

Deteksi Protein Bovine Major Histocompatibility Complex Klas I dan Klas II pada Sapi Madura

**(DETECTION OF THE CLASS I AND CLASS II PROTEINS OF BOVINE MAJOR
HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX IN MADURA CATTLE)**

Ni Ketut Suwiti¹, Fedik Abdul Rantam², I Nengah Kerta Besung³

*¹Laboratorium Histologi, ³Laboratorium Bakteriologi
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali,*

Telepon: (0361) 223791, 701808; E-mail: nksuwiti@yahoo.co.id

*²Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115*

ABSTRACT

A study to detect the presence of bovine major histocompatibility complex (Bo-MHC) in madura cattle has been carried out. Lymphocyte samples were collected from 25 cattle. The protein of lymphocyte samples was analysed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose membrane. Bo-MHC proteins on the membrane were detected by monoclonal antibodies (anti-Bo-MHC class I) and BAQ150A (anti-Bo-MHC class II). The proteins of 48 kDa and 11 kDa were detected by MAb B5C which appeared to be the alpha and beta chain of Bo-MHC class I. MAb BAQ150A detected protein band of 26 kDa which was likely to be the beta chain of Bo-MHC class II. Bo-MHC class I dan class II were clearly detected in madura cattle by MAbs which provides a basis for further investigation on the role of the MHC in the susceptibility the animals to many diseases.

Key word: *Bovine Major Histocompatibility Complex*, madura cattle, monoclonal, antibodies.

PENDAHULUAN

Sapi madura merupakan salah satu sapi potong Indonesia yang dipertahankan kemurniannya. Ketentuan ini diatur dalam Staatsblad 1934 No 57 jo.stbl.1937 No. 115. Saat ini *breed* sapi lain dilarang masuk ke Pulau Madura, tetapi sapi madura disebarkan ke berbagai daerah seperti Jawa Timur, Flores, Kalimantan, dan Sumatra, walau pun perkembangannya tidak sebaik di Pulau Madura.

Secara fenotif, sapi madura menyerupai sapi bali, yakni bentuknya yang uniform, ukuran tubuhnya sedang sampai kecil, bertulang dan berotot yang bagus, terutama sapi jantan (karapan) dan mempunyai kaki yang cukup kuat untuk bertahan terhadap kerja tarik yang berat. Sapi madura umumnya berwarna coklat medium dan coklat merah. Warna putih seperti pada kaki (*white stocking*) juga sering ditemukan di daerah abdomen dan bagian paha dalam. Namun, *white stocking* yang ditemukan pada kaki sapi madura berwarna lebih muda

dan tidak sejelas yang ditemukan pada sapi bali (Huitema, 1986).

Dilihat dari ketahanannya terhadap penyakit, khususnya penyakit jembrana, sapi madura relatif lebih tahan dibandingkan sapi bali. Perbedaan ketahanan ini kemungkinan berhubungan dengan perbedaan imunogenetik antara kedua *breed* sapi tersebut. Adanya perbedaan genetik antara *breed* sapi, membuka peluang pendalaman tentang kerentanan genetik, yakni kerentanan individu terhadap penyakit ditinjau dari faktor imunogenetik. Imunogenetik adalah suatu konsep genetik yang mengendalikan perbedaan reaktivitas respons imun dan kerentanan tubuh terhadap suatu penyakit (Judajana *et al.*, 1999). Kendali genetik tersebut akan menentukan perbedaan reaktivitas imun pada setiap individu dalam suatu populasi dan faktor genetik tersebut berpengaruh terhadap ketahanan dan kerentanan individu terhadap penyakit (Angyalosi *et al.*, 2001).

Salah satu faktor imunogenetik yang menentukan ketahanan individu terhadap

penyakit adalah *major histocompatibility complex* (MHC) yang pada sapi disebut *bovine major histocompatibility complex* (Bo-MHC) atau *bovine lymphocyte antigen* (BoLa). Berdasarkan distribusi di jaringan, fungsi dan struktur antigennya Bo-MHC dibedakan menjadi 3 klas, yaitu klas I, klas II, dan klas III. Ketiga klas MHC tersebut mempunyai peranan yang berbeda (Abbas, 1991; Daniel, 1997; Goldsby *et al.*, 2000). Bersama sel T sitotoksik, MHC klas I berperan dalam proses kekebalan seluler. MHC klas II berperan penting dalam respons imun seluler maupun humoral. Peranannya dalam sistem kekebalan seluler diawali dari masuknya antigen ke dalam tubuh melalui proses *up take* oleh makrofag. Sementara itu, dalam sistem kekebalan humoral MHC klas II berperan dalam pembentukan antibodi. MHC klas III berperan dalam pembentukan komponen protein dan sistem komplemen.

MHC merupakan suatu glikoprotein yang terdiri atas kumpulan gen penting (*major*), dan mempunyai sifat polimorfisme tinggi, sehingga menimbulkan variasi ekspresi serta variasi bobot molekul protein yang berbeda. Sistem MHC berhubungan dengan ketahanan dan kerentanan terhadap penyakit (Shirly *et al.*, 1999). Di Indonesia penelitian tentang sistem MHC belum banyak dilakukan terutama sistem MHC pada sapi madura. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan diungkapkan keberadaan sistem MHC pada sapi madura.

METODE PENELITIAN

Isolasi Limfosit

Limfosit diisolasi dari 25 sampel darah sapi madura di Desa Bangkalan, Pulau Madura sesuai dengan metode yang dijabarkan oleh Wareing (1996). Sampel darah dipusing dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Dengan menggunakan pipet Pasteur, lapisan sel darah putih dipisahkan dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi RPMI. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 5 ml *ficolhipaque* kemudian dipusing (3000 rpm, selama 30 menit). Lapisan yang terbentuk pada perbatasan (*interface*) dipindahkan ke dalam tabung yang berisi 7 ml *phosphate buffered saline* (PBS), dan kembali dipusing pada kecepatan 1250 rpm selama 15 menit. Supernatan dicuci dua kali dengan PBS, dan

limfosit dipanen dengan cara membuang supernatannya.

Preparasi Sampel untuk Elektroforesis

Sebelum melakukan elektroforesis terlebih dahulu dilakukan *freez-thawing* terhadap sampel berupa limfosit sebanyak tiga kali. Selanjutnya ditambahkan dengan 500 ml *lisis buffer* (Komposisi: 250 mM NaCl + 50 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,01% NaN₃ + 10 mM glycine) dan didiamkan pada -20°C, selama 30 menit. Campuran limfosit dan *lisis bufer* kemudian dipusing (5000 rpm, selama 15 menit). Supernatan yang terbentuk diambil sebanyak 50 ml dimasukkan ke dalam tabung dan ditambahkan dengan 50 ml *sample loading buffer* (Komposisi: Aqudest + 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 + Glyserol + 10% SDS + 0,05% B Mercaptoethanol + 0,05% Bromophenol), selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih (100°C, selama 5 menit). Sampel ini selanjutnya dipergunakan bahan untuk elektroforesis.

Pemisahan dan isolasi protein dilakukan dengan *sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) memakai alat Protean II Apparatus (Bio-Rad, USA). Pita hasil elektroforesis yang terbentuk dan dicurigai sebagai protein Bo-MHC diisolasi, dengan cara dipotong menggunakan skalpel steril dan dihancurkan, kemudian dimasukkan ke dalam *dialysis bag* untuk proses elektroelusi, dengan menggunakan alat *electro-eluter* (Bio-Rad). Protein hasil elektroelusi ini dipergunakan sebagai sampel untuk menentukan bobot molekul protein Bo-MHC klas I dan klas II sapi madura.

Deteksi Protein Bo-MHC

Keberadaan protein Bo-MHC dilacak dengan *Western blotting* (WB). Protein hasil elektroelusi dielektroforesis dalam *gel polyacrilamid* menggunakan 12,5% *separating gel* dan 4% *loading gel*. Selanjutnya protein di dalam gel ditransfer ke membran nitroselulosa, dan membran diblok dengan *bovine serum albumin* (BSA) 1% dalam PBS. Protein Bo-MHC dilacak dengan antibodi monoklonal B5C untuk Bo-MHC klas I, dan BAQ150A untuk Bo-MHC klas II (VMRD, Pullman, USA), *goat antimouse IgG-biotin* (VMRD, Pullman, USA), *avidin-horseradish peroxidase* (avidin-HRP) (Bio-Rad, USA), dan substrat *diazino-benzidine* (DAB, Sigma chemical Co. USA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekspresi Protein Bo-MHC Klas I

Hasil elektroforesis protein limfosit asal 25 ekor sapi madura menunjukkan bahwa berbagai pita muncul pada gel. Namun, belum diketahui protein yang mana yang termasuk Bo-MHC (data tidak diperlihatkan). Uji WB dengan antibodi monoklonal B5C (anti-Bo-MHC klas I) menunjukkan reaksi positif, yang ditandai dengan pemunculan 2 pita pada kertas nitroselulosa. Pita protein yang terlacak mempunyai bobot molekul sekitar 48 kDa dan 11 kDa. Protein dengan 48 kDa dan 11 kDa secara berturut-turut tampaknya merupakan protein Bo-MHC klas I rantai alfa dan sebagai rantai beta (Gambar 1).

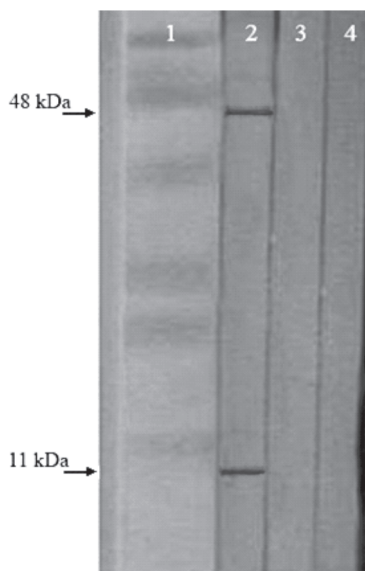
MHC klas I disusun oleh glikoprotein yang terdiri atas rantai berat alfa (45 kDa) dan rantai beta-2-mikroglobulin (12 kDa) yang keduanya berikatan secara non-kovalen (Jonathan *et al.*, 1994). Rantai alfa dibagi dalam tiga bagian, yaitu bagian ekstraseluler, bagian transmembran dan bagian intraseluler. Bagian ekstraseluler membawakan ciri antigen, sedangkan bagian intraseluler adalah bagian yang meneruskan sinyal dari luar ke dalam sel. Rantai alfa-1

dan alfa-2 membentuk suatu celah yang sangat polimorfik dan merupakan tempat menempelnya antigen. Sifat polimorfik ini memungkinkan berbagai macam peptida untuk dapat terikat pada celah ini. Sifat polimorfik dan variasinya yang besar ini merupakan bagian yang menentukan spesifisitas di antara alel. Sedangkan bagian transmembran bersifat hidrofobik (Bellanti, 1993).

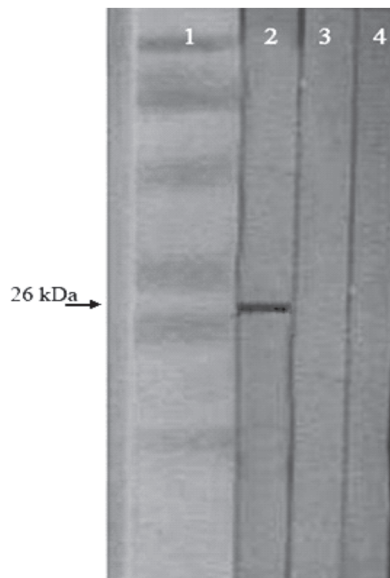
Rantai ringan beta merupakan bagian yang konstan dan mempunyai sekuen yang homolog dengan sekuen imunoglobulin (bagian konstan) dan berfungsi untuk mempertahankan bentuk dan struktur dari molekul sehingga bagian ini merupakan bagian yang homolog di antara alel. Rantai ringan pada kedua ujungnya diakhiri dengan NH₂ dan COOH. Selanjutnya Jonathan *et al.* (1994) mengatakan bahwa pemunculan MHC klas I berhubungan dengan respons imun dan berperan dalam penolakan dalam pencangkokan jaringan.

Ekspresi Bo-MHC Klas II

Hasil pengujian dengan antibodi monoklonal BAQ150A menunjukkan bahwa Bo-MHC klas II terlacak dengan bobot molekul sekitar 26 kDa (Gambar 2). Pita protein tersebut



Gambar 1. Hasil pengujian Bo-MHC klas I sapi madura dengan antibodi monoklonal B5C. (1) Marker, (2) Reaksi positif, protein Bo-MHC dengan AbMo, (3) Reaksi negatif, protein Bo-MHC tanpa AbMo, (4) Reaksi negatif, AbMo tanpa protein Bo-MHC sapi madura.



Gambar 2. Hasil pengujian Bo-MHC klas II sapi madura dengan AbMo BAQ150A pada pemeriksaan WB. (1) Marker, (2) Reaksi positif, protein Bo-MHC dengan AbMo, (3) Reaksi negatif, protein Bo-MHC tanpa AbMo, (4) Reaksi negatif, AbMo tanpa protein Bo-MHC sapi madura.

tampaknya protein Bo-MHC klas II rantai beta. Bo-MHC klas II merupakan suatu glikoprotein dan mengandung dua ikatan non-kovalen dari dua rantai polipeptida. Rantai polipeptida tersebut adalah rantai alfa dengan bobot molekul 31-34 kDa, dan rantai beta dengan bobot molekul 26-29 kDa (Bernadette *et al.*, 1993; Margaret *et al.*, 1997).

Menurut Ababou *et al.* (1994), dengan teknik imunopresipitasi, Bo-MHC klas II dengan 33 kDa yang diketahui sebagai rantai alfa, dan 29 kDa sebagai rantai beta. Bobot molekul protein Bo-MHC klas II yang diisolasi dari leukosit darah terdiri atas rantai alfa (32-34 kDa) dan rantai beta (26-29 kDa). Koufman *et al.* (1994) menyatakan bahwa MHC klas II rantai alfa mempunyai bobot molekul protein 33-35 kDa dan rantai beta 26-29 kDa. Variasi bobot molekul juga ditemukan oleh Jonathan *et al.* (1993), yakni mencapai 45 kDa.

Bobot molekul protein Bo-MHC sapi madura ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Ababou *et al.* (1994), walau pun sumber limfosit yang diambil dari biakan sel BL3 yang telah diinfeksi dengan *Bovine Lymphosarcoma Virus* (BLV). Bobot molekul protein Bo-MHC diperoleh 44 kDa, 33 kDa, dan 29 kDa, sedangkan menurut Abbas (1991) bobot molekul protein MHC rantai alfa pada mencit mencapai 47 kDa sedangkan rantai beta 12 kDa dan pada manusia 44 kDa.

Bobot molekul protein Bo-MHC tampak sangat bervariasi karena sifat polimorfismenya yang sangat tinggi sehingga bobot molekulnya sangat bervariasi pada setiap individu. Di samping itu, Bo-MHC juga berhubungan dengan kerentanan hewan terhadap suatu penyakit. Oleh karena itu, banyak peneliti yang berusaha mengungkapkan peranannya dalam respons imun (Davenport dan Hill, 1996). Pada sapi madura, Bo-MHC klas II rantai alfa tampak tidak terlacak dengan antibodi monoklonal BAQ150A. Hal ini mungkin disebabkan oleh spesifisitas antibodi monoklonal yang hanya mengenali rantai beta (Bernadette *et al.*, 1993). Di samping itu, ada beberapa sifat khas protein Bo-MHC yang dapat menyebabkan reaksi silang parsial antar molekul (Ababou *et al.*, 1994). Reaksi silang parsial semacam itu menyebabkan tidak semua antibodi monoklonal dapat bereaksi secara sempurna dengan antigen protein Bo-MHC.

SIMPULAN

Bobot molekul protein *Bovine Major Histocompatibility Complex* sapi madura klas I rantai alfa: 48 kDa dan rantai beta: 11 kDa, sedangkan protein Bo-MHC klas II mempunyai bobot molekul 26 kDa teridentifikasi sebagai rantai beta. Studi ini diharapkan dapat dipergunakan sebagai dasar menentukan peranan protein dalam kerentanan sapi madura terhadap penyakit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Dr. PG Konthen, dr. SpPD, Prof. drh. IGB Amitaba, dan Dr. Irwan Setiabudi, SpPK, atas bimbingannya dan Bapak Kepala TDC Unair Surabaya, serta Bapak Kepala BBV Denpasar atas diizinkan menggunakan sarana dan prasarana selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Ababou J, Goyeneche WC, Davis D, Levy. 1994. Evidence for the expression of three different BoLA-class II molecules on the bovine BL-3 cell line: determination of a non-DR non DQ gene product. *J Leuk Biol* 56:182-186
- Abbas AK, Litchman AH, Pober JS. 1991. *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders Company. Pp. 19-347
- Angyalosi G, Neveb R, Wolowczuk I, Delanoye A, Herno J, Auriault C. 2001. HLA class II polymorphism influences onset and severity of pathology in *Schistosoma mansoni*-infected transgenic mice. *Infect Immun* 69: 5874
- Bellanti JA. 1993. *Imunologi III*. Cetakan pertama. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press. Hal. 58-304
- Bernadette C, Taylor K, Yeon C, Robert JS, Peter FM, Jeffrey LS. 1993. Differential Expression of Bovine MHC Class II Antigen Identified by Monoclonal Antibodies. *J Leuk Biol* 53:479-489
- Daniel P, Stites AI, Tritram G, Parslow. 1997. *Medical Immunology*. 9th ed. Apleton and Largw. The United States of America: A Simon and Schuster Company. Pp.85-181

- Davenport MP, Hill AVS. 1996. Peptides associated with MHC class I & II molecules In Browning and Michael AJ (Eds.) *HLA and MHC genes molecules and function*. Oxford: Bios Sc Publ Ltd. Pp.277- 308
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. 2000. Overview of the Immune System In Kuby Immunology. 4th ed. New York: WH Freeman and Company. Pp.3-26
- Huitema H. 1986. Peternakan di daerah tropik, arti ekonomi dan kemampuannya. Penelitian di beberapa daerah Indonesia. Jakarta: Penerbit PT Gramedia. Hal. 25-30
- Jonathan M, Austyn, Kathryn, Wood J. 1994. The Major Histocompatibility Complex. In Browning, Michael AJ (Ed) *Principles of Cellular and Molecular Immunology*. New York: Oxford University Press Inc. Pp.65-112
- Judajana FM. 1999. Imunogenetika. In Pitono S, Judajana FM, Suhartono TP, Subijanto (Ed) *Imunologi Mukosal Kedokteran*. Surabaya: Airlangga University Press. Hal. 1-25
- Kreisel D, Krupnick AS, Szeto WY, Popma SH, Sankaran D, Krasinskas AM, Amin KM, Rosengard BR. 2001. A simple method for culturing mouse vascular endothelium. *J Immunol Methods* 254: 31-45
- Margaret GP, Coggeshall KM, Leslie SJ, Pat JL. 1997. Bovine Luteal Cells Elicit Major Histocompatibility Complex Class II Dependent T-Cell Prolifration. *J Biol Repr* 57: 887-893
- Maudsley DJ, Pound JD. 1991. Modulation of MHC antigen expression by viruses and oncogenes. *Immunol Today* 12:429-431
- Scherazade SN, Germain RN. 1992. How MHC class II Molecules Work: Peptide-Dependent Completion off Protein Folding. *J Immunol Today* 13: 43-46
- Shirley A, Keith E, Ballingall T. 1999. Cattle MHC: evolution in action. *Immunol Reviews* 167: 159-168
- Stone RT, Muggli C. 1993. BoLA-DIB Species Distribution, Linkage with DOB and Northern Analysis. *J Anim Gen* 24: 41-43
- Wareing S. 1996. Development of Assays to Monitor The Cell-Mediated Immune Response to Recombinant Jembrana Disease Virus (JDV) Protein in Cattle. Western Australia: School of Veterinary Science, Murdoch University