

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Bahan pangan asal ternak seperti telur, daging dan susu merupakan bagian bahan pangan yang penting untuk memenuhi konsumsi protein khususnya protein hewani yang dibutuhkan oleh masyarakat. Sejalan dengan kebijakan pemerintah dalam memenuhi swasembada daging pada tahun 2015, maka pemerintah dan peternak terus berupaya untuk mengoptimalkan produktivitas ternak guna mencukupi kebutuhan protein hewani bagi masyarakat.

Beberapa faktor yang dapat meningkatkan produktivitas ternak perlu mendapat perhatian baik oleh pemerintah maupun peternak sendiri adalah masalah kesehatan ternak, pengendalian dan pemberantasan penyakit ternak. Pengendalian merupakan suatu usaha yang terorganisir di daerah atau pusat untuk mengurangi kejadian atau kerugian suatu penyakit sampai pada tingkat terkendali yaitu tidak mempunyai dampak serius terhadap kesehatan hewan dan masyarakat, sedangkan pemberantasan adalah suatu usaha yang terorganisir untuk menghilangkan atau mengeliminasi suatu penyakit pada suatu daerah tertentu sampai tidak terjadi lagi penyakit tersebut (Bahri dan Martindah, 2010).

Sejak tahun 1977 pemerintah telah mengeluarkan Peraturan Pemerintah yaitu PP Nomor 15/1977 tentang Penolakan, Pencegahan, Pemberantasan dan Pengobatan Penyakit Hewan. Kebijakan dalam program pengendalian dan pemberantasan penyakit hewan menular dilakukan secara bertahap berdasarkan prioritas terhadap penyakit hewan strategis, yaitu penyakit hewan yang

berdampak kerugian tinggi karena bersifat menular, menyebar dengan cepat sehingga angka morbiditas dan mortalitasnya tinggi, atau berpotensi mengancam kesehatan masyarakat. Program pengendalian dan pemberantasan Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS) telah dilakukan dan terus diupayakan oleh pemerintah. Berdasarkan Peraturan Direktur Jendral Peternakan No. 59/Kpts/PD.610/05/2007 telah menetapkan terdapat 11 PHMS secara nasional diantaranya penyakit Brucellosis yang ditetapkan pada skala prioritas urutan ketiga (Ditkeswan, 2012).

Brucellosis pada hewan disebut Bang's Disease atau Penyakit Keluron Menular disebabkan oleh bakteri yang tergolong genus *Brucella*, bersifat fakultatif intraselular sehingga pengobatan pada hewan yang terserang Brucellosis tidak efektif (Quinn *et al.*, 2002, Ko and Spliter, 2003). Sedangkan pada manusia disebut Undulant Fever atau Malta Fever atau Demam Malta (OIE, 2009). Terdapat beberapa spesies *Brucella* dengan host alamiah yang berbeda seperti *Brucella abortus* (*B. abortus*) pada sapi, *B. melitensis* pada kambing dan *B. suis* pada babi yang bersifat zoonosis.

Brucellosis merupakan salah satu penyakit penting pada dunia peternakan, karena Brucellosis dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat besar berupa abortus (keguguran) pada hewan yang sedang bunting (*gravid*), penurunan produksi susu, bahkan dapat mengakibatkan gangguan reproduksi (infertilitas) baik yang bersifat temporer maupun permanen (Noor, 2006). Menurut Hidayat (2010) Brucellosis di Indonesia menyebabkan kerugian ekonomi sebesar Rp. 385 miliar per tahun karena adanya keguguran, kematian pedet, sterilitas, infertilitas dan penurunan produksi susu.

Penyakit Brucellosis ditemukan hampir di seluruh dunia seperti Eropa, Jepang, Australia dan New Zealand (OIE, 2009) dengan prevalensi kejadian antara 0,85 – 23,3 %, di Pakistan 5,05% dan Mesir 10,0% (Asif *et al.*, 2009). Shahaza *et al.* (2009) juga melaporkan bahwa di Malaysia telah ditemukan sebanyak 476 kasus Brucellosis pada kambing, sedangkan di Indonesia hampir semua daerah atau provinsi tertular Brucellosis kecuali Bali dan Lombok (BBalitvet, 2010). Di Indonesia, Brucellosis dikenal pertama kali pada tahun 1935 secara serologis ditemukan pada sapi di daerah Grati, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur ( Putra, 2001), sedangkan sampai saat ini telah menyebar di 26 propinsi yang secara ekonomi dan sosial menimbulkan kerugian yang besar. Di Jawa Timur, kasus penyakit brucellosis pada sapi perah pertama kali ditemukan di Kecamatan Pujon (KUD SAE) Kabupaten Malang.

Kejadian Brucellosis cenderung semakin meningkat baik dari segi jumlah (tingkat prevalensi) maupun dalam penyebarannya (distribusi). Hal ini terjadi karena adanya mutasi (perpindahan) ternak dari satu daerah ke daerah lainnya, sehingga pada akhirnya dapat menjadi ancaman yang merugikan bagi perkembangan dibidang peternakan khususnya sapi perah (Dispet Jatim, 2009). Pemerintah telah dan terus berupaya untuk membebaskan semua wilayah dari penyakit Brucellosis meskipun pelaksanaannya secara bertahap.

Samkhan dkk. (2010) melaporkan kejadian Brucellosis di Jawa Timur masih menunjukkan angka prevalensi  $> 2\%$  dan secara random kejadiannya pada sapi ditemukan di wilayah Blitar, Kediri, Tulungagung, Malang, Pasuruan dan Jember. Sedangkan menurut Ratnasari (2013) prevalensi tinggi Brucellosis dilaporkan terjadi di Provinsi Nusa Tenggara Timur dan Sulawesi Selatan, selain

itu penyakit Brucellosis menyerang hewan yang ada disekitarnya dan dapat menyebar dengan cepat ke berbagai tempat di Indonesia

Pulau Jawa sebagai sentra sapi perah dengan populasi mencapai 98% dari populasi nasional masih menghadapi masalah serius terhadap kasus brucellosis, yaitu dengan angka prevalensi sebesar 2,07% dan faktor yang paling bermakna karena adanya ternak baru yang dimasukkan ke peternakan berasal dari Kabupaten/Kota yang dinyatakan daerah endemis sehingga untuk program pemberantasan menerapkan program *test and slaughter* dan vaksinasi (Samkhan dkk., 2012). Angka prevalensi tersebut salah satunya disebabkan pemakaian vaksin *Brucella abortus* S19 yang selama ini digunakan belum mencapai hasil yang optimal dalam upaya penanggulangan kasus Brucellosis pada sapi perah (Noor, 2006), diduga tingkat proteksi vaksin yang digunakan masih jauh dari harapan yaitu hanya sekitar 65 – 70%. Hal tersebut juga didasarkan dari hasil evaluasi di lapangan, menunjukkan bahwa masih banyak ditemukan adanya kasus Brucellosis yang sangat tinggi pada peternakan sapi perah di Indonesia.

Belum optimalnya hasil vaksinasi diduga disebabkan oleh beberapa hal: pertama, vaksin *Brucella abortus* S19 yang digunakan sekarang adalah vaksin yang berasal dari bakteri *Brucella abortus* S19 yang dilemahkan sehingga diduga kurang mempunyai kemampuan dalam menginduksi respon imun atau bersifat kurang imunogenik; kedua karena strain tersebut bukan strain lokal yang berasal dari Indonesia, sehingga ada dugaan penggunaannya menjadi kurang optimal di Indonesia karena strain yang menyerang ternak berbeda dengan strain yang digunakan untuk pembuatan vaksin tersebut. Hal ini sesuai pendapat Salehi *et al.* (2006) dan Munir *et al.* (2010) bahwa profil protein penyusun *B. abortus* dari

strain yang berbeda menunjukkan gambaran ekspresi protein yang berbeda pula sehingga memberikan respon imun yang berbeda.

*Brucella* mampu menghambat efek bakterisidal sehingga penggunaan antibiotika tidak efektif untuk pengobatan (Canning *et al.*, 1986), oleh karena itu penanggulangan Brucellosis pada sapi perah di Indonesia selama ini dilakukan dengan vaksinasi dan atau *test and slaughter* (Noor, 2006). Namun karena pelaksanaan *test and slaughter* membutuhkan biaya yang sangat tinggi maka pengendalian terutama dilakukan melalui program vaksinasi. Seperti pendapat Samkhan dkk., (2012) bahwa dana kompensasi daerah perlu dihidup kembangkan lagi, agar ternak-ternak yang positif reaktor Brucellosis segera dapat dilakukan eliminasi dengan dipotong bersyarat, supaya tidak menyisakan kasus positif (reaktor positif) disuatu lokasi serta diperlukan pengadaan vaksinasi brucellosis terutama pada kantong-kantong ternak sapi perah.

Menurut Brionis *et al.* (2001) vaksinasi merupakan cara yang penting dalam mengontrol Brucellosis pada sapi. Tujuan pemberian vaksinasi adalah untuk menimbulkan respon imun, baik respon *innate* maupun *adaptive* sehingga didapatkan imunitas berupa pencegahan terhadap infeksi *Brucella abortus*. Sedangkan menurut Quinn *et al.* (2002), Brucellosis merupakan suatu penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri genus *Brucella*, Gram negatif yang bersifat fakultatif intraseluler yaitu bakteri yang mampu hidup dan berkembang biak dalam sel fagosit. *Brucella* dapat ditemukan tetap hidup di dalam sel makrofag dan sel lain yang terinfeksi seperti sel trophoblast karena *Brucella* tidak dapat dinetralisir oleh antibodi sehingga untuk melawan bakteri *Brucella* juga diperlukan imunitas seluler (Cha *et al.*, 2008). Sebagai organisme intraseluler,

untuk melawan infeksi *B. abortus* membutuhkan *Cell-mediated immunity* (CMI) yang terdiri dari sel TCD4+, sel T CD8+ dan sel makrofag yang teraktifasi (Oliveira *et. al.*, 2006).

Menurut Takeda *and* Akira (2005), bakteri *Brucella* mempunyai beberapa karakteristik sebagai *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) yang terdiri dari Lipopolysakarida (LPS), DNA dan lipoprotein berupa outer membran protein (OMP). LPS bersama dengan CD14 dan MD-2 dapat dikenali oleh reseptor TLR-4, sedangkan OMP dapat dikenali oleh TLR-2, yang kemudian memicu terbentuknya efektor TIRAP dan MyD88. Lebih lanjut MyD88 mengaktifasi IL-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK), selanjutnya bersama-sama TRAF6 akan mengaktifasi JNK dan NF- $\kappa$ B. Aktifasi dari JNK dan NF- $\kappa$ B inilah yang pada akhirnya berperan dalam proses inflamasi (Oliveira *et al.*, 2010). Selain itu tubuh juga merespon terhadap masuknya bakteri dengan membentuk respon imun yang diawali dengan respon imun *innate* (non spesifik) dan diikuti respon imun *adaptive* (spesifik).

Pada respon imun *innate*, Natural Killer (NK) dan makrofag berfungsi sebagai sel fagosit, selain itu makrofag dapat mempresentasikan antigen bersama dengan molekul MHC II sehingga antigen dikenali oleh sel T. Sel makrofag yang aktif akan melepas *cytokine pro inflammatory* yaitu Interleukin 12 (IL-12) dan memicu proliferasi sel T menjadi sel Th atau sel T CD4+ (Billard *et al.*, 2007). Sel TCD4+ merupakan sel limfosit T yang berperan sebagai pusat regulasi imunitas mensekresi IFN- $\gamma$  yang berfungsi mengaktifasi sel makrofag lain untuk meningkatkan proses fagositosis ("*macrophage activated*"). Selain itu IFN- $\gamma$  akan mengaktifkan sel limfosit B menjadi sel plasma yang berperan dalam

imunitas humoral dengan menghasilkan immunoglobulin /antibodi antara lain IgG yang berfungsi netralisasi dan opsonisasi antigen (Fernandes *et al.*, 1995; Abbas *et al.*, 2007). Sel TCD4<sup>+</sup> menghasilkan sitokin yang dapat memicu proliferasi sel TCD8<sup>+</sup> atau sel T sitolitik yang berperan dalam membunuh bakteri intraseluler atau melisis sel yang terinfeksi (“*intracellular killing*”) dengan menghasilkan suatu protein yang disebut perforin dan suatu enzim yang disebut sebagai granzyme (Owen *et al.*, 2013).

Dinding sel *Brucella* terdiri dari peptidoglikan dan protein membran luar (OMP) yang setiap komponen tersebut mempunyai fungsi yang berbeda dalam menimbulkan respon imun pada host (Verstrete *et al.*, 1982). Protein dinding sel *Brucella* bersifat antigenik dan antibodi yang dihasilkan sangat bervariasi tergantung dari sifat antigenitas setiap fraksi protein dinding sel bakteri tersebut (Agus Sudibyo dkk., 1996). Protein dapat memberikan respon imun lebih baik dibandingkan *whole* bakteri, diduga karena protein yang merupakan fragmen dapat dikenali secara langsung oleh reseptor yaitu TLR2 sehingga dapat mengaktifkan respon imun yang lebih baik dibandingkan dengan *whole* bakteri.

Menurut Mariyon and Goni (1998) dan Salhi *et al.*, (2003) protein membran luar yang diekstraksi secara kimiawi dari *Brucella* telah dideteksi dan diklasifikasikan menjadi tiga grup dengan berat molekul berkisar dari 88 sampai 94 kDa (grup I), 36 sampai 38 kDa (grup II), 31 sampai 34 dan 25 sampai 27 kDa (grup III), dan OMP dengan berat molekul 25 dan 31 kDa merupakan epitope permukaan (*antigenic determinant*) imunogenik dan protektif. Menurut Cloeckert *et al.*, (1999) OMP *B. abortus* dengan berat molekul antara 25 sampai 27 kDa, 31 sampai 34 kDa dan 36 sampai 38 kDa merupakan protein yang

imunogenik pada ternak sapi dan domba. Sedangkan Cloeckaert *et al.*, (2002) dan Salehi *et al.*, (2003) melaporkan bahwa gen yang menyandi OMP 36 sampai 38 kDa adalah *Omp 2a* dan *Omp 2b*, sedangkan gen *Omp 25* menyandi OMP 25 sampai 27 kDa dan *Omp 31* menyandi OMP 31 sampai 34 kDa.

*Brucella abortus* isolat lokal mempunyai faktor virulensi berupa lipopolisakarida (LPS) dan *outer membrane protein* (OMP). OMP merupakan antigen potensial dan bersifat imunogenik yang dapat menginduksi respon imun (Macedo *et al.*, 2011). Srivastava (1998) dalam Shomshekar *et al.*, (2014) juga melaporkan bahwa OMP *Pasteurella multocida* bersifat imunogenik dan protektif pada kerbau, sapi dan kelinci. OMP pada bakteri Gram negatif bersifat imunogenik karena mampu menginduksi respon imun sehingga dapat digunakan sebagai komponen pengembangan vaksin subunit (Shomshekar *et al.*, 2014).

OMP bakteri *Brucella abortus* merupakan salah satu antigen potensial yang dapat secara langsung menginduksi respon imun spesifik humoral yaitu sel limfosit B sehingga lebih cepat memacu terbentuknya antibodi (Jawetz *et al.*, 2001; Forestier *et al.*, 2005). Menurut Cha *et al.*, (2010) hasil vaksinasi menggunakan OMP memberikan imunitas yang lebih baik dibandingkan dengan menggunakan *whole* bakteri, tetapi bagaimana mekanisme khususnya yang berasal dari isolat lokal dalam memberikan imunitas yang lebih baik dibandingkan *whole* bakteri masih belum terungkap dengan jelas.

. Penggunaan bakteri yang berasal dari isolat lokal saat ini mendapat perhatian untuk pengembangan vaksin karena isolat lokal mempunyai beberapa keunggulan, antara lain (1) sifat antigenisitas dan spesifitas yang tinggi karena sesuai dengan bakteri *Brucella abortus* penyebab kasus Brucellosis yang

menyerang ternak di Indonesia, (2) profil protein *Brucella abortus* isolat lokal memberikan gambaran ekspresi peptida sebagai epitop yang berbeda sehingga menghasilkan respon imun yang berbeda pula. OMP 36 kDa *Brucella abortus* isolat lokal mempunyai sifat sebagai bahan yang imunogenik dan protektif seperti yang dilaporkan oleh Handijatno dan Tyasningsih (2014) bahwa OMP *Brucella abortus* isolat lokal yang mempunyai reaktivitas tinggi adalah OMP dengan berat molekul 36 kDa ( OMP 36 kDa ).

Sri Winarni dkk. (2012) melaporkan bahwa *Salmonella typhi* mempunyai OMP dengan berat molekul 36 kDa yang dikenal sebagai AdhO36 karena bersifat sebagai adhesin. AdhO36 merupakan protein OMP yang potensial untuk pengembangan vaksin terhadap demam typhoid. Menurut Cut Muthiadin dkk. (2015) dalam Sri Winarni (2007) protein OMP AdhO36 juga mempunyai protektivitas yang tinggi karena dapat menstimulasi respon imun seluler. Selain itu Suswati dan Mufida (2010) juga melaporkan bahwa OMP 35 kDa pada *Proteus mirabilis* merupakan protein OMP yang bersifat antigenik dan berfungsi sebagai protein adhesin.

Berdasarkan latar belakang di atas maka perlu dilakukan penelitian tentang penggunaan OMP 36 kDa *Brucella abortus* isolat lokal sebagai kandidat vaksin Brucellosis, diduga dapat melalui aktifitas respon imun yang lebih baik berupa sel TCD4+, sel TCD8+ dan Ig G yang lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan vaksin *whole* bakteri *Brucella abortus* strain 19 sehingga tujuan pencegahan terhadap penyakit Brucellosis di Indonesia dapat dihasilkan secara optimal.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka timbul permasalahan sbb :

1. Bagaimana karakter biokimiawi *Brucella abortus* S19 dan *Brucella abortus* isolat lokal?
2. Bagaimana karakter genotipik OMP 36 kDa *Brucella abortus* S19 dan *Brucella abortus* isolat lokal berdasarkan metode PCR dan hasil sequencingnya?
3. Bagaimana urutan asam amino yang diprediksi sebagai epitop dalam OMP-36 kDa baik pada *Brucella abortus* S19 dengan *Brucella abortus* isolat lokal berdasarkan uji in silico hasil sequencing gen *Omp2*?
4. Apakah ada perbedaan respon imun seluler dan respon imun humoral pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar antara yang divaksinasi *whole B. abortus* S19, OMP-36 kDa *Brucella abortus* S19 dengan OMP-36 kDa *Brucella abortus* isolat lokal?
5. Apakah ada perbedaan respon imun seluler dan humoral pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar antara yang divaksinasi *whole B. abortus* S19, OMP-36 kDa *B. abortus* S19 dengan *B. abortus* isolat lokal setelah ditantang dengan bakteri *Brucella abortus* isolat lokal?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Menjelaskan karakter isolat *B. abortus* S19 dan *B. abortus* isolat lokal, prediksi epitop pada masing-masing OMP 36 kDa, serta respon imun seluler dan humoral yang dihasilkan.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mendapat data karakter biokimiawi bakteri *Brucella abortus* S19 dan *Brucella abortus* isolat lokal.
2. Mendapat data karakter genotipik OMP 36 kDa *Brucella abortus* S19 dan *Brucella abortus* isolat lokal.
3. Mengetahui urutan asam amino yang diprediksi sebagai epitop dalam OMP-36 kDa baik pada *B. abortus* S19 dan *B. abortus* isolat lokal berdasarkan uji *in silico* hasil sequencing gen *Omp2*.
4. Mengetahui respon imun seluler dan humoral pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang diimunisasi dengan *whole B. abortus* S19, OMP-36 kDa *B. abortus* S19 dan OMP-36 kDa *B. abortus* S19 dan *B. abortus* isolat lokal.
5. Mengetahui respon imun seluler dan humoral pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang diimunisasi dengan *whole B. abortus* S19, OMP-36 kDa *B. abortus* S19 dan OMP-36 kDa *B. abortus* isolat lokal setelah ditantang dengan bakteri *B. abortus* isolat lokal.

## 1.4. Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Teoritis

Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberi informasi sbb :

1. Memberikan informasi ilmiah terbaru dan original prediksi epitop pada OMP 36 kDa baik pada *B. abortus* S19 dan *B. abortus* isolat lokal berdasarkan uji in silico hasil sequencing gen *Omp2*.
2. Memberikan informasi ilmiah terbaru dan original bagaimana profil respon imun seluler dan humoral penggunaan kandidat vaksin subunit berupa OMP 36 kDa *B. abortus* S19 dan *B. abortus* isolat lokal.

### 1.4.2 Manfaat praktis

Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat bagi masyarakat dan pemerintah dalam rangka melengkapi pengendalian penyakit brucellosis pada ternak sapi perah sehingga kerugian ekonomi peternak dapat ditekan.

Secara lebih rinci diuraikan manfaat praktis dari penelitian ini adalah :

1. Menunjukkan penggunaan kandidat vaksin OMP 36 kDa *Brucella abortus* isolat lokal memberikan hasil respon imun lebih baik daripada *whole Brucella abortus* S19.
2. Menunjukkan manfaat bagi ilmu pengetahuan di bidang Veteriner khususnya Bakteriologi Veteriner bahwa OMP 36 kDa *Brucella abortus* isolat lokal dapat digunakan sebagai *seed* vaksin pada penyakit Brucellosis pada ternak.