

PAMERAN



[- 1 SEP 2003

LAPORAN PENELITIAN
ILMU PENGETAHUAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 2000

SELESAI

**REKAYASA KIT DIAGNOSTIK DINI LEUKEMIA SAPI DENGAN
MENGUNAKAN ANTIGEN GALUR LOKAL**

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Peneliti :

Prof. Dr. H. Sarmanu, Drh., M.S.
Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc.
Hasdinah Hasan Rohan, Drh., M.S.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Dasar
DIP Nomor : 028 /XXIII/4/--/2000 Tanggal 15 Mei 2000
Kontrak Nomor : 014/P2IPTD/DPPM/V/2000
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 03

**PUSAT PENELITIAN BIOENERGI
LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Desember, 2000

3000 121013141



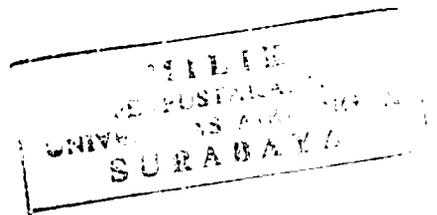
1. LEUKEMIA IN ANIMALS
2. LEUKEMIA-DIAGNOSIS



LAPORAN PENELITIAN
ILMU PENGETAHUAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 2000

KKC
KK
636.089699 419
Sar
r

REKAYASA KIT DIAGNOSTIK DINI LEUKEMIA SAPI DENGAN MENGUNAKAN ANTIGEN GALUR LOKAL



Peneliti :

Prof. Dr. H. Sarmanu, Drh., M.S.
Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc.
Hasdinah Hasan Rohan, Drh., M.S.

SELESAI

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Dasar
DIP Nomor : 028 /XXIII/4/-/2000 Tanggal 15 Mei 2000
Kontrak Nomor : 014/P2IPTD/DPPM/V/2000
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 03

3000 121013141

PUSAT PENELITIAN BIOENERGI
LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Desember, 2000

LAPORAN PENELITIAN
PROGRAM PENELITIAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 2000

REKAYASA KIT DIAGNOSTIK DINI LEUKEMIA SAPI DENGAN
MENGUNAKAN ANTIGEN GALUR LOKAL

Peneliti

Prof. Dr. H. Sarmanu, Drh., M.S.

Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr. M.Sc.

Hasdinah Hasan Rohan, Drh., M.S.

PUSAT PENELITIAN BIOENERGI

Dibiayai oleh Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan
dan Teknologi Dasar
Kontrak Nomor : 014/P2IPTD/DPPM/V/2000 tgl. 15 Mei 2000
Ditbinlitabmas Ditjen Dikti Depdiknas

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Desember 2000



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL

UNIVERSITAS AIRLANGGA

LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | 10. Puslit/ Kesehatan Reproduksi |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Puslit Olah Raga | |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995246
E-mail : lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. a. Judul Penelitian : Rekeyasa Kit Diagnostik Dini Leukemia Sapi Dengan Menggunakan Antigen Galur Lokal
b. Macam Penelitian : (V) Fundamental () Terapan () Pengembangan
c. Kategori Penelitian : I / II / III
2. Kepala Proyek Penelitian
a. Nama Lengkap Dengan Gelar : Prof. Dr. Sarmanu, Drh., M.S.
b. Jenis Kelamin : Laki-laki
c. Pangkat/Golongan dan NIP : Pembina Utama Madya / IVd / 130 701 125
d. Jabatan Sekarang : Guru Besar Madya
e. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan/Klinik Veteriner
f. Univ/Inst/Akademi : Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Ilmu Pertanian
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 orang
4. Lokasi Penelitian : Pusat Veterinaria Farma, Surabaya
5. Kerjasama dengan Instansi lain
a. Nama Instansi : -
b. A l a m a t : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 5 bulan
7. Biaya Yang Diperlukan : Rp. 13.000.000; (Tiga Belas Juta Rupiah)
8. Seminar Hasil Penelitian
a. Dilaksanakan Tanggal : 11 Desember 2000
b. Hasil Penilaian : () Amat baik (V) Baik
() Sedang () Kurang

Mengetahui
Kapuslit Bioenergi

Dr. RTS. Adikara, M.S., Drh.
NIP. 130 687 301

Surabaya, 20 Desember 2000
Kepala Proyek Penelitian

Prof. Dr. Sarmanu, Drh., M.S.
NIP. 130 701 125



Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian

Prof. Dr. Sarmanu, Drh., M.S.
NIP. 130 701 125

RINGKASAN

REKAYASA KIT DIAGNOSTIK DINI LEUKEMIA SAPI DENGAN MENGGUNAKAN ANTIGEN GALUR LOKAL (Sarmanu, Yoes Prijatna Dachlan dan Hasdinah Hasan Rohan, 2000 : 26 halaman).

Penyakit leukemia sapi menjadi masalah bagi masyarakat, karena penyakit ini menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar. Selain angka kematiannya tinggi, produktivitas dan reproduktivitas sapi menjadi rendah. Obat dan vaksin untuk leukemia sapi sampai sekarang belum ditemukan. Pencegahan dilakukan dengan diagnosis dini dengan menggunakan EBL Gp 60 yang masih harus diimpor dengan harga yang mahal. Untuk menghemat biaya dan waktu, maka dilakukan penelitian rekayasa kit diagnostik dini dengan menggunakan antigen EBL Gp60 galur lokal.

Penelitian yang dilaksanakan bertujuan mempelajari tentang rekayasa kit untuk diagnostik dini leukemia sapi dengan menggunakan antigen EBL Gp60 galur lokal dengan pembandingan kit diagnostik yang menggunakan antigen EBL Gp60 galur impor.

Penelitian yang dilaksanakan menggunakan rancangan eksploratif dan rancangan acak lengkap. Rancangan eksploratif meliputi proses pengembangan sel, pengembangan virus, pembuatan serum referen dan serum kontrol. Rancangan acak lengkap digunakan untuk proses titrasi.

Analisis data dilakukan secara deskriptif dan untuk pengujian perbedaan titer antigen antibodi antara EBL Gp60 galur lokal dan impor digunakan uji X^2 . Hasil uji X^2 bermakna bila diperoleh harga $p < 0,05$.

Perangkat antigen EBL galur lokal dan produk IAF Kanada berdasarkan uji presipitasi yang menggunakan serum sapi potong hasilnya tidak berbeda nyata. Hasil uji sensitivitas yang menggunakan serum sapi potong antara perangkat antigen EBL galur lokal tidak berbeda nyata dengan produk IAF Kanada. Hasil uji spesifisitas yang menggunakan serum sapi potong antara perangkat antigen EBL galur lokal tidak berbeda nyata dengan produk IAF Kanada ($p > 0,05$).

Saran yang perlu disampaikan bahwa untuk diagnosis dini penyakit EBL di Indonesia hendaknya digunakan perangkat antigen EBL galur lokal.

(Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Kontrak Nomor : 014/
/P2IPTD/DPPM/V/2000, 15 Mei 2000)

SUMMARY

EARLY KIT DIAGNOSTIC ENGINEERING FOR BOVINE LEUKEMIA (Sarmanu, Yoes Prijatna Dachlan, and Hasdianah Hasan Rohan, 2000; 26 Pages)

Bovine leucaemia (BL) has been long become a problem to farmers, since the disease causes high economic losses. Beside of high mortality rate it is though to lowering productivity and reproductivity. So far medication and vaccines has not been found for the disease. Preventive measures for early diagnose have been done by using imported EBL (Enzootic Bovine Leucosis) Gp60 and considered to be expensive and time consuming. Kit Engineering research was done for early diagnose of BL using EBL Gp60 antigen of local strain, though to be more economic.

The objective of the research was to study Kit Engineering for establishing early diagnose of BL using EBL Gp60 antigene of local strain and comparing with the diagnostic kit using EBL Gp60 antigene of imported strain.

Research was done using explorative and completely randomized design. Explorative design was conducted through out cell, and virus propagation process, producing reference serum, and control serum. More over, completely randomized design was conducted for titration process.

Data was analysed descriptively and antigen - antibody titer differences between imported and local strain of EBL Gp60 was measured using X^2 test. Result was considered to be significant if $p < 0.05$.

The use of EBL antigen of local and imported strains produced by IAF, Canada for precipitation test using serum of beef cattle was not significantly difference. Comparing the result of sensitivity test using beef cattle serum between instrumentation of EBL antigen of local strain and IAF, Canada was also not significant. While the result of specificitas test of beef cattle serum using EBL antigen of local strain and in comparison with IAF product from Canada was not sigificantly difference ($p > 0.05$).

Recommendation needed, for early diagnose of EBL, disease in Indonesia, using EBL antigene of local strain.

(Research Institute, Airlangga University. Agreement Number : 014/P2IPTD/DPPM/V/2000, May, 15, 2000)

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur alhamdulillah ke hadirat Allah Subhanahu Wata'ala, akhirnya selesailah laporan hasil penelitian dengan judul Rekayasa Kit Diagnostik Dini Leukemia Sapi Dengan Menggunakan Antigen Galur Lokal. Penelitian ini pelaksanaannya dibiayai dari sumber dana DP3M Depdiknas tahun anggaran 2000.

Dengan selesainya penulisan laporan penelitian ini, peneliti ingin menyampaikan terima kasih yang sebanyaknya kepada.

1. Prof. dr. H. Soedarto, DTMH., Ph.D. selaku Rektor Universitas Airlangga yang telah menyetujui penelitian ini dilaksanakan.
2. Prof. Dr. H. Sarmanu, Drh., M.S. selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga yang telah berhasil mencarikan dana, sehingga penelitian ini dapat terlaksana.
3. Semua pihak yang namanya tidak sempat penulis cantumkan satu per satu yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Untuk kesempurnaan penulisan buku laporan penelitian ini, peneliti mengharapkan saran dari para pembaca dan harapan peneliti semoga buku laporan ini dapat bermanfaat bagi dunia peternakan.

Surabaya, 10 Desember 2000

Peneliti

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|----------|
| LEMBAR IDENTITAS PENGESAHAN | i |
| RINGKASAN | ii |
| SUMMARY | iii |
| KATA PENGANTAR | iv |
| DAFTAR ISI | v |
| DAFTAR TABEL | vii |
| DAFTAR LAMPIRAN | viii |
| BAB I. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang Permasalahan | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah | 2 |
| II. TINJAUAN PUSTAKA | 3 |
| 2.1. Leukemia Sapi | 4 |
| 2.2. Penyebab Leukemia Sapi..... | 5 |
| 2.3. Gejala Dan Penularan Leukemia Sapi..... | 5 |
| 2.4. Diagnosis Dan Pengobatan Leukemia Sapi ... | 6 |
| III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN | 8 |
| 3.1. Tujuan Penelitian | 8 |
| 3.2. Manfaat Penelitian | 8 |
| IV. METODE PENELITIAN | 9 |
| 4.1. Tempat Dan Waktu Penelitian | 9 |
| 4.2. Bahan Penelitian | 9 |
| 4.3. Alat Penelitian | 9 |

| | | |
|-----------------------------|---|-----------|
| | | vi |
| | 4.4. Rancangan Penelitian | 9 |
| | 4.5. Prosedur Penelitian | 10 |
| | 4.6. Analisis Data | 13 |
| BAB | V. HASIL DAN PEMBAHASAN | 14 |
| | 5.1. Isolasi Virus EBL Galur Lokal | 14 |
| | 5.2. Titrasi Virus EBL | 16 |
| | 5.3. Titer Antibodi | 17 |
| | 5.4. Innocuicity Test | 17 |
| | 5.5. Uji Ouchterlony Antigen EBL Galur Lokal .. | 18 |
| | 5.6. Uji Stabilitas | 18 |
| BAB | VI. SIMPULAN DAN SARAN | 23 |
| | 6.1. Simpulan | 23 |
| | 6.2. Saran | 23 |
| DAFTAR PUSTAKA | | 24 |
| LAMPIRAN | | 26 |

DAFTAR TABEL

| Nomor | J u d u l | Halaman |
|-------|--|---------|
| 1. | Hasil Inokulasi Virus EBL Pada Jaringan Biakan OL .. | 15 |
| 2. | Hasil Uji Postulat Koch Virus EBL Pada Pembuatan Serum Referen, Serum Kontrol Positif, Serum Kontrol Positif Lemah dan Serum Kontrol Negatif | 15 |
| 3. | Titration Virus EBL Pada Biakan Jaringan OL | 16 |
| 4. | Hasil Presipitasi Perangkat Antigen EBL Galur Lokal Dan EBL IAF Kanada | 17 |
| 5. | Uji Ouchterlony Pada Antigen EBL Galur Lokal | 19 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Nomor | J u d u l | Halaman |
|-------|--|---------|
| 1. | Uji χ^2 Presipitasi Perangkat Antigen EBL Galur Lokal Dan EBL IAF Kanada | 26 |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Leukemia sapi adalah penyakit ganas yang disebabkan oleh retrovirus. Virus leukemia menyerang Reticulo Endothelial System (RES). Gejala yang menyolok penderita leukemia adalah pembesaran kelenjar limfe dan limpa. Gejala lain adalah pembesaran hati, ginjal dan jantung. Jumlah leukosit meningkat, eosinofil juga meningkat, produktivitas dan reproduktivitas turun (Burny dan Mamerick, 1987).

Leukemia sapi bersifat endemik dan persisten, artinya sekali terkena leukemia seumur hidup sapi tersebut menderita leukemia yang diakhiri dengan kematian. Penularan virus leukemia bisa dari induk yang bunting ke fetus dan dari sapi satu ke sapi lainnya. Penularan bisa juga terjadi antar jenis ternak misalnya sapi, domba, kambing, babi, rusa, kerbau dan kuda (Ishino dkk., 1988; Onuma dan Olson, 1981).

Kejadian leukemia sapi di Eropa berkisar antara 4-24,3% dengan angka kematian berkisar antara 80-95%. Kerugian ekonomi yang diakibatkan oleh penyakit leukemia sangat besar. Selain angka kematian yang tinggi, produktivitas dan reproduktivitas sapi sangat rendah (Miller dkk., 1976).

Kejadian penyakit leukemia sapi di Indonesia pertama kali dilaporkan oleh Ressay dkk. (1986). Menurut laporan Dit. Keswan



(1998) kejadian leukemia sapi di Indonesia kurang lebih 10%.

Pengobatan untuk sapi yang menderita leukemia sampai sekarang belum ditemukan. Demikian pula vaksin untuk pencegahan leukemia sampai saat ini juga belum ditemukan. Pencegahan leukemia sapi yang dilakukan selama ini adalah dengan jalan karantina melalui diagnosis dini (Djafar, 1985).

Diagnosis leukemia sapi selama ini digunakan uji serologis imunodifusi dengan kit (perangkat) antigen Enzootic Bovine Leucosis (EBL) Gp60 (Miller dan Maaten, 1979; Nakajima dkk., 1985). Antigen EBL Gp60 tersebut masih harus diimpor dengan harga yang mahal dan waktu tunggu yang lama. Pada hal untuk diagnosis leukemia dibutuhkan waktu dini agar penyebaran leukemia secara meluas dapat dicegah.

Berpangkal pada pemikiran tersebut di atas perlu dilakukan penelitian tentang rekayasa kit diagnostik dini leukemia sapi dengan menggunakan antigen EBL Gp60 galur lokal. Dengan digunakannya antigen EBL Gp60 galur lokal ini diharapkan lebih ekonomis, mudah diperoleh, promosi produk sendiri dan mencegah mutasi.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang permasalahan tersebut disusun rumusan masalah sebagai berikut.

1. Apakah kit diagnostik leukemia dengan menggunakan antigen EBL Gp60 galur lokal mutunya tidak berbeda dengan EBL Gp60 impor?

Kesamaan mutu kit antigen galur lokal dengan impor tersebut ditentukan oleh titer antigen dan antibodi, sensitivitas dan spesifisitas yang tidak berbeda.

BAB II

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

2.1. Leukemia Sapi

Leukemia sapi disebut pula Enzootic Bovine Leucosis atau Bovine Lymphomatosis adalah penyakit ganas yang menyerang reticulo endothelial system yang ditandai membengkaknya kelenjar limfe, limpa, hati dan ginjal. Pada stadium preklinis biasanya keadaan umum tidak terganggu, tetapi pada stadium akhir sekitar 80-95% penderita akan mati. Penyakit leukemia berjalan persisten, artinya sekali saja sapi terserang seumur hidup menderita leukemia (Burny dan Mamerick, 1987).

Penyakit leukemia sapi pertama kali ditemukan di Jerman pada tahun 1771 oleh Leiserin dengan gejala pembesaran limpa, hati, ginjal dan kelenjar limfe. Dari Jerman penyakit menyebar ke Swedia, Denmark, Rusia dan negara Eropa Timur. Karena penyebarannya yang cepat sekarang banyak ditemukan di Amerika (Miller dkk., 1976).

Di Indonesia leukemia pertama kali ditemukan Ressang pada tahun 1957 di Bogor menyerang kerbau (Ressang dkk., 1986). Menurut laporan Dit. Keswan (1998) kejadian leukemia sapi di Indonesia kurang lebih 10%. Selanjutnya kejadian leukemia berturut-turut dilaporkan Dharma pada tahun 1983 menyerang sapi peranakan ongole di Banyuwangi. Prabowo pada tahun 1985 menemukan leukemia di Bengkulu Utara juga menyerang sapi peranakan ongole.

Raharjo tahun 1988 menemukan isolat EBL di Lembang. Terakhir pada tahun 1998 Balai Penyidikan Penyakit Hewan menemukan leukemia sapi dengan metode diagnosis imunodifusi (Ditkeswan, 1998).

2.2. Penyebab Leukemia Sapi

Penyakit leukemia sapi disebabkan oleh retrovirus yang berupa partikel C dan secara morfologis menyerupai virus tipe C. Retrovirus leukemia mempunyai densitas 1,18 g/ml merupakan glikoprotein mempunyai epitop sama di seluruh regional. Retrovirus terdiri atas RNA 60s-70s berantai tunggal dan memiliki enzim reverse transcriptase (Ferrer dkk., 1976).

2.3. Gejala Dan Penularan Leukemia Sapi

Gejala leukemia sapi yaitu adanya tumor kelenjar limfe, limpa, hati dan ginjal. Selain itu produksi susu dan daging turun, nafsu makan turun dan infertilitas (Trainin dkk., 1990).

Penyakit leukemia menular dengan cepat melalui transportasi yang kurang baik antar pulau atau dari luar negeri. Penularan terjadi dari sapi satu ke sapi lain dan dari induk ke fetus yang menyebabkan kematian saat dilahirkan. Penularan dapat pula melalui serangga, kontak antar ternak sapi, domba, babi, rusa, kuda dan kerbau (Ishino dkk., 1988; Onuma dan Olson, 1981). Banyaknya vektor sebagai penular, maka penyebaran leukemia sapi sangat cepat.

2.4. Diagnosis Dan Pengobatan Leukemia Sapi

Diagnosis leukemia sapi dapat dilakukan dengan melihat gejala klinis dan pemeriksaan laboratorium. Pemeriksaan laboratorium meliputi gambaran darah, complemen fixation test dan dengan agar gel imunodifusi. Diagnosis dengan agar gel imunodifusi yang paling sering dilakukan, karena mudah pelaksanaannya baik di lapangan maupun di laboratorium. Selain itu tidak memerlukan keahlian khusus. Adanya virus EBL di dalam limposit ditunjukkan adanya garis presipitasi dalam agar gel imunodifusi (Miller dan Maaten, 1979; Nakajima dkk., 1985). Kendala diagnosis dengan agar gel imunodifusi, antigen EBL Gp60 masih harus diimpor dengan harga yang mahal dan waktu tunggu yang lama. Untuk menghemat biaya dan waktu, maka dilakukan penelitian tentang rekayasa kit diagnostik dini leukemia sapi dengan menggunakan antigen EBL Gp60 galur lokal. Kit uji serologis imunodifusi dengan menggunakan antigen EBL Gp60 galur lokal terdiri dari antigen EBL murni, serum referen, serum kontrol positif, serum kontrol negatif, serum kontrol positif lemah, bahan pengencer dan agar gel imunodifusi (Djafar, 1985).

Pengobatan untuk sapi yang menderita leukemia sampai sekarang belum ditemukan. Demikian pula vaksin untuk pencegahan leukemia sapi saat ini juga belum ditemukan. Pencegahan leukemia sapi yang dilakukan selama ini adalah dengan jalan karantina melalui diagnosis dini. Penyakit leukemia sapi bukan

zoonosis, tetapi semua jenis sapi perah dan potong dapat terserang (Djafar, 1985).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan mempelajari tentang rekayasa kit untuk diagnostik dini leukemia sapi dengan menggunakan antigen EBL Gp60 galur lokal dengan pembandingan kit diagnostik yang menggunakan antigen EBL Gp60 galur impor.

3.2. Manfaat Penelitian

Manfaat hasil penelitian ini dengan ditemukannya kit diagnostik dini leukemia sapi dengan menggunakan EBL Gp60 galur lokal diharapkan akan lebih ekonomis dan lebih cepat untuk diagnosis leukemia sapi. Manfaat lain diharapkan dapat mempromosikan produk sendiri dan sekaligus akan meningkatkan pendapatan petani ternak.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian dikerjakan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Pusat Veterinaria Farma, Surabaya. Penelitian dilaksanakan mulai tanggal 10 Juli 2000 sampai dengan 10 Desember 2000.

4.2. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan terdiri atas cel line fetal lamb kidney, ovine lung dan spleen. Virus antigen EBL isolat Lembang. Media RPMI, Eagle, DEAE dextran dan yeast extract. Fetal calf serum, cellulose tubing, antibiotika, thiomersal, amonium sulfat, pospat bufer salin dan versen trypsin.

4.3. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan terdiri atas ultra sentrifuge, inverted microscope, stirer, freeze dried, puncher, botol roux dan inkubator CO₂.

4.4. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian untuk pembuatan kit dengan menggunakan antigen EBL Gp60 galur lokal adalah rancangan eksploratif.

Untuk pengukuran titer antigen dan antibodi, sensitivitas dan spesifisitas digunakan rancangan acak lengkap. Sebagai pembanding kit dengan antigen EBL Gp60 galur lokal digunakan kit dengan antigen EBL Gp60 yang diimpor dari Kanada.

Kedua macam kit tersebut diuji cobakan kepada serum sapi dari Balai Inseminasi Buatan Lembang sebagai serum kasus dan serum kontrol diambil dari serum sapi sehat dari rumah potong Pegirian Surabaya. Besar sampel untuk serum kasus dan kontrol masing-masing 40 ekor, jadi total sampel serum sebanyak 80 ekor.

4.5. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilaksanakan terdiri atas lima tahap yaitu.

1. Pengembangan sel
2. Pengembangan virus
3. Pemurnian antigen
4. Pembuatan serum referen dan serum kontrol
5. Uji titrasi

1. Pengembangan Sel

Pengembangan sel dilakukan menurut metode Johan (1975). Fetus sapi umur 3 bulan dan fetus kambing umur 1 bulan diambil dari rumah potong Pegirian Surabaya. Paru-paru fetus sapi dan ginjal serta limpa fetus kambing diambil. Ketiga jenis organ ini dimasukkan ke dalam kontainer yang berisi media eagle, antibiotika dan dalam keadaan dingin dan steril dibawa ke

laboratorium. Organ tersebut dicuci dengan pospat bufer salin, dipotong menjadi ukuran kecil-kecil kemudian dilakukan tripsinasi, diberi media tanpa serum dan disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 15 menit. Selanjutnya disaring dengan saringan sel, disentrifuge lagi 1500 rpm selama 15 menit hingga bersih. Endapannya diambil diberi media eagle 90%, ditambah calf serum 10% dan dihomogenisasikan. Dikembangkan dalam botol roux, diinkubasikan sampai cell confluen 2 x 24 jam temperatur 37° C dan diperbanyak dengan spliting. Tiap botol roux diisi 5 x 10⁵ sel/ml. Diinkubasi pada suhu 37° C selama 2 x 24 jam. Bila sel telah penuh dipanen displiting melebihi pasase 50. Untuk melihat apakah sel sudah memenuhi syarat sebagai sel line dilakukan metode karyo typing cell.

2. Pengembangan Virus

Untuk pengembangan virus digunakan sel line yang telah dibuat pada nomor satu dengan menggunakan metode Burke dan Rovozo (1983). Sel yang konfluen dicuci dengan pospat bufer salin dan diinokulasi virus 3-5 ml setiap botol roux. Diinkubasi pada temperatur 37° C selama 7 hari. Selanjutnya dilakukan uji sterilitas dengan menggunakan nutrien agar dan serum agar. Bila steril tidak ada pertumbuhan kuman. Setelah steril diadakan postulat Koch pada kambing muda, dilakukan titrasi, inaktivasi dan inocuity test.

3. Pemurnian Antigen

Untuk pemurnian antigen digunakan metode Trudel dan Payment (1990). Medium virus dipindahkan ke tabung sentrifuge dan

disentrifuge kecepatan 4000 rpm selama 30 menit dengan suhu 4° C. Supernatan sel dipindahkan ke botol disedimentasi dengan amonium sulfat dengan konsentarsi akhir 30% suhu 4° C selama 12 jam. Disentrifuge kecepatan 7000 rpm selama 30 menit dengan suhu 4° C. Medium sel bagian atas dibuang dan endapannya dilarutkan dengan aqua destilata 2-3% dari volume asal. Dimasukkan ke dalam cellulose tubing dan didialise dengan larutan NaCl 0,85%. Antigen diambil dimasukkan ke dalam tabung plastik steril dan disimpan pada suhu -70° C. Antigen yang diperoleh adalah antigen EBL Gp60 galur lokal.

4. Pembuatan Serum Referen dan Serum Kontrol

Pembuatan serum referen dipergunakan metode Harlow dan Lane (1988). Kelinci disuntik virus EBL 2 ml (1 ml virus EBL dan 1 ml freund adjuvant) secara subkutan pada 10 tempat di daerah punggung. Pada saat 28 hari kemudian diboster dengan dosis sama dan dipanen 17 hari kemudian.

Pembuatan serum kontrol positif dilakukan dengan menyuntikkan 2 ml virus EBL pada kambing muda secara subkutan pada 10 tempat di daerah punggung. Pada saat 28 hari kemudian diboster dengan dosis sama dan dipanen 17 hari kemudian.

Pembuatan serum kontrol positif dilakukan dengan menyuntikkan 2 ml virus EBL pada kambing muda secara subkutan pada 10 tempat di daerah punggung. Pada saat 28 hari kemudian hasilnya dipanen.



Serum kontrol negatif diambil dari kambing muda tanpa disuntuk virus EBL.

5. Uji Titirasi

Untuk uji titirasi langkah pertama adalah pembuatan agar imunodifusi. Buat lapisan tipis pada plate berdiameter 15 cm dan diinkubasi pada suhu 37° C. Pada agar dibuat sumuran. Sumuran 2, 4 dan 6 diisi dengan serum acuan masing-masing 0,05 ml. Sumuran 1, 3 dan 5 diisi dengan serum uji masing-masing 0,05 ml. Selanjutnya diinkubasi pada temperatur kamar selama 24-48 jam. Setiap kali pemeriksaan dibuat kontrol. Bila reaksi positif, akan terbentuk garis presipitasi terletak antara antigen dengan serum yang diuji. Bila reaksi negatif tidak memperlihatkan adanya garis presipitasi (Miller dkk., 1982).

4.6. Analisis Data

Data yang telah diperoleh disajikan secara deskriptif misalnya dalam bentuk tabel, gambar dan nilai persentase. Untuk menguji kesamaan titer antigen dan antibodi, sensitivitas dan spesifisitas antara kit yang menggunakan antigen EBL Gp60 lokal dan impor digunakan uji χ^2 . Hasil uji tidak berbeda secara bermakna bila diperoleh harga $p > 0,05$ (Steel dan Torrie, 1984).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan pengamatan, pengukuran dan penghitungan secara seksama diperoleh hasil penelitian sebagai berikut.

5.1. Isolasi Virus EBL Galur Lokal

Virus EBL yang didapat dari BPM SOH pasasi 15, diisolasi dan diadakan uji *Postulat koch* untuk mengetahui keberadaan EBL tersebut. Dengan jalan menginokulasikan virus EBL pasasi 15 pada biakan jaringan OL sampai dengan pasasi 29, diinkubasikan selama 5 - 7 hari. Hasil yang didapat pada hari kelima sudah mulai tampak adanya pertumbuhan CPE disertai dengan adanya kerusakan sel yang mengelompok. Semakin tinggi pasasi virus ternyata masa inkubasi yang diperlukan semakin pendek untuk menghasilkan CPE. Pada pasasi 16 tampak CPE sekitar 50 % dengan masa inkubasi selama 6 hari. Setelah mencapai pasasi di atas 20, maka CPE terlihat lebih banyak sampai dengan 80 %, seterusnya pada pasasi di atas 22 rata-rata CPE melebihi 90 % dengan masa inkubasi selama 5 hari (Tabel 1).

Uji *Postulat koch* dilakukan dengan menyuntikkan virus EBL pada domba muda dengan dosis 10 ml / sub kutan per ekor, yang disuntikkan pada bagian punggung. Dieramkan selama 7 - 14 hari

Tabel 1. Hasil Inokulasi Virus EBL Pada Biakan Jaringan OL

| No. | Masa Pasasi Inkubasi/hari | Persentase CPE | | | | | |
|-----|------------------------------|----------------|------|------|------|------|-------|
| | | 50 % | 60 % | 70 % | 80 % | 90 % | 100 % |
| 16 | 6 | + | | | | | |
| 17 | 6 | | | + | | | |
| 18 | 6 | | | + | | | |
| 19 | 6 | | | + | | | |
| 20 | 6 | | | | + | | |
| 21 | 5 | | | | + | | |
| 22 | 5 | | | | | + | |
| 23 | 5 | | | | | + | |
| 24 | 4 | | | | | + | |
| 25 | 4 | | | | | | + |
| 26 | 4 | | | | | | + |
| 27 | 4 | | | | | | + |
| 28 | 4 | | | | | | + |
| 29 | 4 | | | | | | + |

Keterangan : + (angka persentase CPE

dan terlihat adanya gejala-gejala klinis dari penyakit EBL pada domba tersebut (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Uji Postulat Koch Virus EBL Pada Pembuatan Serum Referen, Serum Kontrol Positif, Serum Kontrol Positif Lemah, dan Serum Kontrol Negatif

| Gejala Yang Timbul | Serum Referen pada Kelinci | | | Kontrol Positif | Serum Kontrol pada Domba Muda | | |
|--|-------------------------------|---------|---------|--------------------|----------------------------------|---------|-------|
| | Perlakuan | Kontrol | Positif | | Positif Lemah | Negatif | |
| Pembengkakan Kelenjar Getah Bening | + | + | + | - | + | + | - |
| Pembengkakan Hati Penebalan Sub Mucosa | + | + | + | - | + | + | - |
| Lambung (Ulce- rasi) | + | + | + | - | + | + | - |
| Jumlah sel Limfosit/m ³ | * | * | * | * | 11.762 | 9.836 | 4.010 |

Keterangan : * tidak dihitung

5.3. Titer Antibodi

Uji serum netralisasi digunakan untuk mengetahui harga sensitivitas dari antigen EBL galur lokal dan antigen produk IAF Kanada.

Hasil sensitivitas dan spesifisitas yang didapat dari antigen EBL galur lokal dan antigen EBL IAF Kanada adalah sama, yaitu 97,50 % (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil Presipitasi Perangkat Antigen EBL Galur Lokal Dan EBL IAF Kanada

| Presipitasi | Galur EBL | |
|-------------|--------------|-------------|
| | Lokal | IAF Kanada |
| Negatif | 1 (2,50 %) | 1 (2,50%) |
| Positif | 39 (97,50 %) | 39 (97,50%) |
| Jumlah | 40 (100 %) | 40 (100 %) |

Hasil uji $\chi^2 = 0,51$ dan $p > 0,05$ (Lampiran 1)

5.4. Innocuity Test

Digunakan untuk mengetahui apakah virus tersebut sudah inaktif.

- Dilakukan pada sel monolayer, virus yang sudah inaktif ditanam pada sel kemudian diobservasi adanya CPE, bila inaktif harus tidak terbentuk CPE, dilakukan sampai dengan transfer ke 2

hasilnya harus baik (negatif CPE).

- b. Dilakukan pada anak tikus umur 5-7 hari, virus inaktif disuntikkan pada anak tikus sebanyak 0,02 - 0,03 ml/ekor diobservasi selama 5 hari, harus tidak ada kematian dari anak-anak tikus tersebut (hasil innocuity baik).

5.5. Uji Ouchterlony Antigen EBL Galur Lokal

Antigen EBL galur lokal yang telah dimurnikan diuji seberapa kepekatan yang terkandung di dalamnya. Pengujian ini untuk mengetahui berapa banyak antigen EBL yang akan digunakan dalam perangkat tersebut. Sehingga tidak terjadi kelebihan antigen di dalam pemakaian bahan perangkat. Antigen EBL yang akan diuji diencerkan 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; dan 1:32 dimasukkan ke dalam sumuran agar ouchterlony masing-masing 0,05 ml tiap sumuran. Dibuat 7 sumuran yang terdiri dari 1 sumuran di bagian tengah diisi dengan 0,05 ml serum positif EBL dan 6 sumuran di bagian tepi diisi masing-masing dengan 0,05 ml antigen yang telah diencerkan. Didapatkan hasil positif sampai dengan pengenceran 1:32; yang berarti 1 bagian antigen murni ditambah dengan 32 bagian PBS + sebagai bahan pengencer yang dapat digunakan dalam perangkat (Tabel 5).

5.6. Uji Stabilitas

Perangkat antigen EBL galur lokal dan produk import ditempatkan pada temperatur kamar (25°C - 30°C) pada 1,2,3 dan 4

Tabel 5. Uji Ouchterlony Pada Antigen EBL Galur Lokal

| No. Perlakuan | Antigen pengenceran | | | | | | Kontrol |
|------------------|---------------------|-----|-----|-----|------|------|---------|
| | 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | |
| 1 | + | + | + | + | + | + | - |
| 2 | + | + | + | + | + | + | - |
| 3 | + | + | + | + | + | + | - |

Keterangan :

- + = terbentuk presipitasi
- = tidak terbentuk presipitasi

minggu. Kemudian dilakukan uji ulang presipitasi pada agar *ouchterlony* dengan prosedur dan serum yang sama; didapatkan hasil warna yang baik, tidak ada perubahan pada materi perangkat antigen EBL galur lokal dan produk impor. Dengan uji *ouchterlony*, didapatkan hasil yang sama dengan hasil uji *ouchterlony* sebelumnya.

Pada uji *Postulat Koch* virus EBL galur lokal dengan jalan menyuntikkan virus EBL yang ditambahkan *Freund Ajuvant* sebanyak 4 ml dengan perbandingan sama pada bagian punggung secara sub kutan; setelah melalui masa inkubasi 28 hari seperti *Hepato megali*, pembesaran lambung dan terlihat adanya nanah yang mengeras dan padat, berwarna putih kekuningan (Miller et al. 1976).

Virus EBL terlihat memang lebih sensitif terhadap biakan jaringan OL, terbukti dimana semakin tinggi pasasi virus, maka semakin tinggi pula titer virus dan semakin tinggi pasasi virus maka semakin pendek pula masa inkubasinya, karena disini virus sudah adapted. Virus pada pasasi 15 dengan masa inkubasi selama 6 hari CPE yang ditimbulkan adalah 50 %, virus dengan pasasi 16 masa inkubasi selama 6 hari CPE yang ditimbulkan juga 50 % dan titer virus pada pasasi 16 adalah $10^{4,4}$ TCID₅₀. Tetapi virus pada pasasi 21 sampai dengan pasasi 29 terlihat masa inkubasi yang makin lama makin pendek tetapi jumlah CPE yang ditimbulkan semakin meningkat, demikian pula dengan titer virus, semakin tinggi pasasinya maka semakin tinggi pula titer virusnya; seperti pada pasasi 29 titer virus dapat mencapai $10^{8,2}$ TCID₅₀. Tetapi titer virus yang dianggap mulai adapted disini adalah pada pasasi 24 sampai dengan pasasi 28 yaitu $10^{7,8}$. Virus pada pasasi tersebut nantinya yang digunakan dalam pembuatan perangkat antigen EBL galur lokal. Pada pertumbuhan virus EBL dalam biakan jaringan OL terlihat adanya perubahan pH media dengan disertai perubahan warna media. Di dalam biakan jaringan OL yang confluent (penuh), warna media kekuningan dan pH media rendah (asam) berkisar 6,4 - 6,6. Dengan adanya pertumbuhan virus EBL di dalam biakan jaringan OL, warna Media berubah menjadi merah dan terjadi kenaikan pH media (basis) menjadi 7,0 - 7,4, yang berarti adanya pertumbuhan CPE pada

Pada uji keamanan (*innocuity test*) terlihat tidak terdapat pertumbuhan CPE pada biakan jaringan OL, walaupun telah ditransfer sebanyak dua kali hasilnya tetap negatif. Demikian pula uji keamanan pada anak tikus umur 5 sampai 7 hari, tidak terdapat kematian dari anak-anak tikus tersebut; yang menandakan antigen EBL ini aman untuk digunakan. Pada pembuatan serum referen digunakan hewan kelinci, sesuai dengan pernyataan *Harlow and Lane*, 1988 yang menyatakan bahwa untuk mendapatkan serum referen yang baik digunakan hewan kelinci; karena faktor *suceptibility*. Selain itu dosis yang digunakan harus tepat yaitu 4 ml. Campuran 2 ml virus EBL galur lokal ditambah 2 ml *Freund adjuvant*, disuntikkan pada 6 tempat di daerah punggung kelinci secara Sub kutan. Pemberian dosis yang tepat untuk menghindari terjadinya imunotoleran (bila dosis terlalu kecil) atau *imunosupresif* (bila dosis terlalu besar). Penambahan *adjuvant* di dalam virus EBL pada penyuntikan kelinci, akan mempertinggi produksi antibodi.

Untuk mendiagnosis penyakit EBL menurut *Miller et al.* (1976), dapat dilakukan immunodiagnosis dengan uji *ouchterlony* dan inipun sama seperti yang dikerjakan peneliti yang terdahulu. Dimana hasil dari uji *ouchterlony* pada kedua Perangkat antigen EBL galur lokal dan perangkat antigen EBL produk IAF Canada ini tidak berbeda yaitu 1 ekor positif EBL (1,25%) dengan terbentuknya garis preipitasi berarti terjadi keseimbangan antigen dan antibodi spesifik ; 79 ekor negatif (98,75%). Hal ini sesuai dengan perjanjian yang telah disepakati pada konferensi

penyakit EBL di Copenhagen tahun 1979, bahwa untuk diagnosis penyakit EBL adalah dengan menggunakan immunodiagnosis melalui uji *ouchterlony* dengan melihat adanya garis presipitasi (Miller et al., 1976; Trainin et al., 1990).

Pada uji *ouchterlony* yang diencerkan 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; dan 1:32; didapat hasil positif sampai dengan pengenceran 1 : 32, yang berarti untuk penggunaan antigen dapat diencerkan 1 bagian antigen ditambah dengan 32 bagian PBS⁺. Pengenceran hanya sampai 1/32 karena pada pengenceran tersebut sudah memenuhi persyaratan, sesuai pernyataan Martin 1978 dan Suguira 1982, dalam menggunakan antigen sebaiknya diencerkan pada kisaran perbandingan 1 : 8 sampai 1 : 32; untuk mencegah terjadinya ketidakseimbangan antigen dan antibodi pada uji *ouchterlony*. Hasil uji stabilisasi antigen EBL galur lokal yang ditempatkan pada temperatur kamar (25°C - 30°C) pada 1, 2, 3, dan 4 minggu, masih stabil karena sesuai pernyataan Miller et al., (1976) bahwa virus EBL masih tahan hidup pada temperatur 30°C.

Hasil sensitivitas dan spesifisitas adalah 97,50 %, berarti penelitian ini mempunyai nilai sensitiv dan spesifik yang baik. Perangkat antigen EBL galur lokal yang tidak berbeda dengan perangkat antigen EBL produk IAF Kanada sependapat dengan Onuma dan Olson (1981).

BAB VI
SIMPULAN DAN SARAN

6.1. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan simpulan yang diambil adalah sebagai berikut.

1. Perangkat antigen EBL galur lokal dan produk IAF Kanada berdasarkan uji presipitasi yang menggunakan serum sapi potong hasilnya tidak berbeda nyata.
2. Hasil uji sensitivitas yang menggunakan serum sapi potong antara perangkat antigen EBL galur lokal tidak berbeda nyata dengan produk IAF Kanada.
3. Hasil uji spesifisitas yang menggunakan serum sapi potong antara perangkat antigen EBL galur lokal tidak berbeda nyata dengan produk IAF Kanada.

6.2. Saran

Berdasarkan simpulan tersebut saran yang perlu disampaikan adalah sebagai berikut.

1. Untuk diagnosis dini penyakit EBL di Indonesia hendaknya digunakan perangkat antigen EBL galur lokal.



DAFTAR PUSTAKA

- Dit. Keswan. 1998. Pengendalian Penyakit Hewan Menular. Dit. Jen. Peternakan, Jakarta.
- Burke, C.N. and M. Rovoza. 1983. Manual Basic Virological Techniques. Prentice Hall Inc., New York.
- Burny, A. and M. Mamerick. 1987. Enzootic Bovine Leucosis and Bovine Leucosis Virus. Martinus Publlusing, Boston.
- Djafar, M. 1985. Pemeriksaan Enzootic Bovine Leucosis Dengan Metode Agar Cell Diffusin. Informasi Penyakit Hewan, 1 : 3-9.
- Ferrer, J.F., L. Avila, C. Cabradilla and P. Gupta. 1976. Development of In Vitro Infectivity Assay for the C Type Bovine Leucosis Virus. Can. Res. 36 : 1069-1073.
- Harlow, E.D. and D. Lane. Antibodies a laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory, London.
- Ishino, S., S. Itohara, Y. Kono and H. Sentsui. 1988. Experimental Infection of Bovine Leucosis Virus in Small Laboratory Animal. J. Vet. Sci. 50 : 1245-1251.
- Johan, P. 1975. Cell and Tissue Culture. 5rd ed. Churcill Publishing, London.
- Miller, J.M., M.J. Maaten and D.A. Boothe. 1976. Serologic Detection of Bovine Leucosis Infection. Vet. Mic. 20 : 195-202.
- Miller, J.M. and M.J. Maaten. 1979. Infectivity Test of Secretions and Exretion from Cattle Infected with Bovine Leucosis Virus. Vet. Mic. 30 : 425-428.
- Nakajima, H., S. Inumaru and T. Sugiura. 1985. Immunodiffusion Studies in Bovine Leucosis Virus. Jpn. J. Vet. Sci. 50 : 136-203.
- Onuma, M. and C. Olson. 1981. Goat Lymphosarcoma from Bovine Leucemia Virus. J.N.C. Inst. 10 : 671-675.
- Paffanovich, V. and A. A. Lazarenko and E.M. Nommiyu. 1983. The Possibility of Specific Protection Against Bovine

- Leukemia Virus Infection Bovine Leukemia with Inactivated BLV. J. Br. Vet 39 : 137-146.
- Ressang, A.A., N. Mastenbroek and J. Quak. 1986. Penyakit Viral pada Hewan Mamalia Yang Penting di Indonesia. Penerbit Universiats Indonesia, Jakarta.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1984. Principles and Procedures of Statistics : A Biometrical Approach. 2nd ed. McGraw-Hill International Book Co., Singapore.
- Trainin, Z., S. Bernstein and J. Berner. 1990. The Fat Content of Milk from Dairy Cattle Infected with Bovine Leucosis J. Vet. Res. 14 : 167-171.
- Trudel, M. and P. Payment. 1990. Concentration and Purification of Viruses by Molecular Filtration and Ultracentrifugation Method. J. Vet. Sci. 34 : 436-448.

Lampiran 1. Uji χ^2 Presipitasi Perangkat Antigen EBL Galur Lokal
Dan EBL IAF Kanada

----- CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS -----
ED VALUES (Cell format: count/ percent:total/ percent:row/ percent:col)

| | LOKAL | KANADA | TOTAL |
|-------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|
| TIF | 1 1.25 50.00 2.50 | 1 1.25 50.00 2.50 | 2 2.50 |
| TIF | 39 48.75 50.00 97.50 | 39 48.75 50.00 97.50 | 78 97.50 |
| TOTAL | 40 50.00 | 40 50.00 | 80 100.00 |

SQUARE WITH CONTINUITY CORRECTION FACTOR = .513, PROB.= .4739

SQUARE WITHOUT CONTINUITY CORRECTION FACTOR = .000, PROB.=1.0000

. = 1

21 SEP 2003

PAMERAN

1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025

2003 SEP 1

WASHINGTON

