

LAPORAN TEKNIS 2016

48/AIR 3/OT 02 02/01/2017

**DOKUMEN TEKNIS UNTUK VAKSIN RADIASI MASTITIS
DAN BRUCELLOSIS SERTA PSPb TERHADAP KESEHATAN
DAN REPRODUKSI TERNAK**

**B.J.Tuasikal, T.Handayani, D.Priyoatmojo, A.C.Trinugraha, Nuniek
Ielananingtyas, Dinardi**



**PUSAT APLIKASI ISOTOP DAN RADIASI
BADAN TENAGA NUKLIR NASIONAL
2017**

LAPORAN TEKNIS 2016

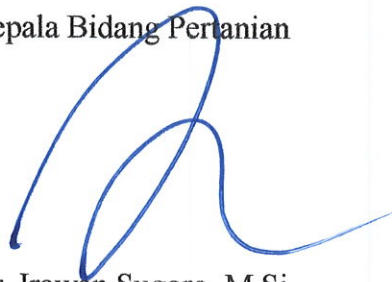
48/AIR 3/OT 02 02/01/2017

**DOKUMEN TEKNIS UNTUK VAKSIN RADIASI MASTITIS
DAN BRUCELLOSIS SERTA PSPb TERHADAP KESEHATAN
DAN REPRODUKSI TERNAK**

**B.J.Tuasikal, T.Handayani, D.Priyoatmojo, A.C.Trinugraha, Nuniek
Ielanangingtyas, Dinardi**

Mengetahui/Menyetujui

Kepala Bidang Pertanian



Dr. Irawan Sugoro, M.Si
NIP. 19761018 200012 1 001

Kepala Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi



Totti Tjiptosumirat
NIP. 19630830 198803 1 002

TEKNIK NUKLIR UNTUK PENINGKATAN KESEHATAN DAN REPRODUKSI TERNAK

B.J. Tuasikal, T. Handayani, D. Priyoatmojo, A.C. Trinugraha, Nuniek Lelaningtyas, Dinardi

ABSTRAK

Kemampuan sinar gamma dapat dimanfaatkan untuk membuat vaksin iradiasi yang berguna mencegah penyakit radang ambing (mastitis) dan penyakit keluron menular (brucellosis) pada ternak. Bakteri penyebab mastitis subklinis dan brucellosis diradiasi dengan tujuan dapat melemahkan dan memperoleh strain dengan tingkat patogenesita rendah, namun tetap mampu merangsang timbulnya kekebalan pada tubuh ternak terhadap penyakit. Selain itu, teknologi nuklir dapat diterapkan pula pada teknik pelabelan isotop untuk Radioimmunoassay (RIA) sebagai diagnosa kebuntingan dini pada ternak ruminansia. Pada uji lapang terbatas kandidat vaksin radiasi mastitis menggunakan hewan model sapi perah. Hewan percobaan divaksinasi dengan SGB iradiasi taraf LD₅₀, dengan dosis 3x10⁸ cfu/ ekor, kemudian dibooster sebanyak 3 kali. Sapi yang tidak divaksin digunakan sebagai hewan kontrol. Berdasarkan hasil pemeriksaan darah, diketahui nilai rata-rata eritrosit sebesar 5,9 x 10⁶ sel/ mm³ dan PCV 32,2%. Kedua nilai tersebut masih dalam kisaran normal dimana nilai normal untuk eritrosit yaitu 5-10 x 10⁶ sel/ mm³ dan PCV 24-46%. Sementara untuk nilai Hb diperoleh nilai rata-rata sebesar 10,4 g/ dL dimana nilai tersebut masih dalam batas normal yaitu 10-17 g/ dL. Hal ini menunjukkan bahwa sapi yang divaksin dengan vaksin iradiasi mastitis tidak menyebabkan anemia pada sapi perah. Pada kegiatan uji *in vivo* *Brucella abortus* pada mencit (*Mus musculus*) dilakukan kegiatan infeksi pada 24 ekor mencit yang dibagi dalam 4 kelompok perlakuan. Tahapan penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian *B. abortus* iradiasi terhadap diferensial sel darah putih (Leukosit) pada hewan percobaan. Hasil pengamatan menunjukkan nilai rata-rata dari diferensial Leukosit yaitu sel basofil, eosinofil, neutrofil, monosit dan limfosit praperlakuan pada mencit (*Mus musculus*) dalam kisaran normal, dimana nilai normal dari limfosit 48,8 - 83,19 %; neutrofil 9,86 - 39,11, basofil 0,07%, eosinofil 0,11- 4,91 dan monosit 3,29 - 12,48 %. Kegiatan pengembangan deteksi kebuntingan dini dengan RIA (radioimmunoassay) PSPb (*Pregnancy Specific Protein type b*) pada ternak ruminansia yaitu melakukan kegiatan untuk mendapatkan protein PSPB dengan konsentrasi tinggi dan pengujian perunut ¹³¹I-PSPB dengan parameter *Non Specific Binding* (NSB), *Binding 0* (B0) dan uji immunoreaktivitas. Pada penelitian ini diperoleh PSPB hasil elektroelusi dengan konsentrasi 597.68±1.13 ng/ml; NSB dengan rerata nilai cacahan 50,783 CPM dan B0 51,496 CPM serta persentase immunoreaktivitas sebesar 8%. Nilai immunorekativitas dipandang perlu untuk ditingkatkan dengan cara mempertahankan konsentrasi protein melalui perbaikan metode pemekatan sekaligus mencegah *protein loss* dengan mengganti membran tabung pemekat lebih kecil dari 50 KDa MWCO (*Moleccular Weight Cut Off*).

Kata Kunci: Mastitis, *B. abortus*, Vaksin Radiasi, RIA-PSPb

PENDAHULUAN

Dalam rangka membangun keberhasilan suatu peternakan maka faktor kesehatan memiliki peran yang penting. Status kesehatan hewan berkaitan dengan penyakit hewan menular (PHM), penyakit hewan non infeksi yang berdampak ekonomi tinggi, dan

gangguan reproduksi yang berdampak pada rendahnya *service per conception*, panjangnya calving interval, rendahnya angka kelahiran dan kemajiran.

Peningkatan kesehatan hewan dapat memberikan kontribusi kesehatan dan kesejahteraan masyarakat melalui meningkatnya tenaga kerja peternakan, pendapatan dan kesejahteraan para peternak. Program peningkatan kesehatan hewan dilakukan melalui vaksinasi, surveylan penyakit hewan, pengawasan dan pemberantasan, investigasi penyakit dan pemeriksaan hewan sebelum dipindahkan.

Penyakit brucellosis atau yang dikenal sebagai penyakit keluron menular menimbulkan keguguran pada umur kebuntingan tertentu. Selain itu beberapa penyakit subklinis seperti mastitis sulit diketahui oleh peternak, dan baru dapat diketahui apabila keadaannya sudah parah. Dengan diketahuinya gejala dini melalui deteksi/ identifikasi penyakit (menggunakan reagen diagnostik), maka peternak dapat menyelamatkan ternak yang masih sehat dengan tindakan preventif misalnya dengan cara vaksinasi. Dalam upaya pengembangan vaksin, teknik nuklir khususnya radiasi sinar gamma dapat digunakan untuk menurunkan virulensi atau patogenitas agen penyakit tetapi masih mampu menstimulasi kekebalan pada ternak terhadap infeksi ganas (Smith 1992).

Kelompok Kesehatan dan Reproduksi Ternak PAIR menggunakan radiasi sinar gamma pada pengembangan vaksin iradiasi untuk pencegahan penyakit radang ambing (mastitis) dan penyakit keluron menular (brucellosis) pada ternak. Sinar Gamma telah digunakan untuk berbagai vaksin (IAEA, 2010). Teknik iradiasi memberikan keuntungan dapat memperpendek waktu pasase dalam mendapatkan bahan vaksin dibanding dengan teknik konvensional.

Selain itu pemanfaatan aplikasi teknik nuklir digunakan untuk peningkatan efisiensi reproduksi ternak melalui teknik Radio immunoassay (RIA), khususnya RIA untuk mendeteksi hormon progesteron (P4). Aplikasi RIA progesteron yang dilakukan pada sapi perah di Kabupaten Garut menunjukkan waktu deteksi yang lebih cepat (21 hari pasca IB) bila dibandingkan dengan deteksi kebuntingan konvensional yang dilakukan dengan palpasi rektal (Tjiptosumirat dkk 2008). Selain hormon, telah diketahui suatu protein yang dapat mengindikasikan kebuntingan dini pada ternak ruminansia yaitu protein spesifik kebuntingan B (*pregnancy specific protein-b: PSPb*) yang merupakan glikoprotein plasenta sehingga disebut juga dengan nama PAG (*pregnancy associated glycoprotein*). Pengembangan metode diagnosa kebuntingan dini berbasis PSPB (*Pregnancy Specific Protein B*) dengan teknik RIA (*radioimmunoassay*) diharapkan dapat menjadi indikator kebuntingan alternatif di Indonesia. PSPB disekresikan pada sirkulasi

induk bunting (maternal) pada minggu ke 3 setelah perkawinan sehingga dapat digunakan sebagai penanda kebuntingan pada ternak ruminansia (Butler dkk 1982 dan Julie Pare dkk 2008).

Kegiatan penelitian tahun 2016 dilakukan untuk menghasilkan 2 data riset yaitu data riset uji lapang/ multi lokasi vaksin iradiasi mastitis dan kit RIA-PSPb dan data riset uji vaksin iradiasi brucellosis pada hewan percobaan. Kegiatan dengan aplikasi teknik nuklir yang dilakukan ini pada akhirnya diharapkan dapat meningkatkan produksi ternak yang sehat dan berdampak pada peningkatan ketersediaan pangan serta mendukung program Landmark BATAN dalam bidang Pangan (Pertanian / Peternakan).

MATERI DAN METODE

Kegiatan meliputi 3 sub kegiatan yaitu:

1. Uji lapang terbatas kandidat vaksin radiasi mastitis pada ternak ruminansia

Pada penelitian kali ini menggunakan sapi perah peranakan *friesian holstein* sebagai hewan percobaan yang dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan. Kelompok pertama untuk kelompok vaksin (V) yang diberi SGB iradiasi secara subkutan dengan dosis 10^8 cfu/ ml sebanyak 4 ml/ sapi, sedangkan kelompok kedua adalah kelompok kontrol (K) yaitu hewan normal yang tidak diberi vaksin SGB iradiasi. Vaksin diberikan pada masa kering kandang dengan pemberian booster 3 kali sebelum hewan melahirkan. Pengambilan sampel darah dilakukan tiap 2 minggu sekali (Crowther 2010). Pemeriksaan darah dilakukan untuk mengetahui status hematologi hewan.

Pemeriksaan eritrosit dilakukan dengan cara mengambil darah hewan percobaan dengan menggunakan syringe 10 ml, selanjutnya dimasukkan kedalam tabung yang mengandung anti koagulan. Darah dipipet dengan pipet eritrosit sampai tanda 0.5 kemudian ditambahkan dengan Larutan Hayem hingga 101. Lalu dikocok sampai homogen, dan dibiarkan selama 15 menit. Darah yang didalam pipet eritrosit dimasukkan ke dalam bilik hitung neubauer, kemudian dengan bantuan mikroskop pada perbesaran 1000 kali eritrosit dapat dihitung. Hasil dari perhitungan dari kelima kotak dibagi 5 dikali dengan $10.000/\text{mm}^3$.

Pemeriksaan PCV dilakukan dengan mengambil darah sebanyak $2/3$ dari panjang tabung hematokrit yang berukuran 75 mm x 1 mm. Bersihkan tabung hematocrit dari sisa-sisa darah sampai bersih dengan memakai kertas tissue lalu sumbat dengan plasticid. Masukkan kedalam sentrifuge/ haemofuge dengan posisi tabung tertutup sebelah luar dan yang terbuka ke arah dalam kemudian haemofuge di hidupkan selama 10 menit. Tabung

diangkat dari haemofuge, persentase PCV dapat dibaca sesuai yang tertera pada alat penghitung hematocrit.

Untuk mengetahui konsentrasi Hb darah dengan cara memasukkan 5 tetes HCl 0,1N ke dalam tabung pengencer Hemometer. Isaplah darah (kapiler, EDTA/Oxalat) dengan pipet HB sampai garis tanda 20 μ l, hapus darah yang melekat pada sebelah luar ujung pipet. Alirkan darah dari pipet kedalam dasar tabung pengencer yang berisi HCl 0,1N. Angkat pipet sedikit, lalu hisap HCl 0,1N yang jernih ke dalam pipet 2-3 kali untuk membersihkan darah yang masih tertinggal di pipet. Campur isi tabung itu supaya darah dan HCl bersenyawa, warna campuran menjadi coklat tua. Tambahkan aquadest setetes demi setetes, aduk dengan batang pengaduk. Baca kadar Hb dalam gram/100 ml darah.

2. Uji in vivo *Brucella abortus* pada mencit (*Mus musculus*).

Persiapan

Pemilihan mencit (*Mus musculus*) Strain BALB/c dengan umur 6-9 minggu, berat badan : 20-25 gram dan jenis kelamin jantan.

Infeksi

Pada penelitian ini, 24 ekor mencit dibagi menjadi 4 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor. Kelompok K1 merupakan kelompok tanpa vaksin dan tanpaantang, disuntikkan NaCl 0,2 ml secara intraperitoneal sebagai kontrol negatif. Kelompok K2 disuntikkan dengan bakteri *B. abortus* tanpa radiasi sebagai kontrol positif. Kelompok K3 disuntikkan dengan vaksin iradiasi brucellosis kemudian ditantang dengan *B. abortus* tanpa radiasi. Kelompok K4 disuntikkan dengan vaksin iradiasi brucellosis tanpa dilakukanantang. Masing-masing mencit (*Mus musculus*) disuntikkan bakteri *B. abortus* iradiasi dengan dosis 10⁹ cfu/ml sebanyak 0,2 ml/mencit secara intraperitoneal. Dan dosisantang 10⁵ cfu/ml sebanyak 0,2 ml/mencit. Pemberian vaksin dilakukan pada minggu ke-1 kemudian dilanjutkan *booster* pada minggu ke-3 dan minggu ke-5, danantang pada minggu ke-7. Mencit (*Mus musculus*) dipelihara dalam kandang dan diberi makan dan minum *ad libitum*.

Pengambilan darah praperlakuan

Pengambilan sampel darah mencit (*Mus musculus*) dilakukan pada sebelum perlakuan, saat perlakuan dan setelah perlakuan infeksi *B. abortus* dengan periode 2 minggu sekali. Mencit (*Mus musculus*) direstrain kemudian dipindahkan ke ruang *treatment* dan diambil darahnya melalui medial canthus sinus orbitalis dalam keadaan

anastesi dengan menggunakan hematokrit dan dimasukkan tabung. Anastesi yang digunakan Ketamin (dosis 100 mg/kg, diinjeksikan IP) dan Xylazin (10 mg/kg, diinjeksikan IP) (Guidelines on Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals, 2009)

Pewarnaan ulas darah dengan giemsa

Sediaan ulas darah difiksasi dengan metanol absolut selama 10 – 15 menit. Larutan methanol dibuang dari ulas darah kemudian tambahkan zat warna Giemsa 10%. Biarkan selama 15 menit. Bilas secara perlahan dengan air mengalir sampai semua kelebihan zat warna hilang. Letakkan sediaan hapus dalam rak dalam posisi tegak dan biarkan mengering. Ulas darah diperiksa dengan mikroskop pada perbesaran 100 x10.

3. Uji Reaktivitas Perunut ¹³¹I-PSPB Untuk Kit Ria PSPB

Koleksi, preparasi dan ekstraksi kotiledon.

Pada penelitian ini dilakukan dengan melakukan ekstraksi sampel kotiledon yang berasal dari plasenta sapi perah yang mengalami keguguran (umur kebuntingan sekitar 4 bulan) di daerah Kemang Kabupaten Bogor. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan memisahkan kotiledon dari pasenta menggunakan pinset dan scalpel, yang kemudian dihaluskan menggunakan blender. Kurang lebih 200 gr larutan kotiledon dicuci dengan NaCl 0,9 % dan selanjutnya ditambahkan buffer phospat 0,01M kemudian di aduk menggunakan stirrer pada suhu 4oC sambil ditambahkan Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 0,2M dan sodium EDTA 0,2%. Larutan kotiledon diaduk menggunakan stirrer selama 24 jam pada suhu 4oC. Larutan disentrifus pada 13000 rpm selama 60 menit kemudian diambil supernatannya. Supernatan ditambah asam phospat sampai pH 4,5 dan diaduk menggunakan stirrer selama 2 jam. Selanjutnya larutan kembali disentrifus pada 13000 rpm selama 60 menit dan pH supernatan disesuaikan menjadi 7,5 dengan menambahkan KOH 0,5 M kemudian disimpan pada 4oC sampai digunakan pada proses filtrasi.

Fraksinasi kolom Sephadex G-75.

Filtrasi larutan kotiledon dilakukan menggunakan kolom Sephadex G-75. Persiapan kolom Sephadex G-75 dilakukan dengan menimbang 0,8 gram Sephadex G-75 kemudian dilarutkan dengan lebih kurang 30 ml NaOH 0,1 N. Larutan Sephadex secara perlahan dialirkan ke dalam kolom gelas yang sudah dilapisi dengan kertas saring Wattman no 41 pada daerah filternya. Selanjutnya larutan tersebut dibiarkan mengeras kurang lebih selama 15 menit. Loading ekstrak kotiledon dilakukan perlahan ke dalam kolom dan proses fraksinasi ke dalam masing-masing micro tube dilakukan dengan laju

alir 1-1,5 ml/menit. Fraksi yang diperoleh selanjutnya disimpan dalam refrigerator untuk digunakan pada proses selanjutnya.

SDS PAGE, Elusi Sederhana dan Elektroelusi Serta Penentuan Konsentrasi PSPB

Karakterisasi protein PSPB dilakukan dengan metode sodium dodesyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) mengikuti metode yang di deskripsikan oleh Laemmli (1970). Gel SDS PAGE dipotong pada bagian pita protein PSPB menggunakan scalpel steril selanjutnya potongan pita PSPB disimpan dalam microtube yang berisi PBS 0,1 M dengan pH 7. Isolasi PSPB dilakukan dengan menggunakan teknik elektroelusi, potongan gel pita PSPB ditempatkan di dalam G-CapsuleTM (Bioscience) selanjutnya diletakkan di dalam tangki elektroforesis horizontal yang berisi buffer TE. Kabel positif dan negatif dipasang pada masing-masing kutubnya dan elektroforesis di running pada 100 volt selama 1,5 jam dengan suhu 20°C. Larutan (berisi protein) yang terkumpul pada membran G-CapsuleTM dikoleksi melalui collection port menggunakan pipet. Protein yang terkumpul disimpan dalam refrigerator dan gel pita protein diambil kembali untuk dikeluarkan sisa proteinnya menggunakan metode elusi sederhana. Selanjutnya protein dipekatkan menggunakan tabung AmiconUltra® MWCO 50 KDa (Merck). Penentuan konsentrasi PSPB dilakukan pada fraksi ekstrak kotiledon, fraksi ekstrak karunkula, presipitasi asam, elusi sederhana dan elektroelusi menggunakan ELISA kit untuk bovine PSPB (Finetest, No Catalog EB004).

Radioiodinasi dengan Metode Chloramine T

Pelabelan protein menggunakan radios isotop dilakukan mengikuti metode yang dideskripsikan oleh Bailey (1990). Protein disiapkan ke dalam tabung plastik kecil sejumlah 10 µL, kemudian ditambahkan Na-125I 5 µL 37 MBq (1 mCi), buffer A 50 µL (0.5 M buffer sodium phosphate dengan pH 7.4) dan larutan chloramine T 25 µL (2 mg/mL chloramine T di dalam 0.05 M buffer sodium phosphate dengan pH 7.4). Larutan dihomogenkan sambil digoyang-goyangkan kemudian didiamkan selama 30 detik. Sodium metabisulfite sejumlah 500 µL ditambahkan kedalam larutan dan masing-masing 10 µL larutan dialikuot ke dalam tabung polistiren kecil untuk dilanjutkan pada proses purifikasi.

Purifikasi, Pengukuran Radioaktivitas, Pengujian Radiokimia dan Immunoreaktivitas.

Purifikasi protein-radioisotop dilakukan dengan menggunakan kolom PD-10 G25 mengikuti metode yang dideskripsikan oleh Bailey (1990). Radioaktivitas 10 µL larutan protein-radioisotop dihitung dan kemudian dialirkan ke dalam kolom dan fraksi dikoleksi

sejumlah 0.6 mL dalam masing-masing tabung. Selanjutnya fraksi dialikuot sejumlah 10 μ L ke dalam tabung plastik kecil. Masing-masing alikuot dari setiap fraksi dihitung radioaktifitasnya menggunakan gamma counter dan hasilnya diplot kedalam kurva radioaktivitas versus fraksi.

Fraksi-fraksi yang membentuk puncak pertama pada kurva radioaktivitas merupakan senyawa dari hasil ikatan protein dan radioisotop. Kemurnian radiokimia diuji menggunakan kertas Whattman dengan eluen aseton untuk menentukan % 125I bebas dan TLC dengan eluen campuran ammonium asetat methanol (1:1) untuk menentukan % koloid 125I.

Penentuan immunoreaktivitas dilakukan dengan mengencerkan alikuot fraksi (10 μ L) dari puncak kurva pertama menjadi 100 μ L sehingga diperoleh cacahan 10.000 cpm/100 μ L. Masing-masing alikuot yang telah diencerkan diinkubasi dengan antibodi boPSPB (Cusabio) pada suhu 4°C selama 4 jam. Ikatan protein-antibodi dan sisa antibodi dalam larutan dipresipitasi dengan menambahkan larutan γ -globulin (200 μ L) dan polyethilen glycol (1 mL) ke masing-masing sampel pada suhu 4°C. Masing-masing tabung dihomogenkan menggunakan vortex mixer kemudian didiamkan pada suhu 4°C selama 15 menit. Selanjutnya masing-masing tabung diputar menggunakan sentrifus pada 4000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Supernatan dihisap secara hati-hati menggunakan pipet dan presipitat di dasar tabung dihitung radioaktivitasnya menggunakan gamma counter.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pemeriksaan darah, diperoleh nilai rata-rata eritrosit sebesar $5,9 \times 10^6$ sel/ mm^3 . Nilai tersebut masih dalam kisaran normal yaitu $5-10 \times 10^6$ sel/ mm^3 . Hal ini menunjukkan bahwa sapi yang diberi vaksin tidak mempengaruhi nilai eritrosit.

Tabel 1. Profil Eritrosit Sapi Perah kelompok perlakuan kontrol dan vaksin

Kelompok Sapi	Eritrosit ($\times 10^6$ sel/ mm^3)
Kontrol	5,7
Vaksin	5,9

Sementara untuk nilai PCV diperoleh nilai rata-rata PCV sebesar 32,2% dan Hb 10,4 $\frac{\text{g}}{\text{dL}}$ (Tabel 2). Nilai-nilai tersebut masih dalam batas normal yaitu untuk PCV 24-

46% dan Hb 10-17 g/ dl. Hal ini menunjukkan bahwa sapi perah yang divaksin dengan vaksin iradiasi mastitis tidak menyebabkan anemia pada hewan percobaan.

Tabel 2. Profil PCV dan Hb Sapi Perah kelompok perlakuan kontrol dan vaksin

Kelompok Sapi	PCV (%)	Hb (g/ dl)
Kontrol	31,5	9,8
Vaksin	32,2	10,4

Manajemen kebersihan kandang dan pekerja masih menjadi kunci keberhasilan penanganan kasus mastitis. Kebersihan yang buruk akan menyebabkan bakteri penyebab mastitis berkembang biak. Deteksi mastitis subklinis pada ruminansia juga dilakukan dengan cara tidak langsung seperti uji dengan CMT maupun penghitungan sel somatik (Shearer and Haris 2003).

Pada penelitian ini dilakukan infeksi *B. abortus* iradiasi dengan dosis radiasi 1000 Gy ke mencit (*Mus musculus*). Untuk mengetahui pengaruh pemberian *B. abortus* iradiasi maka dilakukan pengambilan darah untuk mengetahui gambaran darahnya. Dengan menggunakan pewarnaan ulas darah Giemsa digunakan untuk mengetahui jenis leukosit. Leukosit atau disebut juga dengan sel darah putih merupakan sel darah yang mengandung inti. Leukosit dapat di bedakan menjadi 5 bagian yaitu limfosit, monosit, neutrofil, eosinofil dan basofil. Pada pemeriksaan dengan mikroskop leukosit mempunyai granula spesifik (granulosit). Hasil penghitungan diferensial leukosit pra perlakuan pada penelitian ini terlihat pada Tabel 3.

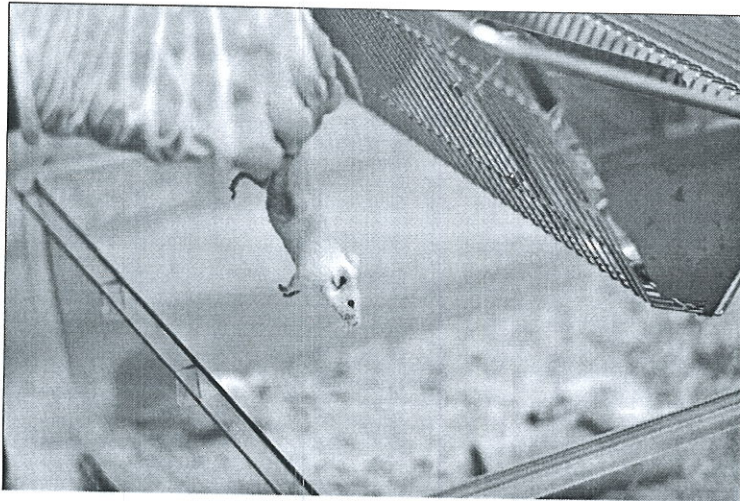
Tabel 3. Gambaran diferensial leukosit pada darah mencit (*Mus musculus*)

	Basofil	Eosinofil	Neutrofil	Limfosit	Monosit
K1	0	0	34	64	2
K2	0	2	33	62	3
K3	0	0	25	72	3
K4	0	1	35	64	0

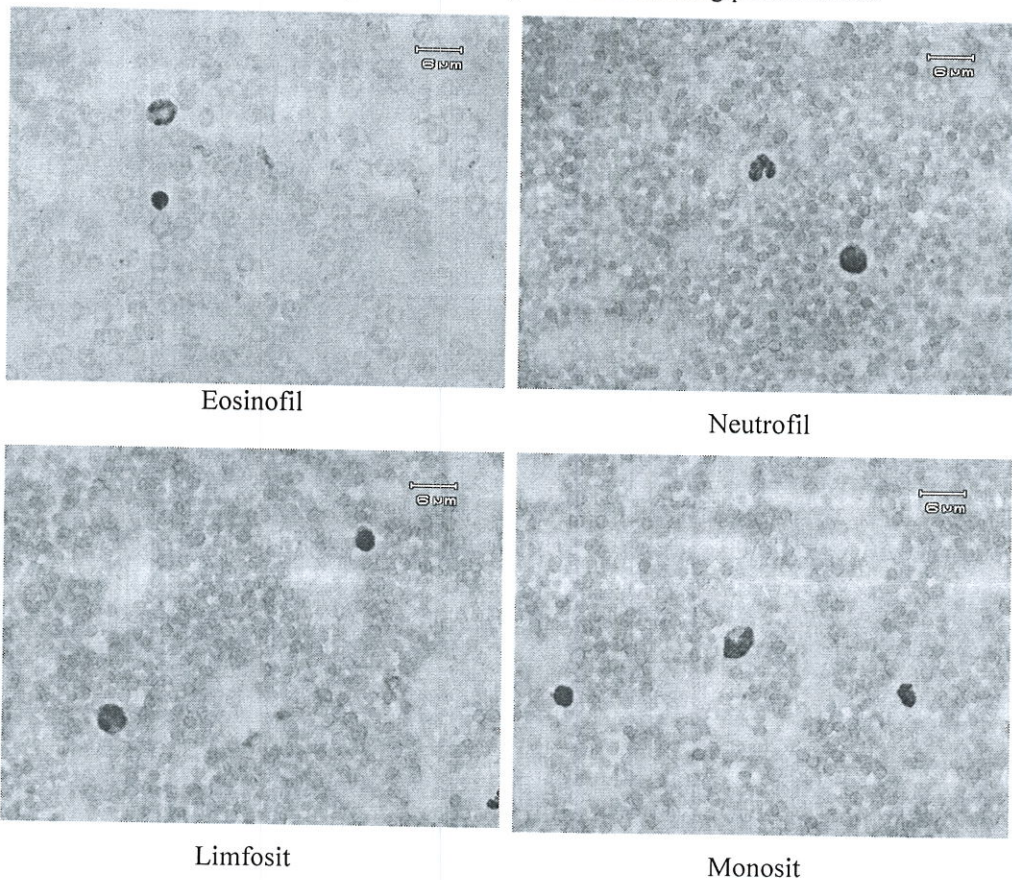
Keterangan : K1=kelompok 1; K2=kelompok 2; K3=kelompok 3; K4=kelompok 4

Hasil pengamatan nilai dari diferensial leukosit pra perlakuan (basofil, eosinofil, neutrofil, limfosit, dan monosit) pada penelitian terlihat pada Tabel 1. Berdasarkan literatur diketahui nilai normal dari limfosit 48,8 -83,19%; neutrofil 9,86 -39,11, basofil

0,07%, eosinofil 0,11-4,91 dan monosit 3,29 -12,48% sehingga nilai dari diferensial leukosit tersebut didalam kisaran normal.



Gambar 1. Mencit (*Mus musculus*) di dalam kandang pemeliharaan



Gambar 2. Jenis leukosit pada ulas darah mencit (*Mus musculus*) dengan mikroskop pada perbesaran 100 x10

Pada pemeriksaan diferensial leukosit dari ulas darah diperoleh macam-macam leukosit yang terlihat pada Gambar 2. Eosinofil memiliki granula bewarna merah, ukuran dan bentuknya hampir sama dengan neutrofil, tetapi granula pada sitoplasmanya lebih besar. Neutrofil terlihat memiliki granula yang tidak bewarna, mempunyai inti sel yang terangkai, kadang terlihat terpisah-pisah, protoplasmanya banyak berbintik-bintik. Limfosit memiliki nucleus besar bulat dengan menempati sebagian besar sel. Monosit memiliki ukuran yang lebih besar daripada limfosit, protoplasmanya besar, warna biru sedikit abu-abu, serta mempunyai bintik-bintik sedikit kemerahan halus atau granula.

Kegiatan penelitian pengujian immunoreaktivitas PSPB tahun 2016 ini dimulai dengan ekstraksi jaringan kotiledon dan karunkula kemudian diteruskan dengan screening fraksi PSPB menggunakan kolom Sephadex G-75, karakterisasi fraksi utama dilakukan dengan SDS PAGE serta dilanjutkan dengan pengeluaran protein PSPB dengan elektroelusi dan elusi sederhana. Protein yang berhasil dikumpulkan kemudian dipisahkan dan dilakukan radioiodinasi menggunakan iodium 131 dengan choramin T sebagai oksidatornya serta dilanjutkan dengan uji radiokimia serta immunoreaktivitas.

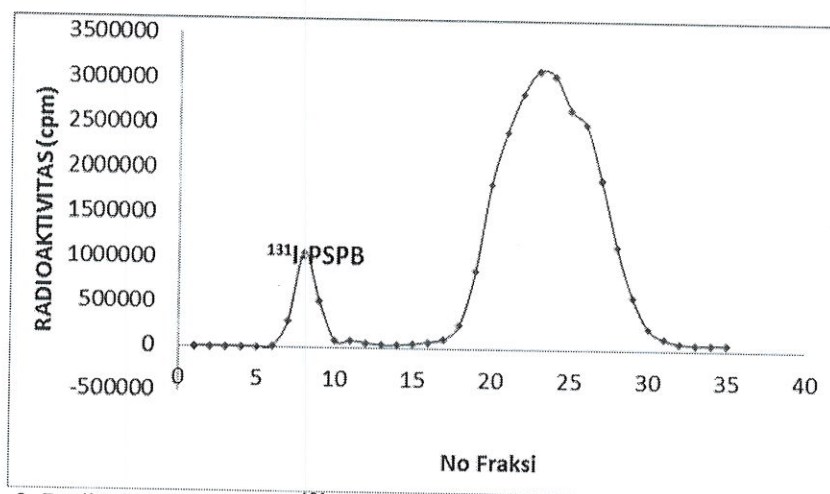
Tabel 4. Konsentrasi PSPB hasil fraksinasi, elusi sederhana dan elektroelusi.

Bahan	Konsentrasi PSPB (ng/ml)
Fraksi kotiledon ke-11 sampai 20	3.28±0.14
Fraksi karunkula ke-11 sampai 35	4.24±0.07
Presipitasi asam campuran kotiledon + karunkula	3.07±0.04
Elusi Karunkula (elusi ke-2)	0.77±0.04
Elusi Kotiledon (elusi ke-2)	29.03±0.14
Presipitasi asam karunkula	3±0.25
Presipitasi asam kotiledon	9.35±0.31
Elektroelusi ekstrak kotiledon + karunkula	597.68±1.13

Pengukuran konsentrasi PSPB menggunakan ELISA pada berbagai elemen ekstrak, fraksi dan elektroelusi didapatkan hasil terbaik pada elektroelusi dan elusi sederhana kotiledon dengan konsentrasi maksimum 597.68±1.13 dan 29.03±0.14 ng/ml (Tabel 4). Elektroelusi protein merupakan metode yang cukup efektif untuk mengisolasi protein dari gel SDS PAGE, menurut Dunn (2004) efisiensi yang dihasilkan dapat mencapai lebih dari 90% dalam hal protein recovery. Mekanisme elektroelusi adalah perpindahan protein dari gel melalui medan elektrik ke dalam larutan dan terkumpul pada

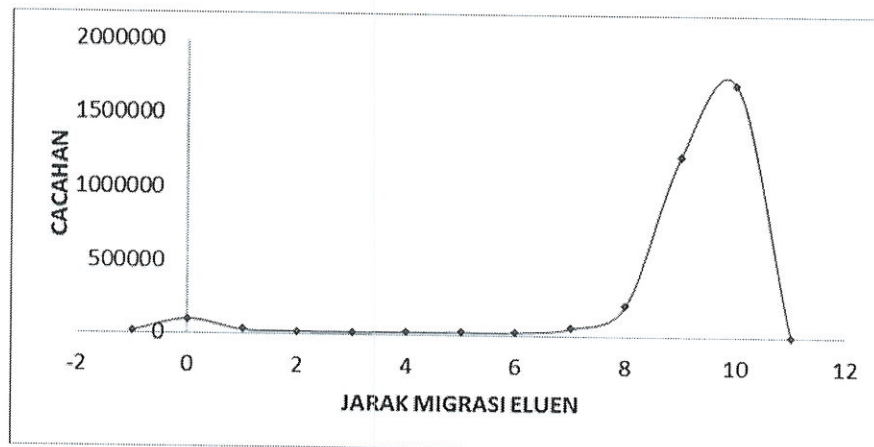
membran dialisis yang memiliki MWCO (molecular weight cut off) tertentu. Disamping keunggulannya, elektroelusi juga mempunyai beberapa kelemahan antara lain: pelaksanaan isolasi dengan waktu yang lebih lama, risiko kontaminasi pada protein yang telah terelusi dengan SDS; garam dan lain-lain, putusnya rantai peptida selama pewarnaan SDS PAGE atau elektroelusi, terjadinya modifikasi kimiawi yang dapat menyebabkan penyumbatan pada terminal-N.

Protein PSPB hasil elektroelusi kemudian digunakan dalam penandaan menggunakan iodium 131 dengan chloramine T sebagai oksidatornya. Chloramine T merupakan oksidator kuat yang umum dimanfaatkan dalam radioiodinasi dimana oksidator tersebut mampu mengoksidasi dan memfasilitasi 1 atom iodin radioaktif dengan satu molekul protein. Adapun senyawa kimia lainnya yang dapat berperan sebagai oksidator radioisotop antara lain iodogen dan laktoperoksidase.



Gambar 3. Radioaktivitas perunut ^{131}I -PSPB hasil radioiodinasi dengan oksidator chloramine T

Cacahan hasil penandaan PSPB (Gambar 3) menunjukkan perunut ^{131}I -PSPB membentuk puncak pada fraksi 7 sampai dengan 10 sedangkan fraksi 18-32 (puncak kedua) merupakan merupakan sisa dari iodium 131 yang tidak terpakai dari proses radioiodinasi. Dari pengukuran radioaktivitas tersebut, jumlah radioisotop yang berikatan dengan protein diperkirakan sekitar 8% dari jumlah total radioisotop yang ditambahkan. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi ikatan yang baik antara radioisotop pada residu tyrosin protein PSPB, namun persentase dari cacahan perunut mengindikasikan perlunya untuk meningkatkan konsentrasi PSPB.



Gambar 4. Kemurnian radiokimia fraksi ^{131}I -PSPB.

Pengujian kemurnian radiokimia pada perunut ^{131}I -PSPB ditunjukkan pada Gambar 4. Grafik kemurnian radiokimia (Gambar 4) menunjukkan terbentuknya puncak perunut pada migrasi eluen ke-8 dengan nilai cacahan gamma sebesar 92.95% yang berarti bahwa fraksi ^{131}I -PSPB terdapat dalam jumlah 92.95% dan sisa 7.05% berupa iodium 131 bebas yang tertinggal pada tempat penotolan di kertas kromatografi.

Tabel 5. Rataan nilai NSB dan B0 dari ^{131}I -PSPB

Parameter assay	x1000 CPM
NSB	50,783
B0	51,496

Non Specific Binding (NSB) merupakan ikatan yang terjadi antara ligan (perunut) dengan selain reseptor yang telah ditentukan sedangkan Binding Zero (B0) merupakan cacahan maksimum (tertinggi) yang dihasilkan dari ikatan antara perunut ^{131}I -PSPB dengan antibodi pada standar PSPB paling rendah. Pada percobaan ini dihasilkan NSB dengan nilai cacahan 50,783 CPM, nilai cacahan tersebut termasuk besar dibandingkan cacahan normal NSB sekitar 8,00-1,000 CPM hal ini dapat disebabkan oleh faktor sebagai berikut: proses dekantasi yang tidak sempurna sehingga perunut banyak yang tertinggal di dasar atau menempel di dinding tabung sehingga ikut terhitung pada proses cacahan, perunut menempel pada komponen buffer pereaksi dan tertinggal bersama pellet sehingga memperbesar nilai cacahan. Sedangkan rerata nilai cacahan B0 diperoleh 51,496 CPM nilai tersebut merupakan nilai yang umum (normal) pada cacahan B0 (Tabel 5).

Tabel 6. Pengujian terhadap fraksi tertinggi ¹³¹I-PSPB

Parameter Pengujian	%
Radioaktivitas	8
Kemurnian radiokimia	92.95
Immunoreaktivitas	8

Puncak fraksi perunut pada kurva radioaktivitas dan kemurnian radiokimia (Gambar 3 dan 4) dikalkulasikan dan diestimasi sebesar 8% dan 92.95%, persentase radioaktivitas termasuk kecil bila dibandingkan dengan puncak kedua dan hal ini berkaitan dengan kecilnya konsentrasi dari PSPB tersebut sehingga perlu dilakukan upaya pemekatan lebih lanjut. Adapun nilai kemurnian radiokimia sebesar 92.95% merupakan representasi kemurnian radiokimia yang cukup baik dibandingkan dengan nilai maksimal yang berpotensi untuk dicapai yakni sebesar 99.99%. Nilai immunoreaktivitas yang dihasilkan sebesar 8% (Tabel 6), hasil ini merupakan nilai ikatan yang terjadi antara antibodi dan senyawa bertanda (¹³¹I-PSPB) dan diukur dengan cacahan sinar gamma. Immunoreaktivitas yang baik mempunyai nilai lebih dari 80% sedangkan immunoreaktivitas ¹³¹I-PSPB hanya 8% dan cenderung berbanding lurus dengan nilai cacahan radioaktivitas, sehingga diperlukan antigen PSPB dengan kemurnian dan konsentrasi yang lebih tinggi melalui metode isolasi dan pemekatan yang lebih baik (kromatografi/HPLC dan pemekatan membran dengan MWCO lebih kecil 3-10 KDa).

KESIMPULAN

Dari 3 subkegiatan tersebut dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Hasil pemeriksaan darah sapi pada penelitian kandidat vaksin mastitis diperoleh nilai rata-rata eritrosit $5,9 \times 10^6$ sel/ mm³ dan nilai PCV 32,2%. Nilai tersebut masih dalam kisaran normal (eritrosit $5-10 \times 10^6$ sel/ mm³ dan PCV 24-46%). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vaksin tidak menyebabkan anemia pada sapi perah.
2. Nilai rata rata sel basofil, eosinofil, neutrofil, monosit dan limfosit praperlakuan pada mencit (*Mus musculus*) dalam kisaran normal.
3. Nilai immunoreaktivitas perunut ¹³¹I-PSPB periode Januari-September 2016 yang diperoleh adalah 8%. Hasil ini merupakan nilai ikatan yang terjadi antara antibodi dan senyawa bertanda (¹³¹I-PSPB). Immunoreaktivitas yang baik mempunyai nilai lebih dari 80% sedangkan immunoreaktivitas ¹³¹I-PSPB hanya 8%, sehingga diperlukan antigen PSPB dengan kemurnian dan konsentrasi yang lebih tinggi

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Samik. Identifikasi Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG) Dari Air Susu Sapi Perah Bunting. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan* Vol. 4, No. 1, Februari 2011.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Vengr JM. 1988. *Techniques for The Brucellosis Laboratory*. Paris: Institute National De La Recherche Agronomique
- Arifin, M., E. Pudjiastuti, B.J. Tuasikal, E. Yulia, "Pengaruh irradiasi terhadap Immunogenitas *Brucella abortus*", Risalah Seminar Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Aplikasi Isotop dan Radiasi untuk Litbang bidang Pertanian, Peternakan, Industri dan Lingkungan dalam Pembangunan Nasional, P3TIR-BATAN, Jakarta 17-18 Februari 2004.
- Arifin, M., Enuh R.J., B.J. Tuasikal, Pujiatmoko, "Pengamatan Serologi dan Patologi pada sapi Peranakan Ongole (PO) yang diinokulasi dengan metaserkaria *Fasciola gigantica* irradiasi", Prosiding Seminar Nasional Pengembangan Usaha Peternakan Berdaya Saing di Lahan Kering, Fakultas Peternakan UGM, Yogyakarta, 2005.
- Bailey, G. S. 1990. In vitro labeling of proteins, in *Radioisotopes in Biology* (Slater, R. J., ed.), IRL, Oxford, UK, pp. 191-205.
- Butler JE, amilton WC, Sasser RG, Ruder CA, Hass GM, William RJ. Detection and Partial Characterization of Two Bovine Pregnancy-Specific Protein. *Boil Reprod* 1982; 26:975-933.
- Charles River laboratories International inc. [www. Criver.com](http://www.Criver.com)
- Diano, M., Le Bivic, A. and Hirn, M. A Method for Production of Highly Specific Polyclonal Antibodies. *Analytical Biochemistry*; 166: 224-229, 1987.
- Diwyanto, K., Bahri, S., dan Masbulan, R., Ketersediaan dan kebutuhan teknologi peternakan dan veteriner dalam upaya meningkatkan ketahanan pangan., Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner BPT Ciawi Bogor (2000).
- Dunn, M. J. 2004. Electroelution of Proteins From Polyacrylamide Gels, in *Protein Purification*
- Frandsen, R.D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak Edisi ke-4*. Gadjah Mada University Press: Yogyakarta
- Ghaffar A. 2010. *Bacteriology. Zoonoses Listeria, Francisella, Brucella, Bacillus and Yersinia*. Chapter seven. *Microbiology and immunology on line*. Microbiology and immunology on line. The University of South Carolina.
- Indrawati, A. Pembuatan Antibodi Monoklonal Terhadap Immunoglobulin M (Ig M) Manusia. Tesis Magister Program Studi Ilmu Biomedik, FK UI; 12-14, 1998.

- Julie Pare, Marie Helena, Paul Rouillier, Marc-André Sirard. Evaluation of the DG29 test for early detection of pregnancy in cattle. *Can Vet J* 2008; 49:1119–1121.
- Kimoto, T., FAO Strategies for collaboration with the government of Indonesia on Animal production and Veterinary sciences., Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, BALITNAK, Ciawi, Bogor, 2002.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lynch RA, Alexander BM, Sasser RG. The cloning and expression of the bovine pregnancy specific protein B (PSPB) gene. *Boil Reprod* 1992;46 (suppl 1):73.
- Morgan WJB. 1982. *Brucella abortus*. In *Handbuch der bakteriellen infektionen bei Tieren*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena. German
- OIE World Organization for Animal Health. 2009. OIE Terrestrial Manual Chapter 2. 4. 3. Bovine brucellosis. www.oie.int
- Partadiredja, M., Potensi, Peluang dan Prospek Perguruan Tinggi Dalam Memenuhi Kebutuhan Vaksin dan Bahan Biologik Veteriner Lain di Indonesia. Lokakarya Puslitbangnak, Balitbangtan Bogor (1999).
- Permentan PERATURAN MENTERI PERTANIAN. 2010. Permentan Nomor 16/Permentan/OT.140/1/2010. Pedoman Identifikasi dan Pengawasan Ternak Ruminansia Besar
- Protocols 2nd Edition. Vol 244 of the series *Methods in Molecular Biology* pp. 339-343
- Setiatin, E.T. Purifikasi Ovine Pregnancy Associated Glycoprotein (ovPAG) dalam Kotiledon Plasenta dan Pengukuran Konsentrasinya dalam Urine domba Garut. Ringkasan Disertasi. Sekolah Pascasarjana. IPB, Bogor. 2010
- Shearer JK and Harris B Jr. 2003. Mastitis in dairy goats. University of Florida, Ifas extention. <http://edis.ifas.ufl.edu>. [28 Juli 2010].
- Smith, N.C., “Concepts and strategies for anti-parasite immunoprophylaxis and therapy”, *Int. J. for Par.* 22 (1992)
- Sudibyo, A., Adin, P., Darodjat, M., dan Supar., “Pengembangan Vaksin Oral Brucellosis: Tingkat Proteksi Vaksin B. suis Galur 2 Terhadap Tantangan B suis Isolat Lapangan Pada marmot; Seminar Hasil Hasil Penelitian Veteriner (Risalah Pertemuan Ilmiah, Bogor 1998) BALITVET Bogor (1998) 51.
- Sudradjat, S., Strategi peningkatan ketahanan pangan nasional bidang peternakan. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, BPT Ciawai Bogorr (2000).
- Tjiptosumirat, T., B.J. Tuasikal, N. Lelanangtyas, “Radioimmunoassay (RIA) Progesteron untuk Diagnosis Kegagalan Inseminasi Buatan pada Ternak Sapi Perah”,

Prosiding Presentasi Ilmiah Keselamatan Radiasi dan Lingkungan X, Jakarta 14 Desember 2004, Puslitbang Keselamatan Radiasi dan Biomedika Nuklir, BATAN, 2005.

Tjiptosumirat, T., I. Sugoro dan N. Lelaningtyas. Identifikasi Senyawa Protein Spesifik Kebuntingan Tipe B (Pspb) Hasil Filtrasi Dengan Sephadex-Gel 75 Sebagai Bahan Senyawa Deteksi Kebuntingan Dini. Prosiding Seminar ilmiah Hasil Penelitian Aplikasi isotop dan Radiasi. (2008). 393-399.

Tuasikal B.J., T.Tjiptosumirat, R.Kukuh, "Studi Gangguan Reproduksi Sapi Perah dengan Teknik Radioimmunoassay (RIA) Progesteron", Risalah Seminar Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Aplikasi Isotop dan Radiasi untuk Litbang bidang Pertanian, Peternakan, Industri dan Lingkungan dalam Pembangunan Nasional, P3TIR-BATAN, Jakarta 17-18 Februari 2004.

WHO World Health Organization. 1997. The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting. Geneva, Switzerland

Yadi Suryadi, Ifa Manzila, Alina Akhdiya, dan Etty Pratiwi. Produksi dan Evaluasi Antibodi Poliklonal untuk Deteksi Toksin *Photobacterium* spp. Jurnal AgroBiogen 2(1):16-23.