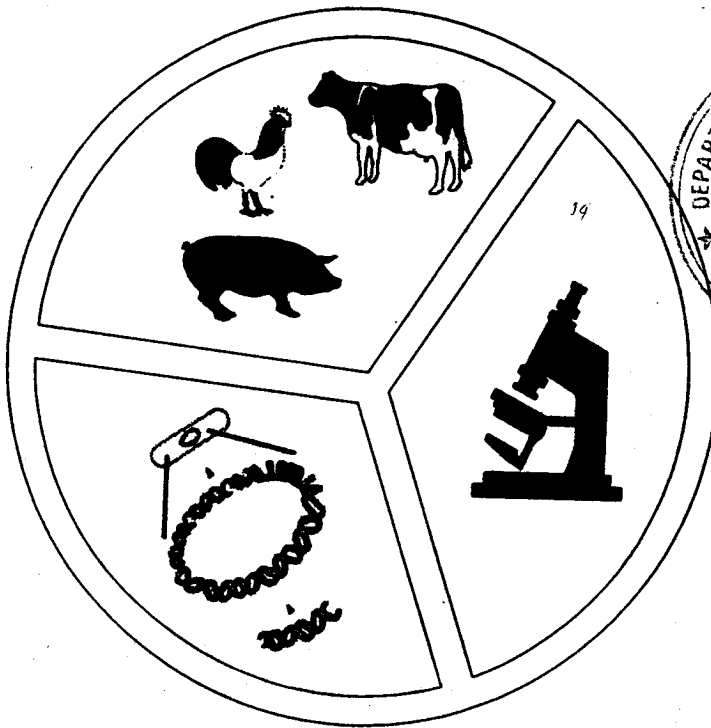


PROSIDING

SEMINAR NASIONAL TEKNOLOGI VETERINER UNTUK MENINGKATKAN KESEHATAN HEWAN DAN PENGAMANAN BAHAN PANGAN ASAL TERNAK

CISARUA, BOGOR 22 -24 MARET 1994



**BALAI PENELITIAN VETERINER
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN
DEPARTEMEN PERTANIAN**

BOGOR, 1995

DAFTAR ISI

Halaman

Kata Pengantar	i
Materi Arahan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian	xiii

I. MAKALAH UNDANGAN

Pembinaan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak (<i>Soehadji</i>).....	1
Peranan Pusat Antar Universitas (PAU) - Bioteknologi dalam Menunjang Penelitian Teknologi Veteriner untuk Meningkatkan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak (<i>Widya Asmara dan Wayan T. Artama</i>)	16
Peranan Perguruan Tinggi Dalam Pembinaan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak (<i>Emir A. Siregar</i>)	20
Keterpaduan Penelitian Veteriner Dalam Kegiatan IPTEKVET untuk Menunjang Pembangunan Subsektor Peternakan pada Pelita VI (<i>Sjamsul Bahri</i>)	29 ^v
Peluang Kerjasama Antar Swasta Nasional dan Lembaga Penelitian Pemerintah dalam Meningkatkan Upaya Pembinaan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak (<i>Tjiptardjo Pronohartono</i>)	40
Peranan Lembaga Swadaya Masyarakat dalam Meningkatkan Upaya Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak (<i>M. Yani</i>)	47
Peluang Kerjasama Penelitian Bidang Veteriner pada Tingkat Internasional (<i>Jan Nari</i>)	51
The Application of Serological, Biochemical and Molecular Techniques for The Differentiation of Stocks of <i>Trypanosoma evansi</i> (<i>Tudor W. Jones</i>)	56
Validation of Enzyme Linked Immunosorbent Immunoassays in The Diagnosis and Control of <i>Trypanosoma evansi</i> in South East Asia (<i>A. G. Luckins</i>).....	62
The Development of Vaccines for The Control of <i>Fasciola hepatica</i> Infection in Ruminants (<i>Terry W. Spithill</i>)	69
Residu dan Cemaran dalam Bahan Pangan Asal Hewan (<i>T.B. Murdiati dan Sjamsul Bahri</i>)	74
Application of PCR to The Identification of Sheep Associated MCF Virus (SA-MCF) in Both Natural and Dead End Hosts (<i>H. W. Reid and S. F. Baxter</i>)	82

Potensi pemakaian vaksin gomboro inaktif strain lokal pada ayam broiler yang ditantang dengan virus IBD lapang

(Arini N., Sumpena N.J. dan Pudjiastono) 149

B. Bakteriologi

Diagnosis Enterotoksemia pada Sapi dan Kerbau di Indonesia

✓(L. Natalia) 150✓

Seroepidemiologi Erysipelas pada Babi di Beberapa Daerah di Indonesia

✓(S. Chotiah dan Agus Sudibyo) 154✓

Studi Retrospektif Laboratorik Antraks di Indonesia 1973–1992

✓(M. Bhakti Purwadikarta, S. Hardjoutomo dan E. Martindah) 159✓

Kloning Molekul DNA Genomik *Escherichia coli* Enterotoksigenik Tipe 987p: Sebuah Kajian Mengenai Pengembangan Vaksin Secara Rekayasa Genetik

✓(Kusmiyati, Supar dan G.R. Moekti) 165✓

Distribusi Infeksi *Escherichia coli* Enterotoksigenik pada Anak Babi di Sumatera Utara dan Prospek Pengendaliannya dengan Vaksin

✓(Supar) 173✓

Evaluasi Mengenai Spesifisitas Antibodi Monoklonal K99 Terhadap Antigen Perekatan *Escheri coli* Enterotoksigenik

✓(Gozali Moekti, Supar dan Kusmiati) 180✓

Patogenitas kuman *Mycoplasma gallisepticum* pada ayam potong

✓(Soeripto, M.B. Poerwadikarta dan Z. Layla) 189✓

Vaksin Mati *Mycoplasma gallisepticum* untuk Penanggulangan Penyakit Pernafasan Menahun Kompleks pada Ayam

✓(Soeripto) 197✓

Pereaksi IPB-1 untuk Deteksi Mastitis Sub-klinis

(Mirnawati S., C.S.Leksmono, D.W. Lukman dan M. Fahrudin) 204

Membandingkan Mutu antara Tuberkulin PPD Bovine Buatan Balitvet Bogor dan Tuberkulin PPD Bovine Buatan CSL Melbourne

✓(Suprodjo H. dan Agus Nurhadi) 210✓

Sensitivitas Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dalam Diagnosis Leptospirosis pada Manusia

✓(M.Darodjat) 218

C. Parasitologi

Gambaran Zat Anti *Toxoplasma Gondii* pada Kelompok Dokter Hewan di Jakarta

(C.Kusharyono, W. Cecilia dan T. Indrianto) 219

Potensi Berbagai Penyakit dalam Menurunkan Tingkat Produksi pada Sapi Perah di Kabupaten Sumedang

(N.Supriatna) 223

Penyakit pada Hewan Percobaan di Indonesia yang Dipelihara Secara Konvensional

(Rabea P.J., M. Edhie Sulaksono, Siti Sundari dan Subahagio) 229

EVALUASI MENGENAI SPESIFISITAS ANTIBODI MONOKLONAL K99 TERHADAP ANTIGEN PERLEKATAN *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOKSIGENIK

GOZALI R. MOEKTI, SUPAR dan KUSMIYATI

Balai Penelitian veteriner, Bogor

ABSTRAK

Upaya dalam mengembangkan kualitas piranti diagnostikum untuk penyakit neonatal kolibasilosis pada pedet; antibodi monoklonal-K99 (AbMk-K99) terhadap antigen perlekatan (adhesin) *Escherichia coli* enterotoksigenik tipe K99 telah diproduksi. Spesifisitas AbMk-K99 yang diperoleh telah dievaluasi baik secara koaglutinasi, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), maupun *immunoblotting*. Dalam penelitian ini antigen perlekatan-K99 yang digunakan sebagai imunogen disiapkan dari *E. coli* galur acuan Compton (K12; K99); sedangkan antigen yang dipakai dalam uji spesifisitas AbMk-K99 adalah masing-masing sediaan *E. coli* K99 galur acuan, baik yang homolog (Compton, K12; K99) ataupun yang heterolog (B41), isolat lapang (BL413, G1231, G1150 dan 2631), serta sediaan dari *E. coli* yang negatif K99 yakni tipe K88, F41 dan 987P. Dua dari 20 panel hibridoma yang diperoleh, 1K99-B5 dan 1K99-C9 yang masing-masing terdiri dari 14 dan 10 klon penghasil AbMk-K99, telah terbukti stabil sampai dengan tahap kloning ke-dua. Pada uji koaglutinasi tiga dari 24 AbMk-K99 telah diketahui mampu bereaksi dengan antigen K99, baik yang disiapkan dari galur acuan ataupun dari isolat lapang, tetapi ketiga antibodi tersebut tidak bereaksi dengan kuman yang bersifat negatif K99. Secara ELISA, semua AbMk-K99 yang dihasilkan (24) tampak hanya reaktif terhadap antigen K99. Pada *immunoblotting*, dari ke-24 AbMk-K99 tersebut di atas bereaksi dengan antigen K99 yang memiliki berat molekul antara 16000 sampai 17000 dalton (D).

ABSTRACT

In attempt to develop an improved diagnostic tool for neonatal colibacillosis in calves, monoclonal antibodies (McAb) directed against K99-adhesin derived from a reference strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* (Compton, K12; K99) were produced. Specificity of McAb produced was evaluated using a slide coagglutination test, indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and immunoblotting. Antigens used for the specificity testing were prepared from known *E. coli* K99 of both homologous (Compton, K12; K99) and heterologous (B41), field-isolates (BL413, G1231, G1150 and 2631), and those of known as K99-negative *E. coli* (i.e. types K88, F41 and 987P). The present study resulted in a panel of 20 hybridomas secreting antibodies specific to K99-adhesin. Two of the total hybridomas obtained, 1K99-B5 and 1K99-C9, were cloned consecutively producing 14 and 10 clones, which were then found to be stable up to the second cloning. Of 24 McAbs produced from the total clones, three antibodies were tested using a slide agglutination test and proved to be reactive to K99 antigens prepared either from reference strains or field-isolates, but showed not to be reactive to K99-negative *E. coli*. Based on the indirect-ELISA, all McAbs produced so far were indicated to be only recognise K99 antigens. Moreover immunoblotting undertaken in this study demonstrated that the 24 McAbs identify K99 antigen located at a molecular weight marker ranging from 16000 to 17,000 daltons (D).

PENDAHULUAN

Kolibasilosis pada hewan neonatal merupakan manifestasi dari infeksi *Escherichia coli* enterotoksigenik. Hal tersebut terjadi karena *E. coli* serupa itu memiliki salah satu atau kombinasi dari antigen perlekatan (adhesin) yakni K88, K99, F41 dan 987P, yang berperan sebagai fasilitator patogenesis, sehingga kuman tersebut mampu melakukan perlekatan dengan vilus epitel usus halus hewan penderita dan

kemudian mengeluarkan enterotoksin (Selwood *et al.*, 1975). Dengan demikian keberadaan adhesin dapat dijadikan dasar dalam membedakan *E. coli* patogen dari yang tidak patogen; kemudian diagnosis kolibasilosis neonatal pun pada hakekatnya adalah diferensiasi dari patogenisitas kuman yang didasarkan pada keberadaan adhesin tadi.

Adhesin K99 dapat ditemukan pada bakteri *E. coli* yang enterotoksigenik terhadap pedet, anak domba dan anak babi (Morris *et al.*, 1982).

Diagnosis kolibasilosis neonatal harus senantiasa dilengkapi dengan pemeriksaan laboratorik, karena gejala klinik yang teramati seperti diare, mudah dikelirukan dengan keadaan patologik akibat penyebab lain. Secara teknik laboratorik konvensional tindakan isolasi dan deteksi keberadaan adhesin merupakan upaya penegakan diagnosis yang harus dilakukan. Metode serum koaglutinasi yang dipakai untuk menentukan keberadaan adhesin yang sering dilakukan di beberapa laboratorium, masih menggunakan antibodi poliklonal anti adhesin (Supar *et al.*, 1991). Walaupun masih dianggap cukup efektif, cara tersebut memerlukan waktu dan kurang sensitif, karena titer antibodi di dalam antisera yang digunakan sebagai reagensia, umumnya menurun akibat dari perlakuan absorpsi sebagai upaya dalam meningkatkan spesifisitas antibodi terhadap satu jenis adhesin (Morris *et al.*, 1985).

Antibodi monoklonal (AbMk), yang sengaja diproduksi untuk dapat menghasilkan titer yang optimal dan hanya mengenal satu jenis determinan antigenik atau epitop, memberikan spesifisitas yang tinggi dalam reaksi imunologi. Beberapa peneliti terdahulu melaporkan bahwa AbMk terhadap adhesin K99 telah dibuat (Sherman *et al.*, 1983) dan dicoba dalam memperbaiki metode pewarnaan histologik sediaan usus hewan tertular kolibasilosis neonatal (Morris *et al.*, 1985). Kemudian secara komersial, kit diagnostikum yang menggunakan AbMk untuk deteksi K99 di dalam sediaan feses tersedia di pasaran (Thorns *et al.*, 1986) dan diimpor dari luar negeri. Piranti tersebut sangat praktis, karena dapat digunakan secara langsung di lapangan. Dengan piranti semacam itu diagnosis kolibasilosis neonatal dapat dilakukan dalam tempo yang relatif lebih cepat dan dapat menunjukkan hasil diagnosis yang lebih akurat. Akan tetapi jika kita hanya mendatangkan dan menggunakan produk luar negeri tersebut, tentu akan menciptakan jenis ketergantungan baru terhadap barang impor. Hal demikian

mungkin dapat dicegah melalui upaya dalam meningkatkan dan mengembangkan produk dalam negeri sendiri. Pada kesempatan ini diutarakan hasil kajian mengenai produksi dan evaluasi AbMk anti K99 dengan harapan dapat menunjang upaya dalam memperbaiki metodologi diagnosis kolibasilosis.

BAHAN DAN CARA

Escherichia coli

Escherichia coli yang digunakan di dalam penelitian ini terdiri dari galur acuan positif adhesin K99 yakni Comptom (K12;K99) dan B41 (O101;K99;F41) yang diperoleh dari *Institute of Medical and Veterinary Science, Adelaide, Australia*; isolat lapang BL413 (O64;K99), G1150 (O101;K99;F41), G1231 (K88;K99) dan 2631 (K99), serta beberapa isolat *E. coli* yang negatif adhesin K99 yakni tipe K88 (galur acuan G7 dan isolat lapang B881), tipe 987P (galur acuan Moon 987P dan isolat lapang 1078), serta tipe F41. Bakteri tersebut di atas saat ini dapat diperoleh dari koleksi *Balivvet Culture Collection* (BCC) yang telah berupa awetan beku-kering produk BCC sendiri.

Pembuatan suspensi adhesin K99, K88 dan F41

Antigen yang berupa suspensi adhesin *E. coli*, baik yang digunakan dalam uji *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) tak langsung, *immunoblotting* ataupun imunisasi mencit galur Balb/C, disiapkan menurut prosedur sesuai dengan yang diterangkan Supar (1990). Galur acuan *E. coli* ditumbuhkan pada medium agar *slope* Minca+Is (Guinee *et al.*, 1977) dan dieramkan pada suhu 37°C, semalam.

Hasil pupukan tersebut selanjutnya dipakai untuk menginokulasi medium agar di dalam cawan petri Minca+Is yang kemudian dieramkan seperti diterangkan di atas. Setelah itu, pupukan kuman dipanen menggunakan *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,2 steril. Suspensi kuman yang didapat kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rotasi per menit (rpm) selama 20 menit. Pelet kuman yang diperoleh dicuci tiga kali menggunakan PBS dan disentrifugasi ulang seperti telah diterangkan di atas. Pelet kuman yang telah dicuci tersebut disuspensikan di dalam PBS sampai memiliki konsentrasi yang sebanding dengan tabung standar MacFarland No. 10. Suspensi kuman tersebut selanjutnya dipanaskan pada temperatur 60°C selama 20 menit, disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit, dan supernatan yang terjadi dipisahkan. Keberadaan adhesin K99 di dalam supernatan yang diperoleh selanjutnya diperiksa secara koaglutinasi.

Sebanyak 20 ml amonium sulfat jenuh ditambahkan ke dalam 20 ml supernatan yang didapat dari perlakuan di atas, sambil diaduk menggunakan pemutar magnetik selama 15 menit dan disimpan pada temperatur 4°C semalam. Presipitat yang terjadi dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 20 menit. Setelah itu supernatan dibuang dan pelet yang diperoleh disuspensikan di dalam 10 ml PBS. Perlakuan tersebut dikerjakan dua kali, sebelum suspensi yang didapat didialisis terhadap masing-masing PBS semalam pada 4°C, terhadap larutan salin normal selama 3 jam, dan terhadap air suling selama 3 jam. Setelah itu suspensi adhesin hasil dialisis disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Keberadaan adhesin di dalam supernatan yang diperoleh diperiksa kembali secara koaglutinasi, sebelum disimpan pada temperatur 4°C sampai digunakan baik sebagai antigen ELISA ataupun imunogen pada penyuntikan mencit galur Balb/C.

Pembuatan hibridoma

Prosedur pembuatan hibridoma pada penelitian ini mengikuti metode yang telah dilaporkan oleh Moekti (1992) dengan sedikit modifikasi dalam protokol imunisasi hewan. Setiap mencit Balb/C jantan dewasa disuntik secara intraperitoneal (ip) dengan imunogen berupa suspensi kuman *E. coli* galur acuan Compton (K12;K99) hidup mengandung 0.25×10^6 sel bakteri per ml. Pada hari ke 14, penyuntikan kedua secara ip dilakukan dengan menggunakan imunogen berupa suspensi adhesin K99. Pada hari ke-30, penyuntikan berikutnya secara intravenus (iv) dilakukan dengan menggunakan suspensi adhesin yang sama seperti di atas. Empat hari sesudah injeksi terakhir, limpa mencit tersebut diambil secara aseptik dan diproses menjadi suspensi *lymphoblast B* (suspensi splenosit). Suspensi splenosit yang diperoleh selanjutnya difusikan dengan sel lestari mieloma SP2/0 dengan bantuan "poly-ethylene glycol 1500" (PEG 1500) (BDH Ltd., Poole, England) sesuai dengan metode Kohler dan Milstein (1975). Sel hibrida (hibridoma) yang stabil akan diperoleh setelah ditumbuh-kembangkan secara *in vitro* di dalam medium *Dubelco's modified Eagle* (DME) (Sigma Chemicals Co., USA) dengan suplementasi 10% (v/v) *foetal calf serum* (FCS) (CSL, Australia) serta dieramkan pada temperatur 37°C di dalam inkubator beratmosfir CO₂ 5%. Hibridoma yang mampu memproduksi antibodi anti-K99 diuji secara serologik dengan metode ELISA (Supar dan Hirst 1991a;1991b). Pengujian tersebut dilakukan terhadap supernatan dari biakan sel hibridoma yang tampak tumbuh sampai pada hari ke 14 pasca fusi. Sel-sel hibridoma yang menghasilkan antibodi spesifik terhadap antigen K99, ditumbuh-kembangkan lebih lanjut di dalam medium sel kultur seperti yang dijelaskan di atas. Kloning hibridoma dengan metode pelarutan terbatas

(Lovborg, 1982) dilakukan sehingga dihasilkan klon hibridoma terpilih yang akan dijadikan bibit penghasil antibodi monoklonal.

Uji koaglutinasi

Pada uji koaglutinasi ini suspensi *Staphylococcus aureus* strain Cowan I dipakai sebagai reagensia koaglutinasi. Reagensia tersebut dibuat menurut prosedur yang dilaporkan Supar (1990). Uji koaglutinasi dilaksanakan sebagai berikut. Sebanyak satu loop pupukan *E. coli* disuspensikan di dalam dua tetes larutan NaCl 0.85 % secara terpisah pada satu gelas objek. Setetes campuran, yang disiapkan dari 0,1 ml antibodi monoklonal yang akan diuji dan 0,9 reagensia koaglutinasi yang telah dieramkan pada suhu kamar selama 3 jam, kemudian ditambahkan kepada salah satu dari suspensi *E. coli* tadi; sementara itu satu tetes suspensi lainnya tidak ditambah apapun dan dibiarkan sebagai kontrol negatif. Setelah diaduk dan digoyang secara perlahan selama 15 sampai 30 detik, reaksi aglutinasi diperiksa.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Pengujian spesifikasi antibodi dengan metode ELISA dilakukan berdasarkan prosedur sesuai yang telah dilaporkan Supar dan Hirst (1991a; 1991b). Antigen ELISA yang mengandung adhesin K99 disiapkan baik dari *E. coli* galur acuan homolog Compton (K12;K99), galur acuan heterolog B41 dan B117, maupun isolat lapang BL413 dan G1231. Sedangkan antigen ELISA yang tidak mengandung adhesin K99 disiapkan dari *E. coli* negatif K99 yakni tipe K88, F41 dan 987P. Konsentrasi tiap antigen ELISA yang digunakan berkisar antara 3 - 5 g per ml per lubang cawan mikrotiter ELISA yang memiliki dasar lubang berbentuk-U (Nunc, Denmark). Bufer karbonat-bikarbonat pH 9.6

dipakai sebagai *coating buffer*, sedangkan bufer tris-EDTA-NaCl yang mengandung 0,05 % Tween 20 dan 0,2 % casein (TEN-TC) digunakan sebagai pelarut, baik antibodi maupun konjugat anti IgG mencit (Bio-Rad Laboratories, USA). Kemudian substrat yang digunakan adalah 1,04 mM 2,2'-azino-di-3 ethylbenzothiazoline-6-sulfuric acid (ABTS) (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) di dalam bufer sitrat pH 4,2. Pembacaan densitas optikal (OD) dilakukan menggunakan ELISA plate reader Titertek Multiskan MK II (Flow Laboratories, Finland) pada panjang gelombang 414 nm. Kontrol konjugat, kontrol negatif dan positif selalu disertakan pada setiap cawan mikrotiter ELISA.

Immunoblotting

Suspensi adhesin dipisahkan secara elektroforesis gel poliakrilamida sodium deodesil sulfat (SDS-PAGE) menggunakan aparatus elektroforesis gel vertikal mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), yang dioperasikan pada tegangan 100 volt selama lebih kurang 45 menit. Setelah itu adhesin yang terdapat di dalam gel poliakrilamida ditransfer (*trans-blotting*) pada membrana *nitrocellulose* berpori-pori 0.2m (Sigma Chemical Co., USA) di dalam bejana mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Membrana *nitrocellulose* hasil *transblotting* di atas selanjutnya direndam selama 30 menit di dalam bufer TEN-Tween mengandung casein 0.2%, dan perendaman membrana tersebut dilanjutkan di dalam antibodi yang akan diuji selama satu jam pada suhu ruangan. Membrana selanjutnya dicuci tiga kali dengan PBS-Tween, dan setelah itu direndam selama satu jam di dalam larutan konjugat anti IgG mencit yang dirumut dengan enzim *horseradish peroxidase* (HRP) (Bio-Rad Laboratories, USA). Pencucian seperti yang telah diterangkan di atas kembali dilakukan, sebelum membrana direndam selama 5 sampai

15 menit di dalam larutan substrat 3,3'-diamino-benzidine (DAB) (Sigma Chemical Co., USA) dalam bufer sitrat pH 4,2. Membrana tersebut akhirnya dicuci dengan air dan dikeringkan di atas kertas saring.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 20 panel hibridoma telah diperoleh pada percobaan ini. Dua di antaranya, 1K99-B5 dan 1K99-C9, telah dikloning dan menghasilkan masing-masing 14 dan 10 klon yang nampak stabil serta memproduksi antibodi. Dari 24 AbMk yang diperoleh tiga diantaranya, 2K99-C9A7, 2K99-C9C4 dan 2K99-C9C5, telah diuji secara koaglutinasi terhadap galur acuan *E. coli* positif K99 galur acuan yakni Compton

(K12;K99) dan B41 (O101;K99;F41), isolat lapang yakni asal babi BL413 (O64;K99), G1150 (O101;K99;F41) dan asal sapi 2631 (K99), serta *E. coli* negatif K99 yakni tipe K88 (B881 dan G7), tipe 987P (1078 dan Moon 987P) dan tipe F41. Hasil pengujian koaglutinasi tersebut disajikan di dalam Tabel 1 dan 2.

Pada pengujian tersebut tidak terdapat reaksi silang dengan antigen yang berasal dari *E. coli* negatif K99. Bukti lain yang lebih menegaskan spesifisitas antibodi yang diuji terhadap adhesin K99 yakni ketidak terjadinya koaglutinasi antara AbMk dengan semua isolat *E. coli* yang ditumbuhkan pada suhu 18°C. Pada suhu demikian (18°C) telah diketahui bahwa adhesin K88, K99, F41, dan 987P tidak akan terbentuk karena tidak terekspresikan (Sherman *et al.*, 1983).

Tabel 1. Hasil pengujian koaglutinasi tiga antibodi monoklonal anti adhesin K99 terhadap *Eschericia coli* enterotoksigenik baik galur acuan maupun isolat lapang yang ditumbuhkan pada suhu 37°C dan 18°C^{a)}

Kode Klon hibridoma penghasil antibodi	<i>E. coli</i> galur acuan				<i>E. coli</i> isolat lapang			
	Compton		B41		Asal babi		Asal sapi	
	(K12;K99)		(K99;F41)		BL413 (K99)		2631 (K99)	
	37°C	18°C	37°C	18°C	37°C	18°C	37°C	18°C
2K99-C9A7	+	-	+	-	+	-	+	-
2K99-C9C4	+	-	+	-	+	-	+	-
2K99-C9C5	+	-	+	-	+	-	+	-

^{a)}Pada suhu 18°C adhesin K88, K99, F41, dan 987P tidak akan terekspresikan oleh *E. coli* yang bersangkutan

+ = terjadi koaglutinasi

- = tidak terjadi koaglutinasi

Tabel 2. Hasil pengujian koaglutinasi tiga antibodi monoklonal anti adhesin K99 terhadap *Eschericia coli* enterotoksigenik baik galur acuan maupun isolat lapang yang ditumbuhkan pada suhu 37°C dan 18°C^{a)}

Kode Klon hibridoma penghasil antibodi	<i>E. coli</i> galur acuan				<i>E. coli</i> isolat lapang					
	G7 (K88)		M987P (987P)		B881 (K88)		1078 (987P)		R57 (F41)	
	37°C		37°C		37°C		37°C		37°C	
	18°C	37°C	18°C	37°C	18°C	37°C	18°C	37°C	18°C	37°C
2K99-C9A7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2K99-C9C4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2K99-C9C5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = terjadi koaglutinasi

- = tidak terjadi koaglutinasi

Dengan metode ELISA semua AbMk (24) yang didapat pada penelitian ini terbukti mampu bereaksi dengan beberapa sediaan antigen yang disiapkan dari *E. coli* positif adhesin K99 (galur Compton, G1150, BL413, dan G1231), tetapi tidak mampu mengenal sediaan antigen yang disiapkan dari kuman negatif adhesin K99 (tipe K88 dan 987P). Hal tersebut dapat dilihat dari jarak yang cukup jauh antara angka densitas optikal (OD) ketika AbMk direaksikan dengan antigen K99 dan nilai OD ketika AbMk yang sama direaksikan dengan masing-masing antigen K88 dan 987P. Bahkan seluruh nilai OD yang dikategorikan non-reaktif tersebut selalu lebih rendah dari pada nilai rata-rata angka OD serum kontrol negatif yang telah ditambahkan dengan 3 kali nilai standar deviasi $\{0,033 + 3 (0,004)\}$

(Cousins dan Robertson, 1986). Hasil pengujian reaktivitas AbMk secara ELISA tersebut disajikan di dalam Tabel 3 dan 4.

Berdasar pada angka OD uji ELISA yang dilakukan, titer antibodi yang terdapat di dalam medium penumbuh klon hibridoma (supernatan) cukup bervariasi, dan pada umumnya menunjukkan angka OD yang sebanding dengan atau bahkan lebih rendah dari pada angka OD serum hiperimun yang diencerkan 1:100. Hal ini wajar karena produksi AbMk di dalam sel kultur umumnya hanya menghasilkan antibodi berkisar antara 1 - 5 g imunoglobulin per ml (Zola, 1988). Untuk keperluan penggunaan AbMk dalam uji serologik seperti ELISA, uji aglutinasi dan pewarnaan histologik, konsentrasi antibodi hasil produksi secara *in vitro* seperti diterangkan

Tabel 3. Reaktivitas 24 antibodi monoklonal terhadap antigen (adhesin) yang disiapkan dari *Escherichia coli* positif K99

Panel hibridoma	Klon hibridoma	Densitas optikal (OD) terhadap antigen ELISA			
		Compton (K12;K99)	G1150 (K99;F41)	BL413 (O64;K99)	G1231 (K88;K99)
1K99-B5	2K99-B5A2	2,188	1,822	2,041	1,243
	2K99-B5A4	2,051	1,761	1,142	1,406
	2K99-B5B5	2,238	1,549	0,872	0,448
	2K99-B5B11	1,925	1,256	1,139	1,512
	2K99-B5C1	1,920	1,141	1,104	1,358
	2K99-B5C7	2,246	1,893	1,591	1,392
	2K99-B5D6	1,741	1,822	0,647	0,700
	2K99-B5D12	1,951	2,054	1,311	1,272
	2K99-B5E3	2,406	2,137	1,476	0,985
	2K99-B5E5	1,209	0,998	0,700	0,960
	2K99-B5F6	2,096	1,972	1,548	1,159
	2K99-B5F8	2,103	2,045	1,492	1,428
	2K99-B5G9	2,041	2,112	1,272	1,075
	2K99-B5H10	2,062	2,117	1,079	1,472
1K99-C9	2K99-C9A2	1,484	1,216	1,130	0,899
	2K99-C9A3	1,844	1,671	1,162	1,178
	2K99-C9A7	0,399	0,821	0,760	0,889
	2K99-C9A9	2,191	2,224	1,263	1,101
	2K99-C9B11	2,103	2,069	1,728	1,249
	2K99-C9C4	0,896	1,126	1,034	1,199
	2K99-C9C5	2,057	1,937	1,129	1,075
	2K99-C9D7	1,042	1,002	0,927	0,551
	2K99-C9E2	2,141	2,069	1,536	1,104
	2K99-C9E1	1,700	1,811	1,382	1,427

di atas sudah cukup memadai; akan tetapi untuk kepentingan terapeutik seperti yang pernah dilakukan Sherman *et al.*, (1983), konsentrasi imunoglobulin yang lebih tinggi akan diperlukan; dan cara mendapatkan AbMk yang berkonsentrasi imunoglobulin yang cukup tinggi, metode produksi secara *in vivo* menggunakan mencit Balb/C yang telah diimunosupresikan dapat ditempuh.

Analisis mengenai spesifitas AbMk secara *immunoblotting* menunjukkan bahwa semua antibodi yang didapat hanya mampu bereaksi dengan adhesin yang disiapkan dari *E. coli* positif K99. Bahkan seluruh AbMk tersebut hanya mampu mengenal antigen K99 yang

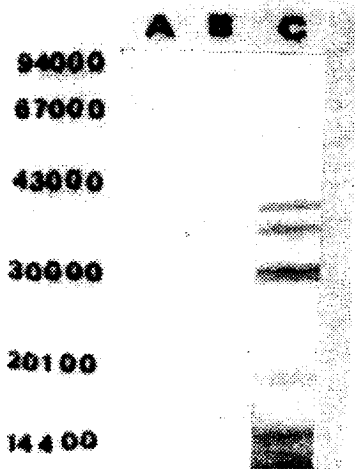
memiliki berat molekul lebih kurang 16436 dalton (Gambar 1). Angka yang didapat pada percobaan ini mungkin menunjukkan berat molekul adhesin K99, akan tetapi menurut laporan terdahulu (Gaastra dan de Graaf, 1982; Dougan dan Morrissey, 1984/85) berat molekul adhesin K99 berkisar antara 18400 sampai 18500 D. Dengan demikian terdapat perbedaan sekitar 1000 D, yang mungkin disebabkan karena acuan atau standar berat molekul yang digunakan sebagai pembanding pada penelitian ini relatif sangat kasar. Pengkajian mengenai reaktivitas AbMk terhadap berat molekul K99 perlu dilakukan lebih lanjut.

Tabel 4. Reaktivitas 24 antibodi monoklonal terhadap adhesin K99 maupun terhadap adhesin yang disiapkan dari *Escherichia coli* negatif K99

Panel hibridoma	Klon hibridoma	Densitas optikal (OD) terhadap antigen ELISA			
		K99 ^{a)}	K88	987P	F41
1K99-B5	2K99-B5A2	1,823	0,030	0,031	bd
	2K99-B5A4	1,590	0,027	0,022	bd
	2K99-B5B5	1,277	0,032	0,026	bd
	2K99-B5B11	1,458	0,010	0,007	bd
	2K99-B5C1	1,381	0,033	0,031	bd
	2K99-B5C7	1,780	0,018	0,013	bd
	2K99-B5D6	1,227	0,025	0,018	bd
	2K99-B5D12	1,647	0,030	0,033	bd
	2K99-B5E3	1,751	0,032	0,025	bd
	2K99-B5E5	0,966	0,031	0,020	bd
	2K99-B5F6	1,693	0,022	0,017	bd
	2K99-B5F8	1,767	0,033	0,010	bd
	2K99-B5G9	1,625	0,019	0,024	bd
	2K99-B5H10	1,682	0,011	0,006	bd
1K99-C9	2K99-C9A2	1,182	0,008	0,015	bd
	2K99-C9A3	1,464	0,002	0,010	bd
	2K99-C9A7	0,717	0,001	0,003	bd
	2K99-C9A9	1,694	0,012	0,006	bd
	2K99-C9B11	1,787	0,031	0,027	bd
	2K99-C9C4	1,063	0,006	0,011	bd
	2K99-C9C5	1,549	0,008	0,015	bd
	2K99-C9D7	0,880	0,019	0,014	bd
	2K99-C9E2	1,712	0,027	0,010	bd
	2K99-C9E1	1,580	0,014	0,021	bd

^{a)} Antigen K99 campuran dari adhesin yang disiapkan baik dari *E. coli* galur acuan (Compton) maupun isolat lapang (BL413, G1150 dan G1231)

bd = belum dilakukan



Gambar 1. Gambar imunoblot antigen K99 yang dilacak baik dengan monoklonal antibodi (kolom B) dan poliklonal antibodi (kolom C) anti adhesin K99, sedangkan kolom A adalah acuan berat molekul

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan atas dana yang disediakan melalui Proyek Pembangunan Penelitian Pertanian Nasional (P4N) atau *Agricultural Research Management Project* (ARMP), Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian. Untuk itu ucapan terimakasih disampaikan terutama kepada penyelenggara proyek ARM. Selanjutnya atas segala bantuan teknis dalam penelitian ini, ucapan yang sama juga disampaikan kepada Mamak.A. Malik, Jaenal Islam, Suryono, Nina Kurniasih dan Jaenuri.

DAFTAR PUSTAKA

Cousins D.V. and Robertson G.M. 1986. Use of enzyme immunoassay in a serological survey of leptospirosis in sheep. *Aust. Vet. J.* 63: 36-39

- Dougan G. and Morrissey P. 1984/85. Molecular analysis of the virulence determinants of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from domestic animals: applications for vaccine development. *Vet. Microbiol.* 10: 241-257
- Gaastera W. and de Graaf F.K. 1982. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* 46: 129-161
- Guinee P.A.M., Veldkamp J. and Jansen W.H. 1977. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 15: 676-678
- Kohler G. and Milstein C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256:495-7
- Lovborg U. 1982. *Monoclonal Antibodies: Production and Maintenance*. William Heinemann Medical Books, London
- Moekti G.R. 1992. The production and characterization of monoclonal antibodies directed against *Leptospira interrogans* serovar *pomona*: attempts to improve the diagnosis of porcine leptospirosis. In: *Proceedings of a workshop on agricultural biotechnology held on May 21-24, 1991 in Bogor-Indonesia*, pp: 235-242 (eds S. Brotonegoro, J. Dharma, L. Gunarto, and M. Kosim Kardin). Central Research Institute for Food Crops, Agency for Agricultural Research and Development, Ministry of Agriculture-Republic of Indonesia
- Morris J.A., Thorns C.J. and Boarer C. 1985. Evaluation of a monoclonal antibody to the K99 fimbrial adhesin produced by *Escherichia coli* enterotoxigenic for calves, lamb and piglets. *Res. Vet Sci* 39: 75-79
- Morris J.A., Sojka W.J. and Wells G.A.H. 1982. K99 and 987P adhesins on *Escherichia coli* enterotoxigenic for piglets. *Vet. Rec.* 111: 165-166
- Sellwood R., Gibbons R.A., Jones G.W. and Rutter J.M. 1975. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to pig intestinal brushborders: the existence of two pig phenotypes. *J. Med. Microbiol.* 8: 405-411
- Sherman D.M., Acres S.D., Sadowaki P.L., Springer J.A., Bray B., Raybould T.J.G. and Muscoplat C.C. 1983. Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *Escherichia coli* K99-specific monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 42: 653-658
- Supar. 1990. Enteric colibacillosis in pigs (and calves) in Indonesia. PhD thesis at the Graduate School of Tropical Veterinary Science, James Cook University of North Queensland
- Supar, Hirst R.G. and Patten B.E. 1991. The importance of enterotoxigenic *Escherichia coli* containing the 987P

- antigen in causing neonatal colibacillosis in piglets in Indonesia. *Vet. Microbiol.* 26: 393-400
- Supar and Hirst R.G. 1991a. Development of whole cell vaccines from *Escherichia coli* bearing K88, K99, F41 and 987P fimbrial antigens: studies on the immunogenicity of the fimbrial antigens. *Penyakit Hewan* 23 (41): 1-10
- Supar and Hirst R.G. 1991b. Development of whole cell vaccines from *Escherichia coli* bearing K88, K99, F41 and 987P fimbrial antigens: the relationship between colostral IgA and IgG antifimbrial antibodies and protection. *Penyakit Hewan* 23 (42): 1-11
- Thorns C.J., Nolan A., Boarer C.D.H. and Roeder P.L. 1988. Monoclonal antibodies in the diagnosis of infectious diseases. In *Immunoassays for Veterinary and Food Analysis-1*, pp.77-91 (eds B.A. Morris, M.N. Clifford and R. Jackman). Elsevier Applied Science, London
- Zola H. 1988. Monoclonal antibody production. In: *ELISA Technology in Diagnosis and Research*, pp:75-82 (ed G.W. Burgess). Graduate School of Tropical Veterinary Science, James Cook University of North Queensland