

Teknik Molekuler Amplifikasi DNA untuk Deteksi Brucellosis pada Sapi (DNA Amplification Technique for Detection of Bovine Brucellosis)

Susan M Noor

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
susan_yurismono@yahoo.com

(Diterima 20 April 2018 – Direvisi 11 Mei 2018 – Disetujui 5 Juni 2018)

ABSTRACT

Brucellosis is one of cattle diseases which causes a very significant economic loss and categorized as zoonotic disease. Early detection of Brucellosis in livestock is very important to prevent the spread of disease to livestock and humans. The success of Brucellosis control depends on rapid, sensitive and specific detection methods. The aim of this paper is to review several methods of Brucellosis detection in cattle. Currently, the detection of Brucellosis in Indonesia is using serological and isolation methods. The latter method is the gold standard of Brucellosis diagnosis, however, its sensitivity is low. Therefore, molecular techniques with DNA amplification have been developed and applied in many countries both in livestock and humans because they are more sensitive, specific and rapid in detecting *Brucella* sp in blood, milk and semen samples. Various DNA amplification methods for detection of Brucellosis that have been developed including polymerase chain reaction (PCR), finger printing and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Both PCR and LAMP are more sensitive and specific in detecting *Brucella* sp than conventional techniques. PCR technique has advantages in detecting *Brucella* sp species to serotype and biovar levels. In addition, PCR reagents are cheaper and easier to obtain than LAMP even though, LAMP procedure is simpler and faster.

Key words: Brucellosis, cattle, detection, molecular, DNA

ABSTRAK

Brucellosis adalah salah satu penyakit pada sapi yang menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat signifikan dan bersifat zoonotik. Deteksi awal Brucellosis pada ternak sangat penting untuk mencegah penyebaran penyakit pada ternak dan manusia. Keberhasilan pengendalian Brucellosis sangat tergantung pada metode deteksi yang cepat, sensitif dan spesifik. Tujuan dari tulisan ini adalah melakukan kajian metode deteksi Brucellosis pada sapi. Deteksi Brucellosis pada sapi di Indonesia saat ini masih menggunakan metode serologis dan isolasi kuman. Metode isolasi merupakan standar baku emas untuk diagnosis Brucellosis namun sensitivitasnya rendah. Oleh karena itu, teknik molekuler dengan amplifikasi DNA telah banyak dikembangkan dan diaplikasikan di banyak negara baik pada ternak maupun manusia karena lebih sensitif, spesifik dan cepat dalam mendeteksi *Brucella* sp pada sampel darah, susu dan semen. Beberapa metode amplifikasi DNA untuk deteksi Brucellosis pada sapi telah dikembangkan meliputi teknik *polymerase chain reaction* (PCR), *finger printing* dan *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). Teknik PCR dan LAMP lebih sensitif dan spesifik dalam mendeteksi *Brucella* sp dibandingkan dengan teknik konvensional. Teknik PCR mempunyai kelebihan dalam hal mendeteksi spesies *Brucella* sp sampai ke tingkat serotipe dan biovar. Selain itu, reagen PCR lebih murah dan mudah diperoleh dibandingkan dengan LAMP walaupun prosedur LAMP lebih sederhana dan cepat.

Kata kunci: Brucellosis, sapi, deteksi, molekuler, DNA

PENDAHULUAN

Brucellosis pada sapi adalah penyakit reproduksi menular yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Brucella abortus* dan bersifat zoonotik (Seleem et al. 2010; Gupta et al. 2014; Kaltungo et al. 2014). Penyakit ini di Indonesia dikategorikan sebagai salah satu penyakit hewan menular strategis yang mendapat prioritas pengendalian. Untuk itu, diperlukan metode diagnosis yang cepat dan tepat untuk mengidentifikasi dan mengontrol Brucellosis pada sapi. Brucellosis sangat

infeksius pada sapi dan berdampak pada kerugian ekonomi yang sangat signifikan karena mengakibatkan keguguran, sterilitas dan infertilitas, pedet lahir lemah atau lahir mati (*stillbirth*) serta turunnya produksi susu (Gwida et al. 2011; Soleimani et al. 2013; Dhama et al. 2014). Brucellosis sebagai zoonosis juga menjadi ancaman penularan penyakit pada manusia baik secara langsung kontak dengan sapi terinfeksi maupun melalui produk ternak yang terinfeksi (Atluri et al. 2011).

Berbagai metode deteksi untuk diagnosis Brucellosis pada sapi telah digunakan yaitu melalui

isolasi dan identifikasi bakteri, uji serologis dan molekuler (Da Silva Mol et al. 2012). Isolasi dan identifikasi bakteri merupakan metode standar baku emas untuk diagnosis Brucellosis namun sensitivitasnya rendah, butuh waktu lama untuk isolasi dan butuh keahlian pengerjaan serta berisiko terinfeksi untuk pekerjaannya (Kazemi et al. 2008; Taleski 2010; Gomo et al. 2012). Sebaliknya, diagnosis serologis Brucellosis dengan *rose bengal test* (RBT), *complement fixation test* (CFT) atau *enzyme-linked immuno sorbent assay* (ELISA) hanya digunakan untuk uji penyarangan Brucellosis pada level peternakan (Yu & Nielsen 2010; Pabuccuoglu et al. 2011; Priyadarshini et al. 2013). Kelemahan uji serologis adalah terjadi reaksi silang dengan bakteri lain seperti *Yersinia enterocolitica* sehingga menghasilkan positif palsu. Selain itu, sulit untuk mendeteksi respon antibodi terhadap Brucellosis pada stadium akut (Moussa et al. 2011), serta tidak mampu membedakan antara sapi yang divaksinasi dan sapi yang terinfeksi (Mukherjee et al. 2007; Baddour & Alkhalifa 2008).

Teknik deteksi molekuler melalui amplifikasi DNA seperti *polymerase chain reaction* (PCR) (OIE 2011), *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) (Trangoni et al. 2015), *finger printing*, telah banyak digunakan untuk diagnosis Brucellosis pada hewan dan manusia. Melalui teknik molekuler PCR mampu mengidentifikasi biotipe *B. abortus* secara cepat, sensitif dan spesifik sehingga dapat digunakan untuk identifikasi kekerabatan genotipe isolat *Brucella* sp yang ada di dunia (Habtamu et al. 2013).

Indonesia mencanangkan program pembebasan Brucellosis pada sapi pada tahun 2025, oleh karena itu monitoring penyakit melalui surveilans sangat penting. Untuk itu, sudah saatnya metode molekuler diterapkan untuk mendeteksi Brucellosis terutama untuk deteksi bakteri *Brucella* sp pada semen dan susu sebagai sumber penularan Brucellosis yang sulit untuk dideteksi secara bakteriologi. Hal ini disebabkan oleh jumlah organisme *Brucella* sp dalam sampel susu dan semen biasanya lebih rendah dibandingkan dengan yang ada pada material abortusan, lambung fetus, cairan dan membran fetus (OIE 2009).

TEKNIK AMPLIFIKASI DNA UNTUK DIAGNOSIS BRUCELOSIS

Teknik deteksi penyakit berbasis amplifikasi DNA telah banyak dikembangkan untuk deteksi dan identifikasi *Brucella* sp dalam usaha mengatasi keterbatasan diagnosis konvensional. Beberapa teknik amplifikasi DNA untuk deteksi Brucellosis pada hewan yang telah diaplikasikan adalah teknik PCR, *real-time-PCR*, LAMP, *finger printing* dan RFLP. Pada kelompok ternak yang terinfeksi Brucellosis, teknik amplifikasi DNA merupakan alat deteksi yang sangat

penting untuk mempercepat diagnosis Brucellosis dalam upaya eradikasi penyakit melalui potong bersyarat.

Polymerase chain reaction standar

Teknik PCR pertama kali dikembangkan dan diaplikasikan untuk diagnosis Brucellosis pada sampel darah manusia di awal tahun 90an (Bricker & Halling 1995; Romero et al. 1995) dan kemudian berkembang untuk deteksi *Brucella* sp pada berbagai jaringan lainnya seperti serum, semen dan cairan sinovial (Bricker 2002).

Teknik PCR merupakan alat diagnosis yang handal untuk mendeteksi DNA bakteri yang sifatnya fastidious yaitu bakteri yang sulit tumbuh dan butuh waktu lama untuk pertumbuhannya seperti *Brucella* sp (Khamesipour et al. 2013). Teknik PCR memungkinkan untuk mendeteksi sejumlah kecil mikroorganisme dalam sampel seperti susu dan semen. Selain itu, prosedur PCR mudah diduplikasi dan distandarisasi, serta dapat meminimalisir risiko infeksi pada pekerja laboratorium dan membutuhkan waktu pengujian cepat sekitar 2-3 jam (Noor et al. 2015).

Standar PCR saat ini telah banyak diaplikasikan untuk deteksi *Brucella* sp sampai ke tingkat genus pada hewan dan untuk deteksi kontaminan produk asal hewan. Sensitivitas dan spesifitas teknik PCR untuk mendeteksi *Brucella* sp dalam sampel dapat dipakai untuk studi epidemiologi dan taksonomi bakteri (Poester et al. 2010). Teknik PCR standar dengan satu pasang primer telah banyak dikembangkan dan diaplikasikan di banyak negara untuk diagnosis berbagai macam penyakit yang disebabkan oleh bakteri fastidious seperti *Brucella* sp (Huber et al. 2009; Habtamu et al. 2013). Teknik ini sederhana dan efisien untuk deteksi *Brucella*, namun efisiensinya bergantung pada spesifitas primer yang dipakai. Teknik PCR standar pertama kali didesain untuk identifikasi lokus gen yang *highly conserved* pada *Brucella* sp dan kemudian berhasil digunakan untuk skrining Brucellosis pada manusia dan produk makanan yang terkontaminasi bakteri (Bricker 2002).

Berbagai target gen *Brucella* sp dengan berbagai pasangan primer seperti *outer membrane protein* (OMP), 16-23 SRNA, *Brucella cell surface protein* (BCSP), *insertion sequence* (IS) (Baddour & Alkhalifa 2008; Godfroid et al. 2010) telah banyak diteliti dalam pengembangan teknik PCR untuk deteksi *Brucella* sp pada sampel darah, susu dan jaringan limfoglandula. Pasangan primer B4/B5 dari gen BCSP31 dilaporkan sangat sensitif (100%) dan spesifik (98,3%) untuk mendeteksi *Brucella* sp dalam sampel darah dibandingkan dengan metode biakan bakteri (70%). Hasil penelitian Karthik et al. (2014) menunjukkan bahwa teknik PCR standar dengan primer genus

spesifik BCSP31 dan spesies spesifik IS711 dapat mendeteksi Brucellosis dalam sampel darah sapi.

Polymerase chain reaction multipleks

Teknik PCR multipleks banyak diaplikasikan untuk deteksi virus, bakteri dan agen infeksi lainnya. Kelebihan dari teknik PCR multipleks ini adalah dalam satu kali proses reaksi dapat mendeteksi banyak patogen sekaligus. Dalam rangka *trace-back* epidemiologi dan identifikasi *strain Brucella* sp teknik PCR multipleks sangat diperlukan untuk skrining *strain Brucella* sp spesifik dalam rangka pemberantasan Brucellosis (Mayer-Scholl et al. 2010; Kumar et al. 2011). Prosedur PCR multipleks ini lebih kompleks dibandingkan dengan standar PCR, namun mampu untuk membedakan sapi yang divaksinasi dan terinfeksi secara alami serta membedakan Brucellosis stadium akut atau kronis pada manusia (Smirnova et al. 2013).

Teknik PCR multipleks yang dikembangkan pertama kalinya untuk deteksi species *Brucella* adalah *abortus*, *melitensis*, *ovis* dan *suvis* (AMOS-PCR) untuk membedakan keempat species *Brucella* tersebut berdasarkan adanya polimorfisme pada lokus spesies-spesifik (Bricker & Halling 1995). Konsistensi AMOS-PCR dalam mendeteksi *Brucella* sp dilaporkan mencapai 50% dibandingkan dengan metode isolasi dan identifikasi bakteri. Selain itu, jika dibandingkan dengan uji *serum agglutination test* (SAT), tingkat deteksi positif AMOS-PCR mencapai 41,18%. Berdasarkan hasil tersebut terbukti bahwa uji AMOS-PCR merupakan metode diagnostik yang cepat, sederhana dan akurat dan juga dapat digunakan untuk identifikasi species *B. abortus* (biovars 1, 2 dan 4), *B. melitensis* (biovars 1, 2 dan 3), *B. ovis* dan *B. suvis* (biovar 1). Namun, AMOS-PCR tidak dapat mendeteksi species *B. canis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* dan *B. ceti* dan juga beberapa biovars *B. abortus* 3, 5, 6, 7 dan 9, serta *B. suvis* biovars 2, 3, 4 dan 5 (López-Goñi et al. 2008; Kang et al. 2011; López-Goñi et al. 2011).

Teknik AMOS-PCR ini kemudian dikembangkan lebih lanjut oleh Bricker et al. (2003) dengan memasukkan pasangan primer *strain*-spesifik *Brucella* sp untuk mengidentifikasi *strain* vaksin *B. abortus* S19 dan RB51 yang dinamakan dengan teknik *Brucella abortus strain* spesifik (BaSS-PCR). Teknik BaSS-PCR dikembangkan menggunakan tujuh pasang primer yang berbeda yaitu IS711-spesifik, *abortus*-spesifik, 16S rRNA, *eri* dan RB51 yang akan mengamplifikasi empat lokus berbeda yaitu region 16S rRNA (*conserved* gen pada semua bakteri), sekuen IS711 diinsersikan ke gen *alkB* (gen pada semua isolat lokal *B. abortus*) dan sekuen IS711 diinsersikan ke dalam gen *wboA* (gen yang hanya ditemukan pada vaksin RB51) dan *erytriol catabolic operon* (tidak ada pada vaksin S19).

Metode multipleks PCR terbaru yang dikembangkan adalah *Bruce-ladder multiplex*-PCR (Kang et al. 2011) menggunakan 16 pasang primer. *Bruce-ladder* PCR dapat menjadi alat diagnosis yang berguna untuk identifikasi cepat *strain Brucella* sp pada ternak dan manusia, serta dapat diaplikasikan di laboratorium rujukan Brucellosis.

Real-time polymerase chain reaction

Teknik *real-time* PCR mempunyai kelebihan dibandingkan dengan PCR standar yaitu dapat mendeteksi Brucellosis lebih cepat, metode lebih sederhana dan sensitif, tidak memerlukan analisis elektroforesis produk PCR pasca-amplifikasi sehingga mengurangi risiko terjadinya kontaminasi di laboratorium dan mengurangi reaksi positif palsu (Bounaadja et al. 2009; De Santis et al. 2011). Teknik *real-time* PCR dapat untuk membedakan species *B. abortus* dan *B. melitensis* meskipun kedua species tersebut menunjukkan tingkat kemiripan genetik yang tinggi.

Teknik deteksi *real-time* PCR telah banyak dipakai saat ini untuk deteksi *Brucella* pada urine, darah dan preparat jaringan dalam parafin (Redkar et al. 2001; Kattar et al. 2007; Queipo-Ortuño et al. 2008). Wareth et al. (2014) telah berhasil mendeteksi species *B. melitensis* pada susu sapi dan produknya pada hewan sehat di Mesir dengan menggunakan *real-time* PCR.

Teknik *real-time* PCR TaqMan probes terbaru telah diteliti oleh Bounaadja et al. (2009) dan Surucuoglu et al. (2009) untuk deteksi sampel serum pasien dengan klinis Brucellosis yang berbeda-beda menggunakan gen spesifik yaitu IS711 dan BCSP31. Hasil menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas *real-time* PCR sangat tinggi untuk diagnosis Brucellosis dengan manifestasi klinis yang berbeda-beda dan juga hasilnya lebih cepat dibandingkan dengan uji serologis dan PCR standar.

Real-time PCR walaupun merupakan teknik deteksi yang tidak mudah terkontaminasi dan hasilnya lebih cepat, namun, karena *real-time* PCR relatif mahal dibandingkan dengan standar PCR maka penggunaannya di beberapa negara berkembang sangat terbatas (Acharya et al. 2016).

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Teknik *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) merupakan metode amplifikasi DNA yang simpel, cepat dan spesifik yang dikembangkan oleh Eiken Chemical Co., Ltd (Notomi et al. 2000). Teknik LAMP ini sangat menjanjikan sebagai alat diagnosis karena banyak keunggulannya dibandingkan dengan

metode amplifikasi gen lainnya seperti PCR atau RT-PCR karena proses amplifikasi dan deteksi gen dapat dilakukan hanya dalam satu suhu (63°C) (Notomi et al. 2000; Nagamine et al. 2002a; Nagamine et al. 2002b; Song et al. 2005). Metode LAMP banyak diaplikasikan untuk mendeteksi berbagai macam patogen seperti *Mycobacterium tuberculosis* (Adhikari 2012), *Salmonella* (Deguo et al. 2008), hepatitis virus B (Moslemi et al. 2009).

Keunggulan metode LAMP adalah: (1) Menggunakan suhu tunggal dan dapat dilakukan dengan penangas air dan atau pelat pemanas (*heating block*) sehingga dapat diaplikasikan di lapang; (2) Prosedur pelaksanaan dan pengamatan hasil mudah dan sederhana; (3) Spesifisitas tinggi karena menggunakan 4 atau 6 primer yang mampu mengenali 6 atau 8 sekuen nukleotida yang berbeda menggunakan enzim Bst polymerase dengan aktivitas perpindahan untai (*strand displacement activity*) yang mencegah terjadinya inhibisi amplifikasi; (4) Proses cepat sekitar 30 sampai 60 menit (4-5 jam untuk PCR, dari awal amplifikasi sampai hasil analisis); dan (5) Sensitivitas sangat tinggi (dapat mengamplifikasi DNA 10⁹ hingga 10¹⁰ kali dalam waktu 15 menit sampai 60 menit).

Amplifikasi dapat dideteksi melalui keberadaan produk amplifikasi. Visualisasi produk LAMP dapat dilakukan dengan melihat adanya endapan putih pada reaksi LAMP positif (presipitat garam magnesium piropospat) (Mori et al. 2001) dengan penambahan *fluorescence detection reagent* (FDR) atau *syber green* dan juga dengan elektroforesis gel dimana hasil visualisasi teknik LAMP seperti anak tangga.

Finger printing

Identifikasi spesies dan subtiping isolat *Brucella* sp sangat penting dilakukan untuk surveilans epidemiologi; investigasi wabah baik di daerah endemis dan non-endemis serta membedakan kasus reinfeksi Brucellosis pada manusia (Al Dahouk et al. 2005). Subtiping isolat *Brucella* sp untuk *trace-back* epidemiologi jika terjadi letupan penyakit merupakan hal yang tidak mudah untuk dilakukan karena sangat sedikit metode tiping yang tersedia. Kesulitan dalam melakukan subtiping *Brucella* sp karena adanya homogenitas genetik dalam genus. Hasil sekuensing genom dari tiga species *Brucella* sp menunjukkan variabilitas pada sekuen DNA.

Beberapa teknik *finger printing* mampu untuk membedakan isolat dalam biovar yang sama dengan spesies tertentu dengan adanya polimorfisme nukleotida tunggal, yang mendeteksi perbedaan nukleotida tunggal dalam urutan DNA anggota suatu spesies. Metode *finger printing* dikembangkan berdasarkan teknik PCR yang mampu untuk diskriminasi antar spesies *Brucella* sp. Salah satu

metode *finger printing* yang telah dikembangkan adalah teknik *Hypervariable Octameric Oligonucleotide Finger Prints (HOOF-Prints)* yang dapat membedakan tipe *strain* dari semua spesies *Brucella* sp sampai biovar. Teknik tersebut dikembangkan berdasarkan 8 sekuen DNA "AGGGCAGT" tandem yang berulang. Teknik *HOOF-Prints* akan sangat berguna sebagai uji konfirmasi karena identifikasi dengan metode konvensional tidak dapat menemukan spesies-spesifik atau alel-biovar spesifik sehingga memberikan kemajuan signifikan dalam epidemiologi Brucellosis untuk membantu eradikasi penyakit.

Restriction fraction length polymorphism (RFLP)

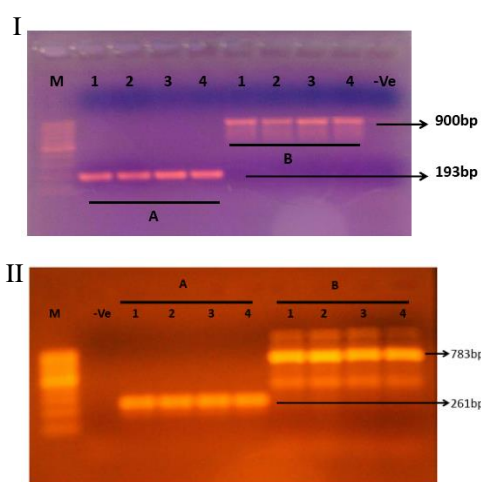
Dengan teknik RFLP membuktikan bakwa adanya polimorfisme di sejumlah gen *Brucella* termasuk *outer membrane protein 2* (*omp2*), *protein heat shock dnaK*, *htr* dan *erythrose-1-phosphate gen dehidrogenase* (*ery*). Adanya polimorfisme DNA pada *omp2a*, *omp2b*, *omp25* dan *omp31* telah terbukti bermanfaat untuk membedakan antar spesies *Brucella* sp dan biovar, termasuk isolat *Brucella* sp pada mamalia laut (De Santis et al. 2011). Hasil PCR-RFLP dapat untuk mengidentifikasi *marker omp25 B. melitensis* dalam bentuk tidak adanya situs EcoRV meskipun *B. suis* biovars 3 dan 4 dan *B. canis* masih belum dapat dibedakan dengan teknik ini (Cloeckert et al. 1995). Gen *omp* lainnya yang diteliti adalah *omp31*, yang terdlesi pada *B. abortus* (Bricker 2002), tetapi memiliki *marker* untuk *B. canis*, *B. suis* biovar 2 dan *B. ovis* (García-Yoldi et al. 2006).

APLIKASI TEKNIK AMPLIFIKASI DNA UNTUK DIAGNOSIS BRUCELOSIS PADA SAPI DI INDONESIA

Brucella abortus dalam tubuh sapi akan bereplikasi di dalam kelenjar mammae dan supra-mammae, kelenjar getah bening dan *shedding* bakteri ke susu dan semen sepanjang hidupnya (Wareth et al. 2014). Untuk mencegah penyebaran Brucellosis dari hewan ke manusia diperlukan teknik deteksi Brucellosis yang cepat, sensitif dan spesifik. Deteksi *Brucella* sp dalam susu dan semen sapi secara biakan kuman kurang sensitif untuk menjangkit keberadaan bakteri terutama jika jumlah bakteri yang terkandung dalam sampel sangat rendah. Melalui aplikasi teknik PCR standar dapat mendeteksi *Brucella* secara cepat, sensitif dan spesifik pada sampel susu dan semen. Teknik PCR ini biasa dipakai untuk analisis risiko dalam investigasi *Brucella* sp dalam susu karena kemampuannya dalam mendeteksi DNA *Brucella* dalam sampel susu yang dinyatakan negatif dengan uji ELISA (Wareth et al. 2014).

Beberapa metode deteksi untuk molekuler diagnosis Brucellosis pada sapi telah diuji dan dikaji di Balai Besar Penelitian Veteriner (BB Litvet), yaitu teknik PCR standar untuk deteksi species *B. abortus* pada sampel semen dan susu, teknik LAMP untuk deteksi *Brucella* sp dalam susu dan teknik multiplex BaSS-PCR untuk identifikasi strain spesifik *B. abortus* isolat lokal. Aplikasi teknik PCR di BB Litvet telah terbukti dapat digunakan untuk deteksi bakteri *Brucella* sp pada sampel susu sapi dengan tingkat sensitivitas dan spesifitas masing-masing mencapai 75 dan 100% (Noor et al. 2015). Teknik PCR juga mampu untuk mendeteksi *Brucella* sp pada sampel semen sapi baik pada semen segar maupun semen beku (Noor et al. 2014a).

Visualisasi hasil deteksi *Brucella* sp dengan teknik PCR pada susu dan semen dalam elektroforesis gel tercantum pada Gambar 1.



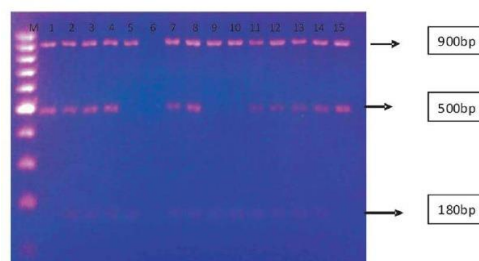
M: Marker; Ve: Kontrol negatif 1, 2, 3 dan 4; I: Sampel susu; II: Sampel semen

Gambar 1. Hasil uji PCR dengan primer OMP (A) dan 16sRNA (B) pada sampel susu dan primer Bruce 1 (A) dan Bruce-6 2 (B) pada sampel semen

Deteksi *Brucella* sp dalam sampel susu dan semen dengan teknik PCR dikerjakan menggunakan pasangan primer *outer membrane protein* (OMP) dan 16SRNA (susu) dan primer Bruce-6 (semen) dan terbukti mampu untuk mendeteksi bakteri *Brucella* sp dengan deteksi DNA limit pada sampel semen sampai dengan konsentrasi 1 pg/ml (Noor et al. 2014b). Hasil uji tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Arasoğlu et al. (2013). Teknik PCR standar mampu mendeteksi keberadaan *Brucella* sp dalam susu lebih akurat dibandingkan dengan metode konvensional melalui isolasi dan identifikasi bakteri. Hasil penelitian serupa dengan dilakukan oleh Dubey et al. (2017) dapat

mendeteksi *Brucella* sp pada sampel susu dengan target gen 16S rRNA dan BCSP 31.

Teknik multiplex BaSS-PCR juga telah diuji dalam mengidentifikasi *B. abortus* strain lapang menggunakan 7 pasangan primer spesifik. Hasil uji menunjukkan bahwa BaSS-PCR mampu mengidentifikasi strain spesifik *Brucella* dengan menggunakan 7 pasangan primer spesifik. Hasil identifikasi BaSS-PCR pada isolat lokal *B. abortus* seperti tampak pada Gambar 2 (Noor et al. 2015).



M: Marker, 1: S19 (vaksin); 2: S99 (referen); 3: CH-PR; 4: BM; 5: *Brucella* spesies; 6: Kontrol negatif; 7: YNT-KP; 8: DK1577; 9: *Brucella* spesies; 10: *Brucella* spesies; 11: CH07-BL; 12: CH04-BL; 13: CH06-BL; 14: CH09-BL; dan 15: S19 (vaksin)

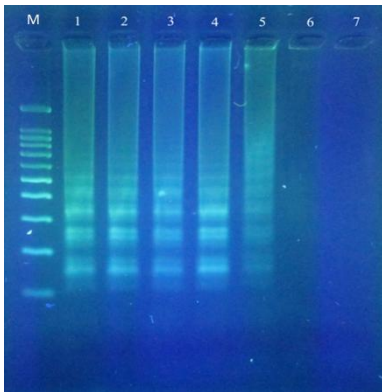
Gambar 2. Hasil identifikasi *B. abortus* strain-spesifik dengan BaSS-PCR

DNA bakteri *B. abortus* galur lapang dengan teknik BaSS-PCR teramplifikasi pada tiga pita DNA yang berbeda (900, 500 dan 180 bp), sedangkan untuk strain vaksin *B. abortus* S19 teramplifikasi pada dua pita (900 dan 500 bp), strain vaksin *B. abortus* RB51 teramplifikasi pada empat pita (900, 500, 300 dan 180 bp). Sementara untuk *Brucella* sp teramplifikasi pada panjang pita 900 dan 180 bp (OIE 2009).

Teknik molekuler lainnya yang telah diuji di BB Litvet untuk deteksi *Brucella* sp pada susu sapi adalah metode LAMP dengan menggunakan primer yang didesain dari hasil *sequencing* *B. abortus* isolat lokal yang diisolasi dari kasus Brucellosis pada sapi di lapang (Noor et al. 2014a). Visualisasi hasil deteksi isolat *Brucella* dengan teknik LAMP seperti tercantum pada Gambar 3.

Kelebihan teknik LAMP dalam mendeteksi Brucellosis lebih sederhana karena hanya memerlukan penangas air atau pelat panas untuk amplifikasinya dibandingkan dengan metode PCR yang memerlukan peralatan *thermocycler* yang cukup mahal dan sulit dibawa ke lapang. Hasil uji teknik LAMP untuk deteksi *Brucella* sp menggunakan target gen 16S rRNA dari isolat lokal *B. abortus* membuktikan kemampuannya untuk mendeteksi *Brucella* sp dalam sampel susu dengan limit deteksi mencapai 0,1 ng/ul susu (Noor et al. 2014b). Hasil uji deteksi limit metode LAMP yang dilaporkan oleh (Ohtsuki et al. 2008) menggunakan gen BCSP31

menunjukkan konsentrasi DNA *Brucella* sp terendah yang dapat dideteksi oleh metode LAMP mencapai 10 fg/ μ l.



M: Marker; 1: Isolat *B. abortus* S99; 2-4: Isolat lokal *B. abortus*; 5: *B. abortus* S19 (isolat vaksin); 6: Kontrol negatif

Gambar 3. Visualisasi produk LAMP dengan elektroforesis gel

Hasil uji diagnosis Brucellosis pada sapi dengan teknik molekuler menunjukkan bahwa baik PCR maupun LAMP dapat diaplikasikan untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Brucella* sp dalam sampel susu dan semen sapi lebih sensitif dan spesifik dibandingkan dengan teknik konvensional melalui biakan kuman yang sensitivitasnya rendah dan memerlukan waktu lama serta berisiko terkontaminasi ke pekerjaannya. Hanya saja untuk preparasi reagensia, baik teknik PCR maupun LAMP membutuhkan biaya yang lebih mahal dibandingkan dengan teknik konvensional. Namun jika dibandingkan antara kedua teknik PCR dan LAMP, teknik PCR mempunyai kelebihan dalam hal kemudahannya memperoleh reagensia secara komersial dengan harga yang sangat kompetitif karena reagensia untuk teknik LAMP masih sangat mahal dan belum banyak tersedia secara komersial. Sensitivitas dan spesifitas kedua teknik molekuler untuk deteksi tersebut yang cepat, sensitif dan spesifik sehingga akan mempermudah pengambilan kebijakan untuk menentukan metode pengendalian Brucellosis pada sapi melalui program uji dan potong bersyarat sehingga secara langsung dapat mencegah penyebaran Brucellosis pada ternak.

KESIMPULAN

Teknik amplifikasi DNA sangat menjanjikan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi bakteri *Brucella* sp dalam sampel lebih cepat, sensitif dan spesifik sampai tingkat spesies dan biovar dibandingkan dengan metode diagnosis standar. Teknik amplifikasi DNA terbukti sangat potensial digunakan untuk diagnosis Brucellosis dalam rangka menunjang

program pembebasan Brucellosis pada sapi di Indonesia terutama untuk mendeteksi sampel susu dan semen sapi sebagai sumber penularan Brucellosis pada ternak dan manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya KP, Kaphle K, Shrestha K, Bastuji BG, Smits HL. 2016. Review of Brucellosis in Nepal. *Int J Vet Sci Med.* 4:54-62.
- Adhikari S. 2012. Prevalence of Brucellosis in goats of Dang Districts, Nepal. In: Joshi BR, Singh UM, Paudel KP, Thakuri KC, Shrestha SP, Jha VC, editors. *Vet Safeguarding Anim Hum Environ.* Kathmandu, 28-30 March 2012. Kathmandu (Nepal): Nepal Veterinary Association.
- Arasoğlu T, Güllüce M, Özkan H, Adigüzel A, Şahin F. 2013. PCR detection of *Brucella abortus* in cow milk samples collected from Erzurum, Turkey. *Turkish J Med Sci.* 43:501-508.
- Atluri VL, Xavier MN, de Jong MF, den Hartigh AB, Tsolis RM. 2011. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu Rev Microbiol.* 65:523-541.
- Baddour MM, Alkhalifa DH. 2008. Evaluation of 3 PCR techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Egypt J Med Microbiol.* 16:201-209.
- Bounaadja L, Albert D, Chénais B, Hénault S, Zygmunt MS, Poliak S, Garin-Bastuji B. 2009. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp: A comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. *Vet Microbiol.* 137:156-164.
- Bricker BJ. 2002. PCR as a diagnostic tool for Brucellosis. *Vet Microbiol.* 90:435-446.
- 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 Diagnostic Investig.* 15:374-378.
- 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.* 3:1640-1642.
- Cloekaert A, Verger JM, Grayon M, Gerpinet O. 1995. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology.* 141:2111-2121.
- Al Dahouk S, Hagen RM, Nöckler K, Tomaso H, Wittig M, Scholz HC, Vergnaud G, Neubauer H. 2005. Failure of a short-term antibiotic therapy for human Brucellosis using ciprofloxacin: A study on *in vitro* susceptibility of *Brucella* strains. *Chemotherapy.* 51:352-356.

- Deguo K, Toubiana M, Hartati S, Kusumawati A, Dubremetz J, Widada J. 2008. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a diagnostic tool of toxoplasmosis. *Vet Parasitol.* 162:327-331.
- Dhama K, Karthik S, Chakraborty S, Tiwari R, Kapoor, Kumar A, Thomas P. 2014. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): A new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animals and human pathogens: A review. *Pak J Biol Sci.* 17:151-166.
- Dubey P, Patel KB, Patel BK, Chauhan HC, Chandel BS, Patel SS, Shrimali MD, Kala JK, Patel MG, Patel AC, et al. 2017. Molecular detection of *Brucella* organism from milk and milk products. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 6:1087-1091.
- García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Vizmanos JL, López-Goñi I. 2006. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin Chem.* 52:779-781.
- Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. 2010. Diagnosis of Brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J.* 51:296-305.
- Gomo C, Musari S, De Garine-Wichatitsky M, Caron A, Pfukenyi DM, Van Heerden H. 2012. Detection of *Brucella abortus* in Chiredzi District in Zimbabwe. *Onderstepoort J Vet Res.* 79:417.
- Gupta VK, Nayakwadi S, Kumar A, Gururaj, Pawaiya RS. 2014. Markers for the molecular diagnosis of Brucellosis in animals. *Adv Anim Vet Sci.* 2:31-39.
- Gwida MM, El-Gohary AH, Melzer F, Tomaso H, Rosler U, Wernery V, Wernery R, Elschner MC, Khan I, Eickhoff M, et al. 2011. Comparison of diagnostic tests for the detection of *Brucella* spp in camel sera. *BMC Res Notes.* 4:525.
- Habtamu TT, Rathore R, Dhama K, Karthik K. 2013. Isolation and molecular detection of *Brucella melitensis* from disease outbreak in sheep and *Brucella abortus* from cattle farm by 711 and omp2a gene based PCR. *J Curr Res.* 5:1920-1925.
- Huber B, Scholz HC, Lucero N, Busse HJ. 2009. Development of a PCR assay for typing and subtyping of *Brucella* species. *Int J Med Microbiol.* 299:563-573.
- Kaltungo BY, Saidu SNA, Sackey AKB, Kazeem HM. 2014. A review on diagnostic techniques for Brucellosis. *African J Biotech.* 13:1-10.
- Kang S Il, Her M, Kim JW, Kim JY, Ko KY, Ha YM, Jung SC. 2011. Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Appl Environ Microbiol.* 77:6726-6728.
- Karthik K, Rathore R, Thomas P, Elamurugan A, Arun TR, Dhama K. 2014. Serological and molecular detection of *Brucella abortus* from cattle by RBPT, STAT and PCR and sample suitability of whole blood for PCR. *Asian J Anim Vet Adv.* 9:262-269.
- Kattar MM, Zalloua PA, Araj GF, Samaha-Kfoury J, Shbaklo H, Kanj SS, Khalife S, Deeb M. 2007. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human Brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 59:23-32.
- Kazemi B, Yousefi Namin SA, Bandepour M, Kafilzadeh F, Gachkar L, Mahmoudinejad F, Samarghandi A, Mardani M. 2008. Detection of *Brucella* by peripheral blood PCR and comparison with culture and serological methods in suspected cases. *Iran J Public Heal.* 37:96-102.
- Khamesipour F, Doosti A, Taheri H. 2013. Molecular detection of *Brucella* spp in the semen, testis and blood samples of cattle and sheep. *J Pure Appl Microbiol.* 7:495-500.
- Kumar S, Tuteja U, Sarika K, Singh DK, Kumar A, Kumar O. 2011. Rapid multiplex PCR assay for the simultaneous detection of the *Brucella* genus, *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis*. *J Microbiol Biotechnol.* 21:89-92.
- López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Barquero-Calvo E, Guzmán-Verri C, Albert D, Garin-Bastuji B. 2011. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet Microbiol.* 154:152-155.
- López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, De Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckaert A, Ferreira AC, et al. 2008. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol.* 46:3484-3487.
- Mayer-Scholl A, Draeger A, Göllner C, Scholz HC, Nöckler K. 2010. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *J Microbiol Methods.* 80:112-114.
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 289:150-154.
- Moussa IM, Omnia ME, Amin AS, Ashgan MH, Selim SA. 2011. Evaluation of the currently used polymerase chain reaction assays for molecular detection of *Brucella* species. *African J Microbiol Res.* 5:1511-1520.
- Mukherjee F, Jain E, Patel V, Nair M. 2007. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of Brucellosis in field animals. *J Med Microbiol.* 56:1309-1316.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 16:223-229.

- Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T. 2002. Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002:1195-1198.
- Noor SM, Sudarmono PP, Kusumawati A, Karuniawati A. 2014a. Identifikasi *Brucella abortus* isolat lokal dengan *Brucella abortus strain specific-polymerase chain reaction*. *J Vet.* 15:306-311.
- Noor SM, Sudarmono PP, Kusumawati A, Karuniawati A. 2014b. Karakterisasi molekuler *Brucella abortus* untuk pengembangan metode diagnostik *loop-mediated isothermal amplification* Brucellosis [Disertasi]. [Jakarta (Indonesia)]: Universitas Indonesia.
- Noor SM, Sudarmono PP, Kusumawati A, Karuniawati A. 2015. Deteksi Brucellosis pada susu sapi dengan uji *polymerase chain reaction* (PCR). *J Kedokteran Hewan.* 9:64-66.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28:E63.
- Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino SI. 2008. Rapid detection of *Brucella* spp by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Appl Microbiol.* 104:1815-1823.
- OIE. 2009. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th ed. Paris (France): Office International des Épizooties.
- OIE. 2011. Office International des Épizooties. 6th ed. Paris (France): Office International des Épizooties.
- Pabuccuoglu O, Ecemis TES, Coskun A, Akcali S, Sanlidag T. 2011. Evaluation of serological tests for diagnosis of Brucellosis. *Jpn J Infect Dis.* 64:272-276.
- Poester FP, Nielsen K, Samartino LE, Yu WL. 2010. Diagnosis of Brucellosis. *Open Vet Sci J.* 4:46.
- Priyadarshini A, Sarangi LN, Palai TK, Panda HK, Mishra R, Behera PC. 2013. Brucellosis in cattle and occupationally exposed human beings: A serosurvey in Odisha, India. *J Pure Appl Microbiol.* 7:3255-3260.
- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Pachón ME, Gonzalez M, Morata P. 2008. Rapid diagnosis of human Brucellosis by SYBR green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin Microbiol Infect.* 11:713-718.
- Redkar R, Rose S, Bricker B, DeVecchio V. 2001. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella suis*. *Mol Cell Probes.* 15:43-52.
- Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I. 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol.* 33:615-617.
- De Santis R, Ciammaruconi A, Pomponi A, Fillo S, Lista F. 2011. *Brucella*: Molecular diagnostic techniques in response to bioterrorism threat. *J Bioterr Biodef.* 2011:1-8.
- Seleem MN, Boyleb SM, Sriranganathan N. 2010. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Vet Microb.* 140:392-398.
- Da Silva Mol JP, Franca SA, da Paixao TA, Santos RL. 2012. Laboratorial diagnosis of animal brucellosis. *Rev Bras Cienc Vet.* 19:117-126.
- Smirnova AE, Varsin A V, Sandybaev TN, Klotchenko AS, Plotnikova AM, Chervyakova VO, Ransyrbay RA, Kiselev IO. 2013. Current methods of human and animal Brucellosis diagnostics. *Adv Infect Dis.* 3:177-184.
- Soleimani M, Shams S, Majidzadeh-A K. 2013. Developing a real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification assay as a rapid and accurate method for detection of Brucellosis. *J Appl Microbiol.* 115:828-834.
- Song T, Toma C, Nakasone N, Iwanaga M. 2005. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Microbiol Lett.* 243:259-263.
- Surucuoglu S, El S, Ural S, Gazi H, Kurutepe S, Taskiran P, Yurtsever SG. 2009. Evaluation of real-time PCR method for rapid diagnosis of Brucellosis with different clinical manifestations. *Polish J Microbiol.* 58:15-18.
- Taleski V. 2010. An overview of introducing various laboratory tests for diagnosis of human Brucellosis in the Republic of Macedonia. *Maced J Med Sci.* 3:239-245.
- Trangoni MD, Gioffre AK, Ceron Cucchi ME, Caimi KC, Ruybal P, Zumarraga MJ, Cravero SL. 2015. LAMP technology: Rapid identification of *Brucella* and *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis. *Braz J Microbiol.* 46:619-626.
- Wareth G, Melzer F, Elschner MC, Neubauer H, Roesler U. 2014. Detection of *Brucella melitensis* in bovine milk and milk products from apparently healthy animals in Egypt by real-time PCR. *J Infect Dev Ctries.* 8:1339-1343.
- Yu WL, Nielsen K. 2010. Review of detection of *Brucella* sp by polymerase chain reaction. *Croat Med J.* 51:306-313.