehingga kuman mampu hidup dan berkembang biak di dalam set neutrofil (Boschioli *et al.*, 2001). Strain *Brucella abortus* yang halus (smooth) pada LPS-nya mengandung komponen rantai 0-perosamin, merupakan antigen paling dominan yang dapat terdeteksi pada hewan maupun manusia yang terinfeksi brucellosis . Uji serologis standar brucellosis adalah spesifik untuk mendeteksi rantai 0-perosamin tersebut.



Gambar 2.2. Foto elektron mikroskop kuman *Brucella abortus* Kunkel (2004)

2.3 Brucellosis

Penyakit brucellosis, *Bangs disease* atau penyakit abortus pada sapi disebabkan oleh *Brucella abortus* (Akoso, 1996 ; Public Health Laboratory Network, 2004). Di Indonesia kecenderungan meningkatnya populasi dan lebih seringnya mutasi sapi perah menjadi penyebab utama meningkatnya kasus brucellosis. Oleh sebab itu di Indonesia penyakit brucellosis dimasukkan dalam daftar penyakit menular yang harus dicegah dan diberantas sejak tahun 1959. Di Indonesia, penyakit brucellosis dikenal pertama kali pada tahun 1935, ditemukan pada sapi perah di Grati, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur dan kuman *Brucella abortus* berhasil diisolasi pada tahun 1938. Penyakit brucellosis sudah bersifat *endemis* di Indonesia dan kadang-kadang muncul sebagai *epidemi* pada banyak peternakan sapi perah di Jakarta, Bandung, Jawa Tengah dan Jawa Timur (Putra dan Arsani, 2003).

2.3.1 Cara penularan

Cara penularan penyakit brucellosis yang paling banyak adalah melalui air susu atau pakan yang tercemar oleh selaput janin atau cairan yang keluar dari uterus yang terinfeksi. Penularan dari pejantan yang terinfeksi brucellosis kepada induk betina dapat terjadi melalui kawin alami atau juga dapat melalui proses inseminasi buatan dilakukan lewat intra uterin dengan sperma yang mengandung brucellosis. Penularan penyakit brucellosis juga dapat terjadi melalui air susu

induk yang diminum oleh pedet sapi, namun terjadinya infeksi melalui air susu tersebut sangat kecil sekali (Subronto, 2003).

Penularan kepada manusia dapat terjadi melalui saluran pencernaan, misalnya minum air susu yang tidak dimasak yang berasal dari ternak penderita brucellosis. Penularan melalui selaput lendir atau kulit yang luka, misalnya kontak langsung dengan janin atau plasenta (ari-ari) dari sapi penderita brucellosis dapat juga menyebabkan penularan brucellosis pada manusia (Subronto, 2003 ; WHO, 1971).

2.3.2 Patogenesis

Bakteri *Brucella abortus* masuk ke dalam tubuh melalui membrane mukosa terutama saluran pencernaan. Pada hewan bunting, invasi *Brucella abortus* pertama kali pada jaringan ikat antara kelenjar uterus dan mengarah pada endometrium yang mengakibatkan *endometritis ulseratif*. Kotiledon kemudian terinfeksi disertai terbentuknya eksudat dan berlanjut pada plasenta sehingga mengakibatkan *placentitis*. *Brucella* banyak terdapat pada vili khorion, karena terjadi penghancuran jaringan, seluruh vili akan rusak menyebabkan kematian fetus dan abortus. Jadi kematian fetus adalah gangguan fungsi plasenta disamping adanya *endotoksin*. Fetus biasanya tetap tinggal di uterus selama 24-72 jam setelah kematian. Selaput fetus menderita oedematous dengan lesi dan nekrosa. (Hardjopranjoto, 1995).

Pada hewan jantan, infeksi akan diikuti oleh orkhitis yang kronis dan perlekatan tunika vaginalis testis dan sel mani menjadi abnormal. Pada ampula dan vas deferent terjadi nekrosa pada jaringan ikatnya. (Hardjopranjoto, 1995).

2.3.3 Gejala klinis

Gejala klinis dari penyakit brucellosis ini adalah abortus atau di masyarakat dan peternak dikenal dengan nama keluron. Keguguran biasanya terjadi pada umur kebuntingan 6 sampai 9 bulan, selaput fetus yang diaborsikan terlihat oedema, hemoragi, nekrotik, adanya eksudat kental serta adanya retensi plasenta dan metritis. Penyakit brucellosis ini juga menyebabkan perubahan di dalam ambing. Ambing merupakan tempat perbanyakan bakteri *Brucella abortus* secara terus menerus. Sapi-sapi dengan titer aglutinasi yang tinggi menunjukkan presentasi jumlah bakteri yang tinggi di dalam ambingnya (Subronto, 2003).

Pada pejantan, penyakit brucellosis dapat menyerang testis dan mengakibatkan *orkhitis* dan *epididimitis* serta gangguan pada kelenjar vesikula seminalis dan ampula. Brucellosis juga menyebabkan abses serta nekrosis pada scrotum. Sehingga semen yang diambil dari pejantan mungkin mengandung bakteri *brucella abortus* (Subronto, 2003).

Gejala klinis Brucellosis pada manusia adalah demam *undulant* yang intermiten, sakit pada otot dan persendian yang sering diikuti komplikasi dengan osteomielitis (Quinn, *et al.*, 2002). Pada wanita yang hamil bila terinfeksi

Brucellosis dapat menularkan kuman *Brucella* ke janin melalui plasenta yang mengakibatkan abortus spontan dan kematian fetus intra uterine pada kehamilan trisemester pertama dan kedua (Gholami, 2000).

2.3.4 Diagnosis penyakit

Diagnosis penyakit brucellosis dapat dilakukan secara bakteriologis dan serologis. Secara bakteriologis dapat dilakukan isolasi dan identifikasi yang berasal dari bahan-bahan yang dicurigai. Bahan-bahan tersebut bisa berasal dari fetus yang diaborsikan, plasenta, eksudat uterus, susu, atau cairan abses. Diagnosis yang hanya berdasarkan gejala klinis sangat tidak spesifik walaupun pada ternak dijumpai gejala klinis penyakit (Timoney and Gillespie, 1998 ; Quinn *et al.*, 2002).

Secara serologis dapat dilakukan beberapa uji diantaranya *Brucella Milk Ring Test*, *Rost-Bengal Test* (hanya untuk uji kualitatif, hasil positif harus dilanjutkan dengan *CFT* atau *ELISA*), *Complement-Fixation Test*, *Indirect ELISA*, *competitive ELISA* (menggunakan antibody monoklonal), *Serum Agglutination Test (SAT)* atau *Antiglobulin Test*. Saat ini juga telah ada *Brucellin Test*, suatu ekstrak *Brucella abortus* yang digunakan untuk tes kulit atau intradermal tes. Akan tetapi tes kulit ini tidak dapat diandalkan dan jarang dilakukan. Uji *polymerase chain reaction (PCR)* juga digunakan untuk diagnose Brucellosis hewan sebagai metode molekuler (Alton *et al.*, 1998 ; jawetz *et al.*, 2002 ; Quinn *et al.*, 2002).

2.3.5 Penanggulangan dan pencegahan brucellosis

Menurut Nazaruddin (2009), pencegahan brucellosis pada sapi didasarkan pada tindakan higiene dan sanitasi, vaksinasi anak sapi dengan Strain 19 dan pengujian serta penyingkiran sapi reaktor. Tindakan higienik sangat penting dalam program pencegahan brucellosis pada suatu kelompok ternak. Sapi yang tertular sebaiknya dipisahkan dari kelompoknya, kemudian fetus dan placenta yang digugurkan harus dikubur atau dibakar dan tempat yang terkontaminasi harus didesinfeksi dengan 4% larutan kresol atau desinfektan sejenis. Program vaksinasi dilakukan pada anak sapi umur 3-7 bulan dengan vaksin *Brucella* Strain 19, tetapi penggunaan vaksin Strain 19 harus hati-hati karena dapat menyebabkan brucellosis atau demam undulant pada manusia

2.4 Outer membrane protein

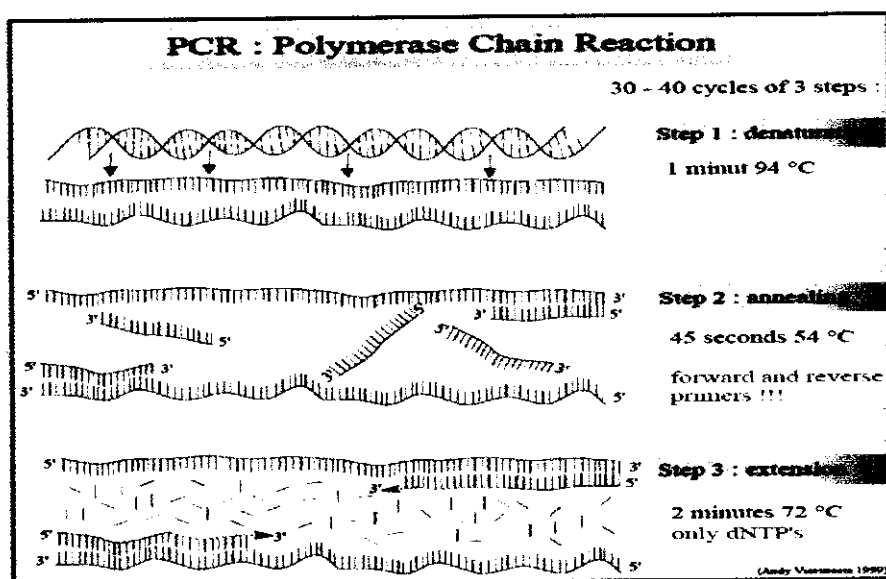
Outer membrane protein (OMP) Brucella spp pertama kali diidentifikasi pada awal tahun 1980 dan diklasifikasikan menurut masa molekulernya (Salehi *et al.*, 2006). *Outer membrane protein (OMP)* bakteri Gram negatif merupakan antigen potensial yang dapat secara langsung menginduksi respon imun spesifik humoral yaitu sel limfosit B sehingga lebih cepat memacu terbentuknya antibodi (Forestier *et al.*, 2005). Protein ini juga berperan dalam menunjukkan sifat imunogenik pada berat molekul tertentu (Jawetz *et al.*, 2002). *Outer membrane protein (OMP) Brucella abortus* telah banyak diteliti dalam usaha mendapatkan antigen yang dapat diandalkan baik untuk diagnosis maupun untuk vaksin

terhadap Brucellosis. *Outer membrane protein* (OMP) yang diekstraksi secara kimiawi dari *Brucella* telah dideteksi dan diklasifikasikan menjadi tiga grup dengan berat molekul berkisar dari 88 sampai 94 kDa (grup I), 36 sampai 38 kDa (grup II), 31 sampai 34 dan 25 sampai 27 kDa (grup III). Protein membran luar dengan berat molekul 25 dan 31 kDa merupakan epitope permukaan (*antigenic determinant*) imunogenik dan protektif (Mariyon *et al.*, 1998). Menurut Cloeckart *et al.*, (1999) *outer membrane protein* (OMP) dengan berat molekul antara 25 sampai 27 kDa, 31 sampai 34 kDa dan 36 sampai 38 kDa merupakan protein yang imunogenik pada ternak sapi dan domba.

Telah diidentifikasi *outer membrane proteine* (OMP) lainnya dengan menggunakan antibodi monoklonal dan merupakan protein minor yaitu yang mempunyai berat molekul 10, 16,5, 19 dan 89 kDa. Semua protein tersebut diatas merupakan protein yang imunogenik pada sapi, domba dan kambing yang terinfeksi. Kuman *Brucella abortus* dapat dikategorikan secara fenotipik berdasarkan morfologi koloninya menjadi tipe halus (*smooth*) dan kasar (*rough*). Strain *Brucella abortus* yang halus (*smooth*) pada LPS nya mengandung komponen rantai O perosamin. Rantai O perosamin ini merupakan O antigen, sedangkan pada tipe yang kasar (*rough*) O antigen tidak terekspresi (Vemulapalli *et al.*, 2006). Sedangkan menurut Bowden *et al.* (1995), antigen membran luar pada *Brucella* spp yaitu lipopolsakarida yang *smooth* (*S-LPS*) atau *rough* (*R-LPS*) dan *outer membrane proteine* (OMP).

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) pertama kali ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1986. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu teknik yang dipakai untuk melipatgandakan asam nukleat (DNA atau RNA) secara in vitro dengan enzimatis di dalam suatu mesin pengubah yang dikenal dengan Thermocycle. Proses pelipatgandaan DNA ini terjadi melalui tiga tahapan yaitu denaturasi, annealing dan ekstensi (Rantam, 2007)



Gambar 2.5. Tahap-Tahap Pelipatgandaan DNA. Sumber: Erlich (1991)

Tahap denaturasi dilakukan pada suhu sekitar 92°C untuk menguraikan rantai ganda menjadi rantai tunggal. Kemudian dilanjutkan dengan tahap annealing dengan suhu sekitar 37°C – 65°C. Pada proses ini primer menempel pada daerah spesifik DNA template. Proses ekstensi dilakukan pada suhu 72°C yang dimaksudkan untuk penambahan enzim *Taq* DNA *polymerase* sehingga primer akan disambung dengan nukleotid dNTP dan terbentuk rantai nukleotida yang lebih panjang (Suwarno, 2007).

2.6 Komponen Polymerase Chain Reaction (PCR)

Tiap reaksi polimerisasi membutuhkan komponen-komponen sintesis DNA seperti untai DNA yang akan digunakan sebagai cetakan (templat), molekul oligonukleotida untai tunggal dengan ujung 3'-OH bebas yang berfungsi sebagai prekursor (primer) spesifik, sumber basa nukleotida berupa empat macam dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), enzim DNA *polymerase*, buffer PCR, ion Mg^{2+} , dan thermal cycler (Fatchiyah, 2006; Susanto, 2008).

2.6.1 Primer

Suwarno (2005) menyebutkan bahwa proses *polymerase chain reaction* (PCR) memerlukan sekurang-kurangnya 2 macam primer, yakni primer *forward* dan primer *reverse*. Masing-masing primer merupakan suatu rantai nukleotida, mempunyai urutan nukleotida yang berpasangan dengan nukleotida dan mengapit kedua ujung fragmen DNA yang diamplifikasi. Menurut Padmalatha dan Prasad (2006) dan Harini *et al* (2008) konsentrasi primer yang terlalu rendah atau yang terlalu tinggi menyebabkan tidak terjadinya amplifikasi. Rasio yang rendah antara primer dan DNA cetakan dapat menyebabkan produk PCR yang dihasilkan tidak konsisten (Ali *et al.*, 2006).

2.6.2 DNA Template

DNA template adalah DNA untai ganda yang membawa urutan basa fragmen atau gen yang akan digandakan. Urutan basa ini disebut juga urutan target (target sequence). Kemurnian DNA target sangat penting, karena ketidakmurnian suspensi DNA dapat mempengaruhi reaksi amplifikasi dan dapat menghambat kerja enzim DNA *polymerase* (Fatchiyah, 2006; Susanto, 2008).

2.6.3 Taq DNA Polymerase

Enzim ini bersifat thermostabil. Aktivitas polimerisasi DNANYa dari ujung-5' ke ujung-3' dan aktivitas enzimatik ini mempunyai waktu paruh sekitar 40 menit pada 95°C (Fatchiyah, 2006). Enzim ini diperlukan untuk menyambung primer dengan dNTP terhadap DNA *template*. Konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan penumpukan background product dan jika terlalu rendah menyebabkan tidak terbentuknya hasil (Suwarno, 2005).

2.6.4 Buffer PCR

Buffer standar untuk PCR tersusun atas 10-50mM Tris-HCL (pH 8,3-8,8 suhu kamar), 50mM KCL, 100µg/ml gelatin atau *bovine serum albumin* (BSA) dan 0,05-0,1% Tween-20 atau laureth-12 (Suwarno, 2005).

2.6.5 Nucleotides (dNTP)

Konsentrasi yang biasanya digunakan untuk setiap dNTP adalah 200 μM . Jumlah dNTP (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) harus sama untuk meminimalkan terjadinya kesalahan dalam pengikatan pasangan, menyediakan energi dan nukleotid untuk sintesis DNA. Konsentrasi yang tinggi akan menimbulkan ketidakseimbangan dengan enzim *polymerase*. Sedang pada konsentrasi rendah akan memberikan ketepatan dan spesifitas yang tinggi tanpa mereduksi hasil akhir (Fatchiyah, 2006; Suwarno, 2005).

2.6.6 Konsentrasi Mg^{2+}

Magnesium merupakan komponen yang penting dalam reaksi PCR dan mempengaruhi kualitas profil band yang dihasilkan. Magnesium mempengaruhi penempelan primer serta aktifitas enzim (Padmanatha dan Prasad, 2006). Konsentrasi Mg^{2+} yang rendah menyebabkan tidak munculnya beberapa band DNA serta intensitas band yang rendah pada produk PCR. Hal ini disebabkan rendahnya aktifitas *Taq polymerase* (Harini *et al.*, 2008). Konsentrasi Mg^{2+} yang tinggi juga mempengaruhi jumlah band yang dihasilkan dan mengakibatkan penurunan intensitas band tertentu. Penggunaan Mg^{2+} dengan konsentrasi lebih besar dari 1 mM dilaporkan dapat menghasilkan produk amplifikasi yang baik pada bakteri (Bassam *et al.*, 1992).

2.6.7 Thermal Cycler

Alat ini secara tepat meregulasi temperatur dan siklus waktu yang dibutuhkan untuk reproduibilitas dan keakuratan reaksi amplifikasi (Fatchiyah, 2006). Kegagalan PCR kebanyakan disebabkan denaturasi DNA *templat*/ produk PCR yang tidak sempurna (Suwarno, 2005).

2.7 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul di dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul (Pratiwi, 2001). Elektroforesis digunakan dengan tujuan untuk mengetahui ukuran suatu partikel DNA, RNA dan protein (Klug and Cummings, 1994).

Setelah siklus PCR tercapai sesuai dengan yang diinginkan, selanjutnya dilakukan pembacaan hasil amplifikasi DNA. Hal ini dilakukan dengan metode Agarose Gel Electrophoresis (AGE). Konsentrasi Agarose ditentukan oleh besarnya nukleotida dari DNA yang diamplifikasi. Untuk memperoleh gambaran yang lebih baik, semakin besar jumlah nukleotidanya maka semakin kecil konsentrasi Agarosanya. Dalam Agarose ditambahkan Ethidium Bromid, selanjutnya dibaca dengan iluminasi ultra violet (Nidom dan de Vries, 2007).

BAB 3

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorium yaitu melakukan deteksi *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* isolat lokal yang berasal dari sapi perah dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi serta Laboratorium Virologi dan Imunologi milik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, bulan Juli sampai dengan bulan Agustus 2010 . Pelaksanaan elektroforesis dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

3.3 Materi Penelitian

3.3.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah bakteri *Brucella abortus* dari Balai Besar Veteriner (BBV) Regional VII, Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan.

3.3.2 Bahan dan alat penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah DNAzol, ethanol 75%, ethanol absolut, NFW (Nuclease Free Water), NaOH, PCR bead dan primer gen OMP, agarose, ethidium bromide, buffer TAE, DNA marker dan buffer loading.

Alat yang digunakan meliputi : micropipet, tabung *eppendorf*, *laminar flow Hood*, *thermal cycler-PCR*, pipet, *microcentrifuge* (Beckman), *transilluminator-UV*, *gel electrophoresis apparatus* (Bio-Rad), vortex, *agarose electrophoresis apparatus* (Bio-Rad), *white tip*, tabung reaksi, *bulb*, tabung *erlenmayer*.

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Uji Biokimia

Sampel bakteri *Brucella abortus* yang diperoleh dari Balai Besar Veteriner (BBV) Regional VII, Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan diperiksa menggunakan uji biokimia yaitu uji katalase, uji urease, uji indol, uji sitrat, uji H₂S dan uji oksidase.

3.4.1.1 Uji Katalase

Koloni bakteri diambil dengan ose dan dilarutkan dengan aquadest di atas objek glass. Suspensi kemudian ditetesi dengan reagen H₂O₂, kemudian diamati apakah terbentuk gelembung udara.

3.4.1.2 Uji Urease

Koloni bakteri abortus ditanam pada media urease dengan cara di streak, kemudian diinkubasikan di dalam inkubator selama 24 jam. Setelah 24 jam diamati perubahan warna yang terjadi pada media urease.

3.4.1.3 Uji Indol

Koloni Bakteri *Brucella abortus* ditanam pada media *sulfide indol motility* (SIM) dan di inkubasi selama 24 jam, kemudian dilihat dengan reagen kovach, hasil positif apabila terbentuk cincin warna ungu pada media SIM.

3.4.1.4 Uji Citrate

Koloni bakteri abortus ditanam pada media *simons citrate agar* (SCA) dengan cara di streak, kemudian diinkubasikan di dalam inkubator selama 24 jam. Setelah 24 jam diamati perubahan warna yang terjadi pada media *simons citrate agar*.

3.4.1.5 Uji H₂S

Kertas saring dicelupkan pada reagen kemudian dimasukkan ke dalam agar miring yang berisi biakan bakteri *Brucella abortus* dan di inkubasi 24 jam. Hasil positif, kertas saring berubah warna menjadi hitam karena menangkap H₂S.

3.4.2 Isolasi DNA

Sebelum melakukan isolasi DNA total, terlebih dahulu sampel *Brucella abortus* diproses menjadi suspensi, yaitu dilarutkan dengan larutan phosphate buffer saline (PBS) sebanyak 10% dan suspensi kemudian dapat dipakai untuk isolasi DNA.

Suspensi *Brucella abortus* di ambil dengan pipet di masukkan dalam tabung *ependorf* ditambahkan dengan larutan DNAzol 1000 μ l kemudian dicampur menggunakan pipet dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 5 menit, dicampur menggunakan vortex setelah itu disimpan selama 2-15 menit pada suhu ruang. Campuran suspensi tersebut disentrifuge selama 10 menit pada suhu 4⁰C dengan kecepatan 10.000 rpm. Setelah disentrifuge, supernatan diambil sebanyak 500 μ l dan dipindahkan ke dalam tube *ependorf* baru kemudian ditambahkan 500 μ l ethanol absolut. DNA akan tampak melayang-layang dan disentrifuge selama 10 menit pada suhu 4⁰C dengan kecepatan 10.000 rpm akan mengendapkan DNA. Tahap terakhir adalah pencucian DNA dengan menambahkan 1000 μ l ethanol 75% dan disentrifuge selama 10 menit pada suhu 4⁰C dengan kecepatan 10.000 rpm. DNA dapat dikeringkan dengan membuang semua supernatan dengan hati-hati dan membiarkan tabung terbuka 5 menit, kemudian DNA dilarutkan dengan NaOH (pH 7,5) sebanyak 1 ml dan disimpan pada suhu 4⁰C.

3.4.3 Amplifikasi DNA dengan PCR

Proses amplifikasi DNA dengan teknik PCR. 5 μ l DNA yang telah dipanaskan dimasukkan ke dalam tube PCR bead, kemudian ditambahkan 2 μ l primer forward, 2 μ l primer reverse dan 16 μ l NFW sehingga total larutan berjumlah 25 μ l. Selanjutnya di- *spindown* dan dimasukkan ke dalam PCR *thermocycler* yang telah diprogram, denaturasi awal selama 45 detik pada suhu 95⁰C di ikuti dengan denaturasi selama 30 detik pada suhu 95⁰C, annealing selama

60 detik pada suhu 50°C, ekstension selama 60 detik pada suhu 72°C, sebanyak 35 siklus dan di akhiri dengan ekstension akhir selama 7 menit pada suhu 72°C. Selanjutnya produk PCR dimasukkan ke dalam es dan disimpan pada suhu -20°C sebelum dilakukan proses elektroforesis. Primer yang digunakan dalam amplifikasi dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 3.1 Primer yang digunakan untuk PCR OMP *Brucella abortus*

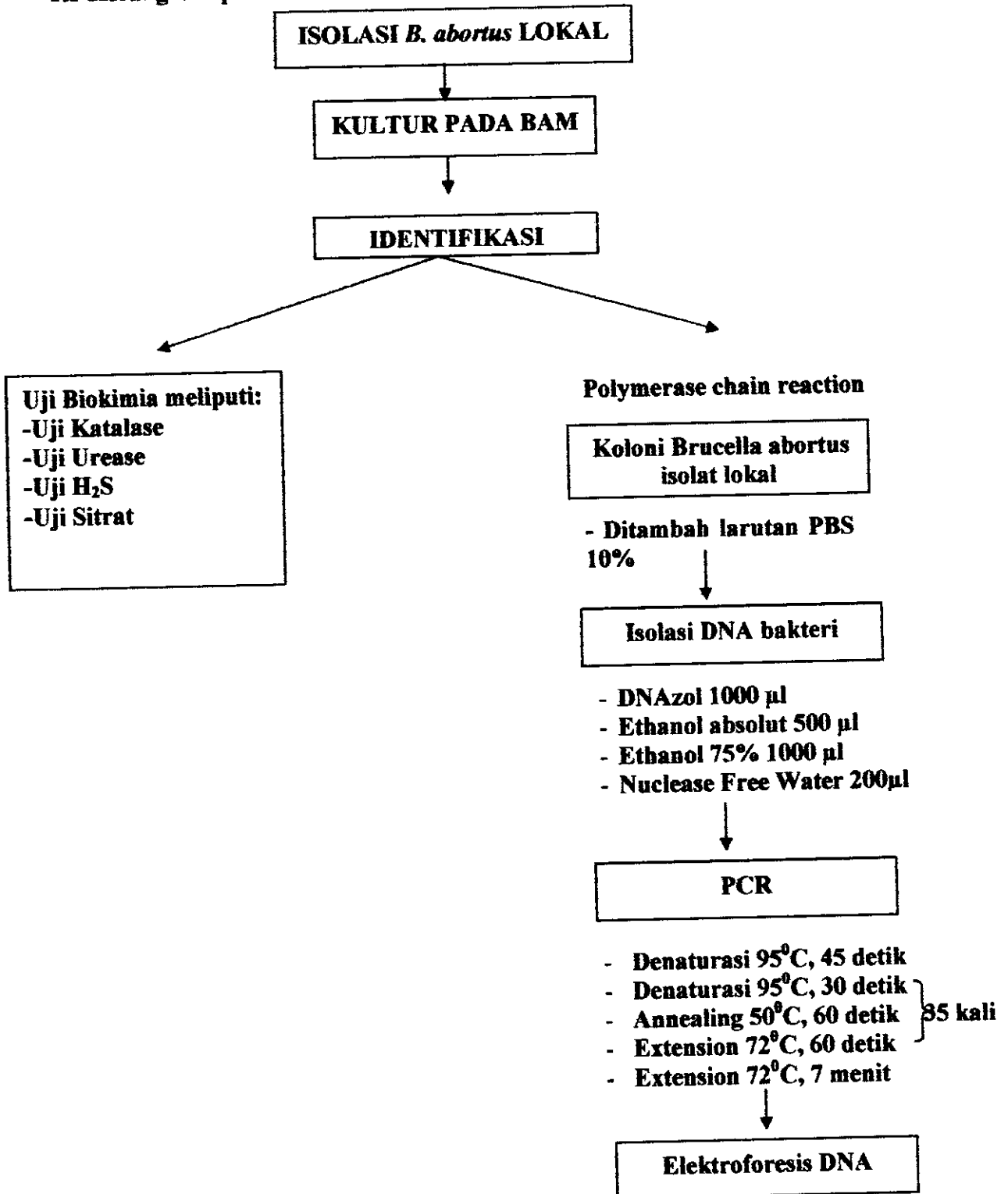
Nama	Sekuens	Kat
2ab5	5'-ACTGACGGATCCGCGCTCAGGCGGCCGACGCAA - 3'	Forward
2ab200	5'-ACTGACTTCGAAACCAGCCATTGCGGTTCGGTAC-3'	Reverse
Omp2a	5'-CCTTCAGCCAAATCAGAATG-3'	Forward
Omp2a	5'-GGTCAGCATAAAAAGCAAGC-3'	Reverse

Sumber : Salehi et al., (2006), Rincon *et al.*, (1997)

3.4.4 Elektroforesis Hasil PCR

Sebanyak 5µl DNA *Brucella abortus* ditambah dengan 2µl *buffer loading*, masukkan dalam agarose 2% yang mengandung ethidium bromide 1mg/ml untuk proses *running*. Hasil dapat divisualisasikan dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 302 nm. Elektroforesis DNA dilakukan untuk mengetahui panjang amplicon dari *Brucella abortus*.

3.5 Kerangka Operasional Penelitian



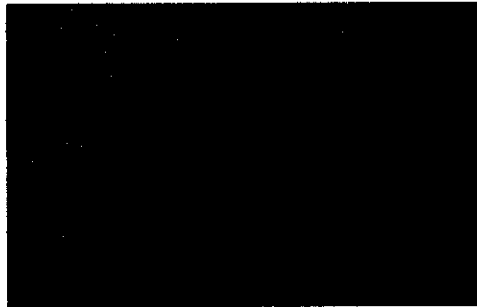
BAB 4

HASIL

BAB 4 HASIL

4.1 Uji Biokimia

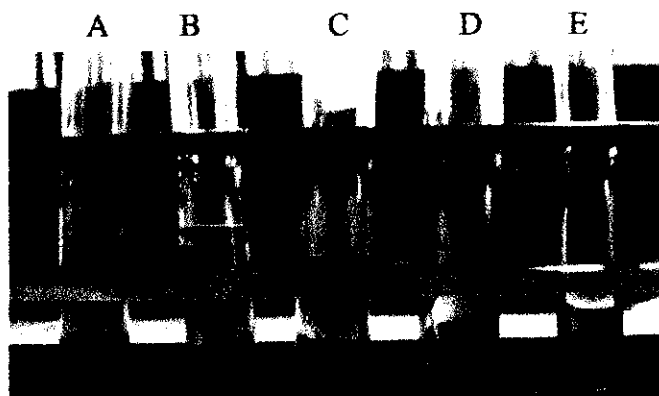
4.1.1 Uji katalase



Gambar 4.1.1 uji katalase(+) ada gelembung udara

Gambar di atas menunjukkan hasil positif dari uji katalase dimana terdapat gelembung udara

4.1.2 Uji citrate, indol dan urease



Gambar 4.1.2. tabung A uji citrate, tabung B dan C uji indol, tabung D dan E uji urease

Pada gambar di atas tabung A merupakan uji citrate yang hasilnya negatif ditandai dengan tidak ada perubahan warna pada media. Tabung B dan C uji indol

yang hasilnya negatif ditandai tidak terbentuknya cincin ungu pada tabung C sebagai media yang ditanami bakteri dibandingkan dengan tabung B sebagai kontrol. Tabung D dan E uji urease yang hasilnya positif pada tabung D dimana warna media berubah menjadi lebih merah dibanding tabung E sebagai kontrol.

4.1.3 Uji H₂S



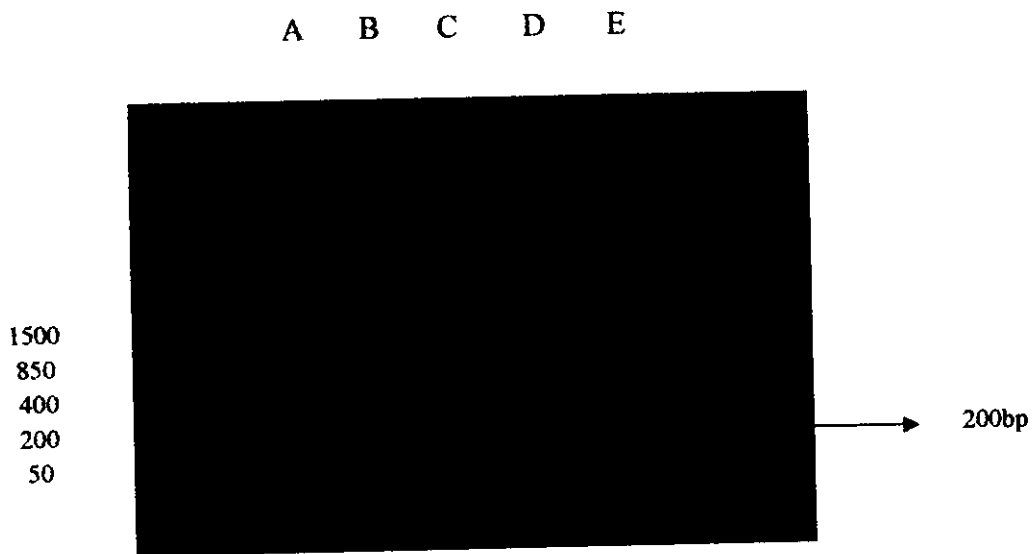
Gambar 4.1.3 tabung kiri reaksi(+) terbentuk warna kehitaman, tabung kanan kontrol

Gambar menunjukkan hasil positif dari uji H₂S dimana tabung sebelah kiri terdapat warna kehitaman sebagai tanda bakteri menangkap H₂S disbanding tabung kanan sebagai kontrol.

4.2 Amplifikasi DNA

Proses amplifikasi DNA dari bakteri *Brucella abortus* menggunakan primer 2ab5 sebagai primer *forward* dan primer 2ab200 sebagai *reverse* mampu menghasilkan gen *outer membran protein* (OMP) dengan panjang 200 basepairs(bp).

Hasil elektroforesis pada proses PCR dapat dilihat menggunakan sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 302 nm, panjang band dari *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* dapat di lihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 4.2 Hasil Amplifikasi OMP *Brucella abortus*
A, marker (1 kb DNA ladder); B-E, sampel *Brucella abortus*

Pada gambar di atas dapat dilihat pada kolom B sampai E panjang band dari *outer membrane protein Brucella abortus* menggunakan primer 2ab sebagai *forward* dan 2ab200 sebagai *reverse* menghasilkan panjang band 200 bp. Berdasarkan pada hasil di atas dapat diketahui panjang band *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* isolat lokal dengan panjang 200bp.

BAB 5

PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

Sifat bakteri *Brucella abortus* dalam uji biokimia biasanya dilihat dari interaksi metabolit-metabolit yang dihasilkan dengan reagen-reagen kimia. Selain itu dilihat kemampuannya menggunakan senyawa tertentu sebagai sumber karbon dan sumber energi (Waluyo, 2004).

Uji katalase adalah uji untuk mengetahui apakah bakteri mempunyai enzim katalase. Hasil positif dari uji katalase adalah terbentuknya gelembung udara hasil dari reaksi H_2O_2 dengan enzim katalase membentuk H_2O dan O_2 . Uji urease digunakan untuk mengetahui adanya enzim urease dari bakteri. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna medium menjadi merah ungu. Uji sitrat menggunakan media simons citrate agar (SCA). Uji ini untuk mengetahui kemampuan bakteri memanfaatkan natrium sitrat sebagai sumber karbon untuk keperluan hidupnya. Hasil positif apabila warna hijau media berubah menjadi biru. Uji H_2S menggunakan reagen Pb-Asetat 10%. Uji H_2S digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan H_2S (Hardijatno, dkk. 2005)

Uji indol biasanya digunakan dalam indentifikasi yang cepat. Hasil uji indol yang diperoleh negatif karena tidak terbentuk lapisan (cincin) berwarna merah muda pada permukaan biakan, artinya bakteri ini tidak membentuk indol dari tryptopan sebagai sumber carbon, yang dapat diketahui dengan menambahkan larutan kovacs. Asam amino triptofan merupakan komponen asam amino yang lazim terdapat pada

protein, sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh mikroorganisme akibat penguraian protein (Fardiaz, S. 1992.)

Brucella merupakan kuman gram negatif yang struktur dinding selnya lebih kompleks dari pada kuman Gram-positif yaitu mengandung *outer membrane protein* (OMP). Deteksi *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* dapat dilakukan dengan teknik PCR menggunakan pasangan primer yang sesuai.

Proses PCR didahului dengan isolasi DNA dari bakteri *Brucella abortus*. Isolasi DNA merupakan prosedur rutin dalam analisis molekuler. Isolasi DNA menggunakan bahan-bahan antara lain, DNAzol yang mengandung fenol dan guanidinisotiosianat, berfungsi untuk melisiskan sel dan mengikat DNA; Ethanol yang berfungsi untuk memisahkan fase cair dan fase organik; Ethanol 75% yang berfungsi sebagai larutan pencuci sekaligus sebagai bahan pengawet jika DNA akan disimpan dalam jangka waktu yang tertentu; Nuclease Free Water dan NaOH yang berfungsi sebagai bahan pelarut DNA (Suwarno, 2010).

Penelitian ini mengacu berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan Salehi *et al.*, (2006). Salehi *et al.*, 2006, menggunakan primer *omp2a* untuk amplifikasi gen *outer membrane protein* (OMP). Pada proses PCR ini denaturasi awal selama 45 detik pada suhu 95°C di ikuti dengan denaturasi selama 30 detik pada suhu 95°C, annealing selama 60 detik pada suhu 50°C, ekstension selama 60 detik pada suhu 72°C, sebanyak 35 siklus dan di akhiri dengan ekstension akhir selama 7 menit pada suhu 72°C. Hasil dari PCR diatas mampu menghasilkan panjang band 1100 bp.

Peneliti kemudian menggunakan primer dan program yang sama untuk proses PCR dengan isolat lokal yang berasal dari pinrang, akan tetapi setelah dilakukan elektroforesis tidak didapatkan band dari omp *Brucella abortus*. Hal ini karena ketidakcocokan primer sehingga tidak terjadi proses penempelan pada saat proses PCR. Kesalahan dalam proses pengerjaan PCR juga bisa menyebabkan kegagalan, kesalahan dapat terjadi pada saat pengenceran primer, penyetelan mesin termocycler yang tidak sesuai waktu dan suhu denaturasi, annealing maupun ekstension. Tidak menempelnya primer pada DNA cetakan secara sempurna, dapat diakibatkan karena tidak tepatnya konsentrasi komponen-komponen PCR (Padmalatha dan Prasad, 2006 ; Pharmawati, 2008).

Pada proses PCR peneliti menggunakan primer 2ab5 sebagai *forward* dan primer 2ab200 sebagai *reverse*. Proses PCR denaturasi awal selama 45 detik pada suhu 95°C di ikuti dengan denaturasi selama 30 detik pada suhu 95°C, annealing selama 60 detik pada suhu 50°C, ekstension selama 60 detik pada suhu 72°C, sebanyak 35 siklus dan di akhiri dengan ekstension akhir selama 7 menit pada suhu 72°C. Penggunaan primer 2ab5 dan 2ab200 dapat mengamplifikasi omp *Brucella abortus* dan menghasilkan panjang DNA 200 bp. Penelitian yang sama pernah dilakukan oleh Rincon *et al.*, (1997), dengan menggunakan primer yang sama. Penelitian yang dilakukan oleh Rincon *et al.*, menghasilkan panjang DNA 200 bp. Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa PCR dapat digunakan untuk deteksi OMP *Brucella abortus*. Selain itu dapat diketahui juga bahwa outer membran protein *Brucella abortus* bersifat spesifik pada setiap isolat dari berbagai daerah.

Penelitian tentang *outer membrane protein Brucella abortus* juga pernah dilakukan oleh Klevesaz *et al.*, (1995) di Mexico, dengan menggunakan primer spesifik lain yaitu JPF sebagai *forward* dan JPR sebagai *reverse*. Hasil dari PCR menghasilkan panjang DNA 193 bp. Berbeda dengan Klevesaz, Imaoka *et al.*, (2007) menggunakan primer JPF sebagai *forward* dan JPR-ab sebagai *reverse*. Hasil PCR panjang DNA yang dihasilkan 186 bp.

Suhu dan lamanya waktu denaturasi menjadi faktor penyebab terhadap keberhasilan dalam melipat gandakan DNA dengan PCR. Kondisi denaturasi pada umumnya yaitu berkisar 95⁰C selama 30 detik atau 97⁰C selama 15 detik. Penggunaan suhu denaturasi yang tinggi dan waktu yang terlalu lama memungkinkan untuk menurunkan aktivitas enzim *polymerase*. Sebaliknya jika suhu denaturasi yang rendah dan waktu yang terlalu singkat memungkinkan DNA yang telah terpisah menempel kembali sehingga mengurangi hasil amplifikasi, Rantam (2007),

Suhu annealing menjadi titik kritis terhadap proses penempelan primer terhadap template. Primer yang relatif mengandung sedikit G dan C (<50%) memerlukan suhu yang lebih rendah dari 55⁰C. Namun sebaliknya, jika primer yang relatif mengandung G dan C banyak diperlukan suhu yang lebih tinggi. Sama halnya dengan proses denaturasi, waktu juga menjadi dasar utama dalam proses annealing dan berkaitan erat dengan penentuan suhu annealing (Gelfand, 1989).

Lamanya waktu extension ditentukan oleh panjang target DNA yang akan dilipatgandakan dan suhu yang digunakan. Suhu ekstensi yang optimal adalah mendekati suhu untuk Taq DNA *Polymerase* yakni sekitar 72⁰C (Gelfand, 1989). Waktu ekstension 1 menit pada suhu 72⁰C biasanya cukup untuk melipatgandakan DNA dengan panjang 2 kb (kilobase) (Rantam, 2007).

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian deteksi outer membrane protein *Brucella abortus* isolat lokal dengan metode PCR, dapat disimpulkan bahwa:

- *Outer membrane protein (OMP) Brucella abortus* dapat di deteksi dengan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

6.2 Saran

Berdasarkan penelitian deteksi *outer membrane protein (OMP) Brucella abortus* isolat lokal dengan metode PCR, saran yang dapat diberikan berdasarkan penelitian ini adalah :

- Perlu penelitian lebih lanjut tentang *outer membrane protein (OMP) Brucella abortus* dari berbagai isolat di Indonesia sebagai bahan untuk pengembangan kandidat vaksin.

RINGKASAN

RINGKASAN

Nenli Prabowo. DETEKSI OUTER MEMBRAN PROTEIN *Brucella abortus* ISOLAT LOKAL YANG BERASAL DARI SAPI PERAH DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR). Penelitian ini di bawah bimbingan Sri Chusniati, drh., M.Kes selaku pembimbing pertama dan Dr. Abdul Samik, drh., M.Si selaku pembimbing kedua.

Penyakit brucellosis merupakan penyakit ternak yang menjadi problem nasional. Kecenderungan meningkatnya populasi dan lebih seringnya perpindahan sapi perah menjadi penyebab utama meningkatnya kasus brucellosis. Penyakit brucellosis, Bangs disease atau penyakit abortus pada sapi disebabkan oleh *Brucella abortus*. *Brucella abortus* mempunyai outer membrane protein dan LPS pada bagian permukaan luarnya.

Outer membrane protein (OMP) bakteri Gram negatif merupakan antigen potensial yang dapat secara langsung menginduksi respon imun spesifik humoral yaitu sel limfosit B sehingga lebih cepat memacu terbentuknya antibodi. *Outer membrane protein (OMP)* *Brucella abortus* telah banyak diteliti dalam usaha mendapatkan antigen yang dapat diandalkan baik untuk diagnosis maupun untuk vaksin terhadap Brucellosis.

Polymerase chain reaction (PCR) adalah suatu teknik yang dipakai untuk melipatgandakan asam nukleat (DNA atau RNA) secara *in vitro* dengan enzimatis di dalam suatu mesin pengubah yang dikenal dengan *Thermocycle*. Proses pelipatgandaan DNA ini terjadi melalui tiga tahapan yaitu denaturasi, *annealing* dan ekstensi.

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli sampai Agustus 2010. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bahwa metode PCR dapat digunakan untuk mendeteksi *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* isolat lokal.

Penelitian ini menggunakan bakteri *Brucella abortus* dari BBV regional VII, Maros Sulawesi Selatan. Bakteri *Brucella abortus* kemudian diekstraksi untuk memperoleh DNA. DNA hasil ekstraksi kemudian diampifikasi melalui proses PCR. Proses PCR denaturasi awal selama 45 detik pada suhu 95°C di ikuti dengan denaturasi selama 30 detik pada suhu 95°C, *annealing* selama 60 detik pada suhu 50°C, ekstension selama 60 detik pada suhu 72°C, sebanyak 35 siklus dan di akhiri dengan ekstension akhir selama 7 menit pada suhu 72°C.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa *Polymerase chain reaction* (PCR) dapat mendeteksi *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* isolat lokal dengan panjang band 200 bp.

Berdasarkan penelitian deteksi *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* isolat lokal dengan metode PCR, dapat disimpulkan bahwa *outer membrane protein* (OMP) *Brucella abortus* dapat di deteksi dengan metoda PCR dan disarankan menggunakan metode PCR sebagai sarana identifikasi *Brucella abortus* di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Akoso, B.T., 1996. *Kesehatan Sapi*. Kanisius . Jakarta.
- Ali. B.A., T.H. Huang, H.H. Salem, Q.D. Xie. 2006. *Influence of thermal cycler day-to-day reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprints*. *Biotechnology* 5: 324-329
- Alton, G.G., L. M. Jones, R.D. Angus and J.M. Verger, 1998. *Techniques for the Brucellosis*. INRA., Paris, French.
- Bassam, B.J., G. Caetano-Anolles, P.M. Gresshoff. 1992. *DNA amplification fingerprinting of bacteria*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 38: 70-76
- Boschiroli, M.L., V. Foulongne, D. O'Callaghan, 2001. *Brucellosis: a worldwide zoonosis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 58-64.
- Bowden, R.a., A. Cloeckaert, M.S. Zygmunt, S. Bernard and G. Dubray, 1995. *Surface Exposure of Outer Membrane Protein and Lipopolysaccharide Epitope in Brucella species Studied by Enzym-Linked Immunosorbent Assay and Flow Cytometry*, *Infection and Immunity J.* pp. 3945 – 3952.
- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Vizcaino N (1996) Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol Let* 145:1-8
- Crawford, R.P ., J .D. Huber and B.S. Adams. 1990 *Epidemiology and surveillance* . In : *Animal Brucellosis* . CRC Press . pp . 131 - 151 .
- Dwidjoseputro, D. 1995. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerbit Djambatan. Hal. 69-103, 118-120.
- Erlich, H.A. 1991. *Basic Methodology: In PCR Technology. Principles and Application for DNA Amplification*. Stockton Press. 1-5.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Gramedia Pustaka Utama: Jakarta
- Fatchiyah, S. Widyarti, E.L. Arumingtyas. 2006. *PCR, RT-PCR dan Real Time PCR*. <http://inherent.brawijaya.ac.id/biomol>. Diakses tanggal 8 Mei 2010.
- Forestier, C., E. Moreno, J. Pizarro-Cerda and J.P. Gorvel, 2005. *Lysosomal Accumulation and Recycling of Polysaccharide to the Cell Surface of Murine Macrophages, An in Vitro and in Vivo Study*. www.jimmunol.org/cgi/content/full/162/11/6784.

- Gelfand, D.H. 1989. *Taq DNA polymerase. In PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (H.A.Erlich, ed).* Stockton Press. New York. pp. 17-22.
- Gholami, K.H., 2000. *Brucellosis in pregnant woman.* Shiraz E-Med.J. 3(6): 1-3.
- Handijatno, E., Erni R. Sabar Iman, Wiwik Tyasningsih. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Veteriner 1.* Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya
- Hardjopranojoto, S., 1995. *Ilmu Kemajiran pada Ternak.* Airlangga University Press. Surabaya.
- Harini, S.S., M., Leelombika, M.N. Shiva Kameshwari, N. Sathyanarayana. 2008. *Optimization of DNA isolation and PCR-RAPD methods for molecular analysis of Uriginea indica Kunth.* International J. Integrative Biol. 2: 138-144
- Jawetz, E., J.L.Melnick and E.A. Adelberg, 2002. *Mikrobiologi untuk Profesi Kedokteran.* ECG. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Klavezas, D.S.L., I.O.M. Vasquez, A.L. Merino and J.P.M. Soriano, 1995. *Single-step PCR for Detection of Brucella spp. from Blood and Milk of Infected AniMals.* Clinical Microbiol. J. 33(12): 3087 – 3090.
- Klug, W. S., and M. R. Cummings. 1994. *Concepts of genetics.* 4th edition. Prentice Hall. Englewood cliffs. pp. xvi + 779.
- Kunkel, D., 2004. *Scientific Stock Photography of Biological.* <http://www.denniskunKel.com/DK/DK/bacteria/96554G.html>.
- Moriyón I, Gamazo C, and Ignacio López-Goñi, 1998. *Structure and properties of the outer membranes of Brucella abortus and Brucella melitensis.* INTERNATL MICROBIOL 1: 19-26
- Nazaruddin, S. 2009. *Dampak ekonomi kejadian brucellosis pada sapi perah di Indonesia.* Komunitas Koassistensi veteriner.
- Nidom, C.A, dan G.C. de Vries. 2007. *Isolasi DNA Prokariotik Untuk Amplifikasi Genom dengan Polymerase Chain Reaction.* Workshop Aplikasi PCR di Bidang Kesehatan dan Kedokteran. FKH Unair. Surabaya.
- Office de Intenational Epizootics (OIE), 2004. *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccine for Terrestrial Animals.* References Laboratories for Bovine Brucellosis. www.unau.es/microbial/Brucellosis2003_proceeding.pdf

- Padmalatha, K., M.N.V. Prasad. 2006. *Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India*. African J. Biotech. 5: 230-234
- Pharwati, Made. 2008. *Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada Grevillea spp. (PROTEACEAE)*. Jurnal Biologi XIII (1) : 12 -16
- Public Health Laboratory Network, 2004. *Brucellosis Laboratory Case Defenition*. Australian Government department of Health and Ageing. <http://www.dhac.gov.au/internet/wems/publishing.html>.
- Putra, A.A.G. dan Arsani, N.M. (2003) *Evaluasi tahun kedua pemberantasan brucellosis padasapi/kerbau di pulau Sumbawa: Data surveilanssampai dengan Desember 2003*. BuletinVeteriner XVI (64): 10-22.
- Pratiwi, R. 2001. *Mengenal Metoda Elektroforesis*. Oseana. Volume XXVI. Nomor 1 : 25-31.
- Quinn,P.J., B.K.Markey, M.E Carter, W.J.Domnelly and F.C.Leonar. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Publishing Great Britain.
- Rantam, F.A. 2007. *Dasar-Dasar Polymerase Chain Reaction*. Workshop Aplikasi PCR di Bidang Kesehatan dan Kedokteran. FKH Unair. Surabaya.
- Rincon, Ana M., Agnes Revol, Hugo A. Barera-saldana.1997. *Detection and differentiation of the Six Brucella Species by Polymerase Chain Reaction*. Departamento de Bioquimica, Facultad de Medicina, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey. Mexico
- Salehi,M., E.Pishva, R. Salehi, M. Rahmani, 2006. *Isolation of Brucella Using PCR-RFLP Analysis*. Iranian J. Publ. Health. 35(4): 22-27
- Subronto. 2003. *Ilmu Penyakit Ternak Mamalia*. Edisi II. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sudibyo,A., 1995. *Studi epidemiologi brucellosis dan dampaknya terhadap reproduksi sapi perah di DKI Jakarta*. JITV 1:31-36.
- Susan,M.N., 2006. *Brucellosis: Penyakit yang belum banyak dikenal di Indonesia*. Wartazda 16(1):31-39.
- Susanto, A.H. 2008. *Sekuensing DNA*. <http://www.biomol.wordpress.com/bahan-ajar/sekuensing-dna>

- Suwarno. 2005. Disertasi : *Karakterisasi Molekuler Protein Serta Gen Penyandi Nucleoprotein dan Glycoprotein Virus Rabies dari beberapa Daerah Geografik di Indonesia*. Program Doktor Ilmu Kedokteran. Program PascaSarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Suwarno. 2007. *Isolasi RNA/DNA untuk tujuan Identifikasi Fragment/Full Genom Organisme dengan Polymerase Chain Reaction. Workshop Aplikasi PCR di Bidang Kesehatan dan Kedokteran*. FKH Unair. Surabaya.
- Timoney J.H. and J.F.Gillespie, 1998. *Hagan and Bruner's Infectious Disease of Domestic Animals*. 8thEd. Comstock Publ. Assoc. , Cornell University Press. Ithaca, London. Hal 127-140.
- Tizard, I. 1988. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Edisi Kedua. Diterjemahkan oleh Dr. Masduki Partodiredjo, cs. dan Dr. Soehardjo Hardjosworo. Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 10-12
- Toelihere, Mozes R. 1985. *Ilmu Kebidanan Pada Ternak Sapid an Kerbau*. UI Press. Jakarta.
- Utomo,B dan Ratnasari,R., 2008. *Identifikasi dan Karakterisasi Outer Membrane Protein imunogen Brucella abortus S-19 sebagai Antigen Pembuatan Kitt Diagnostik Spesifik*. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Vemulapalli,T.H., R. Vemulapalli, G.G. Schurig, S.M. Boyle, and N.Sriranganathan, 2006. *Role in Virulence of Brucella abortus Protein Exhibiting Lectin-Like Activity*. *Infection and Immun.* J. 74(1):183-191.
- Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Universitas Muhamadiyah Malang: Malang
- World Health Organization. 1971. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Fifth Report*. Geneva. Hal 37-47.

LAMPIRAN

LAMPIRAN

Susunan nukleotida outer membran protein *Brucella abortus*. Sumber NCBI

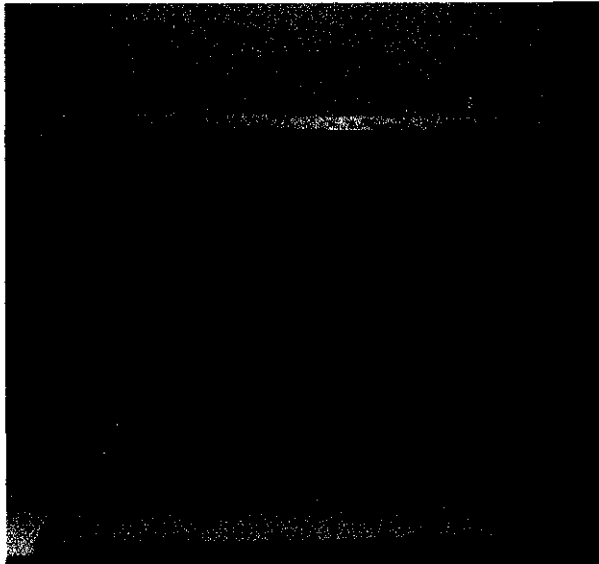
```

1 caggggatct tccgagacc ctgtagaaag actgcggtca gcataaaaag caagcatctg
61 atgctgcacg agggcaacaa aaaaccggc atttctgccg ggtttctgta tccaatccgt
121 aatggattag aacgaacgct ggaagcgaac gataccgcc caageattgt cttcagcaac
181 ggtgttcttc cactcgccac caaacttggg ttaggaaact tccggcgtaa cgggtaagcc
241 aggaaccagt tcgtaagcaa cgtagccgt aactgccgtc ttgccccagt cgcatgcgc
301 agcctgcagg ttgaaggcag ctttctgctg agcctgatac ttcagaccac cccagacagc
361 ccaatcgccg ccccaactggc cgtagttctg atccggcgta gcagcggacg aatatgcgcc
421 ctgcaaccaa accgagaact ggtcgggtgat gttgacgtcg ccacgaacct tggcagccca
481 ttcttcgatg accgagtcac aggcaacaac accagcgtc gaaccccagc cggcagcata
541 cttcaggccg ccaacaacgt caggcatgta gccgtcgatg ttgtagttgg tcgtgccagt
601 gtaaccaccg tcgttgctgc caccctgttc gagagcgtc acagccgaga agcgtttcc
661 gccagtgaag gtgtacgaga tcttgccggg gcggtaggag ccagccgaga tcacgtcacc
721 gttgatgaca tcgccgaggt aaccggtgaa ggtatggaat tccgattcat cgataccaac
781 gcgcagacca ccgagctgga taccgcgaa ctccatgacg gtgccgctgc tggtttcatt
841 accatattta ccatctacgc ccgaattgtt cgcagcatag ttgaagcgca gttcggtgaa
901 ggtcttgagg gtgccgagtt cggtttccga accggtggaa acgcgagtg cgaaacgagc
961 gctcttgctc cagccattgc ggtcgggtacc ggagtaaacg tcatcgccgc cctttacgtc
1021 gtaacggacg taaccatgga cgcgcaggca gtttccggtg cccggaatgt agaagtagcc
1081 agcggcgtaa gcgtcgcaaa cgcggacata ttcaacggct tcgggctctg gcgcgacgat
1141 tgcgctggca gcctgagcgc cggagctgc aaccagagct gcagcggagc caaggagaag
1201 gctcttgatg ttcatttctg acctccagtc aaagttaaaa atgggtctgg gcattctgat
1261 ttggctgaag gacaacctgt ccccatcccc taattgaaa agtcgccccg aagcgtctct
1321 tcttctgaaa gtgaagatac tcgccattt attcgtttca acatcgaata tgttctcaca
1381 acctttatgg tgctgctatg aagggcagtt gttgcagaaa tgacacgaaa ttacctgctt
1441 tagctcggcg gattcatgct ttattaacat aagtgaacgc gaattaaccg atgttaacgt
1501 ttgaaaatgc aagtttttta ggatcgctc cagaataaag ccgcaatct ttcgtcgaaa

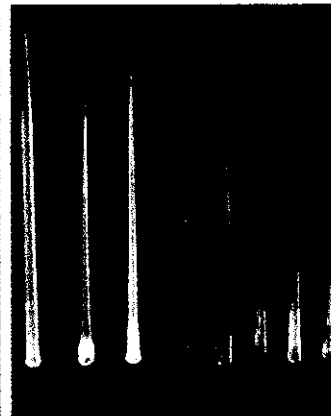
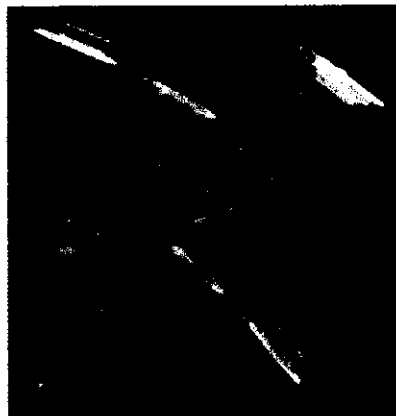
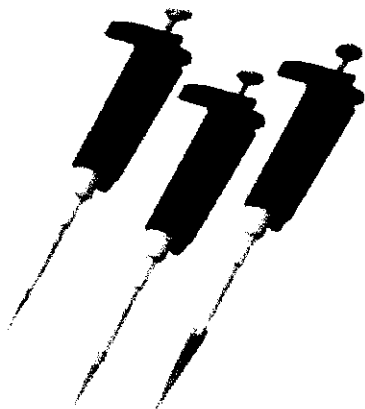
```

1561 cagcccttaa cggaatatgt cggcaagggtg gcaagaatcg tctgaacgga gagcagaaac
 1621 ctcgaaatccg tttcatttaa taagggcaag tgcgtgccgg tgctaaattg tgggcctttt
 1681 taagcgcgcc atatatataa agagaataat ccgcaggaaa tttaccagt taatgcgtaa
 1741 atcgcttgaa atgcccaggc gtaccgggta tctcgcttt accggagagg tggccgagtg
 1801 gtcgaaggcg cccccctgct aaggggagtag acctcaaaag ggtctcgtgg gttcgaatcc
 1861 catcctctcc gccagttttt ccaatatccc agcaaattctt tatgtgttcg acgcgcttga
 1921 tttcatacgg aatcggtttt taccctcgc gcaactgaatc tctgttttc caggctacga
 1981 atccagaaaa caagcaagcc attgataagt aatggtatt caaaattctg gcgattcttg
 2041 actggaggtc agaaatgaac atcaagagcc ttctccttg ctcgcgtgca gctctggttg
 2101 cagcttccgg cgctcaggct gccgacgcaa tcgtcgcgcc agagcccga gccgttgaat
 2161 atgtccgctg ttgcgacgct tacggcgctg gctacttcta cattccgggc accgaaacct
 2221 gcctgcgctg ccatggttac gtccgttacg acgtaaaggg cggcgatgac gtttactccg
 2281 gtaccgaccg caatggctgg gacaagggcg ctcgtttcg actcatgttc aacacgaatt
 2341 cggaaaccga actcggcaca ctcggcacct atactcagct gcgcttaac tacaccagca
 2401 acaattcagc tcatgatggc caatacggcg atttcagcga tgatcgtgat gtcgctgatg
 2461 gcggcgtaag caccggcacc gatctgcagt ttgcatatat cacgcttggg ggtttcaagg
 2521 ttggtatcga cgaatccgaa ttccatacct tcaccggta cctcggtgat gtcatacagc
 2581 atgatgtcgt cgctgctggc tectaccgca ccggcaagat cgctacacc ttcaccggcg
 2641 gaaacggctt ctcggtctgt atcgctctcg aacagggtgg cgaagacgtt gacaacgatt
 2701 acacgatcga cggttacatg ccgcacgttg ttggcggcct gaaatatgct ggcggctggg
 2761 gttcgategc tgggtttggt gcctatgact cggtcacga agaattggct acaaagggtc
 2821 gtggcgacgt caacatcacc gaccggttct cggtatggct gcagggcgca tattcgtccg
 2881 cagcgacgcc gaaccagaac tacggtcagt gggcgggcga ttgggctgtc tggggtggtg
 2941 caaagttcat tgccccgaa aaggcaacct tcaatctgca ggctgcgcat gacgactggg
 3001 gcaagacgcg agttaccgcc aacgtcgtt atcagctcgt tccggattc accattacgc
 3061 cggaaagttc ctacaccaa tttggtggcg agtgaaaga caccgttct gaagacaatg
 3121 cctggggcgg tategttcgc ttccagcgt cgttctaac agatcgacgt taagcatagg
 3181 gcgccaacgg ttccccgttg gcgccggttc attgaaaca gcgttcacga aagcgtgaga
 3241 atcgattctt ccggaatggg gattccaggc ggatcgacaa ttgagggaaat tgccgggacg
 3301 acaaaaagct gggggcaacc ggggggtctt gtaaaggatt gagccaa

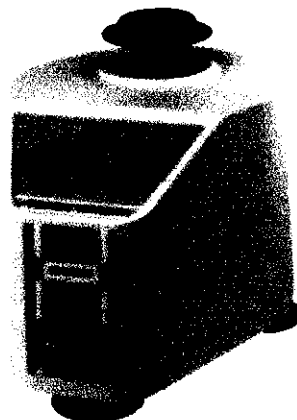
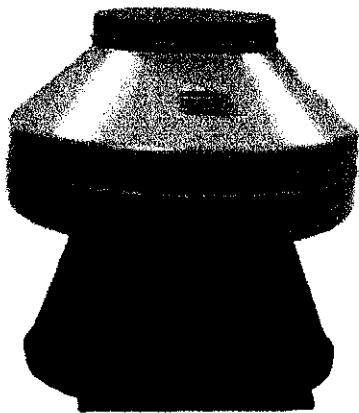
1. Laminar flow digunakan pada saat isolasi DNA



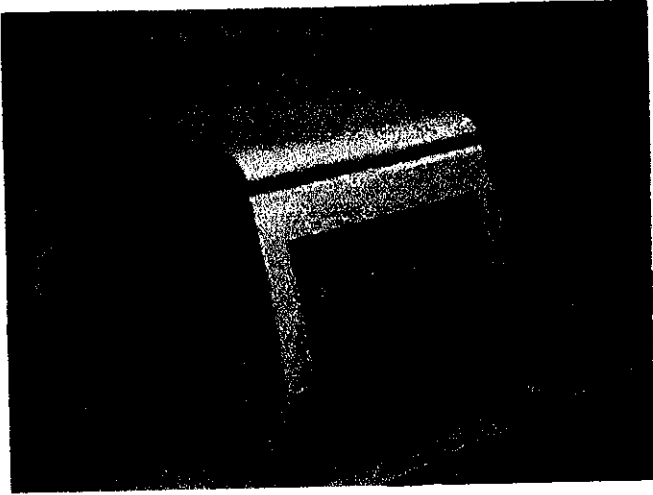
2. Micropipet, microtube, blue tip, yellow tip, dan white tip



3. Sentrifuge dan vortex digunakan untuk homogenizer pada isolasi DNA



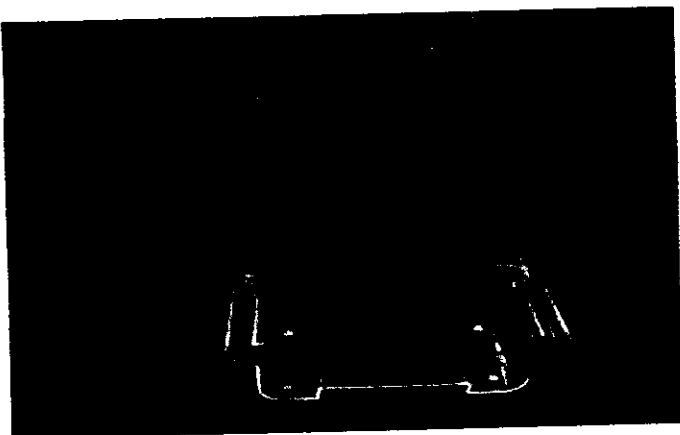
4. Microcentrifuge digunakan untuk isolasi DNA



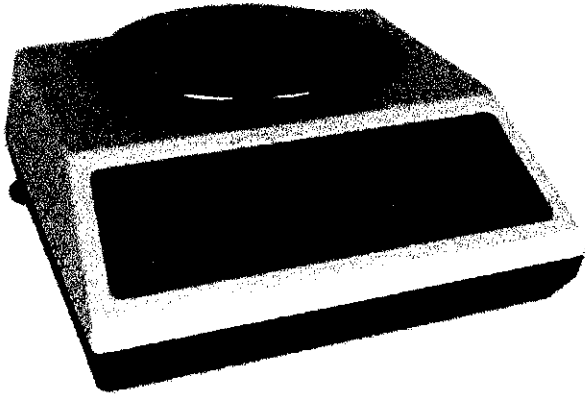
5. Thermocycler digunakan dalam proses pelipatgandaan DNA pada PCR



6. Elektroforesis chamber dan power supply untuk elektroforesis hasil PCR



7. Timbangan digital untuk menimbang gel agarose



8. Transiluminator UV untuk memvisualisasikan DNA hasil PCR

