

**Prosiding**

**Seminar Nasional**

**Teknologi Peternakan dan Veteriner**

**“Cakrawala Baru IPTEK Menunjang Revitalisasi Peternakan”**

**Bogor, 5-6 September 2006**



Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan  
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian  
Departemen Pertanian  
Bogor

## PENGEMBANGAN TEKNIK DIAGNOSA PARATUBERKULOSIS DENGAN ENZYM LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

(The Development of Diagnosis Technique of Paratuberculosis  
with Linked Immunosorbent Assay Enzyme)

RAHMAT SETYA ADJI

Balai Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114

### ABSTRACT

Paratuberculosis (Johne's Disease) is a chronic granulomatous enteritis disease of ruminants caused by *Mycobacterium paratuberculosis*. The disease spreads by faeces with clinical signs of progressive diarrhoea and weight losses. Diagnostic kit for paratuberculosis testing be needed to control and monitoring. The aim of research for develop of ELISA to diagnosis of paratuberculosis disease. The ELISA was developed have 0,29 of a cut-off value with both positive and negative control be tested by using comercial ELISA kit (IDEXX), showed good result. The result of ELISA 80 serum sample of dairy cattle from Kaliadem, Cangkringan, Sleman, DI Yogyakarta, showed negatif paratuberculosis (mean of OD : 0,162 ± 0,015).

**Key Words:** Paratuberculosis, ELISA

### ABSTRAK

Paratuberculosis (Johne's Disease) adalah penyakit enteritis granulomatik kronik pada ruminansia yang disebabkan oleh *Mycobacterium paratuberculosis*. Penyakit ini menular melalui feses dengan gejala klinik diare progresif dan penurunan berat badan. Perangkat diagnosa untuk pengujian terhadap paratuberculosis sangat diperlukan untuk pengawasan dan pengendalian. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan Kit ELISA untuk diagnosa penyakit paratuberculosis. ELISA yang dikembangkan mempunyai nilai cut-off 0,29 dengan kontrol positif dan negatif kontrol yang diuji dengan menggunakan Kit ELISA komersial (IDEXX) dengan hasil baik. Hasil ELISA dari 80 sampel serum sapi perah dari Desa Kaliadem, Kecamatan Cangkringan, Kabupaten Sleman, DI Yogyakarta, menunjukkan hasil negatif paratuberculosis (rata - rata OD 0,162 ± 0,015).

**Kata Kunci:** Paratuberculosis, ELISA

### PENDAHULUAN

Paratuberculosis atau Johne's disease adalah penyakit enteritis granulomatik kronik pada ternak ruminansia terutama sapi, kambing dan domba yang disebabkan oleh *Mycobacterium paratuberculosis* (OIE, 2000). Penyakit ini dapat ditularkan melalui pakan yang terkontaminasi faeces dari hewan yang sakit dengan gejala klinik diare progresif dan penurunan berat badan. Penyakit ini dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat besar karena terjadi penurunan produksi, penurunan berat badan, meningkatnya hewan yang diafkir dan menyebabkan kematian

(PHILIP, 2000). Paratuberculosis ini dilaporkan sangat populer dan banyak terjadi pada sapi di Australia, New Zaeland, Belanda, Jerman, Denmark, Inggris, Austria, Belgia dan Amerika Serikat. Di Amerikat Serikat, kerugian diperkirakan mencapai US \$ 1,5 milyar setiap tahunnya (COLLIN *et al.*, 1994; FLORON *et al.*, 1999; MILNER, 1990).

*Mycobacterium paratuberculosis* merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang, berukuran kecil dan bersifat tahan asam. Kuman ini umumnya menempati saluran usus, terutama pada pangkal ileum, ileocaecal, batas caecum dan limfoglandula mesenterika (YOKOMIZO, 1997). Gejala klinik penyakit

paratuberkulosis adalah diare dan kurus dengan *feed consumption rate* yang tinggi. Gambaran patologi anatomi yang menciri adalah adanya penebalan dan perlipatan usus terutama pada pangkal ileum. Diagnosa penyakit ini berdasarkan gejala klinik dan ditoguhkan dengan pemeriksaan laboratorium.

Uji serologi yang biasa digunakan untuk diagnosa paratuberkulosis adalah Complement Fixation Test (CFT), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dan Agar Gel immunodiffusion (AGID) untuk mengukur imunitas humoral serta Gamma Interferon untuk mengukur imunitas seluler. ELISA adalah metode yang paling spesifik dan sensitif untuk mengukur titer antibodi paratuberkulosis (OIE 2000).

Kejadian penyakit ini di Indonesia pernah dilaporkan. Selain itu, Indonesia pernah mengimpor sapi dari negara-negara yang tertular oleh penyakit paratuberkulosis. Pada penelitian yang telah dilaksanakan tahun 2003, telah terisolasi kuman *Mycobacterium paratuberculosis*, sedangkan dari hasil uji serologi serum sapi perah, terdapat 1,67% sampel yang positif. Kit ELISA yang kita pakai sekarang ini merupakan produk impor dengan harga yang sangat mahal dan memerlukan waktu untuk mendapatkannya. Karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengembangkan dan membuat Kit ELISA paratuberkulosis sebagai perangkat diagnosa yang mudah dan murah. Hal ini dilakukan untuk mempermudah diagnosa dan pengendalian penyakit paratuberkulosis di Indonesia.

#### MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan di Balai Penelitian Veteriner yang ditunjang dengan pengambilan sampel serum dari peternakan sapi perah di Desa Kaliadem, Kecamatan Cangkringan, Kabupaten Sleman, DI Yogyakarta.

#### Pembuatan antigen

Pada penelitian ini, dibuat 3 macam antigen untuk coating plate (1 dan 2) dan absorpsi serum (3), yaitu: (1) *Mycobacterium paratuberculosis* di tumbuhkan pada media cair Watson and Reid's dan diinkubasikan pada

suhu 37°C selama 8 – 10 minggu. Setelah tumbuh baik dan banyak, kemudian disentrifuse, pelet diambil dan dicuci dengan Phosphate Buffer Saline (PBS) sebanyak 3 kali. Selanjutnya dipanaskan atau disonikasi selama 15 menit. Kemudian disentrifuse, sel dibuang dan ekstraks disterilisasi menggunakan milipore 0,2 µm (COX *et al.*, 1991), (2) *Mycobacterium avium* di tumbuhkan pada media cair Dorset and Henley dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 8 – 10 minggu. Setelah tumbuh baik dan banyak, disentrifuse dan pelet diambil dan dicuci dengan Phosphate Buffer Saline (PBS) sebanyak 3 kali. Selanjutnya dipanaskan atau disonikasi selama 15 menit. Kemudian disentrifuse, sel dibuang dan ekstraks disterilisasi menggunakan milipore 0,2 µm (COX *et al.*, 1991), (3) *Mycobacterium phlei* di tumbuhkan pada Dorset and Henley medium dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 8 minggu. Setelah tumbuh baik dan banyak, disentrifuse dan pelet diambil. Selanjutnya dicuci dengan Phosphate Buffer Saline (PBS) sebanyak 3 kali, disaring, pelet diambil dan dikeringkan (MILNER *et al.*, 1990).

#### Conjugate dan serum kontrol

Conjugate yang digunakan adalah Rabbit Anti Bovine IgG HRP serta menggunakan serum kontrol positif yang didapat dengan mengimunisasi hewan dan serum kontrol negatif sebagai pembanding.

#### Uji ELISA

Antigen dilarutkan dalam coating buffer (bicarbonat buffer pH 9,6) kemudian masukkan sebanyak 100 µl larutan tersebut ke dalam lubang mikroplat. Inkubasikan pada suhu 4°C selama satu malam. Cuci mikroplat tersebut dengan PBS Tween 0,05%, kemudian masukkan 150 µl PBS casein 0,5% pH 7,4 ke dalam lubang mikroplat dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu kamar. Cuci mikroplat tersebut dengan PBS Tween 0,05%, kemudian masukkan 100 µl serum sampel (serum sampel dilarutkan dengan PBS Tween 0,05% pH 7,4 dan diabsorpsi menggunakan antigen *Mycobacterium phlei*) ke dalam lubang plate.

Kocok/goyang mikroplat tersebut pada suhu kamar selama satu jam. Mikroplat tersebut dicuci kembali. Larutkan conjugate dalam PBS Tween 0,05% + Casein 0,2% pH 7,4 sesuai dengan enceran yang dikehendaki (dari hasil titrasi) dan masukkan 100 µl ke dalam lubang plate. Dikocok/digoyang mikroplat tersebut pada suhu kamar selama satu jam. Selanjutnya mikroplat tersebut dicuci kembali dan masukkan 100 µl substrat (ABTS dalam citrate buffer pH 4,2), kemudian dikocok/digoyang pada suhu kamar selama satu jam. Selanjutnya dibaca dengan Elisa Reader pada panjang gelombang 405 atau 414 nm. Interpretasi hasil dengan menggunakan OD. Cut-off yang digunakan adalah rata-rata negatif OD + 3 SD (MILNER *et al.*, 1987; WATERS *et al.*, 1999; OLSEN *et al.*, 2001).

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Antigen yang digunakan untuk coating merupakan ekstrak *Mycobacterium paratuberculosis* atau *Mycobacterium avium* yang ditumbuhkan pada medium cair Watson's Reid dan Dorset Henley, sedangkan antigen yang digunakan untuk absorpsi serum adalah ekstrak *Mycobacterium phlei* yang ditumbuhkan pada medium cair Dorset Henley. *Mycobacterium paratuberculosis* merupakan subspecies dari *Mycobacterium avium*, dimana antigen dari kedua kuman ini sangat mirip. Absorpsi dilakukan dengan menambahkan antigen *Mycobacterium phlei* ke dalam pelarut sampel, hal ini dimaksudkan untuk mengurangi reaksi. Nilai *cut-off* ELISA paratuberculosis yang telah dikembangkan adalah rata-rata negatif OD+3 SD, yaitu 0,29 dengan nilai rata-rata *optical density* serum kontrol positif dan negatif 1,45 dan 0,11. Serum kontrol positif dan negative juga diuji banding dengan menggunakan Kit ELISA komersial (IDEXX) dengan nilai rata-rata *optical density* 1,38 dan 0,09. Adapun sensitifitas dan spesifitasnya belum dilakukan dan akan segera dilakukan, karena harus dibandingkan dengan kultur dari hewan positif dan negatif. Kemudian dari hewan – hewan tersebut dikoleksi serumnya dan diuji dengan ELISA. Isolasi dan identifikasi *Mycobacterium paratuberculosis* memerlukan media yang mahal dan waktu yang cukup lama (3 – 6 bulan).

Metode ini merupakan uji serologi untuk mendeteksi adanya antibodi terhadap paratuberculosis dalam serum darah sapi. Teknik diagnosa ini kemudian digunakan untuk menguji 80 sampel serum sapi perah yang dikoleksi dari Kecamatan Cangkringan, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Hasil ELISA 80 sampel serum tersebut menunjukkan nilai rata-rata *optical density*  $0,162 \pm 0,015$ . Sampel serum ini juga diuji dengan Kit ELISA komersial (IDEXX) dengan rata-rata nilai *optical density* 0,12. Dari hasil di atas menunjukkan bahwa sample serum tersebut adalah negatif (tidak mengandung antibodi terhadap paratuberculosis). Hasil di atas menunjukkan bahwa sapi perah di daerah Desa Kaliadem, Kecamatan Cangkringan, Kabupaten Sleman mungkin belum terdapat penyakit paratuberculosis atau masa inkubasi yang belum cukup sehingga belum terbentuk antibodi karena penyakit ini bersifat kronik.

#### KESIMPULAN

Kejadian penyakit paratuberculosis di Desa Kaliadem, Kecamatan Cangkringan, Kabupaten Sleman mungkin belum ada, hal ini didasarkan dari hasil uji ELISA terhadap serum darah sapi perah menunjukkan hasil negatif.

#### DAFTAR PUSTAKA

- COLLINS, M.T., D.C. SOCKET, W.J. GOODER, T.A. CONRAD, C.B. THOMAS and CARR. 1994. Herd Prevalence and Geographic Distribution of, and Risk Factors for Bovine Paratuberculosis in Wisconsin, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204: 636 – 641.
- FLORON, C., J.R. FARRIES, J.R. ALLEN, J. ELLEN, R.S. SANDRA dan D.M. DERRY. 1999. Bovine Paratuberculosis of Dairy Cattle, Texas Agricultural Extension Service, The Texas A & M University System, 1 – 4.
- COX, J.C., D.P. DRANE, S.L. JONES, S. RIDGE and A.R. MILNER. 1991. Development and Evaluation of a Rapid Absorbed Enzyme Immunoassay Test for The Diagnosis of Johne's Disease in Cattle. *Aust. Vet. J.* 68: 157 – 160.
- JARK, U., B. RINGENA, G.F. FRANZ, M. GELACH, BEYERBACH and B. FRANZ. 1997. Development of an Elisa Technique for Serodiagnosis of Bovine Paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 51: 189 – 198.

- MILNER, A.R., A.W.D. LEPPER, W.N. SYMONDS and E. GRUNER. 1987. Analysis by ELISA and Western Blotting of Antibody Reactivities in Cattle Infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after Absorption of Serum with *M. phlei*. Res. Vet. Sci. 42: 140 – 144.
- MILNER, A.R., W.N. MACK, K.J. COATES, J. HILL, I. GILL, P. SHELDRIK. 1990. The Sensitivity and Specificity of a Modified Elisa for The Diagnosis of Johne's Disease from a Field Trial in Cattle. Vet. Microbiol. 25: 193 – 198.
- OIE. 2000. Paratuberculosis. In: Manual of Standards Diagnostic Test and Vaccines, Office International des Epizooties. pp. 292 – 303.
- OLSEN, I., M. TRYLAND, G.H. WIKER, J.L. RUTAN. 2001. AhpC, AhpD, and a Secreted 14 – Kilodalton Antigen from *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* Distinguish between Paratuberculosis and Bovine Tuberculosis in an Enzym-Linked Immunosorbent Assay.
- PHILIP H. JONES. 2000. Update on Bovine Paratuberculosis (Johne's Disease), University of Liverpool, Departement of Veterinary Clinical Science and Animal Husbandry, Faculty of Veterinary Science, Leahurst, Neston, South Wirral. pp. 1 – 20.
- WATERS, W.R., J.R. STABEL, R.E. SACCO, J.A. HARP, B.A. PESCH and M.J. WANNEMUEHLER. 1999. Antigen Specific B-cell Unresponsiveness Induced by Chronic *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* infection in Cattle.
- YOKOMIZO, Y. 1997. Isolation and Identification of *Mycobacterium paratuberculosis*, National Institute of Animal Health, Japan.

## DISKUSI

### Pertanyaan:

Apakah pernah dilakukan uji sensitifitas dan spesifitas?

### Jawaban:

Uji sensitifitas dan spesifitasnya belum dilakukan dan akan segera dilakukan, karena harus dibandingkan dengan hasil kultur dari hewan positif dan negatif. Kemudian dari hewan – hewan tersebut dikoleksi serumnya dan diuji dengan ELISA. Isolasi dan identifikasi *Mycobacterium paratuberculosis* memerlukan media yang mahal dan waktu yang cukup lama (3 – 6 bulan).