

UJI AGLUTINASI LATEKS UNTUK MENDIAGNOSIS PENYAKIT NGOROK (*SEPTICAEMIA EPIZOOTICA*) DI LAPANGAN

LILY NATALIA

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata No. 30, P.O. Box 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 27 September 2000)

ABSTRACT

NATALIA, L. 2001. Latex agglutination test for field diagnosis of haemorrhagic septicaemia. *Jurnal. Ilmu Ternak dan Veteriner* 6 (3): 151-158

Pasteurella multocida is bacterial pathogens that cause haemorrhagic septicaemia (HS) in cattle and buffaloes. Various tests have been used to differentiate types of *P. multocida*, as well as to diagnose this specific disease. A latex agglutination test has been developed for the detection of *P. multocida* B:2 which is the causal agent of HS. This test is a rapid and simple test suitable for local laboratory to diagnose HS cases in the field. A heat stable antigen consisting of mainly lipopolysaccharide (LPS) extract of formalin killed *P. multocida* 0019 was used to produce specific antibody against *P. multocida* B:2. The antibody was then used to sensitise latex particles. Latex agglutination test have been used to screen some *P. multocida* field isolates and this test have been proven to be specific, simple and easy to be used in detecting *P. multocida* B:2. The specificity is due to antibodies recognising LPS or LPS protein complexes. Sensitised latex was stable at 4° C for at least 12 months. This test should be used as an aid to diagnosis and employed principally to confirm and support clinical and post mortem findings of HS.

Keywords: *Pasteurella multocida* B:2, haemorrhagic septicaemia (HS), diagnosis, latex agglutination test

ABSTRAK

NATALIA, L. 2001. Uji aglutinasi lateks untuk mendiagnosis penyakit ngorok (*Septicaemia epizootica*) di lapangan. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6 (3): 151-158

Pasteurella multocida adalah bakteri patogen yang menyebabkan penyakit ngorok atau *Septicaemia epizootica* (SE) pada sapi dan kerbau. Berbagai uji telah dipergunakan untuk membedakan tipe-tipe *P. multocida* di samping untuk mendiagnosis penyakit yang khas ini. Uji aglutinasi lateks telah dikembangkan untuk mendeteksi *P. multocida* B:2 yang merupakan agen penyebab SE pada sapi dan kerbau. Uji ini merupakan uji yang cepat dan sederhana sehingga cocok dipakai oleh laboratorium di daerah dalam mendiagnosis kasus-kasus penyakit SE di lapangan. *Boiled antigen* atau *heat stable antigen* yang terutama terdiri atas ekstrak lipopolisakarida (LPS) dari *P. multocida* 0019 telah digunakan untuk menghasilkan antibodi spesifik terhadap *P. multocida* B:2. Antibodi yang dihasilkan ini kemudian digunakan untuk mensensitisasi partikel lateks. Uji aglutinasi lateks telah dipakai untuk menyeleksi berbagai isolat *P. multocida* dari lapangan dan terbukti bahwa uji ini bersifat spesifik, sederhana, dan mudah digunakan dalam mendeteksi *P. multocida* B:2. Spesifisitas ini didasarkan atas antibodi yang dapat mengikat LPS atau membuat ikatan kompleks protein-LPS. Lateks yang telah disensitisasi tetap stabil jika disimpan dalam suhu lemari pendingin (4°C) paling sedikit selama 12 bulan. Uji ini seyogyanya dapat digunakan sebagai alat bantu untuk mendiagnosis penyakit SE dan digunakan terutama sebagai konfirmasi dan penunjang bagi hasil pemeriksaan klinis dan pascamati.

Kata kunci : *Pasteurella multocida* B:2, *septicaemia epizootica* (SE), diagnosis, uji aglutinasi lateks

PENDAHULUAN

Penyakit ngorok atau *haemorrhagic septicaemia* (HS), yang di Indonesia dikenal dengan nama penyakit *septicaemia epizootica* (SE) adalah penyakit akut dan fatal yang menyerang sapi dan kerbau. Penyakit ini telah menyebar ke hampir seluruh propinsi di Indonesia (DARMADI, 1991). Penyakit ngorok yang terdapat di Indonesia disebabkan oleh *Pasteurella multocida* B:2, bersifat akut, dan pada umumnya menjadi penyebab kematian pada hewan (DE ALWIS, 1993). Kasus penyakit biasanya tertinggi pada akhir musim kemarau

sampai tiba musim penghujan. Di daerah endemik, diagnosis terhadap penyakit SE sering dilakukan dengan pengamatan gejala klinis dan pemeriksaan pascamati. Konfirmasi diagnosis secara laboratorium sampai saat ini belum dapat dilakukan di laboratorium veteriner daerah karena keterbatasan sarana bahan diagnostik. Teknik diagnosis yang ada masih dianggap kurang praktis dan memakan waktu yang cukup lama untuk dapat mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri, serta menentukan tipe antigen kapsuler dan somatiknya (CARTER dan RAPPAY, 1963; RIMLER, 1993).

Berbagai uji telah dikembangkan untuk menentukan tipe bakteri penyebab penyakit ngorok (SE) guna mendiagnosis penyakit secara spesifik. Uji biokimiawi dan fermentasi karbohidrat telah digunakan untuk mengidentifikasi organisme penyebab. Uji ini kemudian dilanjutkan dengan uji serologis atau nonserologis untuk menentukan tipe antigen kapsul dan somatik *P. multocida* (HEDDLESTON *et al.*, 1972; CARTER dan RAPPAY, 1963; NATALIA dan PRIADI, 1997). Beberapa uji serologis cepat telah dicoba dikembangkan untuk menentukan tipe antigen kapsuler atau somatik, antara lain dengan uji koaglutinasi (RIMLER, 1978) untuk mendiagnosis *P. multocida* grup B/E, dan *counterimmuno electrophoresis* (CARTER dan CHENGAPPA, 1981). Selain itu, pemeriksaan dengan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk mendeteksi *P. multocida* penyebab SE juga telah berhasil dikembangkan oleh DAWKINS *et al.* (1990). Uji koaglutinasi dilakukan dengan menggunakan reagen koaglutinasi protein A yang dibuat dari sel bakteri *Staphylococcus aureus* yang dibunuh dengan pemanasan (*heat killed Staphylococcus aureus*) sebagai partikel pembawa antikapsul antibodi IgG. Dengan cara ini, antigen kapsul dideteksi dari biakan dan cairan jaringan. Sementara itu, *counterimmuno electrophoresis* dapat mendeteksi antigen kapsuler tipe D, B, dan E dari cairan jaringan tubuh hewan. Akan tetapi, kedua macam uji tersebut masih sulit atau tidak dapat dilakukan di laboratorium veteriner daerah. Oleh sebab itu, perlu diteliti dan dikembangkan cara diagnosis alternatif yang lebih mudah, cepat dan akurat.

Uji *polymerase chain reaction* (PCR) juga telah dikembangkan dan digunakan untuk memeriksa sampel dari hewan yang diduga membawa agen penyebab penyakit SE. Uji ini sangat spesifik dan cukup sensitif untuk mendeteksi *P. multocida* B:2 dari sampel yang terkontaminasi bakteri lain, tidak memerlukan purifikasi sampel DNA terlebih dahulu (NATALIA, 1996; BRICKELL *et al.*, 1998). Namun demikian, uji ini selain memerlukan peralatan yang tidak sederhana, juga sulit digunakan di lapangan.

Uji aglutinasi lateks (yang menggunakan partikel lateks) telah banyak dipakai di laboratorium klinik kesehatan manusia sejak 40 tahun yang lalu. Teknik uji ini sangat sederhana dan tidak memerlukan alat atau biaya yang tinggi. Pada prinsipnya, teknik ini didasarkan pada reaksi imunoaglutinasi antara antibodi atau antigen yang diikat pada partikel lateks (BANGS, 1988; Carney, 1990). Uji aglutinasi lateks telah banyak dipakai untuk mendeteksi antigen atau antibodi baik bakteri, cendawan, parasit, virus, maupun rickettsia, atau juga untuk mendeteksi hormon, obat-obatan dan penyakit otoimun (BANGS, 1988).

Pada kesempatan ini dikemukakan teknik diagnosis SE untuk mendeteksi dan mengkonfirmasi *P. multocida* B:2 penyebab penyakit SE. Diharapkan

dengan uji ini deteksi kuman penyebab penyakit dapat diketahui lebih cepat, sederhana, dan mudah diterapkan di laboratorium veteriner di daerah.

MATERI DAN METODE

Pembuatan heat stable antigen *P. multocida* tipe B:2

Biakan bakteri *P. multocida* B:2 galur 0019 ditumbuhkan pada agar darah domba (5%) yang disiapkan dalam cawan Petri dan diinkubasikan pada suhu 37° C selama 24 jam. Setelah inkubasi, sel bakteri pada permukaan agar dibilas dan disuspensikan dalam *phosphate buffered saline* (PBS) dengan perbandingan bakteri dari satu cawan Petri disuspensikan dalam 1 ml PBS. Suspensi sel bakteri ini dipanaskan dalam air mendidih selama 1 jam, kemudian disentrifugasi 8.000 g selama 10 menit. Supernatan dipisahkan dan disimpan dalam lemari es (suhu 4° C) sampai perlakuan berikutnya. Supernatan ini mengandung ekstrak lipopolisakarida (LPS) dari bakteri *P. multocida* (DAWKINS *et al.*, 1990), yang akan dipakai sebagai antigen untuk mengimunitasi kelinci.

Pembuatan antibodi terhadap antigen *P. multocida* B:2 pada kelinci

Imunogen untuk membuat antibodi terhadap antigen LPS *P. multocida* B:2 disiapkan dengan cara sebagai berikut: Antigen *P. multocida* B:2 yang telah dibuat dengan cara yang tersebut di atas dicampur dengan *incomplete Freund's adjuvant* (IFA) dengan perbandingan 1:1. Campuran tersebut disonikasi dengan sonikator sebanyak 3 kali masing-masing selama 30 detik sehingga terbentuk krim kental berwarna putih dan tidak mencair kembali jika dibiarkan. Campuran ini kemudian dicampur dengan 0,85% NaCl yang mengandung 2% Tween-80 dengan perbandingan 1:1. Sonekasi diulang kembali seperti di atas sampai terjadi *double adjuvant emulsion*.

Cara membuat antibodi terhadap antigen LPS pada kelinci dilakukan dengan mengimunitasi 10 ekor kelinci yang disuntik secara intramuskuler dengan imunogen yang telah disiapkan di atas. Dosis imunogen yang disuntikkan adalah 1 ml untuk tiap ekor kelinci. Penyuntikan dilakukan pada 2 tempat (paha kanan dan kiri), masing-masing tiap tempat sebanyak 0,5 ml. Suntikan ulangan dilakukan pada hari ke-28 setelah suntikan pertama dengan dosis yang sama dengan suntikan pertama. Selanjutnya, suntikan ulangan kedua berikutnya dilakukan sebulan sekali dengan dosis yang sama.

Pada bulan ketiga serum kelinci yang terbentuk diambil dan diuji dengan *agar gel precipitation* (AGP) (JOHNSTONE dan THORPE, 1982). Dalam uji ini, antigen

P. multocida B:2 direaksikan dengan serum kelinci yang telah dihiperimisasi tersebut. Jika antibodi dalam serum kelinci telah cukup tinggi (yaitu terlihat dari garis presipitasi yang cukup tebal), serum dikoleksi dari kelinci. IgG dalam serum diisolasi dan dimurnikan dengan cara sebagai berikut: Serum yang sudah dikoleksi dilarutkan dengan PBS dalam perbandingan 1:1 dan pH-nya dibuat menjadi 7,8. Ke dalam larutan serum tersebut ditambah larutan 50% w/v *polyethylene glycol* (PEG) 6.000 hingga tercapai konsentrasi akhir 13% w/v. Endapan yang terjadi dipisahkan dengan melakukan sentrifugasi selama 30 menit pada 5.000 g. Endapan (IgG) dipisahkan dan dilarutkan kembali dengan PBS dan dikembalikan ke volume semula. IgG diendapkan dengan PEG diulang satu kali lagi seperti di atas. Endapan IgG terakhir diresuspensikan dalam sedikit volume larutan PBS. Larutan IgG ini kemudian dimasukkan ke dalam tabung dialisis (*cellophane tubing*) dan didialisis melawan PBS pH 7,2 selama 24 jam dengan 4 kali pergantian PBS. Larutan IgG yang diperoleh, diestimasi kadar proteinnya dengan absorpsi ultra-violet (JOHNSTONE dan THORPE, 1982).

Untuk menentukan jumlah optimal IgG yang digunakan untuk mensensitisasi partikel lateks tersebut dilakukan titrasi. Berbagai konsentrasi IgG dicoba untuk melabel partikel lateks. Selanjutnya partikel lateks yang telah disensitisasi dengan berbagai konsentrasi IgG diuji aglutinasi terhadap ekstrak biakan *P. multocida* B:2 (galur 332).

Sensitisasi partikel lateks

Partikel lateks 1,0 μm (*red carboxylate modified*, Park Scientific) disensitisasi dengan IgG anti-*P. multocida* B:2. Sensitisasi dilakukan dengan metode MARTIN dan NAYLOR (1994) yang telah dimodifikasi. Tahap pengerjaan yang dilakukan adalah sebagai berikut: Sebanyak 0,4 ml dari 2,5% suspensi partikel lateks ditambahkan pada 5 ml 0,05 M 2-N *morpholino-ethane sulphonic acid* (MES) *buffer* pH 5,5. Campuran divortex dan disentrifugasi pada 5.000 g selama 6 menit. Supernatan dipisahkan dengan hati-hati dan dibuang. Endapan kemudian disuspensikan dalam 5 ml MES *buffer* dan disentrifugasi lagi pada 5.000 g selama 6 menit. Pencucian dengan MES *buffer* seperti di atas diulang sampai 3 kali seperti sebelumnya. Setelah pencucian akhir, endapan lateks disuspensikan dalam 0,4 ml MES *buffer*. Larutan segar 1% *carbodiimide* (0,1 g dari 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) *carbodiimide metho-p-toluene sulphonate* dalam 10 ml aquades) dipersiapkan. Sebanyak 0,4 ml larutan *carbodiimide* ini kemudian dicampur dengan suspensi lateks. Campuran ditempatkan dalam penangas air bersuhu 50° C selama 10 menit, kemudian ditambahkan 5 ml MES *buffer*.

Setelah sentrifugasi pada 5.000 g selama 6 menit, supernatan dibuang. Endapan lateks diresuspensikan dalam 1 ml MES *buffer* dan kemudian 300 μl IgG anti *P. multocida* B:2 ditambahkan. Campuran lateks dan IgG ditempatkan dalam penangas air bersuhu 50° C selama 10 menit, kemudian disentrifugasi. Endapan yang terbentuk dicuci 1 kali dalam 20 ml MES *buffer*. Setelah pencucian disuspensikan dalam 10 ml 0,2 M 2-amino-2-methyl(1-propanol)hydrochloride (AMP) *buffer* pH 7,8 dengan 0,5% (w/v) *bovine serum albumin* (BSA) dan 0,1% (w/v) *sodium azide*. Setelah tahap ini, partikel lateks yang mengandung IgG sudah siap digunakan untuk uji lateks aglutinasi terhadap *P. multocida*. Secara skematis tahap pengerjaan dapat dilihat pada Gambar 1.

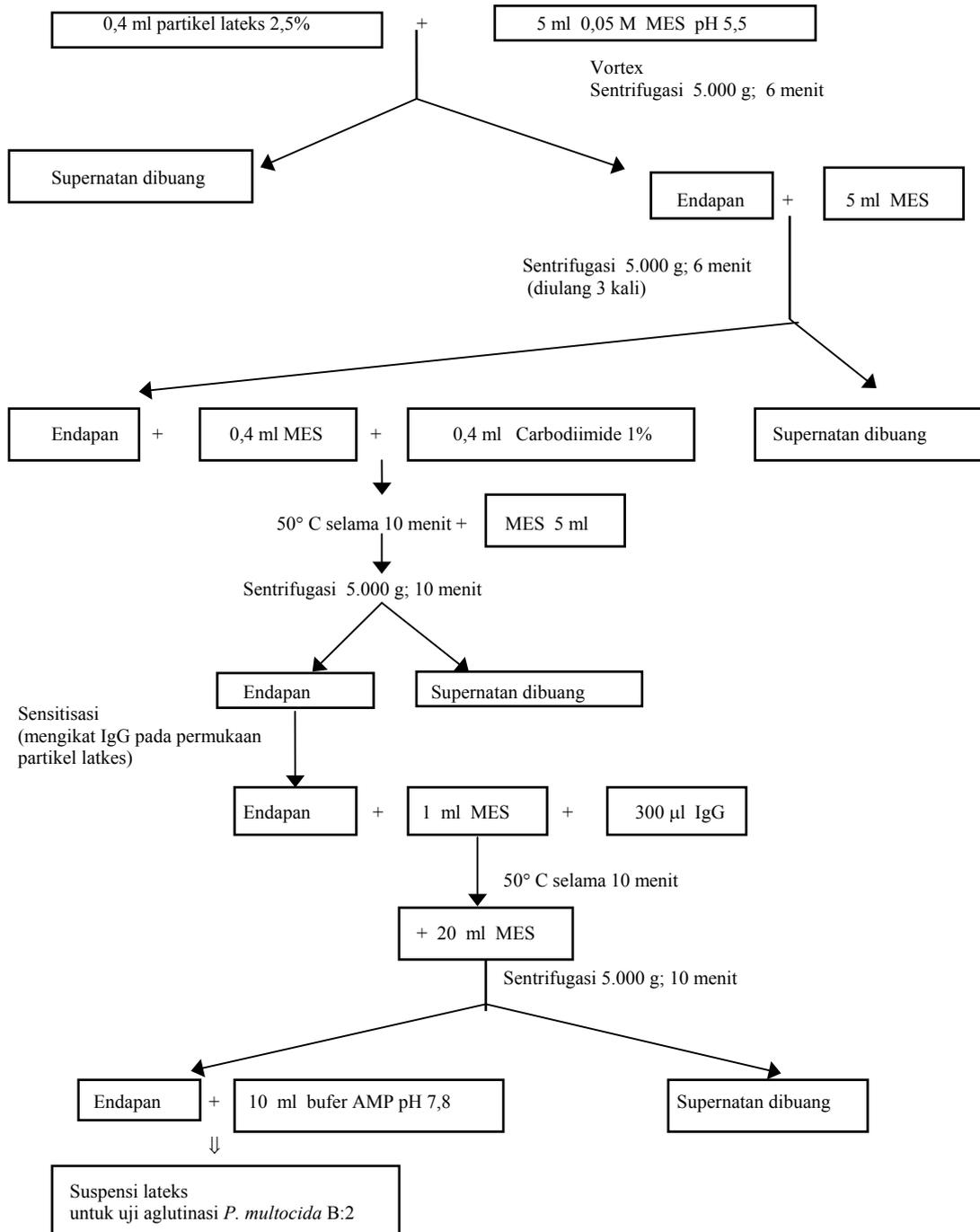
Isolasi bakteri dari sampel

Sampel tonsil, sumsum tulang atau organ lainnya baik dari kasus penyakit maupun dari rumah potong hewan, dibiakkan dan bakteri penyebab SE diisolasi, lalu dimurnikan hingga diperoleh biakan murni berbagai tipe *P. multocida* (BAIN *et al.*, 1982), yang setelah diekstraksi nantinya akan menjadi sampel uji dalam uji aglutinasi lateks.

Pembuatan suspensi untuk uji aglutinasi lateks

Sampel yang digunakan adalah biakan bakteri *P. multocida* (seperti sampel untuk uji ELISA). Tetapi, setelah dicoba dalam uji ternyata biakan bakteri ini mengganggu proses aglutinasi sehingga sampel biakan bakteri tersebut tidak dapat digunakan. Sampel yang digunakan untuk uji aglutinasi ialah ekstrak isolat *P. multocida*. Isolat *P. multocida* yang akan diuji ditumbuhkan terlebih dahulu dalam *brain heart infusion broth* (kaldu BHI), diinkubasi dalam 37°C selama semalam. Pada hari berikutnya, 0,5 ml kaldu diinokulasikan pada medium agar darah domba (5%) yang disiapkan dalam cawan Petri, lalu inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Setelah itu, sel bakteri pada permukaan agar disuspensikan dalam PBS dengan perbandingan bakteri satu cawan Petri dalam 1 ml PBS. Suspensi sel bakteri ini dipanaskan atau dididihkan selama 1 jam, kemudian suspensi ini disentrifugasi 8.000 g selama 10 menit. Supernatan yang merupakan ekstrak biakan bakteri *P. multocida* dipisahkan dan disimpan dalam lemari es (suhu 4° C) sampai saatnya pengujian. Sampel bakteri kontrol positif dan kontrol negatif disiapkan seperti sampel bakteri lapangan.

Aktivasi permukaan partikel lateks:
(untuk mempersiapkan ikatan kovalen antara IgG dan permukaan partikel lateks)



Gambar 1. Skema pembuatan suspensi lateks untuk uji aglutinasi *Pasteurella multocida* B:2

Cara uji aglutinasi lateks

Uji dilakukan dengan menggunakan lempeng mikrotiter dengan 96 lubang dan dasar lubangnya berbentuk U. Sampel dilarutkan dalam AMP buffer dan diencerkan secara seri dalam kelipatan dua

(pengenceran 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32). Pengenceran ini dilakukan untuk mengetahui besarnya kemampuan sampel (ekstrak *P. multocida*) dalam mengaglutinasi partikel lateks. Ke dalam lubang lempeng mikrotiter dimasukkan 25µl sampel, lalu ditambahkan 25µl suspensi preaksi lateks ke dalamnya. Campuran

diaduk atau digoyang selama 2 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan. Hasil uji dapat dibaca 18 jam kemudian atau keesokan harinya. Hasil positif ditandai dengan adanya partikel lateks yang teraglutinasi, sedangkan hasil negatif ditandai dengan terbentuknya endapan partikel lateks di dasar lubang. Gambaran yang menunjukkan adanya aglutinasi sama dengan atau lebih dari 50% masih dianggap positif. Kontrol sampel positif (ekstrak kuman *P. multocida* B:2) dan kontrol sampel negatif (ekstrak isolat *P. multocida* non SE) harus selalu disertakan dalam setiap kali uji aglutinasi lateks. Selain itu, akan dilakukan pula uji aglutinasi lateks secara periodik (setiap bulan) untuk mengetahui kestabilan pereaksi lateks yang dipakai dalam uji.

Perbandingan uji aglutinasi dengan ELISA untuk mendeteksi *P. multocida* B:2

Untuk mengetahui spesifisitas uji, akan dilakukan uji aglutinasi lateks dan uji ELISA (DAWKINS *et al.*, 1990) terhadap berbagai tipe *P. multocida* yang sudah diperoleh, yaitu baik galur homolog maupun heterolog. *Coating antibodies* yang digunakan dalam uji ELISA ini dibuat dengan menggunakan *heat stable antigen* yang sama seperti yang digunakan dalam uji aglutinasi lateks.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam pembuatan IgG untuk sensitisasi partikel lateks, diperoleh hasil sebagai berikut: Setelah mengimunisasi kelinci dengan *boiled antigen* selama 4 bulan, diperoleh antiserum kelinci yang dengan uji AGP menghasilkan garis yang cukup jelas. Terhadap antiserum kelinci tersebut dilakukan pemurnian IgG, dan diperoleh konsentrasi IgG sebesar 28,54 mg/ml. Dari hasil titrasi untuk menentukan jumlah optimal IgG

yang digunakan untuk mensensitisasi partikel lateks, ternyata untuk melabel 0,4 ml dari 2,5% suspensi *carboxylated latex* diperlukan 8,56 mg IgG atau 300 µl dari larutan stok IgG 28,54 mg/ml.

Hasil uji aglutinasi lateks terhadap berbagai isolat *P. multocida* yang tidak diketahui tipenya dapat dilihat pada Gambar 2. Sampel yang berupa ekstrak biakan dari 5 buah isolat *P. multocida* (A: 332, B: 132, C: 140, D: B:3,4., E: BB) diencerkan dari kiri ke kanan dengan pengenceran berkelipatan dua. Pada gambar tampak bahwa sampel A, B dan E menunjukkan hasil positif dengan adanya reaksi aglutinasi. Pada isolat A, aglutinasi terjadi pada enceran antigen 1/2; 1/4; 1/8; 1/16 dan 1/32. Sementara itu, pada isolat B aglutinasi terjadi pada enceran antigen 1/2; 1/4 dan 1/8, namun dengan kemampuan aglutinasi 50%. Pada isolat E, aglutinasi hanya terjadi pada enceran antigen 1/2 dan 1/4, sedangkan isolat lainnya (C, dan D) menunjukkan hasil yang negatif (tidak terlihat adanya aglutinasi, partikel lateks mengendap ke dasar lubang). Jadi, sampel A, B dan E merupakan isolat *P. multocida* tipe B:2, penyebab penyakit ngorok dan sampel isolat lainnya bukan *P. multocida* penyebab penyakit SE.

Kestabilan pereaksi lateks dalam uji aglutinasi telah juga dicoba dalam waktu 4, 6, dan 12 bulan setelah pembuatan pereaksi lateks. Hasilnya menunjukkan reaksi yang sama baik dan masih menunjukkan hasil negatif dan positif yang jelas (Tabel 1), namun, ada penurunan pengenceran sampel ekstrak *P. multocida* yang dapat mengaglutinasi partikel lateks. Uji ini telah dicoba terhadap berbagai sampel dari lapangan dan diuji lama stabilitasnya jika pereaksi disimpan dalam suhu lemari pendingin (4°C). Telah juga dilakukan penambahan antibiotika (*neomycin sulphate* 100 µg/ml) untuk menjaga kestabilan uji tanpa mengganggu hasil uji.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan lama kestabilan pereaksi uji aglutinasi lateks yang disimpan pada suhu 4° C dalam berbagai lama waktu penyimpanan

No. isolat <i>P. multocida</i>	Lama penyimpanan partikel lateks (4°C)			
	1 hari	4 bulan	6 bulan	12 bulan
B:2 (132)	+(1/32)	+(1/32)	+(1/16)	+(1/16)
B:2 (117)	+(1/32)	+(1/16)	+(1/16)	+(1/16)
B:2 (332)	+(1/32)	+(1/16)	+(1/16)	+(1/16)
B:3,4	-	-	-	-
H 16	-	-	-	-
H12	-	-	-	-

Catatan:

- + : terjadi aglutinasi
- : tidak ada aglutinasi
- () : besarnya pengenceran sampel yang menimbulkan aglutinasi

Gambar 2. Hasil uji aglutinasi lateks terhadap 5 buah sampel isolat *P. multocida*:

- Isolat A, B, dan E: ada reaksi aglutinasi (positif);
 - Isolat A, reaksi aglutinasi sampai enceran 1/32
 - Isolat B, reaksi aglutinasi sampai enceran 1/8
 - Isolat E, reaksi aglutinasi sampai enceran 1/4
- Isolat C dan D: tidak ada reaksi aglutinasi; partikel lateks mengendap ke dasar lubang (negatif).

Ternyata uji ini cukup spesifik, dapat membedakan *P. multocida* tipe B:2 (memberikan hasil positif) dengan *P. multocida* lain (memberikan hasil negatif).

Spesifisitas uji ini juga telah dianalisis setelah menguji 48 isolat *P. multocida* dan dibandingkan dengan uji ELISA (DAWKINS *et al.*, 1990) yang dipakai untuk mendeteksi *P. multocida* B:2. Dari 48 isolat *P. multocida*, uji aglutinasi lateks dan ELISA sama memberikan hasil negatif untuk 42 isolat dan hasil positif untuk 6 isolat *P. multocida*. Jadi dari 48 isolat *P. multocida* yang diperiksa, hanya 6 isolat yang merupakan *P. multocida* B:2 penyebab penyakit SE.

Perbedaan kedua uji ini terletak pada sensitivitasnya. Uji aglutinasi lateks membutuhkan biakan kuman yang lebih banyak dibandingkan dengan uji ELISA. Dalam uji aglutinasi lateks, kuman harus ditumbuhkan dalam 1 lempeng agar darah yang menghasilkan kira-kira 10^{10} kuman/ml PBS. Kuman ini kemudian diekstraksi seperti yang telah disebutkan di atas dalam 2 ml larutan. Dalam pemakaiannya, 100 μ l ekstrak kuman dimasukkan ke dalam lubang mikroplat, sedangkan dalam uji ELISA, DAWKINS *et al.* (1990) menyatakan bahwa kuman yang dideteksi dalam lubang mikroplat adalah sebanyak 10^8 kuman (diencerkan 1/100 dari suspensi yang digunakan dalam

uji aglutinasi lateks). Ada kemungkinan ELISA dapat mendeteksi jumlah kuman yang lebih rendah (DAWKINS *et al.*, 1990), tetapi enceran kuman yang lebih rendah dalam uji aglutinasi lateks akan menyulitkan pengamatan hasil aglutinasi.

Jadi, setelah dibandingkan antara hasil uji lateks dan hasil uji ELISA terhadap berbagai isolat *P. multocida*, ternyata uji aglutinasi lateks ini memberikan spesifisitas yang sama dengan uji ELISA. Tetapi untuk sensitivitas, uji aglutinasi lateks mempunyai sensitivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan uji ELISA. Hal ini juga dinyatakan oleh MARTIN dan NAYLOR (1994), bahwa uji aglutinasi lateks mempunyai sensitivitas yang sedikit lebih rendah dibandingkan dengan uji ELISA. Meskipun demikian, dalam mendiagnosis penyakit SE di lapangan, uji aglutinasi lateks mempunyai ketepatan diagnosis yang cukup baik, tanpa prosedur yang rumit.

Boiled antigen atau *heat stable antigen* yang merupakan *crude lipopolysaccharide (LPS) extract* sebelumnya telah digunakan untuk membuat *coating antibody* dalam uji ELISA (DAWKINS *et al.*, 1990). ELISA untuk mendeteksi *P. multocida* penyebab penyakit SE ini dinyatakan mempunyai spesifisitas 99% dan sensitivitas 86% (DAWKINS *et al.*, 1990). Ternyata dalam penelitian ini, *coating antibody* dalam uji ELISA tersebut dapat digunakan untuk mensensitisasi partikel lateks dengan menghasilkan spesifisitas yang sama seperti yang diperoleh dalam uji ELISA. Keuntungan yang diperoleh dengan menggunakan uji aglutinasi lateks adalah tidak diperlukannya bahan seperti konjugat, substrat, dan ELISA *plate reader*. Hasil uji aglutinasi cukup dibaca dengan mata biasa dan prosedur ujinyapun jauh lebih sederhana dibandingkan dengan ELISA.

Ekstrak bakteri atau yang disebut sebagai *boiled antigen* dan *heat stable antigen* adalah *crude LPS extract* yang secara spesifik dapat mendeteksi *P. multocida* B:2 (JOHNSON *et al.*, 1991; RIMLER, 1993).

Boiled antigen ini serupa dengan antigen HEDDLESTON yang digunakan untuk menentukan tipe somatik atau mendeteksi antigen somatik *P. multocida* (HEDDLESTON *et al.*, 1972). Profil protein antigen ini telah diteliti dengan menggunakan *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Dengan teknik ini terlihat bahwa antigen ini terutama terdiri atas lipopolisakarida (LPS) dengan bobot molekul rendah, yaitu sekitar 13 - 15.000 dalton. Selain itu, pada SDS-PAGE juga dapat dilihat ada beberapa *band* protein dengan bobot molekul 40-46.000 dalton. Tetapi, *band* protein tersebut hanya merupakan bagian yang sangat kecil dari jumlah antigen keseluruhan (JOHNSON *et al.*, 1993). Peranan LPS sebagai antigen utama yang dapat menentukan tipe *P. multocida* dinyatakan juga oleh MANNING (1984). Dalam penelitiannya dinyatakan, bahwa LPS merupakan antigen utama untuk menentukan tipe

kapsuler *P. multocida* yang selama ini dilakukan dengan *gel diffusion precipitin test* (GDPT).

Dengan menggunakan uji ini, isolat *P. multocida* sekaligus dapat ditentukan tipe kapsuler dan somatiknya, yaitu *P. multocida* B:2. Pada beberapa waktu yang lalu, penentuan tipe isolat *P. multocida* biasanya sangat sulit. JONES *et al.* (1988) menyatakan bahwa dalam banyak kasus, 82% isolat tidak dapat ditentukan tipenya dengan uji konvensional. Beberapa peneliti juga menyebutkan adanya kesulitan menentukan tipe, karena fenotipe yang berbeda seperti koloni yang bersifat mukoid, dan warna yang berbeda. Uji aglutinasi lateks dapat mengatasi hal itu, karena merupakan uji yang sederhana, dan tidak memakan waktu yang lama untuk mengerjakannya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *boiled antigen* atau *heat stable antigen* dari *P. multocida* 0019 dapat digunakan untuk menghasilkan antibodi spesifik terhadap *P. multocida* B:2 untuk mensensitisasi partikel lateks yang digunakan dalam uji aglutinasi lateks untuk mengidentifikasi *P. multocida* B:2. Uji aglutinasi lateks cukup spesifik untuk mengidentifikasi *P. multocida* B:2 penyebab penyakit SE, dan dibandingkan dengan uji ELISA, uji aglutinasi lateks terbukti lebih sederhana dan mudah digunakan di lapangan.

Pereaksi uji aglutinasi lateks dapat dicoba pemakaiannya di lapangan (laboratorium tipe B) jika terdapat kasus yang diduga penyakit SE. Hasil uji dapat dikonfirmasi ke Balitvet. Jika uji ini dianggap sebagai uji yang mudah dan berhasil diterapkan di laboratorium daerah, maka uji ini dapat dimasukkan ke dalam uji standar (baku) untuk mendiagnosis penyakit SE.

DAFTAR PUSTAKA

BAIN, R.V.S., M.C.L. DE ALWIS, G.R. CARTER and B.K. GUPTA. 1982. Haemorrhagic Septicaemia. Animal Production and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.

BANGS, L.B. 1988. Latex Agglutination Tests. *American Clinical Laboratory News Edition*. June 1988.

BRICKELL, S.K., L.M. THOMAS, K.A. LONG, M. PANACCIO and P.R. WIDDERS. 1998. Development of a PCR test based on a gene region associated with the pathogenicity of *Pasteurella multocida* serotype B:2, the causal agent of Haemorrhagic Septicaemia in Asia. *Vet. Microbiol.* 59 (4): 294-307.

CARNEY, J. 1990. Rapid diagnostic tests employing latex particles. *Analytical Proceedings*. 27: 99-100.

CARTER, G.R. and D.E. RAPPAY. 1963. A haemagglutination test employing specific lipopolysaccharide for the

detection and measurement of pasteurilla antibodies to *Pasteurella multocida*. *British Vet. J.* 119: 73-77.

CARTER, G.R. and M.M. CHENGAPPA. 1981. Identification of type B and E *Pasteurella multocida* by counterimmunoelectrophoresis. *Vet. Rec.* 108: 145 - 146.

DARMADI, P. 1991. Status report: Indonesia. pp.26-27. In: Proceedings of the 4th International Workshop on Haemorrhagic Septicaemia. Kandy, Sri Lanka.: M.C.L. De Alwis *et al.*(eds.). Food and Agriculture Organisation. Bangkok, Thailand.

DAWKINS, H.J.S., R. B. JOHNSON, T.L. SPENCER and B.E. PATTEN. 1990. Rapid identification of *Pasteurella multocida* responsible for Haemorrhagic Septicaemia using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sci.* 49: 261-267.

DE ALWIS, M.C.L. 1993. Pasteurellosis in production animals: A Review. pp. 11-22. In: ACIAR Proceedings no. 43.: *Pasteurellosis in Production Animals*. B.E. Patten *et al.* (eds.). Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia.

HEDDLESTON, K.L., J.E. GALLAGHER and P.A. REBERS. 1972. Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.* 16: 925-936.

JOHNSON, R.B., H.J.S. DAWKINS and T.L. SPENCER. 1991. Electrophoretic profiles of *Pasteurella multocida* isolates from animals with haemorrhagic septicaemia. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1644 -1648.

JOHNSON, R.B., H.J.S. DAWKINS, T.L. SPENCER, J.L.T. BASCON, M.J.P.P. ALMAZAN, E.C. AGOR and W.C. RIVERA. 1993. Characterisation of *Pasteurella ultocida* (Haemorrhagic Septicaemia) isolates from the Phillipines. pp. 203-208. In: ACIAR Proceedings no. 43.: *Pasteurellosis in Production Animals*. B.E Patten *et al.* (eds.) Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia.

JOHNSTONE, A. and R. THORPE. 1982. *Immunochemistry in Practice*. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

JONES, R.J., J.K. CLARKE and B.J. STEVENSON. 1988. A Preliminary investigation of New Zealand isolates of *Pasteurella multocida*. *New Zealand Vet. J.* 36:155-156.

MANNING, P.J. 1984. Naturally occurring pasteurilosis in laboratory rabbits: chemical and serological studies of whole cells and lipopolysaccharides of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 44 (2): 402-507.

MARTIN, P.K and R.D. NAYLOR. 1994. A latex agglutination test for the qualitative detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *Res. Vet. Sci.* 56: 259- 261.

NATALIA, L. dan A. PRIADI. 1997. Diagnosis, pencegahan dan pengendalian penyakit ngorok. Simposium Sehari Penyakit Ngorok (*Septicaemia Epizootica*, SE) dalam Rangka Pelepasan Purna Bhakti Ahli Peneliti Utama Drh. H. Anief Sjamsudin, APU.: 31-43. Balai Penelitian Veteriner, Departemen Pertanian.

- NATALIA, L. 1996. Abattoir survey for *Pasteurella multocida* B:2 in Indonesia using conventional and PCR technology. International Workshop on Diagnosis and Control of Haemorrhagic Septicaemia. Denpasar, Bali. 28 - 30 Mei 1996.
- RIMLER, R.B. 1978. Coagglutination test for identification of *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia. *J. Clin. Microbiol.* 8: 214-218.
- RIMLER, R.B. 1993. Pasteurella: Laboratory techniques for typing and diagnosis of infection. pp 199-202. In: ACIAR Proceedings no. 43: *Pasteurellosis in Production Animals*. B.E Patten *et al.* (eds.). Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia.