

ISSN 0216 - 7662

Volume XVII

No. 30

Semester II th. 1985



PENYAKIT HEWAN

BALAI PENELITIAN VETERINER
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN
DEPARTEMEN PERTANIAN



PEMBUATAN ANTISERA MONOSPESTIFIK *BRUCELLA ABORTUS* DAN *BRUCELLA MELITENSIS* PENELITIAN PENDAHULUAN

ENDHIE D. SETIAWAN, M. BHAKTI POERWADIKARTA, A. WAHYUDIN dan MOCH. SOEROSO
Balai Penelitian Veteriner, Bogor

ABSTRACT

Monospecific abortus serum and monospecific melitensis serum have been prepared in rabbits. The aim of this applied research was to obtain suitable methods for the preparation of standard biological reagents for the diagnosis of brucellosis and biotyping of brucella isolates from livestock in Indonesia. The results of this work will be of considerable importance in the epidemiological studies of brucellosis in Indonesia. Reference strain of *Brucella abortus* (S.19 and S. 544) and *Brucella melitensis* (626) were used and the rabbits used were New Zealand White cross breed. Suspension of brucella organisms (killed and living) were used as antigens to produce antisera in the rabbits. After exsanguinating those animals with high agglutinin titres ($\geq 1 : 320$), separate pools of antisera against *B. abortus* and *B. melitensis* were made. Packed brucella cells of the heterologous species were used to absorb each batch of serum by mixing and incubating in a water bath at 37°C for two hours to remove the cross-reacting agglutinins. After absorption, the brucella cells were removed by centrifugation and the absorbed serum tested by slide agglutination with homologous and heterologous brucella suspension. By these methods several batches of monospecific *B. abortus* and *B. melitensis* antisera were produced which gave satisfactory reactions.

PENDAHULUAN

Sudah banyak dikembangkan cara-cara untuk mendiagnosa brucellosis, antara lain mengenal tanda-tanda klinik, pemeriksaan serologik dan bakteriologik (Morgan and McKennon, 1979). Pemeriksaan serologik seperti aglutinasi tabung, aglutinasi cepat dan pengikatan komplemen pada prinsipnya menentukan antibodi spesifik di dalam serum atau cairan tubuh lainnya (Alton *et al.*, 1975 b). Sedangkan pemeriksaan bakteriologik merupakan upaya untuk mengisolasi dan identifikasi kuman (Gorbell *et al.*, 1978).

Pemeriksaan bakteriologik tidak jarang mengalami kesulitan sekalipun didukung oleh peralatan yang cukup memadai, mungkin karena sifat-sifat biologik kuman *Brucella* agak berbeda dengan kuman lain, sehingga memerlukan perlakuan dan persyaratan khusus (Buxton and Fraser, 1977).

Salah satu cara untuk membantu memudahkan pemeriksaan bakteriologik yaitu melakukan pemeriksaan jalan pintas untuk mengklasifikasi koloni tersangka kuman *Brucella* dengan menggunakan antisera monospesifik, sambil menunggu hasil akhir uji biokemik atau lainnya (Alton, 1984). Antisera monospesifik *B. abortus* dan *B. melitensis* hanya akan bereaksi spesifik terhadap kuman *Brucella* yang sejenis (homolog), sehingga dalam waktu tidak terlalu lama dapat

ditentukan spesies isolat *Brucella* yang diperoleh (Morgan *et al.*, 1971).

Kegunaan lain antisera monospesifik *Brucella* yaitu untuk mengenal dan memilih galur vaksin tepat untuk vaksinasi brucellosis di lapang. Mengingat bila menggunakan vaksin yang sama tipe atau galurnya dengan isolat penyebabnya, diharapkan mempunyai immunogenisitas tinggi.

Tujuan penelitian pendahuluan ini adalah untuk membuat antisera monospesifik *B. abortus* dan *B. melitensis* dalam hubungannya untuk diagnosa, pengembangan reagensia atau vaksin dan studi epidemiologi brucellosis di Indonesia.

BAHAN DAN CARA

Kuman

Untuk pembuatan antisera monospesifik digunakan persediaan kuman *B. abortus* (S. 19 ex USA dan S. 544 ex BCC) dan *B. melitensis* (626 ex BCC).

Media dan reagen

Menggunakan media Dextrose serum agar (DSA) dalam tabung, cawan petri dan dalam botol Roux, acriflavin dan larutan NaCl fisiologik steril.

Hewan percobaan

Digunakan kelinci keturunan persilangan lokal dengan galur New Zealand white sebanyak

10 ekor, beratnya lebih kurang 2 kg dan ditempatkan dalam kandang khusus.

Cara kerja

Rangkaian pekerjaan dalam penelitian ini terdiri dari penyiapan antigen untuk pembuatan inokulum dan sel kuman dipadatkan (packed cells) untuk absorpsi antisera dan pembuatan antisera monospesifik *B. abortus* dan *B. melitensis*.

Penyiapan antigen. Kuman *B. abortus* (S. 19 dan S. 544) dan *B. melitensis* (626) masing-masing ditumbuhkan pada dextrose agar pelat. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Dipilih koloni yang halus (smooth) secara makroskopik adalah koloni tumbuh merata dan halus, secara mikroskopik dengan menggunakan cahaya pantulan (obliquely transmitted light) dan uji acriflavin (Alton *et al.*, 1975 b; Moore, 1954). Dari koloni yang halus diambil dengan ose steril dan ditumbuhkan pada DSA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Biakan kuman dari DSA miring disuspensi dengan 5 ml larutan NaCl fisiologik steril, kemudian setiap 5 ml suspensi kuman *Brucella* ditumbuhkan secara merata pada media DSA dalam botol Roux. Didiamkan selama 15 menit pada suhu kamar, selanjutnya diinkubasi pada 37°C selama 48–72 jam dan diletakkan secara terbalik. Setiap biakan kuman *Brucella* dalam botol Roux yang makroskopik tumbuh murni dibias dengan larutan NaCl fisiologik sebanyak 25 ml dan selanjutnya ditampung dalam bejana Erlenmeyer. Antigen yang sudah dibuat digunakan untuk inokulasi kelinci, ada dua bentuk yaitu antigen hidup dan mati dipanaskan dalam penangas air pada suhu 65 – 70°C selama 1 jam, masing-masing dengan kandungan kuman 2×10^9 kuman/ml (Anonim, 1982; Alton *et al.*, 1975 a).

Pembuatan antisera. Antigen *Brucella* distandarisasi dengan tabung Brown's opacity No. 1 (± 2 milyar kuman) dan diencerkan 1 : 20 dengan larutan NaCl fisiologik steril. Selanjutnya antigen diinokulasikan pada 10 ekor kelinci, dosis 1 ml/ekor intra vena telinga (Anonim, 1982; Jones, 1958). Lima hari pasca inokulasi antigen, darah diambil 1–5 ml dari vena telinga dan serumnya diuji dengan Rose Bengal plat test (RBPT), dan serum agglutinasi test (SAT), sebelum serum kelinci dipanen. Bila hasil pengujian serum sampai hari 7 – 9

pasca inokulasi titer masih rendah ($< 1 : 320$), maka dilakukan penyuntikan antigen ulang dan bila titer sudah mencapai $\geq 1 : 320$, kelinci dipotong dan dipanen antisernya.

Pembuatan antisera monospesifik. Antisera yang dihasilkan dari kelinci kemudian diabsorpsi dengan sel kuman *Brucella* dipadatkan (packed cells) yang berbeda jenis (heterolog). Untuk antisera *B. abortus* diabsorpsi dengan sel kuman *B. melitensis* dan antisera *B. melitensis* diabsorpsi dengan sel kuman *B. abortus*. Membuat sel kuman *Brucella* yang dipadatkan yaitu dengan cara mengendapkan antigen *B. abortus* dan *B. melitensis* dan endapan diambil. Masukkan masing-masing antigen ke dalam tabung pemusing berskala, pusing dengan kecepatan 4000 rpm selama 75 menit pada suhu 4°C dengan alat pemusing (centrifuge tipe swinging head). Endapan sel kuman kemudian dicampur dengan antisera yang akan diabsorpsi dengan perbandingan sel dan antisera 1 : 10. Campuran sel kuman dan antisera ditempatkan dalam botol dan diinkubasi dalam penangas air suhu 37°C selama 2 jam dan setiap 15 menit dikocok dengan tangan supaya merata. Kemudian diputar lagi 4000 rpm selama 75 menit pada suhu 4°C dengan alat pemusing seperti di atas dan supernatan diambil sebagai antisera monospesifik *brucella* (Alton *et al.*, 1975a; Anonim. 1982; Jones, 1958). Akhirnya diuji secara aglutinasi cepat dengan kuman *brucella* sejenis (homolog) dan berbeda jenis (heterolog) untuk melihat antisera monospesifik yang terbentuk. Bila hasilnya masih kurang baik artinya masih ada reaksi silang, maka perlu diabsorpsi ulang 2 – 3 kali lagi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Antisera *B. abortus* dan *B. melitensis*

Antisera *brucella* yang dihasilkan dari kelinci dalam penelitian ini sesuai dengan jenis antigennya, yaitu antisera untuk *abortus* (A) dibuat dari biakan *B. abortus* (S. 19 dan S. 544) dan antisera untuk *melitensis* (M) dibuat dari biakan *B. melitensis* (626). Nilai RBPT dan SAT masing-masing antisera dapat dilihat pada Tabel 1. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa antisera yang dihasilkan cukup baik, karena mencapai nilai RBPT tertinggi yaitu positif 3 dan SAT tabung mencapai titer 4 : 320. Menurut Alton *et al.* (1975 a) antisera monospesifik

brucella, titer SAT harus mencapai 1 : 400, hal tadi dapat dicapai dengan menginokulasi antigen mati yang mengandung 10^9 kuman. Namun demikian perlu diteliti lebih lanjut apakah ada perbedaan prinsipil antara antigen hidup dan antigen mati dalam pembentukan zat kebal tersebut. Adanya zat kebal dalam serum kelinci yang dapat dideteksi kurang 14 hari pasca inokulasi, menunjukkan bahwa zat kebal dini yang sangat efektif terhadap antigen telah terbentuk (Riot, 1974).

Dari 10 ekor kelinci yang digunakan dalam penelitian ini, 8 ekor (80%) dapat menghasilkan antisera dan 2 ekor (20 %) mati sebelum diambil antisernya. Nampaknya kelinci sebagai hewan percobaan yang baik untuk menghasilkan antisera, di samping ditunjang oleh sifat antigen brucella yang mempunyai daya imunogen tinggi.

Antisera monospesifik *B. abortus* dan *B. melitensis*

Antisera monospesifik *B. abortus* dan *B. melitensis* diperoleh dari antisera brucella setelah diabsorbsi dengan sel kuman brucella yang berbeda jenis (heterolog). Hasil uji aglutinasi masing-masing antisera monospesifik dapat dilihat pada Tabel 2. Dari hasil penelitian ini umumnya antisera monospesifik yang dihasilkan dapat menimbulkan aglutinasi dalam waktu kurang lebih 1 menit dan ada yang mencapai pengenceran 1 : 10. Hasil ini cukup memadai sesuai dengan standar Alton *et al.* (1975 a) bahwa dengan pengenceran 1 : 10 tidak menimbulkan aglutinasi dengan kuman (antigen) yang berbeda jenis (heterolog), disamping itu dalam penggunaannya cukup hemat dan ekonomis karena masih dapat diencerkan (Jones, 1985).

Tabel 1. Nilai RBPT dan SAT Antisera *B. abortus* dan *B. melitensis* dari kelinci

Jenis antisera	Dari kelinci Kode/No.	RBPT ^a	SAT ^b					
			1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
<i>B. abortus</i>	S 544	K 212	3	4	4	4	4	4
<i>B. abortus</i>	S 19	K 88	3	4	4	4	1	3
<i>B. abortus</i>	S 19	K 192	3	4	4	4	4	3
<i>B. abortus</i>	S 19	K 194	3	4	4	4	4	3
<i>B. melitensis</i>	S 19	K 89	3	4	4	4	4	4
<i>B. melitensis</i>	626	K 214	3	4	4	4	4	4
<i>B. melitensis</i>	626	K 139	3	4	4	2	4	4
<i>B. melitensis</i>	626	K 140	3	4	4	4	4	4

^aNilai RBPT 3 artinya positif 3, suatu tingkatan reaksi aglutinasi yang besar/kasar dengan batas pinggir jelas dan cairan antigen jernih.

^bNilai SAT 2, 3 dan 4 artinya positif 2, 3 dan 4, suatu tingkatan reaksi aglutinasi, pada pengenceran tertentu (misalnya 1:10 atau 1:320).

Tabel 2. Hasil uji aglutinasi antisera *B. abortus* dan *B. melitensis* setelah diabsorbsi dengan sel kuman *Brucella* yang heterolog

Jenis antisera		Dari kelinci	Diabsorbsi dengan sel	Uji aglutinasi		
				<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	titer
<i>B. abortus</i>	S 544	K 212	<i>B. melitensis</i> 626	+	—	1/10
<i>B. abortus</i>	S 19	K 88	<i>B. melitensis</i> 626	+	—	1/2
<i>B. abortus</i>	S 19	K 192	<i>B. melitensis</i> 626	+	—	1/8
<i>B. abortus</i>	S 19	K 194	<i>B. melitensis</i> 626	+	—	1/8
<i>B. melitensis</i>	626	K 214	<i>B. abortus</i> S 19	—	+	1/10
<i>B. melitensis</i>	626	K 139	<i>B. abortus</i> S 19	—	+	1/5
<i>B. melitensis</i>	626	K 140	<i>B. abortus</i> S 19	—	+	1/2

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kelinci keturunan New Zealand White merupakan salah satu hewan percobaan yang cukup baik untuk pembuatan antisera monospesifik *B. abortus* dan *B. melitensis*.

Penelitian ini merupakan penelitian terapan, perlu kiranya dikembangkan untuk pembuatan reagensia standar dan vaksin yang sesuai untuk studi epidemiologi brucellosis di Indonesia.

Untuk meningkatkan mutu antisera monospesifik yang telah dihasilkan, masih perlu penelitian lanjutan baik dengan biakan referensi atau biakan lokal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Dr Richard Philip dari bantuan tehnik Inggris atas prakarsanya terhadap penelitian ini. Juga penghargaan ditujukan kepada Dr. Robert Hirst, adviser Bakteriologi dari bantuan teknik Australia atas dorongan dan saran sehingga penelitian ini berjalan lancar.

DAFTAR PUSTAKA

- ANONYMOUS. 1982. Preparation of *B. abortus* and *B. melitensis* monospesific antisera. Ministry of Agricultural and Fisheries. Central Vet. Lab., Weybridge, Engla: d.
- ALTON, G.G., L.M JONES and D.E. PIETZ. 1975 a. Laboratory Techniques in Brucellosis. 2nd ed. WHO. Geneva.
- ALTON, G.G., J. MAW, B.A. ROGERSON and G.G. MCPHERSON. 1975 b. The serological diagnosis of bovine brucellosis : An evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose bengal test. Aust. Vet. J. 51 : 57 - 63.
- ALTON, G.G. 1984. Report on a consultancy in animal Brucellosis in Indonesia.
- BUXTON, A. and G. FRESSER. 1977. Animal Microbiology. Vol. I. Blackwell Scientific Publications, Oxford and London.
- GORBELL, M.J., K.P.W. GILL and E.L. THOMAS. 1978. Methods for the identification of *Brucella*. Central Veterinary Laboratory, Weybridge, England.
- JONES, L.M. 1958. A recommended method for the reproduction of monospesific *Brucella* sera. Bull WHO. 19 : 177 - 186;
- MORGAN, W.J.B., D.J. MCKENNON, K.P.W. GILL, S.G.M. GOWER and P.I.W. NORIS. 1971. Standard laboratory techniques for the diagnosis of brucellosis. Ministry of Agricultural, Fisheries and Food. Weybridge, England.
- MORGAN, W.J.B. and D.J. MCKENNON. 1979. Brucellosis. In L.A. Laing. edft. Fertility and Infertility in Domestic Animals. 3rd ed. Bailliere Tindall, London.
- MOORE, T. 1954. A method of cultivating *B. abortus* for antigen without the use of agar. J. Amer. Vet. Med. Ass. 117 : 226 - 227
- RIOT, I.M. 1974. Essential Immunology. 2nd ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford and London.