

BAB III

MATERI DAN METODE

Pengambilan contoh sera yang berupa sera darah domba dan sera darah kambing dilakukan di Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Kotamadya Surabaya. Pemeriksaan contoh sera secara serologis dengan metode uji hemaglutinasi tak langsung (IHA) yang dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 1987 dan selsai pada bulan Desember 1987 yang meliputi pengumpulan dan pemeriksaan contoh sera darah domba dan kambing.

3.1. Materi Penelitian

3.1.1. Bahan Penelitian.

Sera darah (30 sera darah domba dan 30 sera darah kambing), kit Toxoplasmosis buatan Behring (berisi : antigen Tox-IHA, reagensia kontrol, larutan bufer pH 8,1 dan serum positif serta negatif), aquadest, Na Cl 0,85 % , trophozoite Toxoplasmosis, Citras Natrikuas, alkohol 96 % 200cc, Jodium tincture, 50 sera mencit.

3.1.2. Peralatan Penelitian.

Alat sentrifus, dan ultra sentrifus, tabung reaksi 10 CmX10mm steril dengan tutup karet,

spuit disposable 5 ml, spuit tuberkulin, mikroplate bentuk V, mikroskop, obyek glass, tissue, kapas, pipet eppendorf, pipet drop - per 25 ul, pipet pasteur, mikrodiluter 25 ul penangas air, termometer Celcius, termos es, microshacker, freezer, api bunsen, kaca pembesar.

3.2. Metode kerja

Contoh sera domba dan kambing dalam penelitian ini diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Kotamadya Surabaya dan dikumpulkan secara acak Sistematis (Budiar to, 1984), selanjutnya diperiksa secara serologis dengan menggunakan metode uji hemaglutinasi tak langsung (IH A) dengan teknik mikrotiter modifikasi Behring Institute (Anonymous, 1985). Metode uji ini mempunyai prinsip : bila serum darah yang diperiksa mengandung I_g antibodi T.gondii ditambahkan sel darah merah yang telah dilapisi dan disensitisasi dengan antigen T. gondii akan terjadi hemaglutinasi (Jacobs and Lunde, 1957 ; Nation and Allen, 1976).

Beberapa peneliti menetapkan sera positif antibodi T. gondii dengan menggunakan uji hemaglutinasi tidak langsung yang dicapai pada pengenceran 1:64 Frenti. et. al (1976) yang melakukan sigi pada hewan domestik dan hewan liar di California dengan menggunakan uji hemaglutinasi tidak langsung. Seropositif dicapai pada pengenceran 1:64.

Kemudian Parenti et. al. (1986) telah melakukan pemerik-
saan dengan menggunakan uji hemaglutinasi tak langsung
dengan seropositif 1:64 terhadap beberapa jenis burung yang
terserang T. gondii secara spontaneus.

Pengambilan sampel darah domba dan kambing dari vena
yugularis, dipisahkan serumnya dengan sentrifus, serum di-
tempatkan pada tabung disimpan pada freezer -20°C . Sebelum
dilakukan pemeriksaan serum diinkubasi pada suhu 56°C sela
ma 30 menit. Di dalam contoh sera metode yang akan diguna-
kan untuk pemeriksaan adalah pemeriksaan secara kualitatif
dan pemeriksaan secara kuantitatif.

3.2.1. Pemeriksaan secara kualitatif (Screening test).

- Buffer pH 8,1 dimasukkan sebanyak 75 ul pada sumur
1, sedang sumur 4 sampai 6 diisi masing-masing 25ul.
- serum sampel dipipet sebanyak 25 ul masuk sumur 1
aduk dan dipindahkan sebanyak 25 ul pada sumur 2,
3,4. Pada sumur 4 aduk dan dipindahkan pada sumur
5 dari sumur 5 pindah ke sumur 6 sebanyak 25 ul dan
dari sumur 6 dibuang sebanyak 25 ul.
- reagensia kontrol dikocok dan diambil sebanyak 25
ul lalu dimasukkan pada sumur 2.
- reagensia Tox-IHA dipipet sebanyak 25 ul dimasuk-
kan pada tiap sumur 3 sampai 6.
- microplate digoyang secara manual atau dengan
menggunakan microshaker.

- microplate ditutup dengan obyek glass dan dibiarkan selama 2 - 3 jam pada suhu kamar, diusahakan bebas getaran dan dilindungi terhadap sinar.
- reaksi positif ditandai dengan adanya aglutinasi.

Skema 1 : Pemeriksaan kualitas serum PERPUSTAKAAN UNIVERISTAS AIRLANGGA

Lubang (Sumur)		1	2	3	4	5	6
Larutan Buffer	ul	75	-	-	25	25	25
Serum sampel	ul	25					
		25ul					
		25ul					
		25ul					BUANG
Reagensia Kontrol	ul	-	25	-	-	-	-
Reagensia Tox - IHA	ul	-	-	25	25	25	25
Pengenceran serum		1:4	1:8	1:8	1:16	1:32	1:64

3.2.2. Pemeriksaan kuantitatif.

- larutan buffer pH 8,1 dipipet sebanyak 75 ul dan dimasukkan ke dalam sumur 1, sedangkan pada sumur 4 sampai 12 masing-masing diisi dengan 25 ul.
- serum sampel yang positif pada pemeriksaan kuantitatif dipipet sebanyak 25 ul dan dimasukkan ke dalam sumur 1, aduk sampai merata, dipindahkan ke sumur 2,3 dan 4 masing-masing 25 ul, kemudian dari sumur 4 dipindahkan sebanyak 25 ul, ke sumur 5, begitu seterusnya sampai pada sumur 12. Dari sumur 12 diambil sebanyak 25 ul dan dibuang.
- reagensia kontrol dikocok dan dipipet sebanyak 25 ul, kemudian dimasukkan pada sumur 2.
- reagensia Tox-IHA dikocok dan dipipet sebanyak 25 ul, kemudian dimasukkan pada tiap-tiap sumur 3 sampai 12.
- microplate digoyang secara manual atau dengan menggunakan microshaker.
- microplate ditutup dengan obyek glass dan dibiarkan selama 2 - 3 jam pada suhu kamar, bebas getaran dan dilindungi terhadap sinar.
- reaksi positif ditandai dengan adanya aglutinasi.

Skema 2 : Pemeriksaan Kuantitatif

Lubang (Sumur)	: 1	: 2	: 3	: 4	: 5	: 6	: 7	: 8	: 9	: 10	: 11	: 12
Larutan Buffer	ul: 75	: -	: -	: 25	: 25	: 25	: 25	: 25	: 25	: 25	: 25	: 25
Serum sampel	ul: 25	: 1	: 1	: 1	: 1	: 1	: 1	: 1	: 1	: 1	: 1	: 1
	25ul			25ul	25ul	25ul	25ul	25ul	25ul	25ul	25ul	25ul
	25ul											buang
Reagensia Kontrol	ul: -	: 25	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -	: -
Reagensia Tox-IHA	ul: -	: -	: 25	: 25	: 25	: 25	: 25	: 25	: 25	: 25	: 25	: 25
Pengenceran serum	: 1:4		1:8	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
												1:4096

3.2.3. Pembacaan dan Evaluasi Hasil Pemeriksaan

Sebagai pembacaan dan mengevaluasi pola sedimentasi maka, dibagian bawah microplate diletakkan cermin dengan arah pandangan yang tepat. Apabila pembacaan dilakukan dari atas, maka bagian dasar diberi warna yang putih guna memperjelas pembacaan.

Kriterianya sebagai berikut :

- Reaksi positif : bila lapisan aglutinasi didistribusikan secara merata pada seluruh bagian dasar sumur, kadang-kadang tepi berlekuk atau aglutinasi berkerut.
(kuat)
- Reaksi positif : bila lapisan aglutinasi hanya sebagian dari dasar sumur.
(sedang)
- Reaksi positif : bila adanya aglutinasi yang terbatas cincin merah, dan aglutinasi 50%.
(lemah)
- Reaksi negatif : adanya bentuk cincin yang jelas dan tidak ada lapisan aglutinasi
(lemah)
- Reaksi negatif : bila dijumpai adanya bentuk cincin dengan tepi halus atau cincin merah kecil dan tidak ditemukan adanya lapisan aglutinasi.
(kuat)

3.2.4. Pembuatan Bahan Antigen Lokal (Jacob and Lunde, 1957).

Pertama kali yang dilakukan yaitu : mencit disuntik dengan tropozoit Toxoplasmosis secara intraperitoneal, kemudian setelah 3 - 4 hari diambil eksudat peritonealnya dan dimasukkan dalam tabung. Tabung tersebut disentrifus sehingga didapatkan adanya presipitasi dan supernatan, supernatannya dibuang tinggal presipitasi (endapan). Pada endapan ditambah larutan NaCl 0,85% kemudian disentrifus lagi , didapatkan endapan dan supernatannya dibuang. Kemudian endapan ditambah dengan NaCl 0,85%, kemudian disentrifus lagi, supernatannya dibuang dan endapannya ditambah lagi dengan NaCl 0,85% yang ke tiga kalinya dan disentrifus lagi, supernatannya dibuang. Endapan yang terakhir ditambah dengan aquadestilata dengan volume 10 X volume endapan, kemudian dilarutkan, dikocok dan setelah itu dimasukkan dalam almari es pada suhu 4^oC selama 24 jam. Setelah itu disentrifus dengan kecepatan 15.000 G selama 60 menit, kemudian supernatannya dipisahkan dan ditambah dengan NaCl 1,7% sebanyak dua kali volume supernatan tersebut, suspensi terakhir ini digunakan untuk pemeriksaan uji hemaglutinasi tidak langsung (IHA) (Jacob and Lunde, 1957).

3.2.5. Cara Pemeriksaan Toxoplasmosis

Mencit disuntik trophozoit Toxoplasma secara intra - peritoneal dan ditunggu selama 4 hari. Setelah 4 hari mencit tersebut disuntik dengan larutan NaCl 0,85% sebanyak 1-3 cc pada daerah peritonealnya, kemudian eksudat peritoneal diambil. Eksudat dari peritoneal tadi diambil satu tetes dan diteteskan pada obyek glass kemudian dilihat di bawah mikroskop.

3.2.6. Metode Persiapan Sensitisasi Sel Dengan Antigen.

Darah biri-biri diambil dari vena yugularis, kemudian ditambah dengan Citras Natricus dan dicuci dengan NaCl 0,85% sebanyak 3 kali, sehingga didapatkan sel darah merah yang bersih. 1 ml sel darah merah yang bersih ditambah 30-50 ml Phospat Buffer Saline (PBS) pH 7,2 , kemudian sel darah merah yang diencerkan tersebut di atas dicampur dengan campuran asam tanin dengan konsentrasi 1 : 20.000 dengan jumlah yang sama. Campuran ini diinkubasi dalam penangas air pada temperatur 37°C selama 15 menit dan setelah itu disentrifus, kemudian dicuci dengan NaCl 0,85% kemudian sel darah merah diencerkan dalam saline tanpa buffer dan disensitisasi dengan antigen pada pH 6,4 dalam bentuk campuran sebagai berikut : 4 ml PBS pH 6,4 + 1 ml antigen dalam saline + 1 ml sel darah merah yang sudah disensitisasi dengan asam tanin.

Campuran ini disimpan dalam temperatur kamar selama 15 menit, lalu sel darah merahnya dipisahkan dengan sentrifus dan dicuci endapannya dengan 2ml 1 : 100 Normal Rabbit Serum (NRS) dan diencerkan endapannya dengan saline.

3.3. Kegunaan Diagnostik

Reaksi positif pada pengenceran serum 1:64 adalah mempunyai nilai diagnostik yang signifikan. Titer antibodi dapat menunjukkan suatu infeksi *Toxoplasma* stadium kronis maupun stadium akut. Jika suatu infeksi diduga terjadi secara akut, maka diagnosa serologis dengan menunjukkan suatu titer yang meningkat.

3.4. Analisa Data

- Sampel diambil secara bertahap (Stratified random sampling).
- Untuk menguji hipotesis nol (H_0) yang berarti berbunyi tidak ada perbedaan prevalensi antibodi *Toxoplasma gondii* antara domba dengan menggunakan antigen komersial dan antigen lokal, antara kambing dengan menggunakan antigen komersial dan antigen lokal dan antara domba dengan kambing, maka digunakan analisa statistik dengan uji Chi-Kuadrat (Steel and Torie, 1980 ; Budiarto, 1984).

Rumus Chi-Kuadrat (X^2)

$$X^2 = \frac{(n_{11} \cdot n_{22} - n_{12} \cdot n_{21})^2 \cdot n_{..}}{n_1 \cdot n_2 \cdot n_{.1} \cdot n_{.2}}$$

Bila derajat bebas = 1 dan frekuensi pengamatan salah satu sel kurang dari lima, maka digunakan rumus :

$$X^2 = \frac{(|n_{11} \cdot n_{22} - n_{12} \cdot n_{21}| - 0,5 n_{..})^2 \cdot n_{..}}{n_1 \cdot n_2 \cdot n_{.1} \cdot n_{.2}}$$

Keterangan :

n_{11} = frekwensi baris 1 dan kolom ke 1

$n_{1.}$ = jumlah frekwensi baris ke 1

$n_{.1}$ = jumlah frekwensi kolom ke 1

$n_{..}$ = jumlah frekwensi total

Kriteria penilaian uji hipotesa

Hipotesa nol (H_0) : tidak ada perbedaan

Hipotesa alternatif (H_1) : ada perbedaan

Derajat bebas (db) : (baris - 1)(kolom - 1)

Bila $X^2_{hit} > X^2_{\alpha} = 5\% (1)$, maka H_0 diterima

Bila $X^2_{hit} < X^2_{\alpha} = 5\% (1)$, maka H_1 diterima

Harga rata-rata titer positif antibodi T. gondii diperoleh dengan cara merubah titer ke bentuk log dasar 2, kemudian dikalikan frekuensi contoh sera positif. Hasil bagi jumlah perkalian tersebut dengan jumlah fre -

kuensi contoh sera positif dimasukkan dalam daftar Brugh pada lampiran 12 (Brugh, 1978). Pengujian hipotesis yang berbunyi tidak ada perbedaan harga rata-rata titer positif antibodi T. gondii antara domba dengan kambing digunakan analisa statistik metode Student's t (Steel and Torrie, 1980 ; Sudjana, 1982 ; Budiarto, 1984).

Rumus Student's t :

$$t' = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{(s_1^2/n_1) + (s_2^2/n_2)}}$$

$$s_1^2 = \frac{\sum x_1^2 - (\sum x_1)^2/n_1}{n_1 - 1}$$

$$s_2^2 = \frac{\sum x_2^2 - (\sum x_2)^2/n_2}{n_2 - 1}$$

Kriteria penilaian uji hipotesis

Hipotesa nol (H_0) : tidak ada perbedaan, diterima bila :

$$-t_{\alpha=5\%} < t' < t_{\alpha=5\%}$$

Hipotesa alternatif (H_1) : ada perbedaan, diterima bila :

$$t' > t_{\alpha=5\%}$$

$$t' < -t_{\alpha=5\%}$$

$$t_{\alpha=5\%} = \frac{w_1 t_1 + w_2 t_2}{w_1 + w_2}$$

Keterangan :

x = contoh

\bar{x} = rata-rata contoh

S = simpangan baku contoh

n = jumlah contoh

$$w_1 = s_1^2/n_1$$

$$w_2 = s_2^2/n_2$$

t_1 = t dalam tabel = 5% dan db = $n_1 - 1$

t_2 = t dalam tabel = 5% dan db = $n_2 - 1$

db = derajat bebas.