

PEMBUATAN ANTIGEN *DERMATOPHILUS CONGOLENSIS* DAN PENGUJIANNYA DENGAN UJI IMUNODIFUSI DAN ELEKTROFORESIS

DJAENUDIN GHOLIB dan SUBIYANTO

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 14 Agustus 1998)

ABSTRACT

GHOLIB, D. and SUBIYANTO. 1998. The preparation of *Dermatophilus congolensis* antigen and its testing by means of immunodiffusion test and electrophoresis. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 3 (3): 197-201.

The filtrate antigen of *Dermatophilus congolensis* was prepared based on the Makinde method, whereas the whole cell antigen was based on the Bida and Kelley method. Filtrate antigen of *Dermatophilus congolensis* has been tested with positive serum from experimental animals, guinea pigs and sheep by means of immunodiffusion test and electrophoresis. Positive serum was produced by inoculation of whole cell antigen of *D. congolensis* to the animals. The results showed that the immunodiffusion test resulted in one and two precipitation lines with positive serum of sheep and guinea pigs respectively. Electrophoresis SDS-PAGE presented about 8 bands with molecular weight in the range from above 30 kD to more than 94 kD. The bands were then transferred into nitrocellulose membrane and gave positive reaction with positive serum from sheep.

Key words : Antigen, *Dermatophilus congolensis*, immunodiffusion, electrophoresis

ABSTRAK

GHOLIB, D. dan SUBIYANTO. 1998. Pembuatan antigen *Dermatophilus congolensis* dan pengujiannya dengan uji imunodifusi dan elektroforesis. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 3 (3): 197-201.

Pembuatan antigen filtrat *Dermatophilus congolensis* mengikuti cara Makinde, sedangkan pembuatan antigen *whole cell* mengikuti cara Bida dan Kelley. Antigen filtrat *Dermatophilus congolensis* telah diuji dengan serum positif dari hewan percobaan marmot dan domba dengan uji imunodifusi dan elektroforesis. Serum positif dibuat dengan menyuntikkan antigen *whole cell* dari *D. congolensis*. Hasilnya menunjukkan bahwa imunodifusi agar membentuk masing-masing 1 dan 2 garis presipitasi dengan serum positif domba dan marmot. Pemisahan protein dari antigen dengan elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan adanya 8 pita (*band*) dengan bobot molekul dari 30 kD sampai lebih dari 94 kD. *Band* kemudian ditransfer ke dalam membran nitroselulose dan bereaksi positif pada titrasi dengan serum positif domba.

Kata kunci : Antigen, *Dermatophilus congolensis*, imunodifusi, elektroforesis

PENDAHULUAN

Dermatofilosis merupakan dermatitis eksudatif yang disebabkan oleh *Dermatophilus congolensis*, yaitu sejenis bakteri berfilamen dari golongan aktinomiset aerobik (AINSWORTH dan AUSTWICK, 1973). Kasus pertama dermatofilosis dilaporkan di Zaire pada tahun 1915 oleh VAN SACHEGEM. Penyakit ini bersifat akut atau khronis dan dapat menyerang ruminansia kecil dan ruminansia besar serta beberapa jenis hewan liar, sebagai akibat kerusakan kulit karena terlalu lama berada di tempat becek atau di bawah sinar matahari, akibat gigitan caplak atau organisme lain (JUNGERMAN dan SCHWARTZMAN, 1972; GITAO *et al.*, 1990). Gejala penyakit berupa peradangan kulit berwarna merah disertai eksudasi dan pembentukan kerak yang keras dan tebal. Bila kerak diangkat,

meninggalkan luka cekung berwarna merah disertai eksudasi berwarna kekuningan (ABU-SAMRA dan WALTON, 1981; FRAZER dan STAMP, 1989). Luka pada mulut dan muka yang meluas dapat menjadi masalah serius bagi ternak di daerah tropis (SANDERS *et al.*, 1990). Dermatofilosis pada sapi dapat dikelirukan dengan kudis, *ringworm*, cacar, fotosensitisasi, urtikaria, hiperkeratosis dan *lumpy skin diseases*, sedangkan pada domba dapat dikelirukan dengan orf (JUNGERMAN dan SCHWARTZMAN, 1972).

Diagnosis kultural dari sampel kulit atau eksudat dengan pengisolasian agen penyakit dapat menguatkan pengenalan secara klinis, tetapi sering terjadi agen penyakit tercampur dengan organisme lain seperti bakteri, sehingga pertumbuhannya tertekan (PIER *et al.*, 1964). Penelitian penyakit secara serologis perlu, karena dapat membantu diagnosis. Beberapa penelitian

telah dilakukan antara lain MAKINDE (1980) mempelajari serologi dengan uji imunodifusi agar dan PULLIAM *et al.* (1967) melakukan reaksi agglutinasi dan presipitasi, sedangkan PIER *et al.* (1964) mempelajari teknik imunofluoresensi.

Dalam tulisan ini penulis mengetengahkan hasil penelitian tentang antigen filtrat dari *D. congolensis* serta pengujiannya dengan serum positif dari hewan percobaan marmot dan domba dengan menggunakan uji imunodifusi agar dan elektroforesis.

MATERI DAN METODE

Untuk pembuatan antigen *D. congolensis* digunakan isolat BCC Balitvet (no. 1882, koleksi dari Australia). Isolat dalam bentuk kering beku di dalam ampul hampa udara dibiakkan kembali pada medium agar darah. Caranya:

- Isolat dilarutkan dalam aquades steril dan disebarkan pada permukaan medium agar darah.
- Biakan diinkubasikan pada suhu 37°C dalam ruang anaerobik dan mengandung CO₂ 10% dengan menggunakan api lilin di dalam stoples yang ditutup rapat.
- Setelah 2-3 hari masa inkubasi pertumbuhan koloninya diamati.

1. Pembuatan antigen *whole cell* (BIDA dan KELLEY, 1976). Caranya:

- Koloni dari agar darah dipindahkan ke dalam medium cair yang terdiri atas tripton 1% dan NaCl 0,5%, lalu diinkubasikan pada suhu 28°C (suhu kamar) selama 7-14 hari.
- Kemurnian biakan diperiksa dengan membiakkan kembali pada medium agar darah dan koloni yang tumbuh diperiksa secara makroskopik dan pemeriksaan mikroskopik dengan menggunakan mikroskop melalui preparat yang diwarnai dengan Giemsa.
- Kira-kira 22 gram bobot basah dari biakan dikocok di dalam alat pengocok (*shaker*) selama 1 jam, untuk memecah koloni.
- Suspensi kemudian disentrifusi pada kecepatan 25.000 G selama 15 menit.
- Endapan yang terjadi dicuci 3-4 kali dengan 0,15 M *phosphate buffered saline* (PBS), pH 7,2.
- Selanjutnya diberi formalin 0,3% pada suhu 4°C dan disimpan selama satu malam.
- Esok harinya diberi thiomersal 0,1% dan disonikasi selama 1 jam, sedangkan suhu dijaga pada 4°C dengan pemberian es batu.
- Nilai *optical density* (OD) diukur sampai 0,35% pada 460 µm dengan spektrofotometer.

- Antigen ini digunakan untuk imunisasi hewan percobaan.

2. Pembuatan antigen filtrat (MAKINDE, 1980).

Caranya:

- Koloni *D. congolensis* dari medium agar darah dipindahkan ke dalam medium cair *trypticase soy broth* (BBL Microbiology System Cockeysville, Md.) + serum sapi 10%.
- Biakan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 37°C dengan kandungan CO₂ 10%.
- Koloni dipisahkan dengan sentrifusi selama 30 menit pada kecepatan 500 G, dan supernatannya disaring dengan filter 0,22 µm (Milipore).
- Filtrat kemudian dicampur dengan ammonium sulfat (80%) dan dibiarkan selama satu malam pada suhu 4°C agar mengendap.
- Presipitat dipisahkan dengan sentrifusi pada kecepatan 15.000 G selama 30 menit dengan suhu 4°C, lalu endapan dilarutkan dengan 5 M NaCl dingin.
- Larutan kemudian didialisis dengan aquades selama 3 hari, dengan penggantian aquades berulang-ulang pada suhu 4°C.
- Ekstrak dibagi-bagikan ke dalam ampul kecil dan siap digunakan sebagai antigen.
- Selanjutnya, kadar protein diukur dengan cara LOWRY *et al.* (1951) yang dimodifikasi.
- Antigen filtrat digunakan untuk uji serologis.

3. Pembuatan antiserum positif pada hewan percobaan.

Untuk penginokulasian hewan percobaan, dipakai antigen *whole cell* dicampur adjuvan komplit (1:1) pada marmot dan domba (BIDA dan KELLEY, 1976).

3.1. Inokulasi pada marmot percobaan. Caranya:

- Antigen *whole cell* dicampur dengan adjuvan komplit (1:1) dan diaduk sampai homogen.
- Marmot percobaan diinjeksi antigen dengan dosis 0,5 ml subkutan dengan interval 4 hari selama 4 kali.
- Pada injeksi ke-2, ke-3 dan ke-4, inokulum ditambah adjuvan inkomplit (1:1).
- Setelah injeksi subkutan, dilanjutkan dengan injeksi intraperitoneal dengan antigen tanpa adjuvan dengan dosis 0,5 ml.
- Setelah 1 minggu sejak injeksi terakhir, darah marmot diambil dan serumnya dipisahkan.

3.2. Inokulasi pada domba. Caranya:

- Dalam hal ini digunakan inokulum yang sama seperti yang digunakan pada marmot, tetapi dosisnya 1 ml dengan interval tiap minggu.

- Injeksi dilakukan secara intramuskuler sebanyak 4 kali.
- Seminggu setelah penyuntikan terakhir, darah domba tersebut diambil dan serumnya dipisahkan.

4. Uji serologis:

Pengujian antigen *D. congolensis* dengan serum positif dari hewan percobaan dilakukan dengan menggunakan antigen filtrat (GORDON, 1964; BIDA dan KELLEY, 1976; RICHARD *et al.*, 1976). Uji yang dipakai adalah uji imunodifusi agar, elektroforesis SDS-PAGE dan transfer pada membran nitroselulose, lalu dititrasi dengan serum positif.

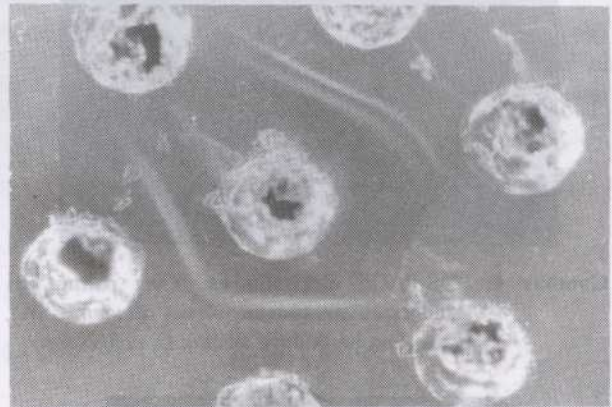
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan koloni *D. congolensis* pada medium agar darah tampak spesifik, yaitu koloni berbentuk bulat, ukuran kecil berdiameter 1 mm atau lebih, menonjol, melekat pada medium dan berwarna putih, permukaan tidak rata dan di sekelilingnya terjadi hemolisis. Pada medium cair (*broth*) pertumbuhan koloni murni menunjukkan bentukan padat, bergumpal dan berbutir berwarna putih, sedangkan mediumnya tetap jernih. Bila mediumnya keruh menunjukkan adanya kontaminasi bakteri atau khamir. Hal ini sesuai dengan yang diterangkan oleh GORDON (1964). Pemeriksaan mikroskopik dengan menggunakan mikroskop di atas preparat yang diwarnai dengan Giemsa menampakkan bentuk filamen bercabang tegak lurus, bersekat melintang dan memanjang serta membentuk sel-sel kokoid (Gambar 1). Antigen filtrat yang dibuat dengan tiga kali pengulangan mempunyai konsentrasi protein masing-masing 165,78; 106,58 dan 73,77 mg/ml dengan pengukuran protein menurut metode LOWRY *et al.* (1951).

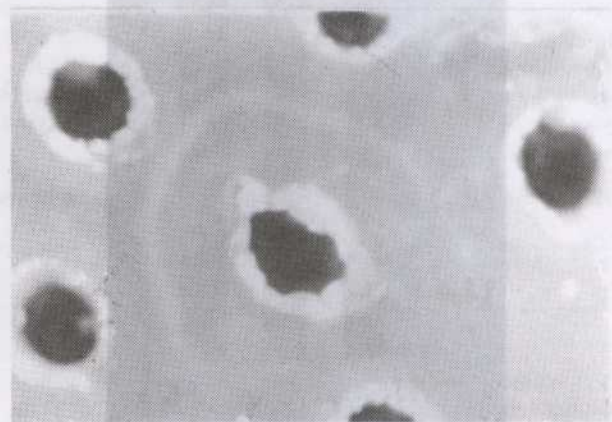


Gambar 1. Bentuk mikroskopis *D. congolensis* dengan pewarnaan Giemsa (pembesaran 400 x)

Hasil uji serologis dengan imunodifusi agar menunjukkan adanya 2 garis presipitasi dengan serum marmot dan 1 garis dengan serum domba (Gambar 2 dan 3). Pemisahan protein dengan elektroforesis SDS-PAGE memperlihatkan sejumlah garis atau pita (*band*) pada ketiga sampel antigen. Pita terletak pada posisi bobot molekul *marker* antara 30 kD sampai di atas 94 kD (Gambar 4). Transfer dari gel ke membran nitroselulose terjadi pemindahan pita-pita protein. Hal ini diperlihatkan dengan reaksi titrasi dengan serum positif domba yang diimunisasi dengan antigen *whole cell D. congolensis*. Pada reaksi ini dipakai zat perak nitrat sebagai pewarna (Gambar 5).



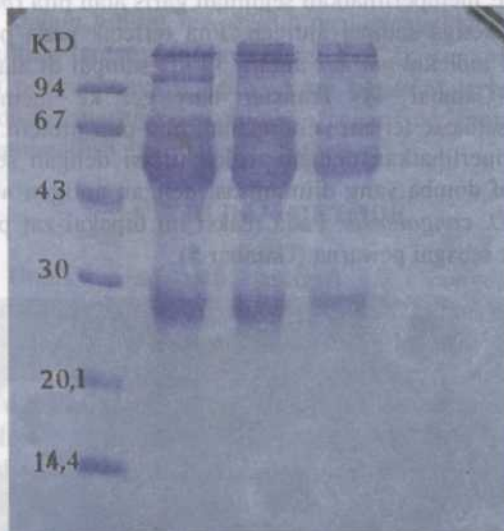
Gambar 2. Uji imunodifusi agar: Antigen ekstrak *D. congolensis* pada lubang tengah, serum positif marmot pada lubang pinggir



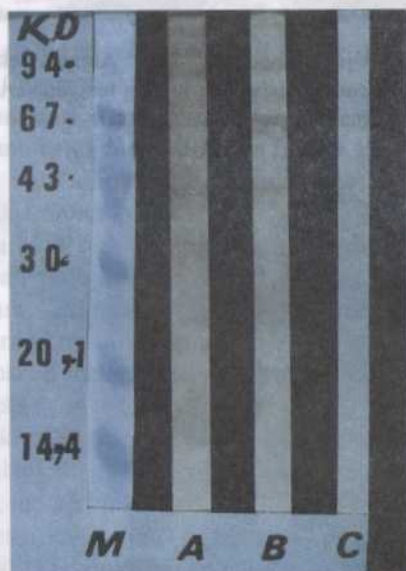
Gambar 3. Uji imunodifusi agar: Antigen ekstrak *D. congolensis* pada lubang tengah, serum positif domba pada lubang pinggir

Penggunaan antigen *whole cell* untuk pembuatan serum positif pada hewan percobaan ini adalah karena dianggap paling antigenik dan menimbulkan pembentukan antibodi dengan titer tinggi. Selain itu, antigen *whole cell* merupakan komponen kompleks dari sel somatik dan flagella. Antigen *D. congolensis*

merupakan unsur yang homogen, baik antigen somatik hemaglutinogen, hemolisis maupun presipitinogen, dan adalah identik serta menimbulkan reaksi presipitasi yang sama (BIDA dan KELLEY, 1976).



Gambar 4. SDS-PAGE elektroforesis: Yang paling kiri standar protein (bovine serum albumin/BSA), tiga kolom berikutnya ekstrak *D. congolensis*



Gambar 5. Transfer gel ke membran nitroselulose dan titrasi dengan serum positif domba A dan B, sedangkan C dengan serum negatif, sebagai kontrol. M = marker

Dengan pemakaian adjuvan pada imunisasi hewan percobaan adalah untuk merangsang pembentukan antibodi dan mempertahankan kadar antibodi dalam waktu yang lebih lama (BIDA dan KELLEY, 1976). Pada uji imunodifusi agar yang menggunakan

agarose 1% masing-masing reagensia berdifusi secara radier. Pita presipitasi yang terbentuk menunjukkan kompleks antigen dan antibodi. Dalam hal ini, antibodi bersifat polivalen dan bereaksi dengan molekul determinan dari antigen untuk membentuk garis presipitasi (CROWLE, 1973). Dalam percobaan ini serum marmot membentuk 2 kompleks reaksi antigen dan antibodi, yang ditunjukkan dengan terbentuknya 2 pita presipitasi. Hal ini terjadi juga pada percobaan dengan kelinci yang dilakukan oleh GORDON (1964) yang menyebutkan bahwa antigen terdiri atas antigen O dan G.

Pada titrasi pita dengan antiserum positif domba, terlihat bahwa pada domba A reaksinya lebih baik dibandingkan dengan domba B. Perbedaan ini disebabkan oleh kenyataan bahwa domba A kondisi fisiknya lebih baik daripada domba B. Hal ini mempengaruhi titer antibodi yang terbentuk oleh sistem kekebalan tubuh.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa antigen *D. congolensis* yang dibuat di laboratorium dan diuji pada hewan percobaan marmot dan domba menunjukkan reaksi imunogenik. Deteksi antibodi dari hewan percobaan dengan cara imunodifusi agar dan reaksi imunoblot menunjukkan reaksi positif.

Penelitian ini adalah yang pertama kali dilakukan pada mikroorganisme *D. congolensis* sebagai penyebab dermatofilitis pada ruminansia. Sementara itu, usaha untuk mengisolasi jenis mikroorganismenya di lapangan belum berhasil, sehingga disarankan agar penelitian ini dilanjutkan pada masa mendatang, terutama mengenai diagnosis serologis.

DAFTAR PUSTAKA

- ABU-SAMRA, M.T. and G.S. WALTON. 1981. The inoculation of rabbits with *D. congolensis* and the simultaneous infection of sheep with *D. congolensis* and orf virus. *J. Comp. Pathol.* 91 (3): 317-329.
- AINSWORTH, G.C. and P.K.C. AUSTWICK. 1973. *Fungal Diseases of Animals*. CAB Farnham Royal, Slough, England.
- BIDA, S.A. and D.C. KELLEY. 1976. Immunological studies of antigenic components of *D. congolensis*. In: *Dermatophilus Infection in Animals and Man*. Lloyd D.H. & K.C. Seller (eds.). Proceeding of a Symposium held at the University of Ibadan, Nigeria and Sponsored by the Agric. Research Council of Nigeria. Academic Press, London. pp. 229-241.
- CROWLE, A.J. 1973. *Immunodiffusion*. Second Edition. Academic Press, New York, USA.

- FRAZER, A. and J.T. STAMP. 1989. *Sheep Husbandry and Diseases*. BSP Professional Books. Melbourne, Australia.
- GITAO, G.C., J.O. EVANS, and D.J. ATKINS. 1990. Natural *D. congolensis* in camels (*Camelus dromedarius*) from Kenya. *J. Comp. Pathol.* 103 (3) : 308-313.
- GORDON, M.A. 1964. The genus *Dermatophilus*. *J. Bact.* 88 (2) : 509-522.
- JUNGERMAN, P.F. and R.M. SCHWARTZMAN. 1972. *Veterinary Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- LOWRY, O.H., N.N. ROSEBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL. 1951. Protein measurements with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 165-175.
- MAKINDE, A. A. 1980. The reverse single radial immunodiffusion technique for detecting antibodies to *D. congolensis*. *Vet. Rec.* 106 (17) : 383-385.
- PIER, A.C., J.L. RICHARD, and E.F. FARRELL. 1964. Fluorescent antibody and cultural techniques in cutaneous streptothricosis. *Am. J. Vet. Res.* 107 (25) : 1014-1020.
- PULLIAM, J.D., D.C. KELLEY, and E.H. COLES. 1967. Immunologic studies of natural and experimental cutaneous streptothricosis infections in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 123 (28) : 447-455.
- RICHARD, J.L., J.R. THURSTON, and A.C. PIER 1976. Comparison of antigen of *D. congolensis* isolates and their use in serological tests in experimental and natural infections. In: *Dermatophilus Infection in Animals and Man*. D.H. Lloyd and K.C. Seller (eds.). Academic Press, London. pp. 216-228.
- SANDERS, A.B., S.J. HOW, D.H. LLOYD, and R. HILL. 1990. The effect of energy malnutrition in ruminants on experimental infection with *D. congolensis*. *J. Comp. Pathol.* 103 (4) : 361-368.