

**Efektivitas Metode Uji Enzymed Linked Immunosorbant Assay (ELISA)
dalam Mendeteksi Antibodi Penyakit Enzootic Bovine Leucosis di UPTD Perbibitan
Kabupaten Konawe Selatan, Sulawesi Tenggara**

Siswani⁽¹⁾, Rosmiaty⁽²⁾, Wulandari Utami⁽¹⁾

(1) Medik Veteriner, (2) Paramedik Veteriner
Balai Besar Veteriner Maros
siswani.nink@yahoo.com

Abstrak

Penyakit *Enzootic Bovine Leukosis* (EBL) adalah penyakit pada ternak yang disebabkan oleh virus leukemia sapi, *Bovine Leukosis Virus* (BLV) yang merupakan virus golongan *retroviridae*. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari efektivitas metode ELISA untuk mendeteksi keberadaan penyakit *Enzootic Bovine Leucosis* (EBL) pada sapi Bali di UPTD Perbibitan Sapi Bali Kabupaten Konawe Selatan. Sebanyak 70 sampel serum sapi Bali milik UPTD Perbibitan Kabupaten Konawe Selatan yang terdiri dari 68 betina dan 2 jantan di uji di laboratorium serologi Balai Besar Veteriner Maros. Jenis Elisa kit yang digunakan dalam pengujian ini adalah kit komersial *Competitive ELISA ID Vet* (Perancis), kit diagnostik ini dirancang untuk mendeteksi antibodi terhadap glikoprotein gp51 dalam serum sapi dan kerbau, baik sampel individual maupun sampel yang di *pooled* (sampai 10 sampel). Hasil uji ELISA EBL terhadap sampel serum sapi Bali milik UPTD Perbibitan Kabupaten Konawe Selatan menunjukkan bahwa dari 70 sampel yang diuji terdeteksi positif sebanyak 2 sampel (2,86%) positif antibody, uji tersebut mempunyai korelasi positif dengan gejala klinis yang muncul dilapangan, yaitu tumor (limfosarkoma). Dengan demikian teknik ELISA dapat digunakan untuk monitoring penyakit EBL pada sapi dan terutama untuk sapi bibit.

Pendahuluan

Penyakit *Enzootic Bovine Leukosis* (EBL) adalah penyakit pada ternak yang disebabkan oleh virus leukemia sapi, *Bovine Leukosis Virus* (BLV) yang merupakan virus golongan *retroviridae*. Umumnya penyakit ini menyerang pada ternak sapi dan kerbau usia dewasa (diatas 3 tahun) namun sapi tahap embrio juga bisa terinfeksi namun kemungkinan sangat jarang. Pada umumnya sapi perah banyak yang terinfeksi dibanding sapi potong, hal ini disebabkan karena sapi perah memiliki populasi sapi tua lebih banyak dibandingkan sapi potong (Subronto, 1990). Penyakit EBL ditandai dengan meningkatnya sel leukosit dalam darah dengan sel B limfosit sebagai target sel. Hal ini terjadi karena adanya rangsangan virus EBL pada jaringan limfatik

sehingga sel-sel jaringan tersebut mengalami *hyperplasia* (Saepullah, 2015). Sel-sel limfosit mengalami *hyperplasia*, maka manifestasi yang tampak berupa pembengkakan jaringan limfatik terutama di *limfoglandula perifer* (Amills *et al.* 2004; Uera *et al.* 2012; Yoon *et al.* 2005; Konnai *et al.* 2013). EBL ditularkan baik secara vertikal maupun horizontal dalam populasi ternak. Penularan vertikal dapat terjadi ketika virus dapat menembus *barier* melalui plasenta, *pasca partus*, dan kolostrum ke anaknya (Gutierrez *et al.*, 2011; Lassauzet *et al.*, 1991). Ada beberapa rute untuk transmisi BLV secara horizontal antar sapi, diantaranya palpasi rektal tanpa mengganti sarung tangan, penggunaan jarum suntik untuk banyak hewan, *dehorning* (pemotongan tanduk), keberadaan serangga penghisap darah (lalat kuda), dan kontak erat antar hewan (Gutierrez *et al.*, 2014; Perino *et al.*, 1990; Rodriguez *et al.*, 2011). Karena EBL adalah penyakit yang ditularkan melalui darah, maka untuk mencegah kontak langsung dan tidak langsung dengan darah yang terinfeksi merupakan langkah terpenting untuk mencegah penyebaran BLV pada ternak sapi.

Penyakit ini dapat mengakibatkan gangguan sistem reproduksi dan penurunan produksi susu, sehingga menyebabkan kerugian ekonomi bagi peternak (Yavru *et al.* 2007; Kobayashi *et al.* 2010; Rodriguez *et al.* 2009). Infeksi yang disebabkan oleh BLV merupakan infeksi persisten dan kronik dengan tahapan sebagai berikut: (i) pada tahap awal hewan yang terinfeksi tidak memperlihatkan gejala klinis ataupun kelainan hematologis dan hewan tersebut akan bersifat sebagai *carrier*, (ii) pada tahap kedua dijumpai adanya perubahan gambaran darah dengan terjadinya peningkatan jumlah limfosit persisten, dan (iii) bentuk limfosarkoma dimana terjadi perubahan yang tampak secara klinis yaitu munculnya tumor yang diikuti dengan bentuk limfosit persisten (Sharifzadeh *et al.* 2011)

Kebanyakan infeksi bersifat subklinis, tetapi sebagian sapi di atas tiga tahun mengalami limfositosis persisten, dan untuk jumlah yang lebih kecil mengalami limfosarkoma (tumor) di berbagai organ dalam, hal yang sama juga terjadi pada kerbau. Menurut Kobayashi (2014) EBL

telah dinyatakan sebagai penyakit penting dalam perdagangan hewan oleh OIE. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa infeksi virus pada populasi ternak berakibat terhadap kerugian pada peternakan yaitu mempercepat masa afkir, menurunkan produksi susu atau menurunkan performa reproduksi. Dampak secara ekonomi akibat virus ini adalah adanya larangan pemasukan ternak, semen dan embrio dari negara yang tertular EBL (Gutierrez *et al.* 2009). EBL dapat ditularkan secara horizontal dan vertikal, yaitu penularan dari hewan satu ke yang lain ataupun dari induk ke anak. Tanda klinis yang muncul tergantung dari organ yang terpengaruh, bahkan kematian ternak dapat terjadi secara tiba-tiba ataupun berbulan-bulan setelah infeksi. Di wilayah sumber bibit sapi bali, khususnya di UPTD Perbibitan Sapi Bali di Kabupaten Konawe Selatan beberapa penyakit hewan menular pada ternak menjadi perhatian karena penyakit ini tidak boleh ada pada ternak bibit, seperti *Brucellosis*, *Bovine Viral Diarrhea* (BVD), *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR), *Antraks*, *Tuberculosis* (TBC), *Babesiosis*, *Anaplasmosis*, *Trichomoniasis*, *Enzootic Bovine Leucosis* (EBL), dan *Theileriosis* (Dirbitpro, 2017). Secara serologi EBL dapat dideteksi dengan metode ELISA (*Enzym Linked Immunosorbant Assay*), dengan mendeteksi antibodi terhadap glikoprotein (gp51) pada sampel serum (Dimmock *et al.* 1987). Lorin *et al.* (2007) menyarankan bahwa suatu peternakan akan terbebas dari EBL apabila hewan yang memiliki seropositif dipisahkan dari kelompok hewan yang seronegatif. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari efektivitas metode ELISA untuk mendeteksi keberadaan penyakit *Enzootic Bovine Leucosis* (EBL) pada sapi Bali di UPTD Perbibitan Sapi Bali Kabupaten Konawe Selatan.

Materi dan Metode

Sampel

Sebanyak 70 sampel serum sapi Bali milik UPTD Perbibitan Kabupaten Konawe Selatan yang terdiri dari 68 betina dan 2 jantan di uji di laboratorium serologi Balai Besar Veteriner Maros.

Perlakuan terhadap sampel serum tersebut yaitu dilakukan inaktivasi pada suhu 58°C di *waterbath* dan preparasi untuk melakukan uji serologik ELISA. Metode ini dipilih karena cukup mudah dan rutin dilakukan serta sensitivitasnya telah diakui oleh OIE.

Uji serologik dengan Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)

Beberapa jenis ELISA cukup sensitif untuk digunakan dalam mendiagnosa penyakit EBL. ELISA dilakukan dengan menggunakan *mikroplate* yang telah dilapisi antigen baik secara langsung atau dengan menggunakan poliklonal atau monoklonal antibodi (MAb) (OIE, 2019). Antigen *Bovine Leukosis Virus* digunakan untuk melapisi *microplate* yang berasal dari kultur sel yang terus menerus terinfeksi BLV. Jenis Elisa kit yang digunakan dalam pengujian ini adalah kit komersial *Competitive ELISA ID Vet* (Perancis), kit diagnostik ini dirancang untuk mendeteksi antibodi terhadap glikoprotein gp51 dalam serum sapi dan kerbau, baik sampel individual maupun sampel yang di *pooled* (sampai 10 sampel). Komponen kit terdiri dari : *microplate* yang sudah dilapisi dengan antigen BLV, *conjugate concentrate* (10x), Kontrol positif, kontrol negatif, *dilution buffer*, *wash concentrate* (20x), *substrate solution*, dan *stop solution* (0,5M). Metode pengujian yang dipilih adalah metode short incubation individual sera, dimana inkubasi sampel selama 45 menit ± 4 menit pada suhu 21°C ($\pm 5^\circ\text{C}$). Tahapan pengujian ELISA diawali dengan memasukkan *dilution buffer* 2 ke semua lubang (*well*), lalu dilanjutkan memasukkan kontrol kemudian sampel diinkubasi. Setelah inkubasi dilakukan tahapan pencucian, lalu penambahan antibodi sekunder yang terlabel enzim (*Conjugate anti-gp51 peroxidase/HRP* kompleks). Substrat (TMB) ditambahkan ke dalam *well*, lalu dilanjutkan dengan penambahan *stop solution* sambil memperhatikan perubahan warna dilanjutkan dengan pembacaan menggunakan *ELISA reader* di filter 450 nm dan hasil diukur dengan S/N ratio dengan formula sebagai berikut:

$$S/N = \frac{OD \text{ Sampel}}{OD \text{ Kontrol Negatif}} \times 100$$

Hasil diinterpretasi dengan S/N *ratio* kurang dari sama dengan 50% adalah positif dan S/N *ratio* lebih dari sama dengan 50% adalah positif.

Tabel 1. Interpretasi uji ELISA EBL

S/N	Titer	Interpretasi
S/N	$\geq 50\%$	Negatif
S/N	$\leq 50\%$	Positif

Hasil dan Pembahasan

Hasil uji ELISA EBL terhadap sampel serum sapi Bali milik UPTD Perbibitan Kabupaten Konawe Selatan menunjukkan bahwa dari 70 sampel yang diuji terdeteksi positif sebanyak 2 sampel (2,86%) positif antibodi (Tabel 2). Hasil tersebut sesuai dengan *cut off* positif yaitu $\leq 50\%$.

Tabel 2. Hasil uji ELISA EBL

Sampel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	NC		13	21	29	37	45	53	61	69
	0.940	⁵ 0.913	0.881	0.001	0.908	0.833	0.881	0.791	0.883	0.799
B	NC		14	22	30	38	46	⁵⁴	62	70
	0.957	⁶ 0.882	0.839	0.001	0.830	0.794	0.865	0.092	0.872	0.771
C	PC		15	23	31	39	47	55	63	71
	0.071	⁷ 0.805	0.727	0.001	0.827	0.806	0.850	0.796	0.856	0.769
D	PC		16	24	32	40	48	56	64	72
	0.065	⁸ 0.837	0.813	0.001	0.705	0.770	0.727	0.754	0.814	0.763
E	1		17	25	33	41	49	⁵⁷	65	73
	0.887	⁹ 0.848	0.806	0.001	0.802	0.837	0.780	0.308	0.777	0.820

F	2 0.964	10 0.797	18 0.862	26 0.001	34 0.839	42 0.896	50 0.949	58 0.772	66 0.846	74 0.793
G	3 0.948	11 0.774	19 0.755	27 0.001	35 0.841	43 0.809	51 0.838	59 0.869	67 0.806	75 0.796
H	4 0.931	12 0.848	20 0.809	28 0.001	36 0.878	44 0.899	52 0.899	60 0.850	68 0.871	76 0.813

Sapi yang terinfeksi oleh virus BLV akan membentuk antibodi dalam jangka waktu yang lama (Balic *et al.* 2012), terlebih lagi bila di daerah tersebut, vaksinasi terhadap penyakit EBL belum pernah dilakukan, maka terdeteksinya antibodi terhadap virus BLV yang menyebabkan penyakit EBL dapat dikonfirmasi sebagai infeksi alami. Terdeteksinya antibodi terhadap virus BLV tidak selalu diiringi dengan munculnya gejala klinis (Jimba *et al.* 2012). Tidak munculnya gejala klinis dan tidak terdeteksinya antibodi terhadap BLV bukan berarti hewan tersebut tidak terinfeksi virus BLV (Saepulloh, 2015). Hal ini dapat disebabkan oleh jumlah virus BLV yang sangat sedikit sehingga tidak dapat menggertak sistem kekebalan tubuh untuk menghasilkan antibodi yang dapat terdeteksi dengan uji serologis baik dengan uji ELISA (Saepulloh, 2015).

Sebagian besar infeksi BLV tidak menunjukkan gejala klinis, dan setelah masa laten hingga 8 tahun sapi dapat menunjukkan *malignant B-cell lymphosarcomas* (Saepulloh, 2015). Untuk kasus positif ELISA di UPTD Perbibitan Kabupaten Konawe Selatan, ternak sapi yang positif secara serologis menunjukkan hal yang sejalan dengan gejala klinis yang muncul, yaitu di beberapa bagian tubuh ternak terdapat tumor (limfosarkoma). Sekitar 30% sapi yang terinfeksi secara alami, akan menunjukkan *persistent leucocytosis* yang menyebabkan pro-virus BLV banyak bersirkulasi dalam darah tanpa menunjukkan gejala klinis (Gillet *et al.* 2007). Provirus ini dapat terdeteksi dengan uji PCR, uji PCR dapat mendeteksi sejumlah kecil DNA provirus, melalui

hibridisasi, reamplifikasi atau prosedur *seminested* (Malgorzata *et al.* 2012).

Antibodi yang paling mudah dideteksi adalah yang diarahkan ke gp51 dan p24 virus. Sebagian besar uji ELISA dalam penggunaan rutin adalah untuk mendeteksi antibodi terhadap glikoprotein gp51, dan metode melakukan tes ini telah diterbitkan (Dimmock *et al.*, 1987; Komisi Eropa, 2009). Telah diutarakan bahwa faktor predisposisi genetik dan cara pemeliharaan mempengaruhi keberadaan penyakit EBL ini, khususnya sapi Bali perlu mendapat perhatian dengan cara diintensifkan dan dilakukan *screening* secara rutin untuk memonitoring keberadaan virus BLV dan mencegah penularan lebih luas.

Kesimpulan

Uji serologis dengan menggunakan teknik ELISA (*ID Screen® BLV Competition*) telah berhasil mendeteksi antibodi BLV dari sampel serum sapi milik UPTD Perbibitan Kabupaten Konawe Selatan sebanyak dua sampel serum. Uji tersebut mempunyai korelasi positif dengan gejala klinis yang muncul dilapangan, yaitu tumor (limfosarkoma). Dengan demikian teknik ELISA dapat digunakan untuk monitoring penyakit EBL pada sapi dan terutama untuk sapi bibit.

Daftar Pustaka

- Abd El-Hafeid YGM, Metias KN, Ibrahim IGA. 2010. Comparative serological detection of Enzootic Bovine Leukosis Virus (EBLV) in cattle sera. *Global Vet.* 4:267-270.
- Aida Y, Takeshima S, Panei CJ, Omori T, Nunoya T, Davis WC, Ishizaki H, Matoba K. 2014. BLV-CoCoMo- qPCR: Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis. *Retrovirology*, 11(Suppl 1):P143. <http://www.retrovirology.com/content/n/S1/P143>.
- Amills M, Norimine J, Olmstead CA, Lewin HA. 2004. Cytokine mRNA expression in B cells from bovine leukemia virus-infected cattle with persistent lymphocytosis. *Cytokine.* 28:25-28.
- Anonim. 2005. Draft final rencana strategis pembangunan kesehatan hewan. Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan. Departemen Pertanian.
- Balic D, Lojkić I, Periskić M, Bedeković T, Jungić A, Lemo N, Roić B, Cac Z, Barbic L, Madić J

- .2012. Identification of a new genotype of bovine leukemia virus. *Arch Virol*. 157:1281-1290.
- Beier D, Riebe R, Blankenstein P, Starick E. 2004. Establishment of a new bovine leukosis virus producing cell line. *J Virol Methods*. 121:239-246.
- Camargos MF, Stancek D, Rocha MA, Lessa LM, Reis JK, Leite RC. 2003. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 49:325-331.
- Camargos MF, Feliziani F, De Giuseppe A, Lessa LM, Reis JKP, Leite RC. 2007. Evaluation of diagnostic test to bovine leukemia virus. *Revista Portuguesa Ciencias Vet*. 102:169-173.
- Forti K, Rizzo G, Cagiola M, Ferrante G, Marini C, Feliziani F, Pezzotti G, De Giuseppe F. 2014. Identification of a novel overlapping sequential E epitope (E0) on the bovine leukaemia virus SU glycoprotein and analysis of immunological data. *Vet Microbiol*. 172:157-167.
- Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 4:18.
- Gonzalez ET, Licursi M, Vila RV, Bonzo E. 2008. Evidence of bovine immunodeficiency virus (BIV) infection: serological survey in Argentina. *Res Vet Sci*. 85:353-358.
- Grimshaw WT, Wiseman RA, Petrie L, Selman LE. 1979. Bovine leucosis (lymphosarcoma): A clinical study of 60 pathologically conformed cases. *Vet Rec*. 105:267-272.
- Gutierrez G, Alvarez I, Politzki R, Lomonaco M, Dus Santos MJ, Rondelli F, Fondevila N, Trono K. 2011. Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol*. 151:255-263.
- Inoue E, Matsumura K, Soma N, Hirasawa S, Wakimoto M, Arakaki Y, Takashi Yoshida T, Osawa Y, Okazaki K. 2013. L233P mutation of the Tax protein strongly correlated with leukemogenicity of bovine leukemia virus. *Vet Microbiol*. 167:364-371.
- Jimba M, Takeshima S, Murakami H, Kohara J, Kobayashi N, Matsuhashi T, Ohmori T, Nunoya T, Aida Y. 2012. CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC Veterinary Research* 2012, 8:167 <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/167>.
- Kobayashi S, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Kameyama K, Konishi M, Murakami K. 2010. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *BMC Vet Res*. 6:1-6.
- Konnai S, Suzukia S, Shirai T, Ikebuchia R, Okagawa T, Sunden Y, Mingala CN, Onuma M, Murata S, Ohashi K. 2013. Enhanced expression of LAG-3 on lymphocyte subpopulations from persistently lymphocytotic cattle infected with bovine leukemia virus. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*. 36:63-69.
- Lorin A, Lins L, Stroobant V, Brasseur R. 2007. Determination of the minimal fusion peptide of bovine leukemia virus gp30. *Biochem Biophys Res Commun*. 355:649-653.
- Malgorzata S, Slawomir Z, Sylwia K. 2012. Diagnosis of the bovine leukaemia virus infection in Polish Holstein- Friesian cows and comparison of their milk productivity. *Acta Vet Brno*. 81:353-358.

- Markiewicz L, Rulka J, Kaminski S. 2003. Detection of BLV provirus in different cells by nested-PCR. *Bull Vet Inst Pulawy*. 47:325-331.
- Mohammadabadi MR, Soflaei M, Mostafavi H, Honarmand M. 2011. Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle. *Gen Mol Res*. 10:2658-2663.
- Mousavi S, Haghparast A, Mohammadi G, Tabatabaeizadeh SE. 2014. Prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in the northeast of Iran. *Vet Res Forum*. 5:135139.
- Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Yamamoto T, Tsutsui T. 2011. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Vet Microbiol*. 148:84-88.
- Nuotio L, Rusanen H, Sihvonen L, Neuvonen E. 2003. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev Vet Med*. 59:43-49.
- [OIE] Office International des Epizootics. 2012. Enzootic bovine leukosis. OIE Terrestrial Manual 2019. Chapter 2.4.11.
- Ramanavicius A, Kurilcik N, Jursenas S, Finkelsteinas A. 2007. Conducting polymer based fluorescence quenching as a new approach to increase the selectivity of immunosensors. *Biosens Bioelectron*. 23:499-505.
- Rodriguez SM, Golemba MD, Campos RH, Trono K, Jones LR. 2009. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for existence of two novel clades. *J Gen Virol*. 90:2788-2797.
- Sarosa A, Ronohardjo P. 1988. Studi pendahuluan penyebaran penyakit enzootic bovine leukosis di beberapa daerah di Indonesia. *Penyakit Hewan*. 20:20-22.
- Scott HM, Sorenson O, Wu JT, Chow EY, Manninen K, VanLeeuwen JA. 2006. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Neospora caninum*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. *Can Vet J*. 47:981-991.
- Stone DM, Norton LK, Chambers JC, Meek WJ. 2000. CD4 T lymphocyte activation in BLV-induced persistent B lymphocytosis in cattle. *Clin Immunol*. 96:280-288.
- Sharifzadeh A, Abbas D, Payam GD. 2011. Molecular detection of Bovine Leukemia virus (BLV) in the Semen Samples of Bulls. *World J Zoology*. 6:285-290.
- Uera JA, Ventura Lazaro JV, Mingala CN. 2012. Detection of Enzootic Bovine Leukosis in Cattle using Nested Polymerase Chain Reaction Assay. *Thai J Vet Med*. 42:319-324.
- Yavru S, Kale M, Ata A, Yapkiç O, Bulut O, Gulay MS. 2007. Effects of subclinical bovine leukemia virus infection on fertility of holstein cows and heifers. *Medycyna Wet*. 63:667-669.
- Yoon SS, Bae YC, Lee KH, Han B, Han HR. 2005. Characteristics of Bovine Lymphoma Caused by Bovine Leukemia Virus Infection in Holstein-Friesian Dairy Cattle in Korea. *Asian-Aust. J Anim Sci*. 18:728-733
- Zaher KS, Ahmed WM. 2014. Bovine leukemia virus infection in dairy cows in Egypt. *Acad J Cancer Res*. 7:126-130.