

**IDENTIFIKASI PROFIL *OUTER MEMBRAN PROTEIN*
Brucella abortus STRAIN 19 DENGAN
MENGUNAKAN METODE SDS-PAGE**

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



Oleh

ANTONIUS UMAR SAMSUDIN
NIM 060413286

Menyetujui
Komisi Pembimbing

(Wiwik Misaco Yuniarti, M.Kes, drh)
Pembimbing pertama

(M. Gandul Atik Yuliani, M.Kes, drh)
Pembimbing kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

**IDENTIFIKASI PROFIL *OUTER MEMBRAN PROTEIN*
Brucella abortus STRAIN 19 DENGAN MENGGUNAKAN
METODE SDS-PAGE**

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 tertulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, Juni 2008

Antonius Umar Samsudin
NIM 060413286

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 1 Juli 2008

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

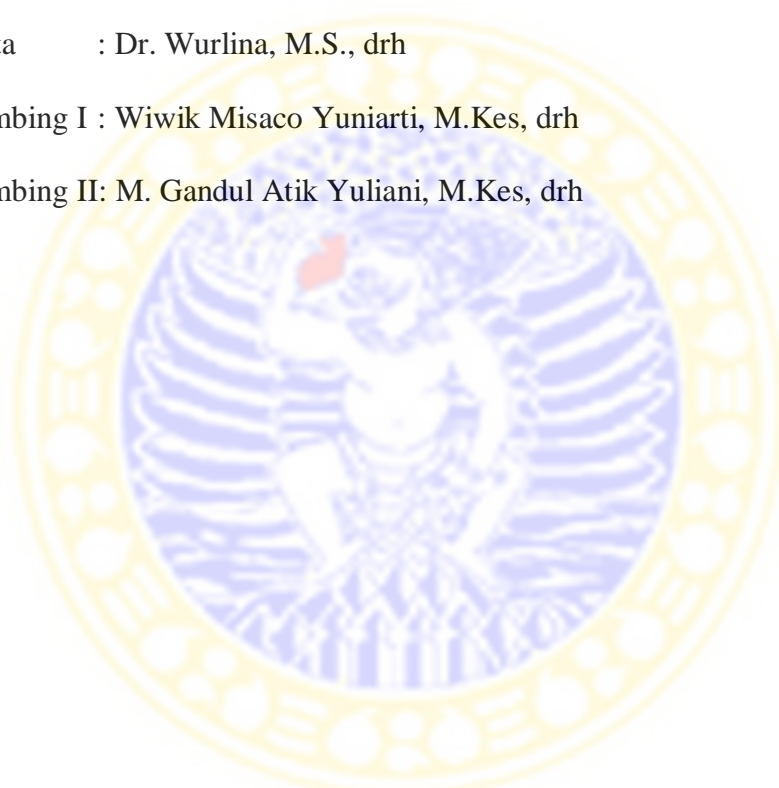
Ketua : Rr. Ratih Ratnasari, S.U, drh

Sekretaris : Nanik Sianita, S.U, drh

Anggota : Dr. Wurlina, M.S., drh

Pembimbing I : Wiwik Misaco Yuniarti, M.Kes, drh

Pembimbing II: M. Gandul Atik Yuliani, M.Kes, drh



Telah diuji pada

Tanggal : 18 Juli 2008

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

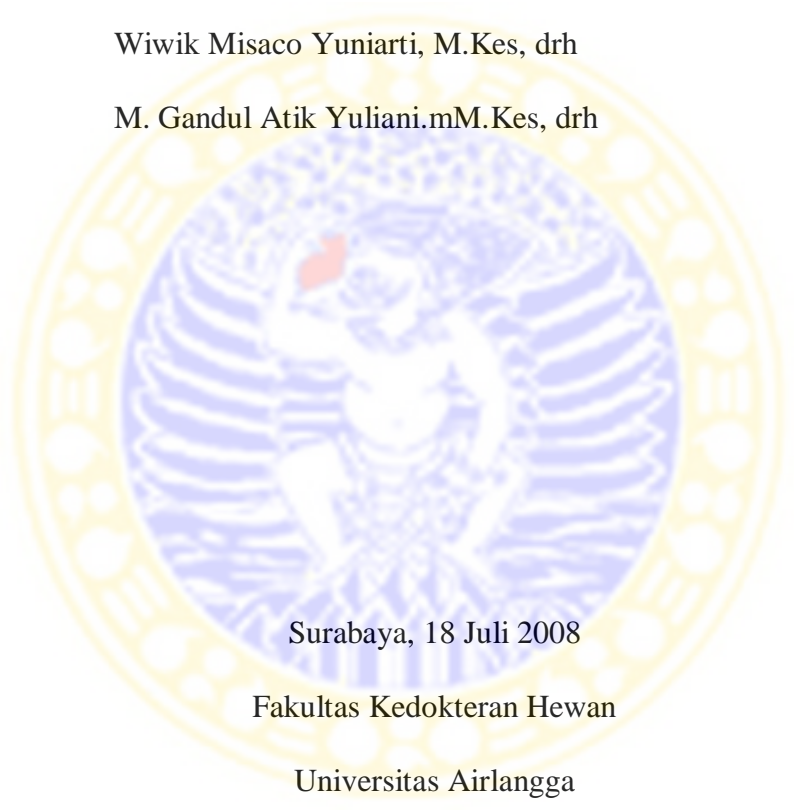
Ketua : Ratih Ratnasari, S.U, drh

Anggota : Nanik Sianita, S.U, drh

Dr. Wurlina, M.S, drh

Wiwik Misaco Yuniarti, M.Kes, drh

M. Gandul Atik Yuliani.mM.Kes, drh



Surabaya, 18 Juli 2008

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan

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

NIP. 130 687 305

**IDENTIFICATION THE PROFILE OF OUTER MEMBRAN PROTEIN
BRUCELLA ABORTUS STRAIN 19 USING SODIUM DODECYL
SULPHATE POLY ACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS
(SDS-PAGE)**

Antonius Umar Samsudin

ABSTRACT

The aim of this research was knowing the profiles of outer membran protein *Brucella abortus* strain 19 by using Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Beside the purpose, it could be the basic research that use in immunogenic serodiagnostic test toward *Brucella abortus* strain 19.

Brucella abortus strain 19 isolate was obtained from Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Isolation of *Brucella abortus* strain 19 was cultured on *Potato Agar* and was incubated at 37⁰C for three days. *Brucella abortus* strain 19 was cultured on *Tryptone Soya Agar* (TSA) and *Blood Agar* (BA) for purity and identification by microscopic examination and biochemical test.

Fractination process to get Outer Membran Protein (OMP) by using sonication technique with ultrasonic homogenizer 25.000 Hz 3x3 minutes with one minute interval.

Brucella abortus strain 19 isolates was analysed by SDS-PAGE based on molecular weight in kDa. That analysis showed eight band proteins of *Brucella abortus* strain 19 with molecule weight of 55.3 kDa; 44.5 kDa; 38.2 kDa; 30.5 kDa; 24.4 kDa; 21.9 kDa; 20.3 kDa and 14.7 kDa.

Key words: *Brucella abortus*, Outer Membran Protein, SDS-PAGE.

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kepada Tuhan YME, atas berkat dan rahmat serta karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi penelitian dengan judul **Identifikasi Outer Membran Protein Brucella abortus Strain 19 Dengan Menggunakan Metode SDS-PAGE** Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

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

Dosen pembimbing pertama Wiwik Misaco Yuniarti, M.Kes, drh dan dosen pembimbing kedua M. Gandul Atik Yuliani, M.Kes, drh atas bimbingan, saran serta dorongan moril maupun materiil yang tidak ternilai harganya kepada penulis serta perhatian dan kesabaran selama membimbing penulis sehingga terselesaikannya skripsi ini.

Dosen penguji Rr. Ratih Ratnasari, SU, drh, Nanik Sianita, SU, drh dan Dr. Wurlina, M.S., drh yang telah memberi banyak masukan demi kebaikan dalam penulisan.

Retno Bijanti, M.S., Drh selaku dosen ketua penelitian beserta tim DIP A PNPB yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk mengambil bagian dalam penelitian ini.

Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan, Kepala Laboratorium Forensik Tropical Disease and Research Center (TDC) Universitas

Airlangga, Kepala Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya atas pemanfaatannya sebagai sarana dalam penelitian.

Ucapan terima kasih juga penulis ucapkan kepada orangtua Therina Itawatie atas segalanya baik itu semangat maupun doa yang senantiasa tercurah sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

Terima kasih penulis ucapkan kepada sahabat, teman-teman satu tim penelitian, Katerine, Desty, Nova, sahabat tercinta Cindy, Fari, Ocha, Ahmaraning, Novi, Hartanta, Antok, serta teman – teman seangkatan 2004 yang tidak dapat disebut satu persatu atas segala bantuan, dorongan, serta saran yang sangat berarti.

Akhirnya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini, penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga. Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu saran dan kritik yang membangun dari berbagai pihak sangat diharapkan. Walaupun demikian, semoga hasil – hasil yang akan dituangkan dalam skripsi ini, dapat bermanfaat bagi pengembangan dunia kedokteran hewan di Indonesia.

Surabaya, Juni 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN IDENTITAS.....	iv
ABSTRACT	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang masalah.....	1
1.2 Rumusan masalah	4
1.3 Landasan teori	4
1.4 Tujuan penelitian	6
1.5 Manfaat penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 <i>Brucella abortus</i>	8
2.1.1 Taksonomi dari <i>Brucella abortus</i>	8
2.1.2 Outer Membran Protein <i>Brucella abortus</i> s-19	10
2.2 <i>Brucellosis</i>	11
2.2.1 Penyebab <i>Brucellosis</i>	13
2.2.2 Gejala klinis <i>Brucellosis</i>	13
2.2.3 Kejadian <i>Brucellosis</i>	15
2.2.4 Diagnosis penyakit <i>brucellosis</i>	16
2.2.5 Penularan <i>Brucellosis</i>	17
2.2.6 Terapi antibiotik terhadap <i>Brucellosis</i>	18
2.2.7 Kerugian ekonomis karena penyakit <i>Brucellosis</i>	19
2.3 Sodium Dodecyl Sulfat Poly Acrilamide Gel Electrophoresis	20
BAB 3 MATERI DAN METODE.....	23
3.1 Tempat dan waktu penelitian	23
3.2 Materi penelitian.....	23
3.2.1 Alat dan bahan penelitian	23
3.3 Metode penelitian	23

3.3.1	Isolasi dan identifikasi <i>Brucella abortus</i>	23
3.3.2	Pemisahan outer membran protein (OMP) <i>Brucella abortus</i> strain 19 dengan menggunakan teknik sonikasi	24
3.3.3	Analisis protein dengan teknik SDS-PAGE.	24
3.4	Kerangka Operasional.....	27
BAB 4	HASIL PENELITIAN	28
4.1	Isolasi dan identifikasi <i>Brucella abortus</i>	28
4.2	Analisa Outer Membran Protein <i>Brucella abortus</i>	29
BAB 5	PEMBAHASAN	31
5.1	Isolasi dan Identifikasi <i>Brucella abortus</i>	31
5.2	Profil Outer Membran Protein dari <i>Brucella abortus</i> dengan metode SDS-PAGE	32
BAB 6	KESIMPULAN DAN SARAN	36
6.1	Kesimpulan.....	36
6.2	Saran	36
	RINGKASAN	37
	DAFTAR PUSTAKA.....	38
	LAMPIRAN	42



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Analisis protein <i>Brucella abortus</i> berdasarkan berat molekulnya	30



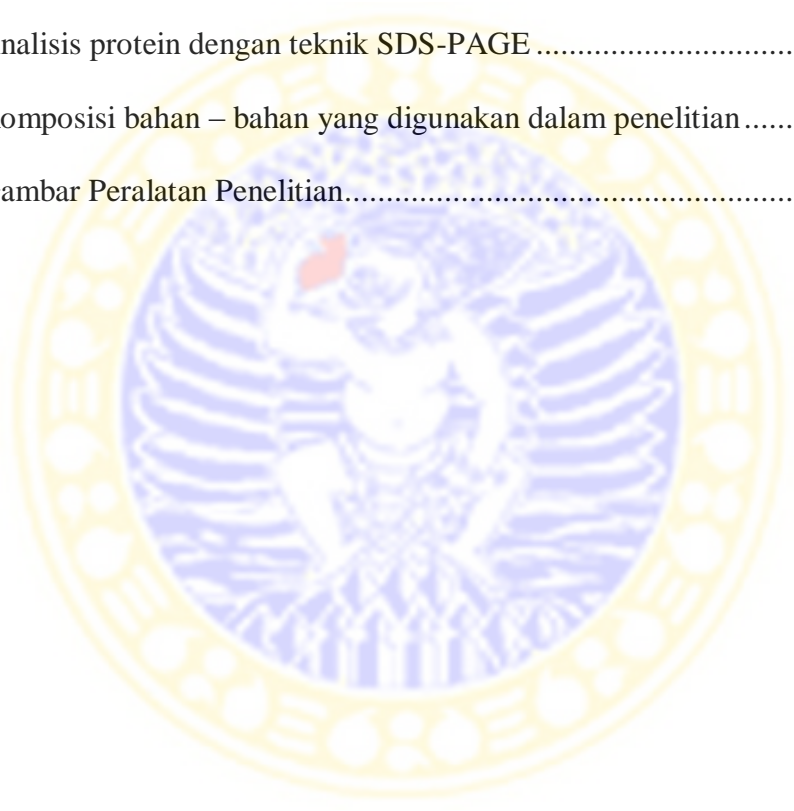
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Foto electron <i>Brucella abortus</i> strain 19.....	10
2.2 Model kuman gram negatif.....	10
4.1 Biakan <i>Brucella abortus</i> pada media <i>Blood Agar</i> dan <i>TSA</i>	28
4.2 Gambaran mikroskopis <i>Brucella abortus</i>	28
4.3 Analisis protein <i>Brucella abortus</i> dengan SDS-PAGE.....	30



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan Massa Molekul Relatif (MR) <i>Brucella abortus</i> strain 19 menggunakan cara regresi <i>cubic</i>	42
2. Teknik Isolasi dan Identifikasi <i>Brucella abortus</i> S-19.....	45
3. Pembuatan OMP <i>Brucella abortus</i> S-19	50
4. Analisis protein dengan teknik SDS-PAGE	51
5. Komposisi bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian	52
6. Gambar Peralatan Penelitian.....	54



DAFTAR SINGKATAN

APS	: Amonium Persulphat
BA	: Blood Agar
BM	: Berat Molekul
CFT	: Complement Fixation Test
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IB	: Inseminasi Buatan
IM	: Intra Muscular
IV	: Intra Vena
KDa	: Kilo Dalton
LPPH	: Lembaga Penyelidikan Penyakit Hewan
MR	: Molekul Relatif
PA	: Potato Agar
PBS	: Phospat Buffer Saline
RBT	: Rose Bengal Test
SAT	: Serum Agglutination Test
SCA	: Simon Citrate Agar
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamid Gel Electrophoresis
SIM	: Sulfite Indol Motility
TEMED	: tetramethylendiamine
TSA	: Triptone Soya Agar

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang masalah

Pulau Jawa merupakan wilayah yang memiliki jumlah hewan ternak yang cukup besar. Diantara hewan ternak tersebut sebagian besar merupakan sapi perah dan sapi pedaging. Dengan demikian produksi yang dihasilkan di pulau Jawa sebagian besar berupa produk olahan bahan asal sapi. Kendala yang sering dihadapi adalah penurunan populasi ternak yang dapat disebabkan oleh berbagai penyakit seperti *downer cow syndrome*, *grass tetani*, *milk fever*, *brucellosis* dan sebagainya. *Brucellosis* dapat menyebabkan penurunan produksi susu pada sapi perah yang terinfeksi. Penyebab penurunan produksi susu pada sapi perah selain karena *brucellosis* juga dapat dikarenakan pemberian ransum pakan yang kurang baik, yang menyebabkan defisiensi mineral (Moncoulont; 2001).

Kejadian *brucellosis* yang menyerang hewan ternak dalam suatu daerah atau lingkungan peternak memberi dampak sosial-ekonomi. Kerugian ekonomis yang ditimbulkan adalah penurunan produksi ternak, penurunan produksi susu, kematian pada anak sapi, induk sapi yang terpaksa dipotong dan penularan penyakit yang sangat cepat dari hewan yang terinfeksi. *Brucellosis* dapat menyebabkan gangguan dalam lingkungan sosial karena mampu mempengaruhi kesehatan masyarakat karena sifatnya yang zoonosis (Kompas, 2006).

Vaksinasi *Brucellosis* dilakukan untuk mengendalikan bakteri patogen *Brucella abortus* yang dapat menyebabkan *bovine brucellosis* yang menimbulkan kerugian ekonomi secara luas karena dapat menyebabkan abortus pada hewan terinfeksi, kelemahan pada hewan ternak, penurunan produksi susu dan kemajiran

pada ternak yang berada di daerah infeksi (Edmondson, 1996). Sedangkan vaksin yang secara luas digunakan adalah vaksin hidup yang berasal dari *Brucella abortus* strain 19 (Subronto; 2001). Strain 19 memiliki keunggulan antara lain bersifat halus, aerotoleran, patogenitasnya rendah dan dapat tumbuh tanpa CO₂ (Alton *et al*; 1988).

Disamping keunggulan dari *Brucella abortus* strain 19 seperti tersebut diatas, ternyata *Brucella abortus* strain 19 terdapat berbagai kekurangan, antara lain: vaksin *Brucella abortus* merupakan vaksin hidup sehingga vaksinasi dianggap sebagai proses infeksi terkontrol, sulit untuk diketahui antara sistem kekebalan yang terbentuk pada hewan yang terinfeksi *brucella* secara alami dengan sistem kekebalan yang ditimbulkan karena vaksinasi, vaksin harus disuntikkan sebanyak dua kali, kurang stabilnya vaksin untuk beberapa strain tertentu, efek samping dari vaksin yang disuntikkan dapat memberikan reaksi yang luas pada jaringan, antibodi yang ditimbulkan sifatnya hanya sementara dalam jangka waktu yang relatif singkat dan perlindungan sistem kekebalan yang dihasilkan kurang optimal (Tizard, 1988).

Kelemahan tersebut dapat diatasi dengan pemberian vaksinasi pada anak sapi betina pada usia empat sampai 10 bulan. Tindakan ini dilakukan dengan harapan agar jumlah antibodi dalam serum sudah mencapai kadar terendah. Apabila antibodi ditemukan dalam jumlah tinggi pada hewan dewasa hal tersebut kemungkinan akibat dari infeksi dan apabila berkadar rendah kemungkinan hewan baru saja terinfeksi atau menerima vaksinasi sewaktu pedet (Tizard, 1988).

Brucellosis merupakan kasus utama di Makurdi, Nigeria sebagai penyebab keguguran pada manusia yang sedang mengandung pada usia kandungan trimester kedua. Menurut Morgan *et al* (1978) dan Alton *et al* (1988) pemeriksaan antibodi terhadap *brucellosis* biasanya menggunakan *Rose Bengal Test* (RBT) dan *Serum Agglutination Test* (SAT) dengan menggunakan serum dari manusia yang terinfeksi. Kasus infeksi *Brucella abortus* yang terjadi di Makurdi tersebut sebesar 77,2% dan 22,8% untuk *Brucella melitensis* dengan angka prevalensi 7,6% berdasarkan pemeriksaan menggunakan RBT (Abuh dan Yohana; 2006). Menurut Quinn *et al* (2002) diagnosa terhadap *brucellosis* dapat dilakukan secara serologis dan bakteriologis. Diagnosis secara bakteriologis terkadang memberikan reaksi negatif palsu dan meragukan (*dubius*). Untuk mengatasi kelemahan dari diagnosis tersebut maka dilakukan berbagai upaya untuk menanggulangi *brucellosis* dengan cara mengidentifikasi protein *Brucella abortus* yang dapat dijadikan sebagai bahan baku pembuatan vaksin sub unit dan perangkat kit diagnostik kepada hewan penderita *brucellosis*.

Berbagai usaha yang telah dilakukan adalah menemukan antigen spesifik *Brucella abortus*, misalnya struktur antigen *O polysaccharide* atau selubung *outer membran* sel *Brucella abortus* (*envelope*) dengan tujuan memperoleh antigen spesifik untuk meningkatkan respon *immune* dan mengetahui perbedaan sistem kekebalan protektif yang terbentuk, apakah karena infeksi mikroorganisme atau karena hewan telah mendapatkan vaksinasi. Sehingga diharapkan pemberian vaksin yang berasal dari *outer membran protein* tersebut dapat memberikan kekebalan dalam waktu yang relatif lama (Edmonson, 1996).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah berdasarkan latar belakang diatas adalah: bagaimana profil protein outer membran dari *Brucella abortus* strain 19 yang diidentifikasi dengan menggunakan metode SDS-PAGE?

1.3 Landasan teori

Brucellosis disebabkan oleh infeksi dari *Brucella abortus* yang diketahui terdiri dari tujuh biotipe. Bakteri dapat tumbuh pada media dengan kadar CO₂ antara 5 – 10%. Media kaya darah dan serum merupakan media yang baik bagi pertumbuhan bakteri. *Brucella abortus* membentuk koloni yang kasar, tidak mengkilap, buram dan kekuningan. Dengan uji katalase serta urease menunjukkan reaksi yang positif dan memproduksi H₂S (Quinn *et al*; 2002).

Berdasarkan skrining serum hewan penderita dapat dilakukan dengan menggunakan RBT atau SAT, untuk memastikan kejadian infeksi dapat dilakukan dengan *Complement Fixation Test* (CFT) dan telah dikembangkan dengan uji yang jauh lebih sensitif untuk deteksi immunoglobulin spesifik sapi dengan jumlah yang sedikit. CFT digunakan untuk mendeteksi antibodi spesifik pada saat awal terjadinya infeksi yaitu IgM. Setelah antibodi IgG₁ dan IgG₂ keluar maka uji serologis yang dapat dilakukan untuk mendapat hasil yang optimal adalah dengan menggunakan SAT. Sedangkan uji RBT cukup efektif dalam mendeteksi antibodi dari IgG₁ dibandingkan dengan antibodi dari IgM dan IgG₂. Sehingga uji serologis yang tepat untuk mendeteksi *brucellosis* tergantung dari antibodi yang dihasilkan (Beh, 1974 ; Hirst,1995).

Outer Membran Protein (OMP) yang berasal dari ekstrak *Brucella mellitensis* atau *Brucella abortus* B-3 yang telah disonikasi memiliki berat molekul 10, 16.5, 19, 25 sampai 27 dan 36 sampai 38 dan 89 kDa. Dari setiap massa molekul protein tersebut diberikan kepada hewan coba, setelah beberapa hari kemudian dilakukan pengambilan serum dari hewan coba untuk dilakukan pemeriksaan dengan kompetitif *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Hasil menyatakan bahwa protein yang dapat digunakan untuk merespons antibodi adalah protein dengan berat 10, 16.5, 19, 25 sampai 27 dan 36 sampai 38 kDa. Sedangkan protein dengan berat 89 kDa dinilai kurang spesifik (Cloeckert *et al.*, 1992).

OMP *Brucella* telah banyak diteliti dalam usaha mendapatkan antigen yang dapat diandalkan baik untuk diagnosis maupun untuk vaksin terhadap *Brucellosis*. OMP yang diekstraksi secara kimiawi dari galur *Brucella smooth* telah dideteksi sebagai tiga grup dengan berat molekul berkisar dari 30 kDa sampai 94 kDa (Hirst, 1995).

Elektroforesis dapat dilakukan untuk karakterisasi protein antigen berdasarkan massa molekul relatif. Salah satu metode elektroforesis yaitu satu dimensi elektroforesis yang biasa dilakukan adalah SDS-PAGE yang merupakan standar metode pengujian massa molekul relatif protein, struktur subunit dan kemurnian protein. Protein adalah molekul amfoterik yang mengandung dua grup karboksil negatif dan grup amino positif (Rantam, 2003).

Selama proses PAGE, protein dipisahkan melalui migrasi matrik tiga dimensi dengan elektrik, maka matrik mempunyai fungsi yaitu memisahkan

protein sesuai dengan ukuran, bentuk dan muatan listrik sehingga dalam hal ini diperlukan pH Buffer yang sesuai (Rantam, 2003).

Keuntungan menggunakan PAGE adalah karena bersifat transparan sehingga dapat di *scan* baik memakai sinar tampak atau ultraviolet. Selain itu ukuran pori PAGE dapat diatur untuk menghasilkan separasi yang lebih baik (Sutiman dkk., 1998).

Tindakan pencegahan terhadap *brucellosis* selain dengan melakukan test serologis dapat dilakukan juga dengan pemberian vaksin kepada hewan ternak. Vaksin yang sedang dikembangkan di negara-negara maju selain menggunakan vaksin strain 19 adalah vaksin RB51. Tidak seperti vaksin strain 19, vaksin RB 51 tidak memberikan reaksi inflamasi pada daerah injeksi, sistem kekebalan yang dihasilkan lebih lama daripada vaksin strain 19 dan dapat dibedakan antara kekebalan yang ditimbulkan karena proses vaksinasi dengan kekebalan yang terbentuk karena hewan terinfeksi *brucella* secara alami. Kerugian yang dimiliki oleh vaksin RB 51 yaitu dapat menyebabkan arthritis pada hewan ternak, keguguran pada ternak bunting yang divaksin dengan RB 51 walaupun kasus tersebut jarang terjadi dan dapat menyebabkan infeksi persisten pada hewan ternak (Richey and Dix Harrel, 2007).

1.4 Tujuan penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui profil protein outer membran dari *Brucella abortus* strain 19 yang diidentifikasi dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Dengan ditemukannya protein hasil identifikasi tersebut,

hasil yang diperoleh dapat digunakan untuk mengetahui macam protein berdasarkan berat molekulnya.

1.5 Manfaat penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah hasil fraksinasi outer membran protein dari *Brucella abortus* strain 19 dengan metode SDS-PAGE. Hasil yang diperoleh juga dapat digunakan sebagai dasar *immunoblotting* untuk menentukan protein yang spesifik dan memberikan landasan ilmiah yang kuat dalam penelitian biologi molekuler untuk pengembangan metode diagnostik dalam upaya melakukan diagnosis dengan cepat dan akurat terhadap infeksi *Brucella abortus* strain 19.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Brucella abortus*

2.1.1 Taksonomi dari *Brucella abortus*

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

Brucella abortus merupakan bakteri gram (-) berbentuk batang berukuran 0,5-0,7 x 0,6-1,5 mikrometer (μm), berasal dari genus *Brucella*, non motil tidak berspora, tidak memiliki flagella dan tidak berkapsul. *Brucella* merupakan kuman patogen bagi manusia maupun hewan yang bersifat *fage intraselular* karena mampu berkembang biak dalam sel fagosit seperti neutrofil dan sel makrofag inang (Cardoso *et al.*, 2006).

Ada dua macam antigen yang stabil pada spesies *brucella* yaitu antigen M dan antigen A. Antigen yang dimiliki oleh *Brucella abortus* adalah antigen A sedangkan antigen M adalah antigen yang terdapat pada *Brucella mellitensis* (Dinas Peternakan Jawa Timur, 2006 ; Karsinah dkk, 1994).

Brucella abortus hidup berpasangan atau menggerombol dan pada pewarnaan gram akan terlihat berwarna merah. Media perbenihan kuman tersebut

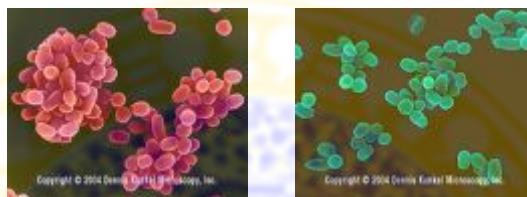
dengan memakai potato agar kemudian di inkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C (Karsinah dkk, 1994)

Dalam media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) *Brucella abortus* membentuk koloni *smooth*, transparan, *convex* dengan batas yang jelas dan mengkilap. Isolasi dan identifikasi *Brucella* dengan media tersebut akan tumbuh dalam waktu 48 jam dan membentuk koloni dengan diameter sebesar 0,5 – 1,0 mm berwarna kuning pucat atau biru keabu-abuan, buram dan tidak tembus cahaya (Dhamir, 2004)

Brucella abortus adalah bakteri *fakultatif anaerob* dan beberapa strain dari bakteri tersebut membutuhkan 5 sampai 10% CO₂ untuk pertumbuhannya (Quinn *et al*, 2002)

Brucella sp adalah bakteri *fakultatif intraseluler* yang dapat bertahan hidup dan berkembang biak dalam sel fagosit dan menyebabkan *keluron* pada hewan yang terinfeksi dan *undulant fever* pada manusia. Beberapa strain *Brucella sp* dapat dikenali dari patogenitasnya terhadap induk semang. Strain *Brucella sp* yang dapat menimbulkan kasus penyakit adalah *Brucella* galur *smooth* dan *rough* dengan cara mengekspresikan *smooth* LPS (S-LPS) atau *rough* LPS (R-LPS) sebagai antigen permukaan mayor. *Outer membran* mengandung *lipopolysaccharida* (LPS) yang merupakan bagian penting dalam integritas struktural dan fungsional dari bakteri gram negatif. Strain yang patogen terhadap manusia adalah *Brucella abortus* dan *Brucella melitensis* yang mengandung S-LPS (Cardoso *et al.*, 2006).

Kasus *brucellosis* bersifat *endemik* di beberapa negara berkembang dan mampu menimbulkan penyakit baik pada manusia ataupun hewan. Apabila hewan menderita *brucellosis* maka dapat menyebabkan penurunan produksi yang sangat besar sehingga terjadi kerugian ekonomis yang sangat besar pula (Anonimus; 2004)

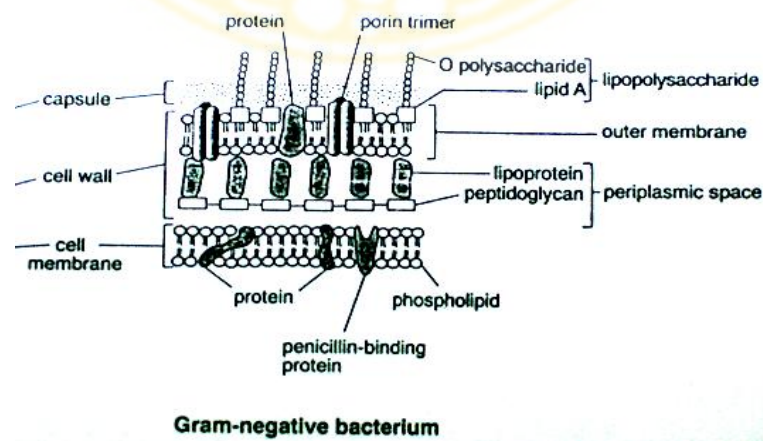


Gambar 2.1. Foto elektron *Brucella abortus* (Kunkel, 2004).

Brucella sp dapat hidup dalam urine selama 30 hari, produk hasil abortusan selama 75 hari dan 200 hari dalam eksudat uterin (Tittarelli, 2008).

2.1.2 Outer Membrane Protein *Brucella abortus* S-19

Brucella abortus S-19 merupakan bakteri bersifat gram negatif sehingga memiliki struktur pada lapisan dinding sel sebagaimana berikut pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Model kuman Gram negatif. Sumber: Quinn *et al* (2002)

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

Molekul lipoprotein terdiri dari lipid yang terikat pada selaput luar dan senyawa protein yang mengandung 57 asam amino. Protein ini berhubungan dengan peptidoglikan melalui rantai samping peptidoglikan (tetrapeptida). Pada selaput luar terdapat protein utama dan protein lainnya (Jametz *et al.*, 1982). Protein pada dinding sel kuman gram negatif mempunyai berat molekul 28 – 43 kDa. Bagian lapisan lipoprotein mengandung asam amino yang terdiri dari tripsin, lisin, tirosin, arginin dan leusin (Wolfgang *et al.*, 1992).

Lipoprotein merupakan faktor virulensi bagi kuman gram negatif yang terdiri dari tiga bagian yaitu: lipid A, *oligosaccharida* dan O-antigen. Lipid A terdiri dari 2,3 diamino, 2,3 dideoxy-D-glukosa (diaminoglukosa), amide, rantai panjang ester C_{16:0} sampai C_{18:0} dan asam lemak *hidroxylated*. Sedangkan *oligosaccharida* terdiri dari 2-amino, 2,6 dideoxy-D-glucose (quinovosamine), 2-amino-2-deoxy-D-glukosa (glukosamine), 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) dan gula (Cardoso *et al.*, 2006).

2.2 Brucellosis

Brucellosis merupakan penyakit menular yang dapat menyerang hewan ternak dan menular kepada manusia. Walaupun penyakit tersebut dapat menyerang hewan lain tetapi perawatan utama tetap pada hewan ruminansia. *Brucellosis* pertama kali dikenal sebagai penyakit *Bang's disease* atau *keluron* menular (Wikkimedia, 2007).

Brucella sp memiliki induk semang spesifik. *Intermediate host* berperan sangat kecil dalam proses penyebaran penyakit. *Brucella abortus* menyerang hewan ternak sebagai induk semang definitif dan menyebabkan terjadinya keguguran atau disebut juga *contagious abortion* pada hewan yang terinfeksi (Manthei and Carter, 1950; Dekeijzer, 1981; Crawford et al., 1990).

Brucellosis disebabkan oleh bakteri dari genus *Brucella*. Pertama kali ditemukan oleh Bruce pada tahun 1887 di Pulau Malta dan dikenal dengan nama *Micrococcus melitensis*. *Brucellosis* memiliki nama lain *Undulant fever, Malta fever, Gibraltar fever, Mediterranean fever, Contagious abortion, Abortion fever, Infectious abortion, Epizootic abortion* dan *Bang's disease*. (Public Health Laboratory Network, 2004).

Brucella sp memiliki empat macam koloni yaitu *smooth, rough, smooth-rough intermediate* dan *muroid*. Tiap koloni memiliki ciri-ciri yang berbeda yaitu tipe *smooth* mengandung *polysaccharide* dari *homopolymer* pada bagian permukaan. Tipe *rough* tampak lebih buram dibandingkan dengan tipe *smooth*, mengandung sedikit *polysaccharide* dan memiliki granula berwarna putih kekuningan, sedangkan *Brucella abortus* dengan bentuk koloni *muroid* hampir serupa dengan tipe *rough* tetapi memiliki selaput lengket (Cloekaert, 1995).

Brucellosis merupakan penyakit yang sangat infeksius dan menular. Penyakit tersebut dapat menyerang kuda, anjing dan babi sehingga *brucellosis* dapat dipertimbangkan sebagai “*dead-end disease*” terhadap spesies tersebut, artinya *Brucella sp* hanya dapat menyerang induk semang spesifik.

Tetapi kejadian *brucellosis* dapat menyerang manusia karena sifatnya yang zoonosis (Richey and Dix Harrel; 1996).

2.2.1 Penyebab *Brucellosis*

Genus *Brucella* memiliki beberapa species yaitu *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis*, *Brucella neotomae* dan ditemukan dua species baru yaitu *Brucella cetaceae* dan *Brucella pinnipediae* yang diisolasi dari hewan air, *cetaceans* dan *pinnipeds*. Dari beberapa jenis *brucella* tersebut yang dapat menyebabkan terjadinya penyakit pada hewan ternak adalah *Brucella melitensis* yang menyerang kambing, *Brucella abortus* yang menyerang sapi dan *Brucella suis* yang menyerang babi (Akoso, 1994 and Cardoso *et al.*, 2006).

Bovine brucellosis dapat menyebabkan keguguran secara spontan dan menyebabkan infertilitas pada hewan yang terserang *Brucella abortus*. Apabila hewan yang terserang *brucellosis* dalam keadaan bunting maka bakteri dapat masuk menembus plasenta atau dapat menginfeksi induk secara intra uterine sehingga menyebabkan keguguran spontan pada hewan yang sedang bunting pada masa kebuntingan trimester kedua. Penularan dapat terjadi secara tidak langsung melalui hewan yang terinfeksi atau kontak langsung dengan mikroba dalam jumlah besar (European Molecular Laboratory, 2006).

2.2.2 Gejala klinis *brucellosis*

Brucella abortus menyerang sapi betina pada umur yang sudah siap untuk dikawinkan. Penyakit ini dapat diketahui atau dikenali karena dapat menyebabkan keguguran pada sapi yang sedang bunting tua, plasentitis dan biasanya diikuti

dengan kemajiran pada hewan tersebut. Sedangkan sapi jantan dapat terinfeksi *Brucella abortus* dan bakteri menyerang vesikula seminalis, testis dan epididimis (Quinn *et al.*, 2002).

Pada hewan yang menderita *brucellosis* apabila dilakukan tindakan bedah bangkai maka dapat diketahui adanya penebalan pada plasenta dengan bercak-bercak pada lapisan chorion, cairan janin bewarna keruh kuning kecoklatan dan biasanya bercampur nanah. Pada hewan jantan akan ditemukan adanya nekrosis jaringan, *orchitis*, *epididymitis* dan *seminal vesikulitis* (Akoso, 1994 ; Offices International des Epizooties, 2002)

Gejala awal dari *brucellosis* adalah adanya *keluron* atau keguguran yang terjadi di masa pertengahan kebuntingan pada hewan yang terinfeksi (Subronto, 2001). Anak sapi atau pedet yang dilahirkan oleh induk yang menderita *brucellosis* keadaannya lemah kemudian mati. Apabila anak yang dilahirkan selamat maka akan mengalami *oedema sub cutan*, pembesaran hati dengan warna kuning kecoklatan, *pleuritis fibrousa* dan *pneumonia focalis*. Hewan yang menderita *brucellosis* dapat mengalami kemajiran temporer atau kemajiran permanen. (National Publishing Inc Philadelphia, 1998 ; Offices International des Epizooties, 2002)

Gejala yang tampak pada manusia adalah demam *intermiten*, sakit kepala, lemah, berkeringat, penurunan berat badan, merasa kedinginan dan sakit sekujur badan yang disebut dengan *Undulant Fever* (Syarif dan Sumoprastowo, 1985) Manusia yang tertular *brucellosis* umumnya berhubungan dengan hewan ternak seperti petani, peternak, dokter hewan dan orang yang bekerja pada rumah potong

hewan. Manusia dapat tertular *brucellosis* karena meminum susu dari hewan penderita yang tidak dimasak atau susu yang tidak dipasteurisasi, kontak hewan dengan hewan yang terinfeksi atau fetus abortusan dari induk yang terinfeksi *Brucella abortus* (WHO, 1971 ; European Molecular Laboratory, 2006).

2.2.3 Kejadian *Brucellosis*

Kejadian *brucellosis* pada sapi bersifat *wideworld* dan dapat tersebar diseluruh dunia seperti India, Mexico, Eropa, Amerika Selatan (Borrok, 1998).

Brucellosis sudah lama dikenal di Indonesia terutama sejak ditemukannya kasus di Jawa dimana *Brucella abortus* menyerang sapi perah. *Brucellosis* mudah menular pada hewan yang ada disekitarnya dan menyebar dengan cepat ke banyak tempat di Indonesia seperti di Sumatra Barat, Sulawesi Selatan, Timor Barat, Nusa Tenggara Timur, Nusa Tenggara Barat dan Kalimantan. Berdasarkan laporan dari pemerintah, prevalensi *brucellosis* di Kalimantan dan Sumatra tergolong rendah (Handijanto, 2003 ; World Animal Health, 2004).

Kejadian *brucellosis* di Indonesia pernah dilaporkan oleh Lembaga Penyidikan Penyakit Hewan (LPPH) pada tahun 1972 dengan angka prevalensi yang sangat tinggi terdapat di Bekasi, Bogor, Kediri dan Jakarta. Di negara yang sudah maju peternakannya, *brucellosis* sudah bukan merupakan masalah lagi karena program pemberantasan *brucellosis* sudah dilaksanakan mulai dari pemeriksaan serologis, program vaksinasi dan pembantaian sapi penderita *brucellosis*. Di Amerika Serikat kasusnya menurun dari 1,06% pada tahun 1962 menjadi 0,91% pada tahun 1982 (Hardjopranto; 1995).

Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur menyatakan bahwa pada tahun 2003 sudah dilaksanakan pemeriksaan *brucellosis* dengan mengambil 4225 sampel darah. Hasilnya 194 kasus positif dengan menggunakan uji RBT dan 350 kasus positif dengan uji CFT atau sebesar 6,44% dengan prevalensi sebesar 0,18% (Anonimus, 2004).

2.2.4 Diagnosis *Brucellosis*

Kejadian keguguran pada sapi dapat disebabkan oleh virus, jamur atau bakteri, sehingga diagnosis yang diberikan tidak cukup hanya dengan melihat riwayat kejadian dan pengamatan secara sepintas yang tampak pada hewan penderita (Subronto, 2001). Pada umumnya kejadian keguguran pada hewan ternak yang sedang memasuki usia kebuntingan trimester kedua patut dicurigai bahwa penyebab kasus tersebut karena infeksi oleh bakteri *Brucella abortus* (Anonimus; 2004).

Diagnosis penyakit dapat dilakukan dengan uji secara serologis atau bakteriologis dengan melakukan kultur dari sampel hewan seperti fetus hasil abortusan, plasenta, eksudat uterus, susu atau cairan abses dari sapi yang diduga menderita *brucellosis* pada media pembiakan bakteri seperti *Simon Citrate Agar* (SCA), *Urea*, *Sulfite Indol Motility* (SIM). Cara lain yang dapat digunakan selain kultur pada media adalah dengan melakukan pewarnaan gram. Apabila hewan tersebut menderita penyakit yang disebabkan oleh bakteri *brucella* maka hasil pewarnaan sampel yang mengandung mikroba dari hewan tersangka tersebut akan berwarna merah atau menunjukkan hasil positif pada pewarnaan gram negatif (Morgan *et al*, 1978 ; Alton *et al*, 1998).

Diagnosa banding untuk *brucellosis* adalah *leptospirosis*, *listeriosis*, *trichomoniasis*, *vibriosis*, *mycosis* dan *infectious bovine rhinotracheitis*. Pemeriksaan pada saat hewan masih hidup dapat dilakukan dengan pengambilan sampel susu dari hewan penderita dan pengambilan darah untuk diambil serumnya. Untuk pemeriksaan *post mortem* dapat dilakukan pemeriksaan pada kelenjar mammae, lymphoglandula, ginjal, paru – paru dan isi rumen dari fetus hasil abortusan serta pemeriksaan pada kotiledon dari membran fetus (National Publishing Inc Philadelphia, 1998 ; Offices International des Epizooties, 2002).

2.2.5 Penularan *brucellosis*

Penularan *brucellosis* dalam suatu area peternakan bersifat *endemik*, artinya bila suatu daerah tertular dan daerah tersebut memiliki populasi ternak yang sangat banyak, dalam waktu singkat sapi – sapi yang ada dalam daerah tersebut akan terinfeksi *brucella* (Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur; 2006).

Brucellosis dapat ditularkan dari individu ke individu lainnya dengan cara kontak langsung dengan cairan tubuh hewan penderita atau melalui alat genital. Penularan lain dapat juga melalui pencernaan yaitu bahan makanan yang terkontaminasi oleh plasenta atau cairan yang keluar dari rahim yang menderita *brucellosis*. Penularan juga dapat melalui inseminasi buatan (IB) apabila air mani terinfeksi *Brucella abortus* (WHO, 1971 ; Subronto, 2001).

Penyebaran dan penularan penyakit dapat terjadi karena adanya pembebasan bakteri dalam jumlah besar melalui air susu, saluran kemih dan feses. Penularan dapat juga terjadi melalui lendir yang dikeluarkan setelah melahirkan.

Penularan kepada pedet dimungkinkan berasal dari air susu pada waktu pedet menyusu induknya (Subronto, 2001).

Penularan *brucellosis* dapat juga dengan cara kontak langsung dengan hewan yang terinfeksi, fetus hasil abortusan dari hewan yang terinfeksi *Brucella abortus*, discharge vagina dan membran plasenta. Selain itu hewan ternak dapat tertular *brucellosis* karena menelan bahan makanan dan minuman yang sudah terkontaminasi oleh mikroorganisme. Penyebaran akan semakin luas apabila antara hewan ternak yang satu dengan yang lain berada dalam satu populasi ternak yang bebas (Wikimedia, 2007).

2.2.6 Terapi antibiotik terhadap *Brucellosis*

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

Antibiotik lain yang juga efektif untuk mengobati *brucellosis* seperti golongan *aminoglycoside*, *rimfampicin* 5 mg/kg BB secara *intra muscular* (IM), *gentamicin*, *doxycycline* 100 mg dua kali sehari secara *intra vena* (IV) selama 45 hari atau dapat juga dikombinasi dengan *rifampin* dengan dosis 2,5 sampai 5 mg/kg BB selama enam bulan. Terapi antibiotik selain menggabungkan dua macam antibiotik juga dapat menggabungkan tiga macam antibiotik (*triple therapy antibiotic*) untuk memberi efek kesembuhan yang lebih besar dengan

memberikan *doxycycline* dikombinasikan dengan *rifampin* dan *cotrimoxazole* dalam kasus penyakit *neurobrucellosis* (Wikimedia, 2007).

2.2.7 Kerugian ekonomis karena *brucellosis*

Brucellosis menyebabkan kerugian ekonomis yang sangat besar karena dapat menyebabkan *keluron* atau keguguran pada hewan betina yang sedang bunting tua, tetapi mortalitas dari penyakit tersebut sangat kecil. Kerugian lainnya adalah hewan yang terinfeksi akan mengalami kemajiran karena adanya gangguan pada saluran reproduksi. Apabila penyakit tersebut menyerang pada sapi perah maka akan menyebabkan penurunan produksi susu (Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur, 2006).

Kerugian lainnya dapat disebabkan oleh turunnya akses pasar baik lokal ataupun internasional karena sifatnya yang *zoonosis* dan mahal biaya pengobatan serta pemberantasan penyakit tersebut (Dharma, 2001).

Pada tahun 1951, kasus *brucellosis* di Amerika menyebabkan kerugian ekonomis yang sangat besar khususnya pada sektor peternakan karena penyebaran *brucellosis* menyerang hampir 10% dari total populasi ternak sehingga mengalami kerugian kurang lebih sebesar 499 juta US\$. Upaya untuk mengatasi kejadian tersebut pemerintahan Amerika harus menginvestasi dana sebesar 3,8 miliar US\$ untuk memperbaiki manajemen peternakan dan menekan laju penyebaran *brucellosis*. Pada tanggal 30 November 1996 pemerintah Amerika berhasil mengendalikan penyebaran penyakit menjadi 40 kasus tiap tahun dari 124.000 kasus tiap tahun pada tahun 1951 (Richey and Dix Harrel; 1996).

Brucellosis tersebut dapat menyebabkan kerugian yang sangat besar pada para peternak sehingga mengganggu pendapatan karena adanya penurunan produksi pada hewan ternak. Berdasarkan laporan dari Direktorat Kesehatan Hewan Direktorat Jendral Bina Produksi Peternakan tahun 2004 terdapat 9 macam penyakit menular seperti Newcastle Disease (ND), Penyakit Mulut dan Kuku (PMK), Septicemia Epizootica (SE), rabies, *hog cholera*, *scabies*, *brucellosis*, *anthrax* dan masalah reproduksi. Tetapi kerugian yang paling besar terjadi pada kasus *brucellosis* yang menyebabkan kerugian sebesar 138,5 milyar/tahun (Direktorat Kesehatan Hewan Direktorat Jendral Bina Produksi Peternakan, 2004).

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

2.3 Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Polyacrylamide merupakan matrik pilihan untuk memisahkan protein yang berat molekulnya antara 500-250.000 Dalton. Gel poliakrilamid dibentuk melalui terbentuknya ikatan silang antara rantai poliakrilamid. Rantai ini terbentuk dari polimerasi monomer *acrylamide* $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ menjadi rantai poliakrilamid

yang panjang. Polimerasi dikatalis oleh *Ammonium Persulphat* (APS) yang didalam larutan terbentuk radikal bebas. Sesudah diaktifkan oleh radikal bebas, *acrylamide* bereaksi dengan *acrylamide* yang lainnya untuk membentuk suatu rantai polimer yang panjang (Sutiman dkk, 1996).

Pada SDS-PAGE protein dielektroforesis dalam detergen ionik, yaitu *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS). Detergen ini mengikat residu hidrophobik dari bagian belakang peptida, salah satu dari setiap asam amino, sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Dengan demikian protein SDS-komplek migrasi melalui *polyacrylamide* tergantung dari massa molekul relatif (Rantam, 2003).

Prinsip dasar metode SDS-PAGE adalah denaturasi oleh *sodium dedocyl sulphate* dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis menggunakan gel poliakrilamid. Pori-pori dari PAGE dibentuk oleh rantai *cross-linking linear polyacrilamide* dengan *bis acrylamide*. Ukuran pori-pori berkurang sesuai dengan peningkatan total persentase *acrylamide* atau peningkatan derajat persentasi konsentrasi campuran dengan *bis acrylamide*, sehingga berpengaruh pada pergerakan protein, apabila total persentase *acrylamide* dengan *bis acrylamide* rendah, maka akan mengakibatkan pergerakan protein melalui gel sangat cepat, sehingga diperoleh protein dengan spesifitas yang rendah. Selama elektroforesis migrasi protein SDS-komplek melalui *poliacrylamide* tergantung molekulnya. Protein yang terpisah akan terlihat seperti pita. Dengan menggunakan teknik pemisahan elektroforesis SDS-PAGE maka adanya perbedaan di dalam komposisi protein akan

menghasilkan pemisahan dalam bentuk pita protein dengan berat molekul yang berbeda, dengan demikian bisa dicari pita protein pembeda tersebut (Rantam, 2003).

Elektroforesis yang dilaksanakan menggunakan voltase yang rendah agar protein yang sudah didenaturasi tersebut membentuk pola matriks yang bagus dalam gel. Voltase yang terlalu tinggi akan mengakibatkan resolusi yang buruk terhadap pola matriks dan mengakibatkan kesulitan dalam proses pembacaan hasil visualisasi dari separating (pemisahan) protein dalam SDS-PAGE (Wikimedia, 2007).

Ada dua sistem dalam SDS yaitu kontinyu (Webber dan Osbon) dan diskontinyu (*laemmli*). Pada sistem kontinyu campuran protein dilapiskan pada bagian atas (band pada bagian atas dari *separating gel*) sehingga kelemahan dalam sistem ini terjadi resolusi dalam sampel. Pada sistem diskontinyu protein migrasi dengan cepat dalam pelarut ion dalam *stacking gel* dan *separating gel*. Protein terkonsentrasi pada garis tipis berupa pita atau band yang tipis (Rantam, 2003)

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

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Pusat Veterinaria Farma Surabaya, *Tropical Disease Centre*, Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi, Laboratorium Biomolekuler dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga pada bulan Juni sampai September 2007

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat dan Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan bakteri *Brucella abortus* strain 19 yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya dalam bentuk suspensi.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 7,3, acrylamide, Tris HCL pH 6,8 dan pH 8,8, *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), aquadest, *Ammonium Persulphate* (APS), *tetramethyldiamin* (TEMED), laemml buffer, butanol, electrophoresis buffer, asam asetat 10%, 25ml methanol 50%, gliserol 10%, NaCL 0,15 M, coomassie brilliant blue solution.

Alat yang digunakan meliputi tabung reaksi, *adjustable mikro pipet*, *centrifuge*, *mikrotube*, *backer glass*, sonikator, *pH meter*, *chamber SDS-PAGE tipe biometra*, *glass plate*, *comb*, *cutter*, *shaker*, *spektrofotometer*, *refrigerator*.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Isolasi dan identifikasi *Brucella abortus*

Isolasi *Brucella abortus* dilakukan dengan cara menanam bakteri pada media *Potato Agar* (PA) yang dibuat dalam botol besar disebut *roux* kemudian

diinkubasi selama dua hari. Isolasi ini berasal dari bakteri yang sudah dikering bekukan sebelumnya di Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Sedangkan identifikasi *Brucella abortus* dilakukan dengan cara pengujian biokimia. Pengujian biokimia yang dilakukan antara lain dengan menggunakan media *Sulfite Indol Motility* (SIM), *Simon Citrate Agar* dan *Urease*. Isolasi *Brucella abortus* ini dilakukan di Pusat Veterinaria Farma Surabaya dan identifikasi dilaksanakan di Departemen Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

3.3.2 Pemisahan Outer Membran Protein (OMP) *Brucella abortus* strain 19 dengan menggunakan teknik sonikasi

Sampel bakteri *Brucella abortus* dimasukkan dalam tabung sonikasi dengan ditambahkan *Phospat Buffer Saline* (PBS) untuk disonikasi. Sonikasi dilakukan dengan sonikator menggunakan frekwensi 25 kHz selama 3x3 menit (tiga kali sonikasi setiap sonikasi tiga menit) dan setiap tiga menit sonikasi dihentikan selama satu menit. Selama proses sonikasi, tabung sonikasi tempat sampel *Brucella abortus* strain 19 dimasukkan dalam wadah yang telah berisi air dingin (air bercampur es dan garam) dengan maksud protein yang dipakai tidak rusak selama proses sonikasi.

3.3.3 Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE

Teknik ini dilakukan untuk mendeteksi profil dan karakterisasi protein berdasarkan berat molekul protein *Brucella abortus* strain 19. Prinsip dasar dari metode ini adalah denaturasi protein oleh *Sodium Dodecyl Sulfate* dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan berat molekul dengan metode elektroforesis menggunakan gel, dalam hal ini yang digunakan adalah *polyacrilamid*. Pada

teknik ini menggunakan larutan *separating gel* 12,5% dan larutan *stacking gel* 5% (Rantam, 2003).

Pelaksanaan pada sistem ini menggunakan sistem diskontinyu. Sistem diskontinyu protein bermigrasi dengan cepat melalui pelarut ion pada *stacking gel* dan *separating gel* (Rantam, 2003).

Tahap pertama yang dilakukan adalah dengan membuat *separating gel* 12,5% dengan mencampurkan *acrylamid* 30% atau 8% *bis-acrylamid* 7,9 ml; 5 ml 1,5 M tris HCL pH 8,8; 0,2 ml SDS 10%; 6,9 ml aquadest; 5 µl *Tetramethyl Ethylen Diamine* (TEMED) dan 40 µl APS 10% semua bahan campur sampai homogen. Kemudian dimasukkan ke dalam plate kaca yang telah bersekat sampai satu sentimeter di atasnya dan dilakukan fiksasi supaya hasil *separating gel* rata dan bagian atas *separating gel* diratakan dengan menambahkan larutan butanol di atasnya, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 25 menit untuk menunggu *separating gel* padat. Kemudian larutan butanol tersebut dibuang dan ditambahkan *stacking gel*.

Tahap kedua adalah membuat *stacking gel* 5% dengan mencampurkan 5,66 ml aquadest; 2,5 ml 0,5 M tris HCL pH6,8; 1,7 ml *acrylamid* 30% atau 8% *bis-acrylamid*; 0,1 ml SDS 10%; 10 µl *Tetramethyl Ethylen Diamide* (TEMED) dan 50 µl APS 10% dengan mencampur sampai homogen, kemudian dituang pada cetakan *separating gel* kemudian dimasukkan comb kedalam *plate* yang berisi gel. Inkubasi selama 25 menit pada suhu kamar sampai *stacking gel* padat, kemudian comb dilepaskan dan dibersihkan serta mencuci *stacking gel* yang

sudah padat tersebut dengan menggunakan E-buffer pengenceran 10 kali (20ml E-Buffer + 180ml aquadest → 200ml E-Buffer pengenceran 10 kali).

Sampel *Brucella abortus* strain 19 yang akan diidentifikasi proteinnya diambil sebanyak 20µl dicampur dengan laemmli buffer dengan perbandingan 2:1 dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Kemudian dilakukan denaturasi protein dengan cara perebusan pada suhu 100 °C selama lima menit. Sampel termasuk kontrol positif dalam laemmli buffer diaplikasikan dalam enam sumuran dan satu sumuran sebagai kontrol diisi dengan 5 µl marker protein (*Color Burst™ Elektrophoresis Markers*, No C.4105).

Proses elektroforesis dimulai dengan memasang plate kaca pada Bio-Rad yang sudah dituang dengan E-Buffer sekitar 400 ml dan plate kaca difiksasi. Lalu memasukkan sampel kedalam lubang comb, dilakukan running dengan voltase 100 V, 40 mA. Tunggu sampai sampel turun melewati running gel, selanjutnya gel beku yang sudah terdapat fraksi protein diambil dengan memisahkan plat kaca.

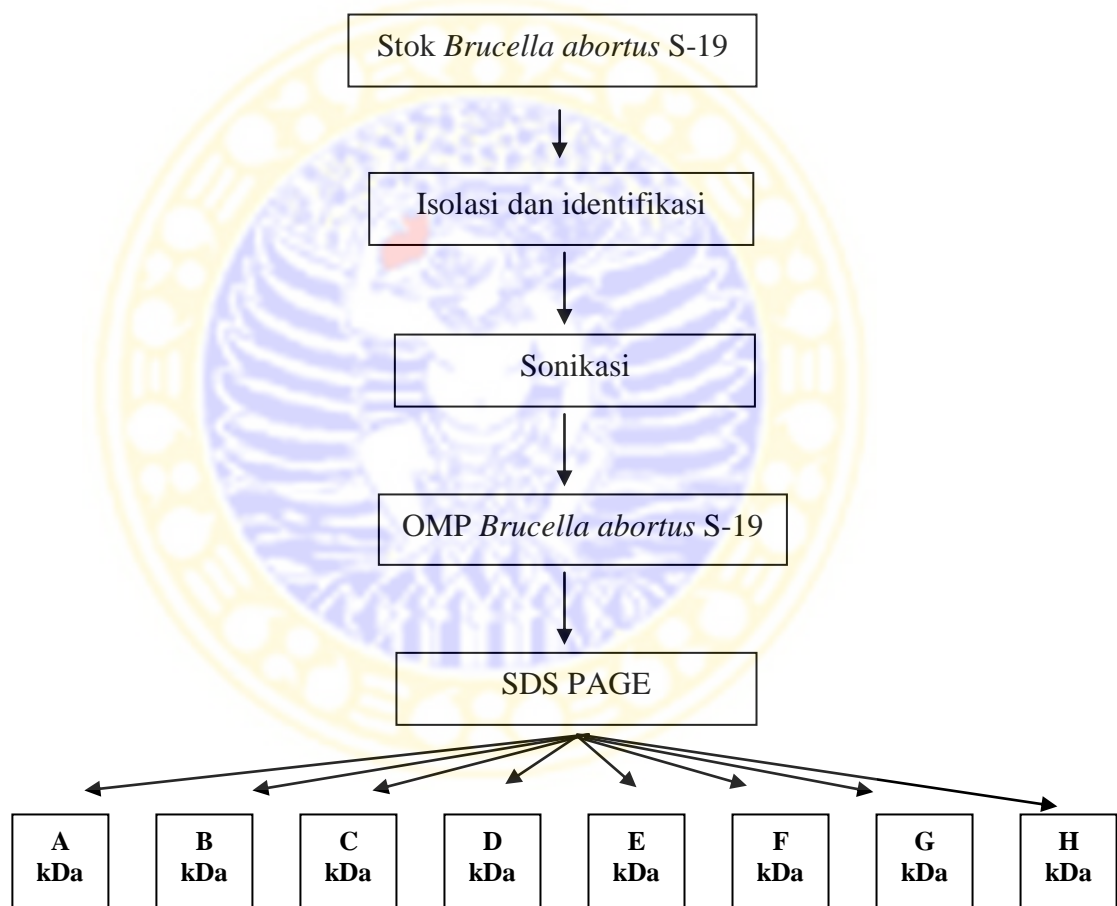
Setelah gel dilepaskan dari *plate glass*, kemudian gel dimasukkan ke dalam larutan pencuci yang terdiri dari 25 ml methanol 50%, 3,7 ml asam asetat 10 % dan aquadest ad 100 ml. Gel dicuci dengan digoyang-goyang di atas shaker yang berisi reagen *Coomasie blue* selama satu jam dan menunjukkan adanya pemisahan protein dengan *band* yang jelas terdapat dalam gel.

Hasil gel yang telah menunjukkan adanya *band* protein disimpan dalam larutan gliserol 10% sebanyak 10 ml dalam aquadest 1000 ml agar gel tidak rusak. Dokumentasi dilakukan dengan menggunakan peralatan *scan* yang dihubungkan

dengan komputer. Perhitungan berat molekul dilakukan dengan perbandingan band protein yang dimaksud dengan standar yaitu marker protein (Color BurstTM Electrophoresis Marker, No C.4105).

3.4 Kerangka Operasional

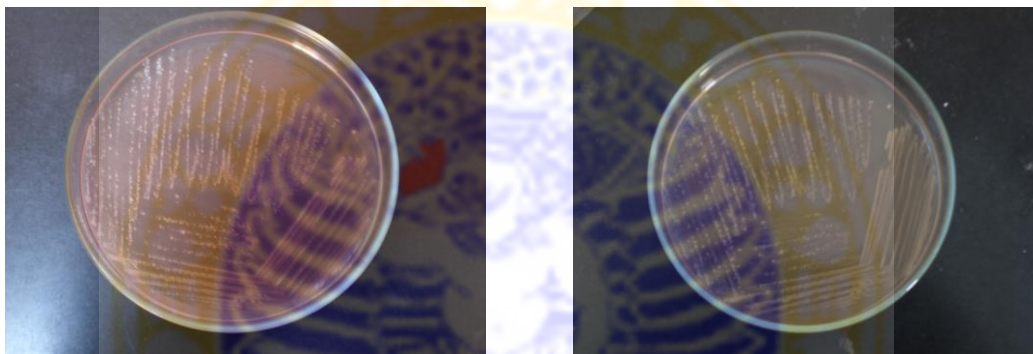
Untuk memperjelas gambaran penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada skema di bawah ini



BAB 4 HASIL PENELITIAN

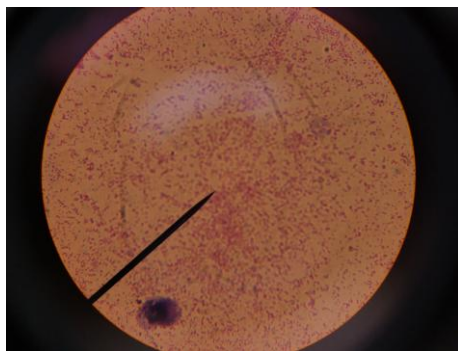
4.1 Isolasi dan Identifikasi *Brucella abortus*

Isolat bakteri *Brucella abortus* diperoleh dari sampel bakteri dalam bentuk suspensi yang sebelumnya telah dikering bekukan lalu ditanam dalam media *Potato Agar* (PA) kemudian di pindahkan dalam media *Blood Agar* (BA) untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghemolisis darah dan *Tryptone Soya Agar* (TSA) untuk pemurnian bakteri *Brucella abortus* (gambar 4.1).



Gambar 4.1. Biakan *Brucella abortus* di media *Blood Agar* dan TSA

Selanjutnya dilakukan identifikasi dengan pemeriksaan mikroskopis pada kuman yang telah diberi pewarnaan gram negatif dimana hasilnya menunjukkan bakteri berbentuk *coccobacillus*, tidak berspora dan berwarna merah (Holt *et al.*, 1994) (gambar 4.2).



Gambar 4.2. Gambaran mikroskopis *Brucella abortus*

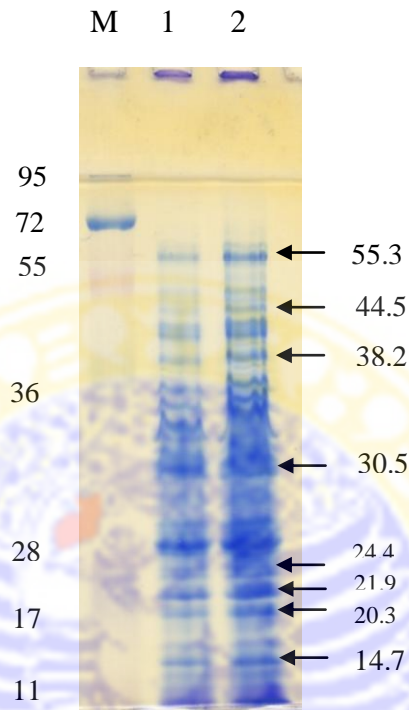
Setelah dilakukan pemeriksaan mikroskopis kemudian dilakukan uji biokimia. Hasil uji biokimia *Brucella abortus* tersebut menunjukkan *Urease* (+), *Simmon Citrate Agar* (-), *Sulfite Indol Motility* (motil, indol negatif) yang sesuai dengan sifat *Brucella abortus*. Sehingga dapat diketahui bahwa isolat bakteri tumbuh adalah *Brucella abortus*.

4.2 Analisa Outer Membran Protein dari *Brucella abortus*

Untuk mengetahui massa molekul relatif (MR) protein antigen dari *Brucella abortus* strain 19 dilakukan perhitungan berat molekul protein menggunakan SDS-PAGE dengan pewarnaan *Commassie Brilliant Blue*.

Perhitungan analisis protein *Brucella abortus* strain 19 dalam penelitian ini menggunakan regresi *cubic* dengan persamaan $Y = 5.522 - 4.413x + 7.151x^2 - 4.315x^3$ yang digunakan untuk menghitung MR dari protein *Brucella abortus*.

Hasil penelitian analisis protein *Brucella abortus* strain 19 tersebut diperoleh delapan pita protein yaitu massa molekul relatif 55.3 kDa terletak antara marker 72-55 kDa. Protein dengan massa molekul relatif 44.5 kDa terletak antara marker 55-36 kDa. Protein dengan massa molekul relatif 38.2 kDa terletak antara marker 55-36 kDa. Protein dengan massa molekul relatif 30.5 kDa terletak antara marker 36-28 kDa. Protein dengan massa molekul relatif 24.4 kDa, 21.9 kDa dan 20.3 kDa terletak diantara marker 28-17 kDa. Protein dengan massa molekul relatif 14.7 kDa terletak diantara marker 17-11 kDa. Hasil penelitian dari analisis protein selengkapnya dapat dilihat pada gambar 4.3



Gambar 4.3. Analisis protein *Brucella abortus* dengan SDS – PAGE.

Tabel 4.1. Analisis protein *Brucella abortus* berdasarkan berat molekulnya

Jarak Sampel	Rf (Sampel)	log y* (Da)	y (Da)	y kDa
37.0	0.287	4.743	55,335.0	55.3
48.0	0.372	4.648	44,463.0	44.5
60.0	0.465	4.582	38,194.4	38.2
85.0	0.659	4.485	30,549.0	30.5
100.0	0.775	4.388	24,434.0	24.4
105.0	0.814	4.341	21,928.0	21.9
108.0	0.837	4.308	20,323.6	20.3
118.0	0.915	4.166	14,655.5	14.7

$$Y = 5.522 - 4.413x + 7.151x^2 - 4.315x^3$$

BAB 5 PEMBAHASAN

5.1 Isolasi dan Identifikasi *Brucella abortus*

Pembiakan pada media *Tryptone Soya Agar* (TSA) menghasilkan koloni berbentuk halus, bulat dan berwarna kekuningan (Soebronto, 2001). Sedangkan menurut Alton *et al* (1988) pada media *Blood Agar* (BA) menunjukkan bakteri tidak mampu menghemolisis eritrosit yang tampak pada gambaran media disekitar koloni tetap berwarna merah, hal ini menunjukkan bahwa *Brucella abortus* S-19 memiliki daya pathogenitas yang rendah.

Menurut Quinn *et al* (2002), pada pemeriksaan mikroskopik dengan pewarnaan gram negatif menunjukkan bahwa *Brucella abortus* S-19 berbentuk *cocco bacillus*, berwarna merah. Hal ini membuktikan bahwa *Brucella abortus* strain 19 tidak tahan terhadap alkohol, karena susunan kimia dinding sel bakteri yang tipis sehingga mampu dirusak dan memudahkan safranin menembus dinding sel sehingga memberikan warna merah pada sitoplasma. Sesuai dengan pendapat Volks (1993) bahwa organisme yang tidak dapat menahan zat pewarna setelah dicuci dengan alkohol 95% disebut gram negatif.

Setelah dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri pada media agar maka dapat dilakukan uji biokimia untuk memastikan bahwa *Brucella abortus* strain 19 yang ditanam tidak ada kontaminasi dari bakteri lain. Pada pemeriksaan biokimia dapat dilakukan dengan uji *Simmons Citrate* yang menunjukkan reaksi negatif yang dibuktikan dengan tidak merubah warna media sehingga tetap berwarna hijau. Hal ini membuktikan bahwa *Brucella abortus* S-19 tidak memanfaatkan

natrium citrat sebagai sumber karbon untuk keperluan hidupnya (Alton *et al.*, 1988).

Uji *Sulfide Indol Motility* (SIM) menunjukkan hasil bahwa koloni *Brucella abortus* S-19 tusuk vertikal menunjukkan hasil bahwa kuman *Brucella abortus* S-19 tidak bergerak yang ditandai dengan tidak terbentuknya gambaran koloni bakteri yang menyebar. Hal ini menunjukkan bahwa kuman tersebut tidak memiliki flagela. Pada penambahan reagen Kovac menunjukkan bahwa kuman tidak mampu membentuk indol dari tryptophan, sehingga tidak ditemukan bentukan cincin merah pada lapisan atas media (Alton *et al.*, 1998).

Pada uji urea menunjukkan reaksi positif yaitu nampak adanya perubahan pada warna media yang dihasilkan dari orange menjadi merah muda. Hal ini membuktikan bahwa *Brucella abortus* S-19 menghasilkan enzim urease sehingga mampu menguraikan urea yang terdapat dalam media (Soebronto, 2001).

Berdasarkan hasil pengujian tersebut diperoleh hasil, bahwa *Brucella abortus* strain 19 yang berada dalam media tersebut adalah murni tidak ada kontaminan dari bakteri lain (hasil dapat dilihat pada lampiran 2).

5.2 Profil Outer Membran Protein dari *Brucella abortus* dengan metode SDS-PAGE

Pada SDS-PAGE, protein dielektroforesis dalam detergen ionik, yaitu *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS). Detergen ini akan mengikat residu hidrophobik dari bagian belakang peptida, salah satu dari setiap asam amino sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Analisis protein dengan menggunakan metode SDS-PAGE bertujuan untuk menentukan besarnya massa molekul relatif

dari protein yang terdapat dalam sampel berdasarkan berat molekul dan dalam fraksi apa saja protein tersebut ditemukan. Metode ini dapat mendeteksi protein berdasarkan berat molekulnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu. Protein terkonsentrasi pada garis tipis berupa pita atau *band* yang tipis. Pita protein yang terbentuk dari hasil SDS-PAGE menentukan perbedaan letak pita pada gel dengan membandingkan pada marker protein, untuk mendapatkan berat molekul yang tepat (Syahrial dkk., 2001; Rantam, 2003).

Pada penelitian ini didapatkan beberapa fraksi protein *Brucella abortus* yaitu: 55.3 kDa; 44.5 kDa; 38.2 kDa; 30.5 kDa; 24.4 kDa; 21.9 kDa; 20.3 kDa dan 14.7 kDa.

Menurut Cloeckaert (1992), OMP *Brucella abortus* strain 19 dapat digolongkan dalam tiga grup yaitu grup pertama dengan massa molekul 41 – 43 kDa yang telah didenaturasi dengan *sodium dodecyl sulfate*, merupakan massa molekul dengan sifat antigenik karena serupa dengan ikatan asam amino dari ompF *Escherichia coli*. Grup kedua dengan massa molekul 25 – 27 kDa dan 36 – 38 kDa merupakan OMP mayor. Hal tersebut ditandai dengan pita protein untuk massa molekul 20.3 - 30.5 kDa dan 30.5 - 38.2 kDa yang lebih tebal. Massa molekul protein tersebut mampu meningkatkan respons imun kelinci dalam membentuk antibodi dan merupakan immunodominan pada *Brucella abortus* B-3. Grup ketiga dengan massa molekul 10, 16.5 dan 19 kDa merupakan OMP minor pada *Brucella mellitensis* B115 CE dan *Brucella abortus* B-3, hal tersebut ditunjukkan dengan berat protein sebesar 14.7 kDa yang ditunjukkan dengan garis yang tipis.

Semakin tebal pita protein yang terlihat berarti semakin banyak berat molekul protein yang dipresentasikan setelah proses *elektroforesis*. Molekul yang memiliki berat molekul besar lebih bersifat *antigenik* dibandingkan dengan berat molekul yang kecil walaupun antigenitas suatu massa protein juga ditentukan dari kompleks fisiokimiawi suatu zat (Tizard, 1988).

Setelah dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan ELISA, yaitu mengambil serum dari hewan coba yang sebelumnya telah diinfeksi menggunakan OMP dari *Brucella abortus* B-3, terbukti bahwa protein yang mampu menginduksi antibodi adalah protein dengan massa molekul 10, 16.5, 19, 25 sampai 27 dan 36 sampai 38 kDa. Protein dengan berat molekul antara 36 – 38 kDa memberikan reaksi kuat dalam menstimulasi antibodi dibandingkan protein dengan massa molekul 25 – 27 kDa (Cloeckert, 1992).

Hal tersebut menunjukkan bahwa protein memiliki kemampuan untuk menginduksi antibodi. Sesuai dengan pernyataan Tizard (1988), protein merupakan antigen terbaik karena ukuran dan kerumitan strukturnya. Protein antigen yang sudah diketahui massa molekul relatif dapat dibuktikan apakah bersifat *immunogen* dengan mengaplikasikan pada hewan coba kemudian dilakukan pengukuran titer antibodi dari serum hewan terinfeksi.

Teknik *immunoblotting* digunakan untuk menentukan massa molekul relatif protein antigen yang dapat berikatan dengan antibodi dalam serum darah yang digunakan, ikatan yang terjadi memberikan arti bahwa antibodi yang terbentuk sesuai dengan antigen yang digunakan, sehingga dapat disimpulkan

bahwa protein antigen yang digunakan bersifat *antigenik* karena mampu berikatan dengan antibodi yang terdapat dalam serum darah hewan coba (Tizard, 1988).

Hasil *Elektroforesis* pada gambar 4.3 terlihat kurang jelas. Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan SDS-PAGE tersebut adalah kemurnian isolat, kebersihan isolat dan konsentrasi protein dalam ekstrak. Isolat yang murni akan menghasilkan pita protein yang baik, tidak terdapat pita protein yang menggelembung sehingga dapat mempermudah analisis berat molekul (BM) pada pita yang terbentuk. Kebersihan isolat mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk dalam gel, pita terlihat tajam dengan gel yang terang sehingga mempengaruhi analisis protein dan dokumentasi. Konsentrasi protein ekstrak mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada proses analisis maupun karakterisasi protein juga kecepatan pembentukan pita protein (Kusnoto, 2003).

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Hasil karakterisasi protein *Brucella abortus* strain 19 dengan metode SDS-PAGE diperoleh delapan pita protein yaitu 55.3 kDa; 44.5 kDa; 38.2 kDa; 30.5 kDa; 24.4 kDa; 21.9 kDa; 20.3 kDa dan 14.7 kDa.

6.2 Saran

Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dari delapan pita (*band*) protein *Brucella abortus* untuk menentukan protein mana yang memiliki sifat *immunogenik* spesifik sehingga menjadi lebih bermanfaat terhadap pengembangan pembuatan vaksin sub unit *Brucella abortus* strain 19.

RINGKASAN

Antonius Umar Samsudin. Identifikasi Profil Outer Membran Protein *Brucella abortus* Strain 19 dengan Menggunakan Metode SDS-PAGE. Di bawah bimbingan Wiwik Misaco Yuniarti, M.Kes.,drh sebagai pembimbing pertama dan M.Gandul Atik Yuliani, M.Kes.,drh sebagai pembimbing kedua.

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan: bagaimana profil protein outer membran dari *Brucella abortus* strain 19 dengan menggunakan metode SDS-PAGE.

Isolasi bakteri berasal dari sampel bakteri yang sudah dikering bekukan sebelumnya di Pusat Veterinaria Farma Surabaya kemudian dilakukan penanaman bakteri pada media umum *Potato Agar* kemudian dipindahkan pada media selektif *Blood Agar* dan *Tryptone Soya Agar* (TSA). Sedangkan identifikasi dilakukan dengan cara pengujian biokimia. Uji biokimia yang dilakukan antara lain *Sulfite Indol Motility* (SIM), *Simon Citrat Agar* dan *Urease*.

Selanjutnya isolat dari *Brucella abortus* dianalisis dengan menggunakan metode SDS-PAGE untuk mengidentifikasi profil dari *Outer Membran Protein* yang dinyatakan dalam berat molekul berupa kDa. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa profil protein dari *Brucella abortus* strain 19 memiliki delapan pita protein yaitu 55.3 kDa; 44.5 kDa; 38.2 kDa; 30.5 kDa; 24.4 kDa; 21.9 kDa; 20.3 kDa dan 14.7 kDa. Tebal tipisnya pita protein merupakan gambaran suatu protein dengan berat molekul serupa. Semakin tebal pita protein maka semakin banyak protein yang dipresentasikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abuh, H. A, Yohana, C. A, Ofukwu, A. R. 2006. Brucella Infection Among Hospital Patients in Makurdi Nigeria. Department of Veterinary Public Health and Preventive Medicine. University of Agriculture, Makurdi. Nigeria. <http://priory.com/med/brucella.htm28-k>
- Akoso, B.T. 1994. Kesehatan Sapi. Penerbit Kanisius. Hal. 74-77.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Techniques for the brucellosis laboratory.
- Alton, G.G., Lois M Jones, R.D Angus, J.M Verger. 1998. Techniques for The Brucellosis Laboratory. Institut de la Recherche Agronomic. Paris.
- Anita J. Edmonson. 1996. Animal Health Branch Extension Veterinarian Division of Animal Industry School of Veterinarian Medicine California Departement of Food and Agriculture Universit of California-Davis.
- Anonimus. 2004. Lipoproteins, Not Lipopolysaccharide, Are the Key Mediators of the Proinflammatory Response Elicited by Heat-Killed *Brucella abortus*. <http://jmm.sgmjournal.org/cgi/content/full/55/7/897>.
- Beh, KJ, 1974. Quantitative distribution of Brucella antibody among immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. Research in Veterinary Science, 17:1-4.
- Borrok. 1998. *Brucella abortus*. Reference from UMR Biological Science. University of Missouri-Rolla.
- Cardoso, Patricia Gomez, Gison Costa Macedo, Masco Azevedo and Sergio Costa Olivera. 2006. *Brucella* spp Noncanonical LPS: Structure, Biosynthesis, and Interaction with Host Immune System.
- Cloekaert Axel, Pierre Kerkhofs, Joseph N. Limet. 1992. Antibody Responses to *Brucella* Outer Membrane Proteins in Bovine *Brucellosis*: Immunoblot Analysis and Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies. Journal of Clinical Microbiology. USA.
- Cloekaert Axel, M.S Zygmunt, R.A Bowden and G. Dubray. 1995. OMP and Rough *Lipopolysaccharide* Spesific Monoclonal Antibodi Protect Mice against *Brucella Ovis*. Journal Medical Microbiology.
- Crawford RP, Huber JD, Adams BS, 1990. Epidemiology and surveillance. Animal brucellosis., 131-151; 91 ref.

- Dekeijzer P, 1981. *Brucella* biotypen in Belgia. *Landbouwtijdschrift*, 34:1513-152
- Dhamir, H. Abuh, M.H Tageldin, S.J Kenyon, O.F Idris. 2004. Isolation of *Brucella abortus* from Experimentally Infected Dromedary Camels in Sudan. Veterinary Publication Inc.
- Dharma, D.M.N. 2001. Pengendalian dan Pemberantasan *Brucellosis* Di Kalimantan Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional V. Banjarbaru. Kalimantan Selatan.
- Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur, 2006. Kebijakan Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur Dalam Upaya Pemberantasan *Brucellosis* di Jawa Timur. Disampaikan Pada Rapat Koordinasi Teknis Nasional Pemberantasan *Brucellosis* se Pulau Jawa.
- Direktorat Kesehatan Hewan Direktorat Jendral Bina Produksi Peternakan. 2004. dalam Perencanaan Tenaga Kerja Pertanian Medik dan Paramedik Veteriner. Jurnal Pengkajian 02-2004.
- European Molecular Laboratory. 2006. Bacteria Genomes - BRUCELLA ABORTUS *Brucella abortus* causes *Brucellosis* (spontaneous abortion in cattle and undulant fever in humans). <http://iai.asm.org/cgi/content/full/73/5/2873>.
- Handijanto, D. 2003. Pencegahan dan Penanggulangan *Brucellosis* pada Sapi Perah. Disampaikan Pada Rakor Pemberantasan *Brucellosis* di Jawa Timur. Hal 1 - 3
- Hardjopranjoto, S. H., 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 215-219.
- Hirst, G. R., 1995. Teknologi ELISA Dalam Diagnosa dan Penelitian. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 393-394, 369.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. William. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Williams & Wilkins. A. Waverly Company. USA.
- Jametz, E., Melnick.J.L., and Adelberg.E.A.1982. Review of Medical Microbiology. 14th. Ed. Lange Medical Publications. Los Alltos Chicago.
- Jane Taylor. 1992. *Micro Organisms and Biotechnology*. University of Bath. Science 16- 19. 2nd. Ed. Thomas Nelson and Sons Ltd. Hongkong.
- Karsinah, Lucky H. M., Suharto., Mardiasuti, H. W. 1994. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi Revisi. Binarupa Aksara. Jakarta. Hal. 188-190.

- Kompas. 2006. Empat Bulan Terakhir, 21 Sapi Terjangkit "Brucellosis" .
- Kunkel, D. 2004. Scientific Stock Photodraphy of Biological. <http://www.denniskunkel.com/DK/DK/bakteria/96554G.html>.
- Kusnoto. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunogenik Larva stadium II *Toxocara cati* Isolat lokal. Tesis. Progam Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Manthei CA, Deyoe BL, 1970. Brucellosis. In: Gibbons WJ, Catcott EJ, Smithcors JF, eds. Bovine Medicine & Surgery and Herd Health Management. American Veterinary Publications Inc., 104-121.
- Moncoulont, R. Bayouth, Nicot, C., Enjalbert, F. 2001. Ketone Bodies in Milk and Blood OF Dairy Cows: Relationship Between Concentration and Utilization for Detection of Subclinical Ketosis. J. Dairy Science. 84:583-589.
- Morgan, B. 1978. Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human *brucellosis* in adults: 16 years' experience in an endemic area. <http://www.sgm.ac.uk/>.
- National Publishing Inc. 1998. *Brucellosis in Cattle In Merck Veterinary Manual* 8th edition. Philadelphia.
- Office International des Epizooties. 2002. Manual of Diagnostic Test and Vaccine for Animal. Offices International des Epizooties. Refference from Bovine Brucellosis.
- Public Health Laboratory Network. 2004. Brucellosis Laboratory Cases Definition. Australian Government Departement of Health and Ageing. <http://www.dhac.gov.au/internet/wems/publishing.html>.
- Putra, A. A. G., Muthalib, A., Arsani N. M., Sunarya, G. M., Yuwana W. S. 2001 Evaluasi Pemberantasan *Brucellosis* Pada Sapi atau Kerbau di Pulau Lombok. Data Surveillance s/d Bulan September 2001. Disampaikan Pada Workshop National *Brucellosis*.
- Quinn, P. J., B. K. Markey, M. E. Carter, W. J. Domelly and F. C. Leonard. 2002. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing. Great Britain. Hal.162-167.
- Rantam, F.A., 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Richardson, M., Jane N. Holt. 1962. Synergistic Action of Streptomycin With Other Antibiotics on Intracelluler *Brucella Abortus* In Vitro. American Society For Microbiology (ASM). USA.

- Richey, E. J., Dix Harrel. 1996. *Brucella abortus* Disease (brucellosis) in Beef Cattle. First Print March 1997. University of Florida. USA.
- Robert, F. W. 2003. Molecular Biology 2nd Edition. International Edition. Migraw-Hill.
- Subronto, I. T. 2001. Ilmu Penyakit Ternak 1. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 464-485.
- Sutiman, B. Sumitro, Rahayu, S. Fatchiyah. Widyarti, S. Arumningtyas, L. Estri. 1996. Kursus Teknik – Teknik Dasar Analisis Protein dan DNA. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- Syahrial, I., F.A. Rantam dan Yoes Prijatna D. 2001. Identifikasi varian antigenik *Trypanosoma evansi* hasil isolasi dari mencit fase akut dan kronik. Media Kedokteran Hewan. April. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. 62.
- Syarief, M. Z. dan Sumoprastowo, R. M. 1985. Ternak Perah. C. V Yasaguna. Jakarta. Hal. 154-155.
- Tittarelli. 2008. *Brucella abortus* strain RB51 Vaccine Immune Response After Calf hood Vaccination and Field Investigation in Italian Cattle Population. [Http://priorityjournalclindevImmunol.org.uk](http://priorityjournalclindevImmunol.org.uk).
- Tizard, I. 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Airlangga University Press. Surabaya.
- Volk, W.A. Wheeler, M.F. 1993. Mikrobiologi Dasar. Erlangga. Jakarta. Hal 213.
- WHO. 1971. Joint FAO/WHO Expert Comitee on *Bricellosis*. Fifth report. Geneva. Hal. 37-47.
- Wikipedia. 2007. Free Encyclopedia Facts About *Brucellosis*.
- Wolfgang, K.J., Willet.H.P., Amos D.D., Willfeet.C.M. 1992. Zinsser Microbiology. 19th. Ed. Prentice Hall Internasional Inc. Appleton and Lange. USA.
- World Animal Health. 2004. New Activities of The Veterinary Services. Comment on Selected List B Disease. <http://mic.sgmjournal.org/cgi/content/abstract/143/9/2913>.

Lampiran 1. Penghitungan Massa Molekul Relatif (MR) *Brucella abortus* strain 19 menggunakan cara regresi *cubic*

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang dipindahkan oleh proein sampel}}{\text{Jarak yang dipindahkan oleh bahan pembawa}}$$

Jarak yang dipindahkan oleh bahan pembawa adalah 129mm

Jarak Marker	Rf* (marker)	BM (y KDa)	BM (y Da)	log y (Da)
20.0	0.155	95.0	95000	4.978
29.0	0.225	72.0	72000	4.857
40.0	0.310	55.0	55000	4.740
57.0	0.442	36.0	36000	4.556
97.0	0.752	28.0	28000	4.447
112.0	0.868	17.0	17000	4.230
125.0	0.969	11.0	11000	4.041

Regression

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Log BM

Cubic

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
.996	.993	.986	.040

The independent variable is Rf.

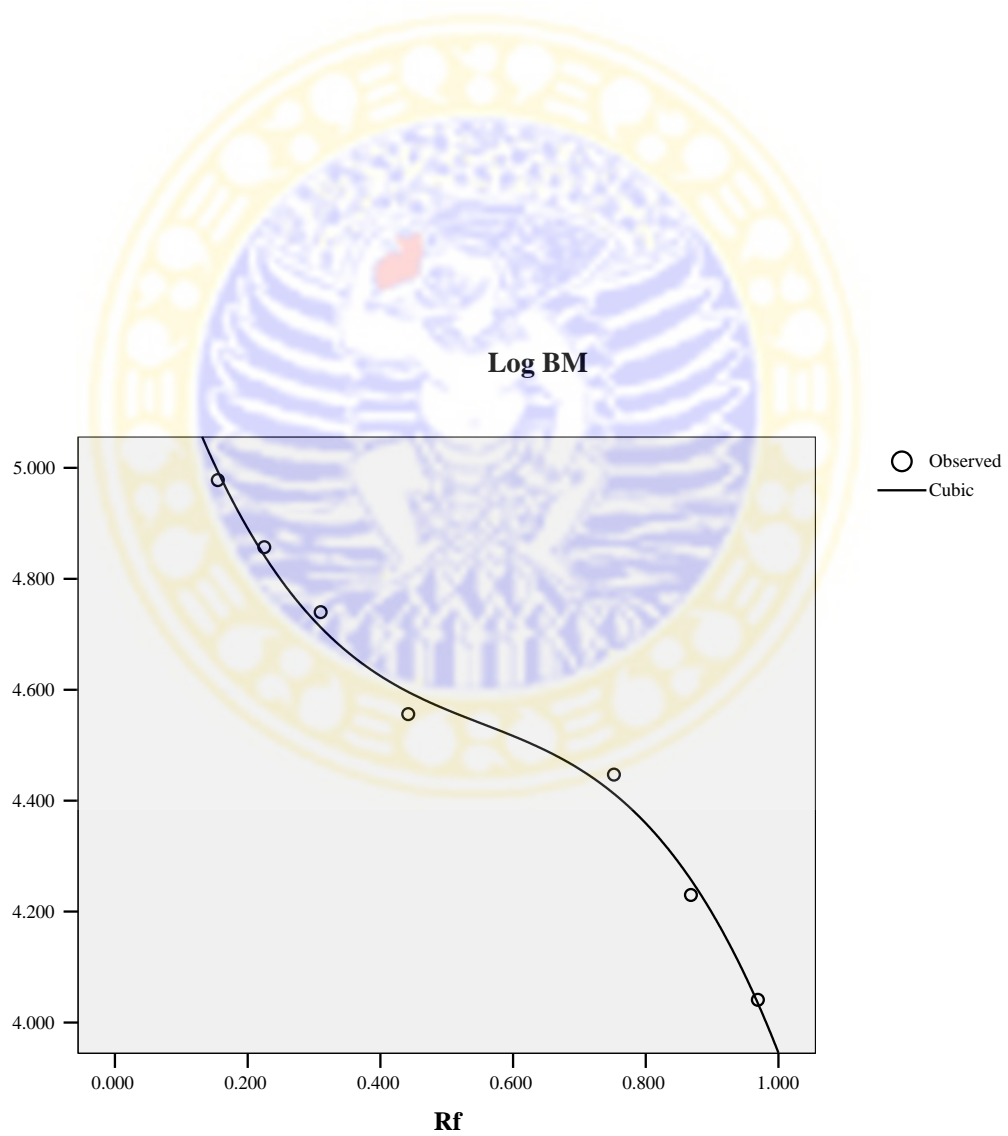
ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	.681	3	.227	141.589	.001
Residual	.005	3	.002		
Total	.686	6			

The independent variable is Rf.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf	-4.413	.926	-4.283	-4.766	.018
Rf** 2	7.151	1.841	7.896	3.885	.030
Rf** 3	-4.315	1.094	-4.669	-3.945	.029
(Constant)	5.522	.131		42.029	.000



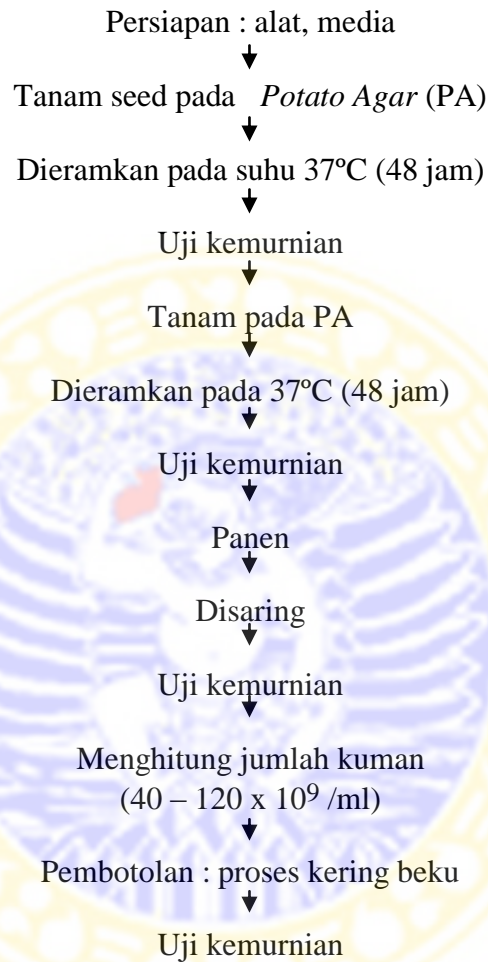
Jarak Sampel	Rf (Sampel)	log y* (Da)	y (Da)	y kDa
37.0	0.287	4.743	55,335.0	55.3
48.0	0.372	4.648	44,463.0	44.5
60.0	0.465	4.582	38,194.4	38.2
85.0	0.659	4.485	30,549.0	30.5
100.0	0.775	4.388	24,434.0	24.4
105.0	0.814	4.341	21,928.0	21.9
108.0	0.837	4.308	20,323.6	20.3
118.0	0.915	4.166	14,655.5	14.7

$$Y = 5.522 - 4.413x + 7.151x^2 - 4.315x^3$$



Lampiran 2. Teknik Isolasi dan Identifikasi *Brucella abortus* S-19

Penanaman *Brucella abortus* S-19 pada media potato agar Cara kerja Penanaman pada media Potato Agar



A



B

Gambar 1. Hasil Penanaman pada PA tampak biakan difus, berwarna krem.

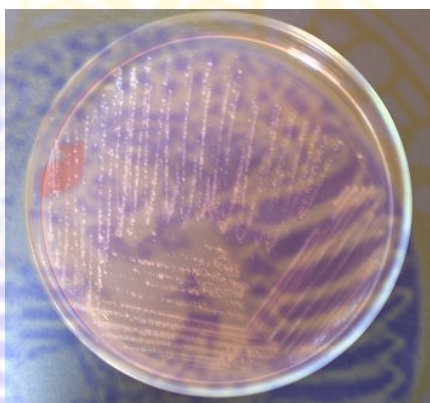
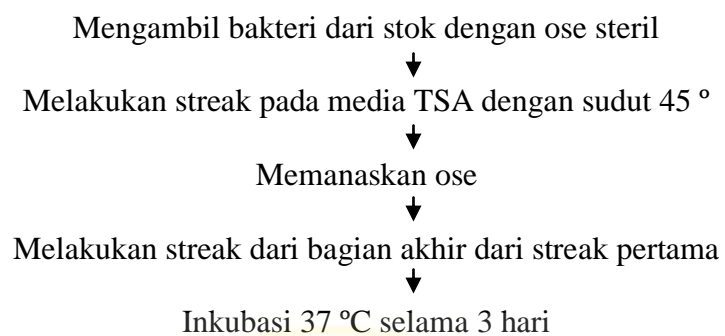
Keterangan :

A = Media PA yang belum ditumbuhi bakteri

B = Media PA yang sudah ditumbuhi bakteri

Penanaman *Brucella abortus* S-19 pada media TSA

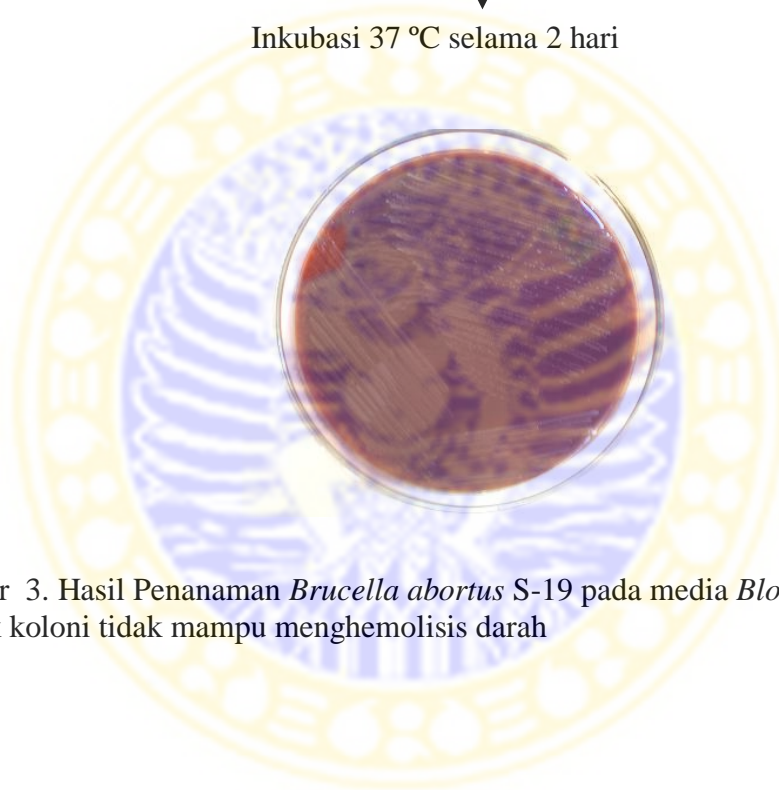
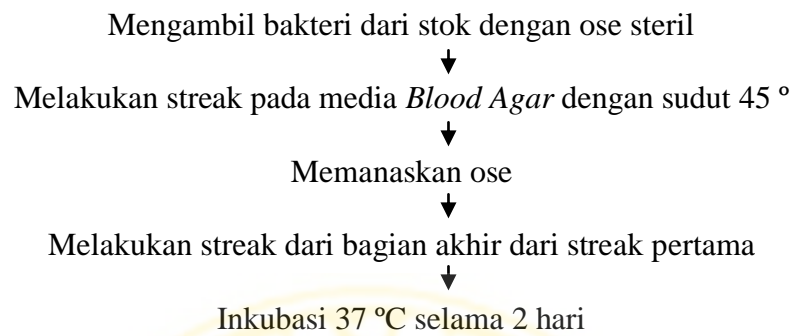
Cara kerja Penanaman pada media TSA



Gambar 2 . Hasil Penanaman *Brucella abortus* S-19 pada media TSA tampak koloni kecil, halus dan berwarna krem.

Penanaman *Brucella abortus* S-19 pada media *Blood agar*

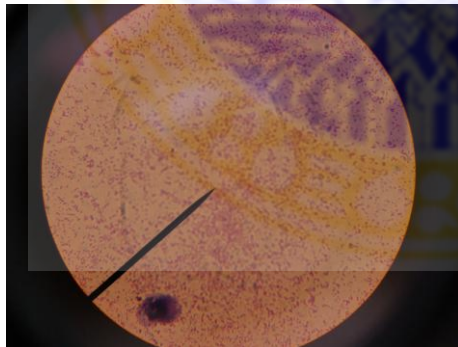
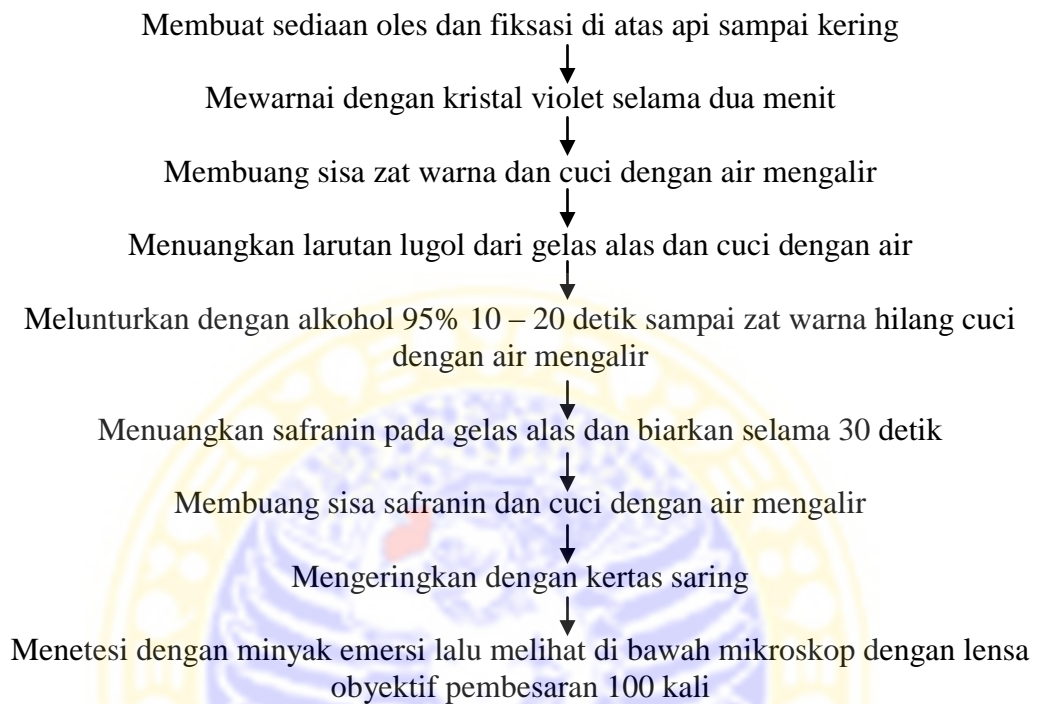
Cara kerja Penanaman pada media *Blood Agar*



Gambar 3. Hasil Penanaman *Brucella abortus* S-19 pada media *Blood Agar* tampak koloni tidak mampu menghemolisis darah

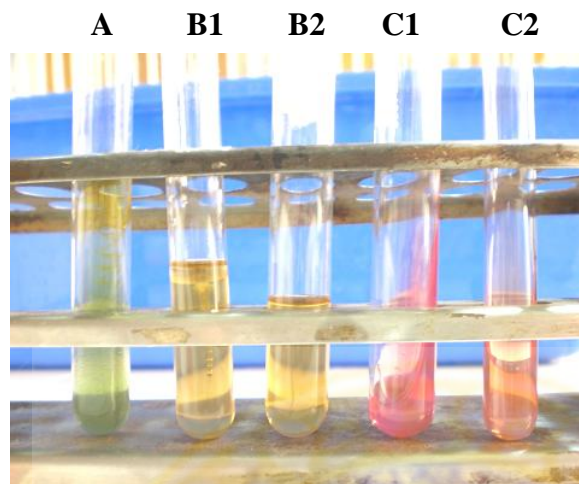
Identifikasi *Brucella abortus* S-19

Cara kerja Pewarnaan Gram (Volk, et.al., 1993)



Gambar 4. Gambaran mikroskopis *Brucella abortus* bentuk *coccobacillus* bergerombol atau berpasangan dan bersifat gram negatif.

Uji Biokimia dari *Brucella abortus*



*B2 : SIM kontrol

*C2 : Urease kontrol

Gambar 5. Hasil Uji biokimia

Keterangan :

- A : *Simmons Citrate* → negatif
 B1 : *Sulfite Indol Motility (SIM)* → motil, indol negatif
 C1 : *Urease* → positif

Cara kerja Uji biokimiawi

a. Simmons Citrate

Mengambil bakteri dari stok dengan ose steril

↓
Streak pada bagian miring

↓
Inkubasi 37 °C selama 3 hari

b. SIM

Mengambil bakteri dari stok dengan ose steril

↓
Menusukkan ose pada media SIM pada ¾ bagian

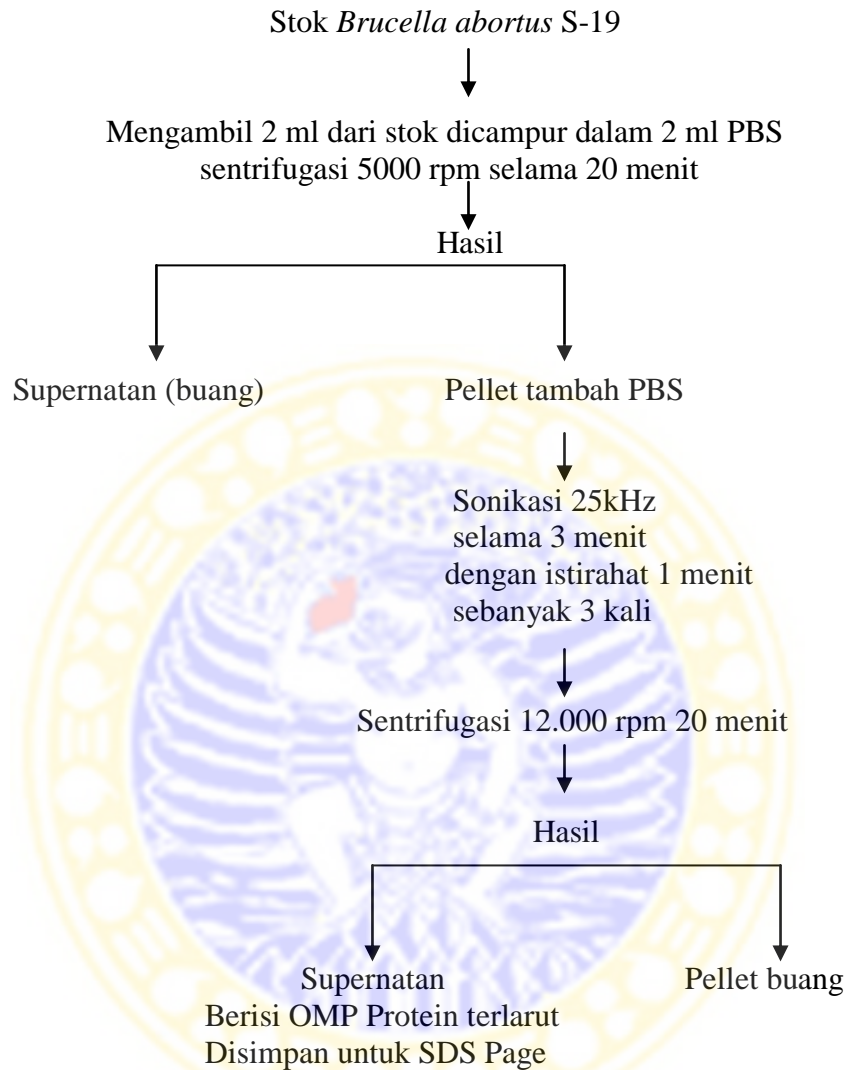
↓
Inkubasi 37 °C selama 3 hari

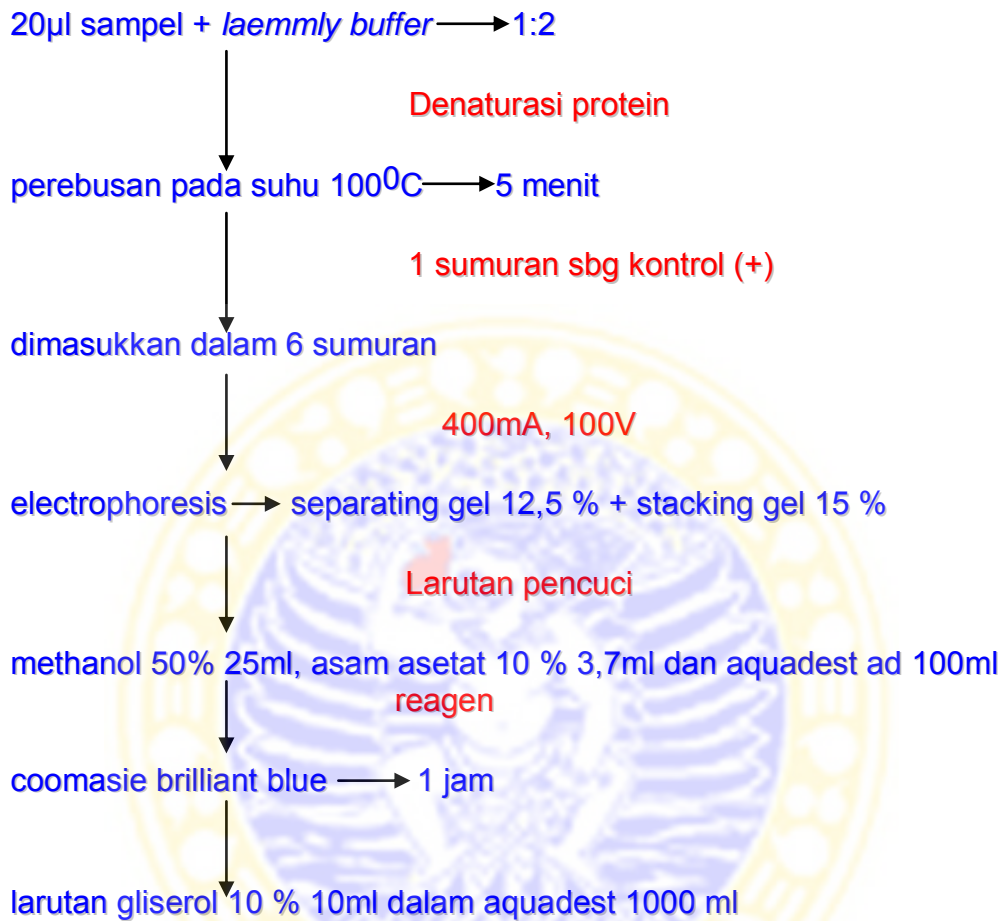
c. Urea agar

Mengambil bakteri dari stok dengan ose steril

↓
Streak pada bagian miring

↓
Inkubasi 37 °C selama 3 hari

Lampiran 3. Pembuatan OMP *Brucella abortus* S-19

Lampiran 4. Analisis protein dengan teknik SDS-PAGE

Lampiran 5. Komposisi bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian**Komposisi *stacking gel* 5%**

aquadest	5,66 ml
tris Hcl pH 6,8	2,50 ml
acrylamid 30%	1,70 ml
SDS 10%	0,10 ml
TEMED	10 μ l
APS 10%	50 μ l

Komposisi *separating gel* 12,5%

acrylamid 30%	7,90 ml
tris Hcl pH 8,8	5 ml
SDS 10%	0,20 ml
aquadest	6,90 ml
TEMED	5 μ l
APS 10%	40 μ l

Komposisi Potato Agar

Kentang	5kg
Aquades	20 l
Agar bacteriological	175 gr
NaCl	
Pepton	70 gr
Lab lemeo powder	35 gr
Gliserin	130 cc
NaOH	

Komposisi Blood Agar**Formula Blood Agar Base Oxoid**

Lab-Lemco Powder	gram per liter	10
Peptone		10
Sodium chloride		5
Agar		15
pH 7,3 \pm 0,2		

Komposisi SIM**Formula SIM Oxoid**

Triptone	gram per liter	20
Peptone		6,1
Ferrous Ammonium Sulphate		0,2
Sodiumthiosulphate		0,2
Agar		3,5
pH 7,3 \pm 0,2		

Simmons Citrate Agar**Formula Simmons Citrate Agar Oxoid**

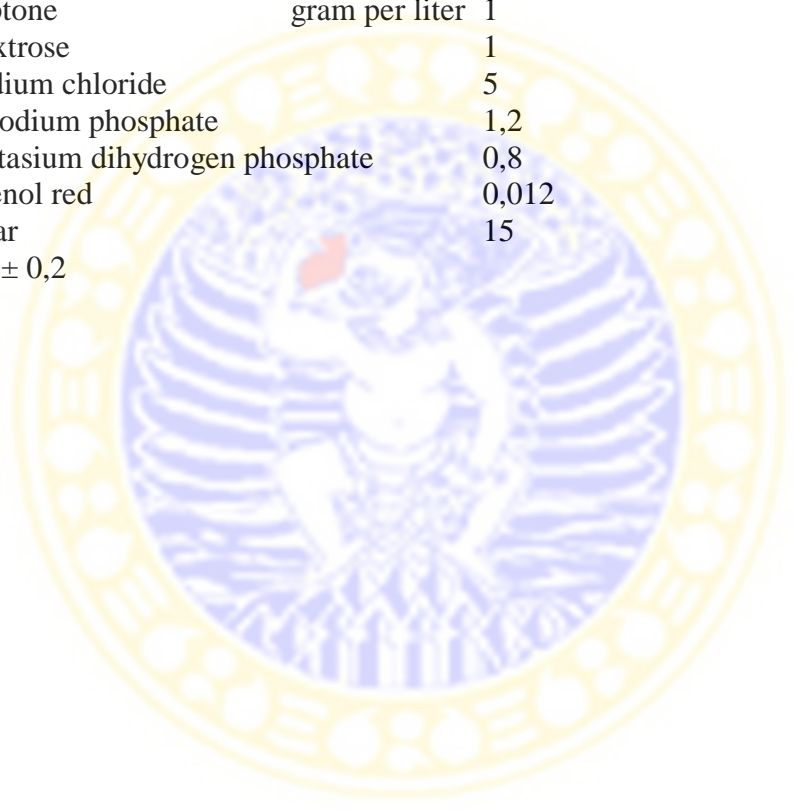
Magnesium sulphate	gram per liter	0,2
Ammonium dihydrogen phosphate		0,2
Sodium citrate, tribasic		0,8
Sodium chloride		2
Bromothymol blue		5
Agar		15
pH $7 \pm 0,2$		

Urea Agar

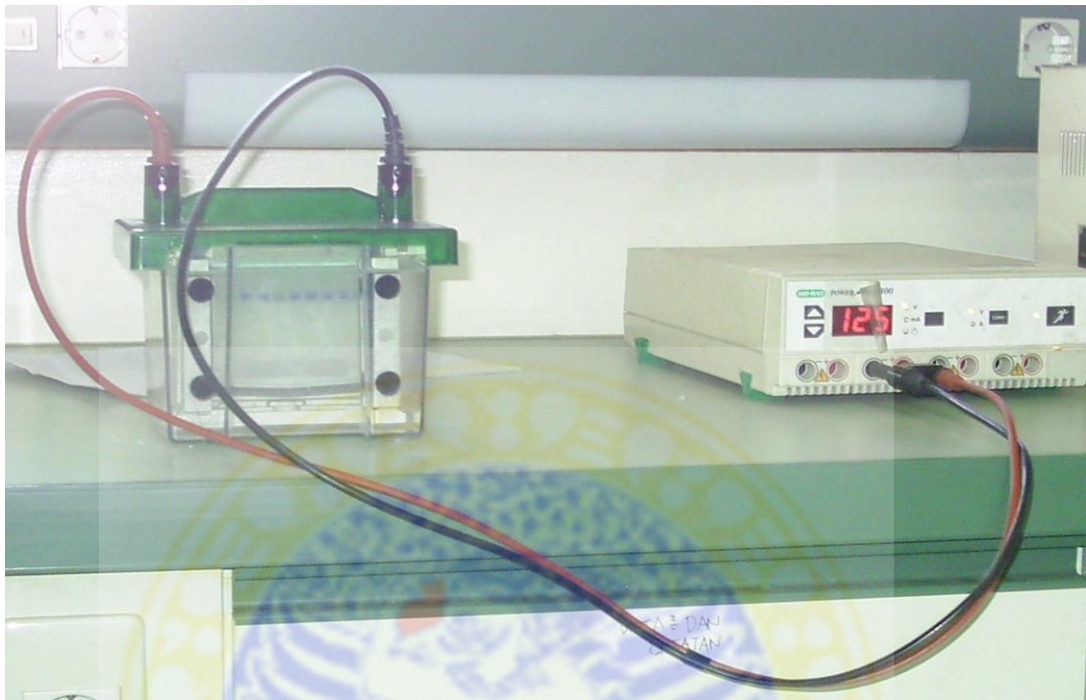
Formula Urea Agar Base Oxoid

Formula Urea Agar Base Oxoid

Peptone	gram per liter	1
Dextrose		1
Sodium chloride		5
Disodium phosphate		1,2
Pottasium dihydrogen phosphate		0,8
Phenol red		0,012
Agar		15
pH $6,8 \pm 0,2$		



Lampiran 6. Gambar Peralatan Penelitian



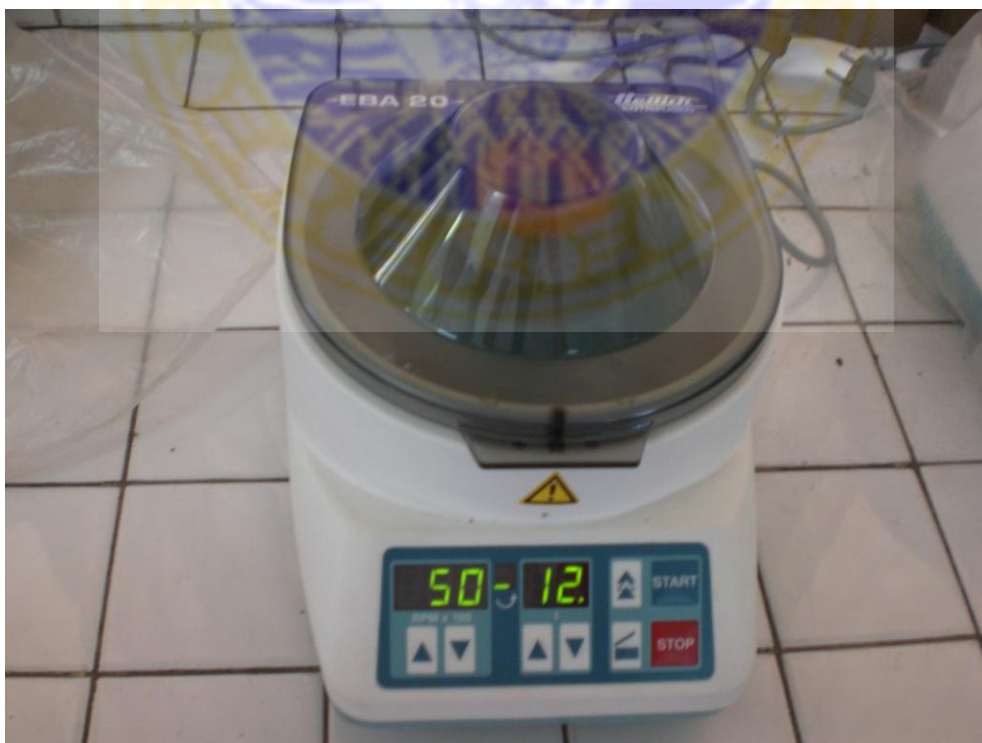
Gambar 6.1. SDS-PAGE *equipment*



Gambar 6.2 shaker



Gambar 6.3 Ultrasonic homogenizer



Gambar 6.5 Sentrifuge