

Deteksi Antibodi *Brucella abortus* pada Sapi Perah di Kecamatan Puspo, Pasuruan Menggunakan *Rose Bengal Test* dan *Complement Fixation Test*

Detection of Antibodies Brucella abortus in dairy cattle in Puspo District, Pasuruan using Rose Bengal Test and Complement Fixation Test

Agung Jati Kusuma^{1*}, Erma Safitri², Ratih Novita Praja³, Wiwiek Tyasningsih³, Maya Nurwartanti Yunita⁴, Prima Ayu Wibawati⁵

¹Mahasiswa, ²Departemen Reproduksi Veteriner, ³Departemen Mikrobiologi Veteriner, ⁴Departemen Patologi Veteriner, ⁵Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Kampus C Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia 60115.

*Corresponding author: kusumaagungjati@gmail.com

Abstrak

Brucellosis adalah penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri genus *Brucella*. Brucellosis pada sapi perah disebabkan oleh *Brucella abortus* yang dapat menyebabkan sapi perah mengalami abortus. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan antibodi *Brucella abortus* pada sapi perah betina dewasa di Kecamatan Puspo, Pasuruan menggunakan *Rose Bengal Test* (RBT) dan *Complement Fixation Test* (CFT). Analisis deskriptif dengan pendekatan kuantitatif digunakan dalam penelitian ini. Selain itu, wawancara dilakukan untuk mendapatkan informasi pendukung dari peternak. Sampel yang digunakan sebanyak 100 ekor. Hasil penelitian menunjukkan 2% sampel dianggap positif brucellosis yang diuji dengan RBT. Untuk menghindari hasil positif palsu, uji RBT diikuti oleh uji CFT. Setelah dilakukan CFT, dalam penelitian ini tidak ada antibodi *Brucella* pada sapi perah betina dewasa di Kecamatan Puspo, Pasuruan.

Kata kunci: *Brucella abortus*, brucellosis, CFT, RBT, Pasuruan

Abstract

Brucellosis was an infectious disease caused by the genus brucella. Brucellosis in dairy cattle was caused by Brucella abortus that impaction an abortion. The aim of this study was to determine the presence of antibodies of the Brucella abortus in adult female dairy cattle in the Puspo district Pasuruan using Rose Bengal Test (RBT) and Complement Fixation Test (CFT). A descriptive analysis method with quantitative approach was used in this study. Meanwhile, interviews were conducted to get supporting information from the farmer. Used 100 samples. The results of the study showed 2% samples considered positive brucellosis tested by RBT. To confidence false-positive result, RBT test was followed by CFT. After tested by CFT, in this study there were no brucella antibodies in adult female dairy cattle in Puspo district, Pasuruan.

Keywords: *Brucella abortus*, brucellosis, CFT, RBT, Pasuruan

Received: 21 Mei 2020

Revised: 6 Agustus 2020

Accepted: 14 September 2020

PENDAHULUAN

Brucellosis merupakan penyakit infeksius disebabkan oleh bakteri genus *Brucella* yang merupakan mikroorganisme intraseluler dan bersifat zoonosis (Aulanni'am *et al.*, 2017; Tyasningsih dan Rantam, 2018). Brucellosis dapat menginfeksi manusia disebut penyakit, *Mediterranean fever*, *Malta fever*, *Gilbaltar fever* sesuai tempat penyakit tersebut ditemukan

pertama kali (Megid *et al.*, 2010). Brucellosis dikenal juga dengan nama *undulant fever* karena dapat menimbulkan gejala demam dengan suhu yang bervariasi dan berulang pada orang yang terinfeksi (Praja *et al.*, 2017). Brucellosis menyerang hewan ternak seperti sapi, kambing dan babi yang dapat menular ke manusia (Agasthya *et al.*, 2007). Berdasarkan variasi antigen dan hospes utamanya, *Brucella* dapat dikelompokkan ke dalam beberapa spesies yaitu:



Brucella abortus pada sapi, *B. melitensis* pada domba dan kambing, *B. suis* pada babi, *B. ovis* pada domba, *B. canis* pada anjing, *B. neotomae* pada rodensia dan *B. maris* pada mamalia laut (OIE, 2009).

Brucellosis pada sapi mengakibatkan kerugian ekonomi karena dapat menyebabkan sapi mengalami abortus, pedet lahir mati atau lemah, infertilitas dan penurunan produksi susu. Pengendalian brucellosis di daerah endemis dapat dilakukan melalui vaksinasi untuk meminimalisir kerugian tersebut (Avila-Calderón *et al.*, 2013). Abortus akibat brucellosis umumnya terjadi selama trisemester akhir 6-9 bulan kebuntingan (Parthiban *et al.*, 2015).

Pemerintah Indonesia melalui Keputusan Menteri Pertanian nomor 4026/Kpts./OT.140/3/2013 menyatakan brucellosis termasuk Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS) (Kepmentan, 2013). Penyakit brucellosis merupakan penyakit yang masih menjadi kendala dalam usaha pengembangan sektor peternakan di Indonesia. Tahun 2005 program pengendalian brucellosis telah dilakukan. Program pengendalian brucellosis diprioritaskan untuk sapi perah di Pulau Jawa melalui program vaksinasi pada daerah tertular dengan prevalensi lebih dari 2% dan sapi potong bersyarat untuk daerah dengan prevalensi kurang dari 2%. Penggunaan vaksin *B. abortus* RB51 untuk pengendalian brucellosis pada sapi perah menjadi fokus pemerintah saat ini. Data epidemiologi brucellosis masih belum menunjukkan gambaran prevalensi yang jelas dimasing-masing daerah, sehingga sulit untuk menentukan langkah yang diambil untuk pencegahan dan pengendalian brucellosis (Kurniawati *et al.*, 2010).

Provinsi Jawa Timur pada tahun 2018 memiliki populasi sapi perah terbanyak di Indonesia dengan total populasi 283.311 ekor (DitjenPKH, 2018). Berdasarkan data yang diperoleh dari Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates tahun (2018) kejadian brucellosis di Jawa Timur menempati posisi tertinggi dengan jumlah populasi sapi perah yang terinfeksi brucellosis sebanyak 231 ekor. Daerah di Jawa Timur yang memiliki populasi sapi perah terbesar adalah

Kabupaten Pasuruan. Data dari dinas peternakan dan ketahanan pangan Kabupaten Pasuruan tahun 2018 pasuruan memiliki populasi sapi perah betina dewasa sebanyak 42.206 ekor. Kecamatan Puspo memiliki jumlah populasi terbesar kelima di Kabupaten Pasuruan dengan populasi sekitar 3.992 ekor sapi perah betina dewasa setelah Kecamatan Tukur, Lekok, Lumbang dan Purwodadi. Jumlah populasi sapi perah yang banyak, mengharuskan pengontrolan dan pengawasan penyebaran penyakit brucellosis diperhatikan (Dinas Peternakan dan Ketahanan Pangan Kab. Pasuruan, 2018).

Kurangnya pengawasan terhadap ternak sapi perah dapat mengakibatkan penyebaran penyakit brucellosis tidak dapat diketahui secara pasti dan dapat mengakibatkan kejadian brucellosis. Jumlah populasi sapi perah yang banyak dan terus mengalami peningkatan disetiap tahunnya, membuat pengawasan dan pemberian vaksin yang dilakukan menjadi kurang optimal. Minimnya pengetahuan dan kurangnya kesadaran masyarakat dalam melaporkan kasus brucellosis menyebabkan penanganan kasus brucellosis tidak cepat teratasi. Berdasarkan kondisi tersebut perlu dilakukan penelitian untuk mendeteksi adanya antibodi bakteri *B. abortus* pada ternak sapi perah di Kecamatan Puspo, Pasuruan dengan uji serologis menggunakan metode *Rose Bengal Test* (RBT) sebagai uji *screening* dan metode *Complement Fixation Test* (CFT) sebagai uji konfirmasi.

METODE PENELITIAN

Sampel

Rancangan penelitian ini menggunakan metode diskriptif dengan pendekatan kuantitatif. Penelitian yang memberikan gambaran secara sistematis dan faktual mengenai ada dan tidaknya antibodi *Brucella* yang ditemukan pada sapi perah betina dewasa (Dwi *et al.*, 2016). Keberadaan antibodi *Brucella abortus* diuji menggunakan metode uji serologis RBT Dan dikonfirmasi dengan pengujian serologis CFT (Adone *et al.*, 2016).

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan serum berasal dari sapi perah betina dewasa dengan jumlah 100 ekor yang diambil di Kecamatan Puspo Kabupaten Pasuruan. Besar sampel yang digunakan ditentukan dengan menggunakan rumus dari Slovin (Sujarweni dan Endrayanto, 2012). Pengujian RBT dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi PSDKU UNAIR di Banyuwangi, sedangkan pengujian CFT dilakukan di Balai Besar Veteriner Denpasar Bali. Sampel untuk deteksi brucellosis pada sapi perah betina dewasa peternakan Kecamatan Puspo Kabupaten Pasuruan adalah serum yang diambil dari vena *coccygeale* (Ekawati, 2018). Menurut Anggraini *et al.*, (2016) umur sapi betina dikatakan dewasa lebih dari 18 bulan.

Uji Rose Bengal Test (RBT)

Alat dan Bahan yang digunakan pada uji RBT yaitu, antigen RBT strain 1119 PUSVETMA (Surabaya), serum kontrol positif dan negatif Brucella yang didapat dari PUSVETMA (Surabaya), sampel serum darah sapi perah dari peternakan di Kecamatan Puspo, Kabupaten Pasuruan, tabung Vakutainer non EDTA (*Vaculab*[®], PT. Jayamas Medica Industri, Sidoarjo, Indonesia), kertas label, Venoject 21G (*DB Vacutainer*[®], Becton, Dickinson and Company, USA), mikrotube, micropipet (*acura*[®], Socorex Isba S.A. Switzerland), *object glass*, kapas, alkohol 70% (*OneMed*[®], PT. Jayamas Medica Industri, Sidoarjo, Indonesia), *ice gel* (*GabaG*[®], PT. GabaG Indonesia, Tangerang, Indonesia), *Rese Bengal plate test* dan *cool box*.

Teknik RBT dilakukan dengan mereaksikan antara serum dan antigen RBT. 25 µl sampel serum diletakkan pada RBT *plate test* dan ditambahkan 25 µl antigen RBT. antigen dan serum dicampur secara menyeluruh dan tunggu selama 4 menit. Hasilnya diamati segera setelah 4 menit. Hasil positif terjadi apabila ditandai dengan adanya gumpalan seperti pasir. Sebaliknya apabila hasil negatif, maka tidak ditemukan adanya gumpalan (Albert *et al.*, 2018).

Uji Complement Fixation Test (CFT)

Alat dan Bahan yang digunakan pada uji CFT yaitu, inkubator, *waterbath* (PT. Eldape Kalibrasi Instrumenindo, Jakarta, Indonesia), *microshaker* (Stuart[®], Beacon Road, United Kingdom), erlenmeyer, *microtiter* (Microtiter[®], Cooke Engineering Company, Alexandria, Virginia) *plate microtiter* bentuk U 96 lubang, *Multichanel micropipet* (Titertek[®], Flow Laboratories, Irvine, Scotland), *single chanel micropipet* (Transferpette[®], BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany), Sentrifuse (Hareus Labofuge 200 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Germany), *freezer*, tabung, tip, plester, larutan ALSEVER'S, CFT *buffer* (Complement Fixation Test Diluent Tablets, OXOID, Basingstoke, Hampshire, England), serum sampel, serum kontrol positif dan negatif brucella (BBVet Maros, *IBBAS*), antigen brucella CFT (Brucellosis Antigen for CFT, ID.Vet, Grabels, France), komplemen (Guinea Pig Complement, ID.Vet, Grabels, France), Hemolisin (virion/sirion, würzburg, Germany) dan eritrosit domba 3% .

Uji CFT dapat digunakan sebagai uji konfirmasi yang lebih spesifik dengan melihat reaksi ikatan komplemen, sehingga hasil uji dapat dijadikan diagnosis akhir dari brucellosis (Corbel, 2006). Uji CFT digunakan sebagai uji peneguhan diagnosis pada uji RBT yang positif dengan mengetahui keberadaan antibodi spesifik serum sampel dengan antigen tertentu yang akan diinkubasikan bersama komplemen dan hemolisin sebagai faktor pengaktif. CFT terdiri dari dua tahap: pada tahap pertama, antigen spesifik dan serum uji dicampur dengan komplemen, jika terdapat antibodi spesifik dalam serum uji, komplemen akan berikatan dengan kompleks antigen-antibodi dan tidak dapat bereaksi pada tahap kedua reaksi. Tahap kedua, eritrosit domba dan hemolisin (Hemolitik Sistem) ditambahkan, jika komplemen mengikat pada tahap pertama, tidak ada hemolisis akan terjadi reaksi positif. Sebaliknya, jika tes serum tidak mengandung antibodi spesifik, komplemen akan berikatan dengan sistem hemolitik yang menyebabkan lisis eritrosit domba (reaksi negatif) (Adone *et al.*, 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian dilakukan terhadap sampel yang diperoleh sebanyak 100 sampel serum sapi perah betina dewasa yang berasal dari Kecamatan Puspo Kabupaten Pasuruan didapatkan hasil dua sampel positif dari pengujian RBT. Sampel positif RBT dilanjutkan dengan uji konfirmasi CFT. Hasil dari pengujian CFT dilakukan pada dua sampel tersebut menunjukkan hasil negatif brucellosis lebih jelasnya dapat dilihat pada (Tabel 1).

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa didapatkan hasil dua sampel yang dinilai positif brucellosis menggunakan uji RBT. Sampel positif diperoleh dari serum dengan kode 25 dan 71 yang didapatkan dari Desa Janjangwulung, Kecamatan Puspo. Data latar belakang sapi yang dinilai positif uji RBT dapat dilihat lebih terperinci pada (Tabel 2).

Ternak yang terinfeksi *Brucella abortus* umumnya menghasilkan respon antibodi isotipe IgM. Biasanya muncul 5 hingga 15 hari setelah paparan. Respon antibodi IgM diikuti oleh produksi isotipe IgG1 dan kemudian diikuti oleh IgG2 dan IgA (Diaz *et al.*, 2011; Elfaki *et al.*, 2015). Secara teoritis IgM lebih cocok untuk digunakan sebagai indikator paparan karena respons IgM terbentuk lebih awal, akan tetapi penggunaan indikator IgM dapat menghasilkan reaksi positif palsu dalam tes serologis dengan adanya sejumlah mikroorganisme lain yang dapat bereaksi silang dan antibodi ini juga dapat diperoleh dari proses vaksinasi (Nielsen dan Yu, 2010). Produksi isotipe IgG2 dan IgA yang terjadi biasanya akan menghilang setelah enam bulan, akibatnya pengukuran antibodi ini akan menurunkan sensitivitas uji. Immunoglobulin jenis IgG2 dan IgGA mempunyai sensitivitas lebih rendah pada uji serologik, sehingga deteksi terbaik adalah IgG1 (Poester *et al.*, 2010).

Uji RBT merupakan *rapid test* yang dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi terhadap antigen *B. abortus*. RBT merupakan uji serologis yang mudah dikerjakan, dengan mencampur serum sapi yang diduga terinfeksi dengan antigen *B. abortus*. Uji ini akan

membentuk reaksi antara antigen *B. abortus* terhadap serum sapi yang mengandung antibodi *B. abortus*. Reaksi aglutinasi akan membentuk aglutinat berbentuk butiran pasir yang dapat diamati secara makroskopik (OIE, 2009). Tes ini dianggap sebagai tes *screening* yang cocok untuk brucellosis, diikuti dengan pengujian konfirmasi CFT (OIE, 2018).

Antigen *Brucella* yang digunakan pada pemeriksaan RBT adalah antigen *Brucella* dengan koloni *smooth* yang diwarnai dengan *Rose Bengal*, dengan larutan penyangga yang memiliki kadar akhir pH $3,65 \pm 0,05$ (OIE, 2018). Penggunaan pH rendah uji RBT dapat meminimalisir adanya aglutinasi dengan IgM dan akan meningkatkan aglutinasi oleh IgG (Kaltungo *et al.*, 2014). RBT dapat memberikan reaksi positif palsu akibat vaksinasi dan reaksi silang oleh bakteri Gram negatif lainnya seperti *Yersinia enterocolitica O:9* dan *Escherichia coli O: 157* (Hinic *et al.*, 2009 ; Munoz *et al.*, 2005).

Uji CFT banyak digunakan sebagai tes konfirmasi untuk brucellosis. CFT memiliki spesifisitas yang tinggi karena menggunakan indikator IgG1. Proses pemanasan akan menyebabkan IgM mengalami inaktivasi (Nielsen, 2010). Hasil positif apabila kompleks antigen dan serum terbentuk karena adanya isotipe antibodi IgG1 dalam serum maka komplemen diaktifkan, ketika ditambahkan komplemen Hemolitik sistem maka tidak ada atau hanya sedikit yang lisis. Sebaliknya jika tidak ada kompleks antigen dan serum yang terbentuk, komplemen akan berikatan dengan Hemolitik sistem dan menyebabkan semua eritrosit domba lisis (OIE 2018).

Pengujian ini terdapat dua sampel positif brucellosis menggunakan metode RBT, setelah di konfirmasi menggunakan metode CFT kedua sampel tersebut menunjukkan hasil negatif brucellosis. Hal tersebut dapat terjadi karena kontaminan dari bakteri Gram negatif lain. Kedua sampel tersebut berasal dari sapi yang telah divaksinasi dengan RB51. Saat ini terdapat dua vaksin yang sering digunakan untuk mencegah brucellosis pada sapi yaitu vaksin S19 dan RB51 (Olsen dan Stoffregen, 2005). Vaksin S19 terdapat *smooth lipopolisakarida* yang

Tabel 1. Jumlah sampel dan hasil uji positif RBT dan CFT

Desa	Jumlah Sampel Uji	Hasil Uji	
		Positif RBT	Positif CFT
Janjanguwung	20	2 (2%)	0 (0%)
Jimbaran	15	0 (0%)	0 (0%)
Keduwung	17	0 (0%)	0 (0%)
Kemiri	15	0 (0%)	0 (0%)
Palangsari	13	0 (0%)	0 (0%)
Puspo	8	0 (0%)	0 (0%)
Pusung Malang	12	0 (0%)	0 (0%)
Total	100	2 (2%)	0 (0%)

Tabel 2. Data sapi positif uji RBT

Kode Sampel	Alamat	Asal Sapi	Umur (Tahun)	Vaksin	Riwayat Penyakit
25	Janjanguwung	Pasuruan	3	RB 51	-
71	Janjanguwung	Pasuruan	4	RB 51	-

mengandung rantai O polisakarida pada permukaan sel sehingga vaksin S19 dapat menginduksi respon antibodi pada sisi rantai O, alasan penggunaan vaksin S19 adalah timbulnya respon antibodi yang tinggi sehingga memberikan proteksi pada sapi yang divaksin. Vaksin ini menyebabkan antibodi yang diproduksi dapat menimbulkan positif palsu pada tes serologi terhadap infeksi *B. abortus* (Cardoso *et al.*, 2006). Vaksin RB51 merupakan mutan kasar dari *Brucella abortus* virulen strain 2308 (S2308). Strain RB51 tidak memiliki rantai O. Ternak yang divaksin dengan strain RB51 tidak memproduksi antibodi terhadap rantai O yang terdeteksi pada uji serologi brucellosis. Strain RB51 resisten terhadap rifampisin (Miranda, 2009). Vaksin RB51 dan S19 meskipun telah dilemahkan masih mempunyai potensi untuk menyebabkan abortus pada sapi bunting dan menyebabkan virulen kepada manusia (OIE, 2018).

Bakteri *brucella abortus* merupakan bakteri Gram negatif. Struktur dinding bakteri brucella abortus terdiri dari membran plasma, periplasma, peptidoglikan dan membran luar (Handayani *et al.*, 2018). Membran luar tersusun dari fosfolipid, *smooth lipopolisakarida* (LPS), lipoprotein dan protein. LPS mengandung Lipid A dan O polisakarida (Christie, 2010). Rantai O polisakarida menunjukkan kesamaan dengan

bakteri lain sehingga dapat menyebabkan reaksi positif palsu dalam pelaksanaan uji pada brucellosis (Khan dan Zahoor, 2018). Hal ini dapat terjadi karena rantai O dari lipopolisakarida yang terdapat pada permukaan bakteri *Brucella abortus* mempunyai kemiripan dengan bakteri seperti *Y. enterocolitica O:9* dan *E. coli O: 157* (Hinic *et al.*, 2009 ; Munoz *et al.*, 2005). Hal tersebut dapat mengakibatkan reaksi positif palsu dalam uji brucellosis. Reaksi ini sering di temukan pada uji yang menggunakan IgM yang mengarah pada spesivitas yang rendah (Kaltungo *et al.*, 2014).

Sapi yang positif brucellosis pada peternakan diduga karena sistem pemeliharaan yang kurang baik, salah satunya yaitu kandang hewan sakit dan kandang hewan sehat tidak dipisahkan. Sistem kandang yang menggunakan kandang bersama memiliki potensi terinfeksi brucellosis lebih tinggi karena ternak yang terinfeksi dapat berinteraksi dengan ternak sehat (Petra *et al.*, 2010). Faktor lain yang dapat mempegaruhi pemeriksaan adalah faktor populasi ternak, tipe manajemen pemeliharaan, proses vaksinasi, pemeriksaan kesehatan yang kurang baik dan kurang pengetahuan peternak mengenai kasus brucellosis (Al-Majali *et al.*, 2009). Selain faktor diatas hasil positif juga dapat dipengaruhi karena perkawinan alami (Rompis, 2012). Sapi jantan yang terinfeksi

bakteri *Brucella* dapat menularkan penyakit ini melalui semen yang dikeluarkan pada saat perkawinan alami (Noakes *et al.*, 2009).

KESIMPULAN

Berdasarkan Hasil Penelitian menggunakan metode RBT didapatkan 2 % hasil positif, setelah dilanjutkan dengan uji konfirmasi CFT menunjukkan hasil negatif, sehingga dapat disimpulkan tidak ditemukan antibodi *Brucella abortus* pada sapi perah betina dewasa di Kecamatan Puspo, Pasuruan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada peternak sapi perah serta Dinas Peternakan dan Ketahanan Pangan Kabupaten Pasuruan, Balai Besar Veteriner Denpasar dan Universitas Airlangga PSDKU di Banyuwangi yang telah memberikan kesempatan bagi peneliti untuk melangsungkan penelitian dan memperoleh data.

DAFTAR PUSTAKA

- Adone, R., Sali, M., Francia, M., Latarola, M., Donatiello, A., & Fasanella, A. (2016). Development of a Sterne-Based Complement Fixation Test to Monitor the Humoral Response Induced by Anthrax Vaccines. *Frontiers in microbiology*, 7, 19.
- Agasthya, A. S., Isloor, S., & Prabhudas, K. (2007). Brucellosis in high Risk Group Individual. *Ind. J. Med. Microbiol*, 25(1), 28-31.
- Albert, I. P., Kato, C. D., Ikwap, K., Kakooza, S., Ngolobe, B., Ndoboli, D., & Tumwine, G. (2018). Comparison of Rose Bengal Plate Test, Seru Agglutination Test, and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Brucellosis detection for Human and Goat Samples. *International journal of One Health*, 4(6), 35-39.
- Al-Majali, A. M., Talafha, A. Q., & Ababneh, M. M. (2009). Seroprevalence and Risk Factors for Bovine Brucellosis in Jordan. *Vet Sci*, 10(1), 61-65.
- Anggraini, S., Sulastrri, dan Suharyati, S. (2016). Status Reproduksi dan Estimasi Output Berbagai Bangsa Sapi di Desa Sriwedari, Kecamatan Tegineneng, Kabupaten Pesawaran. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 4(1), 47-54.
- Aulanni'am, A., Tyasningsih, T., Wuragil, D. K., & Rantam, F. A. (2017). Development of Brucellosis Vaccine Based on Determinant Antigenic og Outer Membrane Protein (OMP) 36 KDA From *Brucella abortus* Local Isolate. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(3), 201-204.
- Avila-Calderón, E. D., Lopez-Merino, A., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., & Contreras-Rodriguez, A. (2013). A History of Development of Brucella Vaccines. *BioMed research international*. p.1-8.
- Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates. (2018). Peta Penyakit Hewan 2018. Yogyakarta.
- Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V., & Olivera, S. C. (2006). Brucella spp Noncanonocal LPS : Structure, Biosynthesis, and Interaction with Host Immune System. *Microbial Cell Factories*. BioMed Central. Brazil.
- Christie, W. (2010). lipid A and Bacterial Lipopolysaccharides. *Scottish Corp Research Institute (and Mylnefied Lipid Analysis)*, Invergowrie, dundee (DD25DA), Schotland.
- Corbel, M. J. (2006). Brucellosis in Human and Animal. *World Health Organizaton press*. Geneva.
- Diaz, R., Casanova, A., Ariza, J., & Moriyon, I. (2011). The Rose Bengal Test in Human

- Brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 5(4), e950.
- Dinas Peternakan dan Ketahanan Pangan Kabupaten Pasuruan. (2018). Data Populasi Sapi Perah Kabupaten Pasuruan, Pasuruan
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan (Ditjen PKH). (2018). Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan.
- Dwi, W. K., Tyasningsih, W., Praja, R. N., Hamid, I. S., Sarudji, S., dan Purnama, M. T. E. (2016). Deteksi Antibodi Brucella pada Sapi Perah di Kecamatan Purwoharjo Kabupaten Banyuwangi dengan Metode Rose Bengal Test (RBT). *Jurnal Medik Veteriner*, 1(3), 142-147.
- Ekawati, J. S. (2018). Konsentrasi Hormon Testosteron Pada Sapi Wagyu di Daerah Temanggung Menggunakan Metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gajah Mada. Hal: 19.
- Elfaki M. G., Alaidan, A. A., & Al-Hokail, A. A. (2015). Host Response to Brucella Infection: Riview and Future prespective. *Jurnal of infection in Developing Countries*, 9(7), 697-701.
- Handayani, T., Noor, S. M., & Pasaribu, F. H.. (2018). Efek Radiasi Gamma Terhadap Viabilitas Bakteri *Brucella abortus CH 09 BL*. Prosiding Seminar Nasional APISORA. Hal. 67-70.
- Hinic, V., Brodard, Thomanna, I., Holub, A., Miserez, R., & Abril, C. (2009). IS711-Based Real-Time PCR Assay as A Tool For Detection of *Brucella spp.* In Wild boars and Comparison With Bacterial Isolation and Serology. *BMC Veterinary Research*, 5, 22.
- Kaltungo, B. Y., Saidu, S. N. A., Sacey, A. K. B., & Kazeem, H. M. A. (2014). Review on Diagnostic Techniques for Brucellosis. *African Journal of Biotechnology*, 13, 1-10.
- Kementrian Pertanian [Kepmentan]. (2013). Keputusan Menteri Pertanian Nomor 4026/Kpts./OT.140/3/2013. Penetapan Jenis Penyakit Hewan Menular Strategis. Jakarta (ID): Kementan.
- Khan, M. J., & Zahoor, M. (2018). An Overview Brucellosis in Cattle and Humans, and its Serological and Molecular Diagnosis in Control Strategies. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 3(65), 1-8.
- Kurniawati, U., Trisunuwati, P., dan Wahyuningsih, S. (2010). Pengaruh Vaksinasi Brucellosis Pada Sapi Perah Dengan Berbagai Paritas Terhadap Efisiensi Reproduksi. program pasca sarjana universitas brawijaya malang. *JIPB*, 20(1), 40.
- Megid, J., Mathias L. A., & Robles C. A. (2010). Clinical manifestations of brucellosis in domestic animal and human. *The Open Vet Science*, 4, 119-126.
- Miranda, K. L. (2009). Evaluation of Brucellosis Vaccines in Brazil. [Disertation Doctor]. Universidade Federal de Minas Gerais. Brazil. p. 47
- Munoz, P. M., Marin, C. M., Monreal, D., Gonzzlez, D., Garin-Bastuji, B., Diaz, R., Mainar-Jaime, R. C., Moriyono, I., & Blasco, J. M.. (2005). Efficacy of Several Serological Tests and Antigens for Diagnosis of Bovine Brucellosis in the Presence of False-Positive Serological Results Due to *Yersina enterocolitica* O:9. *Clinic and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12, 141-151.

- Nielsen, K., & Yu, W. L. (2010). Serological Diagnosis of Brucellosis. *Sec. Biol. Med Sci*, p. 65-89.
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., & England, G. C. W. (2009). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics* Ed. W. B Saunders Co. Philadelphia. p. 483 - 486.
- Office International den Epizooties (OIE). (2009). *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals: Bovine Brucellosis*. Paris. 4(3): 564-567.
- Office International den Epizooties (OIE). (2018). *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals: Brucellosis*. p 355-398.
- Olsen, S. C., & Staffregen, W. S. (2005). Essential Role of Vaccines in Brucellosis Control and Eradication Programs for Livestock. *Expert Review of Vaccines*, 4(6), 915-928.
- Parthiban, S., Malmarugan, S., Murugan, M., Johnson, S., Rajeswar, J., & Pothiappan, P. (2015). Review on Emerging and Reemerging Microbial Causes in Bovine Abortion. *Int. J. Nutr. Food Sci*, 4(4), 1- 6.
- Petra, R. M., Asmarani, K., & Setyawan, B. (2010). Faktor Resiko Bovine Brucellosis Pada Tingkat Peternakan Di Kabupaten
- Belu Provinsi Nusa Tenggara Timur. *Dinas Peternakan Kabupaten Belu, Nusa Tenggara Timur. J. Sain Vet*, 28(1).
- Poester, F. P., Nielsen, K., Samartino, L. E., & Yu, W. L. (2010). Diagnosis of Brucellosis. *The Open Veterinary Science Journal*, 4, 46-60.
- Praja, R. N., Handijatno, D., Koesdarto, A., & Yudhana, A. (2017). Karakterisasi Protein VirB4 *Brucella abortus* Isolat Lokal dengan Teknik *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. *Jurnal Veteriner*, 18(3), 416-421.
- Rompis, A. L. T. (2012). Epidemiologi Bovine brucellosis dengan Penekanan pada kejadian di Indonesia. *J. Vet*, 3(4), 155-163.
- Sujarweni, V. W., & Endaryanto, P. (2012). *Statistika untuk penelitian*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Tyasningsih, W., & Rantam, F. A. (2018). Predileksi Epitop OMP 36kDa *Brucella abortus* Terhadap Imun Seluler. Proc. of the 20th FAFA CONGRESS & The 15th KIVNAS PDHI, Bali Nov 1-3,2018. Hal 290-293.
