

Melacak Kekerabatan *Brucella* Sp. Menggunakan Teknik Reaksi Rantai Polimerase dengan Primer Pendek

(TRACING THE KINSHIP OF BRUCELLA SP. BY USING A POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE WITH A SHORT PRIMER)

Difa Widyasari^{1*}, Eko Sugeng Pribadi^{2**}, Fachriyan Hasmi Pasribu^{2***},
Widya Septiningtyas^{1****}, Jati Adiputra^{1*****}

¹Badan Karantina Pertanian, Kementerian Pertanian,
Kantor Pusat Kementerian Pertanian Gedung E
JL. Harsono RM, No. 3, Ragunan, Pasar Minggu,
Jakarta Selatan, 12560 Jakarta, Indonesia

²Divisi Mikrobiologi Medik, Departemen Ilmu Penyakit Hewan
dan Kesehatan Masyarakat Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, University
Kampus Dramaga Jl Agatis, Bogor 16680, Indonesia;

*difawidyasari@gmail.com, **eko.spribadi@yahoo.co.id, ***fhpasaribu@gmail.com,
****widya.tyas296@gmail.com, *****ajijati@gmail.com

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic disease that has spread throughout the world and has an important impact on both human and animal health. The four species of *Brucella* that cause disease in humans are *Brucella abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* and *B. canis*, and *B. melitensis* as the most pathogenic species. This Research used 46 samples were collected from Government Small Ruminants Abattoir in Bogor Regency. Thirty two spleen samples were examined by previous research and showed a positive result when were tested with CFT and PCR techniques, but sequencing has not yet been done. Fourteen serum and spleen samples were examined by the similar techniques. The Research aimed to determined the genetic relationship of *Brucella* sp. using a PCR technique with a specific short primer to *B. melitensis*. Cloning technique was applied previously to five PCR positive samples before sequencing. Cloning and sequencing result of the Sample 91 showed higher homology to *B. melitensis* and *B. abortus* for 127 nucleotide lengths, 97.6% -100% and 99.2% -100% respectively. In the phylogenic tree, the Sample 91 was part of *B. melitensis* sequences 1, 2, and 3 with accession numbers LT962930.1 and LT962936.1, *B. abortus* sequences 1 and 2 with accession numbers CP033079.1 and *B. abortus* sequence 1 with accession number CP034695.1. Sample of 95, 97, 7, and 13 have lower homologies than Sample 91.

Keywords: *B. melitensis*, short primer, cloning, sequencing

ABSTRAK

Brucellosis merupakan penyakit zoonotik yang telah menyebar ke seluruh dunia dan memiliki dampak penting baik untuk kesehatan manusia maupun hewan. Empat spesies dari *Brucella* yang menyebabkan penyakit pada manusia adalah *Brucella abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* dan *B. canis* dengan *B. melitensis* sebagai spesies yang paling patogen. Penelitian ini menggunakan 46 contoh uji dari tempat pemotongan hewan ruminansia kecil di Kabupaten Bogor. Sebanyak 32 spesimen limpa telah diperiksa sebelumnya dan telah menunjukkan hasil positif ketika diuji dengan teknik CFT dan PCR namun belum dilakukan sekuensing. Empat belas spesimen serum dan limpa diperiksa dengan teknik yang sama. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan hubungan genetik *Brucella* sp. menggunakan teknik PCR dengan primer pendek khusus untuk *B. melitensis*. Teknik pengklonaan telah diterapkan sebelumnya pada lima spesimen yang positif PCR. Pengklonaan dan sekuensing pada spesimen 91 memberikan hasil homologi yang lebih tinggi terhadap *B. melitensis* dan *B. abortus* untuk total panjang nukleotida 127 bp, yaitu masing-masing

97,6%-100% dan 99,2%-100%. Pada pohon filogenik, Contoh 91 terdapat di satu cabang dengan *B. melitensis* sekuens 1, 2, dan 3 dengan nomor aksesori LT962930.1 dan LT962936.1, *B. abortus* sekuens 1 dan 2 dengan nomor aksesori CP033079.1 dan *B. abortus* sekuens 1 dengan nomor aksesori CP034695.1. Contoh Nomor 95,97,7, dan 13 memiliki homologi yang lebih rendah dibandingkan dengan Contoh 91.

Kata-kata kunci: *B. melitensis*, primer pendek, pengklonaan, sekuensing

PENDAHULUAN

Brusellosis merupakan penyakit zoonotik yang memiliki dampak penting baik untuk kesehatan manusia maupun hewan. Penyakit ini sudah menyebar keseluruh dunia. Genus *Brucella* terdiri dari beberapa spesies, antara lain *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. ceti*, dan *B. pinnipedialis*. Spesies terbaru yang diketahui menyerang mamalia laut adalah *B. microti* yang menyerang *Microtus arvalis* di Eropa tengah (OIE 2009). Bakteri *B. abortus* menginfeksi sapi, *B. suis* menginfeksi babi (Burnham *et al* 2011), dan *B. melitensis* menginfeksi kambing dan domba serta *B. canis* menginfeksi anjing (De Miguel *et al.* 2011). Bakteri *B. melitensis* dapat juga menginfeksi unta berpuncuk satu dan *B. abortus* kadang dapat menginfeksi kuda, sehingga satu spesies *Brucella* dapat menginfeksi lebih dari satu inang (Shapiro 2017). Empat spesies dari *Brucella* yang merupakan zoonosis adalah *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* dan *B. canis* (Samadi *et al.* 2010) dengan *B. melitensis* sebagai spesies yang paling patogen (De Miguel *et al* 2011).

Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian Septiningtyas (2017) yang belum melakukan analisis kekerabatan *Brucella* sp. Penelitian ini bertujuan mengetahui kekerabatan *Brucella* sp. yang diisolasi dari Contoh. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk meningkatkan pengawasan lalu lintas ternak yang diduga sebagai pembawa Brusellosis.

METODE PENELITIAN

Spesimen Penelitian

Penelitian ini menggunakan 32 spesimen limpa yang diperoleh dari tempat pematangan hewan ruminansia kecil di Kabupaten Bogor dan hasil pemeriksaan dengan uji Fiksasi Komplemen (*Complement Fixation Test*, CFT) dan teknik reaksi rantai polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) adalah positif (Septiningtyas 2017). Sebanyak 14 Spesimen Serum dan Limpa lainnya diperiksa dengan teknik uji yang sama.

Keempat belas spesimen terakhir ini merupakan spesimen tambahan yang diambil dari lokasi yang sama, tetapi waktu yang berbeda. Tiga puluh dua spesimen diperiksa kembali dengan teknik PCR, tetapi ditambah dengan pengklonaan dan sekuensing. Teknik *Rose Bengal Test* (RBT) dan CFT diterapkan pada Spesimen Serum, dan teknik PCR, klonaan, dan sekuensing diterapkan pada Spesimen Limpa.

Pemeriksaan menggunakan teknik RBT dan PCR dilaksanakan di Laboratorium Karantina Hewan Balai Besar Karantina Pertanian (BBKP) Tanjung Priok. Pemeriksaan menggunakan teknik CFT dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Balai Besar Penelitian Veteriner Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Pertanian. Pemeriksaan pengklonaan di laboratorium Genetika Science dan sekuensing dilakukan di *1st Base* (Malaysia).

Pemeriksaan Menggunakan Teknik RBT dan CFT

Pemeriksaan dilakukan terhadap 14 Spesimen Serum yang mengikuti acuan Uni Eropa (EC 2001) untuk penggunaan teknik RBT dan OIE (OIE 2016) untuk penggunaan teknik CFT.

Ekstraksi Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan sebagai pengendali internal adalah *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC® 25922. Metode ekstraksi DNA bakteri *E. coli* menggunakan teknik pendidihan. Bakteri *E. coli* dibiakkan dalam Tryptic Soy Broth® (TSB, Merck®) dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi selesai, sedikit koloni dalam TSB diambil dan dibiakkan pada media Eosin Methylene Blue Agar® (EMBA, Merck®) dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam. Koloni bakteri *E. coli* pada media EMBA akan terlihat hijau metalik. Sedikit dari koloni *E. coli* di media EMBA dibiakkan ke media Nutrient Agar® (NA, Merck®) dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam. Sebanyak 1-2 öse pada media NA dipindahkan ke tabung mikro 1,5 ml yang telah berisi 100 µl Pepton Buffer Saline®

(PBS, Merck®) dan dihomogenkan menggunakan pemusar. Campuran dipanaskan pada suhu 95 °C selama 10 menit. Campuran didinginkan pada suhu 4°C selama empat menit dan campuran dipusingkan dengan kecepatan 12500 *rotation per minute* (rpm) selama dua menit. Endapan yang merupakan DNA bakteri diambil sebanyak 50 µl dan dimasukkan ke tabung mikro baru. Tabung tersebut disimpan dalam suhu -20 °C sampai siap untuk diuji dengan teknik PCR.

Ekstraksi Contoh Uji

Contoh diekstraksi menggunakan Kit Ekstraksi DNA DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen®) dengan tata kerja sesuai petunjuk pabrik. Contoh dari tempat penyimpanan -20 °C diletakkan pada suhu ruang sampai cair untuk diukur kemurnian DNA menggunakan spektrofotometer Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) pada panjang gelombang 260 nm/280 nm. Nilai yang diharapkan untuk kemurnian DNA adalah 1,8-2,0 (Zhang *et al.* 2013). Contoh selanjutnya diperiksa menggunakan teknik PCR dengan primer 16S rRNA dan primer Mar.

Pemeriksaan Menggunakan Teknik PCR

Semua hasil ekstraksi terlebih dahulu diperiksa menggunakan primer 16S rRNA F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') dan 16S rRNA R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -3') sebagai kontrol internal (Cai *et al.* 2003). Teknik PCR untuk kontrol internal menggunakan kit HotstarTaq Plus Master Mix (Qiagen®) dengan komposisi Hotstar Taq plus Master Mix sebanyak 12,5 µl, primer (masing-masing 10 mM) sebanyak 0,5 µl, air (dH₂O) sebanyak 9,5 µl dan hasil ekstraksi contoh dua mikroliter dengan total keseluruhan campuran mencapai 25 µl. Teknik PCR dimulai dengan denaturasi awal pada 95 °C selama 15 menit yang diikuti dengan 35 siklus denaturasi pada suhu 95 °C selama 20 detik. Berikutnya melakukan *annealing* pada suhu 55 °C selama 30 detik dan dilanjutkan proses *extension* pada suhu 72 °C selama 40 detik. Akhirnya melakukan satu siklus *extension* akhir pada suhu 72 °C selama tujuh menit. Hasilnya diuraikan menggunakan teknik elektroforesis pada jel agarose 1 % dengan penambahan 0,5 µg/ml ethidium bromide (EtBr, Sigma-Aldrich). Pengamatan dilakukan menggunakan transluminator ultraviolet. Pita DNA 16S rRNA muncul pada 1542 pasangan basa (*base pairs*, bp).

Teknik PCR dilakukan menggunakan primer khusus terhadap *B. melitensis* yang akan mengamplifikasi gen IS711. Primer yang digunakan adalah Mar F (5'-GCATTCAATCTGATGGCGTTCC -3') dan Mar R (5'-GATCACTTAAGGGCCTTCATTGC -3') (Moulana *et al.* 2016). Teknik PCR ini menggunakan MyTaq™ HS Red Mix (Bioline Reagents Ltd.) dengan kandungan hasil ekstraksi Contoh sebanyak 200 ng, primer (masing-masing 20 mM) sebanyak satu mikroliter, MyTaq HS Red Mix dua kali sebanyak 25 µl dan penambahan air (dH₂O) sebanyak 13 µl sampai isi total keseluruhan campuran mencapai 50 µl. Teknik PCR dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 95 °C selama satu menit yang diikuti dengan 35 siklus denaturasi pada suhu 95 °C selama 15 detik. Berikutnya melakukan *annealing* pada suhu 60 °C selama 15 detik, dan diakhiri dengan *extension* pada suhu 72 °C selama 10 detik. Hasilnya diuraikan dengan teknik elektroforesis pada jel agarose 1,5 % dengan penambahan 0,5 µg/ml ethidium bromide (EtBr, Sigma-Aldrich). Pengamatan dilakukan dengan menggunakan transluminator ultraviolet. Pita DNA produk PCR menggunakan primer Mar muncul pada 127 bp.

Pengklonaan

Sebanyak 30 µl hasil PCR diuraikan menggunakan teknik elektroforesis dengan jel agarose TBE 1%. Marker menggunakan DNA ladder 50 bp. Hasil PCR yang diharapkan dimurnikan dengan Zymo DNA Clean and Concentrator (Zymo Research®). Hasil pemurnian diklonan pada vektor pTA2 dengan sasaran klon Toyobo (Toyobo®). Vektor pTA2 Toyobo disajikan pada Gambar 1. Hasil klonan diperbanyak pada *E. coli* Zymo 5á with Mix and Go Competent Cells™ (Zymo Research®). Koloni *E. coli* ditumbuhkan dengan media Luria Bertani® (LB, Merck®). Koloni yang tumbuh dan berwarna putih menandakan di dalam koloni tersebut terdapat klonan yang disisipkan. Sebaliknya, koloni yang tumbuh dan berwarna biru menandakan tidak adanya klon yang disisipkan. Koloni berwarna putih dipastikan dengan primer promotor T3 dan T7 menggunakan KOD FX Neo (Toyobo®). Pita yang diharapkan pada target gen adalah 127 bp dan pita yang diharapkan pada vektor *E. coli* adalah 150 bp. Jadi kisaran pita kloning yang dipilih sekitar 277 bp. Bakteri *E. coli* yang digunakan adalah *E. coli* strain DH5á yang optimal digunakan untuk amplifikasi yang

stabil dari materi DNA (Kostlev *et al.* 2015). Hasilnya diuraikan dengan teknik elektroforesis pada gel agarose TBE 1 %.

Koloni yang memberikan hasil positif PCR ditumbuhkan pada media Nutrien Agar® (NA, Merck®). Pertumbuhan koloni pada media NA ditandai dengan adanya bentuk seperti kapas putih. Koloni diambil untuk mengisolasi plasmid dengan ZR Plasmid MiniPrep (Zymo Research®). Plasmid hasil isolasi diperiksa dengan *bi-directional sekuensing plasmid*.

Sekuensing

Sekuensing dilakukan di *1st Base* (Malaysia) dengan metode *Sanger Sequencing*. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan perangkat lunak MEGA7 untuk menghitung jumlah perbedaan basa nukleotida dari total sekuens yang diperoleh dengan membandingkan antara contoh terhadap sekuens rujukan dari beberapa hasil penelitian yang menggunakan dan membahas gen IS711. Kesamaan urutan antar contoh dan isolat acuan Genbank dianalisis menggunakan *The Basic Alignment Search Tools* (BLAST) dari *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI). BLAST digunakan untuk menganalisis homologi asam nukleat dari gen IS711 yang berasal dari contoh lapangan terhadap gen IS711 yang terdapat di *Genbank*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Empat bela contoh serum memberikan hasil negatif setelah diperiksa dengan teknik RBT dan CFT. Kemurnian DNA di dalam hasil ekstraksi limpa disajikan dalam Tabel 1. Nilai yang didapatkan untuk kemurnian DNA 260/280 adalah 1,8-2,0. Menurut Desjardins dan Conklin (2010), nilai ratio yang dapat diterima sebagai

Tabel 1. Kemurnian DNA 260/280

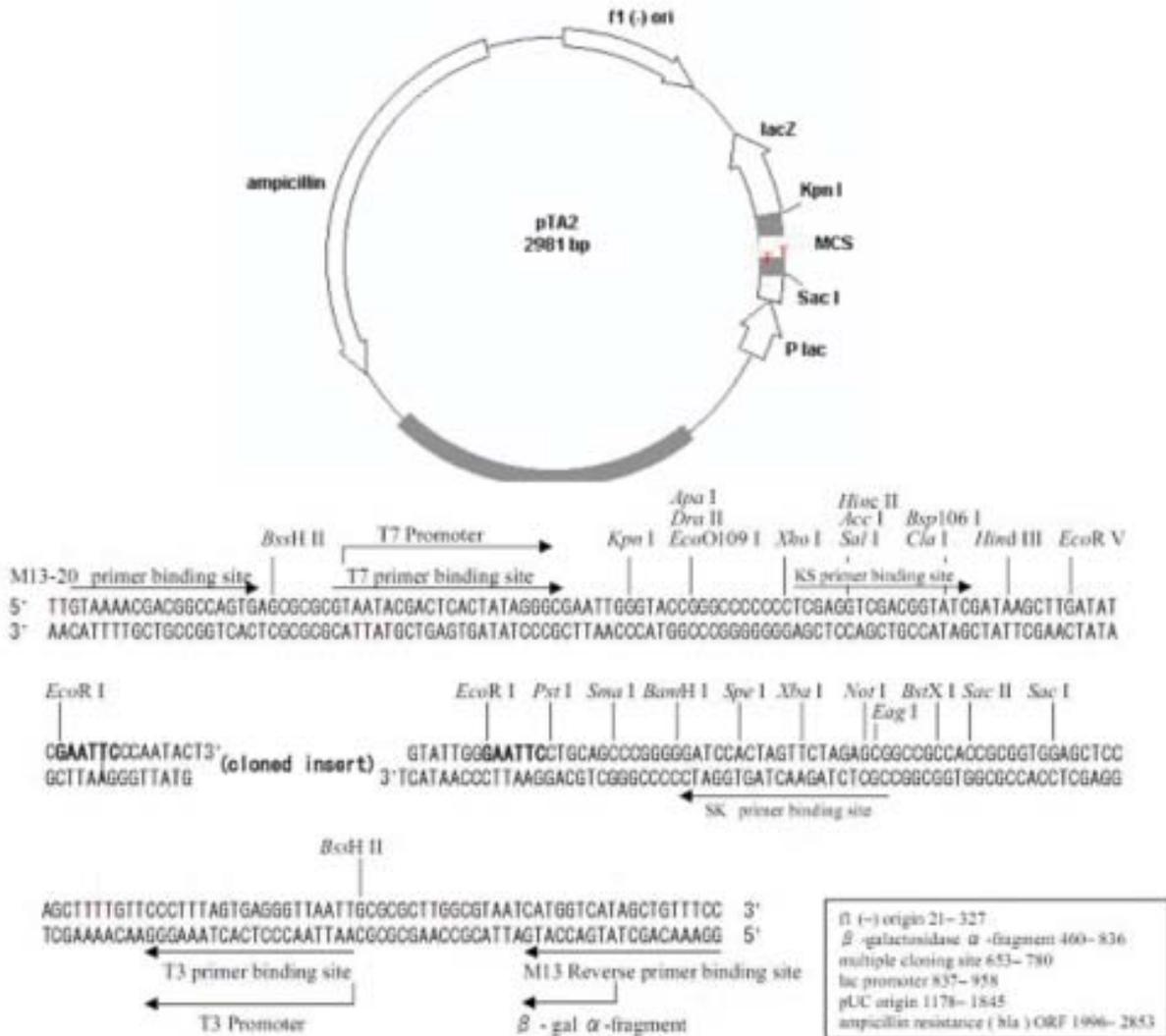
No.	Identitas Contoh	Kemurnian
1	91	1,981
2	95	1,814
3	97	1,871
4	7	1,900
5	13	1,883
6	103	1,923
7	104	1,897
8	124	1,898
9	147	1,895

DNA murni adalah 1,8-2,0. Nilai ratio lebih rendah dari 1,8 dapat dinunjukkan adanya pencemaran protein, fenol, atau pencemar lain yang menyerap cahaya kuat pada panjang gelombang di sekitar 280 nm. Nilai ratio dengan nilai lebih tinggi dari 2,0 menunjukkan adanya pencemaran RNA.

Hasil uji PCR menggunakan primer 16S rRNA disajikan dalam Gambar 2A. Pada gel elektroforesis menunjukkan semua Contoh dan kontrol positif *E. coli* terdapat pita DNA pada 1542 bp. Hasil PCR tersebut memperlihatkan bahwa terdapat gen 16S rRNA sebagai gen lestari (*conserved*) pada DNA bakteri dari hasil ekstraksi DNA yang telah dilakukan.

Pemeriksaan selanjutnya menggunakan primer PCR yang khusus terhadap gen IS711 yang merupakan gen unik dalam *Brucella* sp. (Moulana *et al.* 2016). Hasilnya disajikan dalam Gambar 2B. Hasil pemeriksaan memperlihatkan adanya contoh dengan pita yang diharapkan (127 bp) sebanyak 41 contoh. Lima contoh dengan pita yang diharapkan tersebut dilakukan pengklonaan dan sekuensing, yakni contoh Nomor 91, 95, 97, 7, dan 13. Hasil pemeriksaan sebelumnya mencatatkan bahwa contoh nomor 91, 95, 97, 103, 104, 127, dan 147 memberikan hasil positif *B. melitensis* dengan pita sasaran pada 733 bp menggunakan primer AMOS dan master mix HotstarTaq Plus Master Mix (Qiagen®). Hasil gel elektroforesis delapan koloni *E. coli* yang sudah diklonasi pada contoh nomor 91, 95, 97, 7, dan 13 disajikan pada Gambar 3.

Sekuensing koloni hasil klon contoh uji disajikan dalam Tabel 2. *Query cover* adalah angka yang menjelaskan jumlah sekuens contoh yang tercakup dalam urutan sasaran. Jika sekuens sasaran dalam basis data mencakup seluruh sekuens contoh yang diperiksa, maka angka *query cover* adalah 100% (Newell *et al.* 2013). Nilai *query cover* perlu dilihat terlebih dahulu ketika memperoleh hasil Analisis BLAST dibandingkan melihat angka kemiripan. Sekuens yang tidak berhubungan dapat cocok dengan sebagian kecil sekuens sasaran sehingga menghasilkan kemiripan yang tinggi, tetapi angka *query cover*-nya rendah. Sedangkan angka *E value* merupakan angka yang menggambarkan berapa kali terjadi kecocokan secara kebetulan pada basis data terhadap sekuens contoh (Madden 2003). Jika *E value* semakin mendekati nol, maka semakin mirip antara hasil sekuens dengan gen target hasilnya. Persentase kemiripan adalah angka yang menggambarkan seberapa mirip urutan contoh



Gambar 1. Vektor pTA2 Toyobo

dengan urutan target (berapa banyak karakter dalam setiap urutan yang identik). Semakin tinggi persentase kemiripan, semakin baik hasilnya (Pearson 2013).

Hasil analisis BLAST memperlihatkan Contoh 91 memiliki kemiripan lebih besar terhadap *B. abortus* dan *B. melitensis*. Hasil analisis estimasi perbedaan evolusi nukleotida dengan menggunakan perangkat lunak MEGA7 menunjukkan hasil sekuensing Contoh 91 juga memiliki homologi yang lebih tinggi terhadap *B. melitensis* dan *B. abortus* untuk total panjang nukleotida 127 bp, yaitu masing-masing 97,6%-100% dan 99,2%-100% seperti yang disajikan pada Tabel 2.

Pada Contoh Nomor 95,97,7 dan 13 memiliki homologi yang lebih rendah daripada Contoh 91. Menurut Pearson (2013), homologi

dapat membentuk dasar untuk pencarian yang lebih peka, pendugaan fenotip dan analisis evolusi. Homologi merupakan sekuens yang memiliki nenek moyang evolusi yang sama. Semakin tinggi homologi yang dimiliki, semakin dekat nenek moyang evolusinya. Keempat Contoh tersebut memiliki keberpihakan yang kurang akurat karena memiliki homologi yang rendah. Data perbedaan dan homologi tiap sekuens, sumber sampel asal negara, dan publikasi untuk Contoh 91 disajikan pada Tabel 3.

Analisis pohon filogenik pada Gambar 4. menunjukkan Contoh 91 terdapat di satu cabang dengan *B. melitensis* sekuens 1, 2, dan 3 dengan nomor aksesori LT962930.1 dan LT962936.1, *B. abortus* sekuens 1 dan 2 dengan nomor aksesori CP033079.1 dan *B. abortus* sekuens 1 dengan

Tabel 2. Hasil analisis BLAST contoh uji.

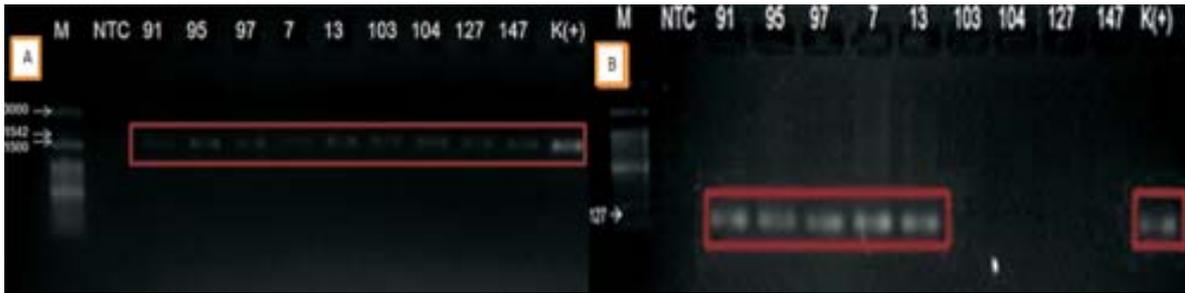
No.	No. Contoh Uji	Acuan sasaran	Query Cover (%)	E value	Kemiripan (%)	Perbedaan (%)	Homologi (%)
1	91	<i>B. abortus</i> Strain BJ1 No. Akses: CP033079.1	99	4e-56	99,21	0,08	99,2
		<i>B. abortus</i> Strain IVRI/95 No. Akses: CP034695.1	99	4e-56	99,21	0-0,08	100-99,2
		<i>B. melitensis</i> isolate 1 No. Akses: LT962930.1	100	4e-56	99,21	0-2,4	100-97,6
		<i>B. melitensis</i> isolate 1 No. Akses: LT962936.1	100	4e-56	99,21	0-2,4	100-97,6
		<i>B. melitensis</i> strain EGY14 No. Akses: MK490917.1	75	0,023	100	51,6	48,4
2	95	<i>B. melitensis</i> strain EGY20 No. Akses: MK490914.1	75	0,023	100	51,6	48,4
		<i>B. abortus</i> strain Egy.19 No. Akses: MK490913.1	75	0,023	100	51,6	48,4
		<i>B. melitensis</i> strain EGY14 No. Akses: MK490917.1	40	0,053	100	86	14
3	97	<i>B. melitensis</i> strain EGY20 No. Akses: MK490914.1	40	0,053	100	86	14
		<i>B. abortus</i> strain Egy.19 No. Akses: MK490913.1	40	0,053	100	86	14
		<i>B. melitensis</i> strain EGY14 No. Akses: MK490917.1	40	0,053	100	112,5	(-) 12,5
4	7	<i>B. melitensis</i> strain EGY20 No. Akses: MK490914.1	40	0,053	100	112,5	(-) 12,5
		<i>B. abortus</i> strain Egy.19 No. Akses: MK490913.1	40	0,053	100	112,5	(-) 12,5
		<i>B. melitensis</i> strain EGY14 No. Akses: MK490917.1	40	0,053	100	112,5	(-) 12,5
		<i>B. abortus</i> strain Egy.19 No. Akses: MK490913.1	40	0,053	100	112,5	(-) 12,5
5	13	<i>B. melitensis</i> strain EGY14 No. Akses: MK490917.1	40	0,053	100	112,5	(-) 12,5
		<i>B. melitensis</i> strain EGY20 No. Akses: MK490914.1	40	0,053	100	112,5	(-) 12,5
		<i>B. abortus</i> strain Egy.19 No. Akses: MK490913.1	40	0,053	100	112,5	(-) 12,5
		<i>B. abortus</i> strain Egy.19 No. Akses: MK490913.1	40	0,053	100	112,5	(-) 12,5

nomor akses CP034695.1. Menurut Felsenstein (2004), *bootstrap* serendah 40 atau 30 bisa menjadi yang tertinggi yang bisa didapatkan. Hal ini terjadi karena kurangnya data yang digunakan.

Pada teknik PCR menggunakan primer Mar terdapat Contoh yang memberikan hasil positif *B. melitensis* pada pengujian PCR sebelumnya, tetapi memberikan hasil yang negatif *B. melitensis* pada pengujian ini. Hal ini dapat terjadi karena terdapat perbedaan perangkat *master mix* dan primer yang digunakan. Perbedaan campuran utama dan primer dapat menyebabkan perbedaan kepekaan hasil pemeriksaan. Perangkat *master mix* yang digunakan pada pengujian sebelumnya adalah

HotstarTaq Plus Master Mix (Qiagen®), sedangkan pada pengujian ini menggunakan MyTaq™ HS Red Mix (Bioline Reagents Ltd.). Primer PCR pada pengujian sebelumnya menggunakan primer AMOS sedangkan pada pengujian ini menggunakan primer Mar meskipun memiliki sasaran gen yang sama, yaitu IS711. Salah satu kelemahan PCR adalah ketika primer yang digunakan dapat menguatkan sekuen yang tidak spesifik, tetapi mirip dan tidak identik dengan DNA yang disasar (Gabriyan dan Avashia, 2013).

Hasil menggunakan teknik PCR terhadap Contoh 95, 97, 7, dan 13 ditemukan pita yang diharapkan, tetapi mendapatkan homologi yang rendah pada hasil analisis sekuensing. Hal ini



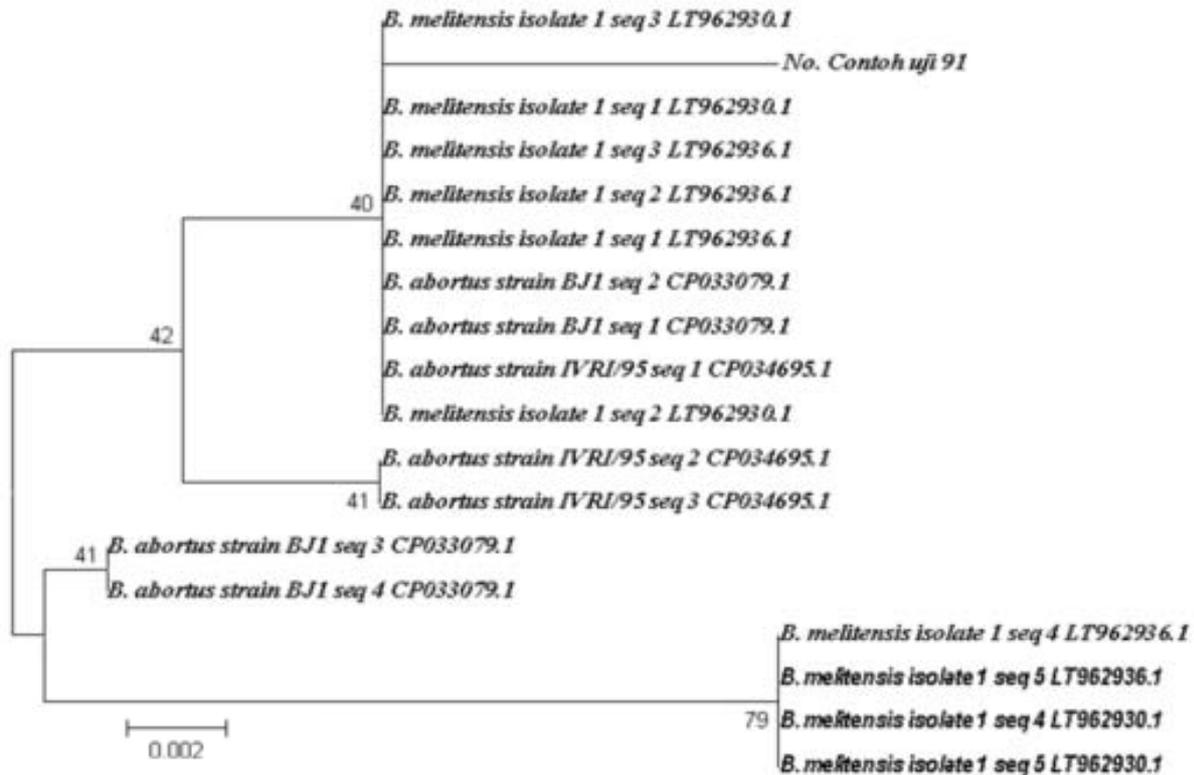
Gambar 2. Hasil Uji PCR dengan menggunakan primer 16S rRNA (A) dan primer Mar (B). Contoh Nomor 91, 95, 97, 7 dan 13 dilanjutkan pengklonaan dan sekuensing.



Gambar 3. Hasil jel elektroforesis 8 Koloni *E. coli* yang sudah diklonaan pada Contoh A) nomor 91, B) nomor 95, C) nomor 97, D) nomor 7, dan E) nomor 13. Setiap Contoh terdapat 8 kandidat koloni *E. coli* yang diuji PCR dan satu koloni yang ditandai dilanjutkan sekuensing.

terjadi karena analisis sekuensing menggunakan perangkat lunak dengan strategi yang berbasis indeks. Strategi ini memerlukan pra-pemrosesan intensif dari basis data

pencarian sehingga dibatasi oleh ketersediaan basis data tersebut. Adanya keterbatasan tersebut dapat menyebabkan primer kurang peka dalam melacak sasaran (Ye *et al.* 2012).



Gambar 4. Pohon filogenik hasil sekuensing Contoh 91.

Tabel 3. Data perbedaan dan homologi tiap sekuens serta sumber sampel, asal negara dan publikasi Contoh 91.

No. Acuan Sasaran	No. Akses	Perbedaan (%)	Homologi (%)	Sumber Sampel, Asal Negara, Publikasi	
1	<i>B. abortus</i> Strain BJ1 seq 1-4	CP033079.1	0,08	99,2	Rusa besar taman, Cina, tidak dipublikasikan
	<i>B. abortus</i> Strain IVRI/95 seq 1	CP034695.1	0	100	
	<i>B. abortus</i> Strain IVRI/95 seq 2		0	100	
	<i>B. abortus</i> Strain IVRI/95 seq 3		0,8	99,2	
	<i>B. abortus</i> Strain IVRI/95 seq 4		0,8	99,2	
2	<i>B. melitensis</i> isolate 1 seq 1	LT962930.1	0	100	Manusia, Norwegia, Johansen (2017)
	<i>B. melitensis</i> isolate 1 seq 2		0	100	Manusia, Norwegia, Johansen (2017)
	<i>B. melitensis</i> isolate 1 seq 3		0	100	
	<i>B. melitensis</i> isolate 1 seq 4		2,4	97,6	
	<i>B. melitensis</i> isolate 1 seq 5		2,4	97,6	
	<i>B. melitensis</i> isolate 1 seq 1	LT962936.1	0	100	
	<i>B. melitensis</i> isolate 1 seq 2		0	100	Manusia, Norwegia, Johansen (2017)
	<i>B. melitensis</i> isolate 1 seq 3		0	100	
	<i>B. melitensis</i> isolate 1 seq 4		2,4	97,6	
	<i>B. melitensis</i> isolate 1 seq 5		2,4	97,6	

SIMPULAN

Pengklonaan dan sekuensing pada Contoh 91 memberikan hasil homologi yang lebih tinggi terhadap *B. melitensis* dan *B. abortus* untuk total panjang nukleotida 127 bp, yaitu masing-masing 97,6 - 100% dan 99,2 - 100%. Contoh 91 memiliki satu cabang pada pohon filogenik dengan *B. melitensis* sekuens 1, 2, dan 3 dengan nomor aksesori LT962930.1 dan LT962936.1, *B. abortus* sekuens 1 dan 2 dengan nomor aksesori CP033079.1 dan *B. abortus* sekuens 1 dengan nomor aksesori CP034695.1. Contoh lainnya, yaitu 95, 97, 7, dan 13 memiliki homologi yang lebih rendah dibandingkan dengan Contoh 91.

SARAN

Penelitian lain dapat menggunakan pengklonaan untuk mendapatkan sekuensing dengan primer yang memiliki bp pendek, dan menggunakan primer Mar untuk melihat kekerabatan *Brucella* sp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penghargaan diberikan kepada Badan Penyuluhan dan Pengembangan Sumber Daya Manusia (SDM) Kementerian Pertanian atas beasiswa yang telah diberikan. Terima kasih kami ucapkan kepada BBLITVET, Badan Karantina Pertanian, dan Pemerintah Daerah kabupaten Bogor yang telah memfasilitasi penelitian ini serta semua pihak yang telah membantu berlangsungnya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Burnham. C-A, Doern C, Binder SR. 2013. Bacterial Disease Chapter 9.20. In: Wild DG, ed. *The Immunoassay Handbook*. Elsevier. Hlm. 929-938.
- Cai H, Archambault M, Prescott JF. 2003. 16S Ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. *J Vet Diagn Invest* 15: 465-469.
- De Miguel MJ, Marin CM, Munoz PM, Dieste L, Grillo MJ, Blasco M. 2011. Development of selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J Clin Microbiol.* 49(4): 1458-1463.
- Desjardins P, Conklin D. 2010. Nanodrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp.* 45: 2565.
- European Commission. 2001. Brucellosis in Sheep and Goats (*Brucella melitensis*) [Internet]. Scientific Committee in Animal Health and Animal Welfare. Health and Consumer Protection Directorate-General. European Union. p 1-20. [diunduh 2018 Jul 18]. Tersedia pada: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scah_out59_en.pdf.
- Felsenstein J. 2004. *Inferring Phylogenies*. Sunderland (US): Sinauer Associates Inc.
- Gabriyan L, Avashia N. 2013. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *J Invest Dermatol* 133(3): e6. doi: 10.1038/jid.2013.1.
- James G. 2010. Universal Bacterial Identification by PCR and DNA Sequencing of 16S rRNA Gene. In: Schuller M, Slots TP, James GS, Halliday CL, Carter IWJ, editor. *PCR for Clinical Microbiology*. Dordrecht (NED): Springer. Hlm. 209-214.
- Johansen TB, Scheffer L, Jensen VK, Bohlin J, Feruglio SL. 2018. Whole-genome sequencing and antimicrobial resistance in *Brucella melitensis* from a norwegian perspective. *Scientific Reports* 8: 8538.
- Kostlev M, Otwell AE, Richardson RE, Suzuki Y. 2015. Cloning should be simple: *Escherichia coli* DH5 α -mediated assembly of multiple dna fragments with short end homologies. *Plos ONE* 10(9): e0137466.
- Madden T. 2002. The BLAST Sequence Analysis Tool. In: McEntyre J and Ostell J, ed. *The NCBI Handbook*. Bethesda. US. NCBI. HLM. 1-15.
- Moulana Z, Roushan MRH, Marashi SMA. 2016. Evaluation of different primers for detection of *Brucella* by using PCR method. *Ephysician* 8(11): 3222-3227.
- Newell PD, Fricker AD, Roco CA, Chandrangsu, Merkel SM. 2013. A small-group activity introducing the use and interpretation of BLAST. *J Microbiol Biol Educ* 14(2): 238-243.
- OIE. 2009. Bovine Brucellosis. World Organization of Animal Health. Paris (FR). p 1-35. [diunduh pada 2017 Des 4]. Tersedia

- pada: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.006>.
- OIE. 2016. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (Infection With *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). World Organization of Animal Health. Paris (FR). p 1-10. [diunduh pada 2017 Des 4]. Tersedia pada: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_bovine_brucellosis.pdf.
- Pearson WR. 2013. An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Curr Protoc Bioinformatics*. Jun: 03.
- Rinanda T. 2011. Analisis sekuensing 16S rRNA di bidang mikrobiologi. *JKS*. 11(3): 172-177.
- Samadi A, Ababrah MMK, Giadinis ND, Lafi CQ. 2010. Ovine and Caprine Brucellosis (*Brucella melitensis*). In: Hemming D, editor. *Animal Science Reviews 2010*. Yordan. CAB. Hlm. 169-183.
- Shapiro DS. 2017. Infections Acquired from Animal Other Than Pets. In: Cohen J, Powderly WG, dan Opal SM., editor. *Infectious Disease E-Book*. Elsevier. Hlm. 663-669.e2
- Septiningtyas W. 2017. Domba Seropositif Brucellosis yang Dipotong di Tempat Pemotongan Hewan Ruminansia Kecil Rakyat di Kabupaten Bogor [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13: 134.
- Zhang Y, Zhang XD, Liu x, Li YS, Ding JP, Zhang XR, Zhang YH. 2013. Reference gene screening for analyzing gene expression across goat tissue. *Asian Australas J Anim Sci* 26(12): 1665-1671.