

ISSN 0216 - 7662

Volume XVII

No. 30

Semester II th. 1985



PENYAKIT HEWAN

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



MYCOPLASMOSIS UNGGAS DI INDONESIA. PEMBUATAN ANTIGEN BERWARNA *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* UNTUK AGLUTINASI CEPAT SERUM

SRI POERNOMO, S. HARDJOUTOMO, YUSUP HIDAYAT DAN DJAENURI
Balai Penelitian Veteriner, Bogor

ABSTRACT

A rapid serum plate test is one of the methods for diagnosing *mycoplasmosis* of poultry, especially when associated with chronic respiratory disease (CRD). A simple method has been developed at Balai Penelitian Veteriner Bogor, using tryptose phosphate broth and pig serum as media for antigen propagation in producing *Mycoplasma gallisepticum* stained antigen for the rapid serum plate test. S₆ strain of *Mycoplasma gallisepticum* from Dr. W.A.M. Gordon was used for seed culture.

The country is, thus, self sufficient for this diagnostic reagent which in turn has saved foreign exchange.

PENDAHULUAN

Usaha peternakan ayam ras semakin berkembang pesat di Tanah Air dewasa ini.

Sejalan dengan itu problematik penyakit unggaspun menjadi bertambah pula. Salah satu penyakit dijumpai dalam peternakan ayam ras adalah chronic respiratory disease (CRD) yang disebabkan oleh *Mycoplasma gallisepticum* (Mg). Mg adalah salah satu dari tiga species mycoplasma yang patogen pada unggas (Anon., 1971; Hofstad *et al.*, 1978; Tully and Whitcomb, 1979).

Mg. ini dapat ditularkan secara horisontal dari unggas satu ke unggas lainnya, maupun secara vertikal dari induk ke anak melalui telur (Robert, 1968; Hofstad *et al.*, 1978, Tully and Whitcomb, 1979).

Tanda-tanda penyakit yang ditimbulkan oleh Mg. ini antara lain : keluarnya exudat dari hidung, turunnya produksi telur, pertumbuhan yang lambat, berat badan menurun, penularan yang lambat serta adanya tanda-tanda klinis yang susah hilang (Robert, 1968).

Kerugian ekonomis akibat Mg. antara lain, karena infeksi Mg. dapat mengakibatkan pertumbuhan yang lambat, penurunan produksi telur, serta biaya pengobatan yang tinggi (Hofstad *et al.*, 1978).

Infeksi Mg. tidak menimbulkan perubahan anatomik yang khusus sehingga untuk mengadakan diagnosa perlu diadakan isolasi dan identifikasi mikroorganisme penyebabnya dan pemeriksaan serologik pada ayam (unggas) yang diduga menderita infeksi Mg. (Tully and Whitcomb, 1979).

Uji serologik yang biasa dipakai untuk men-diagnosa Mg. ini antara lain : Rapid Serum Agglutination (RSA) atau aglutinasi cepat serum

(ACS); Tube Agglutination (TA) atau aglutinasi tabung (AT); Haemoglutination Inhibition (HI) dan yang terakhir oleh Soku dan Olson pada th. 1976 telah dipakai agar gel presipitasi/AGP (Tully and Whitcomb, 1979).

Di samping itu pula dengan mempergunakan Rapid Whole Blood Test/RWBT (Chute *et al.*, 1965; Robert, 1968).

Salah satu cara untuk mengadakan pencegahan dan pembasmian (pembebasan) infeksi Mg. ini adalah dengan mengadakan uji serologik pada ternak ayam/unggas pembibitan dan keturunannya secara teratur (Chute *et al.*, 1965; Robert, 1968; Anon., 1971; Hofstad *et al.*, 1978; Tully and Whitcomb, 1979). RSA adalah salah satu di antara uji serologik yang paling cocok untuk dilakukan pada peternakan pembibitan, misalnya apabila terdapat reaksi positif (reaktor) yang jumlahnya sedikit dalam kandang (flock) atau adanya reaktor dari peternakan yang dianggap bebas dari infeksi Mg. (Tully and Whitcomb, 1979).

RSA atau serum plate test (SPT) ini dapat dilakukan antara lain sebagai berikut (Anon, 1971) :

- biarkan antigen dan serum yang akan diuji, sehingga sama dengan suhu kamar;
- teteskan antiserum di atas kaca aglutinasi sebanyak $\pm 0,02$ ml;
- bubuhkan antigen berwarna Mg. sebanyak 0,03 ml pada antiserum tersebut di atas;
- aduk antigen dan antiserum tersebut.

Hasil :

- positif (+ve), apabila terjadi gumpalan selama 2 menit;
- negatif (-ve), apabila tidak terjadi gumpalan atau terjadi gumpalan setelah 2 menit.

Untuk uji RSA ini diperlukan antigen ber-

warna *Mycoplasma*, yang cara pembuatannya telah ditemukan (Adler, 1985; Hall, 1962 : Anon. 1971; Timmms and Cullen, 1972; Cullen and Anderton, 1974).

Adanya *Mg.* di Indonesia telah dibuktikan dengan uji serologik antara lain oleh Rickey & Dardjosebroto, 1965; Team Survai Jepang untuk penyakit unggas th. 1974; Ronohardjo, 1974.

Sementara itu dari hasil pemeriksaan bahan penyakit ayam yang diterima Lembaga Penelitian Penyakit Hewan (LPPH) th. 1973 - 1974, tercatat angka kematian 13% disebabkan oleh infeksi *Mg.* dengan komplikasi bakteri lainnya (Gordon dan Sri Poernomo 1976). Sedang secara bakteriologik kuman *Mg.* sudah berhasil diasingkan di Indonesia pada th. 1977 (Sri Poernomo, 1980).

Mengingat kenyataan di atas maka sudah waktunya kita mencari suatu strategi dalam pengendalian mycoplasmosis (CRD) pada unggas, terutama pada ayam pembibitan, sehingga dapat dicegah atau setidaknya mengurangi penyebaran penyakitnya, karena penyakit ini dapat ditularkan induk ayam ke anak melalui telur.

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengadakan upaya berdikari dalam penyediaan antigen berwarna *Mg.* dalam rangka pengendalian penyakit *Mg.* pada unggas.

BAHAN DAN CARA

Banyak cara telah ditemukan untuk memproduksi antigen *Mg.* baik untuk keperluan uji serum plate, maupun aglutinasi tabung dan H I (Adler, 1958; Hall, 1962; Anon., 1971; Timms and Cullen, 1972; Cullen and Anderton, 1974). Sesuai dengan fasilitas laboratorium Balai Penelitian Veteriner, untuk pembuatan antigen berwarna *Mg.* ini penulis mempergunakan cara modifikasi Hall (1962) dan Anon., 1971) sebagai berikut :

Media

Medium yang dipergunakan adalah modifikasi kaldu tryptose phosphate yang dipergunakan/terdapat dalam Anon. (1971) dengan mengganti serum kalkun dengan serum babi, yang

ramuannya sebagai berikut :

Tryptose phosphate broth (Difco)	29,5 gr.
Yeast autolysate (Albimi)	10,0 gr.
Maltose	2,5 gr.
Serum babi	200,0 gr.
Aquadest	1000,0 gr.

Serum babi dijernihkan dengan jalan disentrifuge dan disterilkan dengan saringan Seitz EK. Media tidak perlu disterilkan dengan pemansan. Terakhir media ditambah dengan penisilin 100 unit tiap ml dan thallium acetat 5% 1 ml tiap 100 ml. Media pH-nya diatur sampai 8,0.

Media dibagi-bagi dalam :

- tabung-tabung reaksi kecil à 3 ml.
- erlenmeyer volume 100 ml à 50 ml.
- erlenmeyer volume 1000 ml à 500 ml untuk produksi antigen.

Bakteri : Bibit antigen

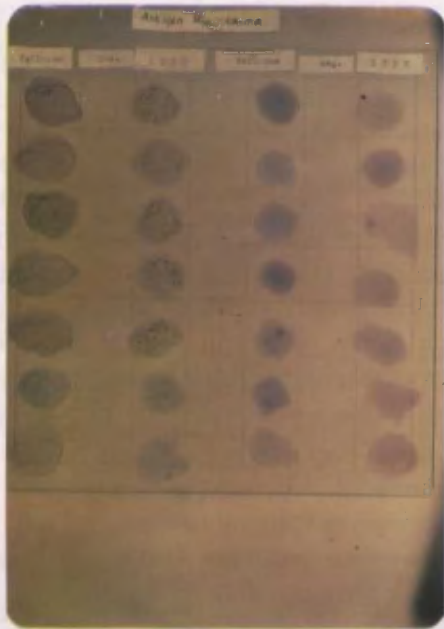
Mycoplasma gallisepticum strain S₆ satu ampul freeze dried culture yang diperoleh dari Dr. W.A.M. Gordon, seorang ahli penyakit unggas dari FAO di Balai Penelitian Veteriner pada th. 1974. Bakteri ini dibuka pada akhir tahun 1976 yang kemudian disubculture pada media PPLO agar dan PPLO broth (kaldu PPLO) dan sebagian dikeringkan lagi untuk persediaan dalam bentuk freeze dried culture.

Cara membuat biakan bakteri

Koloni *Mg.* yang menyendiri dipisahkan (diambil), kemudian dibiakkan pada media PPLO cair dalam tabung kecil a 3 ml, eramkan selama 24 - 48 jam pada suhu 37°C. Biakan *Mg.* umur 48 jam ini dituangkan pada media yang sama sebanyak 500 ml dalam erlenmeyer kolf 1000 ml, kemudian dieramkan selama 48 jam pada suhu 37°C. Selama biakan bakteri untuk pembuatan antigen ini dieramkan, diusahakan dikocok sesering mungkin.

Cara menuai antigen

Biakan *Mg.* umur 48 jam tersebut di atas, kemudian diputar dengan ultra sentrifuge (Sarples) dengan putaran 45.000 rpm secara continuous flow. Kemudian sedimen bakteri diambil (dipisahkan) dari hasil sentrifuge terus dihaluskan dengan Ten Bruck tissue grinder. Sedimen bakteri kemudian dibuat suspensi sedemikian rupa sehingga tidak boleh kurang dari kekeruhan 2xMc. Farland no. 10. Untuk pelarut



Gambar 1. Reaksi aglutinasi.

suspensi dipergunakan buffer phenol 0,25%. Ketebalan bakteri yang dikandung dalam antigen adalah 2xMc. Farland no. 10. Kekeruhan antigen diukur dengan mempergunakan Spektrofotometer atau Spektronik. Antigen diberi warna dengan gentian violet 1% dari larutan pokok 3%. Antigen disimpan pada suhu 4°C. Antigen sebelum diuji sensitifitasnya harus diperam pada suhu 4°C selama 2 - 4 minggu. Antigen yang sudah jadi ini sebelum dipergunakan di lapangan harus diuji/periksa antara lain :

- pH antigen diperiksa, pH antigen harus antara 6 - 7;
- sensitifitas, untuk uji ini dipergunakan anti serum yang sudah disiapkan dari ayam/kelinci yang dibandingkan dengan buatan luar negeri seperti buatan Burroughs Wellcome, Inggris atau Nobilis, Belanda. Biasanya anti serum diencerkan 1 : 5; 1 : 10 dan seterusnya. Reaksi antigen buatan sendiri dibandingkan dengan antigen standar tidak boleh berbeda lebih dari satu tingkat pengenceran (Anon., 1971);
- homogenitas, dengan meneteskan antigen pada kaca alas, nampak apakah antigen homogen atau tidak;
- sterilitas, dengan membiakkan antigen pada media cair dan padat.

Pembuatan Antigen pada Ayam/Kelinci

Untuk antigen yang disuntikkan pada hewan percobaan, biakan *Mg.* seperti pembuatan antigen berwarna, hanya diputar dengan refrigerated ultra centrifuge yang dicuci 3 x dengan PBS dengan putara 10.000 rpm. Kemudian dibuat suspensi dan disuntikkan pada ayam atau kelinci secara intraveneus (Sri Poernomo, 1980). Antiserum ini setelah dititer biasanya mencapai titer berkisar 1280.

HASIL DAN DISKUSI

Sebetulnya pembuatan/pemakaian antigen berwarna *Mg.* ini telah dilaporkan dalam Research Highlights Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan th. 1981 - 1982.

Menurut Hall (1962), hasil antigen untuk serum plate test ini dapat mencapai 12 - 15% dari jumlah biakan bakteri yang diputar dengan sentrifuge Sarple 50.000 rpm secara continuous flow, sedang pengalaman penulis hanya mencapai 5 - 8% dari jumlah biakan bakteri yang diputar dengan Sarple 45.000 rpm. Hal ini mungkin terjadi karena sedimen bakteri *Mg* banyak yang tertinggal pada bowl, karena sedimen bakteri susah dipisahkan dari dinding bowl sentrifuse. Zat warna yang dipergunakan adalah gentian violet 1% dari larutan pokok 3%, ini untuk mendapatkan warna antigen yang lebih jelas, apabila antigen diadu dengan antiserum. Dengan konsentrasi akhir gentian violet 1 : 10.000 (0,02%) (Anon., 1971), menurut penulis warna antigen kurang terang (bagus). Kadangkadang antigen yang sudah jadi berbutir-butir, untuk membuat homogen (halus), antigen dapat dihaluskan dengan mempergunakan Ultrasonic vibration (G. Cottew, senior scientist unit Mycoplasma, dari Commonwealth Scientific Industrial Research Organisation, Melbourne, Australia, komunikasi pribadi, 1980).

pH Antigen antara 6, 8 - 7. Apabila pH antigen di bawah 6, antigen akan terlalu peka, sedang di atas pH 7, antigen menjadi kurang peka (Anon., 1971).

Hasil uji sensitifitas mempergunakan antigen berwarna *Mg.* buatan Burroughs Wellcome, Inggris atau Nobilis, Belanda sebagai pembandingan dapat dilihat pada Gambar 1. Reaksi aglutinasi dengan antiserum *Mg.* dengan pengenceran

tertentu menunjukkan reaksi yang sama dengan antigen berwarna *Mg.* pembanding, aglutinasi masih terjadi jelas pada pengenceran 1 : 80, hanya pada umumnya gumpalan-gumpalan (aglutinasi) yang ditimbulkan oleh antigen berwarna *Mg.* buatan sendiri (Indonesia) lebih kasar. Pernyataan ini juga disampaikan oleh R.G. Philip, expert penyakit unggas dari Inggris (komunikasi pribadi, 1983).

RINGKASAN

Dalam rangka usaha pengendalian mycoplasmosis pada unggas atau Chronic Respiratory Disease (CRD) secara berkari dalam hal pengadaaan antigen berwarna *Mg.* untuk uji aglutinasi cepat serum, penulis telah berhasil membuat antigen berwarna dengan mempergunakan *Mycoplasma gallisepticum* Strain S6 secara sederhana.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Dr. W.A.M. Gordon, ahli penyakit unggas FAO yang telah membantu dengan mencari *Mycoplasma gallisepticum* S6 sebagai galur untuk pembuatan antigen, demikian pula kepada semua Karyawan/karyawati yang telah membantu sehingga tulisan ini dapat disajikan, penulis ucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

1. ANONYMOUS. 1971. Methods of examining Poultry Biologic and for Identifying and Quantifying Avian Pathogens. National Academy of Science, Washington D.C.
2. ANONYMOUS. 1974. Report on the Investigation of Poultry Diseases in Indonesia. Overseas Technical Cooperation Agency. The Government of Japan.

3. ANONYMOUS. 1982. Research Highlights Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan 1981 - 1982.
4. ADLER, H.E. 1958. A PPLO Slide Agglutination Test for the Detection of Infectious Sinusitis of Turkeys. Poultry Sci. 37 : 116 - 1123.
5. CULLEN, G.A. and M.F. ANDERTON. 1974. Comparative Efficiency of Some Rapid Agglutination Antigens for *Mycoplasma gallisepticum* infection. Avian Path. Vol. 3, no. 2 : p. 89 - 103.
6. CUTTE, H.L., R. COUZOO, D.R. STAUFER and V. MAC DONALD. 1965. The Commercial Production of PPLO - Free Chickens. Canadian Veterinary Journal : 16 - 21.
7. HALL, C.F. 1962. *Mycoplasma gallisepticum* Antigen Production. Avian Diseases 359 - 362.
8. HOFSTAD, M.S., B.W. CALNEK, C.P. HELMBOLDT, W.M. REID and H.W. YODER, Jr. 1978. Disease of Poultry. 7th Edition. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. p 949.
9. RICKEY, D.J. and SUGENG DIRDJOSOE BROTO. 1965. Chronic Respiratory Disease of Chicken in West Java, Indonesia. I. Preliminary Serological Studies. Com. Vet. Vol. 9, no. 1 : p. 1 - 5.
10. ROBERTS, D.H. 1968. Methods of Eradication of *Mycoplasma gallisepticum* from Chickens. The Veterinarian, vol. 5 : 259 - 263.
11. RONOHARDJO, P. 1974. Infeksi *Mycoplasma gallisepticum* pada Ayam Petelur dan Ayam Kampung yang sudah dewasa. Bulletin LPPH, vol. V. no. 6 - 7 : 42 - 46.
12. TIMMS, L.M. and G.A. CULLEN. 1972. Comparative Efficiency of 4 *Mycoplasma gallisepticum* as Antigens in Detecting Heterologous Infection. Research in Veterinary Science, 13 : 523 - 528.
13. SRI POERNOMO. 1980. Mycoplasmosis pada Ayam di Indonesia. Isolasi *Mycoplasma gallisepticum* dari Anak Ayam Broiler. Bulletin LPPH, vol. XII, no. 20 : 62 - 70.
14. TULLY, J.G. and R.F. WHITCOMB. 1979. The *Mycoplasmas*. Volume II, Human and Animal Mycoplasmas. Academic Press. New York, San Francisco and London. p. 509.