

PENGEMBANGAN TEKNIK DIAGNOSA PARATUBERKULOSIS DENGAN ENZIM LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Rahmat Setya Adji¹⁾ dan Adrijanto Hauferson Angi²⁾

¹⁾ Balai Besar Penelitian Veteriner (BBALITVET) Jl. RE. Martadinata Bogor, Jawa Barat

²⁾ Program Studi Kesehatan Hewan Politeknik Pertanian Negeri Kupang
Jl. Adisucipto Penfui, P. O. Box. 1152, Kupang 85011

ABSTRACT

Diagnosis Technique Development Paratuberculosis With Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Paratuberculosis (Johne's Disease) is a chronic granulomatous enteritis diseases 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 for 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 commercial ELISA kit (IDEXX), showed good result. The result of ELISA 80 serum sample of dairy cattle from Kaliadem, Sleman-Daerah Istimewa Yogyakarta, showed negative paratuberculosis (mean of OD 0,162 ± 0,015).

Keywords: 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) dan dapat ditularkan melalui pakan yang terkontaminasi feses 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, meningkatkan hewan yang diafkir dan menyebabkan kematian (Philip 2000). Paratuberculosis ini dilaporkan sangat populer dan banyak terjadi pada sapi-sapi di Australia, New Zaeland, Belanda, Jerman, Denmark, Inggris, Autria, Belgia dan Amerika Serikat. Di Amerika Serikat, kerugian akibat penyakit ini diperkirakan mencapai US \$ 1,5 milyar setiap tahunnya (Colin *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 paratuberculosis adalah diare dan kurus dengan penebalan dan perlipatan usus terutama pada pangkal ileum. Diagnosa penyakit ini berdasarkan gejala klinik dan diteguhkan dengan pemeriksaan laboratorium. Metoda isolasi dan identifikasi ini bagus untuk diagnosa paratuberculosis pada hewan hidup dan digunakan untuk mendapatkan isolat *Mycobacterium paratuberculosis*. Sampel yang digunakan untuk isolasi dan identifikasi dengan faeces dan usus (ileocaecal dan *Limfoglandula mesenterika*). Media yang

digunakan adalah Herrold's Egg yolk Medium with Mycobactin dan diinkubasikan selama 15-20 minggu (OIE 2000).

Uji serologi yang biasa digunakan untuk diagnosa paratuberkulosis adalah Complement Fixation Test (CFT), Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) dan Agar Gel Immunodiffusion (AGID) untuk mengukur imunitas humoral serta Gamma Interferon untuk mengukur imunitas selular. 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 serologis serum sapi perah, terdapat 1,67 % sampel yang positif. Kit ELISA yang digunakan sekarang ini merupakan produk import dengan harga yang sangat mahal dan memerlukan waktu untuk mendapatkannya. Karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengembangkan dan membuat kit ELISA paratuberculosis sebagai perangkat diagnosa yang mudah dan murah. Hal ini dilakukan untuk mempermudah diagnosa dan pengendalian penyakit paratuberkulosis di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Balai Besar Penelitian Veteriner yang ditunjang dengan pengambilan sampel serum dari peternakan sapi perah di Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

Pembuatan Antigen :

Pada penelitian ini dibuat 3 macam antigen untuk coating plate (1 dan 2) dan absorpsi serum (3) yaitu *Mycobacterium paratuberculosis* ditumbuhkan pada media cair Watson dan Reid's serta diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 8 – 10 minggu. Setelah tumbuh baik dan banyak, disentrifuse, pellet diambil dan dicuci dengan Phosphate Buffer Selina (PBS) sebanyak 3 kali. Selanjutnya dipanaskan atau disonikasi selama 15 menit . kemudian disentrifuse, sel dibuang dan ekstrak disterilisasi menggunakan milipore 0,2 um (Cox, *et al.* 1991), (2) *Mycobacterium avium* ditumbuhkan pada media cair Dorset dan Henley serta diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 8 – 10 minggu. Setelah tumbuh baik dan banyak, disentrifuse dan pelet diambil, dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Selanjutnya dipanaskan atau disonikasi selama 15 menit. Kemudian disentrifuse, sel dibuang dan ekstrak disterilisasi menggunakan milipore 0,2 um (Cox, *et al.* 1991), (3) *Mycobacterium phlei* ditumbuhkan pada media cair Dorset dan Henley serta diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 8 minggu. Setelah tumbuh baik dan banyak, disentrifuse dan pelet diambil, dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali, disaring, pellet diambil dan dikeringkan (Milner, *et al.* 1990).

Conjugate dan Serum Kontrol :

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

Prosedur Uji mengikuti petunjuk Milner et al . 1987; Waters et al. 1999; Olsen et al. 2001)

Antigen dilarutkan dalam coating buffer (bicarbonat buffer pH 9,6) kemudian masukkan sebanyak 100 ul 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 ul PBS casein 0,5% pH 7,4 ke dalam lubang mikroplat dan diinkubasikan selama satu jam pada suhu kamar. Cuci mikroplat tersebut dengan PBS tween 0,05% , kemudian masukan 100 ul 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. Mikroplate 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 100ul ke dalam lubang plate. Kocok/goyang mikroplat tersebut pada suhu kamar selama satu jam. Selanjutnya mikroplat tersebut dicuci kembali dan masukkan 100 ul substrat (ABTS dalam citrate buffer pH 4,2), kemudian kocok / goyang pada suhu kamar selama satu jam. Selanjutnya dibaca dengan ELISA Reader pada panjang gelombang 405 atau 414 nm. Intepretasi hasil dengan menggunakan OD. Cut - off yang digunakan adalah rata-rata negatif OD + 3 SD..

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 Dorser Henley. Nilai cut- off ELISA paratuberculosis yang telah dikembangkan adalah rata-rata negat 1,45 dan 0,11. Serum control positif dan negative juga diuji banding dengan menggunakan Kit ELISA komersial (IDEXX) dengan nilai rata-rata Optical Density 1,38 dan 0,09. 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 OD 0,162 ± 0,015. Sampel serum ini juga diuji dengan Kit ELISA komersial (IDEXX) dengan rata-rata OD 0,12. Dari hasil diatas menunjukkan bahwa sampel serum tersebut adalah negatif (tidak mengandung antibodi terhadap paratuberculosis).

Metode diagnosis paratuberculosis yang telah dikembangkan merupakan uji serologi untuk mendeteksi adanya antibodi terhadap paratuberculosis dalam serum darah sapi. ELISA antibodi ini menggunakan standar cut-off rata-rata OD negatif + 3 SD, yaitu 0,29. untuk mengurangi cross reaksi, serum terlebih dahulu diabsorpsi dengan menggunakan antigen *Mycobacterium phlei*. Hasil ELISA terhadap 80 sampel serum darah sapi dari Sleman menunjukkan hasil negatif, hal ini menggambarkan bahwa wilayah Kecamatan Cangkringan, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta belum terdapat penyakit Paratuberculosis.

KESIMPULAN

ELISA antibodi penyakit paratuberkulosis yang dikembangkan mempunyai standar nilai cutt –off 0,29. Kejadian penyakit paratuberkulosis di Kecamatan Pakem mungkin belum ada, hal ini didasarkan dari hasil uji ELISA terhadap serum sapi perah menunjukkan hasil negatif..

DAFTAR PUSTAKA

- Collins, MT, Socket, DC, Gooder, WJ, Conrad, TA. 1994. Herd Prevalence and Geografic Distribution of, and Risk Factors for Bovine Paratuberculosis in Wisconsin. *J. Am Med. Ass.* 2004: 636-641.
- Floron C, Farries Jr, Allen Jr, Ellen J, Sandra, RS, Derry, DM. 1999. *Bovine Paratuberculosis of Dairy Catle* . Texas Agricultural Extesion Service, The texas A & M University System, 1-4.
- Cox, JC, Drane, DP, Jones, SL, Ridge S, Milner, AR. 1991. Development and Evaluatin of a Rapid Absorbed Enzyme Immunoassay Test for The Diagnosis of Johne’s Diseases in Catle. *Australian Veterinary Journal*, 68 : 157-160.
- Jark U, Ringena B, Franz, GF, Gelach M. 1997. Development of an ELISA technique for Serodiagnosa of Bovine Paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 51 : 189 – 198.
- Milner, AR, Lepper, AWD. SYmonds, WN, and Gruner E. 1987. Analysis by ELISA and Western Blotting of Antibody Reactivities in Catle Infected with Mycobacterium Paratuberculosis after Absorbtion of Serum with Mycobacterium Phlei. *Research in Veterinary Science*. 42 : 140 – 144.
- Milner, AR Mack, WN, Coates KJ, Hill J, Gill I, Sheldrick P. 1990. The Sensitivity and Specitivity of a Modified ELISA for The Diagnosis of Johne’s Disease from a Field Trial in Catle. *Veterinary Microbiology* . 25 : 193 – 198.
- [OIE] Office International *des Epizooties*. 2000. Paratuberculosis. In *Manual of Standarts Diagnostic Test and Vaccines* . 293-303.
- Philip H. Jones. 2002. *Update on Bovine Paratuberculosis (Johne’s Disease)*. University of Liverpool, Department of Veterinary Clinical Science and Animal Husbandry, Faculty of Veterinary Science, Leahurst, Neston, South Wirral. 1-20.