

DISERTASI

PENENTUAN PROTEIN ANTIGEN LIMFOSIT SAPI (BoLA) DAN HUBUNGAN EKSPRESINYA DENGAN KERENTANAN TERHADAP PENYAKIT JEMBRANA

STUDI IMUNOGENETIK PADA BEBERAPA BREED SAPI DI INDONESIA



NI KETUT SUWITI



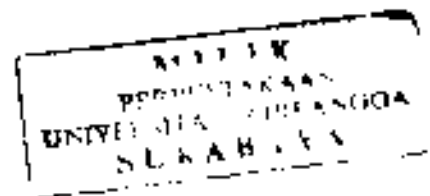
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

**PENENTUAN PROTEIN ANTIGEN LIMFOSIT SAPI
(BoLA) DAN HUBUNGAN EKSPRESINYA
DENGAN KERENTANAN TERHADAP
PENYAKIT JEMBRANA**

STUDI IMUNOGENETIK PADA BEBERAPA BREED SAPI DI INDONESIA

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
dan telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
pada hari Selasa
Tanggal 30 April 2002
Pukul 10.00 WIB,



Oleh :

NI KETUT SUWITI

N I M : 0996123160 D

LEMBAR PENGESAHAN

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 15 MEI 2002**

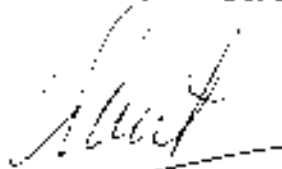
**OLEH
PROMOTOR**



Prof. Dr. Putu Gede Konthen, dr. SpPD.

NIP. 130 189 825

KO-PROMOTOR I



**Prof. I. Gusti Bagus Amitaba, drh.
NIP. 130 072 66**

KO-PROMOTOR II



**Dr. Irwan Setiabudi, dr. SpPK
NIP. 130 238 881**

Telah diuji pada ujian Doktor Tahap I (tertutup)

Tanggal 27 Februari 2002

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua Prof. Dr.H. Soehartojo Hardjopranjoto, drh MSc.

- Anggota**
1. Prof. Dr. Putu Gede Komhen, dr. SpPD
 2. Prof. I Gusti Bagus Amitaba, drh
 3. Dr. Irwan Setiabudi, dr. SpPK
 4. Prof. Dr. Eddy Pranowo S, dr, MPH.
 5. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
 6. Kuntoro, dr., MPH, Dr. PH.
 7. Drh. Nining Hartaningsih, MVSc. PhD.

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor . 1983/J.03/PP/2002
Tanggal 12 Maret 2002**

Ilmu pengetahuan dan ajaran suci
Merupakan penerang bagi ketiga dunia ini
bersinar maha sempurna
(Sloka. 24)



**Kebaikan yang sejati tidak pernah berubah,
Akan tetap diingat walaupun sampai keakhir jaman,
dan karenanya
berbuatlah sebanyak-banyaknya.
(suwiti, 02)**

UCAPAN TERIMAKASIH

Mengawali penulisan disertasi ini, saya memanjatkan puji syukur kehadirat Ida Sang Hyang Widhi/Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan anugrah-Nya yang telah dilimpahkan, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian disertasi dengan seluruh kegiatan akademisnya, dalam suasana kedamaian.

Selama menjalani pendidikan Doktor, sungguh banyak bantuan dan dorongan dari berbagai pihak. Untuk semua itu perkenankanlah saya menyampaikan ucapan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

Prof. Dr. Putu Gede Konthen, dr. SpPD, atas kesediaan beliau menjadi promotor di dalam kesibukannya yang sangat padat masih berkenan meluangkan waktu untuk membimbing, dengan tulus memberikan dorongan semangat yang sangat berguna dalam melaksanakan penelitian sehingga mampu menyelesaikan disertasi ini.

Prof. I Gusti Bagus Amitaba, drh. Selaku Ko-promotor I yang telah banyak memberikan bimbingan dorongan moral yang sangat berguna dan dengan penuh kasih sayang turut memberikan jalan keluar, setiap menemukan permasalahan selama mengikuti program Doktor.

Dr. Irwan Setiabudi, dr. SpPK, selaku Ko-promotor II, yang juga memberikan petunjuk saran dan bimbingannya, sehingga dapat menyelesaikan serta menyempurnakan disertasi ini dengan penuh semangat dan kedamaian.

Pemerintah Republik Indonesia cq. Menteri Pendidikan dan Kebudayaan melalui Proyek BPPS yang telah menyediakan dana selama pendidikan Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Rektor Universitas Airlangga, Surabaya. Prof. Dr. .Med. Purihito, dr. dan mantan rektor, Prof H Soedarto, dr.DTM&H, PhD yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Program Pascasarjana di Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr.SpP(K) dan mantan Direktur Prof. Dr.H.Soedijono Tirtowidardjo, dr. Sp.THT., yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Program Pascasarjana di Universitas Airlangga

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran S3 Program Pascasarjana Prof. Dr. Juliati Hood Alsegaf, dr,MS, SpPA, FIAC, saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya karena telah membantu di dalam proses pelaksanaan ujian kualifikasi, Proposal, Kelayaan, Ujian tertutup (tahap I) dan Ujian terbuka (tahap II).

Rektor Universitas Udayana, Prof. Dr. I Wayan Wira, DSJP dan mantan Rektor Prof. Dr. I Ketut Sukardika,dr.DMSK. yang telah memberikan izin kepada saya untuk memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Program Doktor pada Pascasarjana di Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Ibu Drh. A. A. Ayu Mirah Adi, MSi dan mantan dekan, Bapak Dr. I Nyoman Sadra Dharmawan, drh. MS. atas izin yang telah diberikan kepada saya memberikan kesempatan untuk mengikuti Program Pascasarjana di Universitas Airlangga.

Kepala Balai Penyidikan Pengujian Veteriner Wilayah VI Denpasar, Bapak Drh. A. A. Putra, MSc PhD SH. beserta staf, dengan tulus memberikan izin tempat penelitian dan bantuan berupa bahan dan zat kimia yang sangat penting dalam penelitian disertasi ini.

Kepala Balai Informasi Peternakan (BIP), Bapak Drh. Putran Jaya, beserta staf atas kebaikannya memberikan izin tempat pengambilan sampel Sapi Bali di Desa Marga, Tabanan Bali.

Kepala Dinas Peternakan Dati II Bangkalan dan Kepala Karantina Kamal Madura, Bapak Drh. Zainal, atas kerjasamanya memberikan izin dan turut membantu mengumpulkan sampel sapi Madura

Direktur Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga, Prof. Dr. Yoes Priyatna Dahlan, dr. MSc. atas izin dan perkenan beliau dapat memanfaatkan Lab. Dengue sebagai tempat penelitian

Yang tidak terlupakan staf Pengajar di Program Pascasarjana Universitas Airlangga, antara lain : Prof. Bambang Rahino Setokoesomo, dr., Prof Eddy Pranowo Soedibjo, dr. MPH., Prof Dr. Pitono Soeparto, dr. SpAK., Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., Prof. Soetandyo Wignjosnebroto., Prof. Dr. Sarmanu, Drh. MS, Widodo. J. Pudjirahardjo, MS. MPH. DrPH., Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS., Dr M Zainudin, Apt., Dr Siti Pariani, dr. Fuad Amisyari, dr. MPH, PhD.

Panitia penilai naskah disertasi, antara lain Prof Dr P.G. Konthen, dr. SpPD, Prof. I.G.B. Amitaba, drh., Dr. Irwan Setiabudi dr, SpPK., Prof Eddy Pranowo Soedibjo, dr. MPH., Prof. Dr. Sri Subekti, B.S., Drh. Kuntoro, dr, MPH. DrPH, Dr Fedik Abdul Rantam, drh

Panitia penguji Disertasi Tahap I (tertutup) antara lain : Prof, Dr. H. Soehartojo Hardjopranjoto, drh MSc, Prof. Dr. Putu Gede Konthen, dr, SpPD., Prof. I Gusti Bagus Amitaba, drh., Prof Eddy Pranowo Soediby, dr MPH, Dr Irwan Setiabudi dr, SpPK, Kuntoro, dr, MPH. DrPH, Dr Fedik Abdul Rantam, drh., Drh. Nining Hartaningsih, MVSc PhD

Panitia penguji Disertasi tahap II (terbuka) antara lain . Prof Dr PG Konthen, dr. SpPD, Prof IGB Amitaba, drh. Dr. Irwan Setiabudi, dr SpPK. Prof Purnomo Suryohudoyo, dr Prof. Dr. Mustahdi S, drh Prof Dr. Sri Subekti B. DEA. Drh Prof Soegeng Soekanto, dr. MSc PhD. Dr. Harianto Notopuru, dr MS Prof Dr H. Soehartojo Hardjopranjoto, drh MSc Prof Dr Juliaty Hood A. dr MS SpPA FIAC

Seluruh staf Histologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, atas kerjasamanya sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian disertasi ini dengan baik.

Kuntoro, dr. MPH. DrPH. Ir. Putu Sampurna, MP. Sebagai konsultan atas bantuan pemikirannya dalam rancangan, serta memberikan perhatian dan bimbingannya dalam metodologi penelitian terhadap pendekatan statistik dalam analisis penelitian ini

Yang tidak pernah saya lupakan Bapak Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh. sangat banyak membantu penelitian dan memberikan bimbingan mulai dari awal sampai berakhirnya penulisan disertasi ini, baik mengenai materi maupun tentang teknis pelaksanaan di laboratorium.

Drh. I Nyoman Mantik Astawa, PhD., Drh. Nining Hartaningsih, PhD, Drh. Agustini, Drh. Masa Tenaya, MPhil, Drh. Budiantono, Drh. K. Elly Supartika, Drh. Luh Dartini, Fkaana, Cok, Mundra, Mayun, Suta, Sudiarka, Brati, Suendra dan seluruh staf BPPH, demikian juga teknisi di Lab. TDC : Helen, Indah, Inayah dan Bapak Chosen, yang dengan setia dan sabar membantu mulai pengumpulan sampel, pengerjaan di Laboratorium sampai penelitian ini selesai.

Kepada seluruh teman Program Pascasarjana Universitas Airlangga, terutama pada program studi Ilmu Kedokteran angkatan tahun 1998/1999, yang telah banyak membantu dan kerjasamanya selama perkuliahan sampai selesainya penulisan disertasi ini.

Terimakasih yang sebesar-besarnya dan rasa hormat serta penghargaan yang setinggi-tingginya saya haturkan kepada kedua orang tua saya, Bapak Nyoman Sumantra dan Ibu Nyoman Suarni, atas bantuan dana penelitian yang telah diberikan, sehingga saya dapat menyelesaikan disertai ini dan disertai doa serta kasih sayang mendidik saya dengan tulus. Tiada kata yang dapat mewakili atas segala kebaikan yang telah diberikan. Untuk semua jasa beliau semoga Tuhan memberikan umur panjang, kesehatan dan rejeki yang berlimpah.

Kedua mertua saya dan kakak & adik ipar yang telah memberikan semangat dan bantuannya, sehingga memotivasi saya untuk segera menyelesaikan pendidikan ini. Semoga Ida Sang Hyang Widhi selalu melimpahkan kasih sayang kepada beliau dan selalu berada dalam lindungannya.

Kepada saudaraku tercinta . Nyoman Okantara SH (Alm), Ir. Ketut Suwiti, Ir Made Suartini dan Nyoman Suratini, ST, beserta keluarga, atas dorongan dan doa restunya sehingga pendidikan S3 ini dapat saya selesaikan,

dan pada kesempatan ini saya mohon maaf akibat kesibukan dalam menyelesaikan pendidikan dan tempat yang berjauhan terasa mengurangi kehangatan persaudaraan kita.

Setulus hati saya mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terkasih dan tercinta suami saya, Drh. I Nengah Kerta Besung, MSi. yang telah memberikan izin mengikuti program S3 ini dan dengan setia mendampingi, membantu di dalam menyelesaikan disertasi serta dengan penuh pengertian dan kesabaran mengasuh anak-anak.

Doa dari anakku: I Gede Oga Pramarsutha (10 tahun) dan I Made Sutha Saskara (9 tahun) atas pengertian yang diberikan selama ditinggal untuk mengikuti Program Doktor serta turut memberikan suasana kedamaian untuk keberhasilan studi ibu. Semoga dikemudian hari kalian dapat berguna bagi agama bangsa dan negara, serta melebihi kemampuan kedua orang tuamu.

Akhirnya kepada semua pihak, teman sejawat, pegawai dan handai taulan yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu dan telah membantu dalam memberikan dorongan semangat dalam penyelesaian disertasi ini saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya. Semoga Tuhan memberikan rahmat yang berlimpah kepada semuanya.

RINGKASAN

Penelitian Penentuan Protein Antigen Limfosit Sapi (BoLA) dan Hubungan Ekspresinya dengan Kerentanan terhadap Penyakit Jembrana, telah dilakukan di Lab. Unit Penyidikan Penyakit Jembrana-BPPV dan Lab Dengue – TDC Universitas Udayana. Mulai bulan Nopember th. 2000 sampai dengan bulan Nopember th 2001

Penelitian ini terdiri dari empat tahap yaitu : tahap pertama, menentukan hubungan ekspresi antigen limfosit sapi dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana. Tahap ke dua, menentukan ekspresi antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura pada tiga serotipe monoklonal antibodi. Pemeriksaan mempergunakan metode Imunositokimia, sedangkan rancangannya dengan Rancangan Faktorial

Tahap ke tiga dari penelitian ini adalah , menentukan perbedaan berat molekul protein antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura, dengan melakukan karakterisasi band yang muncul pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE, analisis data mempergunakan Analisis Multivariat. Tahap ke empat menentukan protein antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura dengan mengujikan terhadap monoklonal antibodi BoLA klas I dan klas II. Metode yang dipergunakan dengan Western-Imunoblotting.

Hasil penelitian menunjukkan . Adanya hubungan antara ekspresi antigen limfosit sapi Bali dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana pada serotipe B5C ($P < 0,05$), sedangkan dengan serotipe BAQ150A dan H34A tidak ada hubungan ($P > 0,05$). Ekspresi antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura masing-masing mempunyai spesifisitas. Terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) berat molekul protein antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura.

Penelitian tahap ke empat memberikan hasil sebagai berikut : Berat molekul protein antigen limfosit sapi Bali klas I : 47 kD (rantai α) dan 11 kD (rantai β) dan klas II : 25 kD (rantai α), sapi peranakan Ongole klas I : 45 kD (rantai α) dan 12 (rantai β) klas II: 36 kD (rantai α) dan sapi Madura klas I : 48

kD (rantai α) dan 11 kD (rantai β) kelas II: 26 kD (rantai α). Dalam penelitian ini berhasil mengisolasi protein antigen limfosit, yang dapat dipergunakan sebagai dasar imunodiagnostik.



ABSTRACT

Bali cattle have a number of advantages under Indonesia condition, they have disadvantages. A major problem is their unique susceptibility to Jembrana disease, a disease detected only in Indonesia and endemic in Bali, Kalimantan, Java and Sumatra. Research has demonstrated that the MHC of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle is termed the Bovine Lymphocyte Antigen system (BoLA) contributes to disease resistance and susceptibility.

A study was conducted to the association of expression class I and class II bovine lymphocyte antigen (BoLA) to the Jembrana disease susceptibility. The aim of this study was to determine the expression of Bali cattle, Ongole cross breed (PO) and Madura cattle of the bovine lymphocyte antigen in the three serotypes of MoAB specific for bovine major histocompatibility complexes class I and class II antigen. The expression of BoLA were detected using immunocytochemistry method.

An experiment was done to detect of bovine lymphocyte antigen protein in Bali cattle, PO and Madura cattle. The protein were detected using electrophoresis performed on 12% slab gel according to the method of Laemmli. The experimental design used was completely randomized design.

Determination of protein Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) by testing monoclonal antibodies on class I (B5C) and class II (BAQ150A, H34A). The samples were run on the Mini-Protein cell and electrophoretically transferred to nitrocellulose, using Western-Immunoblotting method.

This study indicate that: there was a significant ($P < 0,05$) association between BoLA class I serotype B5C with the Jembrana disease susceptibility. Expression of bovine lymphocyte antigen were significantly influenced ($P < 0,05$) by the *breed* of cattle. Molecular weight of the class I protein bovine lymphocyte antigen in Bali cattle: 47 kDa (α chain) and 11 kDa (β chain) and class II: 25 kDa (α chain), PO class I: 45 kDa (α chain) and 12 (β chain) class II: 36 kDa (α chain) and Madura cattle class I: 48 kDa (α chain) and 11 kDa (β

chain) class II: 26 kDa (α chain). The research were to find the bovine lymphocyte antigen protein in Bali cattle, Ongole cross breed and Madura cattle.

Keywords: Bovine lymphocyte antigen(BoLA), MoAb, B5C, BAQ150A, H34A Electrophoresis, Immunocytochemistry, Serotypes, Cattle, Western-Immunoblotting.



DAFTAR ISI

	halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Ucapan Terimakasih	vi
Ringkasan	xi
Abstract	xiii
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Runtusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	9
1.4 Manfaat Penelitian	10
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	12
2.1 Antigen Limfosit sapi (Bovine Limfosit Antigen/BOLA)	12
2.2 Komponen Sistem Imun	31
2.3 Aspek Biologi Struktur Antigen	38
2.4 Penyakit Jembrana	40
2.5 Deskripsi <i>Breed</i> Sapi di Indonesia	51
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	56
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	56
3.2 Hipotesis Penelitian	59
BAB 4 METODE PENELITIAN	60
4.1 Rancangan Penelitian	60

4.2	Populasi sampel, Besar sampel dan Teknik Pengambilan Sampel..	62
4.3	Variabel Penelitian	64
4.4	Bahan Penelitian.....	66
4.5	Instrumen Penelitian	68
4.6	Lokasi dan Waktu penelitian	69
4.7	Prosedur Pengambilan Data	70
4.8	Analisis Data	73
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN		74
5.1	Pengamatan Karakterisasi Sapi	74
5.2	Pengamatan Gejala Klinis Penyakit Jembrana	76
5.3	Pengamatan Hematologi dan Serologi Penyakit Jembrana	77
5.4	Perubahan Patologi Anatomi dan Histopatologi Penyakit Jembrana.	81
5.5	Hubungan Ekspresi Antigen Limfosit dengan Kerentanan Sapi Bali terhadap Penyakit Jembrana	82
5.6	Ekspresi Antigen Limfosit Sapi Bali, PO dan Sapi Madura pada Tiga Serotipe MoAb Klas I dan Klas II	84
5.7	Berat Molekul Protein Antigen Limfosit Sapi Bali, PO, dan Sapi Madura	87
5.8	Penentuan Protein Antigen Limfosit Sapi Bali, PO dan Sapi Madura	90
BAB 6 PEMBAHASAN		95
6.1	Pengamatan Karakterisasi Sapi	94
6.2	Pengamatan Gejala Klinis Penyakit Jembrana	96
6.3	Pengamatan Hematologi dan Serologi Penyakit Jembrana	98
6.4	Perubahan Patologi Anatomi dan Histopatologi Penyakit Jembrana	99
6.5	Hubungan Ekspresi Antigen Limfosit dengan Kerentanan Sapi Bali terhadap Penyakit Jembrana	99
6.6	Ekspresi Antigen Limfosit Sapi Bali, PO dan Sapi Madura pada Tiga Serotipe MoAb Klas I dan Klas II.	103
6.7	Berat Molekul Protein Antigen Limfosit Sapi Bali, PO, dan Sapi Madura	108
6.8	Penentuan Protein Antigen Limfosit Sapi Bali, PO, dan Sapi Madura	113
6.9	Temuan Baru	117
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		118

7.1 Kesimpulan	118
7.2 Saran	118
DAFTAR PUSTAKA	120
LAMPIRAN-LAMPIRAN	129



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Organisasi Komplek Gen MHC (Daniel, 1997)	13
Gambar 2.2 Molekul MHC klas I	17
Gambar 2.3 Molekul MHC klas II	19
Gambar 2.4 Perkembangan respons imun seluler	23
Gambar 2.5 Antigen prosesing pada MHC klas I	26
Gambar 2.6 Antigen prosesing pada MHC klas II	27
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian Kasus-Kontrol	60
Gambar 4.2 Skema Rancangan Penelitian Faktorial	61
Gambar 4.3 Prosedur pengambilan data penelitian	72
Gambar 5.1 Sapi Bali	74
Gambar 5.2 Sapi Peranakan Ongole	75
Gambar 5.3 Sapi Madura	76
Gambar 5.4 Hasil pemeriksaan hematologi sel limfosit dengan pewarnaan Giemsa pembesaran 100X	80
Gambar 5.5 Hasil pemeriksaan hematologi sel netrofil dengan pewarnaan Giemsa pembesaran 100X	80
Gambar 5.6 Hasil pemeriksaan hematologi sel monosit dengan pewarnaan Giemsa pembesaran 100X	79
Gambar 5.7 Hasil Pemeriksaan patologi anatomi limpa pada sapi Bali menderita penyakit Jembrana	81
Gambar 5.8 Ekspresi Antigen Limfosit Sapi pada Pemeriksaan Imunositokimia Pembesaran 45x	86
Gambar 5.9 Ekspresi BoLA pada Sel Limfosit dengan Pemeriksaan Imunositokimia. Perubesaran 100x	87
Gambar 5.10 Hasil Elektroforesis Sapi Bali, PO dan Sapi Madura	90
Gambar 5.11 Hasil Pengujian protein antigen limfosit sapi Bali dengan MoAb pada pemeriksaan Western-Imunobloting	92
Gambar 5.12 Hasil Pengujian protein antigen limfosit sapi PO dengan MoAb pada pemeriksaan Western-Imunobloting	92
Gambar 5.13 Hasil Pengujian protein antigen limfosit sapi Madura dengan MoAb pada pemeriksaan Western-Imunobloting	93

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Cara kerja pewarnaan Giemsa 129
Lampiran 2	Cara kerja pemeriksaan Patologi Anatomi (PA) dan Histopatologi (HP) 130
Lampiran 3	Cara kerja pemeriksaan serologi 131
Lampiran 4	Cara kerja isolasi limfosit 133
Lampiran 5	Cara kerja imunositokimia 134
Lampiran 6	Cara kerja SDS_PAGE (elektroforesis) 135
Lampiran 7	Cara kerja Western Immunoblotting 139
Lampiran 8	Cara kerja Isolasi Protein (Elusi). 141
Lampiran 9	Data hematologi dan serologi sapi Bali eksperimen dan kasus lapangan 142
Lampiran 10	Data hubungan ekspresi antigen limfosit dengan kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana pada serotipe B5C, BAQ150A dan H34A 143
Lampiran 11	Data ekspresi antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura 144
Lampiran 12	Data berat molekul protein antigen limfosit sapi Bali 145
Lampiran 13	Data berat molekul protein antigen limfosit sapi PO 146
Lampiran 14	Data berat molekul protein antigen limfosit sapi Madura 147
Lampiran 15	Analisis hasil penelitian hubungan ekspresi antigen limfosit sapi dengan kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana pada serotipe B5C 148
Lampiran 16	Analisis hasil penelitian hubungan ekspresi BoLA dengan kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana pada serotipe BAQ150A 150
Lampiran 17	Analisis hasil penelitian hubungan ekspresi BoLA dengan kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana pada serotipe H34A 152
Lampiran 18	Analisis hasil penelitian pengaruh <i>breed</i> sapi dan serotipe MoAb terhadap ekspresi antigen limfosit 154
Lampiran 19	Analisis hasil penelitian berat molekul protein antigen (BoLA) klas I dan klas II sapi Bali, PO dan sapi Madura 160

BAB 1

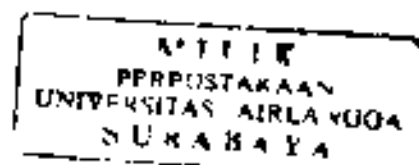
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sapi Bali merupakan salah satu *breed* sapi asli Indonesia, dan telah menyebar hampir diseluruh kepulauan Indonesia, serta ke negara tetangga seperti Malaysia dan Australia. Sebagai plasma nutfah keberadaannya sangat diperhitungkan, oleh karena itu banyak pihak berusaha untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas sapi Bali

Sapi Bali disebut ternak dwiguna karena keunggulan sebagai sapi kerja dan sapi potong. Sebagai sapi kerja telah terbukti dapat membantu pekerjaan petani di sawah, sehingga kedudukannya sangat penting dalam sub sektor pertanian terutama di Pulau Bali dan daerah transmigrasi. Sapi Bali sebagai sapi potong sangat disukai karena memiliki persentase karkas tinggi dengan daging yang berlemak sedikit, sehingga benar-benar dapat diandalkan untuk sumber protein hewani.

Darmadja (1980) mengatakan, sapi bali hidupnya sangat sederhana, mudah dikendalikan dan jinak. Sapi Bali dapat hidup hanya dengan memanfaatkan hijauan yang kurang bergizi, tidak selektif terhadap pakan dan mempunyai daya cerna cukup baik terhadap pakan yang berserat. Kemampuan beradaptasi sangat baik pada kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan, sehingga sering disebut sapi pionir atau sapi perintis dan sifat unggul ini tidak dijumpai pada *breed* sapi manapun di dunia (Bandini, 1997; Darmadja, 1980).



Laporan data statistik tahun 1997 menyebutkan, dari keseluruhan populasi sapi yang ada di Indonesia berjumlah 9.842.146 ekor, 26% adalah *breed* sapi Bali, disusul sapi Madura (11,5%), PO (7,85%), sapi Ongole (2,04%) dan sisanya 51,20% adalah *breed* sapi lainnya. Data statistik peternakan Propinsi Bali tahun 2001 mengenai kepadatan populasi sapi potong menunjukkan, populasi sapi Bali di Pulau Bali paling padat di Indonesia (93,3 ekor/km²), Jawa Timur menduduki kepadatan kedua (68,91 ekor/km²) dan disusul oleh DI Yogyakarta (61 ekor/km²).

Populasi sapi Madura masih berpusat di Pulau Madura, yang pada umumnya digunakan untuk mengolah tanah, menarik gerobak, dan karapan. Pemeliharaan sapi sebagai penghasil daging sebenarnya hanyalah merupakan usaha sampingan dalam keseluruhan usaha tani di Pulau Madura. Pulau Madura merupakan daerah kepadatan ternak yang paling tinggi, dengan areal yang sempit. Sumber pakan sapi Madura terutama dari rumput yang tumbuh di tepi jalan, sepanjang tepi sungai dan tanah tegalan yang tidak dipergunakan serta sisa hasil pertanian

Populasi sapi Bali di P. Bali mencapai sekitar 529.000 ekor, dan sebagai daerah tujuan wisata utama di Indonesia tiap tahun Bali harus menyediakan sekitar 104.000 ekor sapi, dengan berat badan antara 350 – 400 kg. Keadaan tersebut menyebabkan sapi Bali sangat potensial ditingkatkan guna memenuhi kebutuhan protein hewani. Disamping itu impor daging sapi harus dihentikan sehingga berimplikasi pada peningkatan pemanfaatan daging sapi lokal, dan dampaknya akan dapat meningkatkan pendapatan petani peternak.

Didalam pengembangannya menemukan kendala, yakni sangat rentan terhadap penyakit Jembrana (JD). Adanya Penyakit Jembrana menyebabkan populasi sapi Bali terancam punah, dan menimbulkan kerugian pada peternak, antara lain : kematian ternak, hilangnya tenaga kerja sehingga menurunkan produktifitas sawah dan reproduksi ternak. Kerugian lain yang telah dirasakan adalah sapi Bali hanya boleh diperdagangkan untuk keperluan pemotongan dan dilarang diperjual belikan untuk kepentingan bibit keluar Bali, dengan demikian telah mengurangi keuntungan yang diperoleh.

Sampai saat ini penyakit Jembrana tidak dimasukkan kedalam penyakit zoonosis, namun dampaknya akan berakibat pada kesehatan manusia. Salah satu dampak tersebut adalah berkurangnya persediaan protein hewani yang berasal dari sapi. Apabila keadaan ini berkelanjutan akan mengakibatkan kekurangan konsumsi protein dan penurunan gizi, sehingga ketahanan tubuh terhadap penyakit akan menurun, terutama pada anak-anak/balita dan menimbulkan masalah dikemudian hari.

Sejak ditemukan pertama kali di Kabupaten Jembrana tahun 1964, sehingga penyakit ini disebut dengan penyakit Jembrana. Penyakit ini tidak hanya memakan korban sapi Bali di Propinsi Bali saja, tetapi kasusnya telah menyebar ke Propinsi Lampung (1976), Banyuwangi (1978) dan Sumatra Barat (1992). Gejala klinis yang paling menonjol dari penyakit Jembrana ialah demam tinggi (42°C) kebengkakan kelenjar limfe (lymph nodes, *Imfoglandula*) yang

menonjol terlihat pada daerah bahu (preskapularis), daerah depan lutut (prefemorialis) dan diare yang sering bercampur darah.

Pada penyakit yang akut, khususnya yang terjadi pada wabah pertama, sapi Bali yang terserang mati secara tiba-tiba tanpa menunjukkan gejala klinis yang dapat diamati oleh petani. Kondisi tubuh sapi yang mati ini pada umumnya masih bagus. Kematian ini biasanya tidak hanya terjadi pada satu ekor hewan, tetapi terjadi pada sejumlah hewan dalam kurun waktu yang relatif singkat (Hartaningsih, 1999)

Penyakit Jembrana saat ini sudah menyebar dan bersifat sporadik di seluruh Indonesia. Usaha pencegahan terhadap JD ini telah dilakukan yakni dengan pemberian vaksin yang berasal dari limpa atau plasma limpa hewan penderita JD, namun hanya mampu memberikan proteksi kekebalan antara 60% – 70%. Penelitian ke arah pengembangan vaksin JD terus dilakukan untuk memperoleh vaksin yang lebih imunogenik.

Sampai saat ini hanya *breed* sapi Bali yang dinyatakan rentan terhadap penyakit Jembrana, di lapangan belum pernah dilaporkan *breed* sapi murni lainnya terserang, kecuali sapi silang yang memiliki darah sapi Bali seperti sapi Rambon. Penyakit ini tidak dijumpai pada sapi Ongole, sapi Madura, sapi Drought Master dan sapi Frisian Holstein (FH) dinyatakan tahan terhadap penyakit Jembrana (Soeharsono, 1991). Hewan lain seperti kambing, domba, dan babi diketahui tahan terhadap JD (Putra, 1999) Dari uraian di atas terungkap bahwa hanya *breed* sapi Bali yang rentan terhadap penyakit Jembrana. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan patogenitas virus penyakit Jembrana

(JDV) terhadap *breed* sapi. Keadaan ini kemungkinan berkaitan dengan faktor genetik maupun imunogenetik, yang menyebabkan perbedaan ketahanan atau kerentanan individu terhadap penyakit. Perbedaan genetik diantara *breed* sapi di Indonesia telah dibuktikan oleh Mustahdi (1982), dengan melakukan analisis sitogenik dan morfometrik.

Adanya perbedaan genetik antara *breed* sapi di Indonesia, membuka peluang pendalaman tentang *genetic susceptibility*, yakni ketahanan individu terhadap penyakit ditinjau dari faktor imunogenetik. Imunogenetik adalah konsep pendekatan genetik yang mengendalikan perbedaan reaktivitas respons imun dan kerentanan tubuh terhadap suatu penyakit (Judajana dkk., 1997). Kendali genetik tersebut akan menentukan perbedaan reaktivitas imun pada masing-masing individu dalam suatu populasi dan faktor genetik ini berpengaruh terhadap ketahanan dan kerentanan individu terhadap penyakit (Angyalosi, dkk., 2001). Salah satu lingkup imunogenetik yang sedang dipelajari adalah sistem Major Histocompatibility Complex (MHC).

MHC atau Antigen histokompatibilitas utama adalah antigen yang terdapat pada sel limfosit yang bersifat lebih imunogenik dibandingkan antigen lainnya. Antigen ini dapat ditemukan pertama pada leukosit darah dan oleh karenanya ditandai dengan huruf E. (leukosit) yang didahului dengan jenis hewan dimana antigen tersebut ditemukan. Akhirnya Lewin dkk., (1999) menyepakati, MHC yang ditemukan pada sapi (*Bos taurus* dan *Bos indicus*) disebut Bovine Limfosit Antigen (BoLA). Pada anjing antigen ini disebut DLA, babi (SLA)

demikian seterusnya (Tizard, 1995). Sedangkan pada manusia disebut HLA (Human Limfosit Antigen).

Antigen histokompatibilitas utama merupakan glikoprotein, dibedakan atas tiga klas yaitu : MHC klas I, klas II dan klas III. Setiap klas MHC mempunyai peranan yang berbeda-beda, demikian juga dengan berat molekulnya. MHC klas I dengan rantai alfa yang terikat pada membran mempunyai berat molekul (BM) 45 kD, sedangkan rantai beta yang terdapat pada sitoplasma dengan BM 12 kD. Antigen yang dikode oleh MHC klas II keduanya terikat pada membran sel rantai alfa dengan BM antara 32 – 35 kD dan rantai beta 25 – 29 kD (Bernadette, dkk., 1997).

Peranan keseluruhan antigen BoLA adalah menentukan kemampuan individu untuk membedakan self dan non-self, mengatur interaksi fungsi imunitas. Aloreaktivitas dan reaksi penolakan jaringan merupakan manifestasi kemampuan antigen MHC dalam mengenali antigen asing, sedangkan polimorfismenya mengakibatkan kemampuan setiap individu untuk bereaksi terhadap antigen spesifik dan kecenderungan menderita kelainan imunologik berbeda satu sama lainnya.

Molekul MHC klas I sebenarnya dapat ditemukan pada semua sel, namun khusus mempresentasi antigen endogenous di dalam sel host, seperti sel yang terkait dengan antigen virus (Kenneth dan Clark, 1996; Mellors, 1999). Sel yang terinfeksi oleh virus hanya dapat dikenali oleh sel CD8, apabila antigen virus tersebut ditampilkan pada permukaan sel bersama-sama dengan MHC klas I.

Fungsi MHC klas II dapat dibagi dalam beberapa katagori, yaitu: fungsi dalam respons imun, pengenalan sel dan interaksi sel. Karena MHC klas II terutama berfungsi dalam respons imun maka dari itu disebut dengan *immune response associated antigen*. Penelitian yang dilakukan oleh Dharma dkk., (1998) menunjukkan MHC klas II berperan dalam patogenitas penyakit Jembrana, dimana sapi yang menderita penyakit JD ekspresinya mengalami peningkatan.

Gen penyusunnya berperan dalam menentukan kerentanan atau ketahanan terhadap penyakit dan mempunyai sifat polimorfisme yang sangat tinggi. Polimorfisme molekul antigen BoLA ditentukan oleh urutan asam amino yang membentuk celah pengikat peptida dan celah tersebut yang berinteraksi, baik dengan peptida antigen maupun dengan reseptor sel T (Davenport dan Hill, 1996).

Protein antigen limfosit sapi dapat digolongkan lagi menjadi beberapa serotipe, yang telah diproduksi dalam bentuk monoklonal antibodi. Serotipe monoklonal antibodi tersebut antara lain: B5C termasuk BoLA klas I dan BAQ150A, H42A termasuk BoLA klas II. Penyakit yang telah diketahui mempunyai keterkaitan dengan pemunculan beberapa serotipe antigen histokompatibilitas pada sapi adalah : BoLA DRB3 pada sapi perah berasosiasi dengan kerentanan terhadap munculnya mastitis yang disebabkan oleh infeksi *Staphylococcus aureus* (Sharif dkk.1998). Sedangkan penyakit Bovine Viral Diarrhoea berasosiasi dengan kemunculan BoLA-HD7 (Hedge dan Srikumaran, 1997) Pada ayam antigen B 21 berhubungan dengan kerentanan terhadap

penyakit Marek, sedangkan pemilikan antigen B2 berhubungan dengan kerentanan terhadap Leucosis Lymphoid (Tizard, 1998).

Pada manusia HLA B27 telah dibuktikan berasosiasi erat dengan perkembangan penyakit Human Immunodeficiency Virus tipe I (Klein dkk. 1998). Selanjutnya akan terjadi perkembangan penyakit HIV-I yang sangat pesat pada orang-orang yang memiliki HLA-B*35 dan HLA-Cw*04 (Carrington dkk. 1999).

1.2 Rumusan Masalah

Penyakit Jembrana hanya menyerang sapi Bali, keadaan ini memberikan indikasi adanya faktor imunogenetik yang berpengaruh terhadap kejadian penyakitnya. Dalam hal ini salah satu faktor imunogenetik tersebut adalah antigen limfosit sapi (BoLA). BoLA telah diketahui mempunyai peranan yang sangat penting dalam mekanisme respons imun pada sapi, demikian juga beberapa penelitian menunjukkan bahwa adanya hubungan atau asosiasi antara ekspresinya dengan kerentanan dan ketahanan terhadap suatu penyakit

Di Indonesia penelitian untuk mengetahui hubungan antara ekspresi BoLA klas I dan klas II dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana, belum pernah dilakukan, demikian juga perbedaan ekspresinya pada beberapa *breed* sapi belum diungkapkan. Kedua hal tersebut diatas menjadi sangat penting untuk diketahui, karena dapat dipergunakan sebagai dasar dalam membantu diagnostik penyakit.

Sifat polimorfisme yang dimiliki oleh sistem BoLA ini, menimbulkan variasi ekspresi dalam satu populasi, variasi berat molekul protein

Perkembangan mutakhir dalam bidang biologi molekuler, telah berhasil memproduksi beberapa serotipe monoklonal antibodi, dimana dalam penelitian ini akan dapat dipergunakan untuk menentukan berat molekul (BM) protein sapi yang rentan maupun sapi yang tahan terhadap penyakit Jembrana pada beberapa *breed* sapi di Indonesia. Ekspresi antigen BoLA klas I dan klas II pada sel limfosit yang diketahui berperan dalam patogenesis penyakit Jembrana penting dipelajari, untuk menentukan ada atau tidaknya hubungan dengan kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana.

Dari uraian di atas maka rumusan masalah yang diajukan adalah :

1. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi antigen limfosit sapi Bali klas I dan klas II dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana?
2. Bagaimanakah ekspresi antigen limfosit sapi Bali, Peranakan Ongole dan sapi Madura pada tiga serotipe monoklonal antibodi?
3. Apakah terdapat perbedaan berat molekul (BM) protein antigen limfosit sapi klas I dan klas II antara sapi Bali, sapi Peranakan Ongole dan sapi Madura ?
4. Apakah protein antigen limfosit klas I dan klas II sapi Bali, Peranakan Ongole dan sapi Madura dapat diisolasi sebagai dasar imunodiagnostik?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menentukan protein antigen limfosit klas I dan klas II sapi Bali Peranakan Ongole dan sapi Madura

1.3.2 Tujuan khusus

1. Menentukan hubungan ekspresi antigen limfosit sapi Bali klas I dan klas II dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana
2. Menentukan ekspresi antigen limfosit sapi Bali, Peranakan Ongole dan sapi Madura pada tiga serotipe monoklonal antibodi.
3. Menentukan perbedaan berat molekul (BM) protein antigen limfosit sapi klas I dan klas II antara sapi Bali, sapi Peranakan Ongole dan sapi Madura
4. Mengisolasi protein antigen limfosit klas I dan klas II dari sapi Bali, Peranakan Ongole dan sapi Madura, sebagai dasar imunodiagnostik.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat ilmiah

1. Memberikan informasi ilmiah dalam bidang imunogenetik tentang adanya hubungan ekspresi antigen limfosit sapi Bali dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana
2. Memberikan informasi ilmiah dalam bidang imunogenetik tentang ekspresi antigen limfosit sapi Bali, Peranakan Ongole dan sapi Madura pada tiga serotipe monoklonal antibodi.
3. Memberikan informasi ilmiah dalam bidang imunogenetik tentang berat molekul (BM) protein antigen limfosit klas I dan klas II, sapi Bali, sapi Peranakan Ongole dan sapi Madura.

1.4.2 Manfaat klinis

1. Penentuan protein antigen limfosit sapi salah satu konsep cara pemecahan masalah dengan menggunakan pendekatan imunogenetik. Hasil isolasi protein dapat dipergunakan sebagai dasar imunodiagnostik sehingga membantu diagnosa seekor sapi rentan atau tahan terhadap penyakit Jembrana.
2. Ditemukannya protein antigen limfosit sapi ini, dapat dikembangkan untuk memproduksi monoklonal antibodi yang dalam bidang imunologi sangat penting keberadaannya.
3. Hasil penelitian ini jika dikembangkan, akan bermanfaat untuk memproduksi sapi Bali tahan penyakit Jembrana melalui teknik *transgenik animal*, sehingga dimungkinkan masa yang akan datang tidak ditemukan lagi sapi Bali rentan JD.

BAB 2

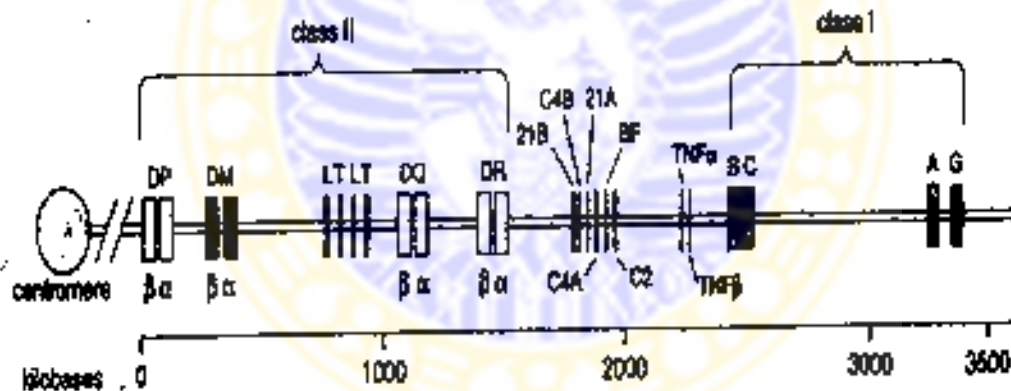
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Antigen Limfosit Sapi (Bovine Limfosit Antigen / BoLA)

Major Histocompatibility Complex (MHC) atau Antigen Histokompatibilitas Utama pada sapi lazimnya disebut Bovine Limfosit Antigen/antigen limfosit sapi, yaitu antigen yang terdapat pada permukaan sel limfosit yang berperan dalam proses respons imun. Pengendalian dan pengenalan sendiri (*self recognition*) yang berhubungan dengan sistem pertahanan tubuh, dimana setiap jenis antigen diri (*self*) atau bukan diri sendiri (*non-self*) baru akan dikenali oleh sel T, apabila dipresentasikan bersama-sama dengan MHC (Bellanti, dkk., 1982; Scheherazade dan Gernain, 1992).

MHC terdiri dari kompleks gen yang sangat penting (major), berlokasi pada satu kromosom dengan karakteristiknya mempunyai sifat polimorfisme yang sangat bervariasi. Pada mencit (H-2) kelompok gennya terletak pada kromosom no. 17 yang terangkai satu sama lain, sedangkan pada manusia terletak pada kromosom no.6 (Abbas, 1991; Roit, 1993). Beberapa alel berada bersamaan dalam satu lokus. Pada manusia (HLA) sekurang-kurangnya terdapat 24 alela yang berada pada lokus HLA-A, dan sedikitnya 50 alela yang berbeda pada lokus B, dan setiap alela menentukan struktur dan rantai glikoprotein (Schwartz, 1994). Antigen histokompatibilitas utama yang dimiliki oleh satu individu diturunkan melalui multiple alela secara autosomal dominan (Nicholas, 1978).

Antigen histokompatibilitas ini merupakan suatu glikoprotein dengan berat molekul yang bervariasi, ditemukan pada sel limfosit atau pada permukaan sel berinti. Berdasarkan distribusi di jaringan, fungsi dan struktur antigen, kompleks gen MHC yang berada pada lengan pendek kromosom dibedakan atas tiga klas, yaitu : MHC klas I, klas II dan klas III. Antigen klas I meliputi antigen yang dikode oleh gen MHC lokus A (A 18, A 31, A11, A14) , lokus B dan lokus C. Antigen klas II dikode oleh gen pada lokus DR, lokus DQ dan lokus DP (Glass dkk , 2000), sedangkan antigen klas III dikode oleh C4, Bf dan C2 yang berhubungan dengan mengkode pembentukan komponen protein dan sistem komplemen (Abbas, 1991, Daniel, 1997; Shirly dkk., 1999).



Gambar 2.1 Organisasi Komplek Gen MHC (Daniel, 1997)

Molekul BoLA banyak diteliti dalam usaha untuk memahami dasar terjadinya perubahan respons imun. BoLA klas I dan klas II mempunyai peran utama diantaranya . memberi sifat pada seleksi positif dan negatif pada saat perkembangannya dalam timus dan menyajikan antigen peptida atau antigen pada sel T. Demikian juga dengan sifat polimorfisme yang dimiliki molekul

BoLA ditentukan oleh urutan asam amino yang membentuk celah pengikat peptida dan celah tersebut yang berinteraksi, baik dengan peptida antigen maupun dengan reseptor sel T (Davenport dan Hill, 1996).

Bukti bahwa keragaman yang sangat besar pada urutan asam amino pada celah tersebut sangat penting secara fungsional diperoleh dari penelitian klinis maupun eksperimental. Analisis peptida yang terikat jelas menunjukkan bahwa molekul-molekul BoLA yang disandi oleh alel yang berbeda mempunyai pola pengikatan yang berbeda. Adanya BoLA dengan sifat pengikatan peptida yang berbeda tersebut dapat menyebabkan suatu peptida antigen akan lepas dalam suatu ikatan molekul BoLA, sehingga menimbulkan pengaruh yang berbeda pada perangsangan aktivitas sel T.

Terdapat bukti yang menyokong konsep, bahwa alel kerentanan dan alel protektif mengikat dan menyajikan epitop peptida antigen yang berbeda. Penelitian membuktikan bahwa alel kerentanan untuk DM tipe 1 (HLA-DRB1*0405) dan alel protektip (HLA-DRB1*0401) berbeda hanya pada asam amino posisi 57. Adanya perbedaan tersebut diduga berkaitan dengan timbulnya tanggapan imun yang berbeda pada orang-orang dengan alel kerentanan dan orang-orang dengan alel protektip (Devitt, 1997).

2.1.1 Antigen limfosit sapi klas I

Antigen limfosit sapi (BoLA) klas I ditemukan hampir pada semua sel berinti, kecuali pada sel embrio yang sangat muda dan beberapa sel yang telah berdiferensiasi seperti eritrosit dan sperma. Sel tropoblas plasenta pada manusia sedikit sekali memiliki MHC klas I (Kresno, 1996; Tizard, 1995). Ekspresi yang

sangat tinggi ditemukan pada sel T setelah diaktivasi dengan IFN-gamma (Kreisel, 2001). Apabila sebuah jaringan atau organ yang dicangkokkan pada resepien yang tidak memiliki hubungan genetik, molekul MHC klas I ini akan membangkitkan tanggap kebal yang kuat dan akan berperan dalam penolakan jaringan (Jonathan, 1994).

MHC klas I terdiri dari glikoprotein yang terdiri dari rantai α (45 kDa) dan rantai β 2-mikroglobulin (12 kDa), berikatan secara non-kovalen (Jonathan dkk., 1994). Rantai berat (alfa) dibagi dalam tiga bagian yaitu : bagian yang terletak ekstra seluler, bagian transmembran dan bagian intraseluler. Bagian ekstraseluler membawakan ciri antigen, sedangkan bagian intraseluler adalah bagian yang meneruskan sinyal-sinyal dari luar ke dalam sel. MHC klas I terdiri dari 30 - 40 asam amino yang didominasi oleh asam amino arginin dan lisin. Bagian ini hidrofobik membentuk ikatan ion positif dan negatif yang sangat kuat, diduga merupakan fondasi ikatan MHC dengan sel. Dua ujung rantai berat adalah NH₂ dan COOH. Rantai alfa-1 dan alfa-2 membentuk suatu celah yang sangat polimorfik, merupakan tempat menempelnya antigen. Sifat polimorfik ini memungkinkan berbagai macam peptida dapat terikat pada celah ini. Sifat polimorfik dan variasi yang besar ini merupakan bagian yang menentukan spesifitas diantara alel. Sedangkan bagian transmembran bersifat hidropobik terdiri dari 25 asam amino (Bellanti, 1993; Kresno, 1996; Tizard, 1995).

Rantai ringan (beta) merupakan bagian yang konstan dan mempunyai sekuen yang homolog dengan sekuen imunoglobulin (bagian konstan). Berfungsi

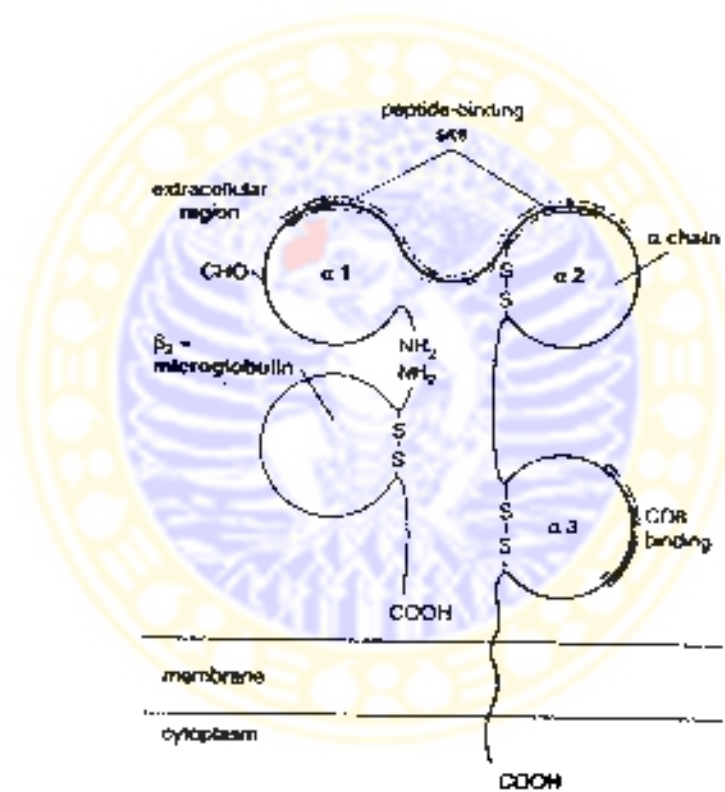
mempertahankan bentuk dan struktur dari molekul, sehingga bagian ini merupakan bagian yang homolog diantara alel. Rantai ringan pada kedua ujungnya diakhiri dengan NH₂ dan COOH. Didalam mempertahankan stabilitas bentuk dan struktur molekul rantai ini diperkirakan erat hubungannya dengan rantai alfa 3 dan berperan pada saat ekspresi antigen

Sifat polimorfisme antigen klas I ditemukan pada setiap lokus, dan antigen yang dikodekan sangat bervariasi dalam setiap lokus. Pada babi ada 20 - 25 alel pada setiap lokus, karena mungkin ada tiga atau lebih lokus klas I dan tidak lebih dari dua alel diturunkan pada setiap lokus pada setiap individu. Jumlah kemungkinan kombinasi antigen yang berbeda nyata sangat besar. Variasi sifat polimorfisme ini juga dapat ditemukan pada urutan asam amino dari rantai α , yakni urutannya berbeda setiap alela. Contoh A2 dan A3 berbeda dalam 15 asam amino, sedangkan A2 dan Aw68 berbeda dalam 13 asam amino (Jonathan dkk., 1993).

Peranan imunologis antigen histokompatibilitas utama klas I, adalah keterlibatannya dalam proses penghancuran (sitotoksitas) antigen yang dilakukan bersama dengan sel T sitotoksik (T_c). Sebelum antigen mengalami proses sitotoksitas, terlebih dahulu terjadi proses pengenalan antigen melalui kerjasama antara MHC dengan sel T reseptor (TCR) pada sel limfosit.

Sel T_c mempunyai beberapa reseptor antara lain : T cel receptor (TCR), CD3 yang berpartisipasi dalam ikatan yang non spesifik, CD8 merupakan reseptor spesifik sehingga sel T_c lazim disebut sel CD. CD8 adalah reseptor

pada bagian monomorfik dari molekul MHC klas I, sehingga pada proses sitotoksik ada dua hubungan antara sel Tc dan sel target. Hubungan tersebut antara reseptor sel T dengan antigen dan bagian polimorfik (rantai $\alpha 1$ dan rantai $\alpha 2$) molekul MHC klas I dan hubungan antara molekul reseptor CD8 dengan bagian polimorfik (rantai $\alpha 3$) dari molekul MHC klas I (Bellanti, 1993, Daniel 1997)



Gambar 2.2 Molekul MHC klas I (Daniel, 1997)

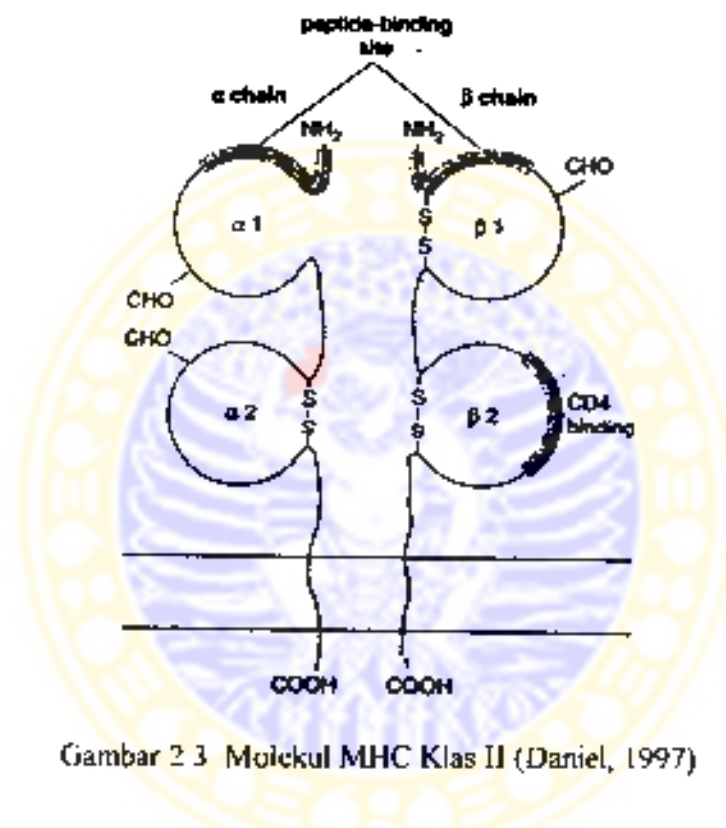
2.1.2 Antigen limfosit sapi klas II

Ekspresi molekul antigen histokompatibilitas utama klas II terbatas pada sel makrofag, limfosit B, sel dendrit dan sel T yang teraktivasi (Abbas dkk., 1991, Margaret dkk., 1997) dan sel T yang diaktivasi dengan IFN-gamma (Kreisel, 2001). Antigen MHC klas II merupakan suatu glikoprotein, mengandung dua ikatan non kovalen dari dua rantai polipeptida. Rantai polipeptida tersebut adalah rantai α dengan berat molekul 31 kDa - 34 kDa, dan rantai β dengan berat molekul 26 kDa - 29 kDa (Bernadette dkk., 1993, Margaret dkk., 1997).

Kedua rantai polipeptida tersebut dirangkaikan secara non kovalen satu dengan yang lainnya, dibedakan atas : bagian ekstraseluler masing-masing mengandung 90 - 100 asam amino, bagian transmembran terdiri dari 20 - 25 asam amino sedangkan bagian sitoplasma terdiri dari rantai α dengan 3 - 15 asam amino dan rantai β dengan 8 - 20 asam amino. Kedua rantai tersebut baik alfa maupun beta terdiri dari glikosida dan karbohidrat. Determinan antigen/epitop terletak pada rantai beta (Jonathan, 1993)

Kedua ujung MHC klas II diakhiri dengan NH₂ dan COOH, tiap rantai dibagi 4 segmen. Dua segmen ekstra seluler (alfa-1, alfa-2 dan beta-1, beta-2), segmen pendek transmembran yang hidrofobik dan segmen yang hidrofilik. Seperti halnya pada MHC klas I fondasi ikatan terdapat pada transmembran, dimana segmen MHC menembus dinding sel.

Rantai alfa-1 dan alfa-2 membentuk suatu celah yang polimorfik, merupakan tempat dimana antigen terikat. Kemampuan celah ini lebih terbatas dibandingkan dengan MHC klas I, tetapi kemampuan rantai beta lebih luas/banyak. Hal ini mengindikasikan bahwa spesitas dari MHC klas II didominasi oleh rantai beta (Daniel dkk., 1997).



Gambar 2.3 Molekul MHC Klas II (Daniel, 1997)

Organisasi genom gen BoLA klas II pada kedua rantai disandi oleh gen yang terpisah, yaitu : Gen A (penyandi rantai α) dan Gen B (penyandi rantai β). Gen A terdiri dari 5 ekson yang masing-masing menjadi : 5' UTR (5' Untranslated Region) dan urutan sinyal, domain alfa-1, domain alfa-2, peptida penghubung regio transmembran ekor sitoplasmik dan sebagian 3' UTR (3' Untranslated Region), sisa 3' UTR dari rantai alfa molekul BoLA.

Gen B tersusun sama kecuali untuk ekor sitoplasmik, yang sebagian disandi oleh suatu ekson tambahan dan sebagian lagi oleh ekson 3' UTR. Setiap sub regio kelas II terdiri paling sedikit satu potong gen yakni A dan B, tetapi tidak seluruh gen selalu terekspresi. Lokus BoLA-DP mempunyai dua pasang gen A dan gen B, tetapi satu pasang diantaranya tidak terekspresi disebut Pseudogen. Lokus BoLA-DQ juga mempunyai dua gen A dan B dengan organisasi genom yang sama dengan DP. Lokus BoLA-DR berbeda, yakni hanya mempunyai satu gen A dan satu sampai lima gen B tergantung haplotipnya dan satu diantaranya pseudogen (Fugger, 1994, Glass, dkk., 2000; Shirley dkk., 1999).

Polimorfisme antigen histokompatibilitas kelas II dapat diamati dengan berbagai metode antara lain pada level protein dapat di deteksi dengan monoklonal antibodi, melalui metode two-dimensial gel elektroforesis. Ekspresi MHC kelas II menunjukkan diversitas alel (polimorfisme) yang tinggi. Fungsinya amat penting dalam imunogenetika, oleh karena itu diperlukan suatu protokol identifikasi yang baik. Prosedur untuk mengidentifikasi seluruh variasi dengan cepat dan tepat akan membantu penilaian awal suatu penelitian.

2.1.3 Peran MHC kelas II dalam respons imun

MHC kelas II berperan penting dalam respons imun, baik respons imun seluler maupun respons imun humoral. Pada respons imun seluler diawali dengan masuknya antigen ke dalam tubuh melalui proses *up take* oleh makrofag, kemudian mengalami pemecahan (*Antigen processing*) menjadi peptida atau fragmen-fragmen antigen dan dipresentasikan oleh molekul MHC kelas II ke

permukaan sel untuk proses pengenalan (*recognizing*) bersama dengan TCR sel CD4 (Daniel, 1997; Roitt, dkk., 1993).

Proses penyajian antigen memerlukan kerjasama dengan sel *T helper* (Th) yang akan memberikan sinyal untuk terjadinya rangkaian aktivitas respons imun seluler. Peptida yang berasal dari antigen dicerna di dalam fagosom dan akan di ekspresikan ke permukaan sel penyaji (APC) dengan pengaturan MHC kelas II, selanjutnya sel Th dengan reseptor dipermukaannya akan mengenal antigen tersebut dan akan melekat disana. Interleukin-1 (IL-1) yang dikeluarkan oleh makrofag akan membantu kontak antara antigen yang disajikan dengan reseptor sel T akan mengaktifkan limfosit tersebut

Aktivitas sel T dalam respons imun diatur oleh sel Th dan Ts (*T supresor*). Sel Th akan mengaktifkan sel B untuk menghasilkan antibodi, juga mengaktifkan sel Tc (*T cytotoxic*) dan makrofag dalam menghancurkan kuman yang berada dalam sitoplasma. Semua proses ini menyebabkan penghancuran kuman lewat mekanisme sel efektor yakni : pengikatan oleh sel Tc, aktivitas sel NK, aktivitas sel K dan peningkatan kegiatan makrofag yang teraktivasi. Sel target selanjutnya akan lisis bersama dengan mikroorganisme yang ada di dalamnya (Roit dkk., 1993; Daniel dkk., 1997)

Diperlukan dua sinyal untuk mengaktifkan sel Th, yakni : kontak antara TCR dengan epitop antigen yang melekat pada molekul MHC kelas II dan ko-stimulasi yang menghasilkan perlekatan protein permukaan APC dengan molekul CD8 dari permukaan sel Th-memory. Proses ini menguat dengan munculnya reseptor IL-2R dipermukaan, yang menangkap IL-2 hasil produksi

sel itu sendiri. Sitokin lain yang dihasilkan akan mengaktifkan sel B, selanjutnya sel B akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma dan akhirnya membentuk antibodi.

Konsep di atas menunjukkan, bahwa penghancuran kuman dilakukan oleh sel efektor Tc dan sel K dengan bantuan antibodi (*Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity/ADCC*). Terlihat pula adanya tiga jenis sel memori yang terbentuk, yaitu sel Th, sel Tc dan sel B. Disamping itu proses inflamasi terjadi lewat dua jalur respons imun, yakni respons imun seluler dan respons imun humoral (Goodman, 1991).

Peranan MHC kelas II dalam respons imun humoral, adalah dalam pembentukan antibodi. Pembentukan antibodi terjadi pada kelenjar getah bening dan limpa, dan daerah tempat peradangan. Setelah sel B berinteraksi dengan antigen, akan terjadi proses proliferasi dan diferensiasi menjadi sel plasma dan akan mengeluarkan antibodi. Sebagian dari sel B akan menjadi sel B memori yang berumur panjang dan akan segera bereaksi apabila kontak dengan antigen yang sama (Gordon, 1990).

Kontak pertama dengan antigen akan membentuk antibodi kelas IgM, sebagai hasil interaksi antara antigen dengan molekul IgM pada permukaan sel B. Pada rangsangan antigen selanjutnya sel B memori akan membentuk antibodi IgG melalui proses imunologi yang sama. Dalam pembentukan antibodi diperlukan kerjasama dengan sel Th dan mengeluarkan zat aktif terlarut, yaitu molekul MHC kelas II.

Umumnya sebagian besar respons imun humoral memerlukan bantuan sel Th, sehingga merupakan *Th dependent*. Pada beberapa antigen terutama dari golongan polisakarida yang memiliki epitop ganda berulang (*multiple repeating epitops*), bisa merangsang terbentuknya antibodi tanpa bantuan sel Th (*Th independent*). Daerah-daerah tersebut selain menentukan spesifisitas reaksi antigen-antibodi, juga menentukan timbulnya respons imun. Daerah molekul yang terdapat pada permukaan tersebut disebut antigen determinan atau epitop. Sifat epitop yang terpenting adalah diperlukan adanya *accessibility* untuk pengenalan oleh reseptor sel B atau sel T *dependent*.

Pengenalan dan penyajian antigen oleh APC diatur oleh molekul MHC kelas II, sehingga hanya epitop tertentu yang akan disajikan kepada sel T *dependent*. Epitop tersebut hanya bisa menempel pada TCR tertentu pula, apabila reseptor sel T yang membangkitkan imunitas maka proses yang timbul mengaktifkan respons imun seluler. Sebaliknya apabila yang teraktivasi adalah sel T *suppressor* maka yang terjadi adalah penekanan dari respons imun seluler.

Kebanyakan antigen mengandung multipel epitop, yakni epitop sel B dan epitop sel T. Epitop sel B adalah determinan antigen yang dibentuk oleh immunoglobulin protein dan epitop sel T adalah determinan antigen pada limfosit T. keduanya diproses dan dipresentasikan bersama dengan molekul MHC (Daniel dkk, 1997; Gray dkk, 1995).

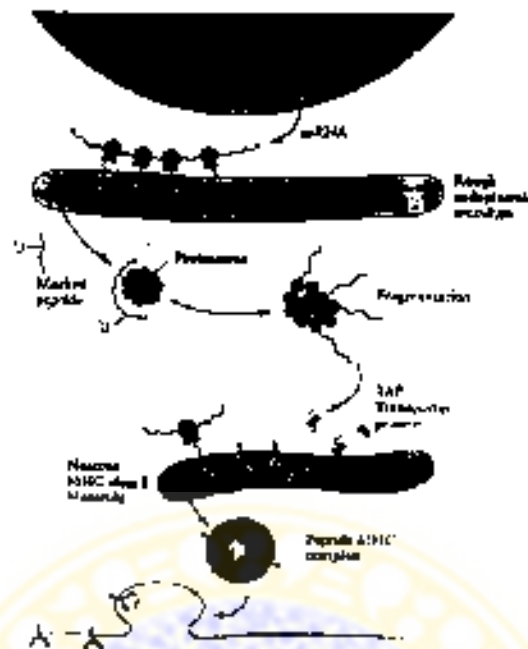
2.1.4 Mekanisme ikatan antigen dengan MHC

Pada saat presentasi antigen terjadi, antigen menempel pada MHC kelas II yang ada pada permukaan sel presentan (makrofag). Sel T mengenali antigen melalui MHC kelas II kemudian akan diikuti dengan proliferasi. Sel T akan membentuk koloni dan hanya akan mengenali antigen yang sama, dalam hal ini MHC kelas II terlibat dalam proses presentasi antigen.

Proses presentasi antigen pada sel T didahului dengan proses ikatan MHC-antigen. Antigen akan terikat pada celah pada MHC dipermukaan sel. Telah terdapat bahwa sel T (CD4) akan berasosiasi dengan MHC kelas II dan sel T (CD8) akan berasosiasi dengan MHC kelas I. Pola ini berkembang bersama dengan proses pematangan sejak sel T masih dalam tahap perkembangan di dalam timus.

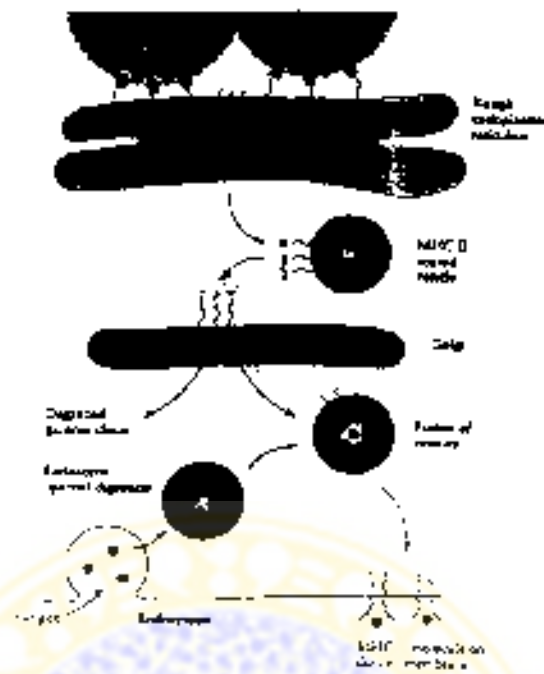
Dalam proses interaksi dengan antigen, proses ikatan MHC-antigen didahului dengan proses penghancuran (degradasi) dari antigen dan MHC sendiri. Hal ini sangat diperlukan, karena dalam proses ini epitop yang mempunyai potensi untuk berinteraksi dengan MHC akan terbuka. MHC yang telah mengalami degradasi akan mengalami sintesis kembali (resintesis) dengan bentuk yang sesuai dengan epitop dari peptida hasil pecahan antigen.

Proses pemecahan (degradasi) MHC terjadi di dalam sitoplasma kemudian masuk ke dalam retikuloendotelium (RE) atau degradasi dapat terjadi di dalam RE. Resintesis terjadi di dalam RE sesuai dengan bentuk epitop antigen. Dalam proses ini melibatkan banyak enzim.



Gambar 2.5 Antigen Prosesing pada MHC klas I (Tizard, 1995)

Setelah terjadi bentuk kompleks MHC-peptida, peptida akan dibawa ke permukaan sel untuk dipresentasikan kepada sel T. Untuk proses ikatan antigen dengan MHC klas II diperlukan rantai invarian non polimorfik yang disimbolkan dengan I_i , dan I_i memainkan peranan penting dalam regulasi MHC klas II (Frauwirth dan Shastri, 2001). MHC klas II di dalam RE akan mengalami degradasi dan resintesa, kompleks ini akan berasosiasi dengan I_i . Kompleks ini akan masuk ke dalam aparatus golgi, dan akan mentasuki vakuola yang sudah berisi peptida hasil pemecahan antigen. Kompleks antigen klas II- I_i berdisosiasi, MHC klas II akan berikatan dengan peptida untuk dipresentasikan ke permukaan sel. Sedangkan I_i akan mengalami degradasi (Frauwirth dan Shastri, 2001; Tizard, 1995; Sevilla, dkk., 2001).



Gambar 2.6 Antigen Processing pada MHC kelas II (Tizard, 1995)

2.1.5 MHC dan penyakit

Klein (1990) menyatakan, faktor-faktor yang perlu dipahami dalam asosiasi sistem MHC dengan suatu penyakit adalah jumlah kuantitatif variasi molekul, variasi ekspresi molekul MHC dan variasi pola sistem MHC pada berbagai populasi yang berbeda. Teori yang mendasari pengamatan empirik tentang asosiasi antigen MHC dengan penyakit, masih mengandung banyak perdebatan dan bersifat spekulatif.

Beberapa teori yang bersifat hipotesis telah dikemukakan untuk memahami keterlibatan gen MHC dalam patogenesis penyakit. Hipotesis yang diajukan antara lain

a. Teori molekul mimikri.

Teori ini menyatakan adanya kemiripan struktur molekul organisme yang infeksius dengan sistem antigen leukosit yang terdapat pada permukaan sel limfosit. Keadaan tersebut menyebabkan host tidak dapat mengenali organisme infeksius tersebut sebagai benda asing, sehingga tidak menimbulkan respons imun. Hal ini dibuktikan dengan adanya reaksi silang antara HLA B-27 dengan *Klebsiella* yang diperkirakan sebagai pemicu terjadinya penyakit Ankylosing spondylitis.

b. Teori reseptor

Teori ini menyatakan bahwa antigen HLA berlaku sebagai reseptor untuk mikroorganisme yang patogen. Hal tersebut telah dibuktikan protein yang mengkode HLA-A dan HLA-B pada manusia, serta H-2K dan H-2D pada tikus, sebagai reseptor permukaan sel untuk virus Semliki forest (Klein, 1990).

c. Teori gen respons imun

Teori ini menguraikan bahwa gen yang terletak pada kromosom no. 6 bertanggungjawab terhadap regulasi respons imun, lokusnya sangat berdekatan dengan lokus kompleks MHC (Klein, 1990). Kenyataannya gen respons imun adalah gen yang terletak sangat dekat dengan lokus HLA kelas II

Pernyataan tersebut didukung oleh fakta bahwa ekspresi molekul MHC kelas II terutama pada sel imunokompeten dan semua sel yang berinteraksi dalam sistem imun memerlukan molekul MHC untuk proses pengenalan antigen. Hal ini dibuktikan pada sapi eksperimen yang diinfeksi dengan virus Bovine

leukemia, yakni adanya peningkatan ekspresi MHC kelas I dan CD25 (Isaacson dkk., 1998).

Fungsi keseluruhan kompleks histokompatibilitas utama adalah mengatur fungsi imun, dan menentukan kerentanan terhadap penyakit yang berhubungan dengan ketahanan tubuh. Pada ayam yang memiliki antigen histokompatibilitas B21 berhubungan dengan kerentanan terhadap Leukosis Limfoid.

Ayam homozigot untuk B1 pada umumnya angka kematian setelah dewasa tinggi, dan sangat rentan terhadap penyakit Marek serta lemah tanggap kebalnya terhadap antigen *Salmonella pullorum* atau albumin serum manusia. Pada ayam galur OS, ayam homozigot B1 sangat rentan terhadap Tiroiditis autoimun dari pada ayam B4 (Tizard, 1988).

Banyak penelitian telah dilakukan untuk mengetahui asosiasi MHC dengan penyakit. Adanya asosiasi antara kemunculan BoLA-DRB3 2*23 dengan penyakit mastitis yang disebabkan oleh Coliforms dan BoLA-DRB3.2*16 berasosiasi dengan kejadian SCS (Somatik Cell Score) pada sapi Holsteins di Amerika, sehingga kemunculan BoLA-DRB3 sangat potensial dipergunakan sebagai petanda genetik tingginya resiko untuk terkena penyakit (Sharif dkk., 1998).

Asosiasi genetik antara BoLA-DRB3 pada sapi Holstein setelah pemberian imunogen untuk mengetahui respons imun baik *innate* maupun *adaptive immunity*, telah dilakukan oleh Dietz dkk., (1997) dan memperoleh hasil yang signifikan antara kemunculan BoLA-DRB3.2*23 dan DRB3.2*27 dengan

peningkatan respons imun, baik *innate* maupun *adaptive immunity*. Penelitian yang dilakukan pada penyakit yang disebabkan oleh parasit *Theileria annulata* juga menunjukkan adanya asosiasi dengan kemunculan BoLA klas I pada permukaan sel (Oliveria dkk., 1998). Sedangkan MHC klas II alela DRB1 berasosiasi dengan perkembangan Bovine Leukemia Virus (Yoshiko dkk., 1999)

Hubungan yang serupa juga terlihat pada manusia, seperti perkembangan penyakit yang sangat cepat pada orang yang menderita AIDS dengan kemunculan HLA klas I alela B35* dan Cw04 (Carrington dkk., 1999). Penyakit yang telah terbukti ada asosiasi antara HLA-B27 dengan penyakit insulin-dependent-diabetes-melitus, penyakit Ankylosing Spondilitis, sehingga HLA-B27 ini dipergunakan sebagai parameter diagnostik penyakit Ankylosing Spondilitis tersebut (Daniel dkk., 1997).

Di Indonesia penelitian tentang asosiasi HLA dengan kerentanan seseorang terhadap suatu penyakit telah dilaporkan. Terdapat asosiasi antara HLA-A29, A28, B40, Bw22, Cw2, DR3, DR9 dan DQw3 dengan penyakit Diabetes Melitus (DM) tipe I (Judajana, 1993). Perbedaan frekuensi antigen HLA yang bermakna pada kelompok penderita penyakit hati menahun untuk antigen HLA-A34, B7, B38, Bw53 dan Bw77. Sedangkan Johanna (1999) mempelajari hubungan tipe HLA dengan kerentanan terhadap penyakit Lepra. Adanya hubungan kerentanan dengan LES dengan HLA klas II HLA-DR3 pada ras Negroid (Afro-Amerika) dengan HLA-DR3 & DR2, dan pada ras Mongoloid (Cina, Korea, Jepang) dengan HLA-DR2.

Asosiasi antara antigen HLA dan penyakit telah banyak dilaporkan, antara lain : adanya asosiasi antara antigen HLA-B27 dengan Spondylitis ankylopoetica, *Yersinia arthritis*, *Salmonella arthritis*, *Jouvenile rheumathoid arthritis* dan *Asbestosis*. Sedangkan penyakit *Myesthenia gravis*, *Systemic lupus* dan *Erythematodes* berasosiasi dengan antigen HLA-B8.

2.2 Komponen Sistem Imun

2.2.1 Limfosit T

Limfosit T merupakan 65-80% dari total limfosit yang beredar di sirkulasi darah. Limfosit T berasal dari sumsum tulang kemudian bermigrasi ke kelenjar timus untuk menjadi matang. Selama proses pematangan di timus, limfosit T mengekspresikan molekul untuk mengikat antigen (*Antigen binding molecules*) pada membrannya, disebut reseptor sel T (*T-cell receptor*). Reseptor sel T ini hanya dapat mengenal antigen yang terikat pada protein membran sel yang disebut *Major Histocompatibility Complex (MHC)* (Goldsbey, 2000). Fungsi utama limfosit T adalah sebagai limfosit T *helper* (Th) dan limfosit T *cytotoxic* (Tc). Limfosit T aktif mensekresi interleukin-2 (*IL-2, T cell growth factor*), yang merangsang produksi reseptor IL-2 dan proliferasi limfosit T. Limfosit Th juga mensekresikan IL-4, IL-5 dan IL-6 (*B cell growth factor*) yang meningkatkan proliferasi dan maturasi limfosit B. Limfosit Tc dapat membunuh sel host, yang mengekspresikan antigen endogen di permukaan seperti : antigen virus dan tumor.

Limfosit T mempunyai rentang aktivitas yang luas, antara lain Mengontrol pertumbuhan limfosit B dan produksi antibodi. Berinteraksi dengan fagosit, membantu memusnahkan patogen, mengenali sel yang terinfeksi virus dan memusnahkannya.

Dua kelas besar limfosit T dibedakan satu dengan yang lain berdasarkan ekspresi petanda permukaan CD4 dan CD8. Limfosit Th adalah limfosit TCD4+, limfosit Tc adalah : limfosit T CD8+. CD4 dan CD8 adalah glikoprotein permukaan yang berfungsi sebagai molekul adesi dan sebagai *co-receptors* limfosit T untuk antigen.

Limfosit Th (CD4+) mengenal antigen yang dipresentasikan pada permukaan makrofag dalam bentuk peptida antigenik, yang membentuk kompleks dengan molekul MHC klas II. Sel Tc (CD8+) mengenali antigen yang dipresentasikan pada permukaan dalam bentuk peptida antigenik yang membentuk kompleks dengan molekul MHC klas I

MHC klas I sebenarnya dapat ditemukan pada semua sel, namun khusus mempresentasikan antigen endogenous, di dalam sel host seperti sel yang terkait dengan antigen virus atau tumor. Disamping petanda CD4 dan CD8, limfosit T juga mempunyai petanda permukaan CD2, CD3 dan CD5

Limfosit Th CD4+ dibagi atas dua subset berdasar atas profil sitokin dan fungsi dominan :

1. Limfosit T *helper* tipe I (Th 1) memproduksi IFN- γ , TNF- α , TNF- γ , IL-
- 2, dan mengatur reaksi hipersensitivitas lambat (tipe IV) terutama

disekitar aktivasi makrofag dan imunitas yang diperantarai limfosit T (*Tcell-mediated immunity*).

2. Limfosit T helper tipe 2 (Th2) menghasilkan IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10 dan ikut terlibat dalam reaksi hipersensitivitas (tipe1) dan imunitas yang diperantarai oleh antibodi sel B (*B cell antibody-mediated immunity*).

2.2.2 Limfosit B

Limfosit B merupakan 5-15% dari total limfosit yang beredar di sirkulasi darah. Limfosit B matang dalam sumsum tulang. Pada saat meninggalkan sumsum tulang limfosit B mengekspresikan reseptor untuk mengikat antigen (*antigen-binding receptor*) pada membrannya. Reseptor limfosit B ini merupakan molekul antibodi yang terikat pada membran (*membrane-bound antibody molecules*)

Fungsi utama limfosit B adalah membentuk antibodi. Reseptor sel B untuk antigen yang larut atau yang terdapat pada permukaan sel adalah *surface immunoglobulin* (sIg) yang terikat pada permukaan membran, terutama antibodi IgM dan IgD. Limfosit B di sirkulasi sangat sedikit mengekspresikan IgA, IgG dan IgE, kecuali di mukosa (*MALT = Mucosal Associated Lymphoid Tissue*) banyak limfosit B mengekspresikan IgA. Memori imunologis diawali saat kontak primer dengan imunogen dan terekam pada perkembangan limfosit T dan limfosit B, disebut sel memori.

Limfosit B memori berumur panjang dan resirkulasi secara kontinyu, dan apabila terpapar kembali dengan antigen yang sama, akan memberikan respons lebih cepat dan lebih kuat yang disebut sebagai respons imun seluler. Limfosit

B memori mempunyai jangka hidup lebih lama dibanding sel lain, secara kontinyu mengekspresikan antibodi yang terikat pada membran yang sama dengan limfosit B inang.

Sel plasma tidak mengekspresikan antibodi yang terikat pada membran, melainkan memproduksi antibodi yang disekresi. Meskipun sel plasma hanya hidup beberapa hari, namun dapat mengsekresikan sejumlah besar antibodi. Diperkirakan satu sel plasma dapat mensekresikan lebih dari 2000 molekul antibodi perdetik. Antibodi yang disekresi ini merupakan *major effector molecules* dari imunitas humoral (Goldsby, 2000).

2.2.3 Makrofag dan sel dendritik

Makrofag merupakan sel yang mempunyai fungsi fagositosis dan sekretoris. Pada inflamasi makrofag berfungsi menghancurkan patogen. Secara umum sel ini merupakan *antigen presenting cell*, yang dapat mengolah imunogen dan menampilkan epitop atau determinan antigenik bersama molekul MHC. Selain itu makrofag juga terlibat dalam reaksi imunologis, misalnya *delayed type hypersensitivity*. (Daniel, 1997, Goldsby, 2000).

Pada mukosa fungsi APC lebih diperankan oleh sel dendritik, sel ini dinamakan sel dendritik karena sel ini mempunyai dendrit seperti yang dijumpai pada neuron. Selain berfungsi sebagai APC, sel ini juga memproduksi sitokin IL-1, IL-6 dan TGF β .

2.2.4 Sel NK (*Natural Killer Cell*)

Sel NK merupakan 5-8% dari total limfosit di sirkulasi, sekitar 70% menunjukkan aktivitas sitolitik. Sel NK di limpa hanya 3-4% dari seluruh limfosit limpa, jarang ditemukan pada kelenjar getah bening dan duktustorasikus (Roitt, 1996).

Sel NK termasuk pertahanan seluler sistem imun non spesifik, sering dianggap sama dengan LGL (*Large Granular Lymphocyte*) karena mekanisme efekturnya sama yaitu melalui lisis oleh mediator sitotoksik perforin yang mampu membuat banyak lubang kecil pada permukaan sel sasaran. Dapat diaktifkan oleh limfosit T. IL-2, IFN dan makrofag dalam mengenali dan menghancurkan sel yang terinfeksi virus atau transformasi neoplasma. Proliferasi sel NK dikontrol oleh limfosit T. IL-2 meningkatkan proliferasi dan aktivasi sel NK. IFN meningkatkan ekspresi reseptor IL-2 dan proliferasi pada progenitor sel NK sehingga terjadi peningkatan jumlah sel NK.

IFN juga mengotor hambatan terhadap terhadap limfosit T untuk mengurangi aktivitasnya. Disamping itu makrofag dapat menghambat sel NK, yaitu dengan memproduksi PGE₂ (Prostaglandin E₂) yang menekan aktivitas sel NK, tetapi sebagian sel NK yang sudah diaktifkan oleh IFN atau IL-2 akan resisten terhadap efek supresi PGE₂ tersebut.

Sel NK terdiri dari sel yang heterogen, tetapi kebanyakan adalah limfosit bergranul besar. Fenotip permukaan sel NK mempunyai seluruh petanda permukaan. Reseptor permukaan yang terdapat pada sel NK antara lain . GM1, IL-2, IFN- α/β , IFN- γ , E₃ dan SRBC (Daniel dkk . 1997)

2.2.5 Antibodi

Antibodi atau immunoglobulin merupakan glikoprotein yang disekresi oleh sel plasma sebagai respons terhadap paparan imunogen. Antibodi ini mempunyai kemampuan untuk mengikat epitop yang merangsang pembentukan antibodi tersebut. Antibodi ini terutama berada dalam fraksi globulin- γ serum.

Berbagai cara antibodi mengeliminasi antigen, yaitu :

1. Netralisasi toksin, dengan cara mmengikat epitop toksin sebagai kompleks antigen-antibodi inaktif dan mengeluarkan kompleks tersebut melalui sistem retikulo endotelial
2. Netralisasi virus, antibodi mengikat epitop spesifik pada permukaan sel virus sehingga menghalangi perlekatan virus pada sel sasaran
3. Oponisasi bakteri, antibodi melapisi bakteri sehingga fagositosis oleh makrofag lebih mudah
4. Aktivasi komplemen, komplemen antigen-antibodi mengaktifkan sistem komplemen, yang melisis sel sasaran melalui aktivitas enzimatik
5. Sitotoksitas seluler yang tergantung pada antibodi (*Antibody dependent cellular cytotoxicity = ADCC*). Antibodi (IgG) mengikat sel NK yang selanjutnya melekat pada sel sasaran, bakteri atau sel tumor, untuk membunuh sel tersebut dengan sitotoksin

2.2.6 Sitokin

Sitokin merupakan protein pengatur dengan berat molekul rendah atau glikoprotein yang disekresikan oleh sel darah putih atau berbagai sel dalam tubuh sebagai respons terhadap sejumlah rangsang (Goldsy, 2000). Protein ini membantu mengatur perkembangan sel imun efektor dan mempunyai reseptor pada sel sasaran

Secara umum sitokin menunjukkan aktivitas yang sangat tinggi terhadap reseptornya, interaksi yang kompleks antara berbagai sel diperantarai oleh sekelompok protein sitokin ini yang membangun komunikasi antar sel.

2.2.7 Organella dan enzim intraseluler

Imunogen yang masuk dari lumen ke dalam sel, dipengaruhi oleh berbagai faktor yang mempengaruhi transport ke permukaan sel. Organella dan enzim yang terlibat antara lain . lisosome, protease (cathepsin B dan D) asam fosfatase dan mannosidase.

2.2.8 Perlekatan antar sel epitel

Pertahanan fisik yang mencegah penetrasi imunogen melintasi epitel usus terdiri atas dua komponen, yaitu sel epitel (aksis transeluler) dan ruang antar sel (aksis paraseluler). Aksis lintasnya terdiri atas *tight junction* dan *subjunctional space*. *Subjunctional space* tidak terlalu berperan dalam ketahanan mukosal sedangkan *tight junction* merupakan ketahanan yang penting untuk difusi molekul besar

2.2.9 Antigen dan imunogen

Antigen merupakan suatu molekul yang mampu berikatan secara spesifik dengan antibodi. Dengan demikian tidak semua antigen dapat menimbulkan respons imun. Antigen dapat diklasifikasikan sebagai eksogenous atau endogenous antigen. Imunogen merupakan suatu molekul yang dapat membangkitkan respons imun. Misalnya makromolekul dari bahan alami yang non patogen seperti makanan, tepung sari atau sintetik, mikroorganisme, protein asing atau polisakarida.

Protein antigen di luar sel biasanya dimakan dan diproses menjadi fragmen antigenik (epitope) dengan mengaktifkan makrofag atau APC. APC menjadi karakteristik dengan penunculan molekul MHC kelas II pada permukaan sel, epitop membuat kompleks dengan MHC kelas II dan kompleks epitop-molekul kelas II dipresentasikan ke permukaan sel APC. Epitop dikenali oleh reseptor yang spesifik untuk antigen tersebut di limfosit Th sehingga terjadi perambatan sinyal imunologis.

2.3 Aspek Biologi Struktur Antigen

Antigen secara umum merupakan substansi yang dapat dikenali sebagai benda asing oleh individu. Sering dikatakan bahwa antigen merupakan substansi yang dapat merangsang pembentukan antibodi yang sekaligus akan mengikatnya, sebagai respons imun tubuh. Menurut Daniel dkk., (1997) antigen adalah benda asing yang diukur dengan keberhasilan dalam mengikat antibodi.

sedangkan imunogen yang merupakan bagian antigen diukur dari kemampuan untuk merangsang sistem imun adaptif.

Belum sepenuhnya diketahui apakah setiap bahan metabolit seperti gula, lemak atau autocoid yang berbentuk sederhana juga dapat bersifat imunogen. Pada umumnya molekul yang bersifat imunogen ialah apabila terjamin keasingannya dan mempunyai berat molekul lebih dari 5000 Da. Pada molekul yang kecil akan menjadi imunogen dengan bantuan makromolekul yang mengikat. Substansi asing yang berbentuk makromolekul saja yang dapat berperan sebagai imunogen, dapat menginisiasi aktivitas sel limfosit yang diperlukan dalam respons pembentukan antibodi (Tizard, 1987). Demikian pula tingkat solubilitas protein antigen tersebut dapat mempengaruhi respons imun yang terjadi.

Pada fosfolipid atau karbohidrat kompleks, penentu antigen akan berperan penuh sebagai struktur kovalen makromolekul. Pada protein epitop terbentuk oleh residu asam amino secara berurutan dari satu rantai peptida disebut *linear determinat*, sedangkan epitop yang terbentuk akibat pelipatan dari dua rantai peptida disebut dengan *conformational determinat*.

Diasumsikan bahwa protein antigen mempunyai ukuran linier determinan yang membentuk ikatan dengan antibodi spesifik sampai sebanyak 6-12 asam amino. Dengan kata lain makin kompleks sifat kimiawi molekul imunogen tersebut akan diikuti dengan peningkatan imunogenitas. Pada keadaan ini protein tersebut merupakan molekul antigen yang bagus, sedangkan karbohidrat, lipid dan asam nukleat merupakan protein antigen yang kurang

bagus. Demikian pula struktur imunogen sangat ditentukan oleh kuat tidaknya keserasian bentuknya, makin konstan keserasian bentuknya makin kuat sifat imunogenitasnya.

Makromolekul yang bertindak sebagai antigen, misalnya protein, asam nukleat dan karbohidrat kompleks dapat terjadi pengulangan struktur internal, membentuk lebih dari satu molekul. Molekul semacam ini disebut dengan multivalen yang dapat berikatan dengan satu binding site pada satu molekul antibodi atau lebih (Abbas, dkk., 1991).

Secara biologis dapat dibentuk antibodi dalam jumlah besar sebagai akibat rangsangan antigen yang seringkali mempunyai tiga struktur dimensional, sehingga seringkali terlibat beberapa konfigurasi. Seringkali terjadi reaksi antigen-antibodi yang tidak sepenuhnya sesuai, sehingga bentuk ikatannya lemah. Keadaan ini sering kali terjadi pada reaksi silang dengan kesesuaian reaksi antigen-antibodi dengan sifat fleksibilitas walaupun tetap berada pada regio imunodominan (Roit dkk., 1993)

2.4 Penyakit Jembrana

Penyakit Jembrana (JD) adalah penyakit yang disebabkan oleh virus golongan Retrovirus dan bersifat fatal pada sapi Bali (*Bos sondaicus*). ditandai demam tinggi, pembesaran kelenjar limfe dan diare yang kadang-kadang bercampur darah dan menyebabkan kematian secara mendadak. (Dharma dan Putra, 1997 ; Wilcox, dkk , 1992).

Sejak ditemukan pertama kali di Desa Sangkar Agung, Kabupaten Jembrana Propinsi Bali pada akhir tahun 1964, JD kini tidak hanya memakan korban sapi di Bali saja, tetapi kasusnya telah menyebar ke Propinsi Lampung (1976), Banyuwangi (1978) dan terakhir ke Sumatra Barat (1992).

Usaha pencegahannya telah dilakukan dengan memberikan vaksin yang berasal dari plasma atau limpa hewan penderita penyakit Jembrana, dan telah diketahui memberikan proteksi kekebalan antara 60 -- 70%. Usaha pengembangan pembuatan vaksin terus dikembangkan untuk memperoleh vaksin yang lebih murni, ekonomis dan sekaligus mampu mengeliminasi virus dari penderita sehingga eradikasi JD dapat dilakukan.

2.4.4 Etiologi

Penyebab penyakit Jembrana adalah virus, dari famili *Retrovirinae*, sub famili *Lentivirinae* (Wilcox, dkk., 1992). Ukurannya sangat bervariasi dapat ditentukan dengan dua cara, yakni lewat filter ultra dan mikroskop elektron. Kemampuannya melewati filter berukuran 100 nm - 200 nm, tetapi tidak dapat melewati filter berukuran 50 nm dan dengan mikroskop elektron ukurannya antara 90 -- 146 nm. Adanya gambaran cara "budding" tipe C, memiliki enzim *reverse transcriptase* dan di luar tubuh hospes virus bersifat sangat fragil dan tahan terhadap berbagai antibiotika, karena antibiotika tidak dapat membunuh virus penyakit Jembrana (JDV/Jembrana Disease Virus).

Terdapat reaksi silang antara antigen virus Jembrana dengan antibodi virus Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) yang dapat diamati dengan uji ELISA maupun uji Western Immunoblotting. Dari sequencing gen yang dilakukan

ada kesamaan sebesar 70% dengan gen virus BIV, yang menandakan bahwa kedua agen penyebab penyakit tersebut mempunyai kedudukan genetik yang berdekatan, namun tidak sama (Kertayadnya dkk, 1993).

Analisis protein virus penyakit Jembrana dengan SDS-PAGE memperlihatkan enam protein antigen, dengan berat molekul masing-masing : 14 kD, 16kD, 26kD, 33kD, 45kD dan 100 kD p26 dan p16 adalah protein antigen yang mayor yang secara konsisten terdapat pada JDV (Kertayadnya dkk, 1993). Dengan menggunakan p26 sebagai antigen, konfirmasi hasil diagnosa serologis ELISA terhadap JDV dilakukan dengan uji Western-Blotting pada serum-serum dari lapangan.

Jembrana Disease Virus (JDV) pada saat demam terdapat bebas dalam plasma darah (Soeharsono, dkk., 1990), dan telah berhasil diadaptasikan dalam kultur jaringan limfosit. Analisis genetik menunjukkan, virus penyakit Jembrana mempunyai 7732 pasangan basa yang terorganisasi di dalam gen-gen *gag*, *pol* dan *env* yang diapit oleh LTRs (*Long Terminal Repeats*). Protein-protein utama penyusun virus penyebab penyakit Jembrana (P100, P45, P42, P33, P26 dan P16), disandi oleh gen-gen *env* (SU dan TM) dan *gag* (CA) (Chadwic dkk, 1995)

2.4.5 Kajian epidemiologi

Penyakit Jembrana telah menyebar di seluruh kepulauan Indonesia yang terdapat sapi Bali, seperti : Pulau Jawa, Sumatra, Lombok, Sulawesi dan Kalimantan (Hartaningsih dkk., 1993). *Breed* sapi berpengaruh terhadap kerentanan, satu-satunya hewan rentan terhadap penyakit Jembrana adalah sapi

Bali, sedangkan sapi lainnya seperti : Friesian Holstein (FH), Madura, Rambon, Ongole dinyatakan tahan. Sapi Bali yang sembuh dari JD masih membawa virus lebih dari dua tahun. Penularan penyakit dapat terjadi melalui kontak maupun mekanis melalui vektor maupun jarum suntik.

Sampai saat ini hanya *breed* sapi Bali yang diketahui rentan terhadap JD. Di lapangan belum pernah dilaporkan *breed* sapi (murni) lainnya terserang penyakit Jembrana, kecuali sapi silang yang memiliki darah sapi Bali. Kasus penyakit dilaporkan pernah terjadi pada sapi Rambon (persilangan sapi Bali dengan sapi Madura). Hewan lainnya seperti : kambing, domba, dan babi dinyatakan tahan terhadap JD dan secara eksperimen marmut jantan yang diinfeksi dengan material yang berasal dari sapi yang menderita JD menimbulkan reaksi radang (orchitis) 14 hari setelah penyuntikan (Adiwinata 1967; Soeharsono dkk., 1990).

Tingkat morbiditas dapat mencapai 60% dengan mortalitas sekitar 10%, tetapi tingkat kematian penderita (*case fatality rate*) cukup tinggi, dapat mencapai 30%. Pengaruh jenis kelamin terhadap kejadian penyakit Jembrana dilaporkan oleh Putra (1999), yang menyatakan 31,8% sapi betina yang terserang JD dalam kelompok umur 1-6 tahun akan mati, dan 7,7% kematian terjadi pada sapi jantan. Demikian juga tentang status fisiologi yang dinyatakan berpengaruh terhadap kejadian penyakit. Sapi bunting lebih peka dibandingkan dengan sapi yang tidak bunting. Enam puluh tiga ekor sapi bunting yang diamati, 51 ekor (81%) menderita JD, dibandingkan dengan 62% kasus JD pada

sapi yang tidak bunting (umur > 3 tahun). Perbedaan kerentanan terhadap penyakit Jembrana pada kedua status hewan ini sangat signifikan

Pengaruh umur pada wabah JD yang terjadi di Kabupaten Karangasem Propinsi Bali, tingkat morbiditas penyakit hewan umur satu sampai tujuh tahun rata-rata sebesar 65%, sementara hewan dibawah umur satu tahun sebesar 49%. Status kekebalan secara umum berpengaruh terhadap kejadian penyakit. Salah satu penyebab terjadinya wabah untuk penyakit yang bersifat endemik ini adalah karena terjadinya perubahan proporsi hewan kebal didalam suatu populasi atau terjadi peningkatan populasi hewan peka. Peningkatan populasi hewan peka dapat terjadi karena meningkatnya jumlah pedet yang lahir atau turunnya antibodi pada hewan yang sebelumnya kebal.

Pada kasus JD yang terjadi di daerah haru biasanya sekitar 70% penderita akan mengalami kesembuhan. Pada wabah yang terjadi di Kabupaten Karangasem-Bali pada tahun 1981, tingkat kematian penderita mencapai 29%, ini berarti 71% hewan penderita mengalami kesembuhan secara alami (Putra dkk., 1983).

Cara penularan penyakit Jembrana dinyatakan sebagai penyakit yang bersifat non kontagius dalam arti tidak terjadi penularan secara kontak badan, tetapi terjadi secara mekanis melalui penggunaan jarum yang tercemar atau melalui gigitan serangga pengisap darah (Dharma dan Putra, 1997). Dalam kaitan ini arthropoda pengisap darah telah dideskriminasi sebagai penyebar JD di lapangan. Hal ini sangat beralasan sebab beberapa kasus di lapangan dapat

terjadi pada hewan yang dikandangkan saja dan relatif terisolir dari ternak lainnya. Oleh karena itu salah satu pengendalian wabah dilakukan penyemprotan dengan insektisida, dan ditengarai pula *Beophilus microplus* dapat menularkan penyakit Jembrana secara transovarial.

Penyakit Jembrana sampai saat ini belum dimasukkan ke dalam penyakit yang bersifat zoonosis, yaitu suatu penyakit pada hewan yang dapat menular pada manusia. Hal ini disebabkan belum adanya laporan penyakit Jembrana yang menyerang manusia, bahkan hanya perbedaan dalam hal *breed* sapi, penyakit ini sudah tidak ditemukan, penyakitnya hanya muncul dimana terdapat sapi Bali. Kecurigaan yang mengarahkan penyakit Jembrana ini bersifat zoonosis tetap ada, mengingat virus penyakit Jembrana ini bersifat immunosupresif, sehingga perlu penelitian lebih lanjut.

Penyakit-penyakit pada hewan yang bersifat zoonosis antara lain Askariasis, Ankilostomiasis, Botulismus, Brucellosis, Salmonellosis, Streptococosis dan yang terakhir penyakitnya telah menyerang penduduk di pulau Jawa ini adalah penyakit Antrak.

2.4.6 Gejala klinis

Gejala klinis yang paling menonjol pada penyakit Jembrana adalah demam yang tinggi, pembengkakan kelenjar limfe dan diare campur darah. Kebengkakan kelenjar limfe (Lim-node, limfoglandula) yang menonjol terlihat pada daerah bahu (Igt. preskapularis), daerah perut lutut (Igt. prefemoralis) dan daerah bawah telinga (Igt. parotis). Diare yang sering disertai oleh adanya darah dalam tinja pada umumnya terjadi beberapa hari setelah hewan demam. Demam

tinggi yang mencapai (42°C), merupakan gejala awal penyakit dan ditemukan pada semua hewan yang terserang. Gejala ini berlangsung selama 5 - 12 hari (rata-rata 7 hari). Secara eksperimental masa inkubasi penyakit antara 4 sampai 12 hari. (Anon, 1993, Soeharsono, 1993; Soeharsono dkk., 1995).

Gejala lain yang terlihat pada sapi Bali yang terserang penyakit Jembrana ini berupa : keluarnya air liur yang berlebihan (hipersalivasi), keluarnya leleran hidung yang bening, adanya erosi pada selaput lendir mulut dan bagian pangkal lidah. Adanya bercak-bercak darah pada kulit (keringat berdarah) dan adanya keputihan selaput lendir mulut, mata dan alat kelamin, serta terjadi kepincangan pada satu atau kedua kakinya. Sapi Bali yang terserang penyakit Jembrana sering kali abortus (Dharma dkk., 1994, Soeharsono dkk., 1995).

Pada penyakit yang akut, khususnya yang terjadi pada wabah, sapi Bali yang terserang penyakit Jembrana, mati secara tiba-tiba tanpa terlihat adanya gejala klinis yang dapat diamati oleh petani. Kondisi tubuh sapi yang mati pada umumnya masih bagus dan kematian biasanya tidak hanya terjadi pada satu ekor hewan, tetapi terjadi pada sejumlah hewan dalam waktu yang relatif singkat. Bagi petani demam dan pembengkakan kelenjar limfe belum dipahami secara baik, oleh karena itu diperlukan termometer dan palpasi untuk mengetahui gejala pembengkakan yang terjadi. Gejala klinis yang dapat dikenali petani adalah adanya mencret, kelesuan dan sapi tidak mau makan.

2.4.7 Perubahan patologi anatomi, histopatologi, dan hematologi.

Gambaran patologi anatomi yang utama selama stadium pertama berupa limfadenopati terutama limfoglandula prescapularis dan limfoglandula prefemorialis. Keadaan ini diamati pada keseluruhan kasus yang terjadi selama wabah di Bali dan Lampung. Haemoragi terutama terlihat pada serosa abomasum dan omasum, sub endokardium dan mukosa di daerah rektum, perdarahan petekie dan ekimosa pada vesika urinaria, saluran pencernaan, limpa, jantung dan ginjal. Pada lapisan mukosa esophagus ditemukan perubahan nekrotik yang bersifat lokal dan tersebar. Lesi ini berwarna putih ke abu-abuan dan beraspek suram, kadang-kadang lesi ini diliputi oleh daerah yang hiperemik. Foki putih keabuan sering juga terlihat pada korteks ginjal dan jantung (Dharma dkk., 1994).

Perubahan histopatologi menunjukkan adanya tiga fase perkembangan penyakit, yaitu : fase inkubasi, fase akut dan fase kesembuhan. Pada fase inkubasi terjadi pada minggu pertama infeksi, ditandai dengan adanya reaksi limforetikuler, yang terjadi pada organ pertahanan, yakni adanya infiltrasi sel-sel limfoid. Fase akut ditandai dengan proliferasi hebat sel-sel limforetikuler pada bagian non folikular organ limfoid dan bersamaan dengan itu juga terjadi infiltrasi dan proliferasi sel-sel limforetikular pada parenkim ginjal, medulla adrenalis hati dan paru-paru. Fase ini juga ditandai dengan terjadinya atrofi folikel dari organ limfoid yang menandai terjadinya immunosupresi.

Kematian terjadi akibat infeksi sekunder yang ditandai dengan nefritis dan pneumonia. Apabila tidak terjadi kematian pada fase akut maka akan

dilanjutkan ke fase kesembuhan yang dimulai pada minggu ke 5. Fase ini ditandai dengan reaksi folikuler yang mencolok pada organ-organ limfoid dan penimbunan sel-sel plasma (plasmatisosis) pada *medullary cords* kelenjar limfe dan kompartemen folikuler limpa (Anon, 1996).

Perubahan hematologi yang konsisten dan menonjol pada pemeriksaan darah adalah terjadinya leukopenia dan limfopenia. Trombositopenia, eosinopenia, neutropenia dan anemia juga akan terjadi pada sapi yang menderita penyakit Jembrana. Trombosit berperan penting dalam proses pembekuan darah, sehingga rendahnya jumlah trombosit ini diduga berkaitan erat dengan keterlambatan proses pembekuan darah, sehingga proses pembekuan darah akan terhambat. Oleh karena itu sapi yang terkena JD dan digigit nyamuk atau alat penghisap darah, akan terlihat bercak-bercak darah pada permukaan kulitnya yang dikenal dengan keringat berdarah. Kadar urea dalam darah meningkat tetapi kadar protein plasma menurun (Anon, 1996).

2.4.8 Gambaran imunopatologik

Studi imunopatologi dilakukan dengan menggunakan teknik imunohistokimia (IHK), yakni dengan melakukan penghitungan rasio sel-sel limfosit BoCD4 : BoCD8 pada kelenjar limfe sapi yang terinfeksi virus penyakit Jembrana. Data menunjukkan pada fase akut terjadi penurunan yang nyata rasio antara BoCD4 : BoCD8 (Dharma dkk, 1994)

Pada sapi Bali yang menderita penyakit Jembrana, penghitungan terhadap *Immunoglobulin Continuing Cells* (ICC) yakni sel plasma yang berfungsi memproduksi imunoglobulin (Ig) tertentu seperti Ig G, IgM atau IgA

menunjukkan adanya penurunan yang nyata. Penurunan IgG dan IgM containing cells (IgG-Cc dan IgM-CC) terjadi pada fase akut, tetapi pada fase kesembuhan akan terjadi peningkatan yang nyata dari IgG-Cc ini. Keadaan ini mengindikasikan pada penyakit jembrana terjadi immunosupresi, selanjutnya oleh Dharma dkk., (1994), Hartaningsih dkk., (1994) mengatakan pada awal kesembuhan ada indikasi bahwa mekanisme kekebalan seluler (*Cell Mediated Immunity/CMI*) dan berperan penting dalam imunopatogenesis penyakit Jembrana

2.4.9 Diagnosa

Diagnosa dapat dibuat berdasarkan gejala klinis, patologi anatomi dan gambaran epidemiologi. Melakukan isolasi terhadap agen penyebab dengan melakukan percobaan secara biologis. Untuk mengetahui hewan karier (pemerita penyakit Jembrana) dapat dilakukan uji serologis yakni dengan Enzyme-linked immunosorbent assay atau Western immunoblotting.

2.4.10 Diagnosa banding

Pada stadium awal sangat mirip dengan penyakit Ingusan (MCF) dan penyakit ngorok (SE), tetapi pada perkembangan penyakit selanjutnya masing-masing akan memperlihatkan ke khasannya. Pengamatan yang didasarkan atas pemeriksaan klinis tidaklah cukup, karena bisa dikelirukan dengan beberapa penyakit lain yang serupa seperti Rinderpest, penyakit ngorok (*Septicemia Epizootica*) dan penyakit Ingusan (*Malignant Catarrhal Fever*). Kedua penyakit yang disebut terakhir telah lama diketahui ada di Indonesia, sedangkan Rinderpest tidak ada di Indonesia.

Studi perbandingan mengenai gambaran histopatologik penyakit Ramadewa di Lampung, penyakit sapi Bali di Banyuwangi dan Sumatra Barat menunjukkan penyakit-penyakit tersebut tidak dapat dibedakan dengan penyakit Jembrana.

Pemeriksaan laboratoris khususnya pemeriksaan secara histopatologik dan serologik sangat diperlukan untuk dapat membedakan penyakit-penyakit tersebut. Pada fase akut penyakit JD terjadi proliferasi sel-sel limforetikuler dan non-folikuler dan folikel mengalami atrofi. Sedangkan pada Rinderpest terjadi nekrosis folikel terutama pada sentrum generativum. Untuk membedakan JD dengan MCF perlu dilakukan pemeriksaan otak dan pembuluh darah. Pada MCF pembuluh darah pada berbagai organ terutama otak, hati, ginjal dan paru-paru mengalami vaskulitis. Pada otak terjadi gliosis, satelitosis dan *perivascular cuffing*, perubahan-perubahan seperti ini tidak terjadi pada penyakit Jembrana (Anon, 1996).

Penyakit yang dinyatakan mempunyai kemiripan dengan JD adalah Bovine Immunodeficiency Virus (BIV). Antibodi virus penyakit Jembrana yang terdeteksi saat ini bereaksi silang dengan BIV. Pemeriksaan dengan ELISA kedua jenis penyakit ini sulit dibedakan, tetapi dengan Western immunoblotting terlihat perbedaan yang cukup jelas, dimana reaksi silang antara kedua penyakit tersebut hanya terletak pada mayor protein P26 dan tidak terhadap jenis protein yang lain, dan ditengarai penyakit BIV ini sudah masuk ke Indonesia

2.4.11 Pengobatan dan pencegahan penyakit.

Pengobatan dapat dilakukan dengan pemberian antibiotika berspektrum luas, yang bertujuan untuk menekan infeksi sekunder oleh bakteri. Tindakan pencegahan dapat dilakukan dengan melakukan vaksinasi dan terhadap hewan yang telah sakit dilakukan dengan mengisolasi ternak sakit dan melakukan penyemprotan terhadap serangga pengisap darah dengan mempergunakan insektisida. Pengawasan yang ketat terhadap lalu lintas ternak keluar dari daerah kasus atau wabah

2.5 Deskripsi *Breed* Sapi di Indonesia

Breed adalah istilah kata dari bangsa atau ras (Belanda) dan bukan istilah dari *ordo* (Latin). Pemakaian kata *breed* disebabkan karena sulit untuk mencari istilah dalam bahasa Indonesia yang tepat / cocok untuk maksud tersebut.

Proses domestikasi sapi, diawali dengan upaya manusia untuk menjinakkan sapi-sapi liar jaman purbakala. Sapi liar yang pertama kali mengalami domestikasi adalah *Bos longifrons* atau *Bos brachyceros* yang tubuhnya tidak terlalu besar dan kemudian dianggap sebagai nenek moyang sapi Eropa sekarang (Clutton B, 1981 dalam Mustahdi 1992).

Breed sapi yang ada kini dibedakan dalam tiga rumpun besar yakni : Sapi asal Eropa (*Bos Taurus*) yang ditandai dengan tidak adanya punuk, Sapi asal Asia (*Bos indicus*) ditandai dengan adanya punuk yang menonjol terutama pada yang jantan, dan sapi-sapi hasil persilangan antara *Bos taurus* dan *Bos indicus*.

Di dunia masih dikenal *breed* sapi lain yang masih tergolong dalam Famili Bovidae, tetapi Genus dan Sub genusnya tidak dapat digolongkan ke dalam tiga rumpun sapi di atas.

Ternak sapi yang sekarang dipelihara berasal dari sapi-sapi liar yang telah dijinakkan orang. Adapun golongan sapi tersebut adalah : *Bos sondaicus* (Banteng atau Bos banteng), golongan ini adalah sapi-sapi lokal Indonesia. *Bos indicus* (sapi Zebu) yakni merupakan sapi yang berasal dan berkembang di India antara lain sapi Brahman dan sapi Ongole. *Bos taurus* (sapi-sapi Eropa), yaitu golongan sapi perah dan sapi daging (Setiadi 1992).

Munculnya bermacam-macam sapi daging disebabkan : (1). Jenis sapi liar mempunyai variabilitas yang besar, mereka dapat membagi ke berbagai variasi dan variasi ini diturunkan pada generasi selanjutnya (2). Perkawinan silang antara dua atau lebih *breed* sapi yang telah ada (3) Adanya seleksi alam atau buatan yang memberi kesempatan timbulnya berbagai *breed* sapi.

Adanya usaha penjinakan sapi liar di berbagai daerah atau negara, maka terjadilah bermacam-macam *breed* sapi ataupun sapi lokal yang berbeda-beda, karena pengaruh lingkungan seperti iklim, tanah dan lain sebagainya. Sapi-sapi tersebut antara lain : Sapi Madura, sapi Bali. Selain dua kelompok sapi ini masih ada sapi yang diberi nama daerahnya seperti sapi Jawa, sapi Sumatra dan lain-lain. Sapi lain yang juga ditemukan di Indonesia adalah sapi Ongole, sapi Brahman, sapi Hereford, sapi Aberdeen angus, sapi Shorthorn, sapi Charolais, sapi Santa Gertrudis (Setiadi 1992).

Sapi Bali merupakan domestikasi dari banteng, dan sampai kini telah mengalami mutasi gen yang cukup berarti. Hal ini disebutkan oleh Huitema (1986), bahwa dibanding dengan banteng sapi Bali sudah mengalami perubahan pola dan warna kulit. Selanjutnya dijelaskan bahwa sapi Bali mengalami pengecilan tubuh apabila dibandingkan dengan banteng.

Di Pulau Bali belum pernah tercatat adanya banteng dalam bentuk liar, maka Darmadja (1990) yang mengutip pendapat Meijer (1962) mempertegas bahwa domestikasi banteng terjadi di Pulau Jawa yang selanjutnya dihidiahkan oleh raja-raja di Jawa kepada raja-raja di Pulau Bali. Apapun pendapat mereka yang pasti saat ini hanya di Pulau Bali dimungkinkan untuk memperoleh sapi Bali yang murni. Hal ini disebabkan karena adanya ketentuan pemerintah melarang masuknya *breed* sapi lain ke Pulau Bali, tetapi saat ini sapi Bali sudah menyebar hampir keseluruhan kepulauan Indonesia dan bahkan sampai ke mancanegara seperti Australia.

Sapi Bali dikenal sebagai sapi potong asli Indonesia, dan walaupun penampitannya kecil namun mempunyai beberapa keunggulan dibanding dengan sapi potong lainnya. Keunggulan tersebut antara lain Tingkat kesuburannya cukup tinggi mencapai 82% sampai bahkan 100%. Sebagai sapi pekerja yang baik dan efisien Mampu memanfaatkan hijauan kurang baik. Persentase karkas yang cukup tinggi dengan daging yang berkualitas baik, tidak berlemak (Darmadja, 1980)

Disamping sifat baik tersebut sapi Bali mempunyai sifat-sifat jelek, seperti : Pertumbuhan yang relatif lambat, kurang baik sebagai sapi angkutan,

makin tua sapi jantannya cenderung menjadi lebih ganas dan yang sangat menjadi masalah adalah rentan terhadap penyakit Jembrana, sehingga apabila tidak cepat ditangani sapi Bali terancam punah.

Sapi Madura seperti halnya sapi Bali merupakan sapi potong Indonesia yang dipertahankan kemurniannya dan dilindungi oleh Staatsblad 1934 No 57 jo.stbl.1937 No. 115. Oleh karena itu saat ini sapi *breed* lain dilarang masuk ke Pulau Madura, akan tetapi sapi Madura diperkenankan disebarkan keluar. Penyebarannya antara lain ke Jawa Timur, Flores, Kalimantan dan Sumatra, akan tetapi perkembangannya tidak sebaik di Pulau Madura.

Sebagian besar sapi Madura memiliki konformasi yang uniform, ukuran tubuhnya sedang sampai kecil, bertulang bagus tetapi berotot, terutama sapi jantan pacuan (karapan) yang terlatih. Kaki cukup kuat untuk bertahan terhadap kerja tarik yang berat.

Warna tubuh sapi Madura dominan adalah coklat medium dan coklat merah. Sering ditemukan warna keputih-putihan di daerah abdomen dan bagian dalam paha. Pada kaki sering ditandai warna seperti kaos kaki yang berwarna lebih muda, tetapi tidak putih seperti sapi Bali.

Punuk dan leher sapi jantan berwarna lebih gelap, tetapi selalu berkembang baik, sedangkan sapi betina mempunyai punuk yang lebih kecil dan agak datar. Cielambirnya kecil, sapi betina mempunyai lipatan pusar dan pada sapi jantan lipatan pusar kecil. Terdapat lingkaran berwarna putih sekitar moncong, seperti yang tampak jelas pada sapi *Brown Swiss* dan *Jersey*. Hidung biasanya berwarna hitam, tetapi kadang-kadang berwarna daging. Cermin pada

bagian belakang agak runcing dan berwarna lebih muda dari sekitarnya tetapi tidak begitu putih seperti pada sapi Bali (Huitema, 1986).

Tanduknya kecil tidak bengkok ke belakang seperti sapi Bali, tetapi ke samping dan ke atas. Kulit diantara tanduk pada sapi jantan seperti pada sapi Bali dewasa. Dibandingkan dengan sapi Bali maka sapi Madura termasuk sapi yang agak lambat pertumbuhannya, tetapi mempunyai *calving rate* sebesar 75%, walaupun tidak sebaik sapi Bali, akan tetapi lebih baik dari pada sapi Ongole (60-70%). Sapi Ongole baru dapat dikerjakan di sawah pada umur 16-20 bulan, tetapi sapi Madura pada umur 12-14 bulan.

Sapi Madura lebih menonjol dipengaruhi karakteristik oleh sapi Bali dari pada sapi Peranakan Ongole (PO). Pengaruh karakteristik sapi PO dijumpai pada punuk dan gelambir yang dimiliki oleh sapi Madura jantan (Gunawan, 1993). Disamping itu sapi Madura mempunyai sifat fenotip yang spesifik dan tidak dimiliki oleh sapi Bali dan sapi Peranakan Ongole

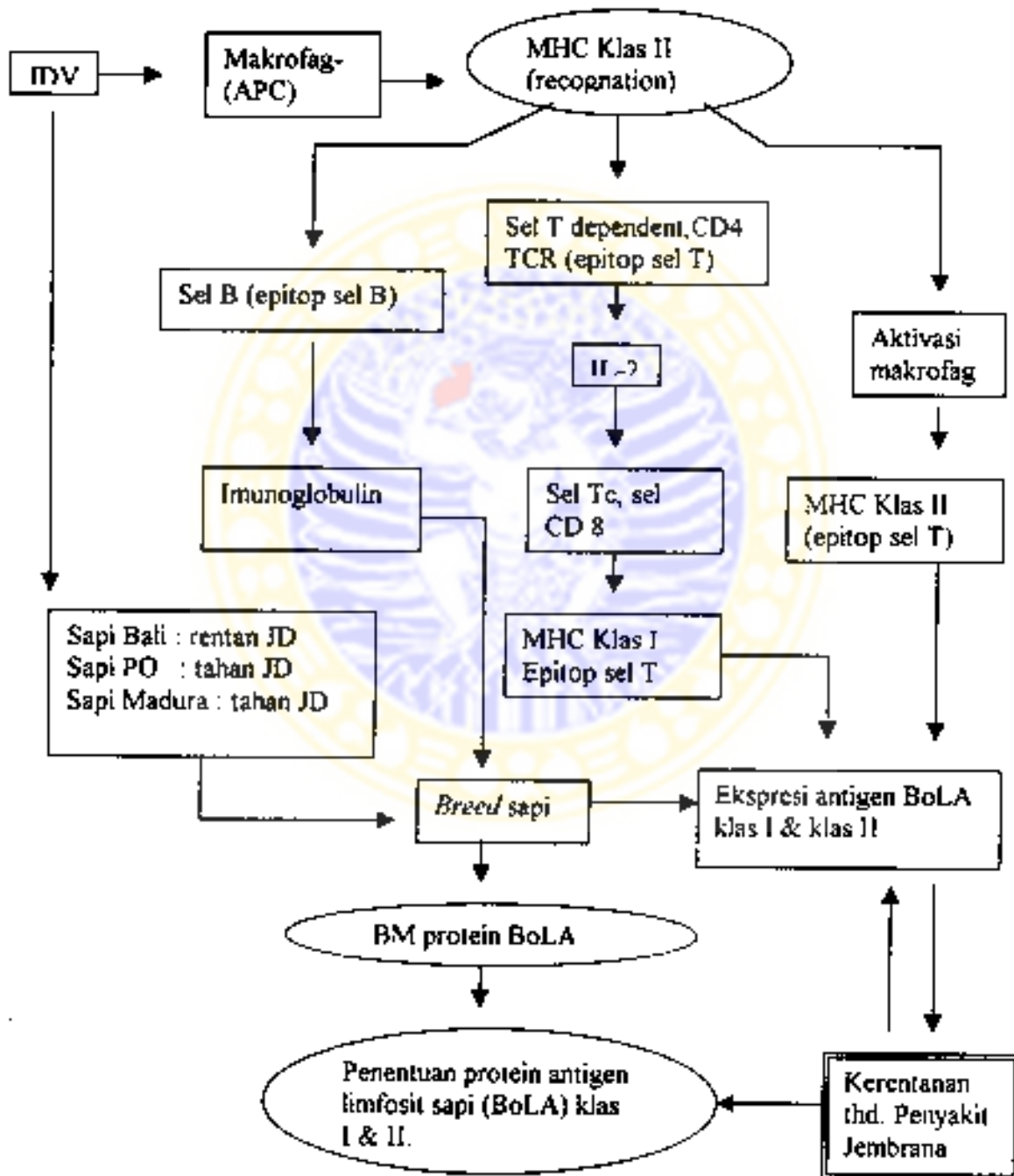
Sapi Ongole, sapi Madura dan sapi Bali merupakan tipe sapi potong yang cukup baik, tetapi ketiganya mempunyai perbedaan dalam hal kualitas karkas. Dalam suatu percobaan menggunakan sapi Ongole dan Madura umur satu tahun, ternyata setelah periode pemberian makanan 280 hari ternyata daging sapi Madura lebih baik dari pada sapi Ongole, tetapi sedikit kurang dibandingkan sapi Bali (Setiawan, 1998)

Pertambahan berat badan maksimal dapat diperoleh dengan penambahan pakan konsentrat. Pertambahan berat badan maksimal pada sapi Madura mendekati sapi Bali, tetapi lebih rendah dari pada sapi peranakan Ongole.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Jembrana Disease Virus (JDV) adalah virus yang menyebabkan penyakit Jembrana pada sapi Bali, termasuk genus *Retrovirus*, sub famili *Lentivirinae* (Soeharsono dkk., 1990. Wilcox dkk., 1992). Virus yang merupakan suatu imunogen masuk kedalam tubuh sapi melalui proses *up take* oleh makrofag, akan mengalami pemecahan menjadi peptida atau fragmen antigen. MHC kelas II atau pada sapi dikenal dengan BoLA (Bovine Limfosit Antigen) mempresentasikan ke permukaan sel untuk proses pengenalan bersama dengan TCR sel CD4. Jadi pemunculan atau ekspresi MHC ditentukan oleh adanya imunogen yang masuk ke dalam tubuh.

Tidak semua permukaan sel dapat mengikat dan menyajikan antigen, tetapi hanya pada tempat spesifik yang dikenal dengan determinan antigen (epitop). Epitop ini dibedakan atas epitop sel T dan epitop sel B, dan epitop yang terbentuk sangat tergantung pada antigen yang dipresentasikan

Epitop sel T akan mengaktifasi makrofag sehingga presentasi antigen oleh MHC kelas II akan semakin meningkat. Epitop sel T juga dapat membentuk IL-2, yang menyebabkan imunogen hancur. Sedangkan sel B yang teraktivasi akan menghasilkan antibodi atau imunoglobulin.

Pengikatan peptida oleh molekul MHC kelas II pertama kali terjadi dikompartemen dimana terakumulasi hasil sintesis molekul MHC kelas II dan kemudian terekspresikan ke permukaan sel. MHC kelas II akan mempresentasikan antigen tersebut kepada sel T melalui reseptor pada permukaan sel TCR. Interaksi antara molekul MHC kelas II, peptida, antigen dan TCR tersebut akan memberikan reaksi imunologi. Selanjutnya timbul respons

imun yang diawali oleh sel T dan berakhir dengan eliminasi antigen non self (Judajana, 1997; Tizard, 1995).

Alur kerja MHC klas I, diawali dengan degenerasi dalam sitosol dan kemudian mengalami proteolisis oleh enzim proteolitik menjadi peptida yang kemudian ditransformasikan ke endoplasmik retikulum melalui TAP transporter protein. Rantai alfa-1 dan beta-2 mikroglobulin akan disclimuti oleh protein ER dibantu oleh valnexin. Kompleks tersebut akan mengalami disosiasi setelah berikatan dengan peptida, dan setelah terbentuk ikatan MHC klas I-peptida antigen, kemudian diekspresikan ke permukaan sel (Judajana, 1997; Tizard, 1995).

Sapi Bali dinyatakan rentan terhadap virus penyakit Jembrana, sedangkan *breed* sapi lainnya seperti sapi Peranakan Ongole (PO) dan sapi Madura dinyatakan tahan terhadap JD (Soeharsono dkk., 1993). Dalam hal ini faktor imunogenetik berperan dalam menentukan kerentanan atau ketahanan individu terhadap suatu infeksi, disamping itu juga mengendalikan derajat imunitas hewan tersebut.

Faktor imunogenetik melalui sistem MHC, adalah pendekatan genetik yang mengendalikan kerentanan dan ketahanan tubuh terhadap penyakit dan menentukan perbedaan reaktivitas imun setiap individu dalam suatu populasi. Oleh karena itu antigen limfosit sapi dipandang perlu untuk dipelajari. Untuk mengetahui klas atau serotipe yang mana paling berperan pada kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana. Dalam hal ini konsep yang akan diajukan adalah menentukan ekspresi BoLA dan menentukan berat molekul protein

antigen limfosit sapi, mengingat setiap *breed* sapi mempunyai latar belakang pola MHC yang unik dan berbeda-beda satu sama lainnya. Sehingga kerentanan dan faktor resiko sapi terhadap suatu penyakit dalam hal ini penyakit Jembrana juga tidak sama.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang dapat diajukan pada penelitian ini adalah

1. Adanya hubungan ekspresi antigen limfosit sapi Bali dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana pada serotipe B5C, BAQ150A dan H34A.
2. Ekspresi antigen limfosit sapi Bali, Peranakan Ongole dan sapi Madura berbeda pada tiga serotipe monoklonal antibodi Bof.A.
3. Terdapat perbedaan berat molekul protein antigen limfosit klas I dan klas II, antara sapi Bali, sapi Peranakan Ongole dan sapi Madura .

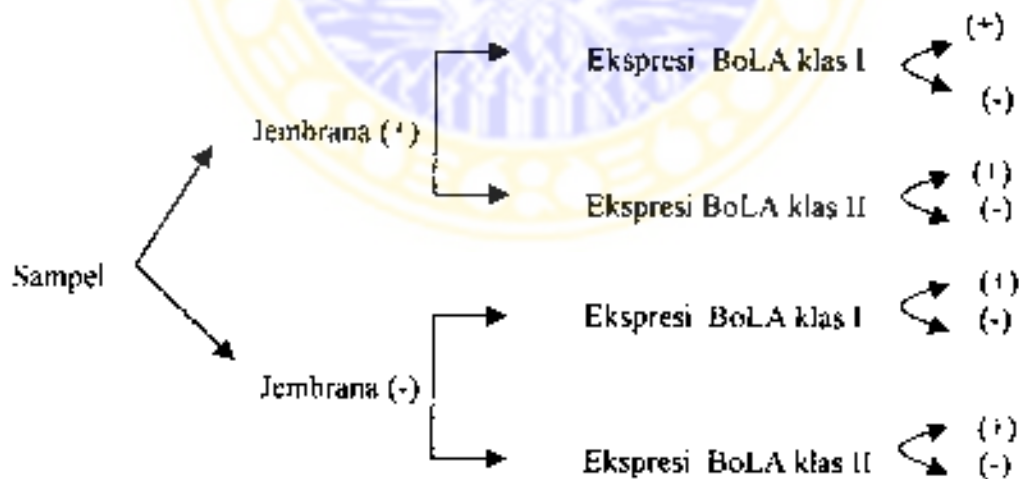
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari dua bagian yaitu studi eksperimental dan observasional analitik. Studi eksperimental dipergunakan untuk menentukan ekspresi antigen limfosit sapi Bali PO dan sapi Madura pada tiga serotipe monoklonal antibodi BoLA. Sedangkan studi observasional analitik dipergunakan untuk menentukan karakterisasi sapi Bali, PO dan sapi Madura, serta pengamatan terhadap gambaran darah, gejala klinis, perubahan patologi anatomi & histopatologi dan serologi penyakit Jembrana serta untuk menentukan perbedaan berat molekul (BM) protein antigen limfosit dari ketiga *breed* sapi.

Penelitian ini berada dalam lingkup imunogenetik, karena antigen BoLA merupakan ekspresi dari gen yang berpengaruh pada reaksi imunologi dalam tubuh.



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian Kasus-Kontrol

Pembuktian adanya hubungan antara ekspresi antigen limfosit sapi dengan kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana, menggunakan rancangan kasus-kontrol (*Retrospective study*). Untuk maksud tersebut akan diteliti keberadaan BoLA klas I dan BoLA klas II pada sejumlah sapi yang menderita penyakit Jembrana dan sapi sehat sebagai kontrol.

Rancangan penelitian yang dipergunakan untuk menentukan : ekspresi antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura pada tiga serotipe MoAb adalah Rancangan Faktorial (3x3), yakni ada dua macam perlakuan (*breed* dan serotipe), yakni ada tiga *breed* sapi (sapi Bali, PO dan sapi Madura) dan tiga serotipe MoAb (B5C, H34A, dan BAQ150A).

<i>Breed sapi</i>	Serotipe MoAb		
	B5C(S1)	BAQ150A (S2)	H34A (S3)
Sapi Bali (B1)	B1S1	B1S2	B1S3
Sapi PO (B2)	B2S1	B2S2	B2S3
Sapi Madura (B3)	B3S1	B3S2	B3S3

Gambar 4.2 Skema Rancangan Penelitian Faktorial

4.2 Populasi sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1 Populasi sampel

Populasi sampel yang dipergunakan didalam menentukan hubungan ekspresi BoLA dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana adalah populasi sapi Bali sakit yang diperoleh dari kasus lapangan dan sapi sakit yang di inokulasi virus penyakit Jembrana, sedangkan sapi kontrol (sehat) diperoleh dari Desa: Marga, Tabanan dan Nusa Penida, Klungkung-Bali. Populasi sampel untuk menentukan ekspresi antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura pada tiga serotipe, serta menentukan berat molekul protein sapi Bali, sapi PO dan sapi Madura, sampel diperoleh sebagai berikut: Sapi Madura diperoleh dari Kamal, Kabupaten Bangkalan, Madura. Sedangkan sapi PO diperoleh dari Rumah Potong Hewan Pegirian Kota madya Surabaya, Jawa Timur, dan sapi Bali dari Tabanan, Nusa Penida-Bali.

4.2.2 Besar sampel

Besar sampel yang dipergunakan untuk menentukan hubungan ekspresi antigen limfosit sapi dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana, sebanyak 20 ekor sapi Bali sehat dan 20 ekor sapi Bali sakit. Untuk menentukan pengaruh *breed* dan serotipe BoLA terhadap ekspresi antigen limfosit sapi, serta BM protein mempergunakan 15 ekor sapi Bali, 15 ekor sapi PO dan 15 ekor sapi Madura.

Keseluruhan sapi yang dipergunakan dalam penelitian ini tidak menunjukkan gejala sakit, kecuali sampel yang dipergunakan untuk menentukan hubungan ekspresi dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana. Jadi jumlah

sapi yang dipergunakan dalam penelitian ini seluruhnya adalah : 40 ekor sapi Bali (sehat dan sakit), 15 ekor sapi PO dan 15 ekor sapi Madura.

4.2.3 Teknik pengambilan sampel

a. Pengambilan sampel untuk pemeriksaan hematologi

Sisa darah dari jarum spuit yang dipergunakan mengambil darah melalui *vena jugularis* diteteskan pada glas slide, selanjutnya dilakukan ulasan darah dan difiksasi dengan methanol. Sampai dilaboratorium dilakukan pewarnaan giemsa.

b. Pengambilan sampel untuk pemeriksaan ELISA

Sampel untuk pemeriksaan serologis (ELISA) diambil darah dari vena yugularis, serum dipisahkan dari klot darah. Serum ditampung dalam tabung bertutup. Selanjutnya dilakukan uji serologi.

c. Pengambilan sampel untuk pemeriksaan Patologi Anatomi dan Histopatologi

Sampel yang dipergunakan dalam pemeriksaan PA dan HIP, adalah organ-organ limfoglandula, limpa, hati, paru-paru, jantung, ginjal. Sebagian organ diperiksa untuk pengamatan PA dan sebagian lagi dimasukkan kedalam formalin, selanjutnya dilakukan pewarnaan HE.

d. Pengambilan sampel untuk pemeriksaan Imunositokimia & Elektroforesis (SDS-PAGE)

Pengambilan sampel pada peternak, dilakukan dengan mengambil darah melalui *vena jugularis* dengan menggunakan tabung yang telah berisi antikoagulan (EDTA). Darah yang diambil sebanyak 20 cc. Darah yang diambil di Rumah Potong Hewan dilakukan dengan cara menampung langsung saat

pemotongan hewan tersebut. Untuk menghindari kerusakan sel-sel darah, seluruh sampel dalam tabung dimasukkan kedalam *dry ice*. Selanjutnya dilakukan isolasi limfosit

c. Pengambilan sampel untuk penentuan protein antigen limfosit sapi.

Sampel yang dipergunakan untuk menentukan protein antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura dilakukan dengan mengisolasi protein hasil elektroforesis.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas

Sebagai variabel bebas adalah *breed* sapi (sapi bali, PO, sapi Madura) dan Serotipe MoAb antigen Bp1.A.

4.3.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah, pertama : ekspresi antigen limfosit sapi, yang dinyatakan dalam 100 sel limfosit melalui pemeriksaan Imunositokimia. Kedua : berat molekul protein dinyatakan dalam Dalton, dengan melalui pemeriksaan Sodium dioksisulfat poliakrilamid gel elektroforesis (SDS-PAGE).

4.3.3 Variabel pengganggu

Variabel pengganggu antara lain : Letak geografis, status fisiologi, jenis kelamin, umur, musim, makanan dan cara pemeliharaan sapi

4.3.4 Definisi Operasional Variabel

1. **Ekspresi antigen limfosit sapi adalah :** penampilan antigen limfosit sapi pada pemeriksaan dengan metode imunositokimia.
2. **Ekspresi positif :** Sel limfosit yang mengekspresikan antigen BoLA lebih besar atau sama dengan 20 tiap 100 sel yang diperiksa.
3. **BM protein adalah :** berat molekul protein antigen limfosit sapi, yang dinyatakan dalam Dalton, melalui pemeriksaan SDS-PAGE.
4. **Kerentanan terhadap JD adalah :** serum sapi lapangan dan sapi eksperimen yang diinokulasi dengan JDV, dan menunjukkan gejala klinis, PA, HP, perubahan hematologi khas penyakit Jembrana dan positif pada pemeriksaan serologi.
5. **Sapi Bali adalah :** sapi yang mempunyai bentuk badan seperti banteng, tetapi lebih kecil. Keempat kaki bagian bawah dan pantat berwarna putih (*White stocking*) dengan perkiraan berat badan antara 250-400 kg, dengan tinggi badan : 130 cm.
6. **Sapi Madura adalah :** sapi yang mempunyai warna kulit coklat atau merah bata, berpunuk kecil dengan tanduk melengkung setengah bulat dan ujungnya menuju ke depan. Berat badan diperkirakan antara : 150 - 300 kg, tinggi 118 cm.
7. **Sapi Peranakan Ongole (PO) adalah :** sapi yang berwarna kulit putih, leher pendek, punggung besar dan panjang. Mata besar, tenang dan tanduk pada betina lebih panjang dari yang jantan. Tinggi badan diperkirakan mencapai 130-160 cm dengan berat badan 400-600 kg.

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Hewan percobaan

Sepuluh ekor sapi Bali sehat asal Nusa Penida dipergunakan dalam penelitian, sapi tersebut diperlakukan sesuai dengan persyaratan etik, yaitu pengelolaan binatang coba pada penelitian ini mengikuti *Animal Ethic*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain : perawatan dalam kandang, pemberian makanan dan minum (*ad libitum*), aliran udara dalam kandang, perlakuan saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan data untuk analisis dan pemusnahannya.

Sapi diinokulasi dengan virus Jembrana isolat Tabanan/87. Isolat dengan titer 10^8 /ml, telah disimpan dalam liquid nitrogen. Virus diencerkan menjadi 10^2 /ml (100ID₅₀) dalam media Dubelco's yang mengandung 10% FCS dan 5x Penstrep.

4.4.2 Pemeriksaan serologis (ELISA)

Bahan yang dipergunakan dalam pemeriksaan ELISA adalah : larutan pencuci buffer, larutan coating buffer, larutan stok tween 20, larutan substrat MoAb terhadap virus penyakit Jembrana diperoleh dari BCDIU/BPPH Wilayah VI Denpasar, dan antiserum/konjugat (*Goat anti-bovine IgG*) diperoleh dari VMRD, Pullman, WA, USA

4.4.3 Pemeriksaan hematologi

Bahan-bahan yang dipergunakan dalam pemeriksaan hematologi adalah : methanol, larutan Giemsa

4.4.4 Isolasi limfosit

Isolasi limfosit dipersiapkan untuk pemerisaan imunositokimia dan penentuan protein antigen histokompatibilitas utama dengan elektroforesis.

Bahan yang diperlukan adalah : EDTA, PBS, Ficoll, Methylene blue.

4.4.5 Pemeriksaan imunositokimia

Pemeriksaan ini dilakukan untuk menentukan ekspresi MHC pada sel limfosit. Bahan-bahan yang dipergunakan dalam pemeriksaan imunositokimia adalah : PBS, Aquadest, Monoklonal antibodi serotipe B5C (MHC klas I) dan BAQ150A& H34A (MHC klas II), Rabbit Anti Mouse (konjugat) yang diperoleh dari VMRD, Pullman, WA, USA. Normal Rabbit Serum (NRS), Xylo, Alkohol absolut, Aceton, H₂O₂, Meyers

4.4.6 Preparasi sampel untuk elektroforesis :

Sebelum melakukan elektroforesis sampel diperlakukan dalam lysis buffer dengan komposisi sebagai berikut 250 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 8,0, 0,01%NaN₃, 10mM Glycin, 5mMEDTA dan 1mM PMSE.

4.4.7 Penentuan BM protein (SDS-PAGE)

Bahan yang dipergunakan dalam elektroforesis (SDS-PAGE) adalah . Acetic acid/ asam asetat 7,5%, Acrylamid, Glutaral dehid 10%, Tris Hcl pH 8,8, NaOH 0,36%, Tris Hcl pH 6,8, NH₃ (amoniak), SDS 0,5%, AgNo₃, Aquadest, Formaldehid, Temed, Zitronzoure, Aps 10% (4oC), Butanol, Elektrolit buffer, Methanol 5%/2,5%, Methanol 50%/25%.

4.4.8 Western-Imunoblotting

Bahan yang dipergunakan adalah protein yang diisolasi pada proses elektroforesis dan transfer buffer, kertas nitroselulosa, BSA dan MoAB (B5C, BAQ150A dan H34A).

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Pemeriksaan serologis (ELISA)

Peralatan yang dipergunakan dalam pemeriksaan serologis adalah . inkubator (37°C), komputer, ELISA washer, ELISA reader, waterbath monopipet (2-20 µl, 20-200 µl), multichange pipette, tip, plat mikrotiter 96 lubang, kulkas(4°C).

4.5.2 Pemeriksaan hematologi

Gelas obyek, tabung reaksi, pipet.

4.5.3 Isolasi limfosit

Peralatan yang dipergunakan antara lain pipet pasteur dan pipet ukuran 1 ml dan 5 ml Vannoject, sentrifugasi, laminar floor, tabung ukuran 10cc, 20 cc, tabung Erlenmeyer, tabung 100 cc, 200 cc.

4.5.4 Pemeriksaan Imunositokimia

Peralatan yang dipergunakan adalah : kaca slide, Mikro pipet, tabung 2cc, gelas beker 100 cc, mikroskop, gelas Erlenmeyer, pipet.

4.5.5 Penentuan protein (SDS-PAGE)

a. Preparasi sampel peralatan yang dipergunakan adalah : kulkas (4°C), Microfuge

b. Elektrophoresis

Peralatan yang dipergunakan adalah : Mikro pipet, tabung ependorf, Mini protein II apparatus (Bio-Rad), cawan petri, pipet 1 ml, 5 ml dan 10 ml. Gelas tabung, gelas ukur, *shaker waterbath*.

4.5.6 Western-Imunoblotting

Alat-alat yang dipergunakan . alat biometra, cawan petri, tabung gelas.

4.6 Lokasi dan Waktu penelitian

4.6.1 Lokasi penelitian

Pemeriksaan serologi dan isolasi limfosit dilakukan di Lab. Unit Penyidikan Penyakit Jembrana, sedangkan pengamatan Imunositokimia dilakukan di Lab. Patologi Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Denpasar-Bali. Penelitian karakterisasi dan penentuan protein antigen limfosit sapi dilakukan di Lab. Dengue, Tropical Diseases Center-UNAIR.

4.6.2 Waktu Penelitian

Persiapan penelitian dilakukan mulai tanggal 1 Nopember sampai dengan tanggal 30 Januari 2001, sedangkan pelaksanaan penelitian dimulai tanggal 1 Februari 2001 dan berakhir bulan Nopember 2001. Waktu penelitian selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Jadwal penelitian penentuan protein antigen limfosit sapi dan hubungan ekspresinya dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana

Kegiatan	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Persiapan	x	x	x											
Pengumpulan data			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Analisis data					x	x	x	x	x	x	x	x		
Penulisan laporan						x	x	x	x	x	x	x		
Seminar hasil													x	
Ujian tertutup														x

4.7 Prosedur Pengambilan Data

Pengambilan data diawali dari pengamatan karakteristik sapi, dilanjutkan dengan pengamatan gejala klinis. Terhadap keseluruhan sampel dilakukan pemeriksaan, hematologi dengan pewarnaan Giemza, serologi dengan ELISA dan khusus untuk sapi eksperimen dilakukan pengamatan terhadap perubahan PA dan HP. Sapi Bali sakit diperoleh dengan dua cara, yakni dengan mengambil kasus dari lapangan dan inokulasi langsung dengan JDV.

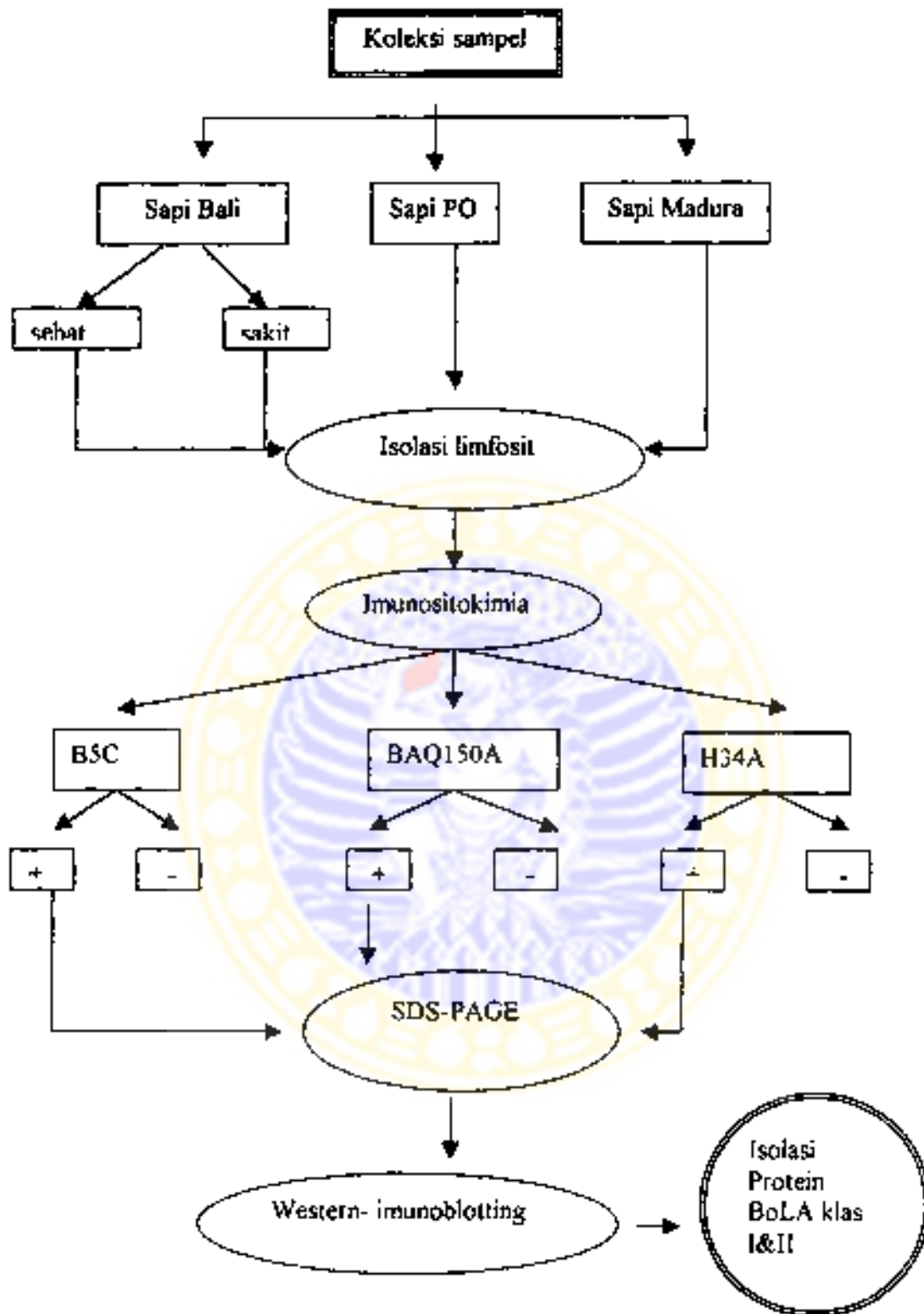
Untuk menentukan ekspresi antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura pada tiga serotipe MoAb BoLA klas I dan klas II, dan hubungannya dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana dilanjutkan dengan isolasi limfosit (Lampiran 4). Pengambilan data dilakukan melalui pemeriksaan imunositokimia

Penilaian diberikan (+/-), terhadap sampel yang mengekspresi MHC positif (≥ 20 sel tiap 100 sel limfosit yang diamati). Selanjutnya terhadap

sampel yang positif dilakukan karakterisasi berat molekul proteinnya dengan metode SDS-PAGE. Adapun cara penghitungannya adalah dengan menyalin pada kertas milimeter blok dan disesuaikan, kemudian dihitung berat molekulnya, dibandingkan dengan marker/penanda.

Penisahan dan isolasi protein dilakukan dengan SDS-PAGE memakai alat mini Protean II Apparatus (Bio-Rad). Setiap garis protein yang terlihat kemudian diberi tanda dan dipotong melintang, dengan menggunakan pisau scalpel steril, dicincang kemudian dimasukkan dalam alat electro eluter (Bio-Rad).

Penentuan protein antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura dilakukan dengan melakukan pengujian terhadap MoAB (BoLA klas I dan klas II) dengan metode Western-Immunoblotting. Masing-masing protein ditampung, kemudian disimpan pada suhu -20°C . Prosedur pengambilan data dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.3 Prosedur pengambilan data penelitian

4.8 Analisis Data

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS. Data mengenai hubungan ekspresi antigen limfosit sapi dengan kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana, dianalisis dengan *chi-square*. Pengaruh *breed* sapi dan serotipe MoAb antigen BoLA terhadap ekspresi antigen limfosit sapi di analisis dengan Analisis Varian, sedangkan untuk menentukan perbedaan pengaruh dan interaksi kedua faktor dilanjutkan dengan I.S.D. Penentuan perbedaan BM protein antigen limfosit sapi klas I dan klas II antara sapi Bali, PO dan sapi Madura dilakukan dengan analisis Manova (Steel dan Torrie, 1991).



BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Pengamatan Karakterisasi Sapi

Sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah: sapi Bali, sapi Peranakan Ongole (PO) dan sapi Madura. Karakterisasi dari ke tiga sapi tersebut sebagai berikut :

5.1.1 Sapi Bali

- Ukuran badan sedang dengan bentuk badan memanjang, badan padat, bertanduk, kepala agak pendek dengan dahi yang datar.
- Tanduk sapi Bali jantan berukuran besar, runcing dan tumbuh agak ke bagian luar kepala. Apabila dilihat dari depan berbentuk seperti huruf U yang melebar pada kedua ujungnya.
- Warna bulu merah bata pada betina, sedangkan pada yang jantan menjadi coklat kehitaman. Ciri khas adanya bulu berwarna putih yang terdapat pada bawah keempat kakinya dengan batas yang jelas (*mirror*).



Gambar 5.1 Sapi Bali

5.1.2 Sapi Peranakan Ongole (PO)

- Warna kulit putih dengan leher pendek, punggung besar dan panjang
- Mata besar dan terang, kulit disekitar mata lebih kurang 1 cm berwarna hitam
- Tanduk pada yang betina relatif lebih panjang dari pada yang jantan
- Tinggi badan yang jantan antara 140-160 cm dan yang betina 130-140cm
- Berat badan kira-kira mencapai 600 kg pada yang jantan, sedangkan pada sapi betina 400 kg.



Gambar 5.2 Sapi Peranakan Ongole

5.1.3 Sapi Madura

- Warna bulu (kulit) coklat atau merah bata, adanya warna putih pada daerah kaki dan bagian belakang tetapi tidak sejelas pada sapi Bali.
- Berpunuk kecil
- Tanduk melengkung setengah bulat dengan ujungnya menuju kedepan
- Berat badan pada yang jantan dapat mencapai 300 kg, sedangkan pada sapi betina mencapai 150 sampai 200 kg
- Tinggi badan berkisar 120 cm.



Gambar 5.3 Sapi Madura

5.2 Pengamatan Gejala Klinis Penyakit Jembrana.

Pemeriksaan gejala klinis dilakukan terhadap tubuh sapi. pengamatan hematologi dan serologi dilakukan terhadap darah dan serum yang berhasil dikumpulkan. Dari keseluruhan sampel sapi Bali, PO dan Madura, hanya sapi

Bali yang ditemukan menunjukkan gejala penyakit Jembrana, sedangkan pada sapi Madura dan PO gejala penyakit ini tidak ditemukan.

Sapi Bali yang menderita penyakit Jembrana kasus lapangan dan sapi eksperimen yang diinokulasi dengan virus penyakit Jembrana, memberikan gejala klinis yang sama. Terjadi peningkatan temperatur tubuh berkisar antara 39,5 °C sampai 41,2°C, sedangkan gejala-gejala khas seperti keringat berdarah belum terlihat.

Tabel 5.1 *Breed* sapi yang menderita penyakit Jembrana

<i>Breed</i> sapi	Gejala klinis penyakit Jembrana
Sapi Bali	+
Sapi PO	-
Sapi Madura	-

5.3 Pengamatan Hematologi dan Serologi Penyakit Jembrana

Pengamatan hematologi dilakukan terhadap sapi Bali yang menunjukkan gejala klinis menderita penyakit Jembrana, yakni dengan melakukan pemeriksaan terhadap WBC (*White Blood Cell*), RBC (*Red Blood Cell*), persentase haemoglobin dan *differential count* (netrofil, limfosit, monosit dan eosinofil) Terhadap serum yang dikumpulkan dilakukan uji serologi dengan Elisa

Tabel 5.2 Data hasil pemeriksaan hematologi sapi Bali.

No. Sapi Bali	WBC ($\times 10^3$)	RBC ($\times 10^6$)	Hb (%)	Differential Count			
				Net	Lym	Mon	Eus
1	4,2	662	14,8	38	49	6	-
2	4,7	583	14,6	35	53	5	-
3	3,1	630	13,2	33	30	9	-
4	4,3	715	16,0	42	51	7	-
5	3,5	543	11,8	38	53	9	-
6	4,2	742	10,4	37	44	7	-
7	3,1	687	15,0	37	54	6	-
8	4,3	621	12,8	36	44	5	-
9	3,5	705	14,6	44	39	7	-
10	4,2	662	16,6	33	45	7	-
11	3,1	693	13,0	37	45	8	-
12	4,3	635	17,0	42	50	8	-
13	3,5	742	10,4	37	43	7	-
14	4,2	543	11,8	38	44	9	-
15	8,75	615	12,3	34	55	11	-
16	9,8	704	10,8	34	57	9	-
17	7,9	805	9,8	33	61	6	-
18	7,7	635	14,6	31	63	6	-
19	6,9	715	12,4	35	56	7	-
20	10,5	593	11,2	37	55	8	-

Perubahan hematologi sapi Bali, baik pada sapi eksperimen yang diinokulasi dengan JDV maupun sapi yang menderita penyakit Jembrana di lapangan, terjadi penurunan jumlah leukosit (leukopenia), penurunan jumlah limfosit (limfopenia) dan penurunan netrofil (neutropenia).

Tabel 5.3 Data hasil pemeriksaan serologi sapi Bali, PO dan sapi Madura.

No.	Titer Elisa	Titer Elisa	Titer Elisa
	Sapi bali	PO	Madura
1	0,377	-	-
2	0,286	-	-
3	0,283	-	-
4	0,289	-	-
5	0,331	-	-
6	0,377	-	-
7	0,408	-	-
8	0,406	-	-
9	0,284	-	-
10	1,225	-	-
11	1,638	-	-
12	1,109	-	-
13	1,459	-	-
14	1,314	-	-
15	1,359	-	-
16	0,811	-	-
17	0,549	-	-
18	0,717	-	-
19	1,638	-	-
20	1,314	-	-

Pemeriksaan serologi dilakukan terhadap populasi sampel sapi Bali, PO dan sapi Madura melalui pengamatan titer antibodi terhadap antigen virus Jembrana. Dari keseluruhan sampel, hanya sapi Bali yang menunjukkan gejala sakit memberikan hasil yang positif terhadap penyakit Jembrana.

Gambar 5.4, 5.5, dan 5.6 berikut ini adalah gambaran darah hasil pemeriksaan hematologi: sel limfosit, netrofil dan sel monosit dengan pewarnaan Giemsa.



Gambar 5.4 Hasil pemeriksaan hematologi, tanda panah menunjukkan gambar sel limfosit dengan pewarnaan Giemsa pembesaran 100X



Gambar 5.5 Hasil pemeriksaan hematologi, tanda panah menunjukkan gambar sel netrofil dengan pewarnaan Giemsa pembesaran 100X.



Gambar 5.6 Hasil pemeriksaan hematologi, tanda panah menunjukkan gambar sel monosit dengan pewarnaan Giemsa pembesaran 100X.

5.4 Perubahan Patologi Anatomi dan Histopatologi Penyakit Jembrana.

Sapi yang diinokulasi virus penyakit Jembrana, memberikan gambaran patologi anatomi menciri pada pembesaran limpa dan limfoglandula dan terjadi perubahan warna (perdarahan).



Gambar 5.7 Hasil pemeriksaan patologi anatomi limpa pada sapi Bali menderita penyakit Jembrana.

Perubahan histopatologi menunjukkan infiltrasi sel-sel limfosit pada limpa, hati, ginjal, dan paru-paru demikian juga adanya proliferasi sel-sel limforetikuler dan pada folikel.

5.5 Hubungan Ekspresi Antigen Limfosit Sapi dengan Kerentanan terhadap Penyakit Jembrana.

Data hasil penelitian hubungan ekspresi antigen limfosit sapi (BoLA) klas I dan klas II dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana, dapat dilihat pada Lampiran 10. Data frekuensi ekspresi BoLA klas I serotipe B5C dengan kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana dapat dilihat pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Data ekspresi antigen limfosit sapi Bali rentan dan tahan terhadap penyakit Jembrana pada serotipe B5C.

		Ekspresi		Total
		+	-	
Sapi	Rentan	7	13	20
Bali	Sehat	17	3	20
Total		24	16	40

Data hasil penelitian ekspresi BoLA pada sapi Bali selanjutnya dianalisis dengan *Chi-Square*. Hasil analisis (Lampiran 15) menunjukkan, adanya hubungan antara ekspresi BoLA klas I serotipe B5C dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana. Dalam hal ini ekspresi BoLA pada sapi Bali rentan berbeda ($P < 0,05$) dengan sapi Bali tahan penyakit Jembrana.

Tabel 5.5 Data ekspresi antigen limfosit sapi Bali rentan dan tahan terhadap penyakit Jembrana pada erotipe BAQ150A.

		Ekspresi		Total
		+	-	
SAPI	Rentan	14	6	20
	Sehat	15	5	20
Total		29	11	40

Data hasil penelitian ekspresi BoLA klas II serotipe BAQ150A pada sapi Bali selanjutnya dianalisis dengan *Chi-Square* dan hasil analisis dapat dilihat pada Lampiran 15. Hasil analisis menunjukkan, tidak adanya hubungan antara ekspresi BoLA klas II serotipe BAQ150A dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana. Dalam hal ini ekspresi BoLA pada sapi bali rentan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan sapi Bali tahan penyakit Jembrana.

Tabel 5.6 Data ekspresi antigen limfosit sapi Bali rentan dan tahan terhadap penyakit Jembrana pada serotipe H34A.

		EKSH34A		Total
		+	-	
SAPI	Rentan	12	8	20
	Sehat	7	13	20
Total		19	21	40

Data hasil penelitian ekspresi BoLA klas II serotipe H34A pada sapi Bali selanjutnya dianalisis dengan *Chi-Square* dan hasil analisis dapat dilihat pada Lampiran 15. Hasil analisis menunjukkan, tidak adanya hubungan antara

ekspresi BoLA klas II serotipe H34A dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana. Dalam hal ini ekspresi antigen limfosit sapi Bali rentan tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dengan ekspresi antigen limfosit sapi Bali tahan penyakit Jembrana.

5.6 Ekspresi Antigen Limfosit Sapi Bali, PO dan Sapi Madura pada Tiga Serotipe Monoklonal Antibodi BoLA klas I dan klas II.

Tiga *breed* sapi yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah : sapi Bali, PO dan sapi Madura, tanpa memperhatikan jenis kelamin, umur, status fisiologi, letak geografi, musim, makanan dan cara pemeliharaan sapi. Terhadap ke tiga *breed* sapi tersebut dilakukan isolasi limfosit, untuk melihat ekspresi antigen limfosit sapi. Tiga serotipe monoklonal antibodi yang dipergunakan adalah BoLA klas I serotipe B5C, BoLA klas II serotipe BAQ150A dan H34A, yang diperoleh dari VMRD, Pullman, USA. Data hasil pengamatan ekspresi antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura dapat dilihat pada Tabel 5.7.

Tabel 5.7. Hasil rata-rata pengamatan ekspresi antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura pada tiga serotipe monoklonal antibodi

<i>Breed</i> sapi	Serotipe monoklonal antibodi BoLA		
	B5C	BAQ150A	H34A
Sapi Bali	8.1	29.1	19.0
Sapi PO	22.3	22.6	14.9
Sapi Madura	28.7	26.2	26.4

Hasil analisis statistik (lampiran 18) menunjukkan ekspresi antigen limfosit antara sapi Bali, PO dan sapi Madura pada tiga serotipe Monoklonal antibodi B5S, BAQ150A dan H43A memberikan hasil yang tidak berbeda nyata

($P>0,05$). Data ekspresi antigen limfosit tiga *breed* sapi dapat dilihat pada Tabel 5.8, sedangkan rata-rata pengaruh serotipe BoLA terhadap ekspresi antigen limfosit sapi dapat dilihat pada Tabel 5.9. Hasil analisis selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 18.

Tabel 5.8 Hasil rata-rata ekspresi antigen limfosit pada tiga *breed* sapi.

SAPI	Mean	N	Std. Deviation
Bali	24,36	45	14,88
Madura	27,09	45	18,34
PO	19,96	45	11,32
Total	23,80	135	15,29

Breed sapi Madura memberikan rata-rata ekspresi yang paling tinggi (27,09) selanjutnya sapi Bali (24,36) dan sapi PO (19,96). Hasil analisis varian (Lampiran 18) menunjukkan, *breed* sapi dan serotipe monoklonal antibodi BoLA, memberikan hasil yang tidak berbeda nyata ($P>0,05$) terhadap ekspresi antigen limfosit sapi.

Pengujian dengan menggunakan uji LSD lebih lanjut terhadap ke tiga *breed* sapi menunjukkan, terdapat perbedaan yang nyata ($P<0,05$) antara ekspresi antigen limfosit sapi Madura dengan ekspresi antigen limfosit sapi PO, sedangkan antara sapi Bali dengan sapi Madura dan sapi Bali dengan PO memberikan ekspresi antigen limfosit yang tidak berbeda nyata ($P>0,05$).

Tabel 5.9 Hasil rata-rata ekspresi antigen limfosit pada tiga serotipe MoAb

MHC	Mean	N	Std. Deviation
B5C	25,09	45	16,49
BAQ150A	26,20	45	10,68
H34A	20,11	45	17,46
Total	23,80	135	15,29

Dilihat dari hasil rata-ratanya maka, monoklonal antibodi BoLA serotipe BAQ150A memberikan ekspresi paling tinggi (26,20), selanjutnya serotipe B5C (25,09) dan serotipe H34A (20,11). Dalam hal ini secara statistik (Lampiran 18) ke tiga serotipe monoklonal antibodi yang dipergunakan memberikan hasil ekspresi yang tidak berbeda ($P > 0,05$).



Gambar 5.8 Gambar ekspresi antigen limfosit sapi pada pemeriksaan Imunositokimia. Pembesaran 45x

- Keterangan : Sel limfosit berwarna biru tidak mengekspresikan antigen limfosit sapi.
- Sel limfosit berwarna coklat mengekspresikan antigen limfosit sapi.



Gambar 5.9 Ekspresi BoLA pada Sel Limfosit dengan Pemeriksaan Imunositokimia Pembesaran 100x

Keterangan :

- Sel limfosit berwarna biru tidak mengekspresikan antigen limfosit sapi.
- Tanda panah menunjukkan sel limfosit berwarna coklat mengekspresikan antigen limfosit sapi.

5.7 Berat Molekul Protein Antigen Limfosit Sapi Bali, PO dan Sapi Madura.

Berat molekul protein antigen limfosit sapi Bali klas I rantai alfa (α) berkisar antara 43.836 dalton sampai 47.139 dalton dan rantai beta (β) 11.250 dalton sampai 14.500 dalton. Sedangkan antigen limfosit sapi Bali klas II rantai alfa (α), berkisar antara 22.250 dalton sampai 30.999 dalton dan rantai beta (β) 21.277 dalton sampai 25.250 dalton.

Berat molekul protein antigen limfosit sapi PO klas I rantai alfa (α) berkisar antara 38.836 dalton sampai 43.836 dalton dan rantai beta (β) 11.500 dalton sampai 14.500 dalton. Sedangkan protein antigen limfosit sapi klas II

rantai alfa (α), berkisar antara 20.000 dalton sampai 36.748 dalton dan rantai beta (β) 23.000 dalton sampai 23.750 dalton.

Berat molekul protein antigen limfosit sapi Madura klas I rantai alfa (α) berkisar antara 45.252 dalton sampai 48.084 dalton dan rantai beta (β) 11.250 dalton sampai 14.500 dalton. Sedangkan antigen limfosit sapi klas II rantai alfa (α), berkisar antara 21.785 dalton sampai 30.999 dalton dan rantai beta (β) 18.500 dalton sampai 21.866 dalton. Dibawah ini (Tabel 5.10) secara ringkas BM protein antigen limfosit ke tiga *breed* sapi, dan data lebih lengkap berat molekul protein antigen limfosit sapi disajikan pada Lampiran 12, 13 dan 14.

Tabel 5.10 Data berat molekul protein antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura dalam dalton dengan pemeriksaan elektroforesis

Breed sapi	Berat molekul protein antigen limfosit Sapi (BoLA)			
	Klas I		Klas II	
	Rantai alfa	Rantai beta	Rantai alfa	Rantai beta
Sapi Bali	43.836-47.139	11.250-14.500	22.250-30.999	21.277-25.250
PO	38.836-43.836	11.500-14.500	20.000-36.748	23.000-23.750
Madura	45.252-48.084	11.250-14.500	21.785-30.999	18.500-21.866

Apabila dilihat dari rataannya dan band-band hasil elektroforesis, maka berat molekul protein antigen limfosit sapi Bali berbeda dengan sapi PO demikian juga dengan sapi Madura. Tetapi dari hasil analisis statistik diperoleh hasil sebagai berikut : berat molekul protein antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura klas I rantai β dan klas II rantai α , tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$)

Tabel 5.11 menunjukkan berat molekul protein antigen limfosit sapi klas I rantai α sapi PO dengan sapi Bali, dan PO dengan sapi Madura terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Tetapi berat molekul sapi Bali dengan sapi Madura tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$).

Tabel 5. 11 Hasil uji LSD berat molekul protein antigen limfosit sapi klas I rantai α .

(I) Kode Sapi	(J) Kode Sapi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Bali	Madura	-1.00275	.68347	.154	-2.40512	.39962
	PO	4.73875	.68347	.000	3.33638	6.14112
Madura	Bali	1.00275	.68347	.154	-.39962	2.40512
	PO	5.74150	.68347	.000	4.33913	7.14387
PO	Bali	-4.7388	.68347	.000	-6.14112	-3.33638
	Madura	-5.7415	.68347	.000	-7.14387	-4.33913

Tabel 5.12 Hasil uji LSD berat molekul protein antigen limfosit sapi klas II rantai β .

(I) Kode Sapi	(J) Kode Sapi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Bali	Madura	2.10550	.44442	.000	1.19363	3.01737
	PO	-1.0600	.44442	.024	-1.97187	-.14813
Madura	Bali	-2.1055	.44442	.000	-3.01737	-1.19363
	PO	-3.1655	.44442	.000	-4.07737	-2.25363
PO	Bali	1.06000	.44442	.024	.14813	1.97187
	Madura	3.16550	.44442	.000	2.25363	4.07737

Dari Tabel 5.12 menunjukkan, berat molekul protein antigen limfosit sapi klas II rantai β sapi Bali dengan sapi PO, sapi Bali dengan sapi Madura, dan sapi

PC) dengan sapi Madura, berbeda nyata ($P < 0,05$). Berikut adalah gambar hasil elektroforesis karakterisasi berat molekul protein antigen limfosit sapi Bali, PC dan sapi Madura



Gambar 5.10 Foto Hasil Elektroforesis Sapi Bali, PC dan Sapi Madura

Keterangan

1 dan 4, dan 7 hasil elektroforesis protein antigen limfosit sapi Bali
 2 dan 5 dan 8 hasil elektroforesis protein antigen limfosit sapi PC
 3 dan 6 dan 9 hasil elektroforesis protein antigen limfosit sapi Madura
 10 marker

5.8 Penentuan Berat Molekul Protein Antigen Limfosit Sapi Bali, PC dan sapi Madura

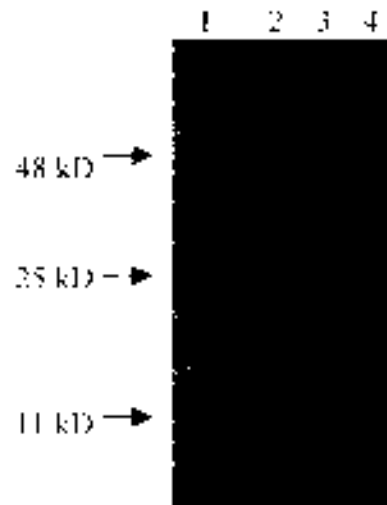
Penentuan protein antigen limfosit sapi (Bal A; diawal) dengan mengisolasi band pada gel hasil elektroforesis yang ditengarai sebagai BM protein Bal.A klas I maupun klas II. Untuk memastikan bahwa protein yang diisolasi adalah protein antigen limfosit sapi, maka dilakukan pengujian dengan

MoAb spesifik untuk BoLA klas I (serotipe B5C) dan klas II (serotipe BAQ150A, H34A).

Tabel 5.13 Data penentuan protein antigen limfosit pada Pengujian menggunakan MoAb dengan pemeriksaan Western-Imunoblotting

Breed sapi	Peruntan reaksi MoAb
Sapi Bali	48kD, 25kD dan 11kD
Sapi PO	45kD, 26kD dan 12kD
Sapi Madura	48kD, 26kD dan 11kD

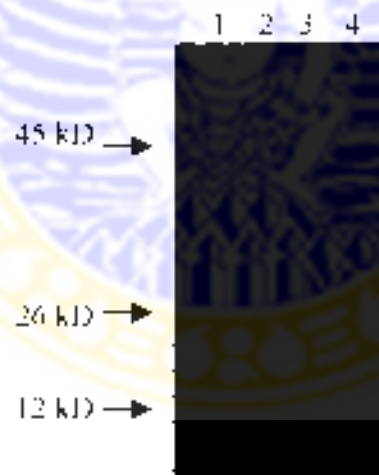
Hasil penelitian menunjukkan protein antigen limfosit bereaksi positif berikatan dengan antibodi, yang ditandai munculnya band pada kertas nitroselulosa dengan pemeriksaan Western-Imunoblotting. Peruntan reaksi antigen antibodi dengan berat molekul antigen limfosit sapi Bali: 47 kD, 11 kD (BoLA klas I rantai α, β) dan klas II: 25 kD (rantai β). Sapi peranakan Ongole klas I : 45 kD (rantai α), 12 kD (rantai β) dan klas II: 26 kD (rantai α) dan sapi Madura klas I 48 kD, 11kD (rantai α, β), dan klas II: 26 kD (rantai β).



Gambar 5.11 Hasil Pengujian protein antigen limfosit sapi Bali dengan MoAb pada pemeriksaan Western - Immunoblotting

Keterangan

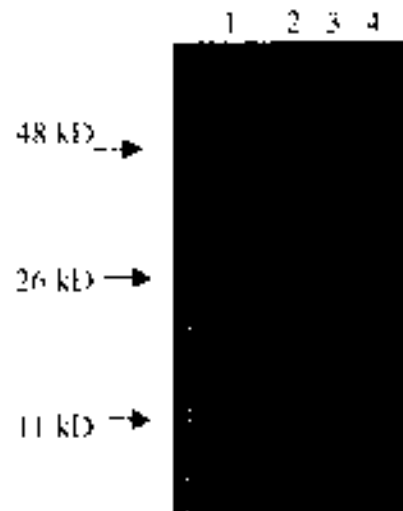
1. Marker; 2. Antigen limfosit sapi Bali bereaksi dengan MoAb, dan membentuk band; 3. Antigen limfosit sapi Bali tanpa MoAb memberikan reaksi negatif; 4. MoAb tanpa antigen limfosit sapi Bali memberikan reaksi negatif.



Gambar 5.12 Hasil Pengujian protein antigen limfosit sapi PO dengan MoAb pada pemeriksaan Western - Immunoblotting

Keterangan

1. Marker; 2. Antigen limfosit sapi PO bereaksi dengan MoAb, dan membentuk band; 3. Antigen limfosit sapi PO tanpa MoAb memberikan reaksi negatif; 4. MoAb tanpa antigen limfosit sapi PO memberikan reaksi negatif.



Gambar 5.13 Hasil Pengujian protein antigen limfosit sapi Madura dengan MoAb pada pemeriksaan Western - Immunoblotting.

Keterangan :

1. Marker.
2. Antigen limfosit sapi Madura bereaksi dengan MoAb, dan membentuk band.
3. Antigen limfosit sapi Madura tanpa MoAb memberikan reaksi negatif.
4. MoAb tanpa antigen limfosit sapi Madura memberikan reaksi negatif.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pengamatan Karakterisasi Sapi

Sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah protein antigen limfosit yang berasal dari sapi Bali, sapi Peranakan Ongole (PO) dan sapi Madura. Oleh karena itu terlebih dahulu dilakukan pengamatan karakterisasi terhadap ketiga *breed* sapi tersebut.

6.1.1 Sapi Bali

Sampel sapi Bali ini diperoleh di Pulau Bali, karena hanya di Bali memungkinkan memperoleh sapi Bali yang masih murni. Hal ini disebabkan adanya ketentuan pemerintah yang sejak lama melarang masuknya sapi-sapi *breed* lain ke pulau Bali. Sapi Bali yang diketahui merupakan keturunan banteng liar, sehingga bentuk tubuhnya menyerupai banteng tetapi ukuran lebih kecil.

Sampel dalam penelitian ini memiliki tanda-tanda karakteristik sebagai berikut : Ukuran badan sedang dengan bentuk badan memanjang, badan padat, bertanduk, kepala agak pendek dengan dahi yang datar. Tanduk sapi Bali jantan berukuran besar, runcing dan tumbuh agak ke bagian luar kepala. Apabila dilihat dari depan berbentuk seperti huruf U yang melebar pada kedua ujungnya. Warna bulu merah bata pada betina, sedangkan pada yang jantan menjadi coklat kehutaman. Ciri khas adanya bulu berwarna putih yang terdapat pada bawah

keempat kakinya (*white stocking*) dan bagian belakang atau pantat dengan batas yang jelas (*mirror*).

Karakteristik sapi Bali ini sesuai dengan pendapat Bandini (1997), yang menyebutkan : sapi Bali mempunyai ukuran badan sedang dengan bentuk badan memanjang, bertanduk, kepala agak pendek. Bulu sapi umumnya pendek, halus dan licin. Kulit berpigmen dan halus. Ciri khas yang membedakan sapi Bali dengan sapi lainnya adalah adanya bulu berwarna putih yang terdapat pada bagian tertentu, seperti pada bagian bawah keempat kakinya dengan batas yang jelas (Bandini 1997; Darmadja, 1980).

6.1.2. Sapi Peranakan Ongole (PO)

Sapi Peranakan Ongole yang diperoleh dalam penelitian ini mempunyai ciri karakteristik sebagai berikut : warna kulit putih dengan leher pendek, punggung besar dan panjang. Mata besar dan tenang, kulit disekitar mata lebih kurang 1 cm berwarna hitam. Tanduk pada yang betina relatif lebih panjang dari pada yang jantan.

Sapi yang berasal dari India ini menurut Setiadi (1982) warna kulit putih, leher pendek dengan punggung yang besar dan panjang. Bola matanya besar dan tenang serta terdapat warna kehitaman disekitar mata. Tanduk pada sapi betina relatif lebih panjang dari pada yang jantan. Tinggi badan sapi ini pada yang jantan antara 140-160 cm, sedangkan pada sapi betina antara 130 - 140 cm. Berat badan berkisar dari 400 kg sampai 600 kg.

6.1.3 Sapi Madura

Sampel sapi Madura diperoleh dari pulau Madura karena sapi ini merupakan sapi lokal Indonesia yang dipertahankan kemurniannya dan dilindungi oleh Staatsblad 1934 No 57 Jo stbl 1937 No. 115. Oleh karena itu hingga saat ini sapi jenis lain dilarang masuk ke pulau Madura, namun sapi Madura diperkenankan disebarkan keluar (Setiawan, 1998).

Karakteristik sapi Madura yang dipergunakan sampel dalam penelitian ini adalah: warna bulu (kulit) coklat atau merah bata, berpunuk kecil, tanduk melengkung setengah bulat dengan ujungnya menuju kedepan. Berat badan pada yang jantan diperkirakan mencapai 300 kg, sedangkan pada sapi betina mencapai 15- sampai 200 kg.

Hasil penelitian ini sesuai dengan yang diperoleh Setiawan (1998) yang menyebutkan, sebagian besar sapi Madura memiliki konformasi yang uniform, ukuran tubuhnya sedang sampai kecil, bertulang bagus tetapi berotot terutama pada sapi jantan yang dipergunakan untuk karapan. Menurut Setiadi (1982), warna tubuh sapi Madura adalah coklat atau coklat merah. Perkembangan ponok lebih baik pada sapi jantan dibandingkan dengan sapi betina. Terdapat lingkaran warna putih sekitar moncong, dengan hidung berwarna hitam, tetapi kadang-kadang berwarna daging.

6.2 Pengamatan Gejala Klinis Penyakit Jembrana.

Pengamatan terhadap gejala klinis bertujuan untuk memperoleh sampel yang dipergunakan untuk menentukan hubungan ekspresi BoLA dengan

kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana. Penelitian ini juga bertujuan untuk memastikan bahwa penyakit Jembrana hanya menyerang sapi Bali sedangkan sapi lainnya bersifat tahan.

Hasil penelitian menunjukkan dari keseluruhan sampel yang diperoleh (sapi Bali, PO dan Madura), hanya sapi Bali yang ditemukan menunjukkan gejala penyakit Jembrana, sedangkan pada sapi Madura dan sapi PO tidak ditemukan. Gejala klinis yang muncul berupa peningkatan temperatur tubuh dan disertai dengan pembesaran limfoglandula superfisialis.

Sapi Bali yang menderita penyakit Jembrana kasus di lapangan tidak cukup untuk memenuhi jumlah sampel yang diinginkan, oleh karena itu diperlukan sapi Bali eksperimen yang diinokulasi langsung dengan virus penyakit Jembrana. Sampel sapi Bali ini diperoleh dari Nusa-penida Klungkung- Bali, karena hanya di tempat ini memungkinkan diperoleh sapi yang bebas penyakit Jembrana, sehingga benar-benar diperoleh sapi eksperimen yang diinginkan.

Sapi Bali yang menderita penyakit Jembrana kasus lapangan dan eksperimen menunjukkan gejala klinis yang sama. Terjadi peningkatan temperatur tubuh berkisar antara 39,5°C sampai 41,2°C, sedangkan gejala-gejala khas seperti keringat berdarah belum terlihat.

Hartaningsih, dkk., (1993) menyebutkan sapi Bali yang menderita penyakit Jembrana, menunjukkan gejala klinis demam mencapai 42°C, dan diikuti dengan diare. Pembengkakan kelenjar limfe superfisialis juga ditemukan pada kasus sapi Bali di lapangan.

Keadaan ini juga bersesuaian dengan pendapat Putra (1999) yang mengatakan hanya *breed* sapi Bali rentan terhadap penyakit Jembrana, sedangkan sapi Madura, Ongole dan Rambon dinyatakan tahan. Penelitian yang dilakukan oleh Soeharsono (1993) pada sapi eksperimen antara lain pada : sapi Bali, PO, sapi Madura, dan FH. Hasil penelitiannya menunjukkan, hanya sapi Bali yang diinokulasi dengan IDV memberikan gejala klinis khas penyakit Jembrana, sedangkan pada sapi Madura menunjukkan gejala klinis pembengkakan limfoglandula preskapularis dan prefemorialis serta terjadi leukopenia sampai hari ke empat, tetapi pada akhirnya sembuh. Sedangkan sapi PO sama sekali tidak menunjukkan perubahan.

6.3 Pengamatan Hematologi dan Serologi Penyakit Jembrana.

Perubahan hematologi sapi yang menderita penyakit Jembrana dilakukan pemeriksaan terhadap WBC (*White Blood Cell*), RBC (*Red Blood Cell*), persentase haemoglobin dan *differential count* (netrofil, limfosit, monosit dan eosinofil).

Perubahan hematologi baik pada sapi eksperimen dan sapi lapangan, terjadi leukopenia, limfopenia dan neutropenia. Pemeriksaan serologi dilakukan dengan pengamatan terhadap titer antibodi, menunjukkan nilai yang positif terhadap penyakit Jembrana. Data pengamatan pemeriksaan hematologi dan serologi dapat dilihat pada Lampiran 9. Hasil yang sama juga diperoleh Soeharsono (1993), dimana terjadi penurunan jumlah sel limfosit, leukosit dan netrofil.

6.4 Perubahan Patologi Anatomi dan Histopatologi Penyakit Jembrana.

Pemeriksaan terhadap perubahan patologi anatomi dan histopatologi Sapi Bali, hanya dapat dilakukan terhadap sapi eksperimen yang diinokulasi virus penyakit Jembrana. Adapun gambaran patologi anatominya, menciri pada pembesaran limpa dan limfoglandula. Sedangkan perubahan histopatologi menunjukkan infiltrasi sel-sel limfosit pada limpa, hati, ginjal, dan paru-paru. Terjadinya proliferasi sel-sel limforetikuler dan folikel.

Hasil penelitian ini bersesuaian dengan penelitian yang dilakukan oleh Dhanua (1993), Dharma dan Putra (1997), pada sapi yang diinokulasi virus Jembrana gambaran patologi anatomi dan histopatologi, menciri pada pembesaran limpa dan limfoglandula serta infiltrasi sel-sel limfosit pada limpa, hati, ginjal. Proliferasi sel-sel limforetikuler dan folikel mengalami pengecilan. Dharma (1993) dalam penelitiannya bahkan mendapatkan pada sapi yang menderita penyakit Jembrana terjadi reaksi folikuler yang jelas, pada organ-organ limfoid dan penimbunan sel-sel plasma (plasmatisosis) pada medullari cords, kelenjar limfe dan limpa (Anon, 1996).

6.5 Hubungan Ekspresi Antigen Limfosit Sapi dengan Kerentanan terhadap Penyakit Jembrana.

Penelitian hubungan ekspresi antigen limfosit dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana, hanya dilakukan terhadap sapi Bali. Mengingat hanya sapi Bali yang dapat menderita penyakit Jembrana sedangkan sapi PO dan sapi Madura tahan terhadap penyakit ini. Pendekatan yang dipergunakan untuk

membuktikan adanya hubungan antara kerentanan dengan ekspresi BoLA, adalah : study kasus-kontrol. Sampel penelitian yang dipergunakan adalah sapi Bali sakit sebagai kasus dan sapi Bali sehat sebagai kontrol. Sapi Bali sakit diperoleh dari kasus lapangan dan eksperimen, sedangkan sapi sehat diperoleh di Desa : Marga-Tabanan, Bali.

Hasil analisis statistik menunjukkan, adanya hubungan antara ekspresi protein antigen limfosit sapi klas I serotipe B5C dengan kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana ($P < 0,05$). Dalam hal ini munculnya BoLA serotipe B5C berhubungan dengan kerentanan atau ketahanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana. Sedangkan ekspresi protein antigen limfosit sapi klas II serotipe BAQ150A dan serotipe H34A tidak berhubungan terhadap perbedaan kerentanan ataupun ketahanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana.

Dalam hipotesis ini antigen BoLA yang berasosiasi dengan penyakit mempunyai sifat imunologik yang sama dengan agen penyebab penyakit. Hipotesis ini meliputi dua alternatif, yakni :

- a. Oleh karena persamaan sifat-sifat imunologik antara agen penyebab penyakit dengan antigen BoLA, maka agen penyebab dianggap sebagai diri sendiri (self) sehingga tidak terjadi respons imun, dan dengan agen tersebut menyebabkan terjadinya penyakit tanpa gangguan dari sistem imun host.
- b. Agen penyebab penyakit dianggap sebagai bahan asing, sehingga timbul respons imun. Oleh karena adanya persamaan sifat imunologik antara agen penyebab penyakit dengan antigen BoLA, maka respons imun juga ditujukan

kepada antigen BoLA, sehingga terjadi respons autoimun dan terjadilah penyakit.

Kerentanan individu sangat tergantung pada : faktor imunogenetik dan faktor lingkungan serta perlakuan yang diberikan terhadap hewan tersebut (Zanotti dkk., 1996). Demikian juga dengan faktor genetik sangat berpengaruh terhadap kerentanan dan ketahanan individu terhadap penyakit (Angyalosi dkk., 2001).

Hasil penelitian menunjukkan BoLA serotipe B5C berhubungan dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana, sedangkan serotipe BAQ150A dan H34A keduanya termasuk BoLA klas II mendapatkan hasil yang sebaliknya. Hal ini dapat dikatakan pemunculan BoLA klas I, dapat memicu penyakit akibat infeksi virus penyakit Jembrana. Pendapat ini didukung oleh Fleischer dan Schrezenmeier (1998), yang mempelajari ekspresi MHC akibat infeksi oleh virus Mo-MLV (Murine Leukemia Virus), dalam hasil penelitiannya diperoleh terjadi peningkatan ekspresi MHC klas I pada hewan coba yang diinfeksi virus Murine Leukemia.

Kedua ini berdasarkan pada kenyataan bahwa antigen BoLA tertentu, dapat bekerja sebagai reseptor untuk agen penyebab penyakit, seperti virus, toksin dan bahan asing lainnya. Kenyataan yang mendukung hal tersebut antara lain bersumber dari hasil pengamatan, yang menyatakan bahwa molekul pada permukaan sel dapat bekerja sebagai reseptor terhadap virus.

Penelitian untuk mengetahui asosiasi BoLA dengan kerentanan atau ketahanan terhadap suatu penyakit telah banyak dilakukan dan memperoleh hasil

yang signifikan. Schmutz dkk. (1992) membuktikan BoLA-DRB pada sapi Holstein berasosiasi dengan ketahanan terhadap *Staphylococcus aureus* penyebab mastitis. Asosiasi antara BoLA dengan Limfositosis Persistensi yang disebabkan oleh Bovine Leukosis Virus (BLV) juga telah dilaporkan dengan memberikan hasil yang signifikan.

Sharif dkk (1998) membuktikan BoLA-DRB32*3 berasosiasi dengan rendahnya resiko terhadap kejadian Retensi plasenta. Sedangkan sapi-sapi Holstein yang memiliki BoLA DRB32*6 dan BoLA DRB 32*22 beresiko terhadap penyakit Cistik ovan. Asosiasi yang signifikan antara pemunculan BoLA DQB-3A, DRB2*2A, DRB32* dengan ketahanan terhadap Persistensi limfositosis (Zanotti dkk., 1996).

Sejak ini penelitian untuk mengetahui asosiasi atau hubungan antara BoLA dengan kerentanan penyakit tertentu berguna sebagai petanda genetik. Selanjutnya apakah keberadaan BoLA serotipe B5C salah satu faktor yang menyebabkan sapi Bali rentan terhadap penyakit Jembrana, demikian juga sebaliknya ketidak hadirannya/tidak munculnya serotipe BAQ150 A dan serotipe F134A menyebabkan sapi Bali tahan terhadap penyakit Jembrana perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Faktor-faktor yang perlu dipelajari dalam asosiasi sistem BoLA dengan suatu penyakit adalah : Jumlah kuantitatif variasi molekul BoLA, variasi ekspresi molekul dan variasi pola sistem BoLA pada berbagai populasi yang berbeda.

6.6 Ekspresi Antigen Limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura pada tiga Serotipe Monoklonal Antibodi BoLA

Penelitian untuk menentukan pengaruh *Breed* sapi dan serotipe monoklonal antibodi terhadap ekspresi antigen limfosit sapi, dilakukan di laboratorium melalui metode imunositokimia, dengan mereaksikan tiap-tiap limfosit dari tiga *breed* sapi (Bali, PO dan Madura) terhadap tiga serotipe monoklonal antibodi Bovine limfosit antigen (B5C, H34A, BAQ150A).

Sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah : sapi Bali, PO dan sapi Madura, tanpa memperhatikan jenis kelamin, umur, status fisiologi, letak geografi, musim, makanan dan cara pemeliharaan sapi Terhadap ke tiga *breed* sapi tersebut dilakukan isolasi limfosit, untuk melihat ekspresi BoLA. Tiga serotipe BoLA yang dipergunakan adalah BoLA klas I serotipe B5C, BoLA klas II serotipe BAQ150A dan H34A, yang diperoleh dari VMRD, Pullman, USA.

Dalam penelitian ini hanya mempergunakan tiga serotipe monoklonal antibodi, sedangkan dipasaran banyak serotipe MoAb yang telah diproduksi. Serotipe MoAb tersebut antara lain MHC klas I: B5C, CF298A, H17A, H58A s dan MHC klas II: BAQ150A, CAT82A, H34A, TH14B, TH21A. Hal ini disebabkan beberapa peneliti cenderung menggunakan serotipe BAQ150A, H34A dan B5C, disamping itu ketiga serotipe MoAb berasal dari isolasi protein antigen limfosit sapi. Hasil analisis varian menunjukkan, tidak terdapat interaksi yang signifikan ($P > 0,05$) antara *breed* sapi dan serotipe monoklonal antibodi BoLA terhadap ekspresi antigen limfosit sapi

Beberapa penelitian yang mendukung perbedaan antara sapi Madura dan PO adalah : seperti yang disebutkan oleh Gunawan (1993), bahwa sapi Madura lebih menonjol dipengaruhi karakteristik oleh sapi Bali dari pada sapi PO. Dalam suatu penelitian yang menggunakan sapi Ongole dan sapi Madura umur satu tahun, ternyata setelah periode pemberian makanan 280 hari, kualitas daging sapi Madura lebih baik dari pada sapi Ongole. Demikian juga dalam hal penambahan berat badan antara sapi Madura dan sapi Ongole, yakni penambahan berat badan sapi Madura lebih rendah dari sapi Peranakan Ongole.

Perbedaan antara sapi Madura dan sapi PO juga ditemukan oleh Soeharsono (1993), pada penelitiannya yang mempergunakan virus penyakit Jembrana. Hasil penelitiannya menunjukkan, pada sapi Madura yang diinfeksi virus penyakit Jembrana muncul reaksi gejala penyakit, walaupun gejala tersebut tidak patognomis untuk penyakit Jembrana, tetapi pada sapi PO sama sekali tidak muncul perubahan. Ini membuktikan adanya perbedaan imunogenetik diantara ke dua *breed* sapi tersebut.

Perbedaan imunogenetik diantara *breed* sapi juga disebutkan oleh Gilliespi (1999), yang melakukan penelitian terhadap *breed* sapi Jersey dan sapi Holstein tentang frekuensi pemunculan BoLA. Hasil penelitiannya menunjukkan, sapi Holstein mengekspresikan BoLA-DRB3.2*2 dan 16* pada pemeriksaan dengan PCR, tetapi tidak pada sapi Jersey. Hal yang sama juga diteliti oleh Diez dkk., (1997) dan Lewin (1994), terhadap BoLA-DRB3.2*11 pada sapi Jersey dan sapi Holstein. Dari hasil penelitiannya disimpulkan bahwa lokus BoLA-DRB3*2 pada sapi Jersey mempunyai polimorfisme yang sangat

tinggi, dan diantara *breed* sapi terdapat perbedaan frekuensi pemunculan alela BoLA klas II.

Tidak terdapat perbedaan yang nyata antara ekspresi protein antigen limfosit sapi Bali dengan ekspresi protein antigen limfosit sapi Madura. Hal ini disebabkan karena sapi Madura berasal dari persilangan antara sapi Bali (*Bos sondaicus*) dengan sapi Zebu (*Bos indicus*), yang telah mengalami domestikasi (Huitema, 1986., Pane, 1990). Kombinasi darah tersebut menyebabkan terdapat hubungan genetik antara kedua *breed* sapi tersebut sehingga menjadikan sapi Madura mempunyai kemiripan dengan sapi Bali

Terdapat persamaan karakteristik antara sapi Bali dengan sapi Madura, misalnya pada kaki sering ditandai warna seperti kaos kaki yang berwarna lebih muda, tetapi tidak putih mulus seperti pada sapi Bali. Warna kulit merah bata tapi pada sapi Bali jantan dewasa berubah menjadi hitam, demikian juga dengan kulit diantara tanduk pada sapi jantan seperti sapi Bali dewasa. Ini membuktikan bahwa sapi Madura lebih menonjol dipengaruhi karakteristik oleh sapi Bali dari pada sapi PO, tetapi sapi Madura mempunyai sifat fenotif yang spesifik dan tidak dimiliki oleh sapi Bali atau jenis sapi lainnya (Gunawan, 1993).

Pernyataan ini didukung oleh penelitian Soeharsono, dkk. (1990) yang menginfeksi JDV terhadap kedua *breed* sapi tersebut. Gejala klinis, perubahan patologi anatomi dan histopatologi yang patognomis dari penyakit Membrana muncul pada sapi Bali, sedangkan untuk sapi Madura tidak muncul. Perbedaan ini juga ditunjukkan pada rataan ekspresi antigen limfosit sapi Madura yang

memberikan hasil sedikit lebih besar (27,09) dibandingkan sapi Bali (24,36). Dalam hal ini dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan imunogenetik antara *breed* sapi Bali dengan sapi Madura.

Dilihat dari hasil rataannya maka, BoLA serotipe BAQ150A memberikan ekspresi paling tinggi (26,20), selanjutnya serotipe B5C (25,09) dan serotipe H34A (20,11). Dalam hal ini secara statistik ke tiga serotipe yang dipergunakan tidak memberikan perbedaan yang signifikan ($P>0.05$) terhadap ekspresi antigen limfosit sapi. Hal ini disebabkan karena ketiga monoklonal antibodi (MoAb) yang dipergunakan mempunyai spesitas dan cara produksi yang sama serta diperoleh dari tempat yang sama, yaitu VMRD Pullman USA. Demikian juga dengan limfosit yang dipergunakan dalam penelitian ini berasal dari limfosit sapi- sapi yang tidak menunjukkan gejala sakit, dalam hal ini ekspresi MHC tidak tergantung dari adanya antigen/immunogen yang masuk ke dalam tubuh sapi.

Banyak faktor yang mempengaruhi ekspresi MHC sehingga menimbulkan fenomena yang beranekaragam. Ada pendapat yang mengatakan pemunculan klas dan serotipe MHC dipengaruhi oleh perbedaan grup virus (DNA/RNA), dan munculnya MHC klas I ataupun MHC klas II pada keadaan fisiologi belum dimengerti sepenuhnya, kemungkinan berhubungan dengan kemampuan molekul MHC untuk memicu timbulnya respons imun (Margaret dkk, 1997).

Ekspresi MHC klas I dan klas II terjadi karena rangsangan imun dan atau peradangan pada berbagai sel yang spesifik (Klein, 1990, Abbas, dkk 1991). Ada empat gambaran penting pada ekspresi molekul MHC, yakni :

1. Terdapat perbedaan ekspresi secara mendasar antara molekul MHC klas I dan klas II, ekspresi MHC klas I pada semua sel berinti sedangkan molekul MHC klas II hanya pada sel makrofag, sel B, sel dendrit, sel endotel dan sel T yang teraktivasi.
2. Kecepatan transkripsi adalah determinan utama untuk ekspresi molekul MHC pada permukaan sel.
3. Transkripsi dan ekspresi dari berbagai gen MHC klas I dan molekul antigen MHC klas I regulasinya terkoordinasi, demikian pula untuk gen dan molekul antigen MHC klas II.
4. Sitokin dapat mengatur kecepatan transkripsi dari gen MHC klas I dan klas II pada berbagai tipe sel, misalnya gama-interferon dapat meningkatkan ekspresi molekul MHC.

Telah diketahui pemunculan MHC diawali oleh penangkapan imunogen atau antigen oleh sel limfosit, kemudian bersama-sama dengan MHC mempresentasikan ke permukaan sel sebagai antigen Presenting Cell (APC) dan memberikan respons yang berbeda-beda tergantung individunya.

Banyak faktor yang mempengaruhi ekspresi MHC pada permukaan sel, antara lain: adanya pengaruh pada faktor transkripsi gen MHC, terdapat kemampuan protein virus untuk membelok transport antigen MHC ke permukaan sel limfosit, sehingga ekspresi MHC tidak muncul dan signal pada

viral mungkin berpengaruh terhadap transkripsi gen MHC (Maudsley dan Pound, 1991).

6.7 Berat Molekul Protein Antigen Limfosit Sapi Bali, PO dan Sapi Madura

Menentukan perbedaan berat molekul protein antigen limfosit antara sapi Bali, PO dan sapi Madura, dilakukan dengan karakterisasi berat molekul protein, melalui pemeriksaan elektroforesis (SDS-PAGE). Prinsip kerja SDS-PAGE dimaksudkan untuk menguraikan komponen-komponen antigen atas dasar berat molekul. Pemisahan molekul protein di dalam gel *polyacrylamide*, adalah berdasarkan mobilitas elektronik dari suatu substansi protein, sehingga terjadi pemisahan protein menjadi fraksi-fraksi yang berbeda. Atas dasar densitas massa dan lebar gel dibuat dengan cara polimerisasi secara kimiawi, dari bahan kimia *acrylamide* dan *bis acrylamide* (*N,N'* methylene-bis-acrylamide). Proses polimerisasi tersebut diawali oleh ammonium persulfat (initiator) dan juga oleh TEMED (*N,N,N,N* tetramethylethylenediamine), yaitu suatu *tertiary amine* yang berfungsi sebagai katalis.

Pada tahap pertama terjadi pelepasan sulfat radikal bebas yang berasal dari ammonium persulfat (APS), selanjutnya sulfat bebas (sulfat radikal) tersebut bereaksi dengan *acrylamide* menjadi *acrylamide sulfat free* radikal yang selanjutnya akan bereaksi dengan molekul *acrylamide* lainnya. Dengan cara ini terbentuklah polimer *acrylamide* membentuk suatu jaringan molekul yang stabil secara mekanis.

Polimerisasi hanya bisa berlangsung pada keadaan kadar oksigen yang sangat rendah. Untuk pemisahan molekul protein menjadi subunit polipeptida pada teknik ini, dipergunakan *dissociating agent* yaitu *Sodium dodecyl Sulphate* (SDS). SDS adalah suatu detergen ionik yang mengandung gugusan 12 Methylene dan berikatan dengan ion sulfat. Penambahan reagen *Beta-mercaptoethanol* bertujuan untuk memecahkan ikatan disulfida dan akan membentuk tiga dimensi dari molekul protein menjadi bentukan silindris.

Pada rasio berat yang konstan (*Constant weight ratio*) yaitu 1,4 gr SDS per gram polipeptida, seluruh polipeptida berikatan dengan molekul SDS. Dengan demikian jumlah muatan negatif pada kompleks polipeptida-SDS setara dengan jumlah molekul SDS. Ini berarti setara pula dengan jumlah asam amino di dalam molekul protein serta berat molekul polipeptida.

Penggunaan buffer yang dipilih pada teknik elektroforesis ini adalah diskontinyu buffer sistem, dimana proses polimerisasi tahap pertama dilakukan untuk *resolving gel* dan berikutnya untuk *stacking gel*. Teknik polimerisasi dilakukan dengan cara menuangkan larutan campuran polimerisasi ke dalam ruangan yang berada diantara dua lempeng kaca. *Poliacrylamide* yang sedang polimerisasi dituangkan di antara kedua lempeng kaca sebagai *resolving gel*. *Stacking gel* (dituangkan diatas *resolving gel*) mempunyai pori-pori yang lebih besar dibandingkan dengan pori-pori *resolving gel*. Oleh sebab itu protein akan terkonsentrasi di *stacking gel* terlebih dahulu, sebelum proses pemisahannya berlangsung melalui elektroforesis (Bernette, 1981).

Empat puluh lima sampel yang diperiksa, yakni berasal dari 15 ekor sapi Bali, 15 ekor sapi PO dan 15 ekor sapi Madura. Hanya 10 sampel yang dapat dikarakterisasi dan dapat ditentukan berat molekul proteinnya, sebagai protein antigen limfosit sapi (BoLA), mengingat banyaknya protein lain yang terdapat pada sel limfosit.

Hasil pengamatan menunjukkan berat molekul yang bervariasi, walaupun band yang muncul dapat diidentifikasi sebagai BM protein antigen limfosit sapi (BoLA) kelas I dan kelas II. Keadaan ini disebabkan protein antigen limfosit yang diperiksa berasal dari sapi-sapi yang tidak menunjukkan gejala sakit atau dalam kondisi fisiologis, sehingga ke dua kelas BoLA tersebut tidak dapat diekspresikan dengan sempurna.

Limfosit T mengekspresikan molekul untuk mengikat antigen (Antigen Binding Molecule) pada membrannya disebut : reseptor sel T (T-Cell Receptor). Reseptor sel T ini hanya dapat mengenali antigen yang terikat pada protein membran sel, yang disebut Major Histocompatibility Complex (MHC). Limfosit Th (CD4) mengenali antigen yang dipresentasikan pada permukaan makrofag dalam bentuk peptida-antigenik, yang membentuk kompleks dengan molekul MHC kelas I. Protein antigen diluar sel biasanya dimakan dan diproses menjadi fragmen antigenik (epitop) dengan mengaktifkan makrofag atau APC dari host. APC menjadi karakteristik dengan pemunculan MHC kelas II sampai terjadinya sitokin. Aktivitas sitokin menghambat replikasi virus pada sel yang terinfeksi. Meningkatnya aktivitas makrofag akan menyebabkan peningkatan ekspresi MHC kelas I dan kelas II (Goldsby dkk., 2000).

Berat molekul antigen limfosit sapi bali klas I rantai alfa (α) berkisar antara 43.836 dalton sampai 47.139 dalton dan rantai beta (β) 11.250 dalton sampai 14.500 dalton. Sedangkan antigen limfosit sapi Bali klas II rantai alfa (α), berkisar antara 22.250 dalton sampai 30.999 dalton dan rantai beta (β) 21.277 dalton sampai 25.250 dalton

Berat molekul antigen limfosit sapi PO klas I rantai alfa (α) berkisar antara 38.636 dalton sampai 43.836 dalton dan rantai beta (β) 11.500 dalton sampai 14.500 dalton. Sedangkan antigen limfosit sapi klas II rantai alfa (α), berkisar antara 20.000 dalton sampai 36.748 dalton dan rantai beta (β) 23.000 dalton sampai 23.750 dalton.

Berat molekul antigen limfosit sapi Madura klas I rantai alfa (α) berkisar antara 45.252 dalton sampai 48.084 dalton dan rantai beta (β) 11.250 dalton sampai 11.500 dalton. Sedangkan antigen limfosit sapi klas II rantai alfa (α), berkisar antara 21.785 dalton sampai 30.999 dalton dan rantai beta (β) 18.500 dalton sampai 21.866 dalton.

Berat molekul protein antigen limfosit pada masing-masing sapi berbeda. hal ini disebabkan karena terdapat perbedaan imunogenetik diantara ke tiga *breed* sapi yang dipergunakan dalam penelitian ini. Keadaan ini juga didukung oleh penampilan fisik dari ketiga *breed* sapi tersebut, yang mempunyai karakterisasi dan penampilan berbeda-beda antara sapi Bali, Po dan sapi Madura.

Gunawan (1993) telah melakukan penelitian terhadap pertambahan berat badan, kualitas daging, dan ketiga breed sapi tersebut memberikan hasil yang berbeda-beda. Apabila dibandingkan ketahanan sapi Bali terhadap infeksi virus penyakit Jembrana dengan ketahanan sapi PO dan Madura, maka sapi PO relatif lebih tahan (Soeharsono, 1993; Soeharsono, dkk, 1995).

Penelitian Ababou dkk. (1994) yang meneliti BoLA dengan metode Immunopresipitasi, memperoleh hasil sebagai berikut : kebanyakan presipitasi terjadi pada 33 kD yang bersesuaian dengan rantai alfa, dan 29 kD yang bersesuaian dengan rantai beta. BM protein antigen limfosit sapi klas II yang diisolasi dari leukosit darah, memperoleh hasil : rantai alfa berkisar antara 32 kD sampai 34 kD dan rantai beta berkisar antara 26 kD sampai 29 kD (Bernadette dkk, 1993).

Koufman dkk (1994) menyatakan MHC klas II rantai alfa berkisar antara 33 kD-35 kD dan rantai beta 26 kD-29 kD. Variasi berat molekul rantai alfa dan rantai beta berkisar antara 41 kD dan 25 kD, bahkan Jonathan dkk. (1993) mengatakan BM protein MHC klas II rantai beta mencapai 45 kD.

Perbedaan-perbedaan berat molekul tersebut dapat juga disebabkan adanya perbedaan genetik diantara sapi-sapi tersebut, sehingga setiap populasi mempunyai latar belakang dan pola MHC yang unik dan saling berbeda satu sama lain. Demikian juga akan berpengaruh terhadap kerentanan dan faktor resiko masing-masing hewan berbeda terhadap suatu penyakit.

6.8 Penentuan Protein Antigen Limfosit Sapi Bali, PO dan sapi Madura

Penentuan protein antigen limfosit sapi dilakukan terhadap tiga *breed* sapi dengan pengujian menggunakan tiga MoAb, melalui pemeriksaan Western-immunoblotting. Prinsip kerja dari metode tersebut adalah sebagai berikut: teknik ini dilakukan setelah molekul protein terurai di dalam *resolving gel*, dengan cara pemindahan ke permukaan kertas nitroselulosa dengan menggunakan prinsip migrasi elektroforetik. Protein yang berkumpul sebagai pita-pita pada kertas nitroselulosa yang telah migrasi digunakan untuk menentukan spesifisitas antibodi setelah direaksikan. Adanya kompleks antigen-antibodi pada membran nitroselulosa tersebut dapat divisualisasikan dengan menambahkan antibodi kedua yang telah dilabel. Melalui teknik Western Blot sekaligus dapat mengetahui berat molekul protein yang bereaksi dengan antibodi spesifik (Bernette, 1981).

Hasil penelitian menunjukkan protein antigen limfosit bereaksi positif berikatan dengan Monoklonal antibodi (MoAb) BoLA klas I serotipe B5C dan klas II serotipe BAQ150A, H34A yang ditandai munculnya band pada kertas nitroselulosa dengan pemeriksaan Western-Imunoblotting. Peruntukan reaksi antigen antibodi dengan berat molekul antigen limfosit sapi Bali: 47 kD, 11 kD bersesuaian dengan BoLA klas I rantai α & β , 25 kD bersesuaian dengan BoLA klas II rantai β .

Adanya perbedaan berat molekul protein antara hasil elektroforesis dengan pengujian menggunakan MoAb (Western-immunoblotting), disebabkan

molekul MHC baik klas I maupun klas II pada pemeriksaan SDS-PAGE mempunyai struktur yang tidak stabil pada kondisi fisiologis, tanpa berikatan dengan peptida. Hal ini telah dibuktikan oleh Nasser dan Germain (1992), dengan melakukan pemeriksaan SDS-PAGE terhadap protein BoLA pada sapi sehat dan sapi sakit.

Berat molekul protein antigen limfosit sapi ini bersesuaian dengan yang diperoleh pada penelitian Ababou dkk. (1994). Sedangkan menurut Abbas (1991) berat molekul protein MHC klas I rantai α pada human mencapai 44 kD dan pada mice 47 kD, dengan BM rantai β 12 kD, jadi BM protein yang diperoleh pada penelitian ini bersesuaian dengan penelitian terdahulu.

Perunutan antigen antibodi pada kertas nitroselulosa bereaksi positif pada keadaan *mixed*, artinya baik antigen hasil elektroforesis maupun antibodi ketiga monoklonal dicampur menjadi satu. Pada keadaan terpisah reaksi tidak berjalan dengan sempurna, sehingga memberikan hasil negatif. Hal ini mungkin disebabkan untuk mengikat antigen limfosit yang diisolasi dari gel (band) hasil elektroforesis, memerlukan jumlah antigen yang banyak, demikian juga monoklonal antibodi yang dipergunakan tidak cukup untuk menimbulkan reaksi ikatan antigen-antibodi spesifik.

Apabila dibandingkan dengan ekspresi BoLA pada pemeriksaan dengan menggunakan metode Imunositokimia, yang memberikan hasil positif, maka hasil tersebut dikatakan sangat lemah. Penelitian yang dilakukan oleh Bernadette dkk., (1993) menyatakan, walaupun pada setiap pemeriksaan

imunohistokimia pada organ (timus, Igl. preskapularis) memberi hasil positif lemah, tetapi pada SDS-PAGE tidak semua monoklonal antibodi dapat mengekspresikan BoLA klas II. Selanjutnya dikatakan perbedaan ekspresi antara metode imunositokimia dengan elektroforesis disebabkan masing-masing monoklonal mempunyai *recognice epitope* yang berbeda-beda.

Hasil yang hampir sama juga diperoleh pada penelitian Ababau dkk., (1994), yakni : enam serotipe monoklonal antibodi (TH14B, TH12A, H34A, H42A, TH22A, TH81A) yang dipergunakan untuk melihat ekspresi BoLA klas II pada sel BL-3. Tiga serotipe memberikan reaksi negatif (tidak muncul band), yaitu pada penggunaan MoAb TH12A, H34A dan H42A. Sedangkan MoAb H42A dan TH22A memberikan hasil yang bervariasi (+/-), keadaan ini dikatakan telah terjadi parsial *cross reaction* antara molekul tersebut.

Kematangan dari rantai α heterodimer juga menentukan ekspresi BoLA. Kejadian parsial *cross reactivity* menunjukkan, tidak semua monoklonal antibodi dengan antigen protein BoLA bereaksi dengan sempurna menjadi satu kesatuan, tergantung tahapan maturasinya (Stone dan Mugge, 1993). Ketidakmunculan ekspresi BoLA dapat pula disebabkan oleh karena ekspresi ke tiga serotipe BoLA tersebut berhubungan dengan perbedaan karakterisasi antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura. Penemuan ini membuktikan adanya 741 perbedaan kedudukan filogenik pada spesies yang berbeda, dibandingkan engan peranan masing-masing serotipe dari molekul *MHC restriction* (Ababau dkk., 1994).

Bernadette dkk., (1993) memfokuskan diri mempelajari perbedaan ekspresi dari Bovine limfosit kelas II, dari empat monoklonal antibodi dengan menggunakan SDS-PAGE 12% dan metode imunohistokimia. Empat MoAb yang dipergunakan adalah: UC-A4, UC-D3, UC-H9 dan IL-A21 pada tiga ekor sapi sehat dan tiga ekor sapi sakit yang menderita PL (Persisten lymphositis). UC-H9 dan UC-D3 selalu bereaksi negatif terhadap antigen yang diperiksa, sedangkan UC-A4 dan IL-A21 memberikan hasil yang bervariasi, artinya kadang muncul band dan kadang tidak. Pada pemeriksaan dengan menggunakan metode imunositokimia ke empat MoAb memberikan reaksi positif, dengan rata-rata sebagai berikut : UC-A4 ($19,4 \pm 3$), UC-D3 ($21,5 \pm 3$), UC-H9 ($28,9 \pm 3$) dan IL-A21 (27 ± 3).

Perbedaan hasil yang ditunjukkan pada kedua metode tersebut, disebabkan karena perbedaan sel (organ) yang dipergunakan pada sistem imun dan variasi protein MHC kelas II. Pada manusia (Human) juga ditemukan hal yang sama, yakni terdapat perbedaan ekspresi HLA pada monosit, dan sebagian besar monosit dewasa mengekspresikan molekul HLA-DR dan HLA-DP.

Ketidak munculannya ekspresi BoLA dengan pemeriksaan metode Western-immunoblotting, pada pengujian antigen dan antibodi secara terpisah, disebabkan karena, Pertama: ketidak tepatan mengisolasi band hasil elektroforesis, dan konsentrasi monoklonal antibodi yang dipergunakan tidak mencukupi untuk menimbulkan reaksi ikatan antigen-antibodi spesifik. Kedua tidak adanya imunogen yang masuk ke dalam tubuh sapi, sehingga sangat sedikit

atau tidak ada pemicu untuk menimbulkan respons imun, keadaan ini menyebabkan molekul BoLA klas I maupun klas II tidak diekspresikan secara maksimum.

6.9 Temuan Baru

Adapun temuan baru yang berhasil dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Menemukan hubungan ekspresi antigen limfosit sapi Bali dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana.
2. Menemukan ekspresi antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura pada tiga *breed* sapi di Indonesia
3. Menemukan berat molekul protein antigen limfosit sapi pada beberapa populasi sapi di Indonesia.
4. Menemukan dan mengisolasi protein antigen limfosit (BoLA) klas I dan klas II sapi Bali, PO dan sapi Madura sebagai dasar imunodiagnostik.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari keseluruhan hasil penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Antigen limfosit sapi Bali klas I serotipe B5C berlaku sebagai reseptor untuk virus penyakit Jembrana.
2. Sapi Bali, Peranakan Ongole dan sapi Madura masing-masing mempunyai spesifisitas ekspresi antigen limfosit.
3. Berat molekul protein antigen limfosit sapi Bali klas I : 47 kD (rantai α) dan 11 kD (rantai β) dan klas II: 25 kD (rantai α), sapi peranakan Ongole klas I : 45 kD (rantai α) dan 12 (rantai β) klas II: 36 kD (rantai α) dan sapi Madura klas I. 48 kD (rantai α) dan 11 kD (rantai β) klas II: 26 kD (rantai α).
4. Protein antigen limfosit sapi Bali, PO dan sapi Madura klas I dan klas II dapat dipergunakan sebagai dasar imunodiagnostik.

7.2 Saran

Saran-saran yang dapat diberikan sehubungan dengan telah selesainya penelitian penentuan protein antigen limfosit sapi dan hubungan ekspresinya dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana, adalah sebagai berikut :

1. Penelitian lebih lanjut dilakukan terhadap protein antigen limfosit sapi yang berhasil diisolasi, antara lain untuk produksi monoklonal antibodi, ataupun isolasi gen dari protein yang tahan terhadap penyakit Jembrana.
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan hubungan ekspresi MHC dengan kerentanan penyakit pada hewan yang lainnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Ababou A, Goyencche J, Davis WC, Levy D, 1994 Evidence for the expression of three different BoLA-class II molecules on the bovine BL-3 cell line: determination of a non-DR non DQ gene product. *J. Leuk. Biol.* 56: 182-186.
- Abbas AK, Litchman AH, Pober JS, 1991 *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders Company. Pp. 19-347.
- Adiwinata T, 1967. Some Informative Notes on a Rinderpest-like Disease on The Island of Bali. OIEFAO Confence on Epizootics in Asia and The Far-East, Tokyo 2-9 October 1967.
- Andersson L, Rask L, 1988. Characterization of the MHC class II region in cattle. The number of DQ genes varies between haplotypes. *Immunogenetics* 27. pp. 353-360.
- Angyalosi G, Neveb R, Wolowczuk J, Delanoye A, Herno J, Auriault C, 2001 HLA class II polymorphism influences onset and severity of pathology in *Schistosoma mansoni*-infected transgenic mice. *Infect Immun.* 69(9):5874.
- Antonimus, 1996 Situasi Terakhir Penyakit Jembrana pada Sapi Bali di Propinsi Bali. Seminar "Situasi utakhir dan Pengembangan Vaksin Penyakit Jembrana pada Sapi Bali" Fak. Kedokteran Hewan Universitas Udayana.
- Amils M, Ramiya V, Norimine J, Lewin HA, 1998. The Major Histicompatibility Complex of Ruminants. *Rev. Sci Tech.* 17(1):108-20.
- Bandini Y, 1990. Sapi Bali. Penerbit PT Penebar Swadaya. Hal 1-50
- Baumgart M, Moos V, Schunbauer D, Muller B, 1998. Differential Expression of major Histocompatibility Complex Class II genes on Murine Macrophages Associated with T cell Cytokin Profile and Protective/Suppressive effects. *J. Viral Immunol.* 9:95(12):6936-40.
- Bellanti JA, 1993. *Imunologi III*. Cetakan pertama Universitas Gajah Mada Press. Hal. 58-304
- Bernadette C, Taylor K, Yeon C, Robert JS, Peter FM, Jeffrey LS, 1993. Differential Expression of Bovine MHC Class II Antigen Identified by Monoclonal Antibodies. *J. Leuc.Biol.*(53) 479-489

- Budiarso IT dan Hardjosworo S, 1976. *Jembrana Disease of Bali Cattle*. *J. Aus. Vet.* 52:97.
- Burnette, WN, 1981. *Western Blotting : Electrophoretic transfer of proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detections with antibody and radioionated protein a analytical biochem.* 112. 195-203.
- Burkala EJ, Narayani T, Hartaningsih N, Kertayadnya G, Berryman DI, Wilcox GE, 1998. *Recombinant Jembrana Disease Virus Protein as Antigen for The Detection of Antibody to Bovine Lentivirus*. *J. Virol Methods.* 74(1) : 39-46.
- Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kiessner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchinder S, Hoots K, O'Brien SJ, 1999. *HLA and HIV-1 : Heterozygote Advantage and B*35-cw804 Disadvantage*. *Science* 12:283(5408):1748-52
- Chadwick BJ, Coelen RJ, Sammmels LM, Kertayadnya G, Wilcox GE, 1995. *Genomic sequence analysis identifies Jembrana disease virus as a new bovine lentivirus*. *J. Gen. Virol* 76 , 189-192.
- Constantinides P, 1994. *General Pathology*. Appleton & Lange. Printed in The United States in The United States of America. Pp. 83-290.
- Daniel P, Stites, Aa I, Terr, Tristram G, Parslow. 1997. *Medical Immunology 9 th*. Appleton & largw. A Simon & Schuster. Company. Printed in the United States of America. Pp 85-181.
- Davenport MP, dan Hill AVS, 1996. *Peptides associated with MHC class I & II molecules in browning and Michael AJ (eds) HLA and MHC genes molecules and function*. Bios. Sc Publ. Ltd Oxford : 277- 308.
- Darmadja D, 1990. *Setengah Abad Peternakan Sapi Tradisional dalam Ekosistem Pertanian di Bali*. Disertasi Universitas Padjadjaran Bandung.
- Devitt H, 1997. *The role of MHC class II molecules in susceptibility and resistance to like a Diabetes Mellitus in svejgaard a Buus S. Fugger L (eds). HLA and Disease the molecule*. Basis Alfred Benzon Symposium 40 Munksgaard Copenhagen 337-344.
- Dharma DN, 1993. *Pathology of Jembrana disease*. PhD Thesis, James Cook University of North Queensland. Australia.

- Dharma DN, Darmadi P, Sudana IG, Santya K, 1985. Studi Perbandingan Penyakit Jembrana dan malignant catarrhal Fever pada Sapi Bali. Annual report on Animal Disease Investigation in Indonesia During The Period of 1983-1984 Pp. 77-81
- Dharma DN, Putra AAG, 1997. Penyidikan penyakit Hewan. Cv Bali Medi Adhikarsa. Denpasar Pp. 123-125,
- Dharma DN, Ladds PW, Wilcox GE, Campbell RS, 1994. Immunopathology of Experimental Jembrana Disease in Bali Cattle. J. Vet. Immunol. Immunopathol. 44(1):31-44.
- Dietz AB, Cohen ND, Timms L, Kehrli ME, 1997. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cow. J. Dairy Sci. 40:406-412.
- Dietz AB, Detilleux JC, Freman AE, Kelley DH, Stabel JR, Kehrli ME, 1997. Genetic Association of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 Alleles with Immunological Traits of Holstein Cattle. J. Dairy Sci. 80(2):400-5.
- Ekaputra IGMA, Sudana IG, Mandala KA, 1979. Laporan Surve kasus Penyakit Hewan di Kabupaten Banyuwangi. Laporan Penyidikan BPPH Wil VI Denpasar
- Fleischer B, Schrezenmeier HT, 1998. T cell stimulation by Staphylococcal enterotoxins. Clonally variable respons and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells J Exp. Med. 167: 1697-1707.
- Frauwirth K, Shastri N, 2001. Mutation of the invariant chain transmembrane region inhibits II degradation, prolongs association with MHC class II, and selectively disrupts antigen presentation Cell Immunol. 1:209(2):97.
- Fugger L, 1994. PCR and RFLP studies of inherited susceptibility to autoimmune disorders with special reference to multiple sclerosis. Dan. Med Bull 11 38-49
- Gilliespie BE, Jayarao BM, Dowlen HH, Oliver SP, 1998. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Jersey cows J Dairy Sci. 26, 82:2049-2053
- Glass EJ, Oliver RA, Russell GC, 2000. Duplicated DQ haplotypes increase the complexity of restriction element usage in cattle J. Immunol. 1:165(1).134-8

- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, 2000. Overview of The Immune System in Kuby Immunology 4th ed New York. W.H. Freeman and Company Pp.3-26.
- Goodman JW, 1991. The Immune Response in Basic and Clinical Immunology 7th edition. Pp. 301-325.
- Gordon E. 1990. Immunogenetics Antibody Diversity and Clonal Selection in Human Genetic. Jones and Bartlett Pub. Boston 2nd edition Pp. 301-325
- Gray GD, Woollaston RR, Eaton BT, 1995. Breeding for Resistance to Infectious Disease in Small Ruminants. ACIAR. Agricultural Research Canberra Australia. Pp 1-15
- Gunawan, 1993. Sapi Madura sebagai ternak kerja, potong, karapan dan sonok. Penerbit Kanisius. Jakarta, Hal 29-37.
- Hartaningsih N, Wilcox GE, Dharma DM, Soetrisno M, 1993. Distribution of Jembrana Disease in Cattle in Indonesia. J. Vet. Microbiol 38(1-2)9-23.
- Hartaningsih N, Soeharsono S, Santhia K, Dharma DN, Sudana IG, Tjupwana IW, 1985. Jembrana Disease in Bali Cattle. In Veterinary Viral Disease , Their Significance in South East Asia and Western Pasific. Academic Press Sydney. Pp. 529-531.
- Hartaningsih N, Wilcox GE, Kertayadnya G, Astawa M. 1994. Antibody Response To Jembrana Disease Virus In Bali Cattle. Vet. Microbiol 39, 15-23.
- Hartaningsih N, 1999. Penentuan Protein Virus Penyakit Jembrana (JDV) yang Protektif dan Imunogenik. Laporan RUT. Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi Dewan Riset Nasional
- Hegde NR, Srikumaran S, 1997. The Use of Bovine MHC Class I Allele-specific Peptide Motifs and Proteolytic Cleavage Specificities for The Prediction of Potential Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes of Bovine Viral Diarrhea Virus Genes. 14(2):111-21.
- Huitema H, 1986. Peternakan di daerah tropik, arti ekonomi dan kemampuannya. Penelitian di beberapa daerah Indonesia. Penerbit PT Gramedia Jak Hal. 7 25-30.



- Irwan Setiabudi, 1993. **Pengidap Virus Hepatitis B, masalah asosiasi dengan antigen leukosit manusia pada populasi etnik Jawa.** Disertasi Universitas Airlangga.
- Isaacson JA, Flaming KP, Roth JA, 1998. **Increase MHC Class II and CD25 Expression on Lymphocytes in The Absence of Persistent Lymphocytes in Cattle Experimentally Infected with Bovine Leukemia Virus.** *Vet Immunopathol.* 64(3):235-48.
- Johanna, 1999. **Hubungan Tipe HLA dengan Kerentanan Tubuh pada Penyakit Lepra** Disertasi Universitas Airlangga.
- Jonathan M, Austyn, Kathryn J, Wood, 1993. **The major Histocompatibility Complex.** In *Principles of Cellular and Molecular Immunology* Published in The United States by Oxford University Press Inc New York. Pp.65-112
- Judajana FM, 1993. **Pola Sistem HLA pada Penderita Diabetes Melitus.** Disertasi Universitas Airlangga.
- Judajana FM, 1999. **Imunogenetika.** Dalam *Imunologi Mukosal Kedokteran* Airlangga University Press. Hal. 1-25.
- Kaufman JF, Aulfray C, Korman AJ, Shackelford DA, Strominger J, 1993. **The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex.** *J. Cell.* 36 1-4
- Kenneth LR, dan Clark K, 1996. **Analysis of the role of MHC class II presentation in the stimulation of cytotoxic Tlymphocyte by antigens targeted into the exogenous antigen-MHC class I presentation pathway.** *J. Immunol* 156:3721-3726.
- Kertayadnya G, Wilcox GE, Socharsono S, Hartaningsih N, Coelen RJ, Cook RD, Collins ME, Brownlie, 1993. **Characteristics of Retrovirus associated with Membrana Disease in Bali Cattle** *J Gen. Virol* 74:1765-1773
- Klein J, 1990. **Immunolog.** Blackweel Scientific Publication Inc. Boston
- Klein MR, van den Burg SH, Hovenkamp E, Holwerda Am, Drijfhout JW, Melief CJ, Miedema F, 1998. **Characterization of HLA-B57 Retristec Human Immunodeficiency Virus type I Gag and Specific Cytotoxic T Lymphocyte Respons.** *J. Gen. Virol.* 79(9):2191-2010

- Kreisel D, Krupnick AS, Szeto WY, Popma SH, Sankaran D, Krasinskas AM, Amin KM, Rosengard BR, 2001. A simple method for culturing mouse vascular endothelium. *J. Immunol Methods*. 1,254(1-2) 31-45.
- Kresno SB, 1996. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium Edisi ke 3 Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia*. Jakarta Hal.9-46.
- Lewin HA, Bernoco D, Nolan TJ, 1994. Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of Bovine Leukaemia Virus infection. *Animal Genet* 17 187-207.
- Lewin HA, Russell GC, Glass E, 1999 Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. *Immunological Reviews*. Vol 167:145-158.
- Margaret GP, Coggeshall KM, Leslie Sj, Pat Jl, 1997. Bovine Luteal Cells Elicit Major Histocompatibility Complex Class II Dependent T-Cell Proliferation. *J. of Biol Repro* Pp.887-893.
- Maudsley DJ, Pound JD, 1991. Modulation of MHC antigen expression by viruses and oncogenes. *Immunol. Today* 12. 429-431.
- Mustahdi Surjoatmodjo, 1992. *Analisis Sitogenik dan Morfomerik Beberapa Bangsa Sapi di Indonesia*. Disertasi Universitas Airlangga.
- Moreau P, Adrian CF, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella Ed, paul P, 1999 IL-10 selectively Induces HLA-G Expression in Human Trophoblast and Monocyte *Int Immunol*. 11(5).803-11.
- Nasseri SS dan Germain RN, 1992. How MHC class II molecules work : peptide dependent completion of protein folding. 1992. *Imunol. To Day*. 13 2 43-46
- Nicholas FW, 1987. *Veterinary Genetics*. Clarendon Press Oxford Published in The United States Pp232-265
- Oliveria Sc, Harms JS, Rech EJ, Rodarte RS, Bocca AJ, Goes AM, Splitter GA, 1998. The Role of T cell Subsets and Cytokines of Regulation of Intracellular Bacterial Infection, *Braz J. Ned. Res*. 31(1) 77-84
- Panc, 1990 *Upaya Peningkatan Mutu genetik Sapi Bali di P3 Bali*. Seminar Nasional Sapi Bali Denpasar

- Peranginangin, 1990. **Perkembangan dan Pengendalian Penyakit Sapi di Wilayah Pelayanan BPPH VI Denpasar.** Seminar Nasional Sapi Bali. Denpasar.
- Putra AAG, 1999. **Bunga Ranpai Penyidikan Penyakit Hewan.** Balai Penyidikan Penyakit HewanWil. VI Denpasar. Hal. 198-342.
- Putra AAG, Dharma DN, Socharsono, Sudanalg, Syafriati T, 1983. **Studi Epidemiologi penyakit Jembrana di Kabupaten Karangasem th 1981 Tingkat Morbiditas, Tingkat Mortalitas dan Atact rate.** Annual Report on Animal Disease Investigation in Indonesia During The Period of 1981-1982. Pp. 170-178.
- Roitt IM, Brostoff J, male D, 1993. **Immunology.** Third Edition Mosby-Year Book Europe Limited. Pp. 9.1-9.12.
- Setiadi B, 1992. **Beternak sapi daging dan masalahnya .** Lembaga Penelitian Ternak Bogor. Penerbit Aneka Ilmu Semarang.
- Setiawan, 1998. **Peran mobilitas sapi terhadap infeksi Tripanasoma pada sapi melalui pendekatan serologi.** Disertasi Universitas Airlangga.
- Scvilla LM, Richter SS, Müller J. 2001. **Intracellular transport of MHC class II and associated invariant chain in antigen presenting cells from AP-3-deficient mocha mice.** *J. Cell Immunol.*15;210 (2) 143-153.
- Scheherazade SN dan Germain RN, 1992. **How MHC class II molecules work: peptide-dependent completion of protein folding.** *J. Immunol. Today* 13. 2: 43-46.
- Schmutz SM, Beryere TG, Robins JW, Carruthers TD. 1992. **Resistance to Staphylococcus aureus mastitis detected by DNA marker** Pp 124-133 in Proc. 31 st Annu.
- Sharif S, Mallard Ba, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JC, Leslie KE, 1998. **Association of The Bovine Major Histocompatibility Complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with Occurence of Disease and Milk Somatic Cell Score in Canadian Dairy Cattle.** *J. Anim. Genet.* 29(3):185-93
- Shirley A, Keith E, Ballingall T, 1999. **Cattle MHC . evolution in action** *Immunological Reviews* 167.159-168

- Wilcox GE, Chadwick BJ, Kertayadnya G, 1995. Recent Advances in The Understanding of Jembrana Disease. *Vet Microbiol* 46(1-3):249-255.
- Yoshiko N, Hidcnori K, Misao O, Noriyuki K, Kosuke Oyoko A, 1999. Ovine MHC Class II DRB1 Alleles Associated with Resistance or Susceptibility to Development of Bovine leukemia Virus-Induced ovine Lymphoma. *Journal of Cancer Research* 59. Pp. 975-981.
- Zanotti M, Poli G, Ponti W, Polli M, Rocchi M, Bolzani E, Longeri M, Russo S, Lewin HA, van Eijk MJT, 1996. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Journal of Animal Genetics*. Pp.337-341.



LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran I. Cara Kerja Pewarnaan Giemsa.

1. Buat preparat ulas darah, diatas gelas obek, keringkan.
2. Difiksasi dengan mempergunakan methanol selama 5 menit.
3. Diwarnai dengan Giemsa (1 : 9 Buffer fosphat, difilter) selama 15 - 20 menit.
4. Cuci dengan air mengalir
5. Periksa dibawah mikroskop, pembesaran 10x, 45x dan 100x.



Lampiran 2. Cara Kerja Pemeriksaan Patologi Anatomi (PA) dan Histopatologi (HP).

1. Pemeriksaan PA dengan mengadakan pengamatan langsung terhadap Sapi Bali yang telah dinekropsi.
- 2 Untuk pemeriksaan HP, dilakukan pengambilan terhadap organ-organ.
3. Organ dipotong dengan ukuran 2 x 1 x 0,5 cm kemudian difiksasi dengan formalin 10% selama 48 jam sampai jaringan tersebut diproses.
4. Organ diproses secara otomatis dengan urutan-urutan sebagai berikut :
Dehidrasi, Penjernihan, Penanaman.
5. Pembuatan blok parafin (embeding).
6. Pewarnaan dengan menggunakan Haematoxylin Eosin.

Lampiran 3. Cara Kerja Pemeriksaan Serologi (ELISA)

1. **Koating antigen.** Tambahkan 100 μ l larutan antigen (1:32, yaitu 0,02 ml antigen diencerkan 6,4 ml larutan coating buffer/plat) ke dalam setiap lubang plat, mulai lubang B2 sampai dengan G11, kocok dengan menggunakan mikrosaker dan kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C.
2. **Pencucian** Plat dicuci 3 kali dengan larutan PBST masing-masing 2 menit, pencucian dapat dilakukan secara manual atau otomatis dengan alat plate washer.
3. **Penambahan sampel (serum).** Serum diencerkan 1:20 dalam PBST buffer (5 μ l serum diencerkan 100 μ l PBST/plat), kemudian tambahkan 100 μ l ke dalam setiap lubang (kecuali lubang kontrol) yang mengandung antigen. Kocok dengan shaker selama 30 detik dengan kecepatan 6,0 dan inkubasi selama 1 jam pada 37°C.
4. **Blank.** Ditempatkan pada lubang no. 1. berisi pelarut, konjugat dan substrat. Ini dilakukan untuk mengetahui apakah pengujian berjalan baik. Penambahan kontrol serum negatif dan positif.
5. Tambahkan 100 μ l serum pengenceran 1:20 ke dalam lubang B2, 1:40 ke dalam lubang C2, 1:80 ke dalam lubang D2, 1:160 ke dalam lubang E2, 1:320 ke dalam lubang F2. Sedangkan pengenceran 1:640 dimasukkan ke dalam lubang G2, B3, C3 dan D3.

6. **Pencucian.** Plat dicuci 3 kali dengan larutan PBST dengan cara yang sama seperti diatas.
7. **Penambahan konjugat.** Tambahkan 50 μ l konjugat (1.500, yaitu 8 μ l konjugat diencerkan dalam 4 ml PBST/plat) pada setiap lubang plat. Plat diayak dengan mikrosaker selama 30 detik dengan kecepatan 6,0 setelah itu diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C
8. **Pencucian.** Plat dicuci 3 kali dengan cara yang sama seperti diatas
9. **Penambahan substrat.** Tambahkan 100 l larutan substrat ke dalam setiap lubang plat. diayak 30 detik dengan kecepatan 6,0, setelah itu inkubasi pada suhu 37°C.
10. Hasil reaksi dibaca dengan ELISA reader menggunakan filter 405 nm.

Lampiran 4. Cara kerja Isolasi limfosit.

- 1 Darah yang mengandung antikoagulan (EDTA) dipusingkan dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.
- 2 Pisahkan lapisan sel darah putih yang berbentuk cincin putih diantara kedua cairan, dengan menggunakan pipet Pasteur.
- 3 Masukkan ke dalam tabung yang berisi RPMI, selanjutnya campurkan secara merata dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan ficolhipaque, selanjutnya sentrifugasi 3000 rpm selama 30 menit.
- 4 Pindahkan sel pada perbatasan (*interface*) ke dalam tabung yang mengandung 7 ml PBS, selanjutnya disentrifugasi (1250 rpm, 15 menit).
- 5 Supernatan yang mengandung limfosit dicuci 2 X dengan PBS (1250 rpm, 15 menit)
- 6 Endapan yang diperoleh adalah sel limfosit, kemudian dipanen dengan cara membuang supernatan dan ditambahkan 500 μ l PBS, kalau tidak langsung dipergunakan selanjutnya disimpan pada -20° C.

Lampiran 5. Cara kerja Imunositokimia

- 1 Teteskan sel limfosit (2×10^6) diatas gelas slide, ditunggu sampai kering.
- 2 Fiksasi dengan menggunakan aceton yang mengandung 3% H_2O_2 selama 15 menit, kemudian keringkan.
- 3 Cuci dengan PBS 2 X 5 menit.
- 4 Teteskan 200 μ l NRS (Normal Rabbit Serum) 10% pada masing-masing slide.
- 5 Tanpa dicuci tambahkan MoAb sebanyak 200 μ l (1 : 60) selama 60 menit.
- 6 Cuci semua slide dengan PBS pH 7,2 sebanyak 2 X 5 menit.
- 7 Tambahkan H_2O_2 3% pada semua selide selama 10 menit, selanjutnya cuci dengan PBS 2 x 5 menit.
- 8 Tambahkan Rabbit Anti Mouse (RAM) dengan perbandingan 1 : 1000 dalam NRS 10% selama 45 menit.
- 9 Cuci dengan PBS 2 X 5 menit kemudian celupkan ke dalam DAB selama 5 menit.
- 10 Cuci dengan air mengalir selama 15 menit, warnai dengan Meyers selama 5 menit
- 11 Cuci dengan aquadest 2 x 5 menit, selanjutnya direndam dalam alcohol absolut selama 2 X 5 menit.
- 12 Dicelupkan dalam Xylol selama 2 X 5 menit selanjutnya dimounting dan dikeringkan
- 13 Diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 10X, 45x dan 100X.

Lampiran 6. Cara kerja Elektroforesis (Sodium Dioksisulfat – Poli Akrylamid Gel Elektroforesis).

6.1 Preparasi sampel untuk Elektrophoresis.

- Melakukan kering beku (*freez-thawing*) sebanyak 3 X terhadap sel limfosit yang diisolasi.
- Tambahkan lisis buffer 500 μ l campurkan sampai rata, kemudian diamkan selama 30' dalam -20°C , selanjutnya sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit.

Supernatan diambil 50 μ l dan ditambahkan dengan sampel buffer 50 μ l, selanjutnya digodok dengan air mendidih (100°C) selama 5 menit dan dipergunakan untuk running dalam SDS-PAGE.

6.2. Membuat separating gel.

1. Komposisi :

- Acrylamid. 2,5 ml
- Tris HCl pH 8,8 1,2 ml
- SDS 0,5% 1,2 ml
- Aquades 1,1 ml
- APS 10% 30 μ l
- Temed 5 μ l

1. Membuat Stacking gel

- Acrlamid 0,66 ml
- Tris Hcl pH 6,8 0,8 ml

- SDS 0,5% 0,8 ml
- Aquadest 0,8 ml
- APS 10% 20 μ l
- Temed 4 μ l

- a. Masukkan separating gel lewat dinding kaca sampai 1 cm dari atas
- b. Tambahkan butanol diatasnya sampai penuh
- c. Inkubasi selama 25 menit, setelah itu dicuci dengan aquades sampai butanolnya bersih
- d. Masukkan stacking gel sampai penuh, kemudian masukkan comb ke stacking dan inkubasi selama 25 menit.
- e. Siapkan sampel (lemfi buffer + sampel) masukkan kedalam ependof dan tutupnya ditusuk dengan jarum $\frac{1}{2}$ tusukan, langsung di godok dengan 100 °C selama 5 menit. (Lemfi buffer : Tris Hcl pH 6,8 1 ml, Gliserin....0,8 ml, SDS 10% ... 1,6 ml, Bromofenolblue 0,5%0,4 ml, Mercaptoetanol 5%50 μ l, aquadest....3,8 ml
- f. Setelah inkubasi selesai lepaskan comb dan cuci dengan E buffer 1 kali sampai tidak ada gelembung udara. (E. buffer 10 X : Tris base ...30,29 gr, Glycine..... 144, 13 gr, SDS.....10 gr, 1 lt aquadest)
- g. Masukkan sampel 10-20 μ l ke dalam lubang-lubang comb dan hilangkan gelembung udara tadi dengan jarum, masukkan marker pada salah satu lubang comb
- h. Pasang listrik dengan 125 volt dan 40 mA

- i. Tunggu sampai sampet turun seluruhnya, kemudian matikan listrik dan lepaskan pelan-pelan.
- j. Gel dimasukkan ke dalam gelas petri yang berisi larutan pencucian I
- k. Pencucian I :
 - Methanol 25 ml
 - Asam asetat 3,75 ml
 - Aquadest 71,25 ml, goyang dengan kecepatan 42 selama 30'.

l. Pencucian II

- Methanol 25 ml
- Asam asetat 3,75 ml
- Aquadest 93,75%, goyang 30' dengan kecepatan 42 rpm.

m. Pencucian III

- Glutaraldehid 10 ml
- Aquadest 90 ml

n. Pencucian IV : dengan aquadest masing 100 ml 3X selama 30'

o. Tahap pewarnaan

Timbang AgNO_3 0,8 gr + 4 ml aquadest, campurkan dan masukkan ke dalam larutan yang terdiri dari

- NaOH 0,36% 21 ml
- NH_3 1,4 ml

- Akuades 73,5 ml, goyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit.

q. Masukkan pengembang warna yang terdiri dari :

- Formaldehid 37% 50 μ l.
- Zitronensure 5% 100 μ l.
- Aquadest 100 ml, tunggu sampai 5' sambil goyang terus

r. Masukkan stop reaksi dengan acetic acid 10%

s. Cuci dengan aquadest @ 100 ml 2X selama 2'

t. Berikan gliserol 10%

- Gliserol... .. 10 ml
- Aquadest 90 ml.

Lampiran 7. Cara kerja Western Immunoblotting

1. **Buka gel dari kaset, cuci dengan larutan transfer buffer (Transfer buffer : 15,15 gr Tris aminomethan, 72 gr glisn, 1000 ml methanol dalam 5000 ml aquadest pH 8,3)**
2. **Ambil transblot dan isikan pada gelas petri, celupkan kertas filter 10 potong dengan panjang 12 x 8 cm.**
3. **Buka alat biometra**
4. **Susun rapi 4 lapis kertas filter diatas anode (+) (pad warna hitam, spon gabus, kertas filter, kertas nitroselulosa, pad warna hitam) atau letakkan membran selulosa pada petridish yang berisi transblot, beri alas kertas saring.**
5. **Letakkan gel diatasnya lalu angkat dan letakkan diatas kertas filter tadi**
6. **Selanjutnya letakkan sisa kertas saring tadi diatas gel, tutup dengan katode (-)**
7. **Setiap lapis disusun pelan-pelan jangan sampai ada gelembung udara. press dan kunci kaset blotting.**
8. **Run kaset dengan transfer buffer (125 v, semalam 4°C, 40 mA)**
9. **Setelah selesai ambil kertas selulosa hati-hati dengan menggunakan pinset, di blok dengan BSA 1 % (Bovine serum albumin) selama 30 menit, dalam PBS selama 10 menit**
10. **Setelah itu buang cairan dan ganti dengan BSA 1% yang baru**

11. Tambahkan MoAb dengan perbandingan 1 : 20
12. Reaksikan dengan MoAb selama 3 jam pada room temperatur
Cuci dengan PBS tween 0,05%, 3X
13. Tambahkan konjugate (1 : 1000) selama 1 jam pada 37°C
14. Pencucian dengan 0,05% tween dalam PBS 3 X
15. Pewarnaan dengan 0,06% 4-Chloronaphthol + 0,01% H₂O₂ atau dengan DAB, sampai timbul warna.
16. Pencucian dilakukan dengan aquadest beberapa kali sampai bersih dan simpan diantara kertas whatman.



Lampiran 8. Cara kerja Isolasi Protein (Elusi).

1. **Kerjakan SDS-PAGE seperti biasa, tapi sebelum pencucian sudah dihentikan hanya sampai running saja.**
2. **Band dipotong dipisahkan dari potongan band yang lain dan ditempatkan dalam wadah yang berlainan dan diisi dengan PBS 1X, jangan sampai robek, dan dijaga agar tidak kering.**
3. **Potongan gel tadi dimasukkan ke dalam selopan yang panjangnya kira-kira 10 cm**
4. **Buka kantong selopan dan kalau sulit, celupkan ujung selopan dengan PBS 1X supaya mudah terbuka.**
5. **Setelah selesai ikat bagian ujung bawah selopan tadi dengan benang bol dan masukkan potongan gel tadi lurus dan tidak boleh melengkung, tambahkan PBS 1X sebanyak 2 ml.**
6. **Ikat ujung atas dengan benang bol.**
7. **Masukkan ke dalam Bio-Rad yang telah diisi dengan E. buffer sebanyak 500 ml, melebihi kawat**
8. **Letakkan secara melintang dari katode ke anode**
9. **Nyalakan Bio- Rad 150 v, 40 mA kurang lebih 1,5 - 2 jam**
- 10 **Cairan yang ada dalam selopan tadi diambil dan masukkan ke dalam tube ependof dan simpan di -20°C .**

Lampiran 9. Data Hematologi dan Serologi Sapi Bali Eksperimen dan Kasus Lapangan.

Kode Sapi	WBC ($\times 10^3$)	RBC ($\times 10^4$)	Hb (%)	Differential Count				Titer Elisa
				Net	Lym	Mon	Eus	
CB1	4,2	662	14,8	38	49	6	-	0,377
CB2	4,7	583	14,6	35	53	5	-	0,286
CB3	3,1	630	13,2	33	30	9	-	0,283
CB4	4,3	715	16,0	42	51	7	-	0,289
CB5	3,5	543	11,8	38	53	9	-	0,331
CB6	4,2	742	10,4	37	44	7	-	0,377
CB7	3,1	687	15,0	37	54	6	-	0,408
CB8	4,3	621	12,8	36	44	5	-	0,406
CB9	3,5	705	14,6	44	39	7	-	0,284
CB10	4,2	662	16,6	33	45	7	-	1,225
CB11	3,1	693	13,0	37	45	8	-	1,638
CB12	4,3	635	17,0	42	50	8	-	1,109
CB13	3,5	742	10,4	37	43	7	-	1,459
CB14	4,2	543	11,8	38	44	9	-	1,314
CB15	8,75	615	12,3	34	55	11	-	1,359
CB16	9,8	704	10,8	34	57	9	-	0,811
CB17	7,9	805	9,8	33	61	6	-	0,549
CB18	7,7	635	14,6	31	63	6	-	0,717
CB19	6,9	715	12,4	35	56	7	-	1,638
CB20	10,5	593	11,2	37	55	8	-	1,314

Lampiran 10. Data Hubungan Ekspresi Antigen Limfosit dengan Kerentanan terhadap Penyakit Jembrana pada serotipe B5C, BAQ150A dan H34A

Kode Sapi rentan	Serotipe MHC			Kode Sapi sehat	Serotipe MHC		
	B5C	BAQ 150A	H34A		B5C	BAQ 150A	H34A
CB1	11 (-)	7 (-)	23 (+)	SB1	23 (+)	30 (+)	8 (-)
CB2	30 (+)	26 (+)	73 (+)	SB2	30 (+)	29 (+)	12 (-)
CB3	14 (-)	36 (+)	38 (+)	SB3	70 (+)	36 (+)	19 (-)
CB4	21 (+)	25 (+)	10 (-)	SB4	21 (+)	35 (+)	10 (-)
CB5	18 (-)	51(+)	11 (-)	SB5	37 (+)	37 (+)	7 (-)
CB6	14 (-)	16 (-)	8 (-)	SB6	27 (+)	33 (+)	15 (-)
CB7	11 (-)	37 (+)	23 (+)	SB7	17 (-)	37 (+)	17 (-)
CB8	20 (+)	36 (+)	24 (+)	SB8	20 (+)	12 (-)	11 (-)
CB9	7 (-)	16 (-)	19 (-)	SB9	49 (+)	20 (+)	23 (+)
CB10	8 (-)	17 (-)	9 (-)	SB10	30 (+)	10 (-)	26 (+)
CB11	18 (-)	51 (+)	42 (+)	SB11	37 (+)	21 (+)	25 (+)
CB12	23 (+)	16 (-)	37 (+)	SB12	27 (+)	27 (+)	21 (+)
CB13	21 (+)	20 (+)	33 (+)	SB13	17 (-)	29 (+)	10 (-)
CB14	15 (-)	27 (+)	17 (-)	SB14	20 (+)	21 (+)	11 (-)
CB15	17 (-)	8 (-)	15 (-)	SB15	21 (+)	8 (-)	8 (-)
CB16	20 (+)	20 (+)	60 (+)	SB16	23 (+)	10 (-)	23 (+)
CB17	30 (+)	21(+)	76 (+)	SB17	60 (+)	36 (+)	24 (+)
CB18	17 (-)	22 (+)	17 (-)	SB18	10 (-)	8 (-)	19 (-)
CB19	14 (-)	33 (+)	20 (+)	SB19	29 (+)	24 (+)	8 (-)
CB20	10 (-)	54 (+)	33 (+)	SB20	30 (+)	22 (+)	20 (+)

Lampiran 11. Data Ekspresi Antigen Limfosit Sapi Bali, PO dan Sapi Madura.

Breed Sapi	Kode Sapi	Serotipe MHC		
		B5C	BAQ150A	H34A
Bali	CB1	11 (-)	7 (-)	23 (+)
	CB2	30 (+)	26 (+)	73 (+)
	CB3	14 (-)	36 (+)	38 (+)
	CB4	21 (+)	25 (+)	10 (-)
	CB5	18 (-)	51(+)	11 (-)
	CB6	14 (-)	16 (-)	8 (-)
	CB7	11 (-)	37 (+)	23 (+)
	SB1	23 (+)	30 (+)	8 (-)
	SB 2	30 (+)	29 (+)	12 (-)
	SB 3	70 (+)	36 (+)	19 (-)
	SB 4	21 (+)	35 (+)	10 (-)
	SB 5	37 (+)	37 (+)	7 (-)
	SB 6	27 (+)	33 (+)	15 (-)
	SB 7	17 (-)	37 (+)	17 (-)
	SB 8	20 (+)	12 (-)	11 (-)
PO	PO1	8 (-)	14 (-)	19 (-)
	PO2	53(+)	20 (+)	10 (-)
	PO3	24 (+)	21 (+)	7 (-)
	PO4	19 (-)	8 (-)	14 (-)
	PO5	9 (-)	28 (+)	20 (+)
	PO6	8 (-)	23 (+)	11 (-)
	PO7	12 (-)	35 (+)	18 (-)
	PO8	29 (+)	16 (-)	23 (+)
	PO9	10 (-)	36 (+)	19 (-)
	PO10	7 (-)	15 (-)	10 (-)
	PO11	44 (+)	17 (-)	7 (-)
	PO12	40(+)	33 (+)	15 (-)
	PO13	11 (-)	37 (+)	17 (-)
	PO14	18 (-)	12 (-)	11 (-)
	PO15	43(+)	24 (+)	23 (+)
Madura	M1	9 (-)	30 (-)	11 (-)
	M2	42 (+)	29 (+)	8 (-)
	M3	37 (+)	36 (+)	23 (+)
	M4	33 (+)	15 (-)	8 (-)
	M5	17 (-)	17 (+)	52(-)
	M6	15 (-)	33 (+)	69(+)
	M7	60 (+)	37 (+)	10 (-)
	M8	76 (+)	12 (-)	70 (+)
	M9	17 (-)	16 (-)	10 (-)
	M10	20(+)	25 (+)	11 (+)
	M11	33 (+)	51(+)	8 (-)
	M12	8 (-)	16 (-)	43(+)
	M13	31(+)	17 (+)	8 (+)
	M14	15 (-)	30 (+)	12 (-)
	M15	17 (-)	29 (+)	53(+)

Lampiran 12. Data Berat Molekul Protein Antigen Limfosit Sapi (BoLA) Klas I dan II pada Sapi Bali dalam Dalton.

Breed Sapi	Ulangan	MHC			
		MHC I		MHC II	
		Rantai alfa	Rantai beta	Rantai alfa	Rantai beta
Bali1	1	46.667	14.000	-	20.000
	2	48.084	14.500	26.000	18.500
	3	46.667	12.500	26.000	25.332
B2	1	-	-	23.750	-
	2	-	-	25.250	-
	3	46.667	14.000	-	25.250
B3	1	45.252	12.000	-	18.500
	2	46.667	12.500	26.000	-
	3	46.667	-	-	25.332
B4	1	46.667	12.500	36.748	18.500
	2	-	-	25.250	25.250
	3	46.667	14.000	-	-
B5	1	45.252	12.000	-	18.500
	2	46.667	12.500	26.000	25.250
	3	46.667	-	-	-
B6	1	46.667	12.500	36.748	18.500
	2	-	11.000	-	25.332
	3	45.252	12.000	29500	-
B7	1	46.668	14.500	29.500	-
	2	46.668	14.500	-	25.250
	3	-	-	18.500	18.500
B8	1	41.004	12.000	26.000	-
	2	-	11.000	27.55	25.332
	3	46.667	11.500	25.250	18.500
B9	1	46.668	14.500	-	25.250
	2	-	-	18.500	-
	3	41.004	12.000	26.000	18.500
B10	1	-	11.000	27.55	25.250
	2	46.667	11.500	25.250	18.500
	3	46.446	-	-	25.250

Lampiran 13. Data Berat Molekul Protein Antigen Limfosit Sapi (BoLA) Klas I dan II pada Sapi PO dalam Dalton.

Breed Sapi	Ulangan	MHC			
		MHC I		MHC II	
		Rantai alfa	Rantai beta	Rantai alfa	Rantai beta
Peranakan Ongole 1	1	38.164	14.000	26.000	23.000
	2	38.164	14.000	26.000	23.750
	3	39.580	12.500	-	23.00
PO2	1	36.478	12.000	23.750	-
	2	-	12.000	-	23.750
	3	43.836	13000	20.000	23.000
PO3	1	43.836	12.000	20.000	-
	2	43.836	12.500	-	-
	3	-	-	-	23.750
PO4	1	39.580	12.500	36.748	23.000
	2	36.478	-	25.250	23.000
	3	-	14.000	-	23.000
PO5	1	43.836	12.000	-	-
	2	43.836	12.500	26.000	23.750
	3	43.836	-	-	23.000
PO6	1	45.252	12.500	36.748	23.750
	2	-	11.000	-	23.000
	3	39	12.000	24.500	-
PO7	1	38.164	14.500	26.000	-
	2	39.580	14.500	-	23.750
	3	36.478	-	23.750	23.000
PO8	1	-	12.000	-	23.000
	2	43.836	11.000	20.000	23.000
	3	43.836	11.500	20.000	-
PO9	1	43.836	14.500	-	23.750
	2	-	-	-	23.000
	3	39.580	12.000	36.748	23.750
PO10	1	36.478	11.000	25.250	-
	2	-	11.500	-	23.750
	3	43.836	-	-	23.000

Lampiran 14. Data Berat Molekul Protein Antigen Limfosit Sapi (BoLA) Klas I dan II pada Sapi Madura dalam Dalton.

Breed Sapi	Ulangan	MHC			
		MHC I		MHC II	
		Rantai alfa	Rantai beta	Rantai alfa	Rantai beta
Madura1	1	48.084	-	26.000	20.000
	2	48.084	14.000	-	18.500
	3	46.667	12.500	23.750	25.232
M2	1	48.084	12.000	23.750	-
	2	45.252	12.000	-	18.500
	3	48.084	13000	20.000	25.232
M3	1	48.084	12.000	20.000	-
	2	46.667	12.500	-	20.000
	3	48.084	-	-	19.250
M4	1	45.252	12.500	36.748	18.500
	2	-	-	25.250	18.500
	3	-	14.000	-	-
M5	1	-	12.000	-	-
	2	48.084	12.500	26.000	19.250
	3	46.667	-	-	20.000
M6	1	48.084	12.500	36.748	20.000
	2	45.252	11.000	-	19.250
	3	48.084	12.000	24.500	-
M7	1	48.084	14.500	26.000	20.000
	2	46.667	14.500	-	18.500
	3	48.084	-	23.750	25.232
M8	1	-	12.000	-	-
	2	45.252	11.000	-	18.500
	3	-	11.500	23.750	25.232
M9	1	46.667	14.500	23.750	-
	2	46.668	-	-	20.000
	3	-	12.000	20.000	19.250
M10	1	48.084	11.000	20.000	18.500
	2	-	11.500	-	18.500
	3	48.084	-	-	-

Lampiran 15. Analisis hasil penelitian Hubungan ekspresi BoLA dengan kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana pada B5C.

	Sapi	BoLA klas I	Ekspresi
1	rentan	B5C	-
2	Rentan	B5C	+
3	Rentan	B5C	-
4	rentan	B5C	+
5	Rentan	B5C	-
6	Rentan	B5C	-
7	rentan	B5C	-
8	Rentan	B5C	+
9	Rentan	B5C	-
10	rentan	B5C	-
11	Rentan	B5C	-
12	Rentan	B5C	+
13	rentan	B5C	+
14	Rentan	B5C	-
15	Rentan	B5C	-
16	rentan	B5C	+
17	Rentan	B5C	+
18	Rentan	B5C	-
19	rentan	B5C	-
20	Rentan	B5C	-
21	Sehat	B5C	+
22	Sehat	B5C	+
23	Sehat	B5C	+
24	Sehat	B5C	+
25	Sehat	B5C	+
26	Sehat	B5C	+
27	Sehat	B5C	-
28	Sehat	B5C	+
29	Sehat	B5C	+
30	Sehat	B5C	+
31	Sehat	B5C	+
32	Sehat	B5C	+
33	Sehat	B5C	-
34	Sehat	B5C	+
35	Sehat	B5C	+
36	Sehat	B5C	+
37	Sehat	B5C	+
38	Sehat	B5C	-
39	Sehat	B5C	+
40	Sehat	B5C	+

Crosstabs

Sapi*EKSB5C Crosstabulation

			EKSB5C		Total
			+	-	
SAPI	Rentan	Count	7	13	20
		Expected count	12,0	8,0	20,0
		% within SAPI	35,0%	65,0%	100,0%
	Sehat	Count	17	3	20
		Expected count	12,0	8,0	20,0
		% within SAPI	85,0%	15,0%	100,0%
Total		Count	24	16	40
		Expected count	24,0	16,0	40,0
		% within SAPI	60,0%	40,0%	100,0%

Chi-Square Test

	Value	Df	Asymp. Sig (2-sided)	Exact Sig (2-sided)	Exact Sig (1-sided)
Pearson Chi-Square	10,417 ^a	1	,001		
Continuity Correction ^a	8,438	1	,004		
Likelihood Ratio	11,035	1	,001	,003	,002
Fisher's Exact Test	40				
N of Valid Cases					

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8,00

Lampiran 16. Analisis hasil penelitian Hubungan ekspresi BoLA dengan kerentanan sapi Bali terhadap penyakit Jembrana pada BAQ150A.

	Sapi	BoLA klas II	Ekspresi
1	rentan	BAQ150A	-
2	Rentan	BAQ150A	+
3	Rentan	BAQ150A	+
4	rentan	BAQ150A	+
5	Rentan	BAQ150A	+
6	Rentan	BAQ150A	-
7	rentan	BAQ150A	+
8	Rentan	BAQ150A	+
9	Rentan	BAQ150A	-
10	rentan	BAQ150A	-
11	Rentan	BAQ150A	+
12	Rentan	BAQ150A	-
13	rentan	BAQ150A	+
14	Rentan	BAQ150A	+
15	Rentan	BAQ150A	-
16	rentan	BAQ150A	+
17	Rentan	BAQ150A	+
18	Rentan	BAQ150A	+
19	rentan	BAQ150A	+
20	Rentan	BAQ150A	+
21	sehat	BAQ150A	+
22	Sehat	BAQ150A	+
23	Sehat	BAQ150A	+
24	Sehat	BAQ150A	+
25	Sehat	BAQ150A	+
26	Sehat	BAQ150A	+
27	Sehat	BAQ150A	+
28	Sehat	BAQ150A	-
29	Sehat	BAQ150A	+
30	Sehat	BAQ150A	-
31	Sehat	BAQ150A	+
32	Sehat	BAQ150A	+
33	Sehat	BAQ150A	+
34	Sehat	BAQ150A	+
35	Sehat	BAQ150A	-
36	Sehat	BAQ150A	-
37	Sehat	BAQ150A	+
38	Sehat	BAQ150A	-
39	Sehat	BAQ150A	+
40	Sehat	BAQ150A	+

Crosstabs

Sapi*EKSBAQ150A Crosstabulation

			EKSBAQ150A		Total
			+	-	
SAPI	Rentan	Count	14	6	20
		Expected count	14,5	5,5	20,0
		% within SAPI	70,0%	30,0%	100,0%
	Sehat	Count	15	5	20
		Expected count	14,5	5,5	20,0
		% within SAPI	75,0%	25,0%	100,0%
Total		Count	29	11	40
		Expected count	29,0	11,0	40,0
		% within SAPI	72,5%	27,5%	100,0%

Chi-Square Test

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,125 ^b	1	,723		
Continuity Correction ^a	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,126	1	,723		
Fisher's Exact Test				1,000	,500
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,50.

Lampiran 17. Analisis hasil penelitian Hubungan ekspresi BoLA dengan kerentanan terhadap penyakit Jembrana pada serotipe H34A.

	Sapi	BoLA klas II	Ekspresi B5C
1	rentan	H34A	+
2	Rentan	H34A	+
3	Rentan	H34A	+
4	rentan	H34A	-
5	Rentan	H34A	-
6	Rentan	H34A	-
7	rentan	H34A	+
8	Rentan	H34A	+
9	Rentan	H34A	-
10	rentan	H34A	-
11	Rentan	H34A	+
12	Rentan	H34A	+
13	rentan	H34A	+
14	Rentan	H34A	-
15	Rentan	H34A	-
16	rentan	H34A	+
17	Rentan	H34A	+
18	Rentan	H34A	-
19	rentan	H34A	+
20	Rentan	H34A	+
21	Sehat	H34A	-
22	Sehat	H34A	-
23	Sehat	H34A	-
24	Sehat	H34A	-
25	Sehat	H34A	-
26	Sehat	H34A	-
27	Sehat	H34A	-
28	Sehat	H34A	-
29	Sehat	H34A	+
30	Sehat	H34A	+
31	Sehat	H34A	+
32	Sehat	H34A	+
33	Sehat	H34A	-
34	Sehat	H34A	-
35	Sehat	H34A	-
36	Sehat	H34A	+
37	Sehat	H34A	+
38	Sehat	H34A	-
39	Sehat	H34A	-
40	Sehat	H34A	+

Crosstabs

Sapi*EKSH34A Crosstabulation

			EKSH34A		Total
			+	-	
SAPI	Rentan	Count	12	8	20
		Expected count	9,5	10,5	20,0
		% within SAPI	60,0%	40,0%	100,0%
	Sehat	Count	7	13	20
		Expected count	9,5	10,5	20,0
		% within SAPI	35,0%	65,0%	100,0%
Total	Count	19	21	40	
	Expected count	19,0	21,0	40,0	
	% within SAPI	47,5%	52,5%	100,0%	

Chi-Square Test

	Value	DF	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig (2-sided)	Exact Sig (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,506 ^b	1	,113		
Continuity Correction ^a	1,604	1	,205		
Likelihood Ratio	2,533	1	,111		
Fisher's Exact Test				,205	,102
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,50.

Lampiran 18. Analisis hasil penelitian pengaruh *breed* sapi dan serotipe MoAb terhadap ekspresi antigen limfosit.

	<i>Breed</i> sapi	BoLA	Ulangan	Ekspresi
1	Bali	B5C	1	11
2	Bali	B5C	2	30
3	Bali	B5C	3	14
4	Bali	B5C	4	21
5	Bali	B5C	5	18
6	Bali	B5C	6	14
7	Bali	B5C	7	11
8	Bali	B5C	8	23
9	Bali	B5C	9	30
10	Bali	B5C	10	70
11	Bali	B5C	11	21
12	Bali	B5C	12	37
13	Bali	B5C	13	27
14	Bali	B5C	14	17
15	Bali	B5C	15	20
16	Bali	BAQ150A	1	7
17	Bali	BAQ150A	2	26
18	Bali	BAQ150A	3	36
19	Bali	BAQ150A	4	25
20	Bali	BAQ150A	5	51
21	Bali	BAQ150A	6	16
22	Bali	BAQ150A	7	37
23	Bali	BAQ150A	8	30
24	Bali	BAQ150A	9	29
25	Bali	BAQ150A	10	36
26	Bali	BAQ150A	11	35
27	Bali	BAQ150A	12	37
28	Bali	BAQ150A	13	33
29	Bali	BAQ150A	14	37
30	Bali	BAQ150A	15	12
31	Bali	H34A	1	23
32	Bali	H34A	2	73
33	Bali	H34A	3	38
34	Bali	H34A	4	10
35	Bali	H34A	5	11
36	Bali	H34A	6	8
37	Bali	H34A	7	23
38	Bali	H34A	8	8
39	Bali	H34A	9	12

40	Bali	H34A	10	19
41	Bali	H34A	11	10
42	Bali	H34A	12	7
43	Bali	H34A	13	15
44	Bali	H34A	14	17
45	Bali	H34A	15	11
46	PO	B5C	1	8
47	PO	B5C	2	53
48	PO	B5C	3	24
49	PO	B5C	4	19
50	PO	B5C	5	9
51	PO	B5C	6	8
52	PO	B5C	7	12
53	PO	B5C	8	29
54	PO	B5C	9	10
55	PO	B5C	10	7
56	PO	B5C	11	44
57	PO	B5C	12	40
58	PO	B5C	13	11
59	PO	B5C	14	18
60	PO	B5C	15	43
61	PO	BAQ150A	1	14
62	PO	BAQ150A	2	20
63	PO	BAQ150A	3	21
64	PO	BAQ150A	4	8
65	PO	BAQ150A	5	28
66	PO	BAQ150A	6	23
67	PO	BAQ150A	7	35
68	PO	BAQ150A	8	16
69	PO	BAQ150A	9	36
70	PO	BAQ150A	10	15
71	PO	BAQ150A	11	17
72	PO	BAQ150A	12	33
73	PO	BAQ150A	13	37
74	PO	BAQ150A	14	12
75	PO	BAQ150A	15	24
76	PO	H34A	1	19
77	PO	H34A	2	10
78	PO	H34A	3	7
79	PO	H34A	4	14
80	PO	H34A	5	20
81	PO	H34A	6	11
82	PO	H34A	7	18

83	PO	H34A	8	23
84	PO	H34A	9	19
85	PO	H34A	10	10
86	PO	H34A	11	7
87	PO	H34A	12	15
88	PO	H34A	13	17
89	PO	H34A	14	11
90	PO	H34A	15	23
91	Madura	B5C	1	9
92	Madura	B5C	2	42
93	Madura	B5C	3	37
94	Madura	B5C	4	33
95	Madura	B5C	5	17
96	Madura	B5C	6	15
97	Madura	B5C	7	60
98	Madura	B5C	8	76
99	Madura	B5C	9	17
100	Madura	B5C	10	20
101	Madura	B5C	11	33
102	Madura	B5C	12	8
103	Madura	B5C	13	31
104	Madura	B5C	14	15
105	Madura	B5C	15	17
106	Madura	BAQ150A	1	30
107	Madura	BAQ150A	2	29
108	Madura	BAQ150A	3	36
109	Madura	BAQ150A	4	15
110	Madura	BAQ150A	5	17
111	Madura	BAQ150A	6	33
112	Madura	BAQ150A	7	37
113	Madura	BAQ150A	8	12
114	Madura	BAQ150A	9	16
115	Madura	BAQ150A	10	25
116	Madura	BAQ150A	11	51
117	Madura	BAQ150A	12	16
118	Madura	BAQ150A	13	17
119	Madura	BAQ150A	14	30
120	Madura	BAQ150A	15	29
121	Madura	H34A	1	11
122	Madura	H34A	2	8
123	Madura	H34A	3	23
124	Madura	H34A	4	8
125	Madura	H34A	5	52

126	Madura	H34A	6	69
127	Madura	H34A	7	10
128	Madura	H34A	8	70
129	Madura	H34A	9	10
130	Madura	H34A	10	11
131	Madura	H34A	11	8
132	Madura	H34A	12	43
133	Madura	H34A	13	8
134	Madura	H34A	14	12
135	Madura	H34A	15	53



Means

Ekspresi*sapi

Ekspresi

SAPI	Mean	N	Std. Deviation
Bali	24,36	45	14,88
Madura	22,79	45	18,34
PO	19,96	45	11,32
Total	23,80	135	15,29

Ekspresi*BoLA

Ekspresi

MHC	Mean	N	Std. Deviation
B5C	25,09	45	16,49
BAQ150A	26,20	45	10,68
H34A	20,11	45	17,46
Total	23,80	135	15,29

Univariate Analysis of Variance

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable : Ekspresi

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2665,067 ^a	8	333,133	1,464	,177
SAPI	1165,733	2	582,867	2,561	,081
MHC	946,311	2	473,156	2,079	,129
SAPI*MHC	553,022	4	138,256	,607	,658
Error	28676,533	126	227,592		
Total	107811,000	135			
Corrected Total	31341,600	134			

a. R Squared = ,085 (Adjusted R Squared = 0,27)

Lampiran 19. Analisis hasil penelitian berat molekul protein antigen limfosit sapi (BoLA) klas I dan II sapi Bali, PO dan sapi Madura

	Sapi	Kode	Ula ngan	MHC I Alfa	MHC I Beta	MHC II Alfa	MHC II Beta
1	Bali	1	1	47.139	13.667	26.000	21.277
2	Bali	1	2	46.667	14.000	24.500	25.250
3	Bali	1	3	46.195	12.250	26.000	21.916
4	Bali	1	4	46.667	13.250	30.999	21.875
5	Bali	1	5	46.195	12.250	26.000	21.875
6	Bali	1	6	45.960	11.833	33.124	21.916
7	Bali	1	7	46.668	14.500	24.000	21.875
8	Bali	1	8	43.836	11.500	26.267	21.916
9	Bali	1	9	43.836	13.250	22.250	21.875
10	Bali	1	10	46.557	11.250	26.400	23.000
11	Madura	2	1	47.612	13.250	24.875	21.244
12	Madura	2	2	47.140	12.333	21.875	21.866
13	Madura	2	3	47.612	12.250	20.000	19.625
14	Madura	2	4	45.252	13.250	30.999	18.500
15	Madura	2	5	47.376	12.250	26.000	19.625
16	Madura	2	6	47.140	11.833	30.624	19.625
17	Madura	2	7	47.612	14.500	24.875	21.244
18	Madura	2	8	45.252	11.500	23.750	21.866
19	Madura	2	9	46.668	13.250	21.785	19.625
20	Madura	2	10	48.084	11.250	20.000	18.500
21	PO	3	1	38.636	13.500	26.000	23.250
22	PO	3	2	40.157	12.333	21.875	23.375
23	PO	3	3	43.836	12.250	20.000	23.750
24	PO	3	4	39.965	13.250	30.999	23.000
25	PO	3	5	43.836	12.250	26.000	23.375
26	PO	3	6	42.126	11.833	30.624	23.375
27	PO	3	7	38.075	14.500	24.875	23.375
28	PO	3	8	43.836	11.500	20.000	23.000
29	PO	3	9	41.708	13.250	36.748	23.500
30	PO	3	10	40.157	11.250	25.250	23.375

Oneway

MANOVA
MHC I Rantai alfa

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	188.087	2	94.043	40.264	.000
Within Groups	63.063	27	2.336		
Total	251.150	29			

Multiple Comparisons
Dependent Variable: MHC I Rantai alfa
LSD

(I) Kode Sapi	(J) Kode Sapi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Bali	Madura	-1.00275	.68347	.154	-2.40512	.39962
	PO	4.73875(*)	.68347	.000	3.33638	6.14112
Madura	Bali	1.00275	.68347	.154	-.39962	2.40512
	PO	5.74150(*)	.68347	.000	4.33913	7.14387
PO	Bali	-4.7388(*)	.68347	.000	-6.14112	3.33638
	Madura	-5.7415(*)	.68347	.000	-7.14387	4.33913

* The mean difference is significant at the .05 level.

MANOVA
MHC I Rantai beta

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	259	2	129	.120	.887
Within Groups	29.118	27	1.078		
Total	29.377	29			

Multiple Comparisons
Dependent Variable: MHC I Rantai beta
LSD

(I) Kode Sapi	(J) Kode Sapi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Bali	Madura	.20840	.46442	.657	-.74451	1.16131
	PO	.18340	.46442	.696	-.76951	1.13631
Madura	Bali	-.20840	.46442	.657	-1.16131	.74451
	PO	-2.50E-02	.46442	.957	-.97791	.92791
PO	Bali	-.18340	.46442	.696	-1.13631	.76951
	Madura	2.500E-02	.46442	.957	-.92791	.97791

* The mean difference is significant at the .05 level

Oneway
MANOVA
MHC II Rantai alfa

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25.008	2	12.504	.699	.506
Within Groups	482.980	27	17.888		
Total	507.988	29			

Multiple Comparisons
Dependent Variable: MHC II Rantai alfa
LSD

(I) Kode Sapi	(J) Kode Sapi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Bali	Madura	2.07570	1.89146	.282	-1.80526	5.95666
	PO	.31690	1.89146	.868	-3.56406	4.19786
Madura	Bali	-2.07570	1.89146	.282	-5.95666	1.80526
	PO	-1.75880	1.89146	.361	-5.63976	2.12216
PO	Bali	-.31690	1.89146	.868	-4.19786	3.56406
	Madura	1.75880	1.89146	.361	-2.12216	5.63976

MANOVA
MHC II Rantai beta

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	51.924	2	25.962	26.289	.000
Within Groups	26.664	27	.988		
Total	78.587	29			

Multiple Comparisons
Dependent Variable: MHC II Rantai beta
LSD

(I) Kode Sapi	(J) Kode Sapi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Bali	Madura	2.10550(*)	.44442	.000	1.19363	3.01737
	PO	-1.06000(*)	.44442	.024	-1.97187	-.14813
Madura	Bali	-2.10550(*)	.44442	.000	-3.01737	-1.19363
	PO	-3.16550(*)	.44442	.000	-4.07737	-2.25363
PO	Bali	1.06000(*)	.44442	.024	.14813	1.97187
	Madura	3.16550(*)	.44442	.000	2.25363	4.07737

* The mean difference is significant at the .05 level.