

STUDI PERBANDINGAN SIFAT-SIFAT PROTEIN ANTIGENIK SEL *BRUCELLA ABORTUS* ISOLAT LAPANG DENGAN TEKNIK ELEKTROFORESIS DAN IMMUNOBLOTTING

AGUS SUDIBYO¹, FACHRIYAN H. PASARIBU², I.W.T. WIBAWAN²,
dan ENDHIE D. SETIAWAN¹

¹ Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, PO Box 52, Bogor 16114, Indonesia
² Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jalan Taman Kencana 3, Bogor, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 29 Mei 1995)

ABSTRACT

SUDIBYO, A. 1996. The comparative study of antigenic protein characters of field isolates *Brucella abortus* cells with electrophoresis and immunoblotting Techniques. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 1 (3) : 185-189.

Live vaccine of *Brucella abortus* strain 19 has been used for prevention and eradication of brucellosis in cattle. The information of the use of this vaccine in Indonesia is still limited, while the effectivity, bacteriological and serological aspects of the vaccine are not much evaluated yet. The objective of this research is to study the differences of protein cell wall antigenicity profiles between *B. abortus* strain 19, strain 544 and field isolates. Protein cell wall was prepared by sonication of *B. abortus* S19, S544 and *B. abortus* field isolates biotype 1, 2 and 3. Antiserum against these *B. abortus* was prepared in cattle. Furthermore, the distribution of protein band was determined by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), while protein antigenic profiles was examined by immunoblotting. The result showed that there was no significant different amongs protein cell wall of these *B. abortus*. From the antigenicity profiles exhibited that cattle vaccinated with *B. abortus* S19, no antibody was detected against protein less than 30 kDa. The other side natural infected or experimental infected cattle with *B. abortus* biotype 1 field isolate, antibody was detected until protein which has molecular weight about 15 kDa.

Key words: *Brucella abortus*, antigenic protein, immunoblotting

ABSTRAK

SUDIBYO, A. 1996. Studi perbandingan sifat-sifat protein antigenik sel *Brucella abortus* isolat lapang dengan teknik elektroforesis dan immunoblotting. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 1 (3) : 185-189.

Vaksin aktif *Brucella abortus* galur 19 telah banyak digunakan untuk pengendalian dan pemberantasan brucellosis pada sapi. Di Indonesia, informasi tentang penggunaan vaksin tersebut masih sangat terbatas, sedangkan evaluasi secara cermat baik aspek serologis, bakteriologis maupun keefektifannya belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari perbedaan sifat antigenisitas protein dinding sel *B. abortus* S19 dan *B. abortus* isolat lapang. Protein dinding sel dipersiapkan dengan cara sonikasi terhadap *B. abortus* S19, S544, dan *B. abortus* isolat lapang (biotipe 1, 2 dan 3). Antiserum terhadap *B. abortus* tersebut dibuat dengan menggunakan sapi. Kemudian dilakukan pemeriksaan band protein dengan metode *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE), sedangkan sifat protein antigeniknya diperiksa dengan teknik *immunoblotting*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang mencolok dari band protein dinding sel antara *B. abortus* S19, S544 dan isolat lapang (biotipe 1, 2 dan 3). Dalam hal sifat antigenisitasnya, maka antibodi terhadap protein dengan bobot molekul kurang dari 30 kDa tidak terdeteksi dalam serum sapi yang divaksinasi dengan *B. abortus* S19, sedangkan dalam serum sapi yang mendapat infeksi alami dan infeksi buatan, antibodi terhadap protein dapat dideteksi sampai dengan BM sekitar 15 kDa.

Kata Kunci: *Brucella abortus*, protein antigenik, immunoblotting

PENDAHULUAN

Dinding sel *B. abortus* terdiri dari peptidoglikan, protein, dan membran luar. Membran luar terdiri dari lipoprotein dan lipopolisakarida (DUBRAY, 1976; VERSTREATE *et al.*, 1982). Setiap komponen tersebut mempunyai fungsi yang berbeda dalam menimbulkan tanggap-kebal pada hewan inang.

Membran protein luar kuman *B. abortus* yang diekstraksi dengan *sodium dodecyl sulphate* (SDS) adalah

berupa porin dan protein yang terdiri dari protein kelompok 1 yang mempunyai bobot molekul (BM) 88 - 94 kilodalton (kDa), kelompok 2 dengan BM 35 - 40 kDa, kelompok 3 dengan BM 25 - 30 kDa (VERSTREATE *et al.*, 1982; VERSTREATE dan WINTER, 1984) dan lipoprotein dengan BM 8 kDa (GOMEZ-MIQUEL dan MORIYON, 1986). Protein dinding sel dari setiap galur *B. abortus* sebagian mempunyai kesamaan dalam komposisi asam aminonya. Namun demikian, juga mempunyai perbedaan seperti metionin, isoleusin, tirosin dan histidin

(VERSTREATE *et al.*, 1982). Kemudian dijelaskan bahwa perbedaan ini terdapat pada komposisi asam amino antara protein kelompok dua dan tiga yang bersifat antigenik. KANNENE *et al.* (1979), menggunakan ekstrak *B. abortus* yang diotoklafkan untuk uji stimulasi limfosit pada sapi yang diinfeksi buatan dengan *B. abortus*. Hasilnya menunjukkan bahwa terjadi proliferasi limfosit terdeteksi 1-2 minggu setelah infeksi. Antibodi yang dihasilkan sangat bervariasi tergantung dari sifat antigenisitas setiap fraksi protein dinding sel *B. abortus*. Fraksi protein yang paling bersifat antigenik diharapkan mampu merangsang timbulnya antibodi spesifik sedini mungkin. Antibodi tersebut berguna dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi *B. abortus*, sedangkan proteinnya sangat berguna sebagai reagen diagnosis.

Sampai saat ini dikenal ada dua jenis vaksin yang digunakan untuk pengendalian brucellosis pada sapi, yaitu vaksin hidup *B. abortus* S19 dan vaksin mati *B. abortus* S45/20. Vaksin S19 merupakan bakteri yang tidak virulen, dan virulensinya tidak pernah berubah sejak ditemukan pertama kali pada tahun 1930 (TIZARD, 1982). Vaksin S19 lebih banyak digunakan di berbagai negara untuk program pengendalian brucellosis pada sapi. Hal ini disebabkan karena vaksin *B. abortus* S19 yang diberikan hanya satu kali ternyata mampu memberi perlindungan sebesar 70% selama masa produksi (ALTON, 1978), sedangkan vaksin *B. abortus* S45/20 yang diberikan dua kali hanya mampu memberi perlindungan kurang dari satu tahun (ALTON, 1978). Keberhasilan program vaksinasi selain ditentukan oleh faktor manajemen juga ditentukan oleh faktor keragaman protein dinding sel *B. abortus* isolat lapang sebagai agen penyakit. Salah satu kelemahan vaksin *B. abortus* S19 adalah terjadinya infeksi laten yang sulit dibedakan secara serologis dengan infeksi alami, sehingga dapat menyulitkan diagnosis. Untuk itu, keragaman protein antigenik *B. abortus* S19 dan isolat lapang perlu diteliti dengan menggunakan *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) dan *immunoblotting*.

MATERI DAN METODE

Pembuatan antiserum *B. abortus*

Pembuatan antiserum terhadap *B. abortus* dilakukan dengan menggunakan 4 kelompok sapi masing-masing terdiri dari 3 ekor. Kelompok pertama diinokulasi dengan suspensi *B. abortus* S19, kelompok kedua merupakan sapi vaksinasi *B. abortus* S19 yang diinokulasi dengan *B. abortus* biotipe 1 isolat lapang, kelompok ke-

tiga diinokulasi dengan *B. abortus* biotipe 1 isolat lapang, sedangkan kelompok keempat merupakan sapi terinfeksi secara alami oleh *B. abortus* biotipe 1. Kemudian, sampel darah diambil dari setiap kelompok dari minggu ke-4 sampai ke-16. Serum dengan titer CFT tinggi disatukan untuk setiap kelompok, kemudian antiserum tersebut digunakan dalam pemeriksaan *immunoblotting*.

Pembuatan supernatan protein *B. abortus*

Dalam penelitian ini digunakan *B. abortus* S19 (vaksin), *B. abortus* S544 (ganas) sebagai pembanding, dan 6 isolat lapang *B. abortus* yang terdiri dari biotipe 1, 2 dan 3 masing-masing 2 isolat. Setiap isolat tersebut diperbanyak dengan cara ditumbuhkan dalam medium TSA di dalam botol Roux, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam dengan penambahan 10% CO₂. Setelah itu, sel kuman dipanen dengan cara membilas dengan NaCl fisiologis. Bilasan kuman ditempatkan dalam tabung sentrifuse, kemudian sel kuman dicuci tiga kali dengan NaCl fisiologis dengan cara disentrifuse dengan kecepatan 3.000 rpm selama 30 menit. Setelah sedimen kuman disuspensikan dengan NaCl fisiologis, kemudian dilakukan sonikasi dalam suhu dingin. Sel *B. abortus* yang sudah disonikasi tersebut disentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 20 menit, selanjutnya supernatannya dikoleksi untuk pemeriksaan SDS-PAGE dan *immunoblotting*.

SDS-PAGE dan *immunoblotting*

Untuk pemeriksaan SDS-PAGE dan *immunoblotting* diperlukan bahan antara lain: *lower tris base*, *acrylamide*, Bis, amonium persulfat, TEMED, SDS, *Tsis glycine*, *mercatoethanol*, *upper tris*, *bromophenol blue*, konjugate anti sapi IgG-HRP, *substrate diaminobenzidine* (DAB), *lower gel buffer*, *upper gel buffer*, kertas nertoselulose. Adapun cara pengerjaan SDS-PAGE dilakukan mengikuti prosedur LAEMMLI (1970).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *band* protein *B. abortus* antara S19, S544 dan isolat lapang (biotipe 1, 2 dan 3) tidak banyak berbeda. Komponen protein yang terdeteksi tersebut adalah protein dengan bobot molekul (BM) seperti terlihat pada Tabel 1. Perbedaan terjadi pada protein dengan BM 38 kDa, yaitu tidak terdeteksi pada S19 tetapi terdeteksi pada S544 dan isolat lapang.

Tabel 1. Hasil karakterisasi band protein *B. abortus* dengan SDS-PAGE

Jenis isolat <i>B. abortus</i>		Band protein yang terdeteksi (kDa)
Strain 19	(galur vaksin)	PU
Strain 544*)	(galur virulen)	PU + 38
Biotipe 1	(isolat lapang)	PU + 38
Biotipe 2	(isolat lapang)	PU + 38
Biotipe 3	(isolat lapang)	PU + 38

Keterangan :

kDa= Kilodalton

PU = Pola umum band protein yang dimiliki oleh semua isolat *B. abortus*, yaitu protein dengan bobot molekul (BM) : 94, 84, 71, 65, 58, 54, 36, 33, 30, 28, 23, 22, 17, 16 dan 15 kDa

+ = Band protein tambahan selain pola umum

*) = Strain 544 memiliki protein BM 33 kDa lebih dominan dibandingkan dengan isolat lain

Protein dengan BM 33 kDa terdeteksi paling dominan pada S544, dan dalam jumlah yang lebih kecil terdeteksi pada S19 dan isolat lapang.

Brucella abortus merupakan bakteri Gram negatif yang mempunyai komponen terdiri dari membran sitoplasma dan dinding sel (protein dan peptidoglikan) (DUBRAY, 1976). Protein luar *B. abortus* terdiri atas porin dari protein kelompok satu (BM 88-94 kDa), kelompok dua (35-40 kDa), dan kelompok tiga (25-30 kDa) VERSTREATE *et al.*, 1982; VERSTREATE dan WINTER, 1984). Penelitian ini juga memperlihatkan adanya protein tersebut yang berhasil dideteksi pada semua isolat *B. abortus* yang diteliti. Di sini terlihat bahwa protein dengan BM 38 kDa terdeteksi pada S544 dan isolat lapang (biotipe 1, 2 dan 3), tetapi tidak terdeteksi pada S19. Perbedaan juga terlihat pada protein dengan BM 33 kDa yang terdeteksi secara dominan pada S544, sedangkan isolat lainnya terdeteksi tetapi dalam jumlah kecil. Band protein *B. abortus* isolat lapang, yaitu antara biotipe 1, 2 dan 3 ternyata tidak menunjukkan perbedaan. Pada protein kelompok satu dan kelompok tiga tidak dijumpai perbedaan yang berarti. VERSTREATE *et al.* (1982) mengemukakan bahwa perbedaan yang terjadi pada protein kelompok dua dan tiga disebabkan oleh adanya perbedaan konsistensi asam amino penyusun protein tersebut. Namun demikian, antigen protein kelompok tiga terdapat pada semua galur *B. abortus*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum protein antara S19 dan isolat lapang tidak banyak berbeda, sehingga diharapkan penggunaan S19 untuk pengendalian brucellosis di Indonesia dapat memberi perlindungan secara baik terhadap infeksi isolat lapang.

Dalam karakterisasi protein antigenik didapatkan bahwa pada sapi, vaksinasi dengan *B. abortus* S19 terbentuk antibodi terhadap protein dengan bobot molekul berkisar dari 30-94 kDa. Antibodi tersebut bereaksi dengan protein dari kedelapan isolat *B. abortus* yang digunakan dalam penelitian ini. Sementara itu, protein dengan BM kurang dari 30 kDa tidak berhasil membentuk antibodi. Vaksin *B. abortus* S19 dapat membentuk antibodi secara dominan terhadap protein dengan BM 43 kDa, 35 kDa, dan 33 kDa, dan dalam jumlah yang lebih rendah terhadap protein dengan BM 94 kDa, 84 kDa, 71 kDa, dan 65 kDa.

Pada sapi vaksinasi S19 yang ditantang dengan isolat lapang biotipe 1 terbentuk antibodi terhadap protein dengan BM 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. Antibodi yang terbentuk bereaksi dengan protein antigenik, yang dipersiapkan dari delapan isolat yang diteliti (Tabel 2).

Pada sapi yang mendapat infeksi buatan dan infeksi alami dengan *B. abortus* biotipe 1 ternyata memberi hasil yang hampir sama. Kedua kelompok tadi mampu membentuk antibodi seperti halnya pada sapi vaksinasi yang ditantang tersebut (Tabel 2). Antibodi terhadap protein dengan BM 38 kDa ternyata tidak terdeteksi baik pada sapi yang mendapat infeksi buatan maupun infeksi alami.

Protein antigen yang bersifat antigenik ditandai dengan kemampuannya dalam menstimulasi respons kebal dalam tubuh inang. Pada kenyataannya tidak semua komponen protein antigenik kuman *B. abortus* mampu menimbulkan antibodi dalam tubuh inang. Dalam penelitian ini terlihat bahwa meskipun kuman *B. abortus* S19 dapat mendeteksi protein dengan bobot molekul rendah kurang dari 30 kDa, namun protein tersebut ternyata kurang berhasil menstimulasi produksi antibodi, sedangkan pada sapi yang mendapat infeksi buatan dan infeksi alami oleh *B. abortus* biotipe 1 isolat lapang sampai protein dengan BM 15 kDa ternyata mampu menstimulasi terbentuknya antibodi dalam inang.

Menurut VERSTREATE *et al.* (1982), protein kelompok dua (35-40 kDa) dan kelompok tiga (25-30 kDa) yang dimiliki *B. abortus* merupakan protein yang bersifat antigenik. Untuk itu kemungkinan tidak berhasilnya sapi yang mendapat vaksinasi *B. abortus* S19 membentuk antibodi terhadap protein dengan BM kurang dari 30 kDa ini dipengaruhi oleh sifat virulensi bakteri tersebut. Karena *B. abortus* S19 tidak bersifat virulen, maka kuman ini lebih mudah dan cepat dimusnahkan dan disingkirkan dari dalam tubuh inang,

Tabel 2. Reaksi silang antiserum poliklonal terhadap protein antigen *B. abortus*, dalam uji immunoblotting

Antiserum	Isolat <i>B. abortus</i>				
	S19	S544	Lapang 1	Lapang 2	Lapang 3*)
Vaksinasi dan infeksi buatan	PU	PU -38*	PU -38*	PU -38*	PU -38*
Vaksinasi	PU -(28,23,22, 17,16,15)	PU -(28,23,22, 17,16,15) -38*	PU -(28,23,22, 17,16,15) -38*	PU -(28,23,22, 17,16,15) -38*	PU -(28,23,22, 17,16,15) -38*
Infeksi buatan	PU	PU -38*	PU -38*	PU -38*	PU -38*
Infeksi alami	PU	PU -38*	PU -38*	PU -38*	PU -38*

Keterangan :

PU= Pola umum reaksi serum dengan segmen protein yang dimiliki oleh semua isolat *B. abortus*, yaitu protein dengan bobot molekul (BM) : 94, 84, 71, 65, 58, 54, 36, 33, 30, 28, 23, 22, 17, 16 dan 15 kDa.

+ = Protein tambahan yang bereaksi di luar pola umum

* = Protein tambahan yang tidak bereaksi

- = Protein dari pola umum yang tidak bereaksi lapang 1, 2 dan 3 *) = Isolat lapang biotipe 1, 2 dan 3

sehingga protein antigenik dengan BM kurang dari 30 kDa tersebut belum berhasil membentuk antibodi dalam tubuh inang. Sementara itu, pada sapi yang mendapat infeksi buatan dan infeksi alami oleh *B. abortus* biotipe 1 isolat lapang pada umumnya lebih bersifat virulen, sehingga lebih mampu membentuk antibodi sampai terhadap protein dengan BM yang rendah. Dari hasil pemantauan respon selorogis dengan ELISA juga terlihat bahwa sapi yang mendapat vaksinasi *B. abortus* S19 menghasilkan antibodi hanya dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan sapi yang mendapat infeksi alami dan infeksi buatan dengan *B. abortus* isolat lapang (SUDIBYO, 1994). Namun demikian, protein antigenik S19 dengan BM kurang dari 30 kDa yang tidak berhasil menimbulkan antibodi ini tidak berarti juga tidak bersifat antigenik pada tanggap-kebal seluler, karena menurut BROOKS-WORREL dan SPLITTER (1992), sapi yang mendapat vaksinasi *B. abortus* S19 ternyata sampai protein dengan BM kurang dari 30 kDa mampu menstimulasi proliferasi limfosit T secara baik. Antibodi terhadap protein dengan BM 38 kDa ternyata tidak terdeteksi pada serum sapi yang mendapat infeksi alami dan infeksi buatan dengan biotipe 1 isolat lapang. Dengan ditemukannya protein antigenik pada *B. abortus* biotipe 1 isolat lapang, serta protein spesifik yang ter-

deteksi hanya pada S19 atau isolat lapang, maka temuan ini dapat menjadi dasar dalam pengembangan reagen diagnosis dini terhadap brucellosis serta imunogen protektif.

KESIMPULAN

Secara umum antara *B. abortus* S19, S544 dan isolat lapang (biotipe 1, 2 dan 3) tidak ada perbedaan yang berarti dari *band* proteinnya, tetapi perbedaan terjadi pada sifat antigenisitasnya, yaitu pada protein dengan BM rendah kurang dari 30 kDa dan *B. abortus* S19 kurang bersifat antigenik dibandingkan dengan S544 dan isolat lapang.

DAFTAR PUSTAKA

ALTON, G.G. 1978. Recent development in vaccination against bovine brucellosis. *Aust. Vet.J.*54: 551-556.

BROOKS-WORREL, B.M. and G.A. SPLITTER. 1992. Antigens of *Brucella abortus* S19 immunodominant for bovine lymphocytes as identified by one-and-two-dimentional cellular immunoblotting. *Infect. Immun.* 60(6):2459-2464.

- DUBRAY, G. 1976. Localisation cellulaire des polyside de bacteries des genres *Brucella* et *Echericheria* en phaselisse (s) on rugueuse (r). *Ann. Microbiol.* 127:133.
- GOMEZ-MIQUEL, M.J. and I. MORIYON. 1986. Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of *Brucella* spp. *Infect. Immun.* 53:678-683.
- KANNENE, R.K. ANDERSON, C.C. MUSCOPLAT, and D.W. JOHNSON. 1979. Cell-mediated immune response in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 vaccine and non-exposed control animals of the same age. *Am. J. Vet. Res.* 40:999.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage-T4. *Nature* (London). 227:680-685.
- SUDIBYO, A. 1994. Studi Brucellosis dan Karakterisasi Protein Antigenik *Brucella abortus* Isolat Lapang pada Sapi Perah. Tesis Magister Sain, Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- TIZARD, I. 1982. *An Introduction to Veterinary Immunology*. 2nd Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA.
- VERSTREATE, D.R. and A.J. WINTER. 1984. Comparison of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiled and antigenic relatedness among outer membran protein of 49 *Brucella abortus* strains. *Infect. Immun.* 48:182-187.
- VERSTREATE, D.R., M.T. CREAY, N.T. CAVENY, C.L. BALDWIN, M.W. BALD, and A.J. WINTER. 1982. Outer membrane protein of *Brucella abortus*: Isolation and characterization. *Infect. Immun.* 35:979-989.