

STUDI PEMBUATAN PPD TUBERKULIN *MYCOBACTERIUM AVIUM*

SUPAR, M. BHAKTI POERWADIKARTA dan M. SOEROSO

Balai Penelitian Penyakit Hewan, Bogor

ABSTRACT

A purified protein derivative (PPD), avian tuberculin, was produced under laboratory conditions at the Research Institute for Animal Disease, Bogor, using a highly cultivated D₄ER strain of *Mycobacterium avium*. To assess this biological product as a diagnostic agent, it was tested in experimental chickens. Twenty four five month old chickens which reacted negatively to PPD tuberculin were divided into four groups. The first, second and third groups were inoculated intramuscularly with viable strains of *M. Avium* (D₄ER, Yogya isolate and 661 Bakitwan Culture Collection). The fourth group of chickens were not inoculated and were used as a control. Four and six weeks after inoculation, the chickens which survived and the control group were tested with PPD tuberculin. Tuberculin was injected intradermally at the wattle, using a tuberculin syringe (1-ml capacity). The observations for determining reactors were made 48 hours following the injection of tuberculin. The inoculated chickens were positive reactors and the control group were negative reactors. The results of this experiment suggest that PPD avian tuberculin can be used as a diagnostic agent to identify *M. avium* infection in poultry.

PENDAHULUAN

Mycobacterium avium merupakan penyebab penyakit tuberkulosis pada ayam atau jenis unggas lainnya. Tuberkulosis pada unggas pertama kali dilaporkan oleh Pernot di Oregon, U.S.A., tahun 1900 (Stubbs, 1928). Tuberkulosis pada ayam mempunyai arti penting ditinjau dari segi kesehatan unggas yang dibudidayakan, segi ekonomik dan segi kesehatan manusia, karena produk-produk dari ayam atau jenis unggas lainnya untuk kepentingan manusia. Selain ternak unggas, ternak babi rentan terhadap infeksi *M. avium* (Merchant dan Packer, 1956; Hungerford, 1975; Kleeberg, 1981).

Purified protein derivative (PPD) merupakan suatu produk biologik yang dapat dipakai untuk mendeteksi atau mendiagnosa adanya infeksi *M. avium* pada unggas atau jenis ternak lainnya (Youmans, 1979). PPD merupakan protein yang disintesis oleh bakteri tersebut yang ditumbuhkan dalam kultur media yang tidak mengandung protein. Sebagai sumber nitrogen (N) untuk pertumbuhan bakteri tersebut ialah asparagin. Agar supaya tidak tercemari oleh protein lain, kuman *M. avium* telah diadakan beberapa kali sub-kultur pada media yang sama dengan media untuk pembuatan PPD tuberkulin.

Pembuatan tuberkulin pertama kali dilakukan oleh Koch tahun 1891, yang dinamakan "Old tuberculin" untuk mendiagnosa infeksi *M. tuberculosis* pada manusia. Bahan ini berasal dari kultur/biakan cair *M. tuberculosis*, filtrat yang diperoleh dari biakan cair diuapkan dengan pemanasan sampai pada kepekatan tertentu, kemudian ditambah gliserin. Sekitar tahun 1934 dimulai penggunaan ammonium sulfat untuk mengendapkan protein. Sesudah diendapkan kemudian dimurnikan, didialisis dan distandarasi jumlah proteinnya. Produk biologik ini dina-

makan "purified protein derivative" (PPD tuberkulin). Sebagai bahan diagnostikum PPD tuberkulin ini lebih efektif dibandingkan "old tuberculin" (Seibert cited Youmans, 1979).

Data tuberkulosis pada unggas di Indonesia belum banyak terungkap, oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan suatu hasil penelitian pembuatan PPD tuberkulin jenis avian, bertujuan untuk mendapatkan bahan diagnostikum untuk mendeteksi adanya tuberkulosis pada unggas. Dalam penelitian ini dipakai "trichlor-acetic acid" untuk mengendapkan protein dari filtrat biakan *M. avium*.

BAHAN DAN CARA

- A. Bahan-bahan dan peralatan :
 - Kultur murni *M. avium*, strain D₄ER, isolat Yogya dan Bakitwan Cultur Collection (BCC) no. 661.
 - Alat pengukur pH, lemari pengeram, alat pengaduk (stirrer), pompa isap, sentrifuse, sentrifuse super Sharple's dan perlengkapan.
 - Berbagai macam peralatan gelas untuk tempat media.
 - Bahan kimia seperti: asparagin, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Sodium citrate, Mg SO₄, Ferri citrate, glukosa, gliserin, Na₂HPO₄ 12 H₂O, NaCl NaOH.
 - Air suling dan bahan kimia lainnya.
- B. Komposisi beberapa larutan.
 1. Dipersiapkan kultur media cair untuk *M. avium* atau media PPD (media Dorset dan Henley) dengan ukuran 200 ml. dan 500 ml., formula seperti yang ditulis oleh Supar dan Ibrohim 1981.

2. Larutan bufer untuk pelarut protein :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	7,2	gram
KH_2PO_4	3,62	gram
Air suling	1000	ml.
3. Larutan anti bakterial

Phenol 83%	30	ml.
Gliserin	500	ml.
NaCl.	25	gram
Air suling	1000	ml.
4. Larutan pengencer (diluent).

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	7,2	gram
KH_2PO_4	3,62	gram
Gliserin	100	ml.
Air suling	1000	ml.

Semua larutan tersebut dipersiapkan dalam keadaan steril sebelum dipakai.

C. Cara kerja

- Botol-botol yang berisi media PPD volume 200 ml. diinokulasi *M. avium*, D₄ER. 2 sampai 3 subkultur.
- Kultur yang terakhir untuk inokulasi media PPD yang volumenya 500 ml.
- Sesudah diinokulasi, dieramkan di dalam lemari pengeram pada suhu 37°C selama 10 - 12 minggu
- Setelah jangka waktu pengeraman cukup, semua botol biakan cair tersebut dikontrol kemurniannya, dengan menumbuhkan (diinokulasikan pada media agar alkalis). Selanjutnya botol-botol kultur dipanaskan dalam sterilisator uap panas suhu 100°C (steam sterilizer) selama 2 jam.
- Bila kultur yang telah dimatikan ternyata murni, disaring, yang tidak murni dibuang. Penyaringan pertama dengan kain saring, kemudian dengan kertas saring, Ampas atau sisa sel kuman dibuang. Filtrat yang akan diendapkan adalah proteinnya.
- Filtrat diendapkan dengan trichlor-asetic acid (TAA) 40 % dengan perbandingan 9 bagian filtrat dan 1 bagian TAA 40 %
- Filtrat ditempatkan di dalam botol yang tahan asam, TAA 40 % ditambahkan ke dalamnya sedikit demi sedikit, sambil diaduk dengan pengaduk listrik.
- Setelah asam dan filtrat bercampur rata (tampak endapan yang homogen), maka campuran didiamkan antara 1 - 2 jam, agar supaya endapan protein turun ke dasar botol
- Setelah endapan mengumpul di bagian dasar botol, cairan bagian atas (supernatan) dipisahkan pelan-pelan, diisap dengan pompa isap. (Sampai pada tingkatan ini endapan protein dapat disimpan di dalam lemari es, diteruskan pada hari berikutnya).
- Endapan protein yang diperoleh harus dibersihkan dari sisa-sisa TAA. Endapan protein yang masih bercampur dengan TAA ini dipusingkan dengan sentrifuse kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, endapan protein lebih memadat didasar tabung sentrifuse, cairan supernatan dibuang sangat mudah.
- Endapan protein yang diperoleh dicuci dengan suspensi TAA ½ % (dilarutkan dan disentrifus lagi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 - 20 menit; supernatan dibuang, endapan dilarutkan lagi kedalam TAA ½ %. Langkah ini dilakukan sampai 3 kali ulangan.
- Endapan pada pencucian terakhir, dicuci dengan larutan NaCl 5 %, perlakuan ini diulangi 3 kali.
- Endapan terakhir dilarutkan pada pelarut protein (bufer fosfat steril, butir B.2) dengan volume 1/40 dari cairan kultur media asal yang idak tercemar. Umpama 250 ml. bufer fosfat untuk setiap endapan dari filtrat yang berasal dari volume media awal 10 liter
- Ditambah larutan phenol anti bakterial (butir B.3) sebanyak 1/5 dari jumlah konsentrat yang akan dibuat.
- Selanjutnya ditambah suspensi pelarut protein bufer fosfat (butir B.2) sampai mencapai volume 1/10 dari volume filtrat (sebelum dibubuhi TAA).
- pH suspensi PPD disesuaikan menjadi netral (pH 7) dengan NaOH 40 %, sampai tingkat ini merupakan PPD tuberkulin pekat.
- PPD tuberkulin pekat yang dihasilkan kemudian dipusingkan dengan ultra sentrifuse Sharple's pada kecepatan 45.000 rpm selama 2 jam, molekul protein yang relatif besar akan mengendap pada dinding tabung sentrifuse (tidak dipakai), sedangkan molekul protein kecil masih tetap terlarut di dalam cairan yang akan dipakai. Setelah selesai pemusingan cairan dikeluarkan dari tabung pemusing. Apabila memakai sistem pemusing kontinyu, bagian ini akan keluar tetes demi tetes secara kontinyu selama waktu pemusingan.
- Kadar protein (N) dalam PPD pekat dari hasil pemusingan dianalisa. Sampel dari PPD pekat ini dikirimkan ke Balai Besar Industri Hasil Pertanian, Bogor, untuk dimintakan analisa kadar proteinnya (nitrogen). Langkah ini penting untuk menentukan dosis penggunaan.
- Setelah kadar protein (N) larutan PPD pekat diketahui, dapat ditentukan pengeceran la-

rutan PPD pekat dengan larutan pengenceran (butir B.4) untuk memperoleh kadar N dalam larutan PPD yang dikehendaki menurut standar, umpama 1 mg/ml. atau 0,5 mg/ml. yang siap untuk dipakai.

- D. Uji PPD tuberkulin yang dihasilkan
1. Ayam normal umur 5 bulan sebanyak 24 ekor bereaksi negatif terhadap PPD tuberkulin. Ayam tersebut dibagi menjadi 4 kelompok. Empat hari sesudahnya, kelompok 1 diinfeksi secara intramuskuler dengan *M. avium* D₄ER, kelompok 2 diinfeksi dengan *M. avium* isolat Yogya, kelompok 3 diinfeksi dengan *M. avium* 661 BCC dan kelompok 4 tidak diinfeksi, masing-masing kelompok terdiri atas 6 ekor. Ayam tersebut selama dalam percobaan dipelihara didalam kurungan, 2 ekor tiap-tiap kurungan.
 2. Empat minggu dan enam minggu sesudah diinfeksi semua ayam yang masih hidup dituberkulinasi dengan PPD tuberkulin yang dihasilkan dalam percobaan butir C. Tuberkulinasi dilakukan pada jower (wattle) dengan jarum suntik no. 25 - 26 gauge, dan alat suntik ukuran 1 ml. Dosis PPD yang berkadar protein 0,5 mg/ml. ialah 0,1 ml. untuk PPD yang berkadar protein 1 mg/ml ialah 0,05 ml tiap ekor. PPD diinjeksikan ke jaringan intra kutan, apabila cairan PPD tuberkulin masuk maka terjadi benjolan yang berdiameter kurang lebih ½ cm. Penentuan reaksi positif atau negatif ditentukan 48 jam sesudah injeksi, tetapi pengamatan dilakukan 24 jam dan 48 jam sesudah injeksi (Hays, 1928; Karlson, 1972).

HASIL DAN DISKUSI

Pembuatan PPD tuberkulin memerlukan waktu cukup lama, tetapi masih lebih singkat dibandingkan dengan pembuatan glover SM. tuberculin. Dalam pembuatan media Glover diperlukan ekstrak kuman *Mycobacterium* yang telah dikeringkan, kultur untuk memproduksi kuman kering menggunakan media kaldu tuberkulin dan inkubasi biakan ini 12 minggu. Sedangkan waktu pengeraman biakan *Mycobacterium* dalam media PPD dan Glover adalah sama, dengan demikian waktu yang dibutuhkan untuk pembuatan PPD tuberkulin lebih singkat dibandingkan dengan pembuatan Glover SM. (Catatan pedoman kerja lab. tuberkulosis)

Problema kontaminasi kultur atau biakan dalam media PPD sering terjadi pada masa-masa pertengahan pengeraman yang lama, penguapan dapat mempengaruhi pertumbuhan kuman. Dari percobaan - per-

cobaan dapat diperoleh cairan filtrat sebanyak 1/5 bagian dari volume media mula-mula sebelum diinokulasi. Inkubasi yang lebih lama akan mengakibatkan penguapan yang lebih banyak.

PPD tuberkulin yang diperoleh dalam bentuk suspensi pekat kira-kira 1/10 bagian dari volume filtrat diendapkan dengan TAA. Sebagai contoh disini dari 4700 ml cairan filtrat didapatkan 470 ml PPD pekat dengan kadar protein (N) 0,44 % setara dengan kadar (N) 4,4 mg/ml. Dari suspensi PPD tuberkulin pekat ini dapat dibuat suspensi menurut keperluan, dalam percobaan ini dibuat 1 mg/ml. atau 0,5 mg/ml. Uji produk PPD tuberkulin yang dihasilkan pada ayam infeksi buatan dapat dilihat pada tabel 1, sedangkan reaksi positif atau negatif dapat dilihat pada gambar 1 dan 2. Dari hasil percobaan ini PPD tuberkulin yang dihasilkan dapat dipakai untuk deteksi infeksi *M. avium* pada ayam. Dari hasil uji tuberkulinasi ayam percobaan 4 minggu sesudah infeksi sudah terjadi reaksi positif, sedangkan 6 minggu sesudah infeksi semua ayam yang diinokulasi bereaksi positif terhadap PPD tuberkulin yang dibuat dari strain D₄ER. Pengamatan serupa dengan yang dilakukan oleh Stafseth *et al.* 1934 pada penelitiannya mengenai kemungkinan penularan tuberkulosis pada ayam secara vertikal. Oleh sebab itu tuberkulinasi pada ayam merupakan langkah awal usaha deteksi infeksi *M. avium* pada ayam.

Kondisi sebagian besar ayam yang diinfeksi dengan *M. avium* pada waktu 6 minggu post inokulasi seperti terlihat pada gambar 3. Gejala klinis yang sangat menyolok ialah, lumpuh, kurus, berak encer putih, napsu makan turun, jengger pucat, bulu kusut.



Gambar 1. Reaksi PPD tuberkulin positif (jower terjadi pembengkakan maksimal 48 jam sesudah injeksi, menyusut seperti semula pada hari ke 4.



Gambar 2. Reaksi PPD tuberkulin negatif pada ayam kontrol (jeweher kiri) sama dengan jeweher sebelah kanan tidak terjadi pembengkakan.



Gambar 3. Contoh keadaan kondisi ayam yang diinfeksi buatan dengan *M. avium*, strain 661 BCC, 6 minggu sesudah infeksi.

Ayam akhirnya mati. Pengaruh infeksi *M. avium* pada ayam lebih mengarah ke saluran pencernaan tidak pada organ paru-paru. Organ reproduksi menjadi tidak aktif.

KESIMPULAN

Percobaan pembuatan PPD tuberkulin *M. avium*, D₄ER telah dilakukan. Produk biologik ini dapat dipakai untuk deteksi *M. avium* pada ayam infeksi buatan dengan strain yang sama atau strain yang berbeda. Dosis penggunaan 0,1 ml. untuk PPD tuberkulin yang berkadar protein 0,5 mg/ml. atau dengan dosis 0,05 ml. untuk PPD tuberkulinasi intradermik pada jeweher (wattle). Aplikasi pada jaringan lain belum diteliti. Pemantapan cara penggunaan di lapangan dan cara-cara produksi dengan strain lain atau strain lokal masih perlu penelitian lebih lanjut.

Tuberkulinasi pada unggas di masa yang akan datang mempunyai arti penting mengingat tuberkulosis unggas merupakan penyakit zoonosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada Saudara Kepala Balai Besar Industri Hasil Pertanian atas bantuan yang diberikan dalam pemeriksaan kadar protein (N) PPD tuberkulin, semoga kerja sama ini dapat ditingkatkan dalam waktu yang akan datang. Tak lupa kepada para teknisi laboratorium kultur media dan teknisi laboratorium penyakit kronis diucapkan terima kasih dalam membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. HAYS, C.H. 1928. A report of Tuberculin - testing of poultry flocks in Nebraska. J. Am. Vet. Med. Ass. Vol. 72: 880-889.
2. HUNGERFORD, T.G. 1975. Diseases of livestock. Eighth edition. McGraw-Hill Book Co. Sydney, Auckland, New York, London, Johannesburg, Singapore, Panama, Dusseldorf, Sao Paulo, New Delhi, Tokyo. p.: 446-447.
3. KARLSON A.G. 1972. Tuberculosis. In "Diseases of Poultry". Sixth edition. Edited by Hofstads, M.S., B.W. Calnek, C.F. Helmboldt, W.M. Reid and H.W. Yoder, Jr. 1972. The Iowa State University Press. Ames. p. 252-271.
4. KLEEBOEG, H.H. 1981. Epidemiology of Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli in South Africa. Abstract. Vet. Bulletin, Vol. 17. no.6, p.: 109.
5. MERCHANT, I.A. and R.A. PACKER. 1956. Veterinary Bacteriology and Virology. Fifth edition. The Iowa State University Press. Ames. p.: 526-560.
6. STAFSETH, H.Y., R.J. BIGGAR, W.W. THOMPSON and LISA NEU. 1934. The Cultivation and egg-transmission of the avian tubercle bacillus. J. Am. Vet. Med. Ass. Vol. 85: 342-359.
7. STUBBS, E.L. 1928. Avian tuberculosis. J. Am. Vet. Med. Ass. Vol. 72: 631-635.
8. SUPAR dan IBROHIM. 1981. Kultur Media dan Cara Pembuatannya. Pedoman kerja laboratorium Media, Balai Penelitian Penyakit Hewan, Bogor.
9. YOUNG, G.P. 1970. Tuberculosis. W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto. p.: 209-224.
10. Catatan pedoman kerja laboratorium penyakit kronis. Balai Penelitian Penyakit Hewan, Bogor.

Tabel 1. Uji PPD tuberkulin pada ayam percobaan.

Kelompok	Nomer ayam	Infeksi buatan <i>Mycobacterium avium</i>		Reaksi terhadap PPD tuberkulin <i>M. avium</i> D ₄ ER sesudah diinfeksi	
		strain	aplikasi	4 minggu	6 minggu
I	1	D ₄ ER	i.m.	+	+
	2	"	"	*XXX	
	3	"	"	-	++
	4	"	"	+	++
	5	"	"	+	+++
	6	"	"	+	+++
II Yogya	7	isolat	i.m.	-	++
	8	"	"	*XXX	
	9	"	"	+	+++
	10	"	"	+	+++
	11	"	"	+	++
	12	"	"	+	++
III	13	BBC 661	i.m.	+	+++
	14	"	"	+	+++
	15	"	"	-	+++
	16	"	"	+	+++
	17	"	"	+	+++
	18	"	"	+	+++
Kontrol					
IV	19	tidak diinfeksi		-	-
	20	"		-	-
	21	"		-	-
	22	"		-	-
	23	"		-	-
	24	"		-	-

Keterangan: *: mati sebelum dituberkulinsi; - : reaksi tuberkulinsi negatif (tidak terjadi pembengkakan pada jower yang diinjeksi PPD); +, ++, +++ : reaksi positif (terjadi pembengkakan pada jower yang diinjeksi PPD tuberkulin).