

Penelitian

Determinan Antigen Gen *omp2a* *Brucella abortus* Isolat Lokal

(Antigenic Derterminants *Omp2a* gene of *B. abortus* Local Isolate)

Ratih Ratnasari*, Didik Handijatno, Suwarno, Fedik Abdul Rantam

Departemen Mikrobiologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Kampus C Universitas Airlangga. Jl. Mulyorejo, Surabaya. 60115.

*Penulis untuk korespondensi: ratih_fkh@yahoo.co.id

Diterima 20 September 2013, Disetujui 8 Oktober 2013

ABSTRAK

Penyakit Brucellosis pada sapi disebabkan oleh *Brucella abortus* dan dikenal sebagai penyakit reproduksi menular pada ternak. Brucellosis merupakan penyakit zoonosis karena dapat menular pada manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui determinan antigen yang terdapat pada gen *omp2a* *B. abortus* isolat lokal yang telah diblasting ke asam amino (protein). Sampel bakteri berasal dari sapi penderita Brucellosis asal Sulawesi Selatan dan Nusa Tenggara Timur. Gen *omp2a* diamplifikasi melalui tehnik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan primer 2ab5F dan 2a900R. Produk PCR disekuensing untuk mendapatkan sekuen nukleotida gen *omp2a* *B. abortus* isolat lokal. Sekuen nukleotida ini dianalisis tingkat homologinya terhadap isolat asal mancanegara yang diakses dari GenBank dengan menggunakan BLAST. Sekuen nukleotida gen *omp2a* diblasting ke asam amino kemudian dengan metode Kolaskar dan Tongaonkar antigenicity dapat diperoleh determinan antigen pada antigen protein membran luar (OMP) *B. abortus* isolat lokal. Hasil menunjukkan bahwa tingkat homologi antara sekuen gen *omp2a* *B. abortus* isolat lokal dengan isolat asal mancanegara mempunyai tingkat homologi yang tinggi (99% - 100%). Hasil prediksi determinan antigen didapatkan enam determinan antigen pada antigen OMP *B. abortus* isolat lokal.

Kata kunci: *Brucella abortus*, gen *omp2a*, homologi, determinan antigen

ABSTRACT

Brucellosis in cattle caused by *Brucella abortus* and it has known as a contagious reproductive disease in animals. Brucellosis is a zoonotic disease because it can be transmitted to humans. The objective of this research was to determine the antigenic derterminants *omp2a* gene of *B. abortus* local isolates had been translated to amino acid (protein). The samples of bacteria were isolated from infected cattle with *B. abortus* in South Sulawesi and East Nusa Tenggara. *Omp2a* gene of *B. abortus* local isolates were amplified by *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Specifically-designed primers used in PCR were 2ab5F and 2a900R. PCR product were sequenced to get nucleotide sequences of *omp2a* gene of *B. abortus* local isolates. Then these nucleotide sequence were analyzed for homology level toward isolates from foreign countries by using BLAST. Nucleotide sequence of *omp2a* gene were translated to amino acid, then antigenic determinants on outer membrane protein (OMP) antigens were obtained by Kolaskar and Tongaonkar antigenicity method. The result showed that the homology level between nucleotide sequence of *omp2a* gene of *B. abortus* local isolates and isolates from foreign countries have a high homology level (99% - 100%). The result of antigenic determinants prediction showed six antigenic determinants on OMP antigens of *B. abortus* local isolates.

Key words: *Brucella abortus*, *omp2a* gene, homology, antigenic determinants

PENDAHULUAN

Brucellosis adalah penyakit zoonosis yang secara ekonomis merugikan dan mempengaruhi kesehatan masyarakat. Cara penularan penyakit ini pada manusia melalui kontak atau mengonsumsi produk ternak berupa susu dan daging. Pada manusia Brucellosis menyebabkan demam yang bersifat *undulant* dan disebut “Demam Malta” yang sulit diobati (Briones et al., 2001). Brucellosis pada sapi disebabkan oleh *Brucella abortus* yang merupakan bakteri Gram negatif, kokoid dan hidupnya fakultatif intraseluler (Eskra et al., 2003; Abtahi et al., 2007). Di Indonesia Brucellosis dikenal sebagai penyakit reproduksi menular pada sapi yang menyebabkan abortus pada sapi bunting, retensi plasenta, orchitis dan epididimitis (Noor, 2006).

Penegakan diagnosis Brucellosis memerlukan suatu uji sensitivitas tinggi. Uji serologis di lapangan yang merupakan *Gold Standard* adalah *Rose Bengal Test* (RBT) sebagai uji saring dan *Complement Fixation Test* (CFT) sebagai uji konfirmasi. Namun uji CFT ini sering terjadi reaksi komplementer akibat serum mengalami hemolisis, sedangkan ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) dengan menggunakan antigen utuh memiliki sensitivitas lebih tinggi dibanding RBT dan CFT (Sulaiman, 2003). Kelemahan uji serologis karena menggunakan antigen utuh sehingga sering terjadi reaksi silang dengan bakteri lain dan mengakibatkan positif palsu. Untuk mengatasi kendala tersebut diperlukan antigen yang bersifat antigenik yang mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (Rantam, 2003).

Protein membran luar (*outer membrane protein*, OMP) *Brucella spp.* sangat penting karena merupakan antigen yang poten untuk pembuatan vaksin dan reagen diagnostik (El-Mohammady et al., 2012). Menurut Salhi et al. (2003) dan Forestier et al. (2005), OMP bakteri Gram negatif merupakan antigen potensial yang dapat secara langsung menginduksi respon imun spesifik humoral yaitu sel limfosit β sehingga lebih cepat memacu terbentuknya antibodi. Antigen adalah substansi yang dapat dikenali dan diikat dengan baik oleh sistem imun. Tidak setiap bagian dari antigen dapat berinteraksi dengan molekul sistem imun. Bagian antigen yang secara langsung berikatan dengan molekul reseptor dikenal dengan determinan antigen atau disebut epitop (Rantam, 2003). Antigen OMP mayor *Brucella* terdiri dari tiga grup yaitu: grup 1 yang mempunyai berat molekul antara 88 sampai 94 kDa, grup 2 mempunyai berat molekul antara 33 sampai 43 kDa, dan grup 3 mempunyai berat molekul 25 sam-

pai 31 kDa (El-Mohammady et al., 2012). Gen penyandi grup 2 porin protein terdiri dari dua gen yaitu *omp2a* dan *omp2b* yang terletak pada genom *Brucella* (Salehi et al., 2006). Gen *omp2a* menyandi protein dengan berat molekul 33 kDa, sedangkan gen *omp2b* menyandi protein dengan berat molekul 36 kDa. Gen *omp2a* dan *omp2b* adalah homolog yang mengekspresikan asam amino dengan komposisi dan struktur yang sama dengan asam amino yang dihasilkan oleh gen *omp2b* (Cloeckert & Vizcaino, 2004). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui determinan antigen pada gen *omp2a* *B. abortus* isolat lokal yang telah diblasting ke asam amino (protein) dan homologi antara gen *omp2a* *B. abortus* isolat lokal dengan isolat asal mancanegara.

BAHAN DAN METODE

Sampel Kultur dan Bakteri

B. abortus isolat lokal berasal dari sapi penderita Brucellosis asal Sulawesi Selatan (Sulsel) dan Nusa Tenggara Timur (NTT) yang diperoleh dari Balai Besar Veteriner (BBV) Maros. Isolat bakteri dikultur pada media selektif *Brucella agar base* (BAB) yang diperkaya dengan 2,5% serum sapi kemudian diinkubasi pada 37 °C selama 3 hari dengan penambahan 5% CO₂. Koloni yang tumbuh diidentifikasi dengan uji biokimia atau menurut prosedur standar uji bakteriologis (Alton et al., 1998; OIE, 2000; Quinn et al., 2002).

Ekstraksi DNA

Biakan murni dari masing-masing isolat *B. abortus* (isolat asal Sulsel dan NTT), isolat *B. abortus* asal Kendari (sebagai kontrol positif) dan isolat *E. coli* (sebagai kontrol negatif) dipanen dan dibuat suspensi dengan dilarutkan dalam *phosphat buffer saline* (PBS) sebanyak 10%. Suspensi ini selanjutnya digunakan untuk ekstraksi DNA.

Suspensi *B. abortus* diambil dengan pipet kemudian dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* dan ditambahkan dengan larutan DNAzol 1000 μ l, dicampur menggunakan pipet dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 5 menit, setelah itu dicampur dengan menggunakan vortex dan disimpan selama 2-15 menit pada suhu ruang. Campuran suspensi tersebut disentrifugasi selama 10 menit pada suhu 4 °C dengan kecepatan 10.000 rpm. Setelah disentrifugasi, supernatan diambil sebanyak 500 μ l, dipindahkan ke dalam tabung *eppendorf*, ditambahkan 500 μ l etanol absolut, kemudian disentrifugasi kembali selama 10 menit pada suhu 4 °C dengan

kecepatan 10.000 rpm untuk mengendapkan DNA. DNA dicuci dengan menambahkan 1000 µl etanol 75% dan disentrifugasi selama 10 menit pada suhu 4 °C dengan kecepatan 10.000 rpm. DNA dikeringkan dengan membuang semua supernatan secara hati-hati dan tabung dibiarkan terbuka selama 5 menit, kemudian DNA dilarutkan dengan NaOH (pH 7,5) sebanyak 50 µl dan disimpan pada suhu 4 °C (Suwarno, 2010).

Amplifikasi DNA dengan PCR

Proses amplifikasi DNA dengan teknik PCR dilakukan dengan menggunakan *Ready to Go PCR Kit* (GE Health Care). Sebanyak 5 µl DNA yang telah dipanaskan dimasukkan ke dalam *tube PCR bead*, kemudian ditambahkan 2 µl *primer forward*, 2 µl *primer reverse* dan 16 µl NFW sehingga total larutan berjumlah 25 µl. Selanjutnya larutan di-*spindown* dan dimasukkan ke dalam *PCR thermocycler* yang telah diprogram, denaturasi awal selama 45 detik pada suhu 95 °C diikuti dengan denaturasi selama 30 detik pada suhu 95 °C, *annealing* selama 60 detik pada suhu 66 °C, ekstensi selama 60 detik pada suhu 72 °C, sebanyak 35 siklus dan diakhiri dengan ekstensi akhir selama 7 menit pada suhu 72 °C. Selanjutnya produk PCR yang terdapat dalam tabung *PCR bead* disimpan dalam *freezer* pada suhu -20 °C sebelum dilakukan proses elektroforesis (Ratnasari et al., 2011). Primer yang digunakan untuk PCR dapat dilihat pada Tabel 1.

Untuk melihat hasil PCR dilakukan elektroforesis DNA sampel sebanyak 5 µl DNA ditambah dengan 2 µl *buffer loading*, dimasukkan dalam agarose 2% yang mengandung ethidium bromide 1 mg/ml untuk proses *running*. Hasil divisualisasikan dengan sinar ultraviolet transiluminator pada panjang gelombang 302 nm. Elektroforesis DNA dilakukan untuk mengetahui panjang amplicon dari *B. abortus* (Ratnasari et al., 2011).

Tabel 1 Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen *omp2a Brucella abortus*.

Nama	Sekuen nukleotida (5' – 3')	Ket.
2ab5	ACTGACGGATCCGCGCTCAGGCGGCCGACGCAA	Forward
2a900	ACTGACTTCGAATTGCCTTTTCGGGGGCAATGA	Reverse

Sumber: Sifuentes-Rincon et al. (1997)

Sekuensing

Sekuensing DNA dilakukan dengan menggunakan mesin sekuensing *Abi Prism 3130 Genetic Analyzser-Applied Biosystem*. Proses sekuensing ada tiga tahapan. Tahap (1) dilakukan siklus sekuensing dengan penambahan *Big Dye labeling* untuk menandai bagian gen yang akan dibaca di mesin sekuensing. Pada tahap ini, DNA murni dimasukkan ke dalam *Eppendorf Thermocycler* dan diprogram dengan: 1 menit pada suhu 96 °C untuk denaturasi DNA awal, diikuti dengan 25 siklus yang terdiri dari 30 detik pada suhu 96 °C untuk denaturasi DNA, 60 detik pada suhu 66 °C untuk *annealing* DNA dan 60 detik pada suhu 72 °C untuk ekstensi. Tahap (2) dilakukan purifikasi hasil siklus sekuensing tahap (1) dengan menggunakan *Big Dye X Terminator*. Tahap (3) sekuensing dilakukan dengan *Abi Prism 3130 Genetic Analyser – Applied Biosystem*. Data hasil sekuensing diolah dengan menggunakan piranti lunak *Mega 5* untuk mendapatkan hasil sekuensing nukleotida (Applied Biosystems, 2010).

Analisis Homologi

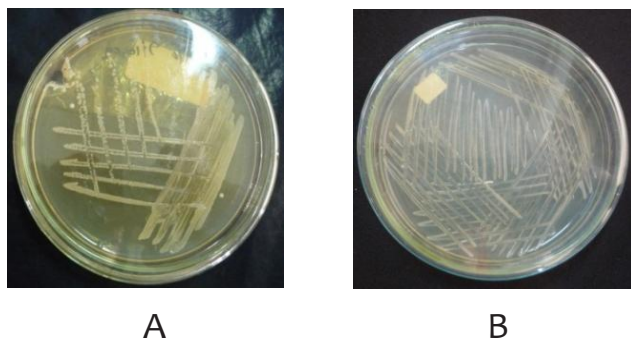
Data hasil sekuen nukleotida gen *omp2a* dari sampel yang didapat kemudian dihomologikan dengan cara urutan nukleotida yang ada diubah dalam bentuk data Fasta, kemudian dengan menggunakan BLAST (*basic local alignment search tool*) dilakukan proses analisis homologi dengan membandingkan antara sekuen gen *omp2a* dengan data sekuen nukleotida isolat asal mancanegara yang diakses dari GenBank.

Prediksi Determinan Antigen (Epitop)

Sekuen nukleotida gen *omp2a* dari masing-masing isolat *B. abortus* diblasting (diubah) ke asam amino. Determinan antigen didapatkan dengan menggunakan metode dari Kolaskar dan Tongaonkar antigenicity (Kolaskar & Tongaonkar, 1990).

HASIL

Hasil kultur isolat bakteri dengan metode goresan (*streak*) pada media *Brucella agar base* (BAB) terlihat koloni halus, jernih, mengkilat dengan tepi yang rata berwarna kekuningan atau seperti madu dengan permukaan koloni berbentuk konvex.



Gambar 1 Hasil kultur *B.abortus* pada media BAB. A: isolat asal SulSel dan B: isolat asal NTT pada media BMB.

Hasil identifikasi isolat *B. abortus* asal Sulsel dan NTT dengan uji biokimiawi menunjukkan reaksi positif pada uji katalase, H₂S, urease dan oksidase (Tabel 2).

Tabel 2 Uji biokimiawi *B. abortus* isolat lokal

<i>B.abortus</i> isolat	Uji biokimiawi			
	Katalase	H ₂ S	Urease	Oksidase
SulSel	+	+	+	+
NTT	+	+	+	+

Hasil amplifikasi dengan PCR pada penelitian ini menunjukkan panjang amplicon gen *omp2a* 720 bp. Sebagai kontrol positif digunakan *B. abortus* asal Kendari dan sebagai kontrol negatif digunakan *E.coli* (Gambar 2).

Hasil sekuensing dari primer yang digunakan kemudian diolah dan digabung dengan menggunakan piranti lunak *Clone Manager* sehingga didapatkan data hasil sekuensing dari sampel *B.abortus* isolat lokal dari Sulsel dan NTT dengan urutan nukleotida sebagai berikut:

```

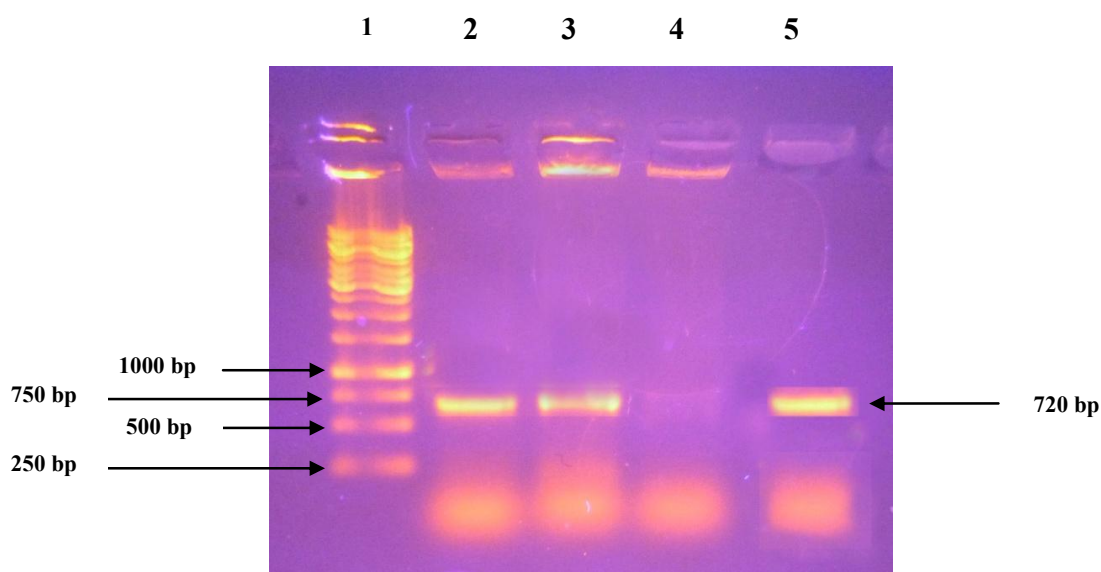
1 GCCAGAGCCC GAAGCCGTTG AATATGTCGG CGTTTGGCAG GCTTACGGCG CTGGCTACTT
61 CTACATTCCG GGCACCGAAA CCTGCCTGCG CGTCCATGGT TACGTCCGTT ACGACGTAAA
121 GGGCGGGGAT GACGTTTACT CCGGTACCGA CCGCAATGGC TGGGACAAGG GCGCTCGTTT
181 CGCACTCATG TTCAACACGA ATTCGGAAAC CGAACTCGGC ACGCTCGGCA CCTATACTCA
241 GCTGCGCTTC AACTACACCA GCAACAATTC ACGTCATGAT GGCCAATACG GCGATTTTCAG
301 CGATGATCGT GATGTCGCTG ATGGCGGCGT AAGCACCAGG AAGATCGCCT ACACCTTCAC
361 CGGCGGAAAC GGCTTCTCGG CTGTGATCGC TCTCGAACAG GGTGGCGAAG ACGTTGACAA
421 CGATTACACG ATCGACGGTT ACATGCGCGA CGTTGTTGGC GGCCTGAAAT ATGTCGGCGG
481 CTGGGGTTTC ATCGCTGGTG TTGTTGCCTA TGACTCGGTC ATCGAAGAAT GGGCTACAAA
541 GGTTCGTGGC GAGTCAACA TCACCGACCG GTTCTGGTGA TGGTGCAGG GCGCATATTC
601 GTCCCGAGCG ACGCCGAACC AGAACTACGG TCAGTGGGGG
    
```

Gambar 3 Urutan nukleotida *B.abortus* isolat SulSel.

```

1 GCCAGAGCCC GAGCCGTTGA ATATGTCGGC GTTTGCGACG CTTACGGCGC TGGCTACTTC
61 TACATTCCGG GCACCGAAAC CTGCCTGCGC GTCCATGGTT ACGTCCGTTA CGACGTAAAG
121 GCGCGCGATG ACGTTTACTC CGGTACCGAC CGCAATGGCT GGGACAAGGG GCGCTCGTTT
181 GCACTCATGT TCAACACGAA TTCGGAAACC GAACTCGGCA CACTCGGCAC CTATACTCAG
241 CTGCGCTTCA ACTACACCAG CAACAATTCA CGTCATGATG GGCAATACGG CGATTTTCAGC
301 GATGATCGTG ATGTCGCTGA TGGCGGCGTA AGCACCAGCA AGATCGCCTA CACCTTCACC
361 GCGGAAACG GCTTCTCGGC TGTGATCGCT CTCGAACAGG GTGGCGAAGA CGTTGACAA
421 GATTACACGA TCGACGGTTA CATGCCGCAC GTTGTGGCG GCCTGAAATA TGCTGGCGGC
481 TGGGGTTTCA TCGCTGGTGT TGTTCCTAT GACTCGGTCA TCGAAGAATG GGCTACAAA
541 GTTCGTGGCG ACGTCAACAT CACCGACCGG TTCTCGGTAT GGCTGCAGG GCGCATATTC
601 TCCCGAGCGA CGCCGAACCA GAACTACGGT CAGTGGGGG
    
```

Gambar 4 Urutan nukleotida *B.abortus* isolat NTT.



Gambar 2 Hasil amplifikasi gen *B. abortus* lokus *omp2a*. Kolom 1: Marker, kolom 2: *B.abortus* isolat Sulsel, kolom 3: *B.abortus* isolat NTT, kolom 4: kontrol negatif, kolom 5: kontrol positif.

Tabel 3 Nilai Homologi *B.abortus* Isolat Sulsel dan Isolat NTT terhadap Isolat *B. abortus* asal mancanegara.

Isolat Pembanding (Data GenBank)	Sulsel	NTT
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM19. Accession FN552428, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM23. Accession FN252432, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM1. Accession FN552410, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM2. Accession FN552411, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus Omp2a</i> porin (<i>omp2a</i>) gene, complete cds. Accession AY008719.1 - Perancis	100%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM3. Accession FN552412, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat isolat KVAFSU-ADMAS-BVM14. Accession FN552423, asal India	99%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM15. Accession FN552424, asal india	99%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM16. Accession FN552425, asal India	99%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM21. Accession FN552430, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM20. Accession FN552429, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM6. Accession FN552415, asal India	99%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM5. Accession FN552414, asal India	99%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM4. Accession FN552413, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM7. Accession FN552416, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM8. Accession FN552417, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM9. Accession FN552418, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM10. Accession FN552419, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus omp2a</i> gene for outer membrane protein, isolat KVAFSU-ADMAS-BVM11. Accession FN552420, asal India	100%	99%
<i>Brucella abortus</i> isolat Sulawesi Selatan	100%	99%
<i>Brucella abortus</i> isolat Nusa Tenggara Timur	99%	100%

Tabel 4 Prediksi Epitop (Determinan Antigen) dengan Menggunakan Metode Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity pada OMP *B. Abortus* asal Sulsel.

No.	Posisi Awal	Posisi Akhir	Determinan Antigen (Epitop)	Panjang
1	4	28	EAVEYVRVCDAYGAGYFYIP	20
2	25	38	TETCLRVHGYVRYD	14
3	125	132	FSAVIALE	8
4	147	158	YMPHVVGGLKYA	12
5	164	176	IAGVWAYDSVIEE	13
6	190	202	RFSVWLQAYSSA	13

Tabel 5 Prediksi Epitop (Determinan Antigen) dengan Menggunakan Metode Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity Pada OMP *B. Abortus* asal NTT.

No.	Posisi Awal	Posisi Akhir	Determinan Antigen (Epitop)	Panjang
1	4	23	RAVEYVRVCDAYGAGYFYIP	20
2	25	38	TETCLRVHGYVRYD	14
3	125	132	FSAVIALE	8
4	147	158	YMPHVVGGLKYA	12
5	164	176	IAGVWAYDSVIEE	13
6	190	202	RFSVWLQAYSSA	13

Simbol asam amino dengan menggunakan satu huruf (Whitford, 2005).

Hasil analisis homologi antara *B.abortus* isolat Sulsel dan NTT dengan 20 isolat *B. abortus* asal mancanegara menunjukkan tingkat kesamaan (homologi) yang berkisar antara 99% sampai 100%. Hal ini menunjukkan bahwa fragmen gen *omp2a* *B.abortus* isolat lokal (Sulsel, NTT) mempunyai kesamaan urutan nukleotida dengan fragmen gen *omp2a* dari ke 20 isolat *B. abortus* asal mancanegara sebesar 99% sampai 100% (Tabel 3).

Hasil blasting sekuen nukleotida gen *omp2a* *B. abortus* asal Sulsel ke asam amino adalah :

PEPEAVEYVRVCDAYGAGYFYIPGTETCLRVHGYVRYD
VKGGDDVYSGTDRNGWDKGFALMFNTNSETELGT
LGTYTQLRFNYTSNNSRHDGQYGFSDDRDVADGGV
STGKIAYTFTGGNGFSAVIALEQGGEDVDNDYTIDGYM
PHVVGGLKYAGGWGSIAGVWAYDSVIEEWATKVRGDV
NITDRFSVWLQAYSSAATPNQNYGQWG

Hasil blasting sekuen nukleotida gen *omp2a* *B. abortus* asal NTT ke asam amino adalah:

ARARAVEYVRVCDAYGAGYFYIPGTETCLRVHGYVRY
DVKGGDDVYSGTDRNGWDKGFALMFNTNSETEL
GTLGTYTQLRFNYTSNNSRHDGQYGFSDDRDVADG
GVSTGKIAYTFTGGNGFSAVIALEQGGEDVDNDYTIDG
YMPHVVGGLKYAGGWGSIAGVWAYDSVIEEWATKVR
GDVNITDRFSVWLQAYSSAATPNQNYGQWG

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini identifikasi terhadap *B. abortus* isolat lokal dilakukan secara konvensional dan

secara genomik dengan teknik PCR. Menurut Kazemi et al. (2008) penggunaan metode PCR untuk deteksi *Brucella* sangat cepat dan peka dibandingkan dengan deteksi secara bakteriologis dan serologis, karena metode PCR dilakukan dengan cara mengamplifikasi genom bakteri. Keunggulan PCR untuk deteksi patogen (*B. abortus*) karena teknik ini tidak memerlukan proses pembiakan yang memakan waktu lama dan mempunyai sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi (Situmeang & Yulia, 2003). Teknik PCR tidak beresiko tinggi bagi pekerja di laboratorium karena tidak berhubungan langsung dengan patogen dan sampel untuk pemeriksaan PCR dapat disimpan pada suhu -20 °C sebelum diproses atau dapat dikirim ke laboratorium lain (Ancora et al., 2005; Khosravi et al., 2006; Lopez-Goni et al., 2008). Primer yang digunakan dalam teknik PCR pada penelitian ini adalah 2ab5F dan 2a900R yang berasal dari sekuen dua gen yang homolog yaitu *omp2a* dan *omp2b* dimana gen tersebut mengkode OMP grup 2 porin protein dari *Brucella* (Sifuentes-Rincon et al., 1997; Salehi et al. 2006). OMP grup 2 ini mempunyai kisaran berat molekul antara 33 sampai 43 kDa (El-Mohammady et al., 2012). Hasil pengamatan PCR dengan elektroforesis menunjukkan bahwa sepasang primer yang digunakan untuk amplifikasi pada proses PCR (2ab5F dan 2a900R) menghasilkan panjang nukleotida 720 bp (base-pairs) pada kedua sampel *B. abortus* asal Sulsel dan NTT.

Sifuentes-Rincon *et al.* (1997) telah berhasil mendeteksi sekuen genom *B. abortus* dengan menggunakan teknik PCR pada DNA sampel darah sapi penderita *Brucellosis*. Sepasang primer yang digunakan pada PCR ini didesain dari sekuen dua gen yang homolog (*omp2a* dan *omp2b*) dimana mengkode OMP mayor *B. abortus*. Primer ini mempunyai *target site* pada gen *omp2a*. Sekuen primer 2ab5' digunakan sebagai *forward* dan 2a900 sebagai *reverse* yang dapat mengamplifikasi gen *omp2a* *B. abortus* (Bv 1) menghasilkan panjang amplicon 720 bp fragmen. Fragmen 720 bp ini akan berubah panjangnya menjadi 900 bp apabila digunakan untuk amplifikasi spesies/strain lain.

Pada penelitian ini produk PCR yang didapat kemudian disekuensing untuk mendapatkan urutan nukleotida dari gen penyandi OMP grup 2a dari *B. abortus* isolat lokal. Hasil sekuensing pada sampel *B. abortus* asal Sulawesi Selatan yang terbaca adalah 640 nukleotida dan sampel NTT yang terbaca 639 nukleotida.

Tingkat kesamaan (homologi) antara *B. abortus* isolat lokal dengan ke 20 isolat asal mancanegara (asal India dan Perancis) setelah dianalisis berdasarkan sekuen nukleotida gen *omp2a* ternyata sangat tinggi berkisar antara 99% sampai 100%. Walaupun demikian di antara isolat lokal dan isolat asal mancanegara masih terdapat perbedaan sekitar 1%, hal ini disebabkan karena pengaruh faktor lingkungan, letak geografis yang berbeda, iklim dan musim, sehingga terjadi perubahan gen pada struktur komponen bakteri (Ardhiani, 2012). Perubahan gen tersebut disebabkan karena telah terjadi mutasi, delesi atau insersi gen pada setiap isolat (Witaningrum, 2013). Perubahan salah satu sekuen nukleotida ini menyebabkan perubahan asam amino yang selanjutnya akan mempengaruhi perubahan protein sehingga protein yang ada di sampel isolat lokal berbeda dengan isolat negara lain.

Untuk mengetahui adanya determinan antigen maka sekuen nukleotida gen *omp2a* yang didapat pada masing-masing isolat *B. abortus* diubah (diblasting) ke asam amino. Dengan menggunakan metode dari Kolaskar & Tongaonkar (1990) akan didapatkan determinan antigen pada protein yang terdapat pada membran luar (OMP) dinding sel bakteri. OMP grup 2 dari *B. abortus* ini merupakan antigen potensial yang menginduksi respon imun (Salhi *et al.*, 2003; Forestier *et al.*, 2005; El-Mohamady *et al.*, 2012). Determinan antigen atau epitop adalah bagian dari antigen yang dapat bereaksi dengan reseptor sel T (TCR) yang spesifik (Rantam, 2003; Baratawijaya & Rengganis, 2009). Pada penelitian ini sebagai antigen adalah OMP grup 2a dari *B.*

abortus isolat lokal yang mempunyai enam determinan antigen (Tabel 4 dan Tabel 5).

Penelitian yang dilakukan oleh Munir *et al.* (2010) dengan menggunakan tiga strain *B. abortus* yaitu strain vaksin halus (*smooth*) S19, strain vaksin kasar (*rough*) RB51 dan strain lokal (*lapangan*) biotipe 1. Profil protein (OMP) yang diperoleh dari hasil SDS-PAGE *B. abortus* S19 terlihat adanya delapan pita protein dengan berat molekul: 89,0; 73,0; 53,7; 49,0; 38,0; 27,0; 22,3 dan 17,7 kDa. Profil protein dari RB51 terlihat sebelas pita protein. Protein dengan berat molekul tinggi: 107,1 dan 74,1 kDa. Pita protein dengan berat molekul menengah: 53,7; 37,1; 34,2 dan 25,7 kDa. Pita protein dengan berat molekul rendah: 21,8; 20,4; 18,1; 15,8; dan 12,5 kDa. Profil protein isolat lapangan terlihat delapan pita protein dengan berat molekul 151,3; 89,0; 75,8; 67,6; 37,0; 27,0; 24,0 dan 19,0 kDa. Hasil analisa dengan *Western immunoblot* terhadap protein tersebut di atas dengan menggunakan antisernya, terlihat adanya perbedaan imunoreaktif terhadap protein dari ketiga strain *B. abortus*. *Transblot* dari S19, RB51 dan isolat lapangan antiserum yang berbeda menunjukkan pita-pita yang imunoreaktif, tetapi yang paling jelas reaktivitasnya dengan masing-masing antisernya pada pita 37 sampai 38 kDa yang dapat terlihat pada ketiga strain *B. abortus*. Oleh karena itu OMP yang imunoreaktif dengan berat molekul 37–38 kDa merupakan determinan antigen (*epitop*) yang memungkinkan untuk pengembangan vaksin rekombinan untuk infeksi *B. abortus* pada kerbau. OMP yang imunoreaktif dengan berat molekul 151,3 kDa hanya terlihat pada strain lapangan saja dan tidak ditemukan pada kedua strain vaksin sehingga protein ini dapat digunakan sebagai antigen determinan untuk uji diagnostik karena dapat membedakan antara infeksi alami dengan vaksinasi.

Pada penelitian ini sekuen nukleotida gen *omp2a* *B. abortus* isolat lokal yang dikonversikan ke asam amino dengan menggunakan BLAST menghasilkan 213 asam amino. Apabila dikalkulasi ke berat molekul setara dengan 23430 Dalton (23,4 kDa). Sekuensing amplicon hasil PCR dengan menggunakan mesin sekuensing *Abi Prism 310 Genetic Analyser Applied Biosystem 1* kapiler dengan panjang 5 – 47 cm 50 µm hanya dapat menghasilkan sekuen maksimal 700 nukleotida. Namun demikian pada proses pembacaan biasanya ujung untaian DNA kurang maksimal terbaca, karena pada awal pembacaan mesin belum bekerja secara optimal sehingga hasil yang didapatkan hanya terbaca sekuen nukleotida sekitar 640. Oleh karena itu pada penelitian ini hanya sebagian sekuen nukleotida gen *omp2a* *B.*

abortus isolat lokal saja yang dapat terbaca. Apabila seluruh sekuen nukleotida gen *omp2a* dapat terbaca, maka akan didapatkan 965 nukleotida atau 321 asam amino dengan berat molekul sekitar 35,3 kDa. Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Ficht et al. (1989) gen *omp2a* terletak pada posisi 225 – 3216 (965 bp) pada sekuen DNA lokus *omp2*, sedangkan panjang keseluruhan sekuen DNA *B. abortus* lokus *omp2* adalah 3430 (GenBank no. M26034). Salah satu persyaratan suatu zat bersifat imunogenik/antigenik apabila mempunyai berat molekul lebih dari 10.000 Dalton (Bellanti, 1993). Pada penelitian ini lokus OMP2a *B. abortus* isolat lokal didapatkan enam determinan antigen yang mengandung asam amino sekitar 8 – 20. Berat molekul determinan antigen ini berkisar antara 880 – 2200 Dalton. Determinan antigen ini terdapat pada OMP grup 2a yang mempunyai berat molekul sekitar 35,3 kDa, sehingga determinan antigen ini merupakan antigen/imunogenik yang dapat digunakan sebagai antigen untuk pengembangan bahan vaksin subunit dan kit diagnostik.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa: pada protein membran luar (OMP) *B. abortus* isolat lokal terdapat enam determinan antigen dan OMP grup 2 dari *B. abortus* tersebut dapat digunakan sebagai antigen untuk dikembangkan sebagai vaksin subunit dan kit diagnostik karena gen *omp2a* *B. abortus* isolat lokal mempunyai tingkat homologi yang tinggi terhadap isolat asal mancanegara.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didukung oleh proyek I'MHERE Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Kami ucapkan terimakasih kepada pimpinan proyek I'MHERE Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan bantuan dana.

"Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini."

DAFTAR PUSTAKA

- Abtahi H, Sulmanian AH, Rafati S, Nejad GB, Hassan ZM. 2007. High level expression of recombinant ribosomal protein (L7/L12) from brucella abortus and its reaction with infected human sera. Iranian Biomedical Journal 8(1): 13-18.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. 1998. Techniques for the Brucellosis. INRA., Paris, French. p37-38.
- Ancora M, de Santis P, Giannatale ED, Alessiani A. 2005. Molecular typing of brucella field strain isolated in Italy. Veterinaria Italiana Journal 41(1): 51-55.
- Applied biosystems. 2010. Manual Procedure. <http://www.appliedbiosystems.com/28> Agustus 2012.
- Ardhiani F. 2012. Karakterisasi Molekuler Gen Penyandi *omp2a* *Brucella abortus* Isolat Lokal. Tesis S2. Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. p59.
- Baratawidjaja KG, Rengganis I. 2009. Immunologi Dasar. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. p152-154.
- Bellanti JA. 1993. Immunology III. W.B. Saunders Company. Philadelphia. p83.
- Briones G, Iannino NI, Roset M, Vigliocco A, Paulo PS, Ugalde RA, 2001. *Brucella abortus* Cyclic β -1,2-glucan mutan have reduce virulence in mice and are detected in intracellular replication in HeLa cells. American Society for Microbiology 69(7): 4528-4535.
- Cloekaert A, Vizcaino N. 2004. DNA Polymorphism and Taxonomy of *Brucella* Species, in Lopez-Goni I, Mariyon I (eds). Molecular and Cellular Biology of *Brucella*. Horizon Scientific Press. United Kingdom. p9-13.
- El-Mohammady H, Shaheen HI, Klena JD, Nakhla I, Weiner MA, Armstrong AW. 2012. Specific IgA antibodies in the acute brucellosis. Journal of Infection in Development Countries 6(2): 192-200.
- Eskra L, Mathison A, Splitter G. 2003. Microarray analysis of m RNA levels from RAW 264,7 macrophages infected with brucella abortus. Infection and Immunity 71(3): 1125-1133.
- Ficht AT, Bearden SW, Sowa BA, Adams LG. 1989. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. Infection and Immunity 57(11): 3281-3291.
- Forestier C, Moreno E, Pizarro-Cerda J, Gorvel JP. 2005. Lysosomal accumulation and recycling of polysaccharide to the cell surface of murine macrophages, an in vitro and in vivo study. The Journal of Immunology 162(11): 6784-6791.
- Kazemi B, Namin SAY, Dowlatshahi M, Bandepour M, Kafizadeh F, Gachkar L, Mahmoudinejad M, Samarghandi A, Mardani M. 2008. Detection of *Brucella* by peripheral blood PCR and comparison with culture and serological methods in suspected cases. Iranian Journal of Public Health 37(4): 96-102.

- Khosravi AD, Abassi E, Alavi SM. 2006. Isolation of *B. melitensis*, *B. abortus* from brucellosis patients by conventional culture method and polymerase chain reaction technique. *Pakistan Journal of Medical Sciences* 22(4): 396-400.
- Kolaskar AS, Tongaonskar PC. 1990. A Semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters* 276(1-2): 172-174.
- Lopez-Goni I, Garcia-Yoldi D, Marin CM, de Miguel MJ, Munoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckaert A, Ferreira AC, Cardoso R, Correa de Sa MI, Walravens K, Albert D, Garin-Bastuji B. 2008. Evaluation of a multiplex PCR bAssay (Bruce-Ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *Journal of Clinical Microbiology* 46(10): 3484-3487.
- Munir R, Afza M, Hussain M, Naqvi SMS, Khanum. 2010. Outer membrane proteins of *Brucella abortus* vaccinal and field strains and their immune response in buffaloes. *Pakistan Veterinary Journal* 30(2): 110-114.
- Noor SM. 2006. Brucellosis: Penyakit yang belum banyak dikenal di Indonesia. *Wartazoa* 16(1): 31-39.
- [OIE] Office des International Epizooties. 2000. *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. List A and B Diseases of Mammals, Birds and Bees. References Laboratories for Bovine Brucellosis.* www.unau.es/microbial/Brucellosis_2003_proceeding.pdf. p330.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonar FC. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* Blackwell Publishing. Great Britain. p162-164.
- Rantam FA. 2003. *Metode Imunologi.* Airlangga University Press. Surabaya. p3-11.
- Ratnasari R, Lastuti NDR, Ardhiani F, Anis S. 2011. Deteksi protein membran luar (OMP) dinding sel *brucella abortus* isolat lokal dengan polymerase chain reaction (PCR) sebagai kandidat vaksin brucellosis. *Media Kedokteran Hewan* 27: 51-55.
- Salehi M, Pishva E, Salehi R, Rahmani M. 2006. Isolation of *Brucella* using PCR-RFLP analysis. *Iranian Journal Public Health* 35(4): 22-27.
- Salhi I, Boigegrain RA, Machold J, Weise C, Cloeckaert A, Rout B. 2003. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infection and Immunity* 71(8): 4326-4332.
- Sifuentes-Rincon AM, Revol A, Barrera-Saldana HA. 1997. Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. *Molecular Medicine Journal* 3(11): 734-739.
- Situmeang R, Yulia E. 2003. Polymerase chain reaction (PCR) dan kegunaannya dalam membedakan virus *Hog cholera* dengan pestivirus lainnya. *Buletin Veterinaria Farma* 3(1): 8-14.
- Sulaiman I. 2003. Evaluasi Sero-diagnostik sebagai Sarana Diagnosa Brucellosis di Sulawesi Selatan. *Makalah Apresiasi Diagnosa Laboratorium Bakteriologi.* BPPH VII Maros 9-18 Juni 2003.
- Suwarno. 2010. *Polymerase Chain Reaction dan Aplikasi.* Workshop Departemen Mikrobiologi Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. p5-6.
- Whitford D. 2005. *Proteins, Structure and Function.* John Wiley & Sons Ltd. England. p18-22.
- Witaningrum AM. 2013. *Analisis Filogenetik Gen Penyandi Katabolisme Erythritol *Brucella abortus* Isolat Lokal.* Tesis S2. Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. p51.