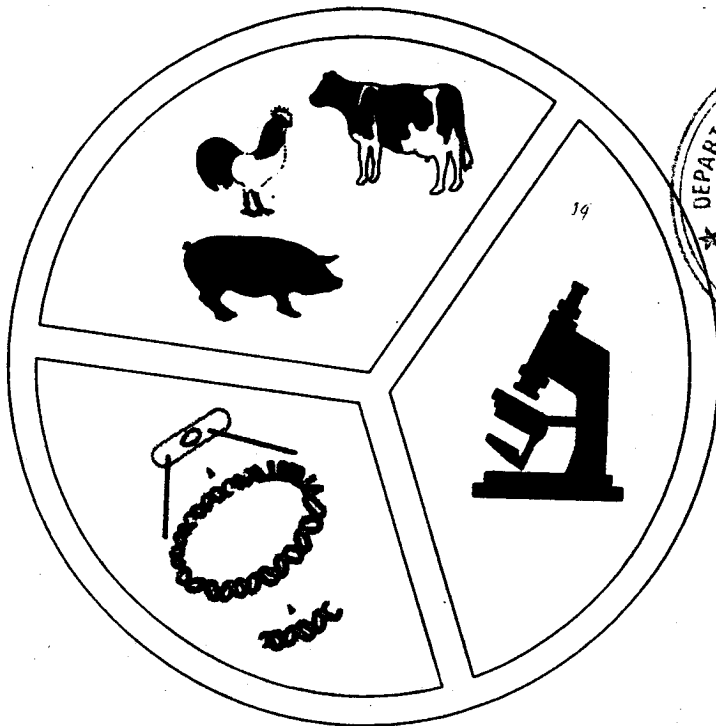


PROSIDING

SEMINAR NASIONAL TEKNOLOGI VETERINER UNTUK MENINGKATKAN KESEHATAN HEWAN DAN PENGAMANAN BAHAN PANGAN ASAL TERNAK

CISARUA, BOGOR 22 -24 MARET 1994



 **BALAI PENELITIAN VETERINER
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN
DEPARTEMEN PERTANIAN**

BOGOR, 1995

DAFTAR ISI

Halaman

Kata Pengantar	i
Materi Arahan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian	xiii

I. MAKALAH UNDANGAN

Pembinaan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak (<i>Soehadji</i>).....	1
Peranan Pusat Antar Universitas (PAU) - Bioteknologi dalam Menunjang Penelitian Teknologi Veteriner untuk Meningkatkan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak (<i>Widya Asmara dan Wayan T. Artama</i>)	16
Peranan Perguruan Tinggi Dalam Pembinaan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak (<i>Emir A. Siregar</i>)	20
Keterpaduan Penelitian Veteriner Dalam Kegiatan IPTEKVET untuk Menunjang Pembangunan Subsektor Peternakan pada Pelita VI (<i>Sjamsul Bahri</i>)	29 ^v
Peluang Kerjasama Antar Swasta Nasional dan Lembaga Penelitian Pemerintah dalam Meningkatkan Upaya Pembinaan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak (<i>Tjiptardjo Pronohartono</i>)	40
Peranan Lembaga Swadaya Masyarakat dalam Meningkatkan Upaya Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak (<i>M. Yani</i>)	47
Peluang Kerjasama Penelitian Bidang Veteriner pada Tingkat Internasional (<i>Jan Nari</i>)	51
The Application of Serological, Biochemical and Molecular Techniques for The Differentiation of Stocks of <i>Trypanosoma evansi</i> (<i>Tudor W. Jones</i>)	56
Validation of Enzyme Linked Immunosorbent Immunoassays in The Diagnosis and Control of <i>Trypanosoma evansi</i> in South East Asia (<i>A. G. Luckins</i>).....	62
The Development of Vaccines for The Control of <i>Fasciola hepatica</i> Infection in Ruminants (<i>Terry W. Spithill</i>)	69
Residu dan Cemaran dalam Bahan Pangan Asal Hewan (<i>T.B. Murdiati dan Sjamsul Bahri</i>)	74
Application of PCR to The Identification of Sheep Associated MCF Virus (SA-MCF) in Both Natural and Dead End Hosts (<i>H. W. Reid and S. F. Baxter</i>)	82

Potensi pemakaian vaksin gomboro inaktif strain lokal pada ayam broiler yang ditantang dengan virus IBD lapang (Arini N., Sumpena N.J. dan Pudjiastono)	149
B. Bakteriologi	
Diagnosis Enterotoksemia pada Sapi dan Kerbau di Indonesia ✓(L. Natalia)	150 [✓]
Seroepidemiologi Erysipelas pada Babi di Beberapa Daerah di Indonesia ✓(S. Chotiah dan Agus Sudibyo)	154 [✓]
Studi Retrospektif Laboratorik Antraks di Indonesia 1973–1992 ✓(M. Bhakti Purwadikarta, S. Hardjoutomo dan E. Martindah)	159 [✓]
Kloning Molekul DNA Genomik <i>Escherichia coli</i> Enterotoksigenik Tipe 987p: Sebuah Kajian Mengenai Pengembangan Vaksin Secara Rekayasa Genetik ✓(Kusmiyati, Supar dan G.R. Moekti)	165 [✓]
Distribusi Infeksi <i>Escherichia coli</i> Enterotoksigenik pada Anak Babi di Sumatera Utara dan Prospek Pengendaliannya dengan Vaksin ✓(Supar)	173 [✓]
Evaluasi Mengenai Spesifisitas Antibodi Monoklonal K99 Terhadap Antigen Perekatan <i>Escheri coli</i> Enterotoksigenik ✓(Gozali Moekti, Supar dan Kusmiati)	180 [✓]
Patogenitas kuman <i>Mycoplasma gallisepticum</i> pada ayam potong ✓(Soeripto, M.B. Poerwadikarta dan Z. Layla)	189 [✓]
Vaksin Mati <i>Mycoplasma gallisepticum</i> untuk Penanggulangan Penyakit Pernafasan Menahun Kompleks pada Ayam ✓(Soeripto)	197 [✓]
Pereaksi IPB-1 untuk Deteksi Mastitis Sub-klinis (Mirnawati S., C.S.Leksmono, D.W. Lukman dan M. Fahrudin)	204
Membandingkan Mutu antara Tuberkulin PPD Bovine Buatan Balitvet Bogor dan Tuberkulin PPD Bovine Buatan CSL Melbourne ✓(Suprodjo H. dan Agus Nurhadi)	210 [✓]
Sensitivitas Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dalam Diagnosis Leptospirosis pada Manusia ✓(M.Darodjat)	218
C. Parasitologi	
Gambaran Zat Anti <i>Toxoplasma Gondii</i> pada Kelompok Dokter Hewan di Jakarta (C.Kusharyono, W. Cecilia dan T. Indrianto)	219
Potensi Berbagai Penyakit dalam Menurunkan Tingkat Produksi pada Sapi Perah di Kabupaten Sumedang (N.Supriatna)	223
Penyakit pada Hewan Percobaan di Indonesia yang Dipelihara Secara Konvensional (Rabea P.J., M. Edhie Sulaksono, Siti Sundari dan Subahagio)	229

KLONING MOLEKUL DNA GENOMIK *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOKSIGENIK 987P: SEBUAH KAJIAN MENGENAI PENGEMBANGAN VAKSIN SECARA REKAYASA GENETIKA

KUSMIYATI, SUPAR, dan G.R. MOEKTI

Balai Penelitian Veteriner, Bogor

ABSTRAK

Untuk mengetahui fragmen *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang mengendalikan sintesis antigen perlekatan (adhesin) pada *Escherichia coli* enterotoksigenik 987P, upaya kloning molekul DNA genomik bakteri tersebut telah dilakukan. Dalam penelitian ini, molekul DNA genomik diekstraksi dari kuman *E. coli* 987P isolat lapang, dan difragmentasi dengan enzim restriksi *Sau3A* atau *EcoRV*. Fragmen-fragmen DNA yang diperoleh selanjutnya diligasikan pada vektor phagemid pBluecript II SK untuk menghasilkan "gene library". Pengekspresian sifat DNA rekombinan dilakukan dalam *E. coli* XL1-Blue. Sifat pertumbuhan dari semua mutan pembawa DNA rekombinan yang diperoleh diuji di dalam medium spesifik penumbuh adhesin 987P. Sebanyak lima belas mutan terpilih untuk diperiksa secara serologik kualitatif menggunakan antiserum spesifik 987P yang dibuat pada kelinci, tiga belas di antaranya terbukti mampu mengekspresikan senyawa polipeptida homolog dengan antibodi 987P. Fragmen DNA yang berhasil diklon pada penelitian ini diduga terletak di sekitar untai nukleotida yang mengendalikan sintesis antigen adhesin 987P. Analisis lebih lanjut masih perlu dilakukan untuk mengetahui urutan nukleotida pengendali produksi adhesin 987P, sifat mutan hasil rekombinan, dan potensi dari senyawa yang dihasilkan mutan sebagai vaksin sub-unit.

ABSTRACT

In order to analyse DNA fragments encoding synthesis of adhesin antigens in enterotoxigenic *Escherichia coli* 987P, a blind molecular cloning was undertaken. Genomic DNA was extracted from field isolates of *E. coli* bearing 987P adhesin, and fragmented utilizing restriction enzymes *Sau3A* or *EcoRV*. The fragmented genomic DNA was then used to generate libraries in the *E. coli* XL1-Blue expression system employing phagemid pBluecript II SK vector. All clones suspected recombinant DNA were grown on selective medium for propagating 987P adhesin antigen. Six recombinant clones (mutants) were selected to be tested serologically using antiserum anti 987P adhesin antigen raised in rabbits. Of the 15 mutants, 13 of which were found to be able to express a homologous polypeptide compound against 987P anti adhesin antibody. The present study may therefore suggest that a DNA fragment clone is located in the area of coding sequence for the synthesis of adhesin antigen in enterotoxigenic *Escherichia coli* 987P. Further studies may be required particularly in connection to the determination of the sequence of DNA fragment clone, expression of gene clone, and the potential use of expressing components as sub-unit vaccines.

PENDAHULUAN

Kasus kolibasillosis atau diare neonatal pada anak babi yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* enterotoksigenik (ETEC) 987P banyak terjadi di Indonesia. Kolibasillosis dapat mengakibatkan kerugian ekonomi, karena terbukti dapat menimbulkan angka kematian yang cukup tinggi terutama pada anak babi penderita diare berumur antara satu sampai dua minggu (Supar *et al.*, 1989, 1991).

E. coli yang bersifat patogen enterik mampu menempel pada permukaan usus halus melalui

perantara antigen perlekatan (adhesin) atau dikenal sebagai antigen fimbrial 987P, dan selanjutnya kuman tersebut mampu memproduksi enterotoksin yang dapat mengakibatkan diare (Gaastra and de Graaf, 1982).

Antigen perlekatan 987P merupakan senyawa protein yang imunogenik dan dapat dipakai sebagai bahan vaksin (Supar and Hirst, 1990; 1991). Determinan genetik yang bertanggung jawab terhadap sintesis sub unit antigen perlekatan 987P tersebut terdapat di dalam kromosom (Dougan and Morrissey, 1984/1985).

Upaya penanggulangan kolibasilosis neonatal dengan antibiotika banyak dilakukan di lapangan, tetapi kurang efektif, karena tingkat resistensi isolat *E. coli* penyebab penyakit tersebut terhadap beberapa sediaan antibiotika yang sering dipakai di lapangan cukup tinggi (Supar *et al.*, 1990). Hewan neonatal yang peka terhadap *E. coli* enterotoksigenik dapat dikembalikan secara pasif melalui vaksinasi induk dengan antigen adhesin yang bersifat imunogenik pada masa akhir kebuntingan (Nagy *et al.*, 1985)

Dewasa ini telah dilakukan penelitian pembuatan vaksin ETEC dari isolat lapang yang mempunyai beberapa macam antigen perlekatan (K88, K99, F41 dan 987P) dengan metode konvensional (Supar and Hirst, 1990; 1991a; 1991b). Akan tetapi dengan metode konvensional tersebut masih dijumpai kesulitan dalam mendapatkan konsentrasi antigen perlekatan yang optimal. Oleh karena itu perlu diadakan penelitian rekayasa genetika untuk membuat galur mutan *E. coli* yang mampu memproduksi adhesin secara optimal.

Pada kesempatan ini dikemukakan hasil pendahuluan rekayasa gena pengendali sintesis adhesin 987P.

BAHAN DAN CARA

Phagemid bluescript

Vektor yang digunakan dalam penelitian ini yakni phagemid pBluescript II SK (Stratagene) berukuran 2,96 kilo pasang basa (kb) yang dimasukkan ke *E. coli* XL1-Blue. Phagemid diisolasi dengan metoda seperti yang diuraikan oleh Brown (1990), secara singkat adalah sebagai berikut: *E. coli* XL1-blue yang membawa phagemid Bluescript ditumbuhkan di dalam medium Lauria Bertoni (LB) broth mengandung ampisilin, inkubasi pada 37°C selama satu malam dengan alat pengocok, kemudian dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C.

Endapan sel yang diperoleh selanjutnya disuspensikan dalam buffer (glucose, EDTA, Tris-HCl pH 8,0 yang mengandung lysozyme 2 mg per ml) dan diinkubasi pada es mencair selama 10 menit. Buffer lisis (0,2 M NaOH, 1% SDS) ditambahkan ke dalam larutan tersebut dan diinkubasikan di es selama 10 menit. Setelah itu ditambah larutan 5 M potasium asetat pH 4,8 dan disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Ekstraksi DNA kemudian dilakukan dengan menggunakan phenol-chloroform. Molekul DNA diendapkan dengan ethanol absolut dan dicuci dengan ethanol 70%. Endapan DNA dikeringkan dan selanjutnya disuspensikan dalam buffer Tris-EDTA. Phagemid Bluescript yang diperoleh diperiksa kemurniannya dengan elektroforesis. Setelah itu larutan phagemid direaksikan dengan enzim restriksi *Bam*HI atau *Eco*RV (Boehringer Mannheim).

Isolasi DNA genomik dan pembuatan DNA rekombinan

Bakteri yang digunakan di dalam penelitian ini ialah *E. coli* 987P (1078) yang diisolasi dari anak babi penderita diare.

DNA genomik diisolasi mengikuti prosedur yang diuraikan oleh Brown (1990). Secara singkat adalah sebagai berikut: *E. coli* 987P ditumbuhkan di dalam medium LB-broth, inkubasi pada 37°C selama satu malam sambil dikocok. Sel dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Endapan sel bakteri yang diperoleh selanjutnya disuspensikan dalam buffer lisis mengandung proteinase K dan SDS 1%. Setelah sel lisis, DNA genomik diekstraksi dengan menggunakan phenol dan ekstraksi kedua dengan phenol-chloroform. Molekul DNA yang terlarut diendapkan dengan ethanol absolut dan dicuci dengan ethanol 70%. Endapan dikeringkan dengan eksikator vakum dan kemudian disuspensikan di dalam buffer Tris-EDTA pH 7,5,

dan disimpan pada suhu 4°C sampai proses berikutnya.

Suspensi molekul DNA yang diperoleh pada perlakuan di atas kemudian direaksikan dengan enzim restriksi endonuklease *Sau3A* atau *EcoRV* (Boehringer Mannheim). Hasil proses restriksi diperiksa secara elektroforesis gel agarose. Molekul DNA yang telah dipotong secara enzimatis diligasikan pada phagemid Bluescript yang telah dipotong dengan enzim restriksi *BamHI* atau *EcoRV*. Reaksi ligasi tersebut menggunakan enzim T4 ligase (Boehringer Mannheim) dan diinkubasikan pada suhu 15°C selama satu malam. Sebelum transformasi, larutan tersebut di atas diperiksa secara elektroforesis gel agarose.

Pembuatan sel kompeten dan transformasi

E. coli galur XL1-blue, yang akan digunakan sebagai sel inang (untuk ekspresi rekombinan), ditumbuhkan di dalam medium LB-broth. Kultur tersebut diletakkan pada alat pengocok dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu malam. Kultur tersebut diinokulasikan ke dalam medium LB-broth, diinkubasikan pada suhu 37°C dengan pengocokan selama 3 jam atau sampai mencapai kekeruhan pada OD₆₀₀ = 0,3-0,5. Sel dipanen dengan cara sentrifugasi dan dicuci dengan larutan yang terdiri dari RbCl₂, MnCl₂, CaCl₂, potasium asetat, dan glyserol.

Setelah sentrifugasi endapan sel disuspensikan dalam larutan yang terdiri dari RbCl₂, CaCl₂, MOPS, dan glyserol, kemudian suspensi tersebut dibagi-bagi ke dalam tabung eppendorf masing-masing berisi 200 µl.

Sebanyak 2 µl larutan fragmen DNA hasil ligasi di atas dimasukkan ke dalam 100 µl suspensi sel kompeten kemudian campuran tersebut disimpan di dalam es mencair beberapa saat. Setelah itu dipanaskan pada suhu 42°C selama 45 detik, kemudian dipindahkan pada es

yang sedang mencair selama 2 menit. Ke dalam reaksi ini ditambahkan 0,9 ml medium LB-broth yang mengandung ampisilin dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 jam. Sebanyak 0,1 ml kultur transformasi tadi disubkultur pada medium LB-agar mengandung ampisilin dan diratakan ke seluruh permukaan agar, selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu malam.

Seleksi DNA rekombinan pada *E. coli* XL1-Blue

Koloni yang tumbuh pada LB-agar mengandung ampisilin, merupakan sel *E. coli* XL1-blue yang membawa phagemid Bluescript, sedangkan yang tidak membawa tidak dapat tumbuh.

Koloni bakteri yang tumbuh pada LB-agar dipilih dan disubkultur pada LB-broth diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu malam sambil dikocok. Phagemid diisolasi menurut prosedur seperti tersebut di atas. DNA phagemid yang diperoleh dipotong dengan enzim endonuklease *EcoRI* atau *HindIII* (Boehringer Mannheim) dan hasilnya diperiksa secara elektroforesis gel agarose. Metode ini untuk mengetahui adanya fragmen DNA genomik yang masuk pada phagemid Bluescript. Phagemid yang lebih besar dari 2,96 kb terjadi pemasukan fragmen DNA genomik *E. coli* 987P (1078).

Uji ekspresi rekombinan

Klon *E. coli* XL1-Blue yang membawa phagemid rekombinan lebih besar dari 2,96 kb diuji untuk menentukan keberadaan sifat ekspresi antigen 987P. Beberapa klon *E. coli* pembawa gena rekombinan (mutan) dari hasil seleksi di atas ditumbuhkan pada medium spesifik yang tidak mengandung protein dan asam amino. Media tersebut terdiri dari Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NH₄Cl, CaCl₂, MgSO₄, dan glukose sebagai sumber energi (Supar 1993, data tidak

dipublikasi). Media tersebut disiapkan dalam bentuk cair, sebanyak 200 ml, dengan pH 7,2. Setelah inokulasi, kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 5-10 hari, kemudian sel dipanen dengan cara sentrifugasi pada 8000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Endapan dilarutkan dengan NaCl fisiologis dan selanjutnya diperiksa secara aglutinasi dengan antibodi spesifik 987P.

Pembuatan antigen 987P dan antiserum spesifik 987P

Bakteri *E. coli* tipe 987P galur acuan (M987P) ditumbuhkan dalam medium cair *Tryptic Soy Broth* (TSB) di dalam tabung reaksi dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 7-10 hari pada kondisi statis. Pelikel yang terbentuk pada permukaan atau endapan pada dasar tabung selanjutnya dipakai untuk menginokulasikan agar darah 5% kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C. Sel kuman yang tumbuh dipanen dan disuspensikan di dalam larutan NaCl fisiologis 0,85% yang mengandung 0,1% formalin. Suspensi sel selanjutnya disentrifugasi pada 3000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Pelet sel disuspensikan dalam NaCl fisiologis 0,85% dan kepadatan sel di dalam suspensi diukur sampai kekeruhan larutan setara dengan tabung McFarland nomor 10. Sebanyak 0,25 ml suspensi sel tersebut disuntikkan pada kelinci secara subkutan, kemudian selang 4 hari kelinci disuntik dengan dosis bertingkat secara intra vena. Tujuh hari setelah penyuntikan terakhir, darah kelinci diambil dan serum dipisahkan dan disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Antiserum 987P yang telah dihasilkan diabsorpsi dengan sel kuman galur yang homolog dan ditumbuhkan pada medium agar pada suhu 18°C selama 5 hari, absorpsi dilakukan 3 kali. Spesifisitas dari antiserum monospesifik tersebut diuji dengan metoda aglutinasi terhadap antigen galur acuan *E. coli* yang homolog dan heterolog dan ditumbuhkan pada suhu 18°C dan 37°C.

Reagen koaglutinasi

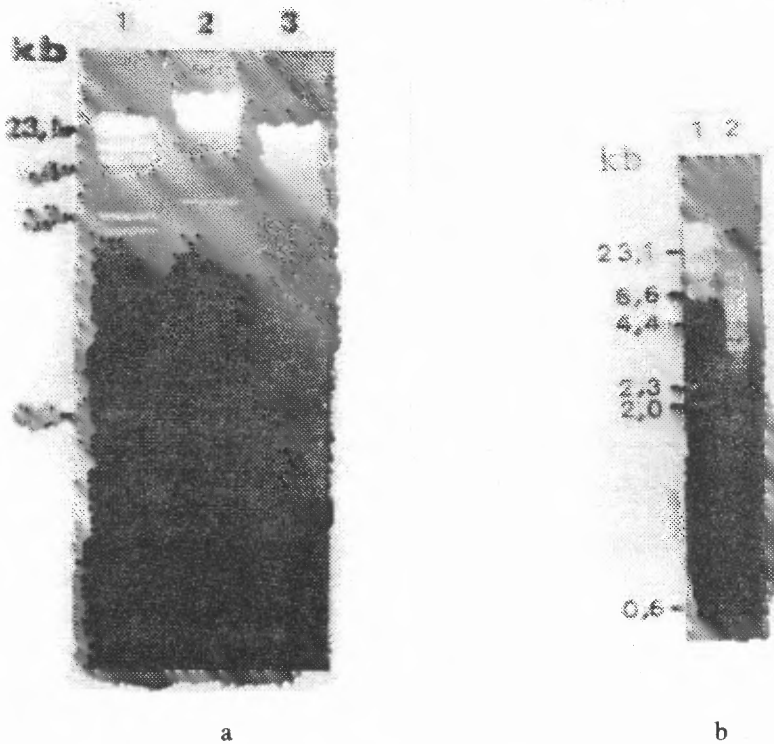
Reagen koaglutinasi dibuat menurut metode yang diuraikan Supar (1990), yang secara singkat adalah sebagai berikut. Sebanyak 4 ml kultur bakteri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ditumbuhkan di dalam medium TSB dan diinkubasikan pada 37°C selama satu malam. Setelah itu, kultur ditambahkan 20 ml phosphate bufer salin (PBS) dan dibiarkan selama 10 menit kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Endapan sel dicuci dengan PBS, 3 kali dan disentrifugasi, lalu sel disuspensikan dalam PBS mengandung 0,5% formalin dan disimpan pada suhu ruangan selama 3 jam. Setelah itu sel dicuci kembali 3 kali dengan PBS dan disentrifugasi. Pelet sel disuspensikan dalam PBS sampai konsentrasi sel 10% (v/v), dipanaskan di penangas air pada suhu 80°C selama 1 jam kemudian didinginkan. Ke dalam suspensi sel ditambahkan 10% sodium azide, dan disimpan pada suhu 4°C sampai proses selanjutnya.

Sebanyak 0,9 ml suspensi sel yang telah diperoleh ditambahkan 0,1 ml antiserum spesifik 987P, dicampur dan dibiarkan pada suhu ruangan selama 3 jam, digoyang setiap setengah jam. Spesifikasi diuji dengan galur yang homolog dan heterolog seperti di atas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Molekul DNA genomik dari *E. coli* 987P (1078) difragmentasi dengan enzim restriksi *Sau3A* atau *EcoRV*, menghasilkan sejumlah fragmen DNA. Hasil restriksi molekul DNA tersebut diperlihatkan dengan elektroforesis gel agarose 0,8% seperti pada Gambar 1.

Hasil reaksi ligasi fragmen-fragmen DNA genomik pada DNA phagemid Bluescript ditransformasi pada *E. coli* XL1-blue. Dari transformasi ini dihasilkan koloni-koloni bakteri



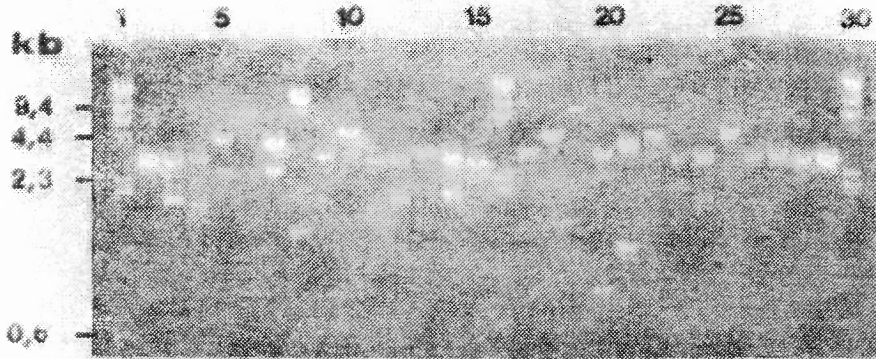
Gambar 1. Gambaran elektroforetik DNA genomik yang telah difragmentasi dengan enzim restriksi *Sau3A* atau *EcoRV*. Penanda DNA lambda dipotong dengan *HindIII* (kolom 1 gambar 1a dan 1b); DNA genomik *E. coli* 987P (kolom 2 gambar 1a); DNA genomik 987P yang difragmentasi dengan enzim restriksi *Sau3A* (kolom 3 gambar 1a); DNA genomik 987P yang difragmentasi dengan enzim restriksi *EcoRV* (kolom 2 gambar 1b)

yang mampu tumbuh pada medium LB-agar mengandung ampisilin, karena phagemid Bluescript mempunyai gena resistensi terhadap ampisilin. Koloni bakteri yang tumbuh tersebut adalah *E. coli* XL1-Blue yang membawa phagemid rekombinan (DNA rekombinan). DNA phagemid rekombinan diisolasi kembali dan diperiksa secara elektroforesis gel agarose 0,8%, memiliki ukuran yang lebih besar daripada ukuran DNA vektor (Gambar 2a, 2b, dan 2c). Hal ini memberikan petunjuk adanya fragmen DNA genomik masuk ke dalam phagemid Bluescript di daerah multiple kloning pada lokus *BamHI* atau *EcoRV*.

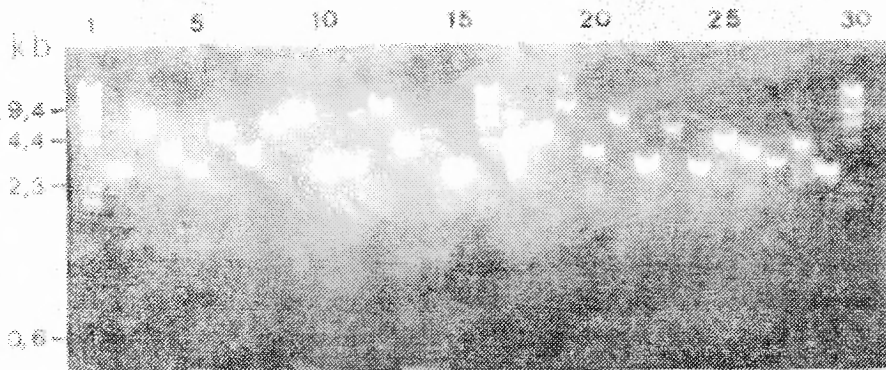
Mutan *E. coli* XL1-Blue yang membawa DNA phagemid rekombinan diuji sifat

pertumbuhannya di dalam medium spesifik penumbuh adhesin 987P (tanpa protein dan asam amino). Sebanyak 15 mutan diperiksa secara serologik kualitatif dengan antiserum spesifik 987P yang dibuat pada kelinci, 13 diantaranya mampu mengekspresikan senyawa polipeptida homolog dengan antiserum spesifik 987P (Tabel 1).

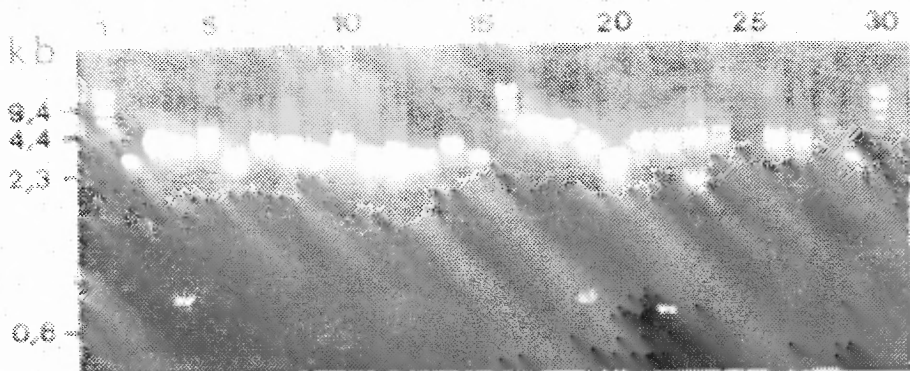
Fragmen DNA yang berhasil diklon pada penelitian kali ini diduga terletak di sekitar untai nukleotida yang mengendalikan sintesis adhesin 987P. Analisis lebih lanjut masih perlu dilakukan untuk mengetahui urutan nukleotida pengendali produksi adhesin 987P, sifat mutan hasil rekombinan, dan potensi dari senyawa yang dihasilkan mutan sebagai vaksin sub-unit.



Gambar 2a. Gambaran elektroforetik DNA transforman pada gel agarose 0,8%. Penanda DNA lambda dipotong dengan *Hind*III (kolom 1, 16, dan 30); DNA phagemid Bluescript (kolom 2, 15, dan 29); DNA rekombinan (kolom 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, dan 25)



Gambar 2b. Gambaran elektroforetik DNA transforman pada gel agarose 0,8%. Penanda DNA lambda dipotong dengan *Hind*III (kolom 1, 16, dan 30); DNA phagemid Bluescript (kolom 2, 15 dan 29); DNA rekombinan (kolom 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 27, dan 28)



Gambar 2c. Gambaran elektroforetik DNA transforman pada gel agarose 0,8%. Penanda DNA lambda yang dipotong dengan *Hind*III (kolom 1, 16, dan 30); DNA phagemid Bluescript (kolom 2, 15, dan 29); DNA rekombinan (3, 4, 5, 7, 10, 14, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 26, 27, dan 28)

Tabel 1. Hasil pengujian ekspresi mutan rekombinan secara serologik kualitatif

Kode mutan rekombinan	Antibodi 987P dibuat pada kelinci			
	Antibodi 987P dari isolat <i>E. coli</i> 1078		Antibodi 987P dari isolat <i>E. coli</i> M987P	
	Serum	Koaglutinasi	Serum	Koaglutinasi
Rk1	-	-	-	-
Rk2	+	+	+	+
Rk3	+	+	+	+
W3	+	+	+	+
W4	+	+	+	+
W14	+	+	+	+
W16	+	+	+	+
E42	+	+	+	+
E58	+	+	+	+
E103	-	-	-	-
E25	+	+	+	+
E48	+	+	+	+
E60	+	+	+	+
E76	+	+/-	+	+/-
E81	+	+/-	+	+

- tidak aglutinasi
- +/- aglutinasi lambat dan halus
- + aglutinasi sedang
- ++ aglutinasi kasar

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan atas bantuan proyek Agricultural Research Management (ARM), untuk itu penulis menyampaikan terima kasih. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Nina Kurniasih, Djaenuri, Agus Wahyudin dan Suryono atas bantuan teknis dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown, T.A. 1990. Essential Molecular Biology volume I: A practical approach. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Dougan, G. and P. Morrissey. 1984/85. Molecular analysis of the virulence determinants of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from domestic animals: applications for vaccine development. *Veterinary Microbiology* 10 : 241-257.
- Gastra, W. and F.K. de Graaf. 1982. Host-specific fimbrial adhesins of non invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* 46: 129-161.
- Nagy, L.K., T. MacKenzie and K.R. Painter. 1985. Protection of the nursing pig against experimentally induced enteric colibacillosis by vaccination of dam with fimbrial antigens of *Escherichia coli* (K88, K99, and 987P). *Vet. Rec.* 117:408-413.
- Supar, R.G. Hirst and B. Patten. 1989. The detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* with F41 fimbrial antigen from pigs in Indonesia. *Penyakit Hewan* 21(37):13-17.
- Supar, R.G. Hirst and B. Patten. 1990. Antimicrobial drug resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99, F41 and 987P isolated from piglets in Indonesia. *Penyakit Hewan* 22(39):13-19.
- Supar and R.G. Hirst. 1990. Development of whole cell vaccine from *Escherichia coli* bearing K88, K99, F41 and 987P fimbrial antigens: Vaccine field trials to control piglet neonatal colibacillosis. *Penyakit Hewan* 22 (40):69-75.
- Supar. 1990. Enteric colibacillosis in pigs (and calves) in Indonesia. Thesis for the degree of Doctor of

Philosophy in the graduate School of Tropical Veterinary Science and Agriculture at James Cook University of North Queensland.

Supar and R.G. Hirst. 1991a. Development of cell vaccine from *Escherichia coli* bearing K88, K99, F41 and 987P fimbrial antigens: The relationship between colostral

IgA and IgG antifimbrial antibodies and protection. *Penyakit Hewan* 23 (42):1-11.

Supar and R.G. Hirst. 1991b. Development of cell vaccine from *Escherichia coli* bearing K88, K99, F41 and 987P fimbrial antigens: Studie on the immunogenicity of the fimbrial antigens. *Penyakit Hewan* 23 (41):1-10.

JAN
FEB
MAY
JUN
JUL
AUG
SEP
OCT
NOV
DES