# CARA PEMBUATAN DAN PENGUJIAN TUBERKULIN GLOVER SM BUATAN BALITVET, BOGOR

SUPRODJO HARDJOUTOMO dan SUTARMA
*Balai Penelitian Veteriner, Bogor*

(Diterima untuk publikasi 15 April 1993)

**ABSTRACT**

Hardjoutomo Suprodjo and Sutarma, 1993. Method Manufacture of Glover SM Tuberculin Made by the Balitvet, Bogor. *Penyakit Hewan* 25 (45): 20-24

A homemade bovine tuberculin as a veterinary diagnosticum to detect tuberculous cattle in Indonesia has been made by the Research Institute for Veterinary Science (RIVS), Bogor since 1909. In order to increase its quality in terms of the potency and safety, work have continously been undertaken by RIVS up to the present time. Glover synthetic medium tuberculin as a heat concentrated synthetic medium (HCSM) tuberculin, which has for long time been used in field tuberculin, testing for cattle in this country, so will be replaced by a better product of its kind namely a purified protein derivative (PPD) tuberculin made by the same Institute. The method of manufacture of this homemade HCSM tuberculin as well as its quality control were both described in this paper.

**Key words:** glover SM tuberculin, method of manufacture, quality control, bovine tuberculosis

**ABSTRAK**

Hardjoutomo Suprodjo dan Sutarma, 1993. Cara pembuatan dan pengujian tuberkulin Glover SM buatan Balitvet, Bogor. *Penyakit Hewan* 25 (45): 20-24

Tuberkulin bovin merupakan diagnostikum veteriner yang digunakan untuk mendeteksi tuberkulosis sapi. Sebagai produk hasil penelitian, tuberkulin buatan Balitvet, Bogor telah digunakan di Indonesia sejak tahun 1909. Melalui penelitian dari waktu ke waktu peningkatan mutu tuberkulin yang dihasilkan oleh Balitvet terus dilakukan. Tuberkulin bovin yang kini digunakan di lapangan adalah tuberkulin Glover SM, yang dalam waktu tak begitu lama akan diganti dengan produk serupa yang lebih murni, yakni tuberkulin PPD. Tujuan dari tulisan ini ialah untuk mendokumentasikan cara pembuatan serta pengujian mutu tuberkulin Glover SM buatan Balitvet, Bogor.

**Kata kunci:** tuberkulin glover SM, cara pembuatan, pengujian mutu, tuberkulosis sapi

## PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TBC, TB) pada sapi perah di Indonesia dilaporkan pertama kali oleh Penning pada tahun 1905 (Penning, 1906) dan sampai saat ini masih merupakan kendala dalam memajukan pembangunan persusuan di tanah air.

Tuberkulosis sapi perah merupakan penyakit hewan menular pertama yang diinstruksikan oleh Pemerintah Kolonial waktu itu untuk ditangani penelitiannya oleh Balai Penelitian Veteriner (Balitvet), yang didirikan pada tahun 1908 dan dulu disebut sebagai *Veeartsenijkundig Laboratorium* (Hardjoutomo, 1988). Tuberkulin merupakan diagnostikum veteriner yang dipakai di lapangan untuk mendiagnosis kasus-kasus TB sapi. Dari catatan Balitvet diketahui bahwa tuberkulin pertama yang berhasil dibuat adalah Tuberkulin A pada tahun 1909, hanya setahun setelah penyakit ini diteliti oleh Balitvet. Produk hasil penelitian tersebut kemudian digunakan oleh Dinas Peternakan Daerah untuk mendiagnosis TB di lapangan. Perlu dicatat bahwa sejak tahun itu kegiatan tuberkulinasi di lapang di Indonesia tidak lagi memerlukan impor tuberkulin dari luar negeri. Sebagai konsekuensinya, penelitian pengembangan tuberkulin buatan sendiri ini secara berlanjut terus dilakukan oleh Balitvet guna mendapatkan peningkatan mutu produk yang lebih baik lagi.

Peraturan tentang pemberantasan TB pada sapi perah telah dikeluarkan oleh Pemerintah sejak tahun 1911 dan hingga kini, dengan segala perubahannya, masih dinyatakan berlaku. Bahkan secara tegas dinyatakan oleh Direktorat Bina Produksi Peternakan, Jakarta bahwa setiap perusahaan susu yang beroperasi di Indonesia harus bebas dari penyakit TB.

Sebagaimana telah dimaklumi, pemeriksaan TB di lapangan pada usaha-usaha peternakan sapi perah dilakukan dengan mengadakan uji tuberkulin pada setiap individu sapi yang ingin diketahui status penyakitnya. Uji ini, sering juga disebut sebagai tuberkulinasi, di Indonesia lazim dilakukan 1x dalam setahun pada suatu

usaha Peternakan Sapi perah dan menjadi tanggung jawab dari Dinas Peternakan setempat untuk melaksanakannya.

Tuberkulin yang selama ini dipergunakan di Indonesia adalah tuberkulin Glover SM yang disiapkan dari medium sintetik sebagai pengembangan dari tuberkulin Glover SM, yang telah digunakan sejak tahun 1937 oleh Lobel, Schaaf dan Roza (Roza, 1952). Pada tahun 1955 tuberkulin yang disebut terakhir diresmikan penggunaannya sebagai pengganti uji tuberkulin dengan aplikasi optalmik atau tetes mata, yang hingga saat itu digunakan di lapangan (Roza, 1955).

Tulisan ini dimaksudkan untuk mendokumentasikan cara pembuatan sekaligus cara pengujian tuberkulin Glover SM sebagaimana dilakukan di laboratorium Mycobacteria pada Balitvet, Bogor.

## BAHAN DAN CARA

### Pembuatan media sintetik Glover

Untuk menumbuhkan dan sekaligus memperbanyak galur kuman TB yang akan digunakan sebagai pokok kuman (*seed culture*) perlu dibuat suatu media khusus, yang dikenal sebagai media sintetik Glover. Media sintetik yang tersusun atas bahan-bahan kimia anorganik ini disiapkan dengan cara menimbang bahan-bahan penyusunnya (*), memasukkannya dalam satu labu Erlenmeyer berisi air suling dan kemudian melarutkannya dengan cara pemanasan tak langsung. Pemanasan melalui penangas air bersuhu 60°C ini dilakukan sedemikian lama sampai seluruh bahan melarut. Selanjutnya, pada larutan tadi ditambahkan gliserin dan air suling dan kemudian dilakukan pengukuran serta penyesuaian derajat keasaman (pH) media menjadi 6.8. Sebelum dipakai, media yang sudah jadi disterilkan lebih dahulu dalam suatu otoklaf bersuhu 121°C, selama 15 menit.

**(*) Media sintetic Glover tersusun atas bahan-bahan sbb. :**

| | |
|---|---|
| Asparagin | 1 gram |
| Sodium sitrat | 6 gram |
| Dikalium hydrogenfosfat (K2HPO4) | 2 gram |
| Ammonium chloride (NH4Cl) | 1 gram |
| Magnesium sulfat | 0,5 gram |
| Ferro ammonium sitrat | 0,05 gram |
| Gliserin | 25 ml |
| Air suling | 975 ml |

### Proses pembuatan tuberkulin Glover SM

*Mycobacterium bovis* galur standar AN5 digunakan sebagai pokok kuman dalam pembuatan tuberkulin ini. Kuman AN5 diinokulasikan pada medium tersebut di atas dan kemudian diinkubasikan pada lemari pengeram kuman dengan suhu 37°C, selama 10 minggu. Pertumbuhan kuman yang bagus ditandai dengan pembentukan suatu selaput (pelikel), yang semakin lama semakin menebal yang terapung pada permukaan media. Hanya koloni murni saja yang akan diproses lebih lanjut, yaitu dengan memanen dan kemudian diikuti dengan proses pembunuhan dengan cara sebagai berikut: Panenan dibunuh dengan cara pemanasan basah selama 2 jam dimana uap panas bersuhu 100°C dialirkan melalui suatu alat yang dikenal sebagai **Arnold's steamer**. Dengan cara itu kuman TB hasil panenan akan terbunuh seluruhnya. Sesudah didinginkan selama satu malam, pada esok harinya panenan disaring melalui kertas saring; ampas yang tertahan pada kertas saring dibuang. Sedangkan filtratnya ditampung ke dalam satu bejana dan diukur volumenya. Selanjutnya, dilakukan proses pengedapan protein (tuberkulo-protein) yang terkandung dalam panenan dengan cara pembubuhan serbuk ammonium sulfat. Untuk setiap liter filtrat panenan dibutuhkan 600 gram serbuk ammonium sulfat. Campuran ini diaduk secara hati-hati sambil memanaskannya secara tak langsung melalui penangas air (*water bath*) bersuhu 60°C. Seluruh ammonium sulfat akan melarut dalam waktu 2 jam setelah pemanasan dan terlihat endapan yang terbentuk dari protein tuberkel tadi. Tahap berikutnya adalah memanen endapan protein yang didapat dan memindahkannya ke dalam tabung sentrifuse untuk kemudian memutarnya dengan alat sentrifuse berkecepatan 3500-4000 putaran per menit (*rpm*), selama 20 menit.

Endapan protein yang diperoleh berwarna abu-abu, kemudian dilarutkan kembali dengan cairan pelarut yang terdiri dari campuran gliserin-air suling 20% steril. Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar protein yang terdapat dalam larutan itu.

Sebagai bahan pengawet, pada suspensi tuberkulo-protein yang telah dibubuhi gliserin-air suling tersebut di atas ditambahkan larutan formalin dengan kepekatan akhir 0.1%.

Tahap selanjutnya adalah menyaring larutan tadi, pertama-tama melalui kertas saring dan kemudian melalui saringan Seitz-EK. Hasil penyaringan terakhir ini kemudian dikemas dalam vial steril, diberi label dan siap untuk diuji mutunya. Produk yang diperoleh dari

hasil penyaringan terakhir inilah yang dinamakan **tuberkulin Glover SM** itu. Sementara menunggu saat pengujian mutu di laboratorium, tuberkulin ini disimpan dalam lemari es dengan suhu simpan antara 4-8°C.

Setelah melalui serangkaian pengujian, baik uji *in-vitro* maupun uji *in-vivo* di laboratorium, maka tuberkulin Glover SM tersebut siap untuk diaplikasikan di lapangan.

**Pengujian mutu tuberkulin Glover SM**

Pengujian mutu di laboratorium dimaksudkan untuk mengetahui 1) keamanan produk yang diuji bagi individu pemakaiannya (*safety test*) dan 2) khasiat/ potensi daripada produk yang diuji (*potency test*).

Uji keamanan produk dilakukan dengan cara membiakkan sampel produk pada media bakteri dan akan dapat diketahui apakah produk yang diuji itu tercemar oleh kuman-kuman pencemar atau tidak.

Setelah itu, dengan mengaplikasikan produk yang telah lulus uji keamanan tadi pada hewan percobaan sebagaimana aturan pakainya maka akan dapat dinilai tentang potensi/khasiatnya sebagai suatu produk biologik yang laik pakai.

**Uji *in-vitro* di laboratorium**

Sebelum pengujian *in-vitro* produk di laboratorium dilakukan, terlebih dahulu kandungan tuberkulo-protein dalam panenan diukur kadarnya secara kuantitatif dengan metode BioRad titertek. Dalam hubungan ini tuberkulin PPD bovin buatan CSL, Australia yang diketahui mempunyai kandungan protein sebanyak 3 mg per ml. digunakan sebagai produk acuan. Uji keamanan produk di laboratorium dilakukan dengan cara menumbuhkan sedikit sampel (*aliquot*) dari produk yang sedang diteliti itu pada media bakteri dan memperhatikan ada atau tidak pertumbuhan kuman-kuman pencemar. Hanya produk yang memenuhi persyaratan baik kandungan tuberkulo-protein maupun terbukti bebas kuman pencemar saja yang selanjutnya akan diuji potensinya secara *in-vivo* di laboratorium.

**Uji *in-vivo* pada hewan percobaan**

Uji potensi dilakukan dua kali pengujian, satu kali dengan menggunakan marmut percobaan dan sekali lagi menggunakan sapi percobaan.

Pada marmut percobaan uji potensi dilakukan sebagai berikut :

Sejumlah marmut dibagi ke dalam dua kelompok. Satu kelompok marmut sengaja ditulari dengan kuman hidup *Mycobacterium bovis* dengan dosis 0.1 mg berat kuman/ml dan dibiarkan selama satu bulan sebelum digunakan. Kelompok ini berlaku sebagai marmut-marmut terinfeksi tuberkulosis. Sedangkan kelompok marmut lainnya, yang tidak mendapatkan perlakuan apapun, merupakan kelompok marmut normal.

Seluruh marmut percobaan dituberkulinasi dengan cara sebagai berikut: Sebagai tempat inokulasi adalah kulit daerah abdomen. Untuk pengujian ini, kulit abdomen marmut percobaan tadi dicukur habis bulu-bulunya. Selanjutnya, pada sisi sebelah kiri disuntikkan tuberkulin yang diuji, yaitu tuberkulin Glover SM buatan Balitvet; sedangkan pada sisi sebelah kanan disuntikkan tuberkulin PPD bovin buatan CSL, yang dimaksudkan sebagai pembanding. Dosis masing-masing tuberkulin adalah 0.1 ml dengan kepekatan $10^{-1}$ serta aplikasi intradermal melalui alat suntik tuberkulin plastik berkapasitas 1 ml. Pada waktu yang bersamaan, kelompok marmut normal juga dituberkulinasi dengan dosis dan aplikasi yang sama dengan kelompok marmut perlakuan tadi. Reaksi yang timbul pada tempat suntikan dibaca setelah 24 dan 48 jam pasca inokulasi.

Marmut percobaan dianggap positif tuberkulosis, bila pada kulit di tempat inokulasi timbul reaksi berupa kemerahan, kebengkakan dan kesakitan pada perabaan. Bila reaksi seperti yang digambarkan itu tidak terlihat, maka hasil uji potensi tuberkulin dianggap negatif.

Adapun uji *in-vivo* pada sapi percobaan dilakukan sebagai berikut :

Sejumlah sapi yang dipelihara di kandang Balitvet dipakai sebagai hewan percobaan. Uji *in-vivo* dilakukan secara *'single caudal fold test'* (SCT), yaitu penyuntikan tunggal tuberkulin secara intradermal pada lipatan kulit dekat pangkal ekor bagian ventral tidak berbulu sebagai tempat suntikannya, dengan dosis tunggal 0.1 ml tuberkulin per ekor hewan (Lepper *et al.*, 1977).

Reaksi dari uji tuberkulin ini ditafsirkan baik secara obyektif maupun secara subyektif pada 72 jam pasca inokulasi (Lepper *et al.*, 1977) dan dilakukan secara bersamaan untuk kedua tuberkulin yang diaplikasikan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam pembuatan tuberkulin ini dipakai pokok kuman (*seed culture*) *Mycobacterium bovis* galur standar AN5 yang ternyata tumbuh baik pada media

sintetik Glover yang khusus disiapkan bagi percobaan ini. Dalam pertumbuhannya, galur AN5 ini membentuk selaput/pelikel yang terlihat terapung pada permukaan media. Semakin lama inkubasinya terlihat pembentukan pelikel menjadi semakin menebal. Dalam waktu inkubasi 10 minggu pada suhu 37°C tebal pelikel mencapai antara 0.5-1.0 cm. Warna pelikel yang terbentuk kuning keputih-putihan, berkeriput dan bila terguncang akan tenggelam kedalam media.

Hanya koloni yang murni saja yang akan diproses lebih lanjut. Sedangkan koloni yang tercemar, dimusnahkan. Setelah melalui tiga kali percobaan diketahui bahwa pembentukan pelikel tidak dipengaruhi oleh umur pokok kuman AN5 saat perbanyakannya, yaitu antara umur 2-7 minggu.

Dari beberapa nomor pembuatan (*batch*) dengan menumbuhkan AN5 pada media sintetik tersebut di atas, pada pemrosesannya dihasilkan endapan protein yang mencapai berat rataan sebesar 2.06 gram per liter media (penghitungan dengan menggunakan metode BioRad titertek). Angka tersebut terbukti lebih tinggi bila dibandingkan bila pokok kuman AN5 dibiakkan pada media yang disertai dengan penambahan 'ampas organik', berupa sel-sel kuman TB yang telah dimatikan, yaitu hanya sebesar 1.85 gram per liter media. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa prosedur modifikasi yang sedang diteliti memberikan hasil panenan berupa endapan tuberkulo-protein yang lebih tinggi, yang dalam hal ini terdapat peningkatan sebesar 10,19%.

Selain itu, pada proses pembuatan tuberkulin yang sedang diteliti ini kecepatan sentrifusi untuk mendapatkan endapan tuberkulo-protein, ditingkatkan dan diperlama. Dalam hal ini, kecepatan menjadi 5000 rpm, sedangkan waktu pemutaran ditingkatkan menjadi 30 menit.

Dibandingkan dengan tuberkulin impor selaku produk acuan (dalam hal ini tuberkulin PPD buatan CSL, Australia yang mengandung tuberkulo-protein 3 mg per ml), maka kandungan tuberkulo-protein dari produk buatan Balitvet ini masih rendah, yakni hanya ± 2.0 mg per ml. Sehingga diperlukan proses pemekatan dari hasil yang sampai saat ini dicapai.

Selain daripada itu, uji sterilitas dari produk yang sedang diteliti dengan cara menumbuhkannya pada media bakteri ternyata memberi hasil baik, dalam arti tidak memperlihatkan ada pertumbuhan kuman-kuman pencemar alias steril. Hal ini berarti bahwa produk yang diuji itu telah memenuhi persyaratan dari uji keamanan produk.

**Uji *in-vivo* pada marmut percobaan**

Inokulasi dari produk yang telah lulus uji keamanan tersebut di atas pada kelompok marmut yang terlebih dahulu ditulari dengan kuman hidup AN5 pada kulit abdomennya memberi hasil positif; sedangkan pengujian pada kelompok marmut normal memberi hasil negatif. Hasil yang sama ternyata juga didapat bilamana tuberkulin PPD bovin buatan CSL, yang dimaksudkan sebagai tuberkulin pembanding, diinokulasikan pada marmut-marmut yang sama (Tabel 1).

**Tabel 1.** Hasil uji tuberkulin Glover SM (Balitvet) pada marmut percobaan di laboratorium

| | Marmut | | Hasil uji tuberkulin | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Nomor urut | Kelompok | Jumlah (ekor) | Glover SM (Balitvet) | | PPD bovine (CSL, Aust.) | |
| | | | neg. | pos. | neg. | pos. |
| 1. | I | 6 | 0 | 6 | 0 | 6 |
| | Kontrol | 6 | 6 | 0 | 6 | 0 |
| 2. | II | 9 | 0 | 9 | 0 | 9 |
| | Kontrol | 6 | 6 | 0 | 6 | 0 |
| 3. | III | 6 | 0 | 6 | 0 | 6 |
| | Kontrol | 6 | 6 | 0 | 6 | 0 |
| 4. | IV | 8 | 0 | 8 | 0 | 8 |
| | Kontrol | 6 | 6 | 0 | 6 | 0 |
| 5. | V | 8 | 0 | 8 | 0 | 8 |
| | Kontrol | 6 | 6 | 0 | 6 | 0 |
| | | 67 | 30 | 37 | 30 | 37 |

**Keterangan :**

I, II, ... V = kelompok marmut percobaan yang sengaja diinfeksi *M. bovis* sebelum diperlakukan.

kontrol = kelompok marmut normal.

tuberkulin = ada dua macam, yakni tuberkulin Glover SM buatan Balitvet, Bogor yang sedang diuji dan tuberkulin PPD bovine buatan CSL, Australia sebagai pembanding.

aplikasi = intradermal pada kulit abdomen marmut yang sama, sisi yang berbeda untuk tiap tuberkulin.

Seperti pada marmut, maka pengujian potensi tuberkulin Glover SM buatan Balitvet pada sapi-sapi percobaan juga meliputi sapi normal dan sapi reaktor tuberkulosis. Pengujian potensi pada 78 ekor sapi percobaan (75 ekor sapi normal dan 3 ekor yang lain merupakan sapi reaktor buatan), yang dibaca pada 72 jam pasca inokulasi, memberi hasil negatif pada 75 ekor sapi normal dan positif pada 3 ekor sapi reaktor TB buatan. Hasil yang sama diperoleh terhadap tuberkulin PPD bovin CSL, Australia, selaku tuberkulin pembanding, yang diinokulasikan bersamaan waktunya (Gambar 1.).

**Gambar 1.** Uji tuberkulin dengan aplikasi intradermal pada lipatan kulit pangkal ekor sapi

**Catatan :** Hasil **positif** ditandai dengan bengkak kulit pada tempat suntikan, kenaikan suhu setempat dan rasa sakit saat diraba. Pembacaan reaksi dilakukan 72 jam pasca suntikan.

Seperti diketahui dengan metode SCT ini (Lepper *et al.*, 1977), suntikan tuberkulin Glover SM dilakukan hanya satu kali saja (tunggal), dengan aplikasi intradermal tanpa suntikan kedua (**booster**), yang pada aplikasi uji tuberkulin di lapang terdahulu biasanya dilakukan pada 48 jam pasca suntikan pertama, yakni tuberkulinasi pada bidang sisi leher hewan (Bulletin LPPH, 1973). Dengan kata lain, metode SCT ini merupakan penyederhanaan uji tuberkulin di lapangan.

## KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kuman *Mycobacterium bovis,* galur AN5 tumbuh baik pada medium pembuatan tuberkulin yang dikembangkan di Balitvet.
2. Agar mencapai kandungan tuberkulo-protein 3.0 mg per ml, dalam pembuatan tuberkulin Glover SM (Balitvet) proses pemekatannya masih diperlukan.
3. Tuberkulin Glover SM (Balitvet, Bogor), selaku produk buatan Dalam Negeri untuk mendiagnosis tuberkulosis sapi, sampai sekarang ternyata masih terus digunakan di lapang.

Saran sehubungan dengan hal-hal tersebut di atas :

Dalam mengusahakan peningkatan mutu tuberkulin buatan Dalam Negeri dan sekaligus untuk tidak tertinggal dari kemajuan jaman selayaknya, bila Balitvet melakukan penelitian cara pembuatan tuberkulin PPD bovin serta aplikasinya di lapang.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak H. Moch. Soeroso, Bsc. mantan peneliti pada Unit Mycobacteria, yang memberi dorongan bagi pendokumentasian perihal prosedur pembuatan tuberkulin Glover SM produksi Balitvet ini. Juga kepada para pegawai pada Unit Mycobacteria disampaikan pula penghargaan atas tenaganya sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

## DAFTAR PUSTAKA

ANONYM. 1937. Kumpulan resep-resep lama (tidak dipublikasi). *Veeartsenijkundig Institut.* Bogor.

BIO-RAD LABORATORIES, S.A. Mini Protein II Dual seal cell Instruction Manual.

BULLETIN LPPH. 1973. Edisi khusus. Petunjuk kerja bagi petugas lapangan. Vol IV (5): Semester I-II.

HARDJOUTOMO, S. 1988. Tinjauan Penyakit Tuberkulosis di Indonesia Kurun Waktu 1901-1985. *Hemera Zoa,* 73 (1): 35-45.

LEPPER, A.W.D., D.A. NEWTON-TABRETT, L.A. CORNER, M.T. CARPENTER, W.R. SCANLAN, J.O. WILLIAMS and D.M. HELWIG. 1977. The use of Bovine PPD tuberkulin in the single caudal fold test to detect tuberculosis in beef cattle. *Aust. Vet. J.,* vol. 53 : 203-213.

PENNING, C.A. 1906. Tuberculinatie van het melkvee ter hoofdplaats Semarang. *Veearts. BL.,*17 : 271-279.

ROZA, M. 1952. Nilai dari tuberkulinasi intradermo dibandingkan dengan ophthalmo test. *Hemera Zoa, LIX* (1-2): 301-321.

ROZA, M. 1955. Beberapa pertimbangan untuk mengganti tuberkulinasi konjunktiva oleh intradermo test dengan tuberkulin Glover. *Hemera Zoa,* LXII (9-12): 193-211.