

REAKSI PRESIPITASI METODA ASCOLI DISEDERHANAKAN UNTUK MENDIAGNOSA ANTHRAX

I. Pembuatan Antigen Kokto.

Oleh

Suprodjo HARDJOUTOMO dan Sri POERNOMO

PENDAHULUAN

Anthrax atau radang limpa adalah penyakit menular akut pada hewan yang disebabkan oleh *Bacillus anthracis*. Penyakit yang didapatkan di seluruh dunia ini telah dikenal lebih dari satu abad yang lalu, meskipun demikian baru pada abad ke-19 para penyelidik mengenal penyakit ini dengan lebih baik lagi (Hutyra, Marek dan Manninger, 1946).

Untuk Indonesia, berita tentang suatu penyakit pada kerbau di daerah Teluk Betung yang sangat menyerupai Anthrax dapat dibaca dalam "Javasche Courant" 1884. Berita yang lebih jelas tentang berjangkitnya penyakit ini di beberapa daerah di Indonesia diberitahukan oleh "Koloniaal verslag" tahun-tahun 1885 dan 1886 (Sumanegara, 1958).

Mengenai kejadian Anthrax di Indonesia, Sumanegara (1958), melukiskan frekwensinya pada ternak sapi, kerbau, kuda, kambing, biri-biri dan babi antara 1906-1957 sebagai terdapat di pulau-pulau:

a. Sumatera dan Kalimantan:

di Jambi, Palembang, Padang, Bengkulu, Bukit Tinggi, Sibolga dan Medan.

b. Jawa dan Madura:

di Jakarta, Purwakarta, Bogor, Priangan, Banten, Cirebon, Tegal, Pekalongan, Surakarta, Banyumas, Madiun dan Bojonegoro.

c. Nusa Tenggara:

di semua pulau seperti di Sumbawa, Sumba, Lombok, Flores, Timor, Roti dan Bali.

d. Sulawesi:

di Sulawesi Selatan, Menado, Donggala dan Palu.

Diagnosa Anthrax secara bakteriologik diselenggarakan dalam berbagai cara yang ditujukan untuk mengenali agens bakteriilnya ataupun produknya (Bruner dan Gillespie, 1973), yang terpenting adalah sebagai berikut:

1. Pemeriksaan mikroskopik langsung atas sediaan kuman yang disiapkan dari jaringan yang rusak atau darah/cairan tubuh hewan tersangka. Cara ini berdaya guna bilamana diambil dari hewan yang diketahui baru saja mati dan bila proses pembusukan belum mulai.

7. DAFTAR PUSTAKA

1. Bradburne, A.F. 1970: Antigenic relationships amongst coronaviruses. Arch. ges. Virusforsch. 31, 352-364.
2. Crowle, A.J. 1961: Immunodiffusion. Academic Press, New York.
3. Hyllseth, B dan U. Petterson 1970: Neutralization of equine arteritis virus; enhancing effect of guinea pig serum. Arch. ges. Virusforsch. 32, 337-347.
4. Nasz, I., A. Lengyel dan I. Crezba 1972: Comparative studies of adenovirus hexon antigen. Arch. ges. Virusforsch., 36-92.
5. Rice, C.E. 1967: Serologic reaction. Viral and rickettsial infection of animals. Academic Press, New York and London.
6. Ronohardjo, P dan M. Abubakar, 1975: Pemurnian virus Newcastle dengan adsorpsi barium sulfat dan ilusia sodium citrat. Bull. LPPH. 8-9, 36-42.
7. Woernle, H. 1966: The use of the agar-gel diffusion technique in the identification of certain avian virus diseases. The Veterinarian 4, 17-28.

2. Pembiakan kuman.

Tidak ada kesulitan dalam membiakkan kuman Anthrax bila saja jaringan tubuh dan darah masih segar. Bila pembusukan telah mulai, akan tumbuh dua kesulitan, yaitu: pertama, bahwa kuman Anthrax cepat terbunuh dan yang tersisa hanya beberapa atau sama sekali tidak ada lagi kuman Anthraxnya dan yang kedua, bahwa kuman-kuman lain yang menyerupai kuman Anthrax bermunculan.

3. Inokulasi hewan percobaan laboratorium.

Penyuntikan sub-kutan dengan suspensi bahan pemeriksaan pada marmot-marmot sebagai hewan percobaan laboratorium meneguhkan diagnosa, asal saja bahan yang bersangkutan tidak mengandung kuman lain yang membunuh hewan percobaan lebih cepat dari pada kuman Anthrax.

4. Sera diagnosis.

Uji thermo presipitasi metoda Ascoli digunakan dengan hasil baik sekali di Eropa dalam pengujian kulit hewan yang terinfeksi Anthrax. Uji ini juga dapat digunakan untuk lain-lain jaringan tubuh.

Diagnosa Anthrax di Afrika Selatan menurut Viljoen, Curson dan Fourie (1928) diselenggarakan sebagai berikut:

a. Cara klinik.

Pada herbifora, Anthrax biasanya berjalan per-akut, namun tidak selalu demikian, sehingga gejala penyakitnya masih dapat diikuti untuk sampai pada diagnosa.

b. Pemeriksaan mikroskopik atas sediaan ulas darah.

Dengan memperhatikan secara cermat ciri-ciri kuman Anthrax, dengan pewarnaan Giemsa atas sediaan-sediaan ulas darah asal dari hewan yang diketahui baru saja mati atau beberapa jam sebelum mati, diagnosa Anthrax secara mikroskopik dapat ditetapkan.

c. Inokulasi hewan percobaan laboratorium.

Mencit dan marmot digunakan untuk meneguhkan diagnosa Anthrax atas bahan-bahan pemeriksaan berupa kulit kering, tulang, tepung tulang dan lain-lainnya ataupun berupa koloni kuman yang diasingkan secara pembiakan dalam laboratorium.

d. Pemeriksaan atas biakan kuman.

Hal ini amat berguna untuk penetapan diagnosa Anthrax atas bahan pemeriksaan asal hewan sakit ataupun yang baru saja mati, dimana diagnosa penyakit atas dasar pemeriksaan mikroskopiknya saja tidak mungkin.

e. Uji presipitasi.

Uji presipitasi metoda Ascoli jarang dilakukan, berhubung dengan dianggap

telah cukup meyakinkan penetapan diagnosa penyakitnya atas hasil-hasil pemeriksaan tersebut di muka.

Di Lembaga Penelitian Penyakit Hewan (L.P.P.H.) Bogor, secara rutin diagnosa Anthrax ditetapkan atas hasil-hasil pemeriksaan: mikroskopik, inokulasi pada hewan percobaan laboratorium (biologik) dan biakan kumannya.

Hal yang tersebut di atas tidak selamanya dapat dilakukan. Bila L.P.P.H. menerima kiriman bahan pemeriksaan tidak lengkap, maka ketiga macam pemeriksaan yang dimaksud tidak mungkin dilakukan semuanya.

Sekali-sekali L.P.P.H. menerima kiriman bahan pemeriksaan kearah Anthrax, berupa sepotong kulit kering, sepotong tulang atau sekerat daging kering (dendeng). Dalam hal-hal seperti ini, maka penetapan diagnosa penyakitnya tidak mungkin lagi dengan pemeriksaan-pemeriksaan yang tersebut lebih dahulu, kecuali dengan reaksi presipitasi metoda Ascoli yang dikenal pula dengan istilah: Uji Ascoli.

Untuk maksud tersebut dan juga sekaligus sambil menunjang kelancaran tugas bagi Dinas-Dinas Peternakan Daerah dalam hal penetapan diagnosa Anthrax secara cepat dan tepat, maka L.P.P.H. mencoba mengembangkan Uji Ascoli ini.

Sebagai ilustrasi dikemukakan di sini, bahwa penetapan diagnosa Anthrax di laboratorium atas dasar hasil-hasil pemeriksaan mikroskopik, biologik dan biakan kuman berlangsung sampai dengan 72 jam lamanya, sedangkan dengan Uji Ascoli yang disederhanakan ini hanya diperlukan waktu 4 - 6 jam saja. Jelas di sini terjadi penghematan waktu sebesar 91,6% sampai 94,4%.

Uji Ascoli.

Pada prinsipnya Uji Ascoli adalah presipitasi yang terjadi apabila presipitinogen yang terdapat dalam bahan pemeriksaan direaksikan dengan presipitin yang terdapat dalam serum hiperimun yang homolog (Hutyra, Marek dan Manninger, 1946).

Untuk itu, serum hiperimun yang dimaksud yang seterusnya dalam tulisan ini disebut serum Ascoli harus dimiliki lebih dahulu.

Lazimnya serum hiperimun dibuat dengan menyuntikkan suspensi antigen kokto (cocto antigen) pada hewan percobaan keledai atau kelinci dengan cara tertentu.

Dalam hal ini antigen kokto yang digunakan berupa serbuk kering dibuat dari biakan muda kuman *Bacillus anthracis* yang dibunuh secara perebusan. Selanjutnya serbuk kering demikian dilarutkan dalam larutan garam faali dan dengan perlakuan tertentu diinokulasikan pada hewan percobaan yang tersedia.

Oleh sebab kesulitan dalam memperoleh keledai maka sebagai hewan percobaan untuk memperoleh serum Ascoli dipakai: kelinci.

Di dalam bagian pertama tulisan ini akan dipaparkan tentang pembuatan antigen kokto secara terperinci.

BAHAN DAN CARA KERJA

Pada mulanya penulis menggunakan metoda Kudrjawzew dan Romanow (1928) dalam cara pembuatan Antigen Kokto. Namun dalam kenyataannya dalam metoda tersebut dijumpai banyak kesulitan, seperti sulitnya memperoleh kertas saring Schleiter 575, alat pensel, juga kesulitan dialami dalam cara pengeringan sedimen kumannya. Oleh karena itu kemudian diadakan modifikasi seperlunya terhadap metoda tersebut di atas itu.

Modifikasi yang dimaksud meliputi beberapa hal berikut ini: sebagai pengganti alat pensel dipakai butir-butir gelas mutiara (glass beads) untuk menuai biakan kuman. Adapun sebagai pengganti kertas saring Schleiter 575, suspensi kuman diputar dengan alat pemusing untuk memperoleh sedimennya (Society of American Bacteriologist, 1957).

Selanjutnya untuk mengeringkan sedimen kuman yang diperoleh dari hasil pemusingan, dipergunakan alat pengering (freeze dryer).

Dalam pelaksanaannya pembuatan antigen kokto dikerjakan sebagai uraian di bawah ini:

a. Pemurnian biakan kuman *Bacillus anthracis*.

Dalam koleksi kuman L.P.P.H. Bogor terdapat beberapa isolat lokal *B. anthracis* berasal dari berbagai kota di Indonesia. Isolat *B. anthracis* asal Purwakarta, Jawa Barat, dipakai dalam penelitian ini untuk pembuatan antigen kokto. Pada media padat agar alkalis dalam cawan-cawan Petri bergaris tengah 90 mm. disemai biakan kuman *B. anthracis* umur 24 jam dalam air kaldu alkalis, yang kemudian dieramkan dalam lemari pengeram yang bersuhu 37°C selama 24 jam. Koloni-koloni kuman terpilih diambil untuk disemaikan ulang ke dalam air kaldu alkalis dalam tabung-tabung reaksi dan dimasukkan ke dalam lemari pengeram bersuhu 37°C selama 24 jam. Dari sini biakan-biakan kuman yang khas diteliti kemurniannya, antara lain dengan pemeriksaan mikroskopik atas sediaan kuman yang bersangkutan.

Dari biakan murni yang terpilih kemudian dibuat suspensi kumannya dalam larutan garam faali steril untuk selanjutnya diinokulasikan pada 2 (dua) ekor marmot dengan dosis a 0,5 ml. di bawah kulit (sub-kutan). Hewan percobaan ini mati dalam 48 jam pos inokulasi.

Pengasangan kembali *B. anthracis* dari marmot-marmot percobaan yang mati tersebut, menghasilkan biakan kuman anthrax yang memenuhi syarat untuk pembuatan antigen kokto.

b. Penyiapan alat dan bahan-bahan.

1. Ke dalam botol-botol gepeng bekas Ercevit berukuran 100 ml. yang berisi butir-butir gelas mutiara secukupnya, dimasukkan air kaldu alkalis (PH 7,2) sebanyak lebih kurang 30 ml. tiap botolnya. Sterilisasi dilangsungkan di dalam autoklaf.
2. Ke dalam botol-botol roux berukuran $18 \times 11 \text{ cm}^2$., dengan luas permukaan 198 cm^2 ., dimasukkan agar alkalis sebanyak 125 ml. tiap botolnya. Setelah sterilisasi di dalam autoklaf, botol-botol tadi diletakkan sedemikian, sehingga terjadi media padat agar alkalis.
3. Ke dalam botol-botol atau tabung-tabung reaksi dimasukkan sejumlah butir gelas mutiara yang kemudian disteril.
4. Labu-labu erlenmeyer berukuran 2000 ml., corong gelas besar, kertas saring, semuanya disteril secara kering dalam hot air sterilizer (oven).
5. Air suling, larutan garam faali, larutan jenuh garam dapur dan larutan asam cuka 50%, masing-masing terpisah dalam botol 250 ml., disteril di dalam autoklaf.

Pembuatan antigen dapat dimulai, bila yang tersebut pada a) dan b) telah disiapkan semuanya :

1. Biakan kuman *Bacillus anthracis* asal dari Purwakarta, Jawa Barat berumur 24 jam pada media agar alkalis miring yang terpilih dan sudah dimurnikan dipindahkan kepada media air kaldu alkalis dalam botol-botol gepeng. Pengeraman dilakukan pada suhu 37°C , sambil sekali-sekali dikocok.
2. Setelah biakan kuman dalam air kaldu alkalis mencapai umur 32 jam, maka selanjutnya kuman dibiakkan kembali (subcultured) pada media agar alkalis dalam botol-botol roux, untuk setiap botolnya sebanyak 0,5 ml. suspensi kuman. Dengan menggoyang-goyangkan botol roux tersebut, suspensi biakan kuman yang disemai menutupi seluruh permukaan media; pengeraman pada suhu 37°C dilangsungkan selama 14-15 jam.
3. Hari berikutnya (sesudah biakan berumur 14-15 jam), botol-botol roux dikeluarkan dari lemari pengeram untuk dituai. Ke dalam tiap botol roux ditambahkan larutan garam faali steril sebagai pembilas dengan volume yang berbeda-beda tergantung pada baik/tidaknya pertumbuhan kumannya sebagai berikut :

- 3.1. Ke dalam botol roux dengan pertumbuhan baik, ditambahkan 30 ml. larutan garam faali.
- 3.2. Ke dalam botol roux dengan pertumbuhan kurang baik, ditambahkan 25 ml. larutan garam faali.

Sedang botol roux dengan pertumbuhan jelek tidak dipakai. Dalam menuai, dipakai gelas mutiara secukupnya untuk memungkinkan seluruh koloni kuman terambil; jumlah larutan garam faali yang dipakai dipergunakan sebagai sebuah faktor (x) dalam menghitung penambahan zat-zat selanjutnya.

4. Untuk mengetahui kemurniannya, dari suspensi kuman hasil tuaian setiap botol roux dibuat sediaan dengan pewarnaan Giemsa. Dari hasil pemeriksaan ini, koloni kuman murni dari botol-botol roux kemudian ditampung ke dalam sebuah labu erlenmeyer berukuran 2 - 3 liter, melalui corong berkertas saring, yang telah disediakan. Corong tersebut di atas diberi tutup (misalnya dengan cawan Petri besar) untuk menghindari pencemaran. Cara menuangkan isi botol roux ke dalam corong harus dilakukan dengan hati-hati, supaya gelas-gelas mutiara tidak ikut terbawa.

5. Kemudian ke dalam labu erlenmeyer yang telah dihitung volume suspensi kumannya itu, ditambahkan berturut-turut:

- 5.1. air suling steril sebanyak 5 kali jumlah larutan garam faali yang terpakai, jadi : 5X.

- 5.2. larutan garam dapur jenuh sebanyak 20% dari volume suspensi tersebut dalam butiran 5.1. di atas, berarti: $\frac{1}{5} \times (X + 5X)$ ml. = 1,2 X ml.

- 5.3. larutan asam cuka 50% sebanyak 1 tetes (gtt) untuk setiap 20 ml. suspensi, sesudah penambahan larutan yang terakhir atau dalam hal ini $(X + 5X + 1,2X)$ ml., sehingga volume larutan asam yang ditambahkan, dihitung sebagai berikut:

$$\frac{X + 5X + 1,2X}{20} \times 1 \text{ gtt} = 0,36 X \text{ gtt.}$$

6. Sesudah penambahan berbagai zat seperti dalam urutan 5 di atas, maka volume suspensi kini menjadi: $(X + 5X + 1,2X + 0,36X)$ ml.

Kemudian suspensi ini dimasak selama 45 menit pada suhu 100°C dalam alat pemasak Koch.

7. Untuk mengetahui apakah masih ada kuman atau sporanya yang masih hidup, maka sesudah suspensi menjadi dingin diambil contohnya untuk dibiakkan pada media agar alkalis yang kemudian dieramkan dalam

- 1.1. dengan freeze dryer segi sterilitas lebih terjamin.
- 1.2. dengan freeze dryer akan diperoleh serbuk kuman murni, sedang dengan kertas saring serat kertas saring dapat ikut terbawa bersama endapan kumannya.

Percobaan-percobaan berikutnya dilanjutkan dengan inokulasi antigen kokto yang dihasilkan pada kelinci untuk memperoleh hiperimun serum anti antigen anthrax serta pelaksanaan reaksi presipitasi sesuai dengan metoda Ascoli, yang akan disajikan dalam tulisan: Bagian II.

RINGKASAN

Bila cara-cara pemeriksaan dalam mendiagnosa anthrax yang lazim dilakukan dalam laboratorium tidak mungkin lagi diadakan, maka satu-satunya cara yang masih mungkin ialah dengan: Uji Ascoli. Dengan modifikasi seperlunya dari pada metoda aslinya, telah berhasil dikembangkan antigen kokto kuman anthrax.

SUMMARY

If routine examinations for diagnosing anthrax in the laboratory cannot be conducted, so the ultimate test will be: Ascoli's test. By modifying the original method of producing cocto antigen B.anthraxis, the authors have been successful in developing a method of cocto antigen production.

UCAPAN TERIMA KASIH

Rasa terima kasih penulis disampaikan kepada segenap karyawan Bagian Bakteriologi L.P.P.H. yang telah memungkinkan terlaksananya tulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bruner, D.W. and Gillespie (1973)
Hagan's Infectious Diseases of Domestic Animals. 6 th. edition. Cornell University Press, London.
2. Hutyra, F., J. Marek and R. Manninger (1946)
Special Pathology and Therapeutics of the Diseases of Domestic Animals. 5 th. English edition vol. I. Balliere Tindall and Cox. London.
3. Kudrjawzew, G. and D. Romanow (1928)
Zur frage der Serodiagnostik bei Milzbrand. Zeitschr. f. inf. Krankh. Parasit. Krankh. und Hyg. der Haustiere.

4. Society of American Bacteriologists (1957)
Manual of Microbiological Methods. Mc Graw-Hill Book Company, inc. New York, Toronto, London.
5. Soemanegara, R. Md.T. (1958)
Ikhtisar singkat dari Penyakit Radang Limpa, Penyakit Ngorok dan Radang Paha di Indonesia. *Hemera Zoa*, vol. LXV, no. 7-8.
6. Viljoen, P.R., H.H. Curson and P.J.J. Faurie (1928)
Anthrax in South Africa. 13 th. and 14 th. Reports of the Director of Veterinary Education and Research, Union of South Africa.