

Identifikasi *Brucella abortus* Isolat Lokal dengan *Brucella abortus* Strain Specific-Polymerase Chain Reaction

(IDENTIFICATION OF LOCAL ISOLATES OF *BRUCELLA ABORTUS*
USING *BRUCELLA ABORTUS* STRAIN SPECIFIC-POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY)

Susan Maphilindawati Noor¹, Pratiwi Pujilestari Sudarmono²,
Asmarani Kusumawati³, Anis Karuniawati²

¹Laboratorium Bakteriologi, Balai Besar Penelitian Veteriner,
Jln. RE Martadinata No 30 Bogor, Email : susan_yurismo@yahoo.com

²Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jln Salemba Raya No 6, Jakarta

³Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
Jln. Fauna No 2, Klebengan, Yogyakarta

ABSTRAK

Brucella abortus Strain Specific-Polymerase Chain Reaction (BaSS-PCR) merupakan teknik PCR multiplex yang dapat mengidentifikasi dan membedakan *Brucella* (*B.*) *abortus* galur lapang (biovar 1, 2, dan 4), *B. abortus* galur vaksin, *Brucella* species dan non-*Brucella*. Pada penelitian ini BaSS-PCR diaplikasikan untuk identifikasi *B. abortus* isolat lokal dengan tujuan untuk mengetahui galur *B. abortus* yang menginfeksi ternak sapi di Indonesia. Sebanyak 50 isolat lokal *B. abortus* hasil isolasi dari sapi terinfeksi brucellosis asal Pulau Jawa (Jakarta dan Bandung), Sulawesi Selatan (Maros), Nusa Tenggara Timur (Kupang dan Belu) digunakan dalam penelitian ini. Visualisasi produk BaSS-PCR dilakukan pada *agarose gel* dengan penambahan *ethidium bromida*. Identifikasi galur *B. abortus* didasarkan atas ukuran dan jumlah produk DNA yang teramplifikasi dari tiap isolat. Hasil uji BaSS-PCR pada 50 isolat *B. abortus* tersebut adalah *B. abortus* galur lapang. Hal ini menunjukkan bahwa *B. abortus* yang menginfeksi ternak sapi di Indonesia adalah *B. abortus* galur lapang.

Kata-kata kunci : BaSS-PCR, *B. abortus*, vaksin, lapang

ABSTRACT

Brucella abortus Strain Specific-Polymerase Chain Reaction (BaSS-PCR) is a single multiplex PCR technique which able to identify and differentiate between *Brucella abortus* field strains (biovar 1, 2, and 4), *B. abortus* vaccine strains, *Brucella* species, and non-*Brucella* species. In this study, BaSS-PCR was applied to identify local isolates of *B. abortus* in order to investigate the *B. abortus* strains that infected cattle in Indonesia. Fifty local strains of *B. abortus* isolated from infected cattle in Java (Jakarta and Bandung), South Sulawesi (Maros), East Nusa Tenggara (Kupang and Belu) were used in this study. The DNA bands were observed by agarose gel in the presence of ethidium bromide. Identification was performed based on the size and number of DNA products amplified by PCR from each isolates. The results showed that the 50 isolates were of *B. abortus* field strains. This finding showed that the cause of bovine brucellosis in Indonesia is *B. abortus* field strains.

Key words: BaSS-PCR, *B. abortus*, vaccine, field strains

PENDAHULUAN

Brucellosis adalah penyakit yang disebabkan oleh genus *Brucella* yang menginfeksi hewan ternak di sebagian besar dunia. Brucellosis pada sapi bersifat kronis dengan fase bakterimia yang subklinis. Sumber penularan penyakit pada sapi terutama cairan

plasenta dan sisa-sisa jaringan yang digugurkan. Brucellosis mudah menyebar secara luas pada sekelompok populasi ternak dan berdampak pada kerugian ekonomi. Diperkirakan kerugian ekonomi akibat brucellosis pada sapi di Indonesia ditaksir mencapai 138,5 miliar rupiah setiap tahun (Ditjennak, 2006), kenerunnya populasi

ternak secara langsung akibat kluron (*abortion*), lahir mati (*stillbirth*), lahir lemah, infertilitas dan sterilitas. Brucellosis juga merupakan salah satu zoonosis dengan gejala klinis bervariasi pada manusia. Angka kejadian brucellosis pada manusia di dunia mencapai 500.000 setiap tahunnya berdasarkan laporan dari WHO (Pappas *et al.*, 2006).

Pengendalian brucellosis pada sapi di Indonesia melalui program vaksinasi menggunakan vaksin *B.abortus* S19 dan RB51 telah dilakukan, namun angka prevalensi brucellosis pada sapi di beberapa daerah (Jakarta, Sulawesi Selatan, dan Nusa Tenggara Barat) masih cukup tinggi yaitu lebih dari 2% (Ditjenak, 2012). Pemakaian vaksin *B.abortus live attenuated* tersebut pada ternak sapi apakah memungkinkan untuk terjadinya infeksi *Brucella* perlu dibuktikan secara ilmiah.

Polymerase Chain Reaction (PCR) telah digunakan secara luas di banyak negara untuk deteksi brucellosis pada ternak yaitu uji tapis brucellosis pada satu populasi ternak, identifikasi species dalam suatu kelompok ternak, dan untuk identifikasi strain epizootik dengan tujuan membantu pakar epidemiologi melakukan *trace back* infeksi dari sumbernya (Bricker *et al.*, 2003).

Teknik *multiplex PCR species-specific assay* dapat dipakai untuk identifikasi species maupun galur *Brucella*. Bricker dan Halling (1994), pertama kali mengembangkan uji (AMOS)-PCR untuk identifikasi *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.ovis*, dan *B.suis* berdasarkan adanya polimorfisme pada lokasi *species-specific* dengan menyisipkan *sequence* kromosom *Brucella* IS711 menggunakan lima primer oligonukleotida. Teknik tersebut kemudian dikembangkan lebih lanjut oleh Ewalt dan Bricker (2003) menjadi uji *Brucella abortus strain specific-Polymerase Chain Reaction* (BaSS-PCR) dengan mengubah dan menambah primer sehingga dapat

mengamplifikasi sampai empat lokus yang berbeda dengan menggunakan tujuh primer oligonukleotida. Teknik BaSS-PCR mampu untuk mengidentifikasi dan membedakan isolat *B.abortus* galur vaksin (S19 dan RB51) dan galur lapang *B.abortus* biovar 1, 2, dan 4. Uji BaSS-PCR ini merupakan uji yang sangat cepat, sensitif, dan akurat untuk identifikasi galur *Brucella* (Bricker *et al.*, 2003).

Berdasarkan pertimbangan tersebut maka pada penelitian dilakukan identifikasi isolat lokal *B.abortus* hasil isolasi sampel dari sapi terinfeksi brucellosis secara molekuler dengan uji BaSS-PCR. Manfaat dari penelitian ini diharapkan dengan diketahuinya galur *B.abortus* yang menginfeksi ternak sapi di Indonesia maka dapat digunakan untuk tindakan pengendalian serta identifikasi galur epizootik untuk *trace back* infeksi dari sumbernya.

METODE PENELITIAN

Isolat *Brucella abortus*

Sampel penelitian yang digunakan adalah 50 bakteri *B.abortus* hasil isolasi dan identifikasi secara konvensional dari ternak sapi terinfeksi brucellosis asal Pulau Jawa (Jakarta dan Bandung), Sulawesi Selatan (Maros), dan Nusa Tenggara Timur (Kupang dan Belu), disajikan pada Tabel 1.

Ekstraksi DNA *B.abortus*

Ekstraksi DNA isolat *B. abortus* dilakukan dengan menggunakan komersial kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen, German). Sebanyak satu atau dua koloni *B.abortus* disuspensikan dengan 180µL buffer ATL dalam tabung *eppendorf* dan ditambah 20µL proteinase K. Tabung divorteks dan diinkubasi pada suhu 56°C selama tiga jam. Sesudah inkubasi, tabung disentrifugasi, ditambah 200µL buffer AL divorteks 15 detik

Tabel 1. Isolat lokal *B.abortus* yang di uji dengan *Brucella abortus strain-specific- Polymerase Chain Reaction* (BaSS-PCR)

No.	Asal Isolat	Jumlah Isolat	Sampel
1	Jakarta	21	Susu
2	Bandung	8	Susu, cairan amnion
3	Maros	9	Cairan higroma
4	Kupang	4	Cairan higroma
5	Belu	8	Cairan higroma
Jumlah		50	

dan diinkubasi 10 menit pada suhu 70°C. Kedalam tabung kemudian ditambahkan 200µL etanol absolut, divorteks 15 detik dan disentrifugasi kembali. Suspensi dipindahkan ke dalam *QIAamp Spin column* dan disentrifugasi pada 6000xg (8000rpm) selama satu menit. Filtrat dibuang dan diganti dengan kolom baru, kemudian tambahkan 500µL buffer AW1 dalam kolom dan disentrifugasi pada 6000 x g (8000rpm) selama satu menit. Filtrat dibuang dan ditambah 500µL buffer AW2, disentrifugasi 20000 x g (14000rpm) selama tiga menit, dan filtrat dibuang. Tambahkan 200µL elusi buffer AE ke dalam kolom, diinkubasi pada suhu ruang selama satu menit sebelum disentrifugasi pada 6000 x g (8000 rpm) selama satu menit. Ekstraks DNA disimpan pada -20°C sebelum digunakan.

PCR Master Mixture

Uji BaSS-PCR untuk identifikasi dan diferensiasi *B. abortus* galur lapang mengikuti metode Ewalt dan Bricker (2003). Penyiapan *multiplex master mix* PCR dilakukan di dalam *laminar flow cabinet*. Setiap target diamplifikasi

dalam volume reaksi 25µL, yang terdiri dari: 12,5 µL *Multiplex PCR Master Mix*; 2,5µL *primer cocktail oligonukleotida* 2 iM (Tabel 2); 2,5µL *Q solution* 0,5x; 2,5µL *coral load dye*; 2,5µL *H₂O* (PCR-grade), dan 2µL template DNA (konsentrasi d" 300ng/µL). Sebagai kontrol negatif tabung PCR disubstitusi dengan 2µL *distilled water*, disertakan pula template DNA *B.abortus* S19 dan S99 sebagai kontrol positif.

Amplifikasi dan Deteksi Produk PCR

Proses amplifikasi DNA dengan BaSS-PCR dilakukan dengan denaturasi awal selama lima menit pada suhu 95°C, diikuti dengan denaturasi selama 30 detik pada suhu 95°C, *annealing* selama 90 detik pada suhu 60°C, *extension* selama 90 detik pada suhu 72°C, sebanyak 40 siklus dan diakhiri *extension* akhir selama tujuh menit.

Produk PCR yang teramplifikasi dipisahkan dengan 1.5% *agarose gel* dalam TBE buffer (89mM Tris/HCl, 89mM asam borak, 2,0 mM *ethylene diaminetetra-acetic acid* [EDTA] pH 8,0) dengan penambahan *ethidium bromida*.

Tabel 2. Primer oligonukleotida yang digunakan pada uji *Brucella abortus strain-specific-Polymerase Chain Reaction* (Ewalt dan Bricker, 2003)

Primer	Sequence Nukleotida 5' – 3'
IS711spesifik	TGC-CGA-TCA-CTT-AAG-GGC-CTT-CAT-TGC-CAG
<i>B.abortus</i> spesifik	GAC-GAA-CGG-AAT-TTT-TCC-AAT-CCC
16S-universal-F	GTG-CCA-GCA-GCC-GCC-GTA-ATA-C
16S-universal-R	TGG-TGT-GAC-GGG-CGG-TGT-GTA-CAA-G
ery-F	GCG-CCG-CGA-AGA-ACT-TAT-CAA
ery-R	CGC-CAT-GTT-AGC-GGC-GGT-GA
RB51-3	GCC-AAC-CAA-CCC-AAA-TGC-TCA-CAA

Tabel 3. Amplifikasi produk *Brucella abortus strain specific-polymerase chain reaction* (BaSS-PCR)

Amplikon (bp)	<i>B.abortus</i> strain lapang	<i>B.abortus</i> S19	<i>B.abortus</i> RB51	<i>Brucella</i> spp	Non- <i>Brucella</i>
900 ¹	+	+	+	+	+
500 ²	+	+	+		
300 ³			+		
180 ⁴	+		+	+	

Keterangan:

1. Amplifikasi dari lokus 16S (kontrol)
2. Amplifikasi dari lokus *alkB* (*B. abortus* spesifik)
3. Amplifikasi dari lokus *whoAb* (spesifik untuk *B. abortus* galur vaksin RB51)
4. Amplifikasi dari lokus *eryCO* (pada semua *Brucella* kecuali *B. abortus* galur vaksin S19)

Elektroforesis di-*running* pada voltase 80 volt selama 2,5 jam. *Ladder* DNA disertakan sebagai marker dan visualisasi pitaDNA dilakukan di bawah sinar *ultra violet* (UV). Identifikasi produk BaSS-PCR berdasarkan jumlah dan ukuran produk DNA yang teramplifikasi dari tiap isolat seperti disajikan pada Tabel 3.

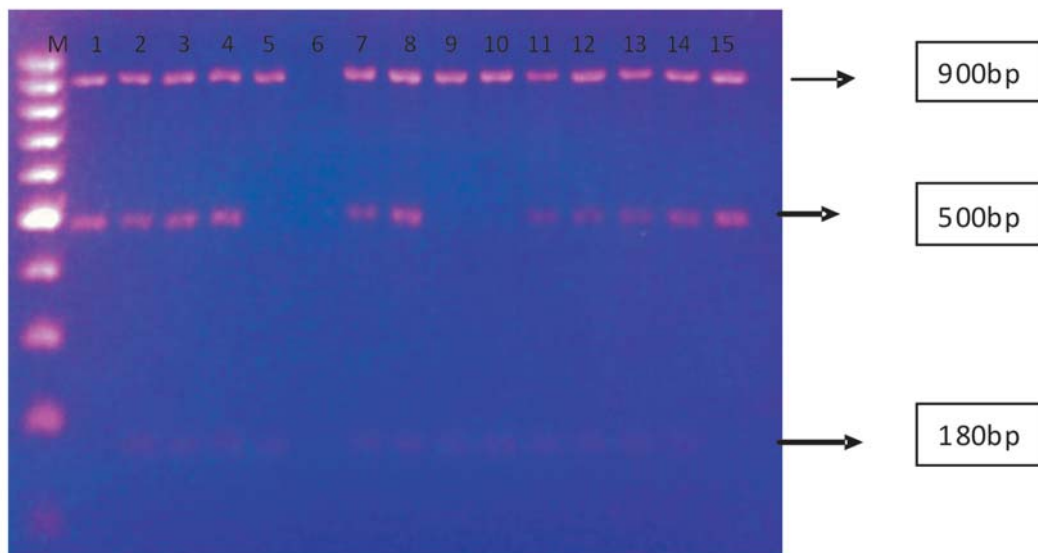
HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik *multiplex BaSS-PCR* yang dikembangkan oleh Bricker dan Halling (1994) dapat membedakan species *Brucella* galur lapang dengan galur vaksin. Teknik BaSS-PCR ini menggunakan tujuh primer yang mampu mengamplifikasi empat lokus yang berbeda yaitu (i) region 16SrRNA yang merupakan *gen conserved* pada kebanyakan bakteri, (ii) *sequence* DNA dengan elemen *Brucella* specific IS711 disisipkan dekat dengan gen *alkB* (terdapat pada semua *B.abortus biovar* yang ditemukan di Amerika Utara) (Bricker dan Halling, 1995), (iii) *sequence* DNA dengan elemen spesifik *Brucella* disisipkan ke dalam gen *whoA* (hanya ditemukan pada vaksin strain *B. abortus* RB51) (Vemulapalli *et al.*, 1999), dan (iv) segmen dari *erythriol catabolic operon* yang termasuk *sequence* 702 bp yang tidak terdapat pada *genom* vaksin strain *B. abortus* S19 (Sangari *et al.*, 1994; Sangari *et al.*, 2000).

Identifikasi dan diferensiasi 50 isolat lokal *B. abortus* dengan BaSS-PCR pada penelitian ini dilakukan berdasarkan pada jumlah dan ukuran produk PCR yang teramplifikasi pada setiap isolat yang divisualisasi pada *gel agarose* seperti disajikan pada Gambar 1. Semua sampel kecuali kontrol negatif akan mengamplifikasi sekurang-kurangnya satu produk DNA dengan panjang pita 900 bp dari lokus 16S, sehingga jika tidak muncul pita maka uji BaSS-PCR harus diulang.

Pada Gambar 1 adalah hasil dari elektroforesis gel produk BaSS-PCR dari beberapa isolat *B. abortus* yang diuji, yaitu dari Jakarta (DKI 577), Bandung (CH-PR), Maros (BM), Belu (CH-BL) dan Kupang (YNT-KP). DNA *B.abortus* galur lapang akan teramplifikasi pada tiga pita DNA (900 bp, 500 bp, dan 180 bp). Bakteri *B.abortus* galur vaksin S19 teramplifikasi pada dua pita (900 bp dan 500 bp), sedangkan *B.abortus* galur vaksin RB51 teramplifikasi pada empat pita (900 bp, 500 bp, 300 bp, dan 180 bp). Sementara untuk *Brucella* species lain teramplifikasi pada panjang pita 900 bp dan 180 bp.

Pada penelitian ini isolat *B. abortus* galur vaksin RB51 tidak disertakan karena isolat vaksin tersebut tidak ada. Hasil identifikasi 50 isolat lokal *B.abortus* secara molekuler dengan uji BaSS-PCR menunjukkan bahwa semua isolat *B.abortus* yang ada di Jawa, Sulawesi, dan NTT



Gambar 1. Hasil elektroforesis gel dari produk *Brucella abortus* strain-specific -PCR. M= Marker, 1=S19 (vaksin), 2=S99 (referen), 3= CH-PR, 4= BM, 5= *Brucella* spesies, 6= Kontrol negatif, 7=YNT-KP, 8=DKI577, 9= *Brucella* spesies, 10= *Brucella* spesies, 11=CH07-BL, 12= CH04-BL, 13=CH06-BL, 14=CH09-BL, dan 15= S19 (vaksin)

merupakan *B.abortus* galur lapang. Isolat *B.abortus* tersebut adalah identik dengan galur *B.abortus* yang terdapat pada semua biovar *B.abortus* yang ditemukan di Amerika Utara (Bricker dan Halling, 1995) karena primer *B.abortus species-specific* untuk uji BaSS-PCR didesain untuk identifikasi brucellosis pada sapi di Amerika (Bricker *et al.*, 2003).

Teknik BaSS-PCR dikembangkan dengan menggunakan tujuh primer dengan empat lokus yang berbeda sehingga hasil dari amplifikasi DNA juga akan berbeda setiap galur *B.abortus*. Isolat *B.abortus* yang termasuk biovar 1, 2, dan 4 dan juga galur vaksin (S19 dan RB51) mempunyai *sequence* lokus IS711-*alkB* DNA dan akan teramplifikasi pada panjang pita DNA 500 bp. Untuk *B.abortus* galur vaksin RB51 mempunyai *sequence* lokus IS711-*whoA* dan teramplifikasi pada panjang pita 300bp. Semua species *Brucella* mempunyai gen *eri* kecuali strain vaksin S19, sehingga galur vaksin *B.abortus* S19 tidak akan teramplifikasi pada panjang pita 180 bp.

Identifikasi isolat lokal *B.abortus* dalam hal ini perlu dilakukan untuk melihat apakah pemakaian vaksin *Brucella* S19 dan RB51 pada sapi dalam kurun waktu lama dapat mengakibatkan terjadinya infeksi mengingat ke dua vaksin tersebut adalah vaksin hidup yang dilemahkan (*live attenuated*), sehingga dikhawatirkan dapat bereplikasi pada inang. Selain itu juga untuk memenuhi regulasi baru yang telah diterapkan di banyak negara di dunia agar dapat melakukan deteksi dan identifikasi *Brucella* sampai ke galur spesifik serta mampu membedakan species *Brucella* galur vaksin dengan galur lapang.

Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa aplikasi vaksin *B.abortus* S19 dan RB51 yang telah dilakukan untuk program pengendalian brucellosis pada sapi di Indonesia tidak mengakibatkan infeksi brucellosis pada ternak. Masih tingginya angka prevalensi brucellosis pada sapi di beberapa daerah endemik di Indonesia perlu dianalisis lebih lanjut ke permasalahan manajemen ternak.

SIMPULAN

Hasil identifikasi molekuler pada isolat lokal *B.abortus* dengan uji BaSS-PCR adalah isolat *B.abortus* galur lapang. Hal ini menunjukkan bahwa *B.abortus* galur lapang adalah penginfeksi ternak sapi di Pulau Jawa, Sulawesi Selatan, dan Nusa Tenggara Timur.

SARAN

Perlu dilakukan identifikasi dan diferensiasi isolat-isolat lokal *B.abortus* lebih lanjut dengan uji Bruce-ladder-PCR untuk mengetahui galur *Brucella* lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian yang telah membiayai penelitian ini melalui proyek Anggaran Pendapatan Belanja Negara (APBN) Balai Besar Penelitian Veteriner (Bbalitvet) tahun anggaran 2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Bricker BJ, Halling SM. 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.
- Bricker BJ, Halling SM: 1995, Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 33 : 1640-1642.
- Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, Jensen AE. 2003. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest* 15 : 374-378.
- Ditjennak. 2006. Program dan Pedoman Teknis Pemberantasan Brucellosis pada Sapi Perah di Pulau Jawa. Direktorat Bina Kesehatan Hewan. Departemen Pertanian.
- Ditjennak. 2012. Kebijakan Kesehatan Hewan dalam Pengendalian PHM dan Zoonosis Situasi Penyakit Hewan Menular Tahun 2010-2011. Rapat Koordinasi Kesehatan Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner se-wilayah kerja BPPV Subang, 7 Nopember 2012
- Ewalt DR, Bricker BJ. 2003. Identification and differentiation of *Brucella abortus* field and vaccine strains by BaSS-PCR. *Methods Mol Biol* 216 : 97-108.

- Pappas G, Papadimitriou P, Aktridis N, Christou L, Tsianos EV. 2006. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 6 : 91–99.
- Sangari FJ, Garcia-Lobo JM, Aguero J. 1994. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett* 121 : 337–342.
- Sangari FJ, Aguero J, Garcia-Lobo JM. 2000. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiology* 146 : 487-495.
- Vemulapalli R, McQuiston JR, Schurig GG. 1999. Identification of an IS711 element interrupting the *whoA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 6 : 760–764.