

DETEKSI BRUCELOSIS PADA SUSU SAPI DENGAN UJI POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Detection of Brucellosis in Bovine Milk by Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay

Susan M. Noor¹, Pratiwi Sudharmono², Asmarani Kusumawati³, dan Anis Karuniawati²

¹Departemen Bakteriologi Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor

²Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta

³Bagian Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: susan_yurismono@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mendeteksi brucellosis pada sampel susu sapi dengan uji *polymerase chain reaction* (PCR) dan membandingkan tingkat sensitivitas dan spesifisitasnya dengan metode *milk ring test* (MRT). Sebanyak 24 sampel susu sapi yang dikoleksi secara aseptik dari lapang diuji PCR dan MRT. Hasil pengujian menunjukkan bahwa 79,17% (19/24) sampel susu positif brucellosis dengan uji PCR dan 83,33% (20/24) dengan uji MRT. Sensitivitas dan spesifisitas PCR mendeteksi brucellosis masing-masing sebesar 75 dan 100% dibandingkan dengan uji MRT.

Kata kunci: *Brucella abortus*, PCR, MRT, susu, sensitivitas, spesifisitas

ABSTRACT

This study was conducted to detect brucellosis in bovine milk using polymerase chain reaction (PCR) and compare its sensitivity and specificity to milk ring test (MRT). Twenty four bovine milk were aseptically collected from the field and then analyzed using PCR and MRT for tuberculosis incidence. The results showed that 79.17% (19/24) of bovine milk samples indicated a positive result with PCR assay and 83.33% (20/24) showed positive reaction with MRT. Polymerase chain reaction sensitivity and specificity to detect brucellosis in milk samples were 75 and 100%, respectively compared to those of MRT.

Key words: *Brucella abortus*, PCR, MRT, milk, sensitivity, specificity

PENDAHULUAN

Brucellosis merupakan salah satu penyakit zoonosis yang berimplikasi serius pada kesehatan hewan dan manusia (OIE, 2004) dan masih terus dilaporkan sampai sekarang ini (FAO, 2010). Brucellosis disebabkan oleh bakteri Gram negatif *coccobacilli* dari genus *Brucella* (Corbel, 1997). Brucellosis di Indonesia bersifat endemis pada ternak sapi dengan kerugian ekonomi mencapai Rp 138,5 miliar setiap tahun (Dirjennak, 2006). Infeksi brucellosis pada sapi mengakibatkan abortus dan menurunkan tingkat produksi susu. Setelah masa akut penyakit ini berakhir, hewan dapat menunjukkan sedikit atau tanpa gejala penyakit. Kuman *Brucella* dapat berada di nodus limfatikus *supramammary* dan kelenjar susu pada 80% sapi yang terinfeksi dan sapi akan terus mengeluarkan patogen dalam cairan tubuh (Morgan dan McDiarmid, 1960; Nicoletti, 1980).

Gejala klinis brucellosis sangat tidak spesifik, sehingga untuk peneguhan diagnosis penyakit harus dilakukan dengan pemeriksaan laboratorium (Young, 1995; Colmenero *et al.*, 1996). Diagnosis brucellosis secara isolasi merupakan standar baku (*gold standard*) namun sensitifitasnya rendah (50-70%) dan menurun pada stadium kronis, sedangkan uji serologis tidak cukup spesifik pada daerah endemik brucellosis (Young, 1995; Ariza *et al.*, 2002). Diagnosis brucellosis dengan *milk ring test* (MRT) mempunyai sensitivitas sangat tinggi namun spesifisitasnya rendah sehingga hasil uji sering terjadi reaksi positif palsu.

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan metode diagnosis molekuler yang sangat potensial dan

menjanjikan untuk diagnosis brucellosis karena hasilnya akurat, spesifik, dan cepat untuk deteksi *Brucella* pada sampel susu dan jaringan terkontaminasi walaupun dengan jumlah sampel sedikit (Fekete *et al.*, 1990; Fekete *et al.*, 1992; Herman dan de Ridder, 1992; Leal-Klevezas *et al.*, 1995; Gallien *et al.*, 1998; Bricker, 2002). Berbagai target gen yang berbeda, pasangan primer, teknik, dan prosedur ekstraksi telah dikembangkan untuk deteksi *deoxyribonucleic acid* (DNA) *Brucella*. Berbagai region genom *Brucella* telah berhasil diidentifikasi dengan teknik PCR ini, yaitu: IS711/IS6501 (Bricker dan Halling, 1994; Ouahrani-Bettache *et al.*, 1996), 16S rRNA (Herman dan de Ridder, 1992; Romero *et al.*, 1995), 31 kDa omp (Baily *et al.*, 1992; Gallien *et al.*, 1998; Sreevatsan *et al.*, 2000), 43 kDa omp (Fekete *et al.*, 1990), omp2 (Leal-Klevezas *et al.*, 1995), dan BCSP31 (Guarino *et al.*, 2000).

MATERI DAN METODE

Koleksi Sampel Susu

Sebanyak 20 ml susu sapi dikoleksi secara aseptik dari keempat kwartir ambing dan disimpan dalam pendingin sebelum dibawa ke laboratorium. Sampel susu tersebut dideteksi terhadap brucellosis dengan uji PCR dan MRT.

Deteksi Brucellosis dengan Uji PCR

Ekstraksi DNA

Deoxyribonucleic acid dari sampel susu diekstraksi menggunakan 1 ml susu dalam alikotot dan disentrifus

pada 6.000 g selama 10 menit. Cairan bening dibuang dengan menggunakan transfer *pipette*, endapan susu dan lemak ditambah *double-distilled water sterile* sampai 200 μ l sebelum diekstraksi dengan QIAmp DNA *extraction kit* (Qiagen). *Proteinase K* sebanyak 25 μ l ditambahkan dalam tabung tersebut dan dilakukan *vortex* sampai homogen. Kemudian ditambahkan 200 μ l *lysis buffer* dan diinkubasi pada 70° C selama 30 menit. Selanjutnya, ditambahkan 200 μ l etanol, *vortex*, dan sampel dipindahkan ke dalam *minicolumn* dan diproses sesuai dengan instruksi protokol. *Deoxyribonucleic acid* diekstraksi dengan 50 μ l *double-distilled deionized water sterile*, dan disimpan pada suhu -20° C sebelum digunakan.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan 2 pasangan primer yaitu 16S rRNA: Urutan *forward* primer 5'-TGCAATACCGTATGTGCTT-3' dan *reverse* primer 5'-TTGACATCCCGGTCGCGTTA-3' (Herman dan de Ridder, 1992) dan *omp2* primer: urutan *forward* primer 5'-GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA-3', dan *reverse* primer 5'-ACCAGCCATTGCGGTCGGTA-3' (Leal-Klevezas *et al.*, 1995). Semua amplifikasi PCR dikerjakan dengan menggunakan *platinum PCR supermix high fidelity* (Invitrogen™) dengan volume akhir 25 μ l, dengan 1 μ l sampel DNA, dan 20 pmol primer. Reaksi PCR menggunakan DNA *thermal cycler* (Applied Bio-System) pada suhu denaturasi 94° C selama 4 menit; diikuti 35x siklus pada suhu *annealing* 94° C selama 60 detik, ekstensi 72° C selama 60 detik dan ekstensi final pada suhu 72° C selama 3 menit.

Deteksi dan Identifikasi Produk PCR

Deteksi dan identifikasi produk PCR dilakukan dengan proses elektroforesis dalam 1,5% gel *agarose*, dengan penambahan *ethidium bromide* (0,5 mg/ml). Sebanyak 8 μ l produk PCR dengan 2 μ l *loading dye* dielektroforesis pada 100 volt selama 1 jam. Visualisasi produk diidentifikasi dengan sinar ultraviolet.

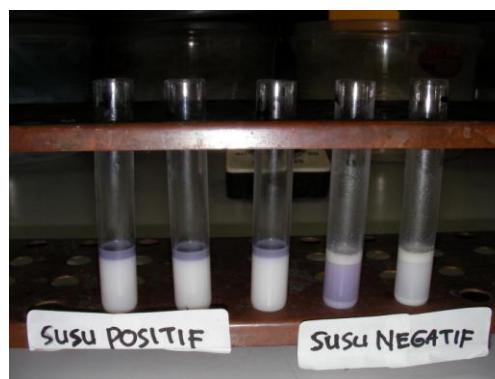
Deteksi Brucellosis secara MRT

Deteksi brucellosis secara MRT dilakukan dengan menambahkan 30 μ l antigen MRT (BBLitvet) ke dalam tabung yang telah diisi 1 ml susu yang telah disimpan dalam refrigerator sekurang-kurangnya 24 jam. Tabung diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 jam. Uji MRT dinyatakan negatif jika lapisan krim di bagian atas berwarna putih dan bagian susu pada bagian bawah berwarna biru semua. Reaksi positif MRT ditandai dengan cincin krim berwarna biru dan susu bagian bawah berwarna putih.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Diagnosis brucellosis pada sampel susu dengan MRT secara tidak langsung mendeteksi adanya *Brucella spp.* pada hospes (Godfroid *et al.*, 2002). Uji MRT dapat digunakan untuk uji penyaringan brucellosis pada sampel susu *bulk* maupun sampel susu dari

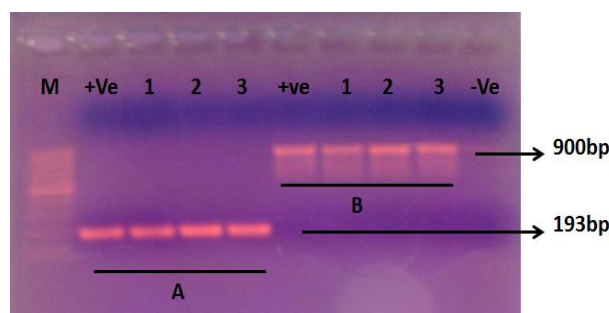
individual sapi. Deteksi brucellosis pada 24 sampel susu secara MRT menunjukkan hasil positif sebesar 83,33% (20/24) yang ditandai dengan terbentuknya cincin berwarna biru dengan bagian bawah berwarna putih seperti yang disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil reaksi antigen *milk ring test* (MRT) dan sampel susu (Sampel positif terlihat cincin berwarna biru dan MRT negatif susu berwarna biru homogen)

Reaksi positif MRT pada *bulk* sampel susu menunjukkan bahwa terdapat satu atau lebih sapi yang terinfeksi brucellosis pada satu populasi. Uji MRT pada individual sapi jika positif tidak perlu dikonfirmasi lebih lanjut dengan uji serologis. Tetapi, hasil positif MRT dari individual sapi sampel susu perlu diencerkan 10 kali, jika hasil MRT positif mengindikasikan adanya infeksi brucellosis pada sapi tersebut.

Deteksi brucellosis pada sampel susu secara PCR pada penelitian ini dilakukan menggunakan dua pasangan primer yang berbeda yaitu 16S rRNA dan *omp2* (Gambar 2). Uji PCR dengan menggunakan primer 16S rRNA menghasilkan produk amplifikasi DNA 900 bp, sedangkan dengan primer *omp2* menghasilkan produk amplifikasi DNA 193 bp. Hasil deteksi brucellosis pada 24 sampel susu dengan uji PCR menunjukkan 79,17% (19/22) sampel positif.



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA dengan 16SrRNA(A) dan *omp2* (B) (M= marker; +Ve= kontrol positif; -Ve= kontrol negatif; 1-3= sampel susu)

Analisis statistik untuk menghitung tingkat sensitivitas dan spesifisitas dari uji PCR dalam mendeteksi brucellosis pada sampel susu dibandingkan dengan uji MRT seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa sensitivitas uji PCR dalam mendeteksi *Brucella* pada sampel susu adalah 75% sedangkan

Tabel 1. Sensitivitas dan spesifitas uji PCR dibandingkan dengan MRT dalam mendeteksi brucellosis pada sampel susu

Jenis	Uji	MRT		Total	Sensitivitas (%)	Spesifisitas (%)	Overall Agreement (%)
		Positif	Negatif				
PCR	Positif	15	4	19	75	100	62,5
	Negatif	5	0	5			
Total		20	4	24			

spesifisitasnya adalah 100% dengan *overall agreement* kedua uji tersebut adalah 62,5%. Walaupun uji MRT adalah untuk mendeteksi adanya antibodi dalam susu sedangkan uji PCR untuk mendeteksi antigen dalam susu, namun dari hasil tersebut dapat dibandingkan untuk diagnosis brucellosis pada sapi. Berdasarkan analisis statistik tersebut terlihat bahwa uji MRT lebih sensitif dalam mendiagnosis brucellosis pada sampel susu dibandingkan dengan uji PCR, namun kurang spesifik. Menurut Alton *et al.* (1988), sensitivitas uji MRT untuk deteksi brucellosis pada sampel susu tinggi namun spesifisitasnya rendah. Uji MRT dapat menghasilkan reaksi positif palsu (*false positive*) pada beberapa kondisi seperti sampel susu mengandung kolostrum sapi pada periode akhir laktasi atau sapi menderita mastitis subklinis. Oleh karena itu, MRT biasanya hanya digunakan untuk uji penyingkapan brucellosis (Alton *et al.*, 1988) dan harus dikonfirmasi dengan uji serologis lain.

Penggunaan uji PCR dengan target gen 16S rRNA dan omp2 terbukti sangat spesifik untuk mendeteksi brucellosis pada susu. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa uji PCR diketahui lebih sensitif dari pada konvensional kultur (Amin *et al.*, 2001; Kanani, 2007). Melalui teknik uji PCR dapat mendeteksi *Brucella* pada susu dengan spesifisitas tinggi, sehingga dapat mengurangi terjadinya infeksi brucellosis pada manusia akibat *foodborne disease* yang diakibatkan konsumsi susu yang terkontaminasi.

KESIMPULAN

Polymerase chain reaction (PCR) menggunakan primer 16S rRNA dan omp2 dapat untuk mendeteksi brucellosis pada sampel susu dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas masing-masing sebesar 75 dan 100% dibandingkan dengan uji MRT.

DAFTAR PUSTAKA

Alton, G., L.M. Jones, R.D. Angus, and J.M. Verger. 1988. **Techniques for the Brucellosis Laboratory**. INRA, Paris.

Amin, A.S., M.E. Hamdy, and A.K. Ibrahim. 2001. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. **Vet. Microbiol.** 83:37-44.

Ariza, J. 2002. Brucellosis in the 21st century. **Med. Clin. (Bare)**. 119:339-344.

Baily, G.G., J.B. Krahn, B.S. Drasar, and N.G. Stoker. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **J. Trop. Med. Hyg.** 95:271-275.

Bricker, B.J. 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Vet. Microbiol.** 90:435-446.

Bricker, B.J. and S.M. Halling. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv 1 by PCR. **J. Clin. Microbiol.** 32:2660-2666.

Colmenero, J.D., J.M. Reguera, and F. Martos. 1996. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: A study of 530 cases. **Medicine.** 75:195-211.

Corbel, M.J. 1997. Brucellosis: An overview. **Emerg. Infect. Dis.** 3:213-221.

Ditjennak. 2006. Kebijakan Pemberantasan Brucellosis pada Sapi Perah. **Rakor Brucellosis se-Pulau Jawa**. Ditjennak, Jakarta.

FAO. 2010. An update on transboundary animal diseases in the Near East. **The 30th FAO Regional Conference Report**. Sudan. (8):3-20.

Fekete, A., J.A. Bantle, and S.M. Halling. 1992. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. **J. Vet. Diagn. Invest.** 4:79-83.

Fekete, A., J.A. Bantle, S.M. Halling, and M.R. Sanborn. 1990. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. **J. Appl. Bacteriol.** 69:216-227.

Gallien, P., C. Dorn, G. Alban, C. Staak, and D. Protz. 1998. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. **Vet. Rec.** 142:512-514.

Godfroid, J., C. Saegerman, V. Wellemans, K.J.J.W. Letesson, A. Tibor, A. McMillan, S. Spencer, M. Sanna, D. Bakker, R. Pouillot, and B. Garin-Bastuji. 2002. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. **Vet. Microbiol.** 90:461-477.

Guarino, A., L. Serpe, G. Fusco, A. Scaramuzzo, and P. Gallo. 2000. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. **Vet. Rec.** 147:634-636.

Herman, L. and H. de Ridder. 1992. Identification of *Brucellosis* spp by using the polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.** 58 (6):2099-2101.

Kanani, A.N. 2007. Serological, Cultural and Molecular Detection of *Brucella* Infection in Breeding Bulls. **Thesis**, Anand Agricultural University, Gujarath, India.

Leal-Klevezas, D.S., A. López-Merino, and J.P. Martínez-Soriano. 1995. Molecular detection of *Brucella* spp.: Rapid identification of *B. abortus* biovar I using PCR. **Arch. Med. Res.** 26:263-267.

Morgan, W.T.B. and A. McDiarmid. 1960. The excretion of *Brucella abortus* in the milk of experimentally infected cattle. **Res. Vet. Sci.** 1:53-56.

Nicoletti, P. 1980. The epidemiology of bovine brucellosis. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.** 24:69-84.

OIE. 2004. Bovine Brucellosis. In **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. OIE, World Organisation for Animal Health.

Ouahrani-Bettache, S., M.P. Soubrier, and J.P. Liutard. 1996. IS6501- anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. **J. Appl. Bacteriol.** 81:154-160.

Romero, C.C. Gamazo, M. Pardo, and I. Lopez-Goni. 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. **J. Clin. Microbiol.** 33(3):615-617.

Sreevatsan, S., J.B. Bookout, F. Ringpis, V.S. Perumaalla, T.A. Ficht, L.G. Adams, S.D. Hagius, P.H. Elzar, B.J. Bricker, G.K. Kumar, M. Rajasekhar, S. Isloor, and R.R. Barathur. 2000. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **J. Clin. Microbiol.** 38:2602-2610.

Young, E.J. 1995. An overview of human brucellosis. **Clin. Infect. Dis.** 21:283-290.