ISSN : 1411 - 8327

Pelacakan Perlekatan Bakteri *Escherichia Coli* K99 pada Zona Pelusida Embrio Mencit dengan Metode *Enzym Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dan *Scanning Electron Microscope* (SEM)

(DETECTION OF *ESCHERICHIA COLI* K99 ATTACHMENT ON MOUSE EMBRYOS ZONA PELLUCIDA BY MEANS ENZYM LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPE (SEM)

I WAYAN BATAN[1,2], ARIEF BOEDIONO[3], ITA DJUWITA[3], BIBIANA WIDIATI LAY[3], SUPAR[4]

[1]Sekolah Pascasarjana Program Studi Sains Veterienr
Institut Pertanian Bogor Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor 16680
[2]Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana,
Kampus Bukit Jimbaran Kuta Badung Bali
[3]Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor,
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor 16680
[4]Balai Penelitian Veteriner Jl. Martadinata No 30, Bogor 16114

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian laboratoris tentang perlekatan *E.coli* K99 pada zona pelusida mencit. Sampai kini belum ada informasi mengenai perlekatan antara *E.coli* K99 dengan zona pelusida yang dilacak menggunakan ELISA dan SEM. Uji ELISA dipersiapkan guna melacak perlekatan ini. Untuk itu, zona pelusida mencit dipisahkan, setelah embrio *hatching* dan selanjutnya disonikasi. Zona pelusida yang telah disonikasi dipandang sebagai antigen dan digunakan untuk melapisi sumuran cawan ELISA. Suspensi *E.coli* dalam PBS, baik bakteri yang memiliki K99 mau pun yang tidak, dipersiapkan dari sel-sel bakteri utuh yang berasal dari isolat yang berbeda. Antigen pili K99 dipersiapkan dengan pemanasan suspensi *E.coli* K99 pada suhu 60°C selama satu jam. Pili K99 diperoleh dengan melakukan sentrifyus. Embrio yang memiliki zona pelusida utuh dicemari dengan bakteri *E.coli* K99 sebanyak 10^5 per ml, diinkubasikan selama satu jam pada suhu 37°C. Selanjutnya embrio yang tercemar itu dicuci dengan mPBS dan dipersiapkan untuk pemeriksaan mikroskop electron. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kepadatan optik sample-sampel yang mengandung antigen K99, angkanya lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak (K88 dan F41). Dalam penelitian ini ditemukan adanya perlekatan antara antigen K99 dengan zona pelusida pada sumuran yang dilapisi dengan zona pelusida, dan tidak dengan K88 dan F41. Hal ini berarti bahwa terjadi perlekatan antara antigen K99 dengan zona pelusida. Dengan SEM, bakteri *E.coli* K99 terlacak melekat pada permukaan embrio. Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini bahwa terjadi perlekatan yang spesifik antara *E.coli* K99 dengan zona pelusida, yang ditunjukkan antara pili K99 dengan ekstrak zona pelusida.

Kata-kata kunci : ELISA, SEM, zona pelusida, *E.coli* K99.

J Vet 2006 7 (1) : 29 - 38

ABSTRACT

A laboratory study on the attachment of *Escherichia coli* K99 on the zona pellucida of mouse embryos was carried out by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and scanning electron microscopy (SEM). The zona pelucida of mouse embryo was separated from embryo by embryo hatching and sonification. The separated zona pellucida was then used antigen for ELISA. Suspension of several different *Escherichia coli* isolates with or without K99 antigen was prepared in PBS. K99 villous antigen was prepared by heating of the bacterial suspension at 60°C for 1 hour, and followed by centrifugation. Embryos with an intact zana pelucida were inoculated with E. coli at the dose of 10^5 cells per ml and incubated for 1 hour at 37°C. After 3 times washes with PBS, the embryos were examined by scanning electron microscope. The result showed that the ELISA readings (optical density) of samples with K99 antigen was significantly higher than those without K99 antigen (K88 and F41). The attachment of *E. Coli* to the plate coated with zona pellcida was observed only in the well containing K99 antigen, but not in the well containing K88 or F41 antigen. The attachment of K99 bacterial cells was also observed by SEM. This study provide a clear evidence for the specific attachment between E. coli K99 and the zona pellucida of mouse embryo.

Key words: ELISA, SEM, Zona pellucida, *E.coli* K99

J Vet 2006 7 (1) : 29 - 38

PENDAHULUAN

Zona pelusida (ZP) merupakan membran ekstraselular oosit atau embrio (Dudkiewicz *et al.* 1976). ZP membungkus oosit atau embrio mulai dari saat ovulasi, fertilisasi, hingga implantasi dini pada permukaan uterus. ZP melindungi embrio dari kerusakan mekanik sepanjang perjalanannya menuju uterus (Wassarman *et al.* 1999). Di samping itu, ZP berperan melindungi oosit atau embrio terhadap pengaruh bahan biologik berbahaya, seperti infeksi oleh virus dan bakteri. Keberadaan ZP penting, karena menentukan status kesehatan embrio, sebab ZP mencegah serbuan agen-agen penyakit sebelum embrio mengalami *hatching* (Wu *et al.* 2004). Walau pun begitu, sejumlah agen virus dan bakteri telah diketahui mampu melekat pada ZP (Wrathall 1995).

Beberapa jenis virus dan spesies bakteri mampu melekat pada permukaan ZP antara lain : virus *blue tongue*, penyakit mulut dan kuku, *bovine herpervirus-1, dan bovine viral diarrhoea* (Stringfellow & Givens 2000), bakteri *Leptospira spp.* (Shisong & Wrathall 1989; Bielanski & Surujballi 1996), *Escherichia coli* K99, *Streptococcus agalactie, Actinomyces pyogenes* (Otoi *et al.* 1992), mikoplasma (*Mycoplasma bovis, M bovigenitalium*), parasit *Tritrichomonas foetus* (Bielanski *et al.* 2000; Bielanski *et al.* 2004). Pencemaran dengan agen patogenik ini dapat terjadi saat fertilisasi *in vitro* dan transfer embrio. Di samping itu cakupan infeksi dapat meluas, karena embrio beku kini telah menjadi komoditi perdagangan antar bangsa (Otoi *et al.* 1992; Otoi *et al.* 1993). Prosedur yang disyaratkan oleh lembaga *International Embryo Transfer Society* (IETS), dengan cara pencucian ternyata kurang efektif menyingkirkan agen penyakit seperti bakteri *E.coli* K99 dari embrio (Otoi *et al.* 1993).

Bakteri *E.coli* K99, merupakan agen penyebab penyakit kolibasilosis pada anak babi dan anak sapi. Infeksi bakteri ini menimbulkan kerugian pada industri peternakan babi dan sapi di Indonesia karena menimbulkan diare profus da kematian anak sapi (Supar 1998). Penelitian ini bertujuan mengamati perlekatan antara zona pelusida embrio yang berperan sebagai *barrier* dengan bakteri *E.coli* K99 sebagai agen patogenik. Pemeriksaan ELISA dilakukan guna menunjukkan bahwa ikatan antara bakteri *E.coli* K99 dengan zona pelusida bersifat spesifik. Sedangkan pemeriksaan dengan SEM dimaksudkan agar perlekatan *E.coli* K99 ke permukaan zona pelusida dapat diamati secara langsung.

MATERI DAN METODE

Penyiapan bakteri *E.coli* K99 dan serum

Bakteri *E.coli* K99 dan anti serum K99 diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner (Balitvet) Bogor. Bakteri *E.coli* K99 diisolasi dari anak sapi, dibiakkan semalam pada media agar Minca plus vitox (Oxoid, UK) disiapkan pada cawan petri. Setelah inokulasi diinkubasikan pada suhu 37^0C selama satu malam. Pada suhu tersebut antigen K99 lebih banyak diproduksi dibandingkan dengan suhu dibawah 25^0C (Guinee *et al.* 1977). Setelah diinkubasi, sel bakteri pada permukaan agar dibilas dengan NaCl fisiologis, sel itu dicuci tiga kali. Sel dipisahkandengan sentrifugasi 4000 rpm selama 20 menit. Endapan sel dari pencucian terakhir kemudian dibuat suspensi dengan kekeruhan setara dengan tabung standar Mc Farland nomor 10 (Supar 1986).

Anti serum spesifik K99 diperoleh dari laboratorium *E. coli* Balitvet. Immunoglobulin (IGg) atau anti K99 IGg dari serum tersebut diendapkan dengan aminosulfat jenuh dengan perbandingan 1:1 (Supar 2000). Endapan di larutkan dengan NaCl fisiologis dan volumenya disesuaikan dengan volume anti serum semula, kemudian di masukkan ke dalam kantung dialisis, selanjutnya dilakukan dialisis melawan aliran larutan garam NaCl, selama 1 malam di dalam lemari es. Besok harinya dilanjutkan melawan aquadest selama 1 jam. Setelah dialisis suspensi anti K99 IGg dimasukkan ke dalam tabung ependorf secara aliquot dan disimpan dalam lemari es atau pada freezer -20^{0}C (sampai saatnya dipakai untuk ELISA).

Pemanenan embrio

Mencit betina berumur 6-8 minggu yang berasal dari kelompok bebas penyakit dirangsang ovulasinya, diinjeksi dengan *pregnant mare's serum gonadotropine* (PMSG) 5IU secara *intra peritoneum* (IP) pada pukul 13.00-14.00. Setelah 48 jam mencit-mencit itu diinjeksi dengan *human chorionic gonadotropin* (hCG) 5IU Selanjutnya masing-masing mencit betina tersebut dikawinkan dengan satu mencit jantan, seperti yang dianjurkan oleh Tebourbi *et al.* (2002). Keesokan harinya, mencit betina yang menampakkan adanya sumbat vagina (*vagina plug*) dipisahkan dari pejantan. Empat hari kemudian mencit-mencit itu dimatikan dengan cara *dislokasio cervicalis,* embrio dipanen dari mencit-mencit tersebut. Embrio akan ditemukan pada kornua uterus. Kornua uterus dipotong dan dipisahkan dari mencit, kemudian ditempatkan pada cawan petri kecil yang telah diisi dengan medium *modified* PBS (mPBS) (Quinn *et al.* 1982), selanjutnya lumen uterus itu dibilas dengan medium mPBS menggunakan alat suntik 1cc. Sambil diamati di bawah mikroskop, embrio dicuci 2 atau 3 kali dengan mPBS yang mengandung *bovine serum albumin* 2.5% tanpa antibiotik (Otoi *et al.* 1992),

Penyiapan reagen-reagen ELISA
Pembuatan antigen ekstrak zona pelusida untuk ELISA

Ekstrak zona pelusida didapat dari embrio tahap morula atau blastosis. Zona dipisahkan dari sel-sel embrio dengan cara membelah embrio itu menjadi dua bagian di bawah mikroskop *inverted* menggunakan *micromanipulator* (Nikon-Diaphot Japan) atau dengan membiarkan embrio terus berkembang sampai tahap *hatched*. Embrio yang dibelah dua akan membuat bagian zona pelusida akan segera terpisah dengan bagian blastomernya, Jika terjadi perlekatan dapat dipisahkan dengan menggetar-getarkan pisau pembelah. Zona pelusida yang terpisah dari sel embrio disonikasi (Bioruptor Ogawa Seiki Ltd Japan). Konsentrasi ekstrak ZP dalam mPBS diukur dengan spektrofotometer.

Pembuatan coating buffer 0.1M Karbonbikarbonat.

Sebanyak 1,06 gram Na_2CO_3 anhidrous dan 0,84 gram $NaHCO_3$ anhidrous dilarutkan dalam 100 ml akuades, kemudian pHnya disesuaikan agar menjadi pH 9,6. Larutan ini langsung dipakai untuk melarutkan antigen ekstak zona pelusida.

Pembuatan *Phosphate buffer saline* (PBS) konsentrasi 10x, pH 7,2 untuk ELISA

Sebanyak 8,5gram NaCl, 2 gram KCl, 11,5 gram Na2PO4, dan 2 gram KH2PO4 dilarutkan dalam 1000 ml akuades.

Setelah larut, dimasukkan kedalam botol dan disimpan dalam lemari es. Larutan ini digunakan untuk melakukan pencucian pada saat melakukan ELISA. PBS tersebut di atas diencerkan 10 kali dalam akuades, kemudian ditambahkan Tween-20, sehingga konsentrasi akhirnya PBST ini menjadi 0,05%.

Citrate-phosphate buffer.

Sebanyak 21,01 gram citrate ($C_6H_6O_7.H_2O$) dilarutkan dlam 500 ml akuades, begitu pula 14,2 gram Na_2HPO_4 dilarutkan dlam 500 ml akuades. Larutan posfat dimasukkan kedalam larutan sitrat sedikit demi sedikit, sehingga pH campuran kedua larutan menjadi 4,2. Setelah pH larutan dapat disesuaikan, larutan disaimpan dalam lemari es 4^{0}C (1-2 minggu).

Pembuatan suspensi substra ABTS.

Subtrat ABTS dibuat dengan cara melarutkan (286 mg dalam 10ml air suling) sebanyak 200 μl dimasukkan ke dalam 10 ml *citric buffer posphate* (24 ml 0.1M asam sitrat ditambahkan 26 ml 0.2M Na_2HPO_4 dan kemudian dilarutkan dalam 100 ml air suling), yang memiliki pH 4.2, kemudian ditambahkan 30ml hidrogen peroksida (H_2O_2) 10% (Voller & Bidwell 1986).

Prosedur ELISA

Ekstrak zona pelusida setelah diperiksa dengan spektrofotometer setelah konsentrasi diketahui dipakai untuk melapisi cawan ELISA. Prinsip uji ELISA yang digunakan pada penelitian ini mengikuti prosedur seperti yang ditulis oleh Supar (1986) dengan sedikit modifikasi. Secara singkat sebagai berikut : *Polysterene* mikro-ELISA dilapisi (*coating)* dengan ekstrak zona pelusida. Konsentrasi zona pelusida dibuat 10-15 mg/ml dalam *buffer carbonate bicarbonate* pH 9,6 sebanyak 100ml dimasukan kedalam tiap sumuran cawan ELISA. Cawan ditutup dan dibungkus dengan kertas saring yang telah dibasahi dengan air, kemudian dimasukkan ke dalam kantung plastik dan diinkubasi pada suhu 37^{0}C selama satu sampai dua jam. Selanjutnya disimpan selama semalam pada suhu 4^{0}C.

Setelah inkubasi sumuran-sumuran cawan ELISA dicuci dengan PBST sebanyak tiga kali. Sumur cawan No1 dan 2, 7 dan 8, 9 dan 10 dari baris A diisi dengan bakteri *E.coli* kontrol negatif, sedangkan sumur No 3 dan 4, 5 dan 6, 11 dan 12 kontrol positif. Isi lubang baris A tersebut diencerkan *insitu* secara berseri dengan faktor setengah berturut-turut dalam PBST sampai baris G sedangkan baris H hanya berisi PBST saja. Kemudian diinkubasikan selama 10 menit pada suhu 37^{0}C. Cawan dicuci tiga kali dengan PBST. Lama pencucian 4-5 menit, kemudian ke dalam sumur diisi dengan PBST yang mengandung BSA 0.5% sebanyak 100 ml. Cawan ditutup dan dibungkus, kemudian diinkubasikan pada suhu 37^{0}C selama 60 menit (Supar *et al*. 1993; Supar 2002).

Sumur dicuci lagi dengan PBST sebanyak tiga kali, dan setiap lubang diisi dengan suspensi IgG anti K99 yang dibuat pada kelinci sebanyak 100 ml dengan konsentrasi 10-15 mg/ml dalam PBST. Kemudian diinkubasikan pada suhu 37^{0}C selama 30 menit.

Setelah itu sumuran-sumuran kembali dicuci dengan PBST sebanyak tiga kali. Selanjutnya suspensi konjugat enzim *antirabbit horseradish peroxidase* dalam PBST dengan pengenceran 1:500 diisikan ke dalam sumur itu dengan volume 100ml. Kemudian diinkubasikan pada suhu 37^{0}C selama 60 menit. Setelah diinkubasi, dicuci dengan PBST sebanyak tiga kali. Ke dalam setiap sumur diisi dengan substrat sebanyak 100ml. Subtrat yang ditambahkan adalah ABTS atau *2,2'-azino-bis(3ethylbenzthiazoline-6 sulfonic acid)*. Cawan dibungkus seperti sebelumnya dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 45 menit dan diletakkan pada alat pengocok. Reaksi dibaca dengan alat pembaca ELISA mikro pada panjang gelombang 405 nm, guna memperoleh angka pembacaan optikal densitas reaksi ELISA. Dalam uji ELISA ini intensitas warna yang muncul akibat adanya reaksi yang berkaitan langsung dengan kandungan antigen yang terikat partikel zona pelusida yang di-coating ke dasar sumur (Tizard 2000). Hasil bacaan ELISA selanjutnya disusun dalam tabel untuk memudahkan evaluasi.

Prosedur Pemeriksaan Mikroskop Elektron.

Embrio yang telah dicemari dengan ± 10^5 bakteri *E.coli* K99 per ml, dicuci dua kali selama 30 detik dengan mPBS dengan seksama (Otoi *et al.* 1993). Kemudian embrio ditempelkan pada permukaan gelas objek berukuran 3x3 mm yang sebelumnya telah direndam dalam perekat neophren 2.5%. Selanjutnya embrio difiksasi dalam glutaraldehid 2.5% pada suhu 4°C selama 24 jam. Setelah fiksasi embrio dicuci dengan mPBS selama 5 menit sebanyak tiga kali, kemudian embrio direndam dalam asam tanat 2% selama satu jam pada suhu kamar. Setelah itu dilakukan pencucian kembali hingga jernih. Selanjutnya direndam dalam OsO_4 1% selama satu jam pada suhu kamar, dan terakhir dicuci dengan mPBS sebayak tiga kali.

Preparat tersebut didehidrasi dengan alkohol bertingkat dari konsentrasi 70%, 80%, 90%, 95% dan 100% masing-masing tingkat sebanyak tiga kali selama 30 menit. Dehidrasi berikutnya dilakukan dalam *t*-butanol. Pengeringbekuan menggunakan alat *freezedryer* (VDF-21S *t*-BOH). *Coating* dengan menggunakan platinum paladium dengan alat Giko IB-3 *ion coater*, dilakukan selama 13 menit dengan muatan listrik 9 ampere. Sampel selanjutnya diperiksa pada *scanning electrone microscope* (Jeol, JSM-5310 LV) pada 20 kV (Hyttel *et al.* 1988; Prasetyaningtyas *et al.* 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada pemeriksaan ELISA terlihat bahwa reaksi antara zona pelusida (mencit) dengan bakteri *E.coli* K99 ditemukan adanya pembacaan kepadatan optik yang lebih tinggi, dibandingkan dengan bakteri *E.coli* yang memiliki faktor perlekatan bukan K99 seperti F41, K88, dan -K99 (Tabel 1, Gambar 1). Seperti yang ditunjukan pada hasil pemeriksaan secara ELISA, diperoleh bahwa nilai optikal densitas bakteri yang memiliki pili K99, nilai OD-nya lebih tinggi. Hal ini terlihat pada sample pili K99, TDF1a, dan K99, dengan rataan nilai OD secara berurutan sebagai berikut : 1.16, 1.62, dan 1.63 Nilai OD ini lebih tinggi dibandingkan dengan sample yang tidak memiliki antigen perlekatan K99,seperti pada sample F41, K88, dan – K99, dengannilai OD secara berurutan sebagai berikut : 0.50, 0.55, dan 0,42. Pada satu jenis bakteri *E.coli*, selain memiliki satu jenis antigen perlekatan (pili), mungkin saja bakteri itu memiliki pili K99 atau F41, seperti yang ditemukan pada bakteri E.coli O_{101} dan O_9 (Supar 1996). Adanya kepekatan optik yang lebih tinggi pada *E.coli* K99, dibandingkan dengan bakteri *E.coli* negatif K99, menandakan bahwa bakteri *E.coli* K99 memang mampu berikatan dengan zona pelusida. Dari peneliti sebelumnya dilaporkan bahwa glikolipid yang mengandung asam muramik, galaktosa, dan glukosa merupakan reseptor pili K99 (Dean dan Isaacson 1985) Selain itu Vazquez *et al.* (1996) melaporkan bahwa antigen perlekatan *E.coli* K99 atau F5, perlekatannya melalui suatu pola *mannose resistant hemaglutination*. Akan tetapi perlekatannya bisa juga diperantarai oleh manosa, seperti pada *E.coli* unggas jika bakteri itu dibiakan pada media padat (Dozois *et al.* 1995).

Zona pelusida mengandung tiga jenis glikoprotein, yakni ZP1,ZP2, dan ZP3. Rantai polipeptida dan oligosakarida dari glikoprotein tersebut berbeda satu dengan yang lain (Wassarman 1988). Kandungan glikoprotein zona pelusida tidaklah banyak dan gugus gula yang umum ditemukan padanya adalah ±D-manosa, ±D-glukosa, ß-galaktosa, N-asetil-glukosamin (Skutelsky *et al.* 1994). Gugus gula pada permukaan zona pelusida itu berbeda antar jenis hewan. Pada mencit yang umum ditemukan adalah ±-galaktosil, L-fukosa, D-manosa, dan metil manosida (Wassarman 1988). Gugus gula itu penting dalam pengikatan spermatozoa pada saat fertilisasi (Miller & Ax 1990). Gugus gula zona pelusida merupakan tempat interaksi yang spesifik. Memahami persebaran gugus gula pada permukaan zona pelusida sangatlah penting guna mengetahui adanya ikatan spesifik (Skutelsky *et al.* 1994). Namun, adanya manosa pada permukaan spermatozoa justru membuatnya mudah *diganduli* bakteri *E.coli,* karena bakteri melekat ke gula manosa. Akibatnya spermatozoa tidak leluasa bergerak guna membuahi oosit (Wolff *et al.* 1993).

Dari pemeriksaan secara ELISA, menunjukkan adanya ikatan antara zona

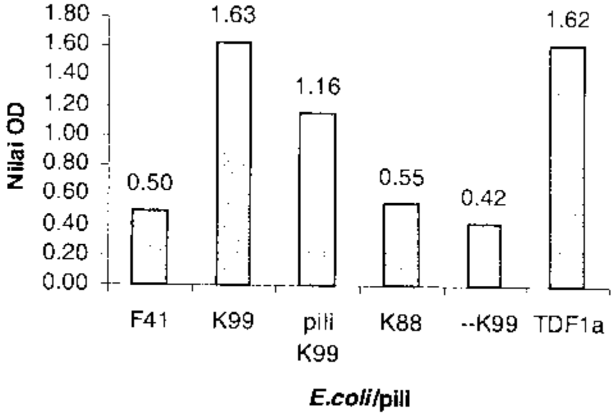
Tabel 1 Kepadatan optic (OD) reaksi ELISA dengan antigen zona pelusida mencit sebagai penangkap antigen pili K99

Baris	Pengenceran$^{(-2}$log2)	Nilai OD reaksi ELISA pada sample					
		F41	K99	Pili K99	K88	—K99	TDF1a
A	0	0,50	1,63	1,16	0,55	0,42	1,62
B	1	0,52	1,65	1,01	0,52	0,41	1,47
C	2	0,44	1,61	0,65	0,50	0.40	0,80
D	3	0,44	0,53	0,48	0,48	0,41	0,42
E	4	0,46	0,49	0,48	0,47	0,42	0,42
F	5	0,46	0,46	0,49	0,47	0,42	0,41
G	6	0,54	0,43	0,48	0,47	0,39	0,42
H	PBS	0,54	0,43	0,50	0,49	0,44	0,50

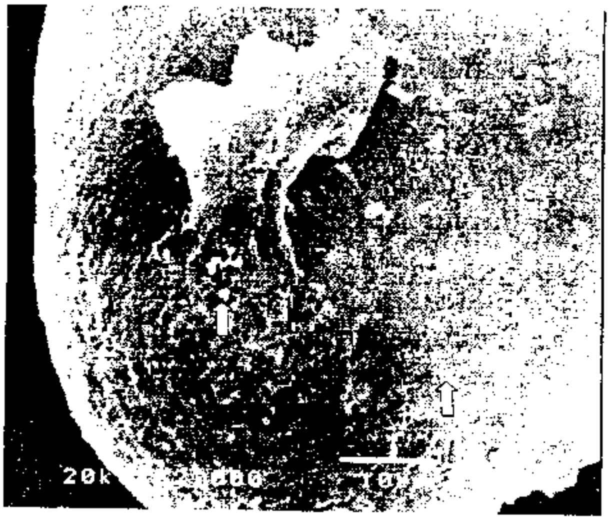
Keterangan :
F41 : suspensi pili *E.coli* F41
K99 : suspensi *E.coli* K99, *referentstrain couple* $K_{12}K_{99}$
Pili K99 : suspensi pili murni K99 dari isolat lapang TDF1a
K88 : suspensi pili *E.coli* K88
—K99 : suspensi pili *E.coli* K99$^{(-)}$
TDF1a : suspensi *E.coli* K99 isolat lapang TDF1a

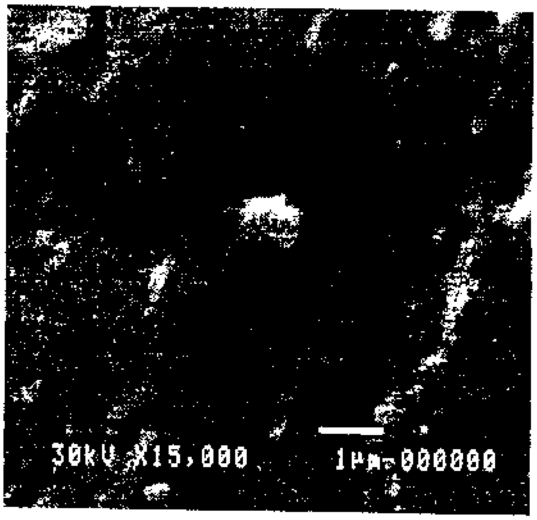
pelusida dengan baik suspensi pili mau pun suspensi bakteri *E.coli* K99. Yang ditandai dengan nilai OD tinggi, sedangkan pada sampel bakteri negatif K99, nilainya sama dengan suspensi PBST (Tabel 1). Hasil ini nampaknya mendukung penelitian sebelumnya bahwa ikatan antara *E.coli* K99 dengan zona pelusida ini sulit dilepaskan (Otoi *et al.* 1992; 1993), di samping itu walau pun embrio yang dicemari oleh bakteri *E.coli* K99, telah dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) mau pun tripsin, ternyata tidak mampu melepas ikatan yang terjadi.

Dalam preparat embrio yang dipaparkan (*expose*) dengan *E coli* K99 menunjukkan adanya perlekatan bakteri *E coli* K99 pada permukaan embrio walaupun telah dilakukan pencucian. Dari hasil pengamatan SEM dan ELISA memberikan dugaan adanya pertautan antigen pili pada permukaan embrio atau zona pelusida (Gambar 2). Implikasi hasil penelitian ini memberi masukan praktis pada aspek transfer embrio terutama dalam melakukan tidakaan pencegahan adanya cemaran bakteri *E coli* K99.



Gambar 1 Kepadatan Optik Hasil ELISA Antara Zona Pellusida Mencit dengan Berbagai Jenis Bakteri *E. coli* Asal Hewan.





Gambar 2 Bakteri *E.coli K99* (panah putih) menempel pada permukaan zona pelusida mencit (atas), bakteri *E.coli K99* tampak berbentuk batang dan berukuran di bawah satu mikron (bawah).

Dengan menggunakan SEM, dapat dipakai untuk membuktikan bahwa bakteri *E.coli* K99 mampu melekat ke permukaan zona pelusida, bahkan ada sejumlah bakteri yang sedikit terjerembab ke dalam pori-pori pada permukaan zona pelusida. Bakteri *E.coli* yang menempel pada permukaan embrio menunjukkan, gambaran ini serupa dengan yang pernah dilaporkan oleh Bertschinger dan Fairbrother (1999). Upaya pembuktian adanya perlekatan *E.coli* K99 ke permukaan zona pelusida yang dilacak dengan SEM belum pernah dilaporkan sebelumnya, tetapi adanya penempelan bakteri *Leptospira spp.* dilaporkan oleh Shisong dan Wrathall (1989), Bielanski dan Surujballi (1996), perlekatan *Myicoplasma bovis, M.bovigenitalium* ke zona pelusida dilaporkan oleh Bielanski *et al.* (2000), dan perlekatan *Tritrichomonas foetus* dilaporkan oleh Bielanski *et al.* (2004). Hasil penelitian ini menunjukkan adanya perlekatan *E.coli* K99 ke permukaan zona pelusida. Baik uji secara ELISA mau pun secara SEM, uji-uji itu belum pernah dilaporkan sebelumnya guna menunjukkan adanya perlekatan antara *E.coli* K99 dengan zona pelusida. Implikasi dari penelitian ini memberikan petunjuk bahwa *E.coli* K99 merupakan salah satu bakteri yang dapat menimbulkan efek negatif terhadap keberhasilan aplikasi transfer embrio pada sapi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada penaja penelitian ini : Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, melalui dana Hibah Bersaing Perguruan Tinggi XIII tahun 2005 sehingga penelitian dapat dilakukan. Ucapan yang sama atas bantuan teknis pelaksanaan kami sampaikan kepada Djaenuri (Balitvet Bogor), Dr. Bambang (Biosains FMIPA UI), Wahono Esthi Prasetyaningtyas, I Ketut Mudite Adnyane (Lab Histologi FKH IPB).

DAFTAR PUSTAKA

Bertschinger HU, Fairbrother JM. 1999. *Escherichis coli Infection. In Desease of Swine.* 8th Ed. Edited by Straw BE, Allaire SD, Mengering WL, Talyor DJ. Iowa State Uni Press. Ames. Pp. 431-441.

Bielanski A, Surujballi O. 1996. Association of *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo type Hardjobovis with Bovine Ova and Embryos Produced by in Vitro Fertlization. *Theriogenology* 46: 45-55.

Bielanski A, Devenish J, Phipps-Todd B. 2000. Effect of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovigenitalium* in Semen on Fertlization and Association with *in vitro* Produced Morula and Blastocyst Stage Embryo. *Theriogenology* 53: 1213-1223.

Bielanski A, Ghazi DF, Phipps-Todd B. 2004. Observation on the Fertilization and Development of Preimplantation Bovine Embryos *in vitro* in the Presence of *Trichomonas foetus*. *Theriogenology* 61: 821-829.

Dean EA, Isaacson RE. 1985. Purification and characterization of receptor for the 987P pilus of *Escherichia coli*. Infect. And Immun. 47(1): 98-105.

Dozois CM, Pousbakhsh SA, Fairbrother JM. 1995. Expression of P type 1 (F1) Fimbriae in Pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet Microbiol* 45: 297-309.

Dudkiewicz AB, Shivers CA, Williams WL. 1976. Ultrastructure of the hamster zona pellucida treated with zona precipitating antibody. *Biol Reprod* 14: 175-185.

Guinee PAM, Veldkamp J, Jansen WH. 1977. Improved minca medium for detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect.Immun* 15:676-678.

Hyttel P, Xu KP, Greve T. 1988. Scanning Electrone Microscope of in vitro fertilization in cattle. *Anat Embryol* 178 : 41-46.

Miller DJ, Ax RL. 1990. Carbohydrates and Fertilization in Animals. *Mol. Reprod Dev*. 26 : 184-198.

Otoi T, Tachikawa S, Kondo S, Suzuki S. 1992. Effect of antibiotics treatment of in vitro fertilized bovine embryos to remove adhering. *J Vet Med Sci* 54: 763 - 765

Otoi T, Tachikawa S, Kondo S, Suzuki T. 1993. Effect of washing, antibiotic and trypsin treatment of bovine embryos on the removal of adhering K99 *Escherichia coli*. *J Vet Med Sci* 55: 1053-1055.

Prasetyaningtyas WE, Setiadi MA, Nisa' C, Fahrudin M, Agungpriyono S. 2005. Morfologi dan karakteristik spermatozoa kancil (*Tragulus javanicus*). *Seminar Kongres Nasional XI & Pekan Ilmiah Nasional Perhimpunan Ahli Anatomi Indonesia*. Yogyakarta. 29-30 Juli 2005.

Shisong C, Wrathall E. 1989. The Importance of the zona pellucida for disease control in livestock by embryo transfer. *Br Vet J* 145: 129-140.

Skutelsky E, Ranen E, Shalgi R. 1994. Variation in Distribution of Sugar Residues in the Zona Pellucida as Possible Species-Specific Determinants of Mammalian Oocytes. *J of Reprod & Fertil*. 100: 35-41.

Stringfellow DA, Givens MD. 2000. Epidemiologic concerns relative to in vivo and in vitro production of livestock embryos. *Anim Reprod Sci*. 61: 629-642.

Supar. 1986. Penggunaan metode enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) untuk deteksi antigen pili K99 dan K88 pada Escherichia coli dari anak sapi dan anak babi diare. *Penyakit Hewan* 17:159-167.

Supar, Patten BE, Hirst RG, Djaenuri, Kurniasih. 1993. The use of elisa for detecting anti-fimbrial antibody responses in pigs vaccinated with multivalent *Escherichia coli* containing K88, K99, F41, and 987P antigens. *Penyakit Hewan* Vol XXV No 46A (edisi khusus): 21-28.

Supar. 1996. Kolibasilosis pada Anak Sapi Perah di Indonesia. *Wartazoa* 5(1): 26-32.

Supar, Kusmiyati, Poerwadikarta MB. 1998. Aplikasi vaksin enterotoksigenik *Escherichia coli* (ETEC) K99, F41 polivalen pada induk sapi perah bunting dalam upaya pengendalian kolibasilosis dan kematian pedet neonatal. *J Ilmu Ternak dan Vet* 3: 27-33.

Supar. 2002. *ELISA Escherichia coli K88 & K99* dalam *Escherichia coli* dan Kolibasilosis. Balitvet. Bogor

Tebourbi L, Testart J, Cerutti I, Moussu J P, Loeuillet A, Courtot A M. 2002. Failure to infect embryos after virus injection in mouse zygotes. *Human Reprod*. 17: 760-764.

Tizard I. 2000. Veterinary immunology an introduction. Sixth Ed. W B Saunders. Tokyo. Pp: 195-197.

Vazquez F, Gonzales EA, Garabal JI, Blanco J. 1996. Fimbriae Extracts from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains of Bovine and Porcine Origin with K99 and/or F41 Antigens. *Vet Microbiol* 48: 231-241.

Voller A, Bidwell D. 1986. *Enzyme linked immunosorbent assay*. A manual; of clinical laboratory immunology. III ed. Edited by Rose NL, Friedman, H, Fahey J L. American society for microbiology. Washington DC. Pp 99-109.

Wasaarman P, Chen J, Cohen N, Litscher E, Liu C, Qi H, Williams Z. 1988. Structure and functions of mammalian egg zona pellucida. *J Exp Zool* 285: 251-258.

Wolff H., Panhans A, Stolz W, Meurer M. 1993. Adherence of *Escherichia coli* to sperm : a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *Escherichia coli*. *Fertility and Sterility* 60(1):154-158.

Wrathall A E. 1995. Embryo transfer and disease transmission in livestock; A review of recent research. *Theriogenology* 43: 81-88

Wu GM, Lai L, Mao J, McCauley TC, Caamano JN, Cantley T, Rieke A, Murphy CN, Prather RS, Didion BA, Day BN. 2004. Birth piglet by in vitro fertilization of free zona porcine oocyte. *Theriogenology* 62: 1544-1556.