

Deteksi Molekuler Gen Penyandi Protein *Virb11* pada *Brucella abortus* Isolat Lokal Asal Pinrang, NTT dan Strain Vaksin

(MOLECULAR DETECTION OF PROTEIN ENCODING GENES
Virb11 ON BRUCELLA ABORTUS LOCAL ISOLATES
ORIGIN OF PINRANG, NTT AND VACCINE STRAINS)

Maria Gladis Bupu Meze¹, Didik Handijatno²,
Wiwiek Tyasningsih², Suwarno²,
Agnes Theresia Soelih Estoepangestie³, Rahaju Ernawati²

¹Mahasiswa Program Studi Magister Ilmu Penyakit
dan Kesehatan Masyarakat Veteriner,

²Departemen Mikrobiologi Veteriner,

³Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo, Kota Surabaya,
Jawa Timur, Indonesia, 60115

Telepon +6281226094872, 5993016; Fax. +62 31 5993015

*email:- didik_fkhunair@yahoo.co.id

ABSTRACT

Brucellosis in cattle is a disease caused by *Brucella abortus* due to the reduction in livestock population caused by abortion, stillbirth, weak birth, infertility and sterility. *Brucella abortus* has several potential virulence factors, i.e. *virB11* gene that encodes VirB11 protein is an important virulence factor acts as an ATPase for assembling organelles when the bacteria replicate, helping to complete the bacterial cycle and agress to another cells. The aim of this study are to re-identification *Brucella abortus* and detect *virB11* gene as encoding of *B. abortus* VirB11 protein in local isolates from Pinrang, NTT, strain vaccines S19 and RB51. The isolates *Brucella abortus* were re-cultured in Brucella agar base and re-identification is followed by microscopic with Gram staining and biochemical tested with urease, citrat, indol and TSIA test. *virB11* gene was detected with PCR method. The PCR result showed *virB11* gene have DNA band 720 bp. *virB11* gene are present in local isolates from Pinrang, NTT, strain vaccines S19 and RB51.

Key words: *Brucella abortus*, vaccine strain S19, vaccine strain RB51, *virB11* gene

ABSTRAK

Brucellosis adalah penyakit pada ternak yang disebabkan oleh *Brucella abortus* yang mengakibatkan pengurangan populasi ternak akibat abortus, lahir mait, lahir lemah, infertilitas dan sterilitas. *Brucella abortus* mempunyai beberapa faktor virulensi seperti gen *virB11* yang menyandi protein VirB11 yang berperan sebagai ATPase untuk perakitan organel ketika bakteri berreplikasi, membantu menyelesaikan siklus bakteri dan pengeluaran bakteri menuju sel lain. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk re-identifikasi *Brucella abortus* dan deteksi gen *virB11* dari isolat lokal asal Pinrang, NTT, strain vaksin S19 dan RB51. Isolat *Brucella abortus* dire-kultur pada media Brucella agar base dan re-identifikasi dilakukan dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia melalui uji urease, citrat, indol dan TSIA. Gen *virB11* dideteksi dengan metode PCR. Hasil PCR menunjukkan pita band 720 bp. Gen *virB11* terdapat pada isolat lokal asal Pinrang dan NTT serta strain vaksin S19 dan RB51.

Kata kunci *Brucella abortus*, strain vaksin S19, strain vaksin RB51, gen *virB11*

PENDAHULUAN

Brucellosis merupakan penyakit yang menginfeksi ternak di sebagian besar dunia yang disebabkan oleh bakteri genus *Brucella* dan menyebabkan keluron atau *abortus*. Brucellosis mudah menyebar secara luas pada sekelompok populasi ternak dan berdampak pada kerugian ekonomi. Diperkirakan kerugian ekonomi akibat brucellosis pada sapi di Indonesia ditaksir mencapai 138,5 miliar rupiah setiap tahun (Ditjennak, 2006) karena berkurangnya populasi ternak secara langsung akibat keluron, lahir mati (*stillbirth*), lahir lemah, infertilitas dan sterilitas.

Pengendalian brucellosis pada sapi di Indonesia telah dilakukan melalui program vaksinasi menggunakan strain vaksin *Brucella abortus* S19 dan RB51, namun angka prevalensi brucellosis pada sapi di beberapa daerah (Jakarta, Sulawesi Selatan, dan Nusa Tenggara Barat) masih cukup tinggi yaitu lebih dari 2% (Ditjennak, 2012). Kedua vaksin ini memberikan kekebalan pada sapi, tetapi antibodi yang dihasilkan dari vaksinasi menggunakan *B. abortus* S19 sulit dibedakan dengan antibodi yang disebabkan oleh infeksi *B. abortus* dari alam (Olsen dan Stoffregen, 2005).

Karakterisasi *genomic* untuk pemeriksaan *Brucella* dapat dideteksi pada gen target *omp*, *polysaccharide deacetylase*, *eryC*, *wboA*, *bp26*, *ABC transporter binding protein* (Lopez-Goni *et al.*, 2008) dan *virB* (Ke *et al.*, 2015). Gen-gen tertentu ada yang terdapat pada semua species *Brucella*, termasuk pada *B. abortus* tetapi ada juga gen target yang tidak dimiliki oleh salah satu species *Brucella*. Beberapa gen target yang tidak dimiliki oleh semua species *Brucella* dapat digunakan untuk identifikasi dan diferensiasi (Lopez-Goni *et al.*, 2008).

Virulen *B. abortus* infeksius dan S19 dibedakan oleh metabolisme *erythritol* (Sangari *et al.*, 2000). Vaksin *B. abortus* S19 tidak memiliki fragmen gen *eryC* karena merupakan salah satu faktor virulensi yang menyandi *D-erythrose-1-phosphat dehydrogenase* yang digunakan untuk katabolisme *erythritol* sebagai sumber energi *Brucella* (Lopez-Goni *et al.*, 2008).

Pada strain vaksin *B. abortus* RB51, Vemulapalli *et al.* (2000) menunjukkan bahwa terjadi mutasi dari gen *wboA* yang disebabkan oleh elemen IS711. Gen *wboA* mampu menyandikan glikosiltransferase yang telah terbukti penting untuk biosintesis antigen O *Brucella* yang merupakan bagian dari struktur

lipopolisakarida (LPS). Mutasi pada gen *wboA* inilah yang membedakan strain vaksin RB51 dengan *B. abortus* yang infeksius lainnya.

Bakteri *B. abortus* merupakan bakteri patogen intraseluler yang dapat bertahan hidup dan bereplikasi dalam sel fagosit dan telah mengembangkan berbagai cara untuk menghindari pertahanan inang/*host* atau degradasi bakteri, seperti mengendalikan pematangan sel fagosit dan mentransformasikannya ke dalam lingkungan yang kaya nutrisi sehingga bakteri bisa bereplikasi (Celli *et al.*, 2003). *Brucella* mempunyai kemampuan untuk menghindari efek bakterisida dari sel target seperti sel makrofag yaitu dengan mengkodekan T4SS (de Jong *et al.*, 2008) untuk mengeluarkan dan mentranslokasi protein efektor ke sel inang untuk memodulasi respons seluler, menghindari proses fagositosis dan mendukung proses infeksi (Myeni *et al.*, 2013).

Gen *virB* merupakan gen penyandi virulensi yang berperan penting terhadap kelangsungan hidup intraseluler dan multiplikasi dari *B. abortus* yang terdiri dari 12 gen yaitu *virB1-12* (Sieira *et al.*, 2000). Gen *virB11* menyandi protein *virB11* yang berfungsi sebagai ATPase (Smith *et al.*, 2016) dan merupakan faktor virulensi dari berbagai bakteri patogen, salah satunya terdapat pada bakteri *B. abortus* (Delrue *et al.*, 2001).

Penghapusan gen *virB11* pada *B. abortus* yang bertujuan mengendalikan produksi protein *virB11* ATPase pada penelitian yang dilakukan oleh Smith *et al.* (2016) untuk mengetahui persyaratan yang dibutuhkan selama siklus intraseluler dalam makrofag, menunjukkan bahwa gen *virB11* yang menyandi protein *virB11* tidak hanya diperlukan untuk menghasilkan organel pada tahap replikasi *B. abortus* tetapi juga membantu penyelesaian siklus bakteri dan jalan keluar bakteri menuju ke sel lain. Hasil temuan Smith *et al.* (2016) memperluas fungsi patogen dari gen *virB* *B. abortus* dan menggambarkan penargetan sekresi ATPase melalui gen *virB11* sebagai strategi yang berguna untuk memanipulasi aktivitas sistem sekresi bakteri.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi kembali secara mikroskopis maupun biokimia isolat lokal *B. abortus* asal Kabupaten Pinrang Sulawesi Selatan, NTT, strain vaksin S19 dan RB51, dilanjutkan dengan mendeteksi gen *virB11* yang merupakan faktor virulensi pada masing-masing isolat menggunakan uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah bakteri *B. abortus* isolat lokal asal Pinrang, Sulawesi Selatan dan NTT yang diperoleh dari Balai Besar Veteriner (BBVet) Maros Sulawesi Selatan, serta strain vaksin S19 dan RB51 yang diperoleh dari Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

Re-kultur *B. abortus* Isolat Lokal dan Strain Vaksin

Sampel penelitian berupa bakteri *B. abortus* yang diperoleh dari isolat lokal asal Pinrang, NTT, strain vaksin S19 dan RB51 dikultur kembali pada media *Brucella Agar Base* (BAB) dengan cara *streak* kemudian diinkubasi selama tiga hari dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan 5% CO₂.

Re-identifikasi *B. abortus* Isolat Lokal dan Strain Vaksin

Koloni yang tumbuh terpisah diidentifikasi kembali dengan uji biokimia atau menurut prosedur standar uji bakteriologis dengan pewarnaan Gram, uji katalase dengan H₂O₂ 3%, uji urease dengan media urea agar (UA), uji sitrat dengan media *simmonse citrate agar* (SCA), uji indol dengan media *sulfat indol motility* (SIM) dan uji *triple sugar iron agar* (TSIA). Uji biokimia dilakukan dengan menginokulasikan ke dalam UA, SCA, SIM, TSIA dan diinkubasi selama tiga hari dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan 5% CO₂.

Pemeriksaan Molekuler dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Bakteri *B. abortus* isolat lokal asal Pinrang, NTT, strain vaksin S19 dan RB51 diperiksa dengan metode PCR. Sebanyak 1-2 koloni bakteri *B. abortus* isolat lokal asal Pinrang, NTT, strain vaksin S19 dan RB51 diekstraksi menggunakan prosedur menurut *QIAamp DNA mini kit* (Qiagen, Hilden, Germany) sesuai dengan protokol pabrik.

Proses amplifikasi DNA dengan teknik PCR dilakukan dengan menggunakan *thermo cycler*. Sebanyak 5 iL DNA dimasukkan ke dalam *tube PCR bead*, kemudian ditambahkan 1 iL primer *forward*, 1 iL primer *reverse*, 12,5 iL *master mix* dan 0,5 iL air suling/*destilated water* sehingga total larutan berjumlah 20 iL. Selanjutnya larutan tersebut dilakukan *spin*

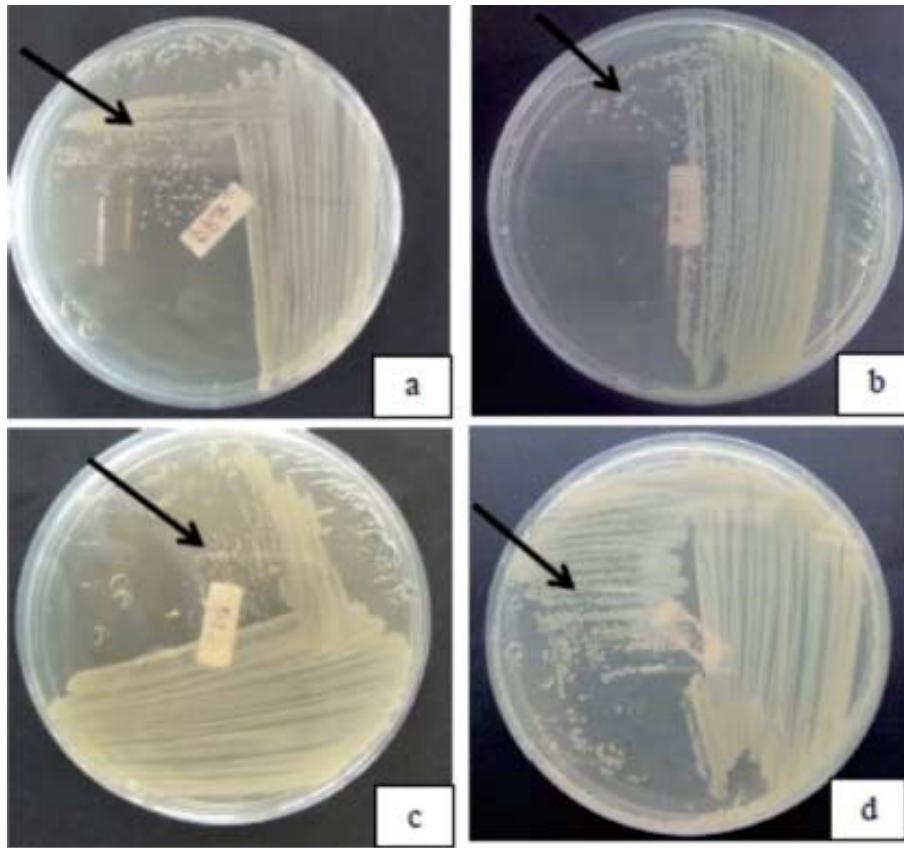
down dan dimasukkan ke dalam PCR *thermo cycler* yang telah diprogram, denaturasi awal selama lima menit pada suhu 94 °C diikuti dengan denaturasi selama 30 detik pada suhu 94°C, *annealing* selama 30 detik pada suhu 55°C, *extension* selama 30 detik pada suhu 72 °C, sebanyak 35 siklus dan diakhiri dengan *extension* akhir selama lima menit pada suhu 72°C. Primer yang digunakan didesain oleh para peneliti yaitu *forward* 5'ATGATGTCAAACC GAAGTGAC 3' dan *reverse* 5' CGTCACTGG TGCGTTTTCTTCTTC 3' dengan target *amplicon* 720 bp. Produk PCR (Gambar 5) kemudian dibaca pada *agarose gel* elektroforesis 2% dan menunjukkan pita/*band* pada posisi 720 bp menggunakan sinar ultraviolet.

HASIL DAN PEMBAHASAN

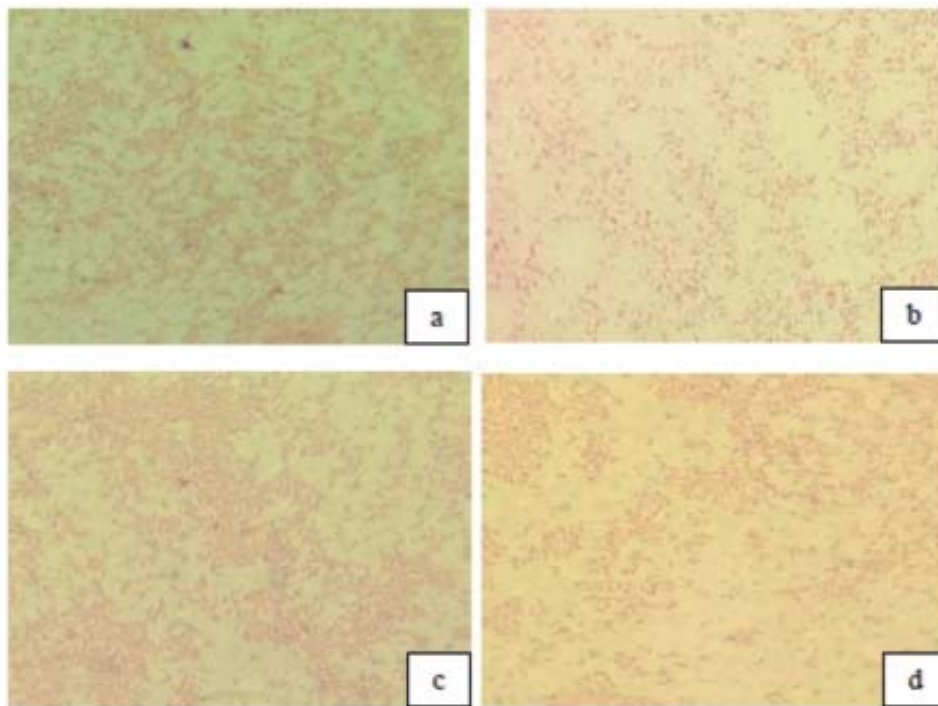
Pertumbuhan isolat lokal asal Pinrang, NTT, strain vaksin S19 dan RB51 pada media *Brucella Agar Base* diamati setelah tiga hari masa inkubasi suhu 37 °C dengan 5% CO₂ terlihat koloni halus, jernih, mengkilat dengan tepi yang rata berwarna kekuningan atau seperti madu (Gambar 1). Menurut Sulaiman 2006, *B. abortus* strain virulen pada *Brucella Agar Media*, memiliki karakteristik berwarna putih madu, *translucent*, bertepi halus, bersifat lembap dan berdiameter 1-2 mm. Strain avirulen dari genus *Brucella* biasanya menunjukkan karakter koloni bertepi tidak beraturan, bersifat kering dan cenderung berbentuk granular kasar.

Pewarnaan Gram terlihat bakteri bersifat Gram negatif (Gambar 2), yang berarti zat warna I (Gentian/kristal violet) dapat dilunturkan oleh acetone alkohol sehingga bakteri berwarna merah karena menyerap zat warna II yaitu safranin. Morfologi bakteri *B. abortus* dari isolat asal Pinrang, NTT, strain vaksin S19 dan RB51 menunjukkan hasil yang sama yaitu *coccobacillus*, berpasangan dan bergerombol.

Pemeriksaan dengan melakukan uji biokimia menggunakan uji urease, uji sitrat, uji TSIA dan SIM (Gambar 4). Uji urease menggunakan media UA menunjukkan hasil positif ditandai dengan perubahan warna media dari kuning menjadi kemerahan yang menunjukkan adanya aktivitas enzim urease dari *B. abortus*. Enzim urease menghidrolisis urea maka terjadi perombakan urea menjadi amoniak yang dibebaskan dalam media dan bereaksi dengan air di media membentuk amonium hidroksida dan menyebabkan medium



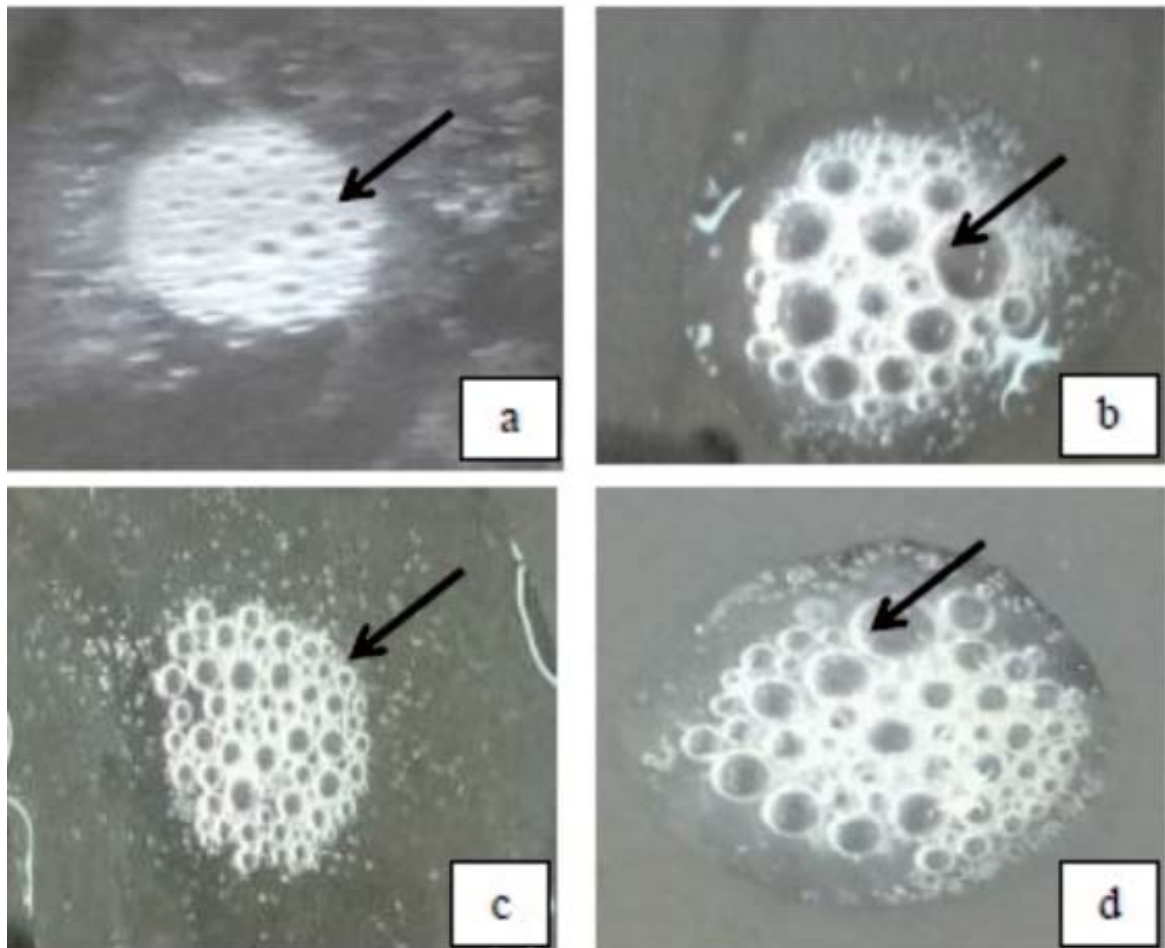
Gambar 1. Gambar pertumbuhan koloni *Brucella abortus* asal Pinrang (a), asal NTT (b), S19 (c) dan RB51 (d) pada media Brucella agar base (BAB)



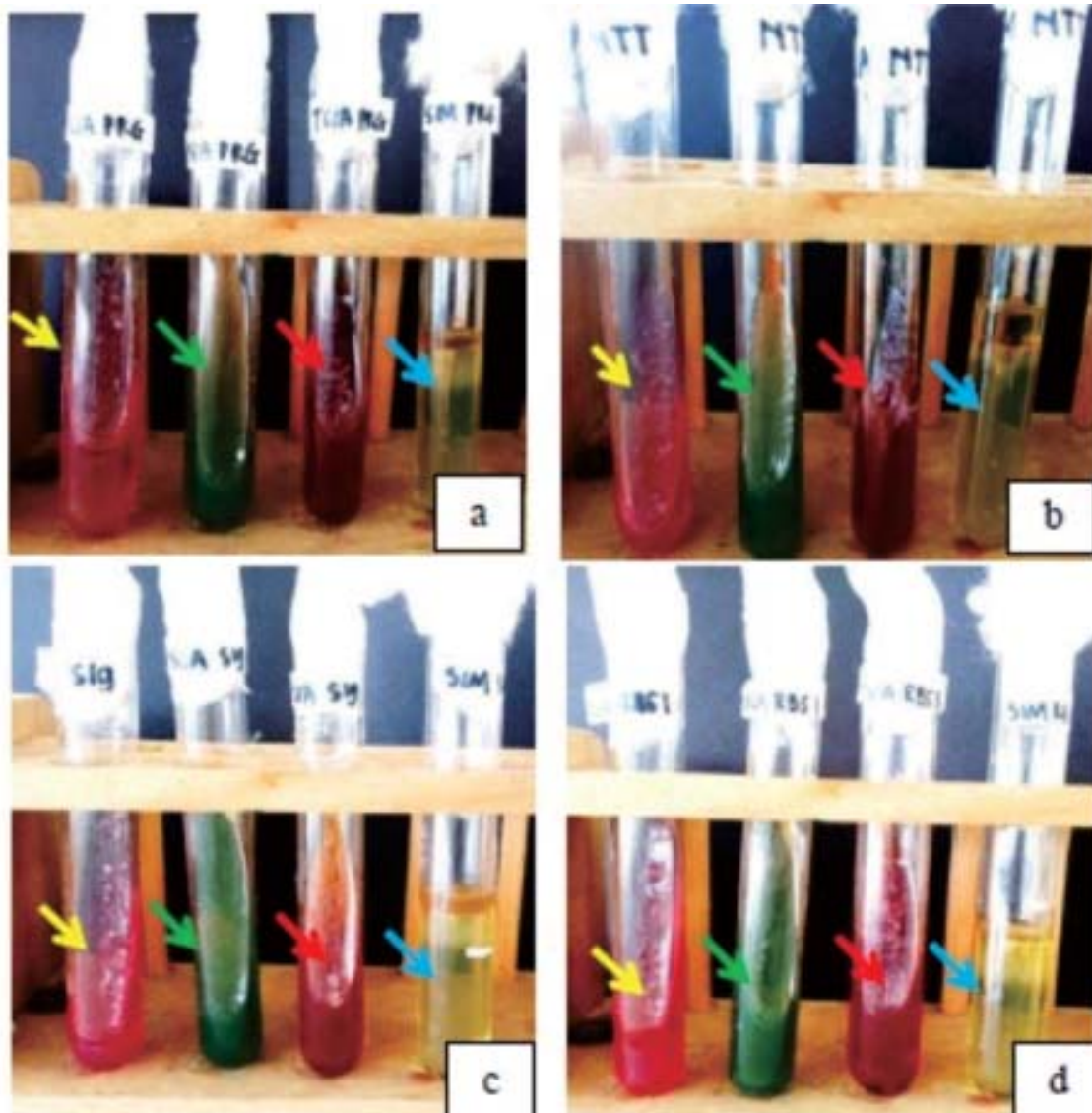
Gambar 1. Gambar mikroskopis pewarnaan Gram (-) isolat *Brucella abortus* asal Pinrang (a), asal NTT (b), S10 (c) dan RB51 (d).

Tabel 1. Hasil re-identifikasi *B. abortus* isolat lokal dan strain vaksin

Uji	Hasil			
	NTT	Pinrang	S19	RB51
Pewarnaan Gram	Gram negatif. coccobacillus. berpasangan dan bergerombol	Gram negatif. coccobacillus. berpasangan dan bergerombol	Gram negatif. coccobacillus. berpasangan dan bergerombol	Gram negatif. coccobacillus. berpasangan dan bergerombol
katalase	Positif (+)	Positif (+)	Positif (+)	Positif (+)
Urease	Positif (+)	Positif (+)	Positif (+)	Positif (+)
Sitrat	Negatif (-)	Negatif (-)	Negatif (-)	Negatif (-)
TSLA	A/A. gas (-)	A/A. gas (-)	A/A. gas (-)	A/A. gas (-)
SIM	Indol (-). nonmotil	Indol (-). nonmotil	Indol (-). nonmotil	Indol (-). nonmotil



Gambar 3. Hasil uji katalase isolat *Brucella abortus* asal Pinrang (a), asal NTT (b), S19 (c) dan RB51 (d)

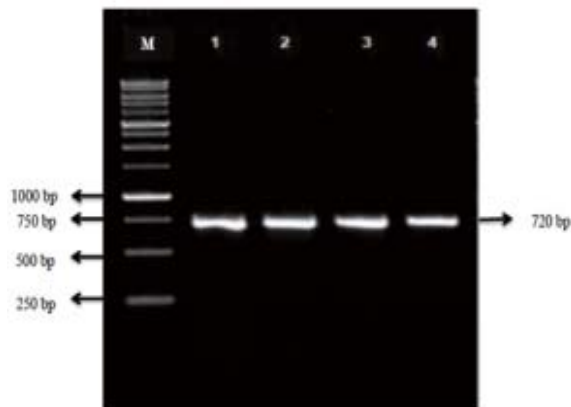


Gambar 4. Hasil uji biokimia UA (panah kuning), SCA (panah hijau), TSIA (panah merah), SIM (panah biru) *Brucella abortus* asal Pinrang (a), asal NTT (b), S19 (c) dan RB51 (d)

berubah menjadi alkalis, sehingga warna media menjadi lebih merah yang disebabkan adanya indikator *phenol red* dalam media. Uji sitrat menggunakan media SCA menunjukkan hasil negatif ditandai dengan tidak ada perubahan warna pada media yang berarti *B. abortus* tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon (Handijatno *et al.*, 2016). Uji indol menggunakan media SIM menunjukkan hasil yang negatif ditandai dengan tidak terbentuknya cincin berwarna merah muda pada ujung tabung. Pada media TSIA menunjukkan hasil *butt* dan *slant* bersifat alkali ditandai dengan warna merah pada bagian atas dan bawah media yang berarti *B. abortus* tidak memfermentasi glukosa, sukrosa dan laktosa serta tidak

membentuk gas. Uji katalase menunjukkan hasil positif, hasil positif dari uji katalase ditandai dengan gelembung udara sebagai reaksi pemecahan H_2O_2 oleh enzim katalase menjadi H_2O dan O_2 (Gambar 3). Pemeriksaan bakteriologis tersebut bermanfaat untuk menegaskan bahwa bakteri yang diisolasi adalah *B. abortus* melalui sifat biokimiawi (Sangari *et al.*, 2000). Uji identifikasi kembali yang meliputi pewarnaan Gram, uji katalase serta uji biokimia pada isolat asal Pinrang, NTT, strain vaksin S19 dan RB51 menunjukkan hasil yang sama (Tabel 1).

Isolat *B. abortus* asal Pinrang, NTT, strain vaksin S19 dan RB51 yang telah diidentifikasi kembali, ternyata berhasil mendeteksi adanya gen penyandi protein *virB11* menggunakan



Gambar 5. Hasil elektroforesis gen penyandi protein VirB11 *B abortus* DNA Leader 1kb(M). isolat Pinrang (1), isolat NTT (2), strain S19 (3) dan strain RB51 (4)

teknik PCR. 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). Hasil dari proses amplifikasi gen penyandi protein *virB11* pada isolat asal Pinrang, NTT, strain vaksin S19 dan RB51 adalah 720 bp sesuai dengan target *amplicon* dari referensi sekuen yang digunakan. Hal ini menunjukkan bahwa pada *B. abortus* infeksius maupun strain vaksin masih memiliki faktor virulensi penting yaitu gen *virB11* yang menyandi protein *virB11*. Gen *virB11* menyandi protein *virB11* yang berfungsi sebagai ATPase (Smith *et al.*, 2016) dan merupakan faktor virulensi dari berbagai bakteri patogen (Sexton *et al.*, 2004), salah satunya terdapat pada bakteri *B. abortus* (Delrue *et al.*, 2001) yang berperan untuk menghasilkan organel pada tahap replikasi, membantu penyelesaian siklus bakteri dan jalan keluar bakteri menuju ke sel lain (Smith *et al.*, 2016).

Bakteri *B. abortus* asal Pinrang dan NTT merupakan *B. abortus* yang bersifat virulen, sedangkan strain vaksin S19 dan RB51 merupakan *B. abortus* yang avirulen. Gen *virB11* merupakan faktor virulensi yang berperan untuk kelangsungan hidup dan replikasi *B. abortus* dalam sel inang (Trokter *et al.*, 2014) dan tidak menyebabkan kerusakan pada jaringan, sehingga baik pada *B. abortus* yang infeksius maupun pada strain vaksin masih mempunyai gen *virB11*.

Virulen *B. abortus* infeksius seperti isolat asal Pinrang dan NTT dengan S19 dibedakan oleh metabolisme *erythritol* (Sangari *et al.*, 2000). Dalam strain vaksin, gen *ery* dengan panjang 702 bp pada BMEII0427-BMEII0428 telah dihapus (Hiremath *et al.*, 2006), sehingga vaksin tidak dapat bertahan hidup dalam *erythritol*. *Erythritol* adalah polialkohol yang ditemukan dalam uterus hewan bunting, yang memiliki konsentrasi maksimum sekitar 150 hari kebuntingan ketika mencapai tingkat yang stabil sampai mendekati kelahiran (Pacheco *et al.*, 2012). Penghapusan gen *ery* dengan panjang 702 bp pada BMEII0427-BMEII0428 menyebabkan kehilangan 234 asam amino tetapi tidak memengaruhi gen *virB11* yang mempunyai panjang 1089 bp pada BMEII0035 sehingga gen *virB11* masih terdapat pada strain vaksin maupun pada strain virulen seperti *B. abortus* asal NTT dan Pinrang. Pemeriksaan PCR pada gen *ery* berdasarkan AMOS-ERY. Gen *ery* terbagi menjadi empat jenis yaitu *eryA*, *eryB*, *eryC*, dan *eryD* yang masing-masing dapat menyandi protein berbeda (Sangari *et al.*, 2000). Gen *eryC* menyandi *D-erythrose-1-phosphat dehydrogenase* yang digunakan untuk katabolisme *erythritol* sebagai sumber energi *Brucella*. Isolat vaksin *B. abortus* S19 tidak memiliki fragmen gen *eryC* karena gen tersebut merupakan salah satu faktor virulensi (Lo'pez-Goni *et al.*, 2008).

Pada strain vaksin *B. abortus* RB51, Vemulapalli *et al.* (2000) menunjukkan bahwa terjadi mutasi dari gen *wboA* yang disebabkan oleh elemen IS711 dan ada satu mutasi lain dalam RB51 yang bertanggung jawab untuk fenotipe kasarnya yang belum diketahui hingga saat ini. Gen *wboA* mampu menyandikan glikosiltransferase yang telah terbukti penting untuk biosintesis antigen O *Brucella* yang merupakan bagian dari struktur LPS. Mutasi pada gen *wboA* inilah yang membedakan strain vaksin RB51 dengan S19 dan *B. abortus* yang infeksius seperti *B. abortus* asal Pinrang dan NTT. Gen *wboA* mempunyai panjang 2139 bp dan berada pada BMEI0998 (Adone *et al.*, 2011). Mutasi pada BMEI0998 *B. abortus* strain vaksin RB51 tidak memengaruhi basa nukleotida penyusun asam amino pada fraksi gen *virB11* *B. abortus* yang berada pada BMEII0035, sehingga *B. abortus* strain vaksin RB51 dengan S19, isolat asal Pinrang dan NTT sama-sama masih mempunyai gen *virB11*.

SIMPULAN

Berdasarkan analisis mikroskopis dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia tidak terdapat perbedaan antara *B. abortus* isolat lokal dan strain vaksin. Hasil uji PCR menunjukkan bahwa pada *B. abortus* isolat lokal asal NTT dan Pinrang, serta strain vaksin S19 dan RB51 masih memiliki faktor virulensi yaitu gen *virB11* yang menyandi protein *virB11* yang berperan terhadap kelangsungan hidup intraseluler *B. abortus*.

SARAN

Penelitian lanjut dengan metode molekuler yaitu sekuensing DNA untuk mengetahui ada atau tidaknya perubahan susunan nukleotida pada *B. abortus* isolat lokal asal Pinrang, NTT, strain vaksin S19 dan RB51.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Besar Veteriner (BBVet) Maros, Sulawesi Selatan untuk *B. abortus* isolat lokal asal Pinrang dan NTT yang digunakan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adone R, Muscillo M, Rosa GL, Francia M, Tarantino M. 2011. Antigenic, Immunologic and Genetic Characterization of Rough Strains *B. abortus* RB51, *B. melitensis* B115 and *B. melitensis* B18. *PLoS ONE* 6(10): 1-8.
- Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. 2003. *Brucella* Evades Macrophage Killing via VirB - Dependent Sustained Interactions with the Endoplasmic Reticulum. *J Exp Med* 198: 545-556.
- de Jong MF, Sun Y H, den Hartigh AB, van Dijl JM, Tsolis RM. 2008. Identification of VceA and VceC, Two Members of the VjbR Regulon that are Translocated into Macrophages by the *Brucella* Type IV Secretion System. *Mol Microbiol* 70: 1378-1396.
- Delrue RM, Martinez-Lorenzo M, Lestrade P, Danese I, Bielarz V. 2001. Identification of *Brucella* spp. Genes Involved in Intracellular Trafficking. *Cell Microbiol* 3(7): 487-497.
- Direktorat Jendral Peternakan [Ditjennak]. 2006. Program dan Pedoman Teknis Pemberantasan Brucellosis pada Sapi Perah di Pulau Jawa. Jakarta. Direktorat Bina Kesehatan Hewan. Kementerian Pertanian Republik Indonesia.
- Direktorat Jendral Peternakan [Ditjennak]. 2012. Kebijakan Kesehatan Hewan dalam Pengendalian PHM dan Zoonosis Situasi Penyakit Hewan Menular Tahun 2010-2011. Rapat Koordinasi Kesehatan Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner se-wilayah kerja BPPV Subang, 7 Nopember 2012.
- Handijatno D, Narumi HE, Chusniati S, Saruji S, Tyasningsih W. 2016. *Diagnosis secara Mikrobiologis Konvensional*. Surabaya. Departemen Mikrobiologi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Hlm. 34-37.
- Hiremath GS, Sullivan DJ, Tripathi AK, Black RE, Sazawal S. 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. *Clinical Chemistry* 52(4): 779-781.
- Ke Y, Wang Y, Li W, Chen Z. 2015. Type IV Secretion System of *Brucella* spp. and its Effectors. *Front Cell Infect Microbiol* 5: 72.
- 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.
- López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, De Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckaert A, Ferreira AC. 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.
- Myeni S, Child R, Ng TW, Kupko JJ, Wehrly TD, Porcella SF, Knodler LA, Celli J. 2013. *Brucella* Modulates Secretory Trafficking via Multiple type IV Secretion Effector Proteins. *PLoS Pathog* 9: e1003556.

- Olsen SC, Stoffregen WS. 2005. Essential Role of Vaccines in Brucellosis Control and Eradication Programs for Livestock. *PubMed* 4(6): 915–928.
- Pacheco WA, Genovez ME, Pozzi CR, Silva LMP, Azevedo SS, Did CC, Piatti RM, Pinheiro ES, Castro V, Miyashiro S, Gambarini ML. 2012. Excretion of *Brucella abortus* Vaccine B19 Strain during a Reproductive Cycle in Dairy Cows. *Brazilian Journal of Microbiology* 43(2): 594-601.
- Sangari FJ, Agüero J, Garcia-Lobo JM. 2000. the Genes for Erythritol Catabolism are Organized as an Inducible Operon in *Brucella abortus*. *Microbiol* 146: 487-495.
- Sexton JA, Pinkner JS, Roth R, Heuser JE, Hultgren SJ, Vogel JP. 2004. The *Legionella pneumophila* PilT Homologue DotB exhibits ATPase Activity that is Critical for Intracellular Growth. *J Bacteriol* 186: 1658-1666.
- Sieira R, Comerci DJ, Sánchez DO, Ugalde RA. 2000. a Homologue of an Operon Required for DNA Transferin Agrobacterium is Required in *Brucella abortus* for Virulence and Intracellular Multiplication. *J Bacteriol* 182: 4849-4855. doi:10.1128/JB.182.17.4849-4855.
- Smith EP, Miller CN, Child R, Cundiff JA, Celli J. 2016. Postreplication Roles of the *Brucella* VirB Type IV Secretion System Uncovered via Conditional Expression of the VirB11 ATPase. *American Society for Microbiology* 7(6): e01730-16.
- Sulaiman I. 2006. Bovine Brucellosis (Bakteriologi, Isolasi dan Identifikasi). Dalam: *Pedoman Diagnosa Laboratorium Brucellosis Sapi*. Wates, Yogyakarta. BBVet Wates. Hlm. 1-11.
- Trocter M, Felisberto-Rodrigues C, Christie PJ, Waksman G. 2014. Recent Advances in the Structural and Molecular Biology of Type IV Secretion systems. *Curr Opin Struct Biol* 27: 16–23.
- Vemulapalli R, He Y, Buccolo LS, Boyle SM, Sriranganathan N, Schurig GG. 2000. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a Functional wboA Gene Results in O-Antigen Synthesis and Enhanced Vaccine Efficacy but No Change in Rough Phenotype and Attenuation. *Infection and Immunity* 68(7): 3927-3932.