

EVALUASI RESPON ANTIBODI SAPI DAN KERBAU TERHADAP VAKSIN *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TIPE A DENGAN MENGGUNAKAN ELISA

LILY NATALIA

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O Box 52, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 30 Juni 1995)

ABSTRACT

NATALIA, L. 1996. Evaluation of antibody responses of cattle and buffaloes to *Clostridium perfringens* type A vaccine using ELISA. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 1(3): 190-193.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to detect specific antitoxin *Clostridium perfringens* type A. It was based on the use of purified alpha toxin of *Clostridium perfringens* type A as the coating antigen, which was then linked to specific alpha antitoxin. Horse raddish peroxidase labelled IgG was used as the conjugate, and 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) as the substrate. The ELISA was used to evaluate vaccination results on cattle and buffaloes against enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens* type A.

Key words: ELISA, *Clostridium perfringens* type A antitoxin, vaccination

ABSTRAK

NATALIA, L. 1996. Evaluasi respon antibodi sapi dan kerbau terhadap vaksin *Clostridium perfringens* tipe A dengan menggunakan ELISA. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 1(3): 190-193.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) telah dikembangkan untuk mendeteksi antitoksin spesifik *Clostridium perfringens* tipe A. Teknik ini didasarkan atas penggunaan toksin alfa *Clostridium perfringens* tipe A yang telah dimurnikan sebagai antigen pelapis, yang kemudian akan berikatan dengan antitoksin yang spesifik. IgG yang telah dilabel dengan horse raddish peroxidase digunakan sebagai konjugat dan 2-2-azino-bis (3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) sebagai substrat. ELISA ini digunakan untuk mengevaluasi hasil vaksinasi pada sapi dan kerbau terhadap enterotoksemia yang disebabkan oleh *Clostridium perfringens* tipe A.

Kata kunci: ELISA, antitoksin *Clostridium perfringens* tipe A, vaksinasi

PENDAHULUAN

Telah sering dilaporkan kasus enterotoksemia yang disebabkan oleh *Clostridium perfringens* tipe A pada sapi dan kerbau di Indonesia (WORRALL *et al.*, 1987; NATALIA *et al.*, 1989; NATALIA, 1995). Penyakit ini bersifat fatal dan menimbulkan kerugian yang tidak sedikit. Untuk mengatasi penyakit ini, hewan perlu divaksinasi terhadap enterotoksemia yang disebabkan oleh *Cl. perfringens* tipe A. Vaksinasi terutama ditujukan pada hewan-hewan yang berisiko tinggi, misalnya hewan yang mengalami stres akibat perubahan makanan yang mendadak oleh perubahan musim, hewan yang disapih terlalu cepat dan hewan yang akan ditransportasikan.

Untuk melakukan vaksinasi, diperlukan suatu uji yang mampu mengevaluasi keberhasilan vaksinasi. Sampai saat ini, uji yang masih sering digunakan untuk mengukur antitoksin adalah uji konvensional yang menggunakan mencit. Uji ini dirasakan tidak praktis

karena jumlah mencit yang digunakan akan sangat banyak, jumlah sampel yang diperlukan cukup besar, sedangkan waktu yang dibutuhkan juga cukup lama.

ELISA diharapkan dapat menggantikan uji biologis seperti yang disebutkan di atas. Uji ini telah terbukti cukup praktis, tidak menggunakan hewan percobaan dan dapat menguji sejumlah besar sampel dalam waktu yang singkat.

MATERI DAN METODE

Pembuatan toksin alfa murni dari *Cl. perfringens* tipe A

Cl. perfringens tipe A yang menghasilkan toksin alfa (galur 107) ditumbuhkan pada *Robertson's cooked meat medium* yang sudah dimodifikasi, dan diinkubasi selama

4 jam pada suhu 37°C. Biakan ini digunakan sebagai starter untuk produksi toksin dalam jumlah yang cukup besar (satu liter). Produksi toksin dilakukan dalam medium yang berisi pepton 2,0%, laktalbumin 1,0%, yeast extract 0,5% dan natrium klorida (NaCl) 0,4%. Selama toksin diproduksi, pH biakan diusahakan selalu berada di sekitar 7,0.

Toksin selesai dihasilkan dalam waktu 5 jam. Setelah itu, ditambah 0,01% mertiolat untuk menghentikan pertumbuhan. Toksin yang masih bercampur dengan medium ini kemudian disentrifugasi pada 7.000 x g selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang mengandung toksin ini kemudian diuji kekuatannya dengan menggunakan mencit. Toksin yang baik untuk digunakan adalah toksin dengan kekuatan 100 *minimum lethal doses* (MLD) per ml atau lebih.

Toksin mula-mula dimurnikan dengan mengendapkannya, yaitu dengan menggunakan 40% amonium sulfat, kemudian endapan ini didialisis dengan *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,2 selama dua hari pada suhu 4°C dengan penggantian PBS beberapa kali. Toksin kemudian dimurnikan lebih lanjut dengan *polyethylene glycol* (PEG) 6000 dan didialisis kembali dengan PBS pH 7,2. Pemurnian toksin terakhir dilakukan melalui kolom kromatografi, yaitu dengan menggunakan DEAE Sephacel (Pharmacia).

Kemampuan toksin murni membunuh mencit diukur lagi di samping juga diukur konsentrasinya. Toksin ini akhirnya dikeringbekukan. Tiap ampul berisi 1 mg toksin yang telah kering beku dan siap digunakan sebagai *coating antigen* atau antigen pelapis dalam ELISA.

Penyiapan ELISA

Antigen yang digunakan adalah toksin alfa yang telah dimurnikan dan dikeringbekukan seperti tersebut di atas, sedangkan konjugat yang dipakai adalah imunoglobulin anti-sapi yang telah dilabel dengan *horse radish peroxidase* (Silenus). Dalam pemakaian, konjugat diencerkan 1:3.500 dengan menggunakan larutan PBS yang mengandung 0,05% Tween 20 (PBST).

Serum kontrol positif diperoleh dengan melakukan imunisasi beberapa ekor sapi dengan toksoid dan toksin alfa *Cl. perfringens* tipe A, yang nilai unitnya kemudian diukur dengan uji L + dengan menggunakan antitoksin standar dari World Health Organisation (WHO) yang sudah diketahui nilai internasional unit (IU)-nya (ANON., 1977). Serum kontrol positif ini diencerkan secara seri pada 2 baris terakhir lempeng mikro (mikroplat).

Serum kontrol negatif diperoleh dari hasil penyaringan pendahuluan sejumlah sapi. Sebagai substrat digunakan 2,2-azino-bis(3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) dalam buffer sitrat ber-pH 4,2.

Prosedur ELISA

Mikroplat ELISA dengan 96 lubang mula-mula dilapisi dengan antigen (toksin yang telah dilarutkan dalam larutan penyangga karbonat pH 9,6) sebanyak 100µl per lubang atau 2 g toksin per lubang. Setelah proses pelapisan, mikroplat dibiarkan satu malam pada suhu 4°C, kemudian dicuci dengan larutan PBST pH 7,2 sebanyak 3 kali.

Serum yang akan diukur antitoksinnya diencerkan 1/100 dalam PBST dan dimasukkan ke dalam lubang sebanyak 100µl per lubang. Inkubasi selama satu jam dilakukan dalam suhu ruangan. Selanjutnya, pencucian dilakukan lagi sebanyak 3 kali, yang kemudian diikuti dengan penambahan konjugat enzim (1/3.500 dalam PBST) sebanyak 100µl per lubang, lalu diinkubasi kembali dalam suhu ruangan selama 1 jam. Setelah itu, substrat ABTS dimasukkan ke dalam lubang sebanyak 100µl per lubang dan diinkubasi kembali selama satu jam. Hasilnya dibaca dengan menggunakan *ELISA plate reader* (Titertek MCC 340, Flow Laboratories, USA) dengan panjang gelombang 415 nm. Setiap mikroplat akan mempunyai serum kontrol positif, serum kontrol negatif dan serum kontrol konjugat.

Enceran serum kontrol terendah mempunyai kekuatan 4,0 IU (1/100) dan 0,125 IU untuk enceran serum tertinggi (1/3.200). Serum kontrol negatif digunakan dalam enceran 1/100.

Uji ini dianalisis dengan program komputer (Plate reader program versi 3,2, ACIAR PN8907, RVL Benalla, Victoria, Australia). Program ini akan membandingkan nilai densitas optikal sampel yang diuji dengan larutan kontrol positif pada mikroplat yang sama dan kemudian dikonversikan untuk mendapatkan nilai Internasional Unit (IU) setiap contoh serum yang diuji.

Penyiapan vaksin

Dalam penelitian ini, vaksin yang digunakan adalah *alum precipitated toxoid* (APT) toksin alfa yang dihasilkan oleh *Cl. perfringens* tipe A. Toksin diubah menjadi toksoid dengan menambahkan 0,6% formalin dan dibiarkan satu malam dalam suhu 37°C. APT dibuat dengan cara mencampurkan satu bagian toksoid, setengah

bagian natrium hidrokarbonat 1 M dan satu bagian aluminium kalium sulfat 0,2 M. Pencampuran dilakukan selama 30 menit dan endapan dicuci sebanyak 3 kali dengan PBS pH 7,2.

Sebelum digunakan, keamanan vaksin diuji (*safety test*) pada mencit. Sebanyak 1,0 ml vaksin yang telah dibuat disuntikkan pada mencit secara subkutan dengan 4 kali ulangan. Jika mencit tetap hidup, maka vaksin dianggap telah aman digunakan untuk ternak.

Vaksinasi pada sapi dan kerbau

Sebanyak 5 ekor sapi Bali dan 23 ekor kerbau telah digunakan untuk mengevaluasi vaksinasi. Hewan ini mendapat suntikan vaksin pertama dan suntikan ulangan dengan selang waktu satu bulan. Dosis vaksin yang diberikan 2,5 ml per ekor sapi secara subkutan. Vaksinasi ketiga dilakukan bulan keenam setelah vaksinasi pertama.

Evaluasi vaksinasi dilakukan dengan cara mengambil sampel darah dari sapi dan kerbau tersebut sebelum dan sesudah vaksinasi. Pengujian tingkat kekebalan hewan kemudian dilakukan dengan uji ELISA seperti yang telah disebutkan di atas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebelum dilakukan uji, telah dilakukan titrasi antigen terhadap serum kontrol positif dan serum kontrol negatif dengan sistem *checkerboard* untuk menentukan enceran antigen yang optimal. Ternyata enceran antigen yang optimal adalah dalam konsentrasi 2 μ g /100 μ l (per lubang).

ELISA yang dikembangkan ternyata dapat digunakan untuk memantau respon imunologik hewan terhadap vaksinasi enterotoksemia. Pada pemantauan hasil vaksinasi, kelompok hewan yang divaksinasi ini 3 bulan sebelumnya pernah tertular enterotoksemia yang disebabkan oleh *Cl. perfringens* tipe A. Sebanyak 8 ekor kerbau dari kelompok hewan ini mati mendadak dan telah didiagnosis toksin *Cl. perfringens* tipe A sebagai penyebab kematiannya (NATALIA, 1995). Oleh karena itu, beberapa ekor hewan telah menunjukkan titer antitoksin yang cukup tinggi sebelum dilakukan vaksinasi.

Dari hasil pengamatan pada kasus ledakan penyakit di Sukabumi, Jawa Barat, telah dinyatakan bahwa hewan kerbau yang mempunyai kadar antitoksin 1,5 IU/ml atau lebih dapat bertahan terhadap serangan penyakit

(NATALIA dan SYAFARUDIN., 1988). Tetapi dari hasil pemeriksaan serologis terhadap sekelompok sapi yang terserang enterotoksemia di Banjarmasin, Kalimantan Selatan, terlihat bahwa sapi yang mempunyai kadar antitoksin 1,0 IU/ml dapat bertahan terhadap serangan penyakit (NATALIA *et al.*, 1989).

Setelah vaksinasi, terlihat bahwa semua hewan memberi respon yang sangat baik (Tabel 1). Setelah satu bulan pascavaksinasi pertama, terlihat bahwa semua hewan menunjukkan kenaikan titer antitoksin yang cukup tinggi dan semua hewan dapat dinyatakan telah mempunyai tingkat kekebalan yang baik. Vaksinasi ulangan (kedua) dilakukan satu bulan setelah vaksinasi pertama. Tingkat kekebalan yang cukup baik ini dapat bertahan sampai 6 bulan setelah vaksinasi pertama, atau sampai saat dilakukan vaksinasi ketiga. Setelah vaksinasi ketiga, ternyata tingkat kekebalan lebih meningkat lagi dan tingkat kekebalan ini tetap bertahan sampai 6 bulan setelah vaksinasi ketiga, atau sampai akhir pengamatan.

Tabel 1. Evaluasi vaksinasi pada sapi dan kerbau dengan ELISA untuk mendeteksi antitoksin *Cl. perfringens* tipe A

Bulan	Antitoksin <i>Cl. perfringens</i> A (I.U.)	
	Sapi (n = 5)	Kerbau (n = 23)
0 (V1)	0,58 \pm 0,32	1,24 \pm 0,25
1 (V2)	3,22 \pm 0,07	3,30 \pm 0,19
2	3,80 \pm 0,45	3,55 \pm 0,56
3	3,18 \pm 0,64	2,96 \pm 0,73
4	2,66 \pm 0,81	2,45 \pm 0,78
5	3,24 \pm 0,52	3,12 \pm 0,60
6 (V3)	3,48 \pm 0,04	2,47 \pm 0,92
7	5,00 \pm 0,00	4,94 \pm 0,26
8	5,00 \pm 0,02	5,03 \pm 0,03
9	4,38 \pm 0,77	4,94 \pm 0,26
10	4,72 \pm 0,56	4,86 \pm 0,60
11	4,32 \pm 0,89	4,78 \pm 0,48
12	4,06 \pm 0,87	4,49 \pm 0,76

Respon serologis terhadap berbagai vaksin clostridia telah diukur dengan berbagai uji, di antaranya uji aglutinasi (CLAUS dan MACHEAK, 1972), uji fiksasi komplemen (CHO, 1971), uji flokulasi (LINDLEY, 1955), uji anti hemolitik (BERGMAN, 1955) dan uji hemaglutinasi tidak langsung (TAMURA *et al.*, 1985). Tetapi, ternyata uji-uji tersebut di atas kurang spesifik dan kurang praktis dibandingkan dengan ELISA (HAMAOKA *et al.*, 1990).

Uji netralisasi toksin merupakan uji yang sampai saat ini sering digunakan untuk mengevaluasi potensi vaksin

clostridia. Uji ini pada umumnya memakan waktu yang lama, tidak mudah distandardisasi dan menggunakan jumlah hewan percobaan yang tidak sedikit. Kebutuhan akan suatu uji secara *in vitro* yang lebih sederhana dari uji netralisasi toksin untuk mengukur respon serologis terhadap vaksin clostridia telah lama disadari. Dibandingkan dengan uji netralisasi toksin, ELISA adalah uji yang lebih spesifik, sederhana, lebih mudah distandardisasi dan tidak menggunakan hewan percobaan (SOJKA *et al.*, 1989). Diharapkan uji ini dapat menggantikan uji konvensional atau uji netralisasi toksin untuk mengevaluasi respon sekelompok hewan terhadap vaksin clostridia secara cepat dan tepat.

Dari hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa ELISA yang dikembangkan dapat digunakan untuk mengevaluasi hasil vaksinasi enterotoksemia pada sekelompok hewan. Prosedur ELISA yang dikembangkan lebih praktis dan sederhana dibandingkan dengan uji konvensional yang digunakan selama ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada M. Syafarudin dan Abdurahman, atas bantuan teknis dan kepada Dr. Sudarisman MS, atas fasilitas yang diberikan selama penelitian dilaksanakan, baik di laboratorium maupun di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

ANONIMOUS. 1977. *British Pharmacopoeia*. Appendix XIV B. A10-A14.

BERGMAN, J. 1955. Die immunbiologische bedutung des rauschbrandhamolysin. Einversuch zur wertbemessung von ranschbrandvakzinen *in vitro*. *Zentralbl. Veterinarmed.* 2:703-717.

CHO, H.J. 1971. Demonstration of component fixing antibody in the sera of cattle vaccinated with combined living blackleg-anthrax vaccine. *Can. J. Comp. Med.* 35:155-160.

CLAUS, K.D. and M.E. MACHEAK. 1972. Preparation of a *Clostridium chauvoei* antigen and determination of protective immunity by plate agglutination test. *Am. J. Vet. Res.* 33:1045-1052.

HAMAOKA, T., Y. MORI, and N. TERAKADO. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of immunity in mice vaccinated with blackleg vaccine. *Jpn. J. Vet. Sci.* 52(1): 167-170.

LINDLEY, E.P. 1955. Preliminary observations on a flocculation test in studies on blackleg vaccine. *Br. Vet. J.* 3:87-96.

NATALIA, L. 1995. Diagnosis enterotoksemia pada sapi dan kerbau di Indonesia. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Veteriner untuk Meningkatkan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak. Cisarua, Bogor, 22-24 Maret 1994. Balai Penelitian Veteriner, Bogor.

NATALIA, L., dan M. SYAFARUDIN. 1988. Pengamatan terhadap penyebab terjadinya enterotoksemia pada kerbau di Sukabumi, Jawa Barat. *Penyakit Hewan* 20(35):13-15.

NATALIA, L., M. SYAFARUDIN, dan S. HARDJOUTOMO. 1989. Enterotoksemia pada sapi impor di Banjarmasin, Kalimantan Selatan. *Penyakit Hewan* 21(38):107-110.

SOJKA, M.G., V.J. WHITE, C.J. THORNS, and P.L. ROEDER. 1989. The detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin in rabbit serum by monoclonal antibody based competition ELISA. *J. Biol. Standard* 17:117-124.

TAMURA, Y., H. MAKIE, and S. TANAKA. 1985. An indirect hemagglutination test for the detection of antibodies to *Clostridium chauvoei*. *Vet. Microbiol.* 10:315-324.

WORRALL, E.E., L. NATALIA, P. RONOARDJO, TARMUJI, and S. PARTOUTOMO. 1987. Enterotoxaemia in water buffaloes caused by *Clostridium perfringens* type A. *Penyakit Hewan* 19(33):17-19.