

PROFILE PROTEIN *Brucella abortus* LOCAL ISOLATE WITH SDS PAGE METHOD

Desty Apritya¹, Didik Handijatno², Ratih Ratnasari²

¹ Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

² Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

ABSTRACT

The aim of this research was to find out the profile protein *Brucella abortus* local isolate. The samples bacteria were obtained from Balai Besar Veteriner Maros, South Sulawesi.

Whole protein was obtained from *Brucella abortus* local isolate by ultrasonic homogenizer. The protein profile was analyzed by Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) with 4% stacking gel, 12% separating gel and standard of molecular weight was 10 – 200 kDa.

The results of this research showed that the profile protein had seven fractions there were 112 kDa, 72 kDa, 54 kDa, 46 kDa, 41 kDa, 31 kDa and 20 kDa.

Keyword : Protein, *Brucella abortus* local isolate, SDS - PAGE

Pendahuluan

Brucellosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme yang termasuk dalam genus *Brucella*. Brucellosis disebabkan oleh *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *Brucella neotomae*, *Brucella canis*, *Brucella ovis*. Infeksi oleh *B. suis* dan *B. melitensis* jarang sekali menunjukkan gejala klinis, serta identifikasi secara serologis selalu mengarah ke infeksi *B. abortus* (Neta dkk.,2009). Berdasarkan sistem pengklasifikasian biovar, *B. abortus* dikelompokkan menjadi biovar 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 9 (Nicoletti, 1980; Alton dkk.,2002).

Di Indonesia kecenderungan meningkatnya populasi dan lebih seringnya mutasi sapi perah menjadi penyebab utama meningkatnya kasus Brucellosis. Pada daerah yang mempunyai populasi sapi padat, cenderung mempercepat penularan penyakit. Penularan Brucellosis dapat terjadi melalui makanan yang tercemar oleh kotoran yang positif Brucellosis, penetrasi pada luka abrasi, pernafasan dan *transplasental*. Bakteri tersebut dapat menginfeksi *glandula mammae* dan terdapat dalam *nodus limfaticus* sampai beberapa tahun. *Brucella* dapat ditemukan pada air susu dalam beberapa tahun. Pada sapi jantan, bakteri tersebut menginfeksi vesikula seminalis, ampula, testis dan epididimis (Meles, 2007 dan Quinn *et al.*,2002)

Untuk mencegah penyebaran penyakit ini maka sangatlah penting adanya kerjasama antara pemerintah dengan instansi terkait salah satunya adalah dengan karantina hewan. Pengawasan dapat dilakukan dengan membuat peraturan yang melarang penjualan sapi yang positif, pemotongan sapi yang sudah kronis, sanitasi kandang dan vaksinasi sapi (Meles,2007).

Beberapa vaksin yang masih digunakan di Indonesia adalah vaksin *B. abortus* S19 dan vaksin RB 51. Kelemahan dari penggunaan vaksin *B. abortus* S19 antara lain dapat menimbulkan antibodi yang persisten, sehingga sulit dibedakan antara sapi yang telah divaksinasi dengan sapi yang terinfeksi secara alami, pada sapi betina bunting dapat menyebabkan abortus dan pemberian pada pejantan dapat menimbulkan orchitis. Berbeda dengan vaksin *B. abortus* RB51, penggunaan vaksin RB 51 diketahui tidak menimbulkan gejala klinis pasca vaksinasi, namun vaksin ini juga menggunakan *B.*

abortus aktif yang berisi kuman utuh dan berasal dari isolat luar negeri, yang belum tentu sesuai dengan isolat lokal milik Indonesia (Siadat *et al*, 2012).

Dilihat dari kelemahan vaksin *Brucella* tersebut sehingga perlu pengembangan vaksin yang lebih efektif dan aman untuk pengendalian penyakit pada hewan dan manusia. Misalnya menggunakan vaksin sub unit yang berisi protein tertentu yang memiliki sifat antigenitas dan imunogenitas yang baik, sehingga sapi dapat terlindungi dari penyakit dan aman dari efek samping pasca vaksinasi.

Pada penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan untuk menciptakan vaksin subunit *Brucellosis*. Protein dari *B. abortus* isolat lokal yang berasal dari Indonesia diteliti antigenitasnya. Diharapkan dengan penggunaan vaksin sub unit tersebut dapat memberikan protektifitas yang baik pada ternak yang ada di wilayah Indonesia.

Metode Penelitian

Isolasi *B. abortus*

Kuman *B. abortus* dibiakkan pada *Brucella Agar Media* (BAM), dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam.. Pada penelitian ini dipilih media *Brucella Agar* karena biasa digunakan untuk pembiakan *B. abortus* dan spesifik untuk pertumbuhan kuman tersebut.

Identifikasi *B. abortus*

Identifikasi *B. abortus* dilakukan dengan pemeriksaan secara mikroskopik dengan pewarnaan gram, uji urease, simon sitrat, dan *Sulfid Indol Motility* (SIM). Pewarnaan gram dilakukan dengan menggunakan objek gelas yang diberi setetes aquades yang kemudian dicampur dengan koloni kuman menggunakan ose tumpul. Objek gelas dipanaskan diatas bunsen, agar kuman melekat pada objek gelas. Kemudian, ditetaskan kristal violet pada objek glass, tunggu selama 2 menit, selanjutnya cairan dibuang dan dicuci dengan air mengalir. Berikutnya ditetaskan lugol, alcohol acetone dan safranin berurutan kemudian dicuci dengan air mengalir. Setelah itu periksa menggunakan mikroskop perbesaran 1000x.

Pada uji urease, simon sitrat dan SIM masing-masing media ditanamkan koloni *B. abortus* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari. .

Prosedur Pembuatan Whole Protein *B. abortus*

Untuk mendapatkan protein dari *B. abortus* dilakukan sonikasi suspensi kuman dengan alat ultrasonic homogenizer dengan kecepatan 40 kHz, suhu 4°C selama 1 menit dengan istirahat 15 detik sebanyak 10 kali. Setelah itu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 10.000 rpm, endapan yang didapat kemudian dilakukan SDS-Page untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul.

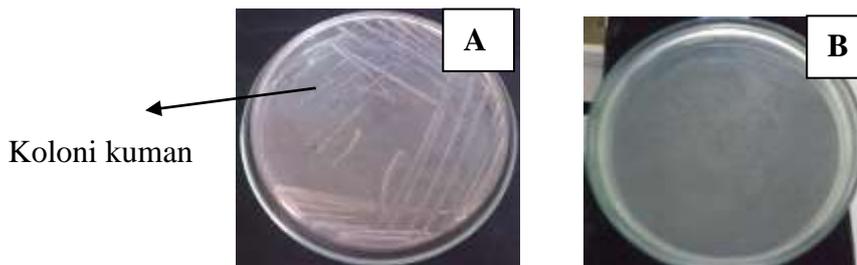
Analisis Profil Protein dengan SDS - PAGE

Protein tersebut kemudian dianalisis dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan komposisi *separating gel* 12% dan *stacking gel* 4%. Setelah larutan *separating gel* 12% dimasukkan dalam gel *plate* pada posisi vertikal kemudian di atasnya diberi aquadest sampai mengeras, agar permukaan gel menjadi lurus, kemudian aquadest dibuang. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* 4 % dan setelah itu dimasukkan *comb* dan ditunggu sampai kering. *Plate* berisi gel kemudian dipasang pada Biorad dan dituangkan electrophoresis buffer. Sebanyak 10 µg sampel berupa *B. abortus* yang telah disonikasi ditambah *Laemmli buffer* sama banyak. Kemudian sampel didenaturasi pada pemanasan 100°C selama 7 menit, kemudian dimasukkan ke dalam sumuran *stacking gel*. Sebagai marker digunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 10-200 kDa produksi *Intron™*. Electrophoresis dinyalakan dengan tegangan 100 V dan kuat arus 20 mA selama 100 menit.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi dan Identifikasi *B.abortus*

Penanaman *B. abortus* pada BAM memberikan gambaran makroskopik tampak pada gambar 1.1 berupa bentukan koloni yang kecil, halus dengan tepi rata, bulat dan berwarna krem sesuai dengan pernyataan Sulaiman (2006).



Gambar 1.1 Hasil Penanaman pada Media *Brucella* Agar. A, media yang sudah ditumbuhi bakteri ; B, media yang belum ditumbuhi bakteri.

B. Abortus strain virulen pada BAM memiliki karakteristik berwarna putih madu, *translucent*, bertepi halus dan bersifat lembab. Sedangkan penanaman pada media *Tryptic Soy Broth* menunjukkan kekeruhan yang homogen.

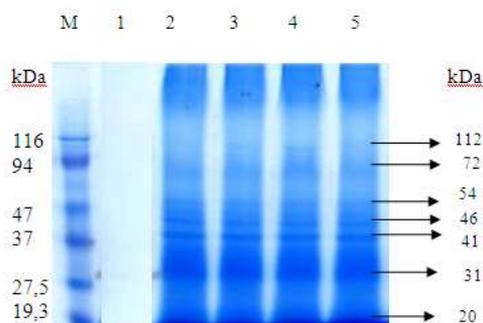
Menurut Quinn *et al* (2002) bahwa pada pemeriksaan mikroskopik dengan pewarnaan Gram negatif menunjukkan bahwa *B. abortus* berbentuk *cocco bacillus*, berwarna merah. Hal ini membuktikan bahwa *B. abortus* tidak tahan terhadap alkohol, karena susunan kimia dinding sel bakteri yang tipis sehingga mampu dirusak dan memudahkan *safranin* menembus dinding sel sehingga memberikan warna merah pada sitoplasma. Sesuai dengan pendapat Volks (1993) bahwa organisme yang tidak dapat menahan zat pewarna setelah dicuci dengan alkohol 95% disebut Gram negatif. Karena terjadi penyingkiran zat lipida dinding sel dengan pencucian alkohol memungkinkan kompleks zat pewarna yodium dapat disingkirkan dari sel.

Penanaman *B. abortus* pada media urea agar menunjukkan reaksi positif (Soebronto, 2003). Hal tersebut nampak pada perubahan warna yang dihasilkan menjadi merah muda. Hal ini membuktikan bahwa *B. abortus* menghasilkan enzim urease sehingga mampu menguraikan urea yang terdapat dalam media.

Alton *et al* (1988) menyatakan bahwa pada pemeriksaan uji *simmons citrate* menunjukkan reaksi negatif yang dibuktikan dengan tidak merubah warna media sehingga tetap berwarna hijau. Hal ini membuktikan bahwa *B. abortus* tidak memanfaatkan natrium citrat sebagai sumber karbon untuk keperluan hidupnya.

Uji SIM menunjukkan hasil bahwa koloni *B. abortus* yang di-streak secara injeksi atau tusuk vertikal menunjukkan hasil bahwa kuman *B. abortus* tidak bergerak yang ditandai dengan tidak terbentuknya gambaran koloni bakteri yang menyebar. Hal ini menunjukkan bahwa kuman tersebut tidak memiliki flagela. Pada penambahan reagen *kovac* menunjukkan bahwa kuman tidak mampu membentuk indol dari *tryptophan*, sehingga tidak ditemukan bentukan cincin merah pada lapisan atas media (Alton *et al*, 1988).

Analisis Profil Protein *B.abortus* Isolat Lokal dengan SDS-PAGE



Gambar 1.2 Hasil Analisis Protein *B.abortus* isolat lokal menggunakan Teknik SDS Page, dengan pewarnaan *coommassie brillian blue* M, marker; kolom 1, kontrol negatif; 2-5, Protein *B.abortus* isolat lokal.

Hasil analisis profil protein *B.abortus* isolat lokal dengan teknik SDS-PAGE menunjukkan adanya 7 macam pita protein, yaitu 112 kDa, 72 kDa, 54 kDa, 46 kDa, 41 kDa, 31 kDa dan 20 kDa.

Hasil protein yang didapatkan dari penelitian ini tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian Sudibyo dkk, 1995 yaitu 17 kDa, 22 kDa, 23 kDa, 28 kDa, 33 kDa, 36 kDa, 43 kDa, 58 kDa, 65 kDa, 71 kDa, 84 kDa, dan 94 kDa. Hanya saja pada penelitian ini protein dengan berat molekul rendah yaitu dibawah 20 kDa tidak terdeteksi. Karena protein dalam penelitian ini adalah *whole* protein, maka berat molekul protein yang didapatkan relatif lebih berat.

Sedangkan hasil analisis profil protein *B. abortus* S-19 menurut Syamsudin (2008) adalah 55,3 kDa, 44,5 kDa, 38,2 kDa, 30,5 kDa, 24,4 kDa, 21,9kDa, 20,3 kDa dan 14,7 kDa. Hasil protein yang didapatkan terdapat beberapa persamaan dan perbedaan. Protein dengan berat molekul 55,3 kDa, 30,5 kDa, dan 20,3 kDa menunjukkan berat molekul yang hampir sama dengan protein dari *B. abortus*

isolat lokal, sedangkan perbedaannya protein dengan berat molekul 112 kDa dan 72 kDa tidak terdapat dalam *B. abortus* S-19.

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap hasil *running* SDS-PAGE menunjukkan bahwa keberhasilan *running* tersebut dipengaruhi beberapa hal antara lain kebersihan isolat, tingkat kemurnian isolat dan kadar protein dalam homogenat. Keberhasilan isolat mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada gel, pita terlihat tajam dengan gel terang, sehingga memudahkan analisis protein dan dokumentasi. Isolat yang murni dan kadar protein homogenat yang bagus akan menghasilkan pita protein yang baik dan jelas sehingga dapat memudahkan analisis berat molekul pada pita yang terbentuk.

Pada penelitian ini, protein dengan berat molekul 31 kDa sangat mencolok dibandingkan pita yang lain. Tebal tipisnya pita protein yang tampak pada gel merupakan gambaran ekspresi suatu protein oleh gen penyandi protein tersebut, semakin tebal pita protein yang terlihat semakin banyak ekspresi protein oleh sel penyandi (Lastuti dkk, 2001).

Kesimpulan

Berdasarkan atas data hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan, profil protein *Brucella abortus* isolat lokal dengan metode SDS PAGE didapatkan 7 macam pita protein yaitu, 112 kDa, 72 kDa, 54 kDa, 46 kDa, 41 kDa, 31 kDa dan 20 kDa.

Daftar Pustaka

- Alton, G.G., L.M. Jones, R.D. Angus, and J.M Veyer. 2002. Technique for the Brucellosis Laboratory. Institute Nasional de la Recherche, Agronomique. Paris
- Meles, W. 2007. Penyakit Sapi Perah Disebabkan Faktor Makanan. Laboratorium Kebidanan. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
- Neta, A.V.C., Mol, J.P.S., Xavier, M.N., Paixao, T.A., Lage, A.P., dan Santos, R.L. 2009. Pathogenesis of Bovine Brucellosis. *The Vet. Journal* 184: 146–155.
- Nicoletti, P. 1980. The Epidemiology of Bovine Brucellosis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. Vol : 24, Hal : 69–95.

- Quinn, P.J, B.K. Markey, M.E. Carter, W.L. Donnely and F.C. Leonard. 2002. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing. Hal 163 – 167.
- Siadat, S,D, Salmani,A,S. Aghasadeghi, M,R. 2012. Brucellosis Vaccines: An Overview, Zoonosis, ISBN: 978-953-51-0479-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/zoonosis/brucellosis-vaccines>.
- Soebronto. 2003. Ilmu Penyakit Ternak I. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 464, 465, 474, 475, 483, 484
- Sulaiman, I. 2006. Bovine Brucellosis (Bakteriologi - Isolasi dan Identifikasi). Dalam Pedoman Diagnosa Laboratorium Brucellosis Sapi – BBVet Wates. Hal : 1 – 11.