

PENGARUH PERBEDAAN KONSENTRASI DAN TEMPERATUR PENYIMPANAN ANTIGEN *BRUCELLA ABORTUS* TERHADAP KUALITAS UJI ROSE BENGAL

Febri Hartanti

Pusat Veteriner Farma Surabaya

ABSTRAK

Brucellosis merupakan penyakit yang penting, bersifat zoonosis dan menimbulkan banyak kerugian. Gejala yang muncul cenderung subklinis sehingga sulit dideteksi. Oleh karena itu, deteksi dini sangat penting. *Rose Bengal Test* merupakan salah satu uji skrining brucellosis yang digunakan dalam pengujian. Konsentrasi antigen maupun temperatur penyimpanan sangat mempengaruhi kualitas *Rose Bengal Test*. *Rose Bengal Test* memiliki beberapa versi yang berbeda-beda di seluruh dunia, tergantung pada status epidemiologi *Brucella* suatu negara, *immunoassays* yang digunakan, spesies hewan diuji dan interpretasi seri/paralel dari hasil serologis yang diadopsi. Menurut OIE, konsentrasi antigen yang dipakai adalah 8% dan temperatur 2° - 8°. Dalam proses produksi sudah mengikuti aturan tersebut, namun *Rose Bengal Test* tersebut sering disimpan oleh konsumen tidak sesuai petunjuk. Oleh karena itu, dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui prosentase konsentrasi antigen yang sesuai dengan kondisi saat ini dan stabilitas antigen pada berbagai temperatur penyimpanan. Antigen disiapkan dengan melakukan kultur *Brucella abortus* strain 1119 pada *Potato Agar* dan diinaktivasi dengan pemanasan 80° selama 90 menit. Setelah diputar menggunakan sentrifuse berpendingin 3000 rpm selama 90 menit, dibuat konsentrasi antigen 6%, 8%, 10% dan 12% serta disimpan dalam 3 jenis penyimpanan yaitu lemari pendingin, ruangan, dan *freezer*. Antigen diuji dengan pengenceran serum kontrol positif (100 IU – 1.000 IU) sesuai konsentrasi antigen. Pengujian stabilitas antigen dilakukan dengan uji fisik, uji variasi, uji identitas dan uji potensi serta uji serum sampel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi antigen yang lebih dari 8% lebih jelas aglutinasinya dengan nilai kesesuaian 6% (0,69), 8% (0,86), 10% (0,88) dan 12% (0,89). Hasil uji fisik, uji variasi, uji identitas dan uji potensi menunjukkan bahwa antigen yang disimpan dalam lemari pendingin lebih stabil dibandingkan yang disimpan dalam ruangan maupun *freezer* ($P = 0,000 < P 0,005$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah konsentrasi antigen yang sesuai sama dengan atau lebih dari 8% dan disimpan di lemari pendingin (2° - 8° merupakan temperatur penyimpanan yang bagus.

Kata kunci: Brucellosis, *Rose Bengal Test*, konsentrasi antigen, temperatur.

PENDAHULUAN

Brucellosis merupakan penyakit bakterial yang disebabkan bakteri *Brucella* yang menyerang sapi, kambing, babi, dan berbagai jenis hewan lainnya (hewan liar) serta bersifat zoonosis. Brucellosis di Indonesia ditetapkan sebagai salah satu Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS)

Deteksi dini terhadap penyakit brucellosis mutlak diperlukan sebagai langkah antisipasi adanya penyebaran penyakit tersebut. *Rose Bengal Test* merupakan salah satu perangkat deteksi serologi penyakit brucellosis yang digunakan sebagai skrining awal terhadap penyakit tersebut. Kualitas antigen selama produksi dan setelah produksi sangat penting diperhatikan untuk mengoptimalkan kualitas hasil pengujian. Menurut Alton *et.al* (1988), faktor produksi yang harus dipenuhi meliputi bentuk bakteri harus *smooth*, berat bakteri, pH *buffer*, dan konsentrasi suspensi antigen 8%. Kondisi di lapangan yang tidak sama pada beberapa daerah, terutama pasokan listrik yang tidak stabil

dan kesalahan personel dalam menyimpan antigen pada temperatur yang tidak sesuai petunjuk merupakan faktor resiko yang dapat mempengaruhi kualitas hasil pengujian.

Antigen RBT memiliki beberapa versi yang berbeda-beda di seluruh dunia, tergantung pada status epidemiologi *Brucella* negara tersebut, *immunoassays* yang digunakan, spesies hewan diuji dan interpretasi seri/paralel dari hasil serologis yang diadopsi. Versi RBT diantaranya adalah versi BCT Amerika, Inggris, Perancis versi lama dan Skotlandia. Versi BCT Amerika menggunakan konsentrasi 8% untuk ruminansia besar dan konsentrasi 3% untuk ruminansia kecil. Menurut Alton *et.al* (1988) dan OIE (2012), standarisasi konsentrasi antigen yang digunakan dalam antigen RBT yaitu 8%. Pada penelitian ini akan dilakukan beberapa pengenceran konsentrasi antigen yang berada di bawah 8% dan di atas 8% sesuai standar konsentrasi antigen yang ditetapkan untuk evaluasi pengaruh perbedaan konsentrasi antigen terhadap hasil pengujian

TUJUAN

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui persentase konsentrasi antigen yang sesuai pada pengujian antigen *Rose Bengal* serta mengetahui stabilitas antigen *Rose Bengal* pada berbagai temperatur penyimpanan.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan dengan pengujian antigen *Rose Bengal* konsentrasi 6%, 8%, 10% dan 12% pada tahapan produksi dan sesudah produksi antigen. Pada tahapan produksi dilakukan uji kemurnian kultur bakteri, uji inaktivasi suspensi bakteri, sedangkan pada tahapan sesudah produksi dilakukan uji antigen dengan pengenceran serum kontrol positif dan uji stabilitas antigen pada berbagai temperatur penyimpanan. Pada penelitian ini antigen dipersiapkan dari kultur kuman *Brucella abortus* strain 1119 yang di kultur pada media *Potato Agar* dan dipanen untuk mendapatkan suspensi kuman, kemudian diinaktivasi dengan pemanasan 80 °C selama 90 menit. Suspensi kuman disentrifus 3000 rpm selama 90 menit dengan *refrigerated* sentrifus untuk mendapatkan endapan antigen. Suspensi antigen diformulasi sesuai dengan konsentrasi pengenceran 6%, 8%, 10% dan 12%. Antigen yang telah diformulasi berdasarkan masing-masing konsentrasi antigen dibagi dan disimpan dalam 3 temperatur penyimpanan yaitu lemari pendingin, ruangan dan *freezer*. Selanjutnya antigen diuji dengan serial pengenceran serum kontrol positif (100 IU -1000 IU) sesuai dengan konsentrasi antigen yang telah disiapkan. Pengujian stabilitas antigen dilakukan dengan uji fisik, uji variasi (asam, panas, acriflavin), uji identitas dan uji potensi terhadap antigen yang disimpan pada masing-masing temperatur yaitu lemari pendingin, ruangan dan *freezer*.

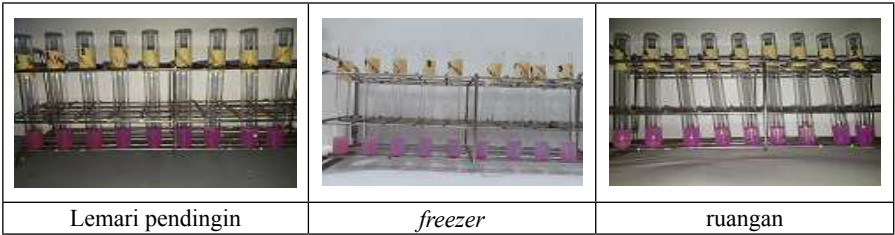
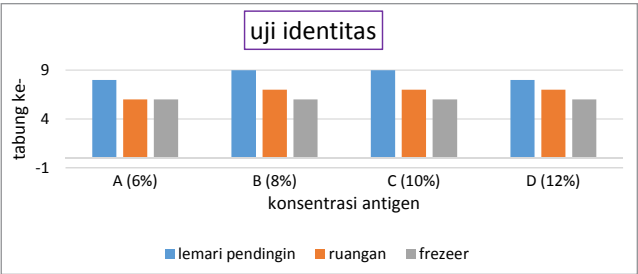
HASIL

Hasil uji kemurnian kultur kuman menunjukkan bahwa kultur yang akan digunakan sebagai antigen adalah murni kultur *Brucella abortus* yang ditandai dengan kuman berwarna merah dengan pengecatan Gram. Pada hasil formulasi antigen didapatkan suspensi antigen sebanyak 500 ml yang dipersiapkan untuk preparasi antigen sampel. Formulasi antigen dilakukan dengan pencampuran suspensi antigen inaktif, pewarna *rose bengal* dan *buffer diluent*. Pada penelitian ini digunakan larutan pewarna *Rose Bengal* 1% sebagai larutan pewarna antigen dan *buffer diluent* dengan pH 3,7. Larutan *Rose Bengal* digunakan sebagai pewarna antigen dan tidak mempengaruhi sensitivitas hasil pengujian (Muthanna and Al-Ezzi, 2009).

Antigen dengan konsentrasi 6% atau kurang dari 8% menunjukkan aglutinasi ringan (positif 1) sampai sedang (positif 2) antigen dengan konsentrasi 8% atau lebih menunjukkan aglutinasi sedang (positif 2 sampai sempurna (positif 3). Berdasarkan hasil pengujian antigen *Rose Bengal* dengan serum kontrol positif dengan berbagai pengenceran tampak bahwa rasio antigen dan antibodi mempengaruhi interaksi antigen antibodi, di mana pada pengenceran serum kontrol positif antara 100 IU-200 IU pada berbagai konsentrasi antigen hasil aglutinasi positif 1 (aglutinasi ringan), sedangkan pada pengenceran serum di atas 300 IU menunjukkan hasil aglutinasi positif 2 (aglutinasi sedang) sampai 3 (aglutinasi sempurna). Berdasarkan hasil tersebut, konsentrasi antigen yang dipersiapkan untuk pembuatan antigen *Rose Bengal* tidak boleh lebih rendah dari konsentrasi 8% sehingga dapat mempengaruhi sensitivitas dan spesifisitas antigen tersebut. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan Muthanna (2009) bahwa konsentrasi antigen yang kurang dari 8% akan mengurangi sensitivitas hasil pengujian.

Tabel 1. Hasil uji umum antigen sampel pada berbagai temperatur penyimpanan.

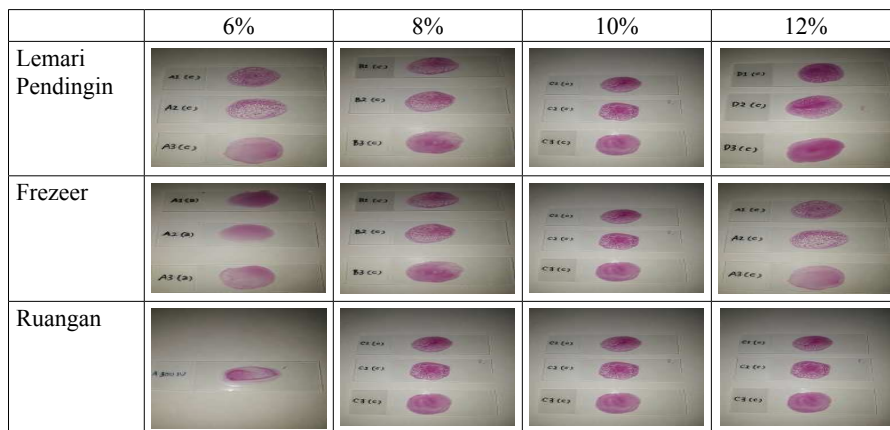
	lemari pendingin	freezer	ruangan
A (6%)	warna suspensi merah muda, suspensi homogen	warna suspensi merah muda, suspensi membeku	warna suspensi merah muda, suspensi homogen
B (8%)	warna suspensi merah muda, suspensi homogen	warna suspensi merah muda, suspensi membeku	warna suspensi merah muda, suspensi homogen
C (10%)	warna suspensi merah muda, suspensi homogen	warna suspensi merah muda, suspensi membeku	warna suspensi merah muda, suspensi ada endapan
D (12%)	warna suspensi merah muda, suspensi homogen	warna suspensi merah muda, suspensi membeku	warna suspensi merah muda, suspensi ada endapan



Gambar 1. Hasil uji identitas antigen pada berbagai temperatur penyimpanan.

	6%	8%	10%	12%
Lemari Pendingin				
Freezeer				
Ruangan				

Gambar 2. Hasil uji antigen sampel dengan serum negatif setelah disimpan pada berbagai temperatur penyimpanan



Gambar 3. Hasil uji antigen sampel dengan serum positif setelah disimpan pada berbagai temperatur penyimpanan.

Pengujian stabilitas antigen pada berbagai temperatur penyimpanan menunjukkan bahwa hasil uji umum, uji potensi dan uji identitas antigen *Rose Bengal* dengan konsentrasi 6%, 8%, 10% dan 12% yang disimpan dalam lemari pendingin dan menunjukkan hasil aglutinasi sesuai aturan FOHI (2013) sehingga dapat dipergunakan sebagai bahan diagnostik, sementara antigen yang disimpan dalam ruangan dan freezer tidak dapat dipergunakan sebagai bahan diagnostik.

PEMBAHASAN

RBT adalah uji aglutinasi pada slide secara cepat untuk mendeteksi adanya agglutinin spesifik *Brucella*. Antigen *Brucella* yang digunakan adalah larutan bakteri *Brucella abortus* yang digunakan untuk mendeteksi adanya agglutinin bakterial yang berhubungan dengan adanya infeksi atau paparan oleh *B. abortus*. Antibodi anti-*Brucella* (IgM dan IgG) adalah protein yang menyebabkan aglutinasi, fiksasi komplemen, dan presipitasi saat bereaksi dengan antigen homolognya yang berasal dari bakteri *Brucella*. Antibodi IgM adalah antibodi yang pertama kali muncul ketika terjadi infeksi terhadap ternak dan bertambah jumlahnya secara bertahap terhadap kasus infeksi akut. Pengujian RBT mendeteksi adanya antibodi terhadap *Brucella* pada serum. Jika serum sampel yang diuji mengandung antibodi, maka penambahan antigen yang sudah diketahui sebagai antigen *Brucella*, akan menimbulkan ikatan antara antigen dengan antibodi sehingga terbentuk gumpalan pada serum tersebut. Apabila tidak ada antibodi terhadap *brucella*, maka tidak ada ikatan dengan antibodi sehingga sampel yang diuji tetap homogen (Dahouk *et.al.*, 2006; Pacha, *et.al.*, 2014).

Menurut Alton, et.al (1988) dan Muthanna and Al-Ezzi (2009), formulasi antigen *Rose Bengal* sangat dipengaruhi dengan kondisi pH *buffer diluent* dan konsentrasi antigen yang dipergunakan dalam proses formulasi. Konsentrasi antigen dan *buffer diluent* yang sesuai akan mempengaruhi sensitivitas hasil pengujian. Menurut Muthana dan Ismaiel (2008) bahwa penggunaan serum dengan titrasi berbeda dari kasus klinis yang terinfeksi brucellosis menunjukkan bahwa antigen dengan konsentrasi lebih rendah kurang sensitif dibandingkan antigen lain ketika menggunakan serum dengan titrasi lebih rendah.

Penelitian yang dilakukan pada antigen dengan serum sampel tampak bahwa antigen yang disimpan dalam temperatur ruangan dan *freezer* memberikan hasil tampak positif (positif palsu) ketika dicampur dengan serum sampel negatif, sedangkan pada antigen yang disimpan dalam lemari pendingin hasil tetap negatif (tidak ada aglutinasi). Pada uji terhadap serum sampel positif, semua antigen tetap memberikan hasil positif, akan tetapi pada antigen yang disimpan pada temperatur ruangan dan *freezer* aglutinasi tidak tampak jelas. Berdasarkan analisa uji *Mann Whitney* pada antigen dengan konsentrasi 6%, 8%, 10%, dan 12% yang disimpan di lemari pendingin dibandingkan dalam *freezer* juga diperoleh hasil ($p=0,000 < 0,005$) sehingga dapat dikatakan terdapat pengaruh perbedaan yang signifikan. Hasil analisa uji *Mann Whitney* pada antigen dengan konsentrasi 6%, 8%, 10% dan 12% yang disimpan di ruangan dibandingkan dalam *freezer* diperoleh hasil ($p=0,000 > 0,005$) sehingga dapat dikatakan tidak terdapat pengaruh perbedaan yang signifikan. Berdasarkan hasil tersebut dapat dikatakan terdapat pengaruh perbedaan yang signifikan pada stabilitas antigen yang disimpan di dalam lemari pendingin dibandingkan dalam ruangan dan *freezer* terhadap kualitas hasil pengujian. Reaksi positif palsu dalam RBT dikaitkan dengan residu dan aktivitas antibodi dari vaksinasi, reaksi silang dengan bakteri tertentu dan kesalahan laboratorium. Reaksi negatif palsu dapat muncul selama inkubasi awal penyakit atau segera setelah inkubasi. Hasil negatif palsu disebabkan karena serum sedikit dengan titer antibodi yang rendah dan hasil positif palsu karena ketidakmampuan untuk membedakan agregat non-spesifik dari partikel antigen saja (Cothe dan Saxena, 2013).

Uji serologis dengan antigen RBT merupakan tes yang direkomendasikan secara internasional untuk skrining brucellosis pada ruminansia. Penelitian Ghazy et.al (2016) menyatakan bahwa modifikasi RBT menggunakan antigen dengan konsentrasi antigen yang lebih rendah dari rekomendasi standar internasional dapat digunakan terutama pada hewan dengan titer *anti-brucella* rendah dan daerah endemik. Berdasarkan hasil tersebut, konsentrasi antigen yang dipergunakan dalam proses produksi antigen *Rose Bengal* tidak boleh kurang dari 8% sehingga kualitas hasil pengujian tetap terjaga. Konsentrasi antigen merupakan salah satu faktor penting pada pembuatan antigen *Rose Bengal* yang dapat mempengaruhi sensitivitas dan spesifisitas hasil pengujian. (Alton, et.al., 1988; Kaltungo, et.al., 2014). Menurut Ghazy et.al (2016), spesifisitas berbanding terbalik dengan sensitivitas dan berbanding lurus dengan PCV, di

mana RBT dengan konsentrasi antigen 8, 10 dan 11% menunjukkan spesifisitas tertinggi (100%).

Menurut Sayour *et.al* (2017), sensitivitas antigen *Rose Bengal* tergantung pada reagen/antigen yang digunakan, faktor hewan dan faktor manusia (*human errors*) yang berkaitan dengan tes yang berlangsung. Reaksi aglutinasi antigen *Rose Bengal* tergantung pada pemeriksaan dengan mata telanjang sehingga berpotensi terhadap hasil sensitivitas pengujian antar individu. Peningkatan sensitivitas antigen *Rose Bengal* dapat dilakukan dengan re-standarisasi konsentrasi antigen, pH antigen dan penambahan pengenceran serum kontrol (OIESS). Pada hewan, faktor yang mempengaruhi sensitivitas antigen *Rose Bengal* meliputi spesies hewan dan tahap infeksi *Brucella*. Faktor-faktor tersebut mempengaruhi sifat dan durasi isotipe antibodi yang dihasilkan pada uji sensitivitas.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Antigen *Rose Bengal* dengan konsentrasi 8% atau lebih dapat digunakan sebagai bahan produksi antigen sesuai dengan hasil penghitungan *Kappa* dengan nilai kesesuaian baik sekali. sehingga kualitas dan sensitivitas hasil pengujian tetap terjaga.
2. Perubahan temperatur penyimpanan antigen akan mempengaruhi kualitas hasil pengujian, sehingga stabilitas antigen harus tetap terjaga pada kondisi suhu lemari pendingin (2°C -8°C).

DAFTAR PUSTAKA

- Alton, G.G; Jones, L.M; Angus, R.D; dan Verger, J.M. 1988. Techniques For The Brucellosis Laboratory. Institut National De La Recherche Agronomique. Paris.
- Dahouk, S.A; Nockler, K; Scholz, H.C; Tomaso, H; Bogumil, R; dan Neubauer, H. 2006. "Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of Brucella infections." *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier B.V., 309, pp. 34 - 37.
- Direktorat Jenderal Peternakan. 2001. Pedoman Pemberantasan Brucellosis. Kementerian Pertanian. Jakarta.
- Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid 1 (Sediaan Biologik). 2013. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Jakarta.

- Ghazy, N. A; Aziz, W.R.A, Shell, W.S; dan Samy, A.A. 2016. "Efficiency of Different Preparations of Rapid Slide Agglutination Antigens for the Diagnosis of Bovine and Ovine Brucellosis." *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. Science Alert., 11(7), pp. 399-204
- Kaltungo, B.Y; Saidu, S.N.A; Sackey, A.K.B; dan Kazeem. 2013. "A Review on diagnostic techniques for brucellosis. African Journal of Biotechnology. AcademicJournals 13 (1), pp. 1 - 10.
- Muthana, I.A dan Ismaiel, A.K. 2008. The Effect of Temperature and Concentration on The Brucella Antigen Activity Used for Diagnosis of Brucellosis by Tube Agglutination Test. Departement of Pharmacotherapeutics. University of Al-Mustansiriyah. AJPS, Vol. 5, No.1.
- Muthana, I. A. 2009. "Evaluation of the Effect of Changing Concentration and pH on the activity Rose Bengal Antigen". Departement of Pharmacotherapeutics. University of Al-Mustansiriyah. AJPS, Vol. 6, No.1.
- OIE (Office International des Epizooties). 2009. Bovine Brucellosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
- Pacha, B.M; Menoueri, M.N; Said, M; Yamani, R.R.T; dan Bouyoucef, A. 2014. 'Study of The Reliability of Technology Diagnosis of Brucellosis. UASVM Veterinary Medicine 71 (1), pp. 19 – 22.
- Sayour, A.E; Elbauomy, E.M; Abdel-Hamid, N.H; El-Kholi, M.K; Ismail, R.I; dan Beleta, E.I.M.. 2017. "Validation of Different Version of The Card or Rose-Bengal Test for The Diagnosis of *Brucella melitensis* Infection in Ruminants". *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*. AJVS. Vol. 53(1) : 187-202.