

RESPON PEMBENTUKAN ANTIBODI PADA TIKUS PUTIH TERHADAP VAKSIN *ompA*-REKOMBINAN *FELINE CHLAMYDIOSIS*

PUDJIATMOKO

Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan
Gunungsindur, Bogor 16340

ABSTRACT

The *ompA*-recombinant protein produced by *E. coli* BL21(DE3)*plysS* containing *pRSETA/ompA* gene of *feline Chlamydia psittaci* B166 strain was purified using method of *Xpress* system protein purification (Invitrogen BV, The Netherlands). To eliminate *guanidine hydrochloride*, the suspension of *ompA*-recombinant protein was dialyzed in 20 mM Tris pH 7.8, glycerol 10% and phenylmethylsulfonyl fluoride containing 0,1 M $MgCl_2$, $CaCl_2$, NaCl or KCl. To prepare the vaccines, the purified proteins were emulsified with oil adjuvant. One ml of each vaccine was injected intramuscularly to 4 spesific pathogen free rats 8-week-old. The second vaccination was performed at 3 weeks post first vaccination. IgG antibody titer against *feline Chlamydia psittaci* was measured using microimmunofluorescence test at a week post second vaccination. Vaccination using *ompA*-recombinant could initiate IgG antibody in 21 of 24 vaccinated rats. IgG antibody titer of rats vaccinated with materials dialyzed in dialysis buffer containing KCl has highest titer ranged from 1:16 to 1:64, and its geometric mean titer is 1:38. The results of the present study indicate that the *ompA*-recombinant protein of *chlamydia* used for main component of vaccine may initiate antibody against *feline C. psittaci* in rats.

Key words: Chlamydia, cat, *ompA*, rat, vaccine

ABSTRAK

Protein *ompA*-rekombinan yang dihasilkan oleh *E. coli* BL21(DE3)*plysS* yang mengandung rekombinan plasmid *pRSETA/gen ompA feline Chlamydia psittaci* galur B166 dimurnikan dengan cara *Xpress system protein purification* (Invitrogen BV, The Netherlands). Untuk menghilangkan *guanidine hydrochloride*, suspensi *ompA*-rekombinan didialisis dengan larutan dapar 20 mM Tris pH 7,8, glycerol 10% dan *phenylmethylsulfonyl fluoride* yang mengandung 0,1 M $MgCl_2$, $CaCl_2$, NaCl atau KCl. Tiap-tiap protein yang telah dimurnikan tersebut diemulsikan dengan adjuvan minyak untuk dijadikan vaksin. Satu ml tiap-tiap vaksin tersebut disuntikan secara intramuskular pada 4 ekor tikus putih *specific pathogen free* (SPF) umur 8 minggu. Vaksinasi kedua dilakukan 3 minggu setelah vaksinasi pertama. Seminggu setelah penyuntikan kedua titer antibodi IgG diukur dengan *microimmunofluorescence test*. Vaksinasi menggunakan protein *ompA*-rekombinan *feline C. psittaci* ini bisa merangsang terbentuk antibodi IgG pada 21 dari 24 tikus yang divaksin. Titer antibodi IgG tikus yang divaksin dengan material yang didialisis dengan larutan dapar yang mengandung KCl mempunyai titer tertinggi berkisar antara 1:6 dan 1:64 dengan *geometric mean titer* 1:38. Dari hasil-hasil penelitian ini menunjukkan bahwa protein *ompA*-rekombinan Chlamydia yang digunakan sebagai komponen utama vaksin bisa merangsang timbulnya antibodi terhadap *C. psittaci* pada tikus putih.

Kata kunci : Chlamydia, kucing, *ompA*, tikus, vaksin

PENDAHULUAN

Feline Chlamydia psittaci adalah bakteri Gram negative yang merupakan parasit *obligate intracellular* yang menyerang kucing (Moulder et al., 1984) yang menyebabkan conjunctivitis, rhinitis dan pneumonia (Hoover et al., 1978, Johnson, 1984, Baker et al., 1942). Organisme tersebut merupakan salah satu kelompok genetik genus *Chlamydia* yang diajukan sebagai spesies baru (Pudjiatmoko et al., 1997) dan kemudian dinamakan *Chlamydophila felis* (Everett et al., 1999).

Dalam menanggulangi penyakit Chlamydiosis pada manusia telah digunakan *chlamydia* utuh sebagai vaksin inaktif yang diberikan secara intramuskuler, tetapi masa

proteksi yang diperoleh singkat dan vaksinasi dengan cara ini bisa menimbulkan sakit yang lebih parah selama masa infeksi berikutnya, hal ini mungkin disebabkan reaksi patogen terhadap antigen Chlamydia tertentu (Grayston dan Wang, 1978; Grasyton dan Wang, 1975).

Pada studi sebelumnya menunjukan bahwa *E. coli* BL21(DE3)*plysS* yang mengandung rekombinan *ompA-pRSETA* bisa memproduksi protein *ompA*-rekombinan 40 kDa yang bisa bereaksi dengan antibodi monoclonal *major outer membrane protein* (MOMP) *C. psittaci* G-1B6 dan protein rekombinan tersebut diusulkan untuk digunakan sebagai salah satu komponen utama vaksin chlamydiosis pada kucing (Pudjiatmoko, 1999a).

Vaksin menggunakan *immunogene ompA-*

rekombinan diharapkan akan lebih cepat, mudah dan ekonomis dalam mempersiapkan *immunogene* dan bisa menghindari efek samping vaksin Chlamydia utuh. Penelitian kali ini bertujuan mempelajari respon imunogenisitas vaksin *ompA*-rekombinan *feline C. psittaci* pada tikus putih.

BAHAN DAN METODE

Ekspresi Protein *ompA*-rekombinan

Prosedur untuk memproduksi protein *ompA*-rekombinan dilakukan seperti pada studi awal pembuatan vaksin feline chlamydiosis sebelumnya (Pudjiatmoko, 1999a), gen *ompA* feline *C. psittaci* galur B166

(Gambar 1) disisipkan pada vektor plasmid pRSETA yang mengandung 6 tandem residu *histidine* (invitrogen BV, The Netherland) (Gambar 2) pada tempat restriksi antara enzim *Bam*HI dan *Xho*I. Plasmid rekombinan pRSETA/gen *ompA feline C. psittaci* ditransformasikan ke dalam *E. coli* BL21(DE3)plysS dengan ciri-ciri genotipe F, *ompT* hsdSB (rB mB) *gal dcm* (DE3) plysS (Cam^R). *E. coli* yang telah memperoleh rekombinan pRSETA-*ompA* tersebut dibiakan pada media *Terrific broth* (TB) yang mengandung 10 µg/ml Carbenicillin dan 34 µg/ml Chloramphenicol. Ekspresi gen *OmpA* diinduksi dengan cara menambahkan 1,0 mM *Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) ke dalam biakan tersebut pada suhu 37° C. Sebelum dilakukan pengecekan protein *ompA*-rekombinan, *E. coli* BL21(DE3)plysS dilisis

1	MKKLLKSALL	FAAAGSALS	QALPVGNP	PSLLIDDTM	EGASGDPCD
51	CATWCD	DAISI	RAGFYGDY	VF	DRILKVDV
101	VAADRSN	FAY	GKHLQDAE	W	TNAAYLALN
151	SDAFNLV	G	GLAGTDFAN	Q	RPNVEISQ
201	ECGCATL	GAE	FQYAQSNPK	I	EMLNVTSS
251	VAAGTAT	ATD	TKSATVKYH	E	WQVGLALS
301	TIRIAQPK	L	SAILNLTTW	N	PTLLGVATT
351	KSRKACG	IAV	GATLIDADK	W	SITGEARL
				ID	ERAAHINAQ
				F	RF

Gambar 1. Rangkaian asam amino *ompA* feline *C. psittaci* galur B166 yang digunakan sebagai imunogen

```

RBS                                Polyhistidine region
2868  GAAGGAGA TATACAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG
      Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met

NheI T7 gene 10 leader              Anti-Xpress™ Anti-
2817  GCT AGC ATG ACT CGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT
      Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Arg Leu Tyr Asp Asp

body Epitope          BamHII       XhoII
2769  GAC GAT AAG GAT AGA TGG GGA TCC GAG CTC GAG ATC TGC AGC TGG TAC
      Asp Asp Lys Asp Arg Trp Gly Ser Glu Leu Leu Ile Cys Ser Trp Tyr

2721  CAT GGA ATT CGA AGC TTG ATC CGG CTG CTA ACA AAG CCC GAA AGG AAG
      His Gly Ile Arg Ser Leu Ile Arg Leu Leu Thr Lys Pro Glu Arg Lys

pRSET reverse priming site
2673  CTG AGT TGG CTG CTG CCA CCG CTG AGC AAT AAC TAG
      Leu Ser Trp Leu Leu Pro Pro Leu Ser Asn Asn ***
    
```

1) Bagian ini merupakan tempat penyisipan gen *OmpA* felin *C. psittaci*

Gambar 2. Sebagian rangkaian nukleotida dan asam amino plasmid pRSETA yang digunakan sebagai vektor

dengan menggunakan *French pressure cell* yang dioperasikan pada tekanan 16.000 – 18.000 Lb/in² (Hopkins, 1992).

Pembuatan Vaksin

Protein *ompA*-rekombinan dimurnikan dengan *column* yang berisi resin ProBond™ menggunakan *Xpress system protein purification* (Invitrogen BV, The Netherlands). Sel *E. coli* BL21(DE3)plysS yang telah dipanen dilisis dengan 10 ml *guanidium lysis buffer* (6M *guanidine hydrochloride*, 20 mM *sodium phosphate*, 500 mM *sodium chloride*, pH 7,8) selama 10 menit. Untuk menguraikan DNA dan RNA, suspensi sel *E. coli* disonikasi dengan frekuensi tinggi selama 10 detik tiga kali. Supernatan dikumpulkan setelah pemusingan pada 3.000 x g selama 15 menit.

Sepuluh ml supernatan tersebut diaplikasikan pada *column* yang telah dialiri dengan *denaturing binding buffer* (8M *urea*, 20 mM *sodium phosphate*, 500 mM *sodium chloride*, pH 7,8). Protein *ompA*-rekombinan dipisahkan dengan *denaturing elution buffer* (8M *urea*, 20 mM *sodium phosphate*, 500 mM *sodium chloride*, pH 4,0) setelah dilakukan pencucian terlebih dahulu dengan *denaturing washing buffer* (8M *urea*, 20 mM *sodium phosphate*, 500 mM *sodium chloride*, pH 6,0 dan pH 5,3).

Protein *ompA*-rekombinan ini dibagi menjadi 4 bagian dengan volume yang sama, masing-masing bagian dimasukkan ke dalam *seamless cellulose tube* (Viskase sales corp., Japan) dan didialisis menggunakan larutan dapar 20 mM Tris pH 7,8, glycerol 10% dan *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMFS) dimana setiap larutan dapar tersebut mengandung 0,1 M MgCl₂, CaCl₂, NaCl atau KCl. Setelah dialisis, material dipusing 10.000 x g selama 10 menit. Pelet dan supernatan dipisahkan dan disuspensikan dengan larutan dapar yang sama sehingga mengandung protein 1 µg/ml.

Untuk kontrol positif digunakan Feline *C. psittaci* galur Fe/145. Chlamydia dibiakan pada sel SL pada suhu 37°C selama 4 hari, setelah dipanen Chlamydia diencerkan dengan *sucrose-phosphate-glutamic acid* (SPG) sehingga diperoleh suspensi chlamydia 10^{7,0} ELD₅₀ per ml. Chlamydia diinaktifkan dengan formalin sehingga konsentrasi akhir 0.1% selama 3 hari pada suhu 37°C.

Chlamydia yang telah diinaktifkan atau suspensi protein *OmpA*-rekombinan yang telah dimurnikan tersebut diemulsikan dengan adjuvan minyak yang terdiri dari minyak mineral (parafin cair) dan emulgator *sorbitan mono-oleat*. Vaksin disimpan pada suhu 4°C sampai dengan saatnya digunakan.

Vaksinasi pada Tikus Putih

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini tikus putih bebas patogen tertentu (*specific pathogen*

free, SPF) umur 8 minggu diperoleh dari Kyoto Biken Laboratories, Jepang. Tigapuluh dua ekor tikus dibagi menjadi 8 kelompok (Kelompok A, B, C, D, E, F, G, dan H) sehingga tiap kelompok terdiri dari 4 ekor. Setiap ekor tikus disuntik secara intramuskuler dengan 1,0 ml vaksin yang mengandung *immunogen* seperti tertulis pada Tabel 1. Penyuntikan diulang pada tiga minggu setelah penyuntikan pertama. Tikus dari kelompok A divaksin dengan vaksin yang mengandung protein *ompA*-rekombinan dari supernatan yang didialisis dengan larutan dapar yang mengandung 0,1 M MgCl₂ (supernatan MgCl₂), kelompok B divaksin dengan vaksin yang mengandung protein *ompA*-rekombinan dari supernatan yang didialisis dengan larutan dapar yang mengandung 0,1 M NaCl (supernatan-NaCl), kelompok C divaksin dengan vaksin yang mengandung protein *ompA*-rekombinan dari supernatan yang didialisis dengan larutan dapar yang mengandung 0,1 M KCl (supernatan-KCl), kelompok D divaksin dengan vaksin yang mengandung protein *ompA*-rekombinan dari pelet yang didialisis dengan larutan dapar yang mengandung 0,1 M MgCl₂ (Pelet-MgCl₂), kelompok E divaksin dengan vaksin yang mengandung protein *ompA*-rekombinan dari pelet yang didialisis dengan larutan dapar yang mengandung 0,1 M NaCl (Pelet-NaCl), kelompok F divaksin dengan vaksin yang mengandung protein *ompA*-rekombinan dari pelet yang didialisis dengan larutan dapar yang mengandung 0,1 M KCl (pelet-KCl), dan Kelompok G divaksin dengan feline Chlamydia galur Fe/145 sebagai kontrol positif. Sedangkan kelompok H disuntik secara intramuskuler dengan campuran *E. coli* BL21(DE3)plysS tanpa *ompA*-rekombinan dan adjuvan sebagai kontrol negatif.

Tabel 1. Pembagian kelompok tikus berdasarkan bahan vaksin yang disuntikan secara intramuskuler

Supernatan ¹⁾			Pelet ²⁾			Kontrol Positif ³⁾ Negatif ⁴⁾	
MgCl ₂	NaCl	KCl	MgCl ₂	NaCl	KCl	Chlamydia	E.coli
A	B	C	D	E	F	G	H

¹⁾ Kelompok A, D dan C divaksin dengan protein *ompA*-rekombinan dari supernatan yang telah didialisis dengan larutan dialisis yang masing-masing mengandung 0,1 M MgCl₂, NaCl, dan KCl.

²⁾ Kelompok D, E dan F divaksin dengan protein *ompA*-rekombinan dari pelet yang telah didialisis dengan larutan dialisis yang masing-masing mengandung 0,1 M MgCl₂, NaCl, dan KCl.

³⁾ Kelompok G divaksin dengan Chlamydia sebagai kontrol positif.

⁴⁾ Kelompok H divaksin dengan *E. coli* BL21(DE3)plysS tanpa *ompA*-rekombinan sebagai kontrol negatif.

Microimmunofluorescence Test

Sampel serum tikus putih dikumpulkan pada saat sebelum vaksinasi dan seminggu setelah vaksinasi kedua (booster). *Microimmunofluorescence test* dilakukan

mengikuti prosedur penelitian sebelumnya (Pudjiatmoko et al., 1996). Ringkasnya, 1 µl antigen (*feline C. psittaci* galur Fe/145 dan Cello) diulaskan pada 12-well teflon-coated slide (Cell-line Associated Inc., Newfield, N.J., US) dan dikeringkan dalam suhu kamar dan difiksasi dengan methanol dingin selama 10 menit, dan 10 µl serum yang telah diencerkan (pengenceran secara seri kelipatan dua, dimulai dari 1:4) ditetaskan pada setiap lubang dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah inkubasi slide dicuci tiga kali dengan PBS(-) selama 5 menit. Kemudian direaksikan dengan 10 µl *fluorescence-isothiocyanate-conjugated goat anti-rat IgG* (Cappel, conchaville, Pa., USA) yang telah diencerkan 20 kali dengan PBS(-) pada suhu 37°C selama 60 menit, dilanjutkan dengan pencucian tiga kali menggunakan PBS(-) selama 5 menit. Titer antibodi ditunjukkan dari pengenceran serum tertinggi yang memperlihatkan perpendaran Chlamydia berwarna hijau. Kontrol positif diperoleh dari *hyperimmune serum* tikus putih yang disuntik dengan galur Fe/145. Serum tikus putih SPF yang tidak mengandung antibodi Chlamydia pada *complement fixation test* dan *ELISA* digunakan sebagai kontrol negatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada proses ekspresi protein *ompA*-rekombinan, kondisi optimum yang diperoleh adalah sebagai berikut: setelah pembiakan awal dalam 3 ml TB pada suhu 37°C selama 6 jam, *E. coli* yang mengandung plasmid pRSETA-gen *ompA* dibiakan kembali pada suhu yang sama dalam 50 ml TB selama 100 menit sehingga densitas-optiknya pada pembacaan OD₆₀₀ mencapai 0,4 saat yang paling tepat untuk dimulainya induksi dengan 1 mM IPTG. Protein *ompA*-rekombinan terbanyak diperoleh setelah diinduksi pada suhu 37°C selama 180 menit.

Pada pemurnian bahan *immunogen*, protein *ompA*-rekombinan berikatan dengan resin ProBond™ dalam 20 mM larutan dapar fosfat, 500 mM NaCl pH 7,8, sedangkan sebagian besar protein sel induk semang (*E. coli*) tidak berikatan dengan resin ProBond™. Sebagian kecil protein sel induk semang yang bisa berikatan dengan resin pada pH tersebut bisa dilepaskan dari resin ProBond™ dengan mudah menggunakan larutan dapar pH 6,0. Protein *ompA*-rekombinan dilepaskan dari resin ProBond™ dengan pencucian menggunakan larutan dapar pH 4,0.

Karena protein *ompA*-rekombinan yang dihasilkan *insoluble* (terdapat pada pelet setelah pelisisan sel) maka pemurnian protein dilakukan dalam kondisi *denature* dimana pada proses pelisisan sel digunakan *guanidine hydrochloride*. Untuk *protein refolding* dan mengembalikan kemampuan aktifitas protein tersebut, perlu dilakukan penyingkiran *guanidine hydrochloride* dalam

suspensi *ompA*-rekombinan. Cara untuk menyingkirkan *guanidine hydrochloride* dilakukan dengan cara mendialisis suspensi *ompA*-rekombinan pada larutan dapar yang mengandung MgCl₂, NaCl, KCl atau CaCl₂.

Dialisis dengan larutan dapar yang mengandung CaCl₂ menyebabkan timbulnya banyak agregasi protein *ompA*-rekombinan sehingga protein yang dihasilkannya tidak baik untuk *immunogen* sehingga tidak digunakan sebagai vaksin. Dialisis menggunakan larutan dapar yang mengandung MgCl₂ dan NaCl menimbulkan sedikit agregasi protein *ompA*-rekombinan. Sedangkan *ompA*-rekombinan sedikit sekali mengalami agregasi ketika didialisis menggunakan larutan dapar yang mengandung KCl. Hasil ini sesuai dengan hasil analisis *immunoblotting*, *band* protein *ompA*-rekombinan yang didialisis dengan larutan dapar yang mengandung KCl terlihat lebih jelas dibanding dengan *ompA*-rekombinan yang didialisis dengan larutan dapar yang mengandung MgCl₂ dan NaCl. Hasil-hasil ini menunjukkan bahwa larutan dapar yang mengandung KCl bisa dengan baik menyingkirkan *guanidine hydrochloride* dalam proses *protein refolding* sehingga protein *ompA*-rekombinan tidak rusak, bisa bereaksi dengan monoclonal antibody G-1B6 yang khas terhadap *outer membrane protein C. psittaci* dan bisa digunakan sebagai *immunogen*. Dialisis dengan larutan dapar 20 mM Tris pH 7,8 10% glycerol, 1 mM PMFS yang mengandung KCl bisa dipergunakan dalam pemurnian *ompA*-rekombinan.

Untuk mengetahui immunogenisitas *ompA*-rekombinan, titer antibodi IgG serum tikus yang divaksin diukur dengan menggunakan *microimmunofluorescence test*. Sebelum dilakukan vaksinasi yang pertama semua tikus tidak mempunyai antibodi terhadap *C. psittaci*. Pada seminggu setelah vaksinasi kedua, tikus kelompok kontrol negatif tidak seekorpun yang mempunyai titer antibodi terhadap *C. psittaci*, sedangkan tikus dari kelompok C mempunyai *geometric mean titer* (GMT) tertinggi yaitu 1:38, titer bervariasi antara 1:16 dan 1:64 (Tabel 2). GMT yang kedua, tikus dari kelompok F yaitu 1:23 dengan kisaran titer antara 1:16 dan 1:32, diikuti kelompok D dengan GMT 1:13, dengan kisaran titer 1:8 dan 1:16, kemudian kelompok E dengan GMT 1:10 dengan kisaran titer 1:8 dan 1:16. Sedangkan kelompok A dan B mempunyai GMT masing-masing 1:4 dan 1:8. Titer antibodi kelompok kontrol positif yang divaksin dengan vaksin yang mengandung Chlamydia utuh berkisar antara 1:32 dan 1:64 dengan GMT 1:45. Keberagaman titer kelompok satu dengan kelompok yang lain ini menunjukkan bahwa larutan dapar yang digunakan untuk dialisis mempengaruhi kualitas *immunogen* yang dihasilkan.

Seminggu setelah vaksinasi kedua, 21 ekor dari 24 ekor yang divaksin dengan vaksin *ompA*-rekombinan mempunyai titer antibodi IgG terhadap *feline C. psittaci*.

Tabel 2. Titer antibodi IgG tikus terhadap *C. psittaci* seminggu setelah vaksinasi kedua.

Grup vaksin		Titer antibodi IgG			
		No. kucing dalam kelompok			
		1	2	3	4
A	Supernatan-MgCl ₂ ¹⁾	8	8	<4	<4
B	Supernatan-NaCl	8	8	16	<4
C	Supernatan-KCl	16	64	32	16
D	Pellet-MgCl ₂ ²⁾	8	8	32	16
E	Pellet-NaCl	8	16	8	8
F	Pellet-KCl	32	16	32	16
G	Chlamydia utuh	32	64	32	64
H	<i>E. coli</i>	<4	<4	<4	<4

1) Kelompok A divaksin dengan *immunogen ompA*-rekombinan yang berasal dari supernatan hasil dialisis dengan MgCl₂.

2) Kelompok D divaksin dengan *immunogen ompA*-rekombinan yang berasal dari pelet hasil dialisis dengan MgCl₂.

Titer antibodi tersebut berkisar antara 1:8 sampai dengan 1:64. Baik material yang berasal dari pelet maupun dari supernatan bisa merangsang timbulnya antibodi IgG pada tikus. Tikus kelompok C yang divaksin dengan konsentrasi *ompA*-rekombinan tertinggi menunjukkan titer antibodi IgG yang tertinggi kemudian diikuti oleh tikus yang berasal dari kelompok F. Kedua kelompok C dan F tersebut merupakan kelompok yang divaksin dengan *ompA*-rekombinan yang didialisis dalam larutan dapar yang mengandung 0,1 M KCl. Tikus kelompok C divaksin dengan *ompA*-rekombinan yang berasal dari supernatan, sedangkan tikus dari kelompok F divaksin dengan *ompA*-rekombinan yang berasal dari pelet. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa vaksin *ompA*-rekombinan bisa menginduksi antibodi IgG terhadap *feline C. psittaci*.

Vaksin yang dibuat dari *immunogen ompA*-rekombinan yang didialisis dengan MgCl₂ dan NaCl menimbulkan antibodi dengan GMT kurang dari 1:14. Sedangkan vaksin yang diperoleh dari protein yang didialisis dengan menggunakan KCl memperlihatkan kemampuan untuk menimbulkan terbentuknya IgG pada tikus cukup tinggi. *Immunogen ompA*-rekombinan yang berasal dari supernatan lebih banyak dari pada yang berasal dari pelet. Hal ini memperlihatkan bahwa protein *ompA*-rekombinan larut dalam *denaturing elution buffer*. Dari hasil-hasil ini menunjukkan larutan dapar dialisis yang mengandung KCl bisa digunakan dalam dialisis sehingga *ompA*-rekombinan bisa digunakan sebagai *immunogen*.

Pada studi kali ini vaksin yang mengandung Chlamydia 10^{7.0}ELD₅₀ yang bisa merangsang terbentuk antibodi IgG cukup tinggi pada kelompok G. Hasil ini sesuai dengan hasil studi terdahulu tentang respon dosis vaksin inaktif yang menyatakan bahwa untuk memperoleh kekebalan yang cukup terhadap infeksi Chlamydia pada kucing, sebaiknya vaksin inaktif yang diberikan

mengandung Chlamydia lebih besar 10^{5.5}ELD₅₀ (Pudjiatmoko, 1999b). Titer antibodi yang diperoleh cukup tinggi pada kelompok C menunjukkan bahwa *immunogen ompA*-rekombinan bisa digunakan sebagai komponen utama vaksin Chlamydia pada kucing. Untuk mengetahui potensi vaksin tersebut perlu dilakukan uji potensi menggunakan hewan percobaan kucing yang ditantang dengan Chlamydia hidup untuk mengetahui kekebalan yang ditimbulkan oleh vaksin *ompA*-rekombinan tersebut.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa: (1) protein *ompA*-rekombinan Chlamydia yang digunakan sebagai komponen utama vaksin bisa merangsang timbulnya antibodi pada tikus putih. (2) Protein *ompA*-rekombinan feline Chlamydia dapat dimurnikan dengan *Xpress system protein purification* (Invitrogen BV, The Netherlands) menggunakan kolom resin ProBond™. (3) Larutan dapar 20 mM Tris pH 7,8 10% glycerol, 1 mM PMFS yang mengandung KCl bisa digunakan untuk dialisis *ompA*-rekombinan dalam mengeliminasi *guanidine hydrochloride*, dan (4) untuk menguji potensi vaksin *ompA*-rekombinasi Chlamydia perlu dilakukan studi respon immunogenisitas *ompA*-rekombinan Chlamydia pada kucing dengan menggunakan tantangan Chlamydia hidup.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis sampaikan terimakasih kepada Masubuchi Katsuo dan Iwamoto Kayo atas bantuan teknis yang diberikan dalam penelitian ini. Penelitian ini dibiayai oleh Society of Techno-innovation for Agriculture, Forestry and Fisheries (STAFF) Jepang.

DAFTAR PUSATAKA

- Baker, J.A.A. 1942. A virus obtained from pneumonia of cats and its possible relation to the cause of atypical pneumonia in man. *Science* 96: 475-476.
- Cello, R.M. 1967. Ocular infections in animal with PLT (Bedsonia) group agents. *Am. J. Ophthalmol.* 64: 1270-1273.
- Everett, K.D.E., R.M. Bush, A.A. Andersen. 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and

- Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 415-440.
- Hoover, E.A., D.E. Kahn, and J.M. Langloss.** 1978. Experimentally induced feline chlamydia infection. *Am. J. Vet. Res.* 39: 541-547.
- Hopkins, T.R.** 1991. Physical and chemical cell discription for the recovery intercellular proteins. *in*: Purification and analysis of recombinant proteins (R. Seetharam and S.K. Sharma, eds.) pp 57-83. Marcell Dekker, New York.
- Johnson, F.W.A.** 1984. Isolation of *Chlamydia psittaci* from nasal and conjuctival exudate of a domestic cats. *Vet. Rec.* 114: 342--344.
- Moulder, J.W., T.P. Hatch, C.-C. Kuo, J. Schachter, and J. Storz.** 1984. Genus I. Chlamydia Jones, Rake and Stearns 1945, 55 AL. *In*: Krieg, N.R. and J.G. Holt (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1, pp. 729-739. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Pudjiatmoko, H. Fukushi, Y. Ochiai, T. Yamaguchi, and K. Hirai.** 1996. Seroepidemiology of feline Chlamydiosis by microimmunofluorescence assay with multiple strains as antigen. *Microbiol. Immunol.* 40:755-759.
- Pudjiatmoko, H. Fukushi, Y. Ochiai, T. Yamaguchi, and K. Hirai.** 1997. Phylogenic analysis of the genus *Chlamydia* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 425-431.
- Pudjiatmoko.** 1999a. Studi awal pembuatan vaksin feline Chlamydiosis menggunakan protein rekombinan *outer membrane protein A (ompA)*. *Inovasi* 8: 46-58.
- Pudjiatmoko.** 1999b. Respon dosis vaksin inaktif Chlamydiosis galur Fe/145 pada kucing. pp. 269-272. *In*: Proceeding of The 8th Scientific meeting of Indonesian Student Association, Osaka, Japan.