

TESIS

**STUDI PERBANDINGAN PEMBUATAN DAN PENGGUNAAN
PERANGKAT (KIT) Antigen Enzootic Bovine Leucosis galur lokal
DENGAN (KIT) Bovileuko Test Produk IAF Canada
UNTUK UJI LEUKEMIA PADA SAPI POTONG**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



HASDIANAH HASAN ROHAN

NIM. 099813095-M

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

SURABAYA

2000

**STUDI PERBANDINGAN PEMBUATAN DAN PENGGUNAAN
PERANGKAT ANTIGEN *EBL* GALUR LOKAL DENGAN
PERANGKAT PRODUK IAF CANADA**

TESIS

UNTUK MEMPEROLEH GELAR MAGISTER DALAM PROGRAM STUDI
IMUNOLOGI PADA PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA



OLEH:

HASDIANAH HASAN ROHAN

NIM. 099813095 – M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA**

2000

i

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI DAN DIUJIKAN
Tanggal, 18 Juli 2000

Pembimbing Utama



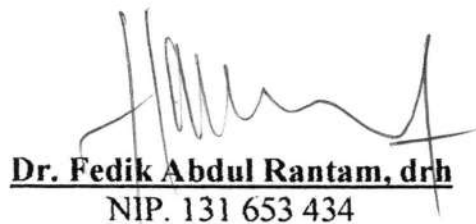
Prof. Atasiati Idajadi, dr, Sp. MK
NIP. 130 128 215

Pembimbing



Dr. Sarmanu, MS, drh
NIP. 130 701 125

Mengetahui
Ketua Program Studi Imunologi Program Pascasarjana
Universitas Airlangga

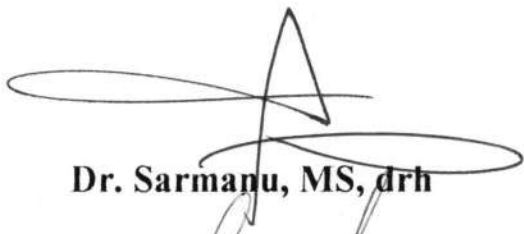


Dr. Fedik Abdul Rantam, drh
NIP. 131 653 434

PANITIA PENGUJIAN TESIS


Ketua : **Prof. Dr. Yoes Priyatna Dachlan, dr, MSc.**


Anggota : **Prof. Atasiati Idajadi, dr, Sp. MK**


Dr. Sarmanu, MS, drh


Prof. Amitaba, drh


Dr. Fedik, A. Rantam, drh

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan ucapan puji syukur kehadirat Allah Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas segala berkah dan karuniaNya, Program Pendidikan Magister Ilmu Immunologi di Universitas Airlangga Surabaya, telah dapat saya jalani dan diakhiri dengan selesainya membuat tesis ini. Oleh karena itu perkenankanlah saya pada kesempatan ini menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih dengan hormat dan tulus kepada :

- Prof. Atasiati Idajadi, dr, Sp.MK, selaku Pembimbing Utama yang dengan tekun dan penuh semangat telah mendidik, membimbing serta mengarahkan dan memberi saran yang berharga mulai dari proposal sampai terselesainya tesis ini.
- Dr. Sarmanu, MS,Drh, selaku Pembimbing yang dengan penuh perhatian memberi motivasi, bimbingan, saran demi sempurnanya penyusunan mulai dari proposal sampai selesainya tesis ini.
- Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh, sebagai Ketua Program Studi Immunologi, atas pengarahan dan petunjuk yang diberikan hingga saya dapat menyelesaikan pendidikan Program Magister.

- Bapak Moh Noer Mantan Gubernur Surabaya, sebagai Ketua Yayasan Aji Dharma Bakti Indonesia dan Kepada Yayasan Aji Dharma Bakti Indonesia serta Bapak Dr. Lucas, dr, yang telah memberikan dorongan dan motivasi dalam pencarian dana serta berhasilnya mendapatkan dana Bea Siswa guna penyelesaian Pendidikan Program Magister.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya tujukan kepada

- Pemerintah Republik Indonesia c.q. Menteri Pendidikan dan Kebudayaan RI atas kesempatan mengikuti Pendidikan Program Magister di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Rektor Universitas Airlangga Prof. H. Soedarto, dr, DTM&H.PhD, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Pendidikan Program Pascasarjana.
- Prof. Dr. H. Soedijono, dr, selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, yang telah memberi ijin kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Pascasarjana.
- Drh. Syamsul Bahri Siregar, MSc, selaku Kepala Pusat Veterinaria Farma yang telah memberikan ijin kepada saya untuk mengikuti

Pendidikan Program Magister di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya tujukan kepada :

- Drh. Enuh Raharjo Jusa, MSc, PhD, selaku Kepala Bidang Peningkatan Mutu dan Pengembangan Produksi (PMPP) Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) sebagai atasan langsung saya telah memberi ijin untuk mengadakan penelitian di Lab. PMPP dan meneruskan pendidikan di Program Pendidikan Pascasarjana.
- Sdr. Ganis Basuki S, Sdr. Setu dan Sdr. Jaidi, asisten Bidang PMPP yang telah membantu saya dalam pelaksanaan penelitian ini dari awal hingga selesai.
- Teman-teman sejawat di Lab. PMPP khususnya dan PUSVETMA umumnya yang telah membantu saya dalam banyak hal dan menggantikan tugas-tugas saya selama pendidikan ini.

Akhirnya ucapan terima kasih kepada Bapak Kepala BIB Lembang BIB Cipelang serta Bapak Drh. Irtisam, Mkes, serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu dan telah memberi bantuan selama pengambilan sampel di Jawa Barat serta mendapatkan serum dari Gianyar Bali.

Tesis ini kupersembahkan kepada Almamaterku dan mereka yang kucintai mas Rohan, Ananda Jannah Shanti Rohana, Irine Rakhmanty Rohana dan Dian Alief Rahmandani, atas do'a, dorongan moril, kesabaran, pengertian, keikhlasan dan pengorbanan yang diberikan mulai dari awal Pendidikan Program Magister hingga selesainya Tesis ini, serta pada Ibu dan Ayah tercinta atas do'a yang tulus yang diberikan kepada ananda agar dapat menyelesaikan Pendidikan Program Magister.

Akhirnya dengan penuh keikhlasan, penulis hanya dapat memohon do'a kepada Allah Yang Maha Pengasih dan Penyayang, semoga melimpahkan segala berkah dan karuniaNya kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan Pendidikan Program Magister ini. Amien.

RINGKASAN

Penelitian ini diadakan untuk mengkaji perbandingan dari pembuatan dan penggunaan Perangkat antigen *EBL* galur lokal dengan Perangkat antigen *EBL* produksi IAF Canada ; melalui uji *ouchterlony* dengan melihat adanya garis presipitasi; uji sensitivitas; dan uji spesifisitas. Dalam hal ini bertujuan untuk memudahkan cara mendapatkan Perangkat antigen *EBL* . Selama ini Perangkat antigen *EBL* didapat dengan jalan meng *import* dari luar negeri, dengan harga yang cukup mahal dan memakan waktu yang lama untuk sampai ke tempat tujuan. Terkadang sapi sudah banyak yang mati, Perangkat antigen *EBL* belum juga datang. Penyakit *EBL* yang persisten, ganas, dan menular cepat, serta menyebabkan kerugian ekonomi yang cukup tinggi. Sampai saat ini belum ditemukan vaksin maupun pengobatannya. Satu-satunya cara untuk mencegah penularan penyakit dan letupan wabah adalah dengan Karantina ketat dan *Scrinig* melalui diagnosis dini menggunakan Perangkat antigen *EBL*.

Perangkat antigen *EBL* terdiri dari 1 vial antigen *EBL* sebanyak 3 ml, 1 vial serum referen sebanyak 10 ml, 1 vial serum kontrol positif, 1 vial serum kontrol positif lemah, dan 1 vial serum kontrol negatif; masing-masing sebanyak 1 ml. Dalam satu kotak Perangkat antigen *EBL* ini dilengkapi pula dengan pelarut yaitu PBS⁽⁺⁾ sebanyak 20 ml serta agar untuk uji *ouchterlony* sebanyak 100 ml.

Jenis penelitian yang digunakan untuk membandingkan Perangkat antigen *EBL* galur lokal dan produk IAF Canada adalah percobaan sungguhan (*true experiment*). Penelitian ini bersifat observasional komparatif. Pola ini terdiri dari tiga faktor yaitu : faktor presipitasi dengan uji *ouchterlony*, faktor sensitivitas dengan uji *SN test* , serta faktor spesifisitas antara ikatan antigen dan antibodi spesifik.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa Perangkat antigen *EBL* galur lokal tidak berbeda dengan Perangkat antigen *EBL* produk IAF Canada; dalam hasil pengujian pada 80 serum sapi lapangan yang diperoleh dari BIB Lembang, BIB Cipelang, serta serum sapi dari Gianyar Bali. Didapat hasil tidak berbeda pada uji *ouchterlony*, presipitasi positif satu ekor (1,25 %) dan negatif 79 ekor (98,75 %). Hasil sensitivitas adalah 98,75 % serta spesifisitas 98,75 %.

Dalam hal ini disimpulkan bahwa Perangkat antigen *EBL* galur lokal tidak berbeda dengan Perangkat antigen *EBL* produk IAF Canada. Sehingga Perangkat antigen *EBL* galur lokal dapat digunakan untuk diagnosis dini penyakit *EBL* di Indonesia khususnya. Dalam hal ini sangat membantu petani peternak untuk meningkatkan produksi peternak sapi; terutama membantu program pemerintah dalam hal pencegahan pencegahan perluasan penyakit *EBL* dan letupan wabah, sehingga dapat mencegah kerugian ekonomi yang cukup tinggi.

Untuk penelitian selanjutnya, sebaiknya diadakan penelitian pembuatan vaksin *EBL* dari sub unit protein *EBL*, yaitu glykoprotein 60 (Gp 60) galur lokal.

ABSTRACT

Enzootic Bovine Leucosis (*EBL*) or cattle leucemia, or Bovine Lymphocytomatosis is a progressive and fatal disease in cattle. It is caused by **Retrovirus C** particle and not to be zoonotic. The disease is very contagious in cattle and buffalo through insect bite and individual contact. Infection may be sub clinical. Usually incubation period of on average half years, about 70-95% of diseased animals will die ; causing high economic losses.

The therapy for the disease has not been found yet. But for preventive action may conduct strict quarantine procedure, do not import cattle from infected area and doing prompt diagnosis.

The diseases may be recognized from clinical signs, serological test using agar gel immunodiffusion (AGID), Complement fixation test (CFT) and the blood pathology picture. Immuno Diagnostic test of AGID gel Immunodiffusion is the most frequent method to be done.

Because of the difficulties in getting *EBL*, kit antigen, an effort will be done to get the antigen kit. It is hoped that the disease can be prevented as early as possible.

The formulation for antigen kit *EBL*, was made by inoculating *EBL* virus in ovine lung cells, vero cells or foetal kidney lamb cells to produce control positive serum and weak control positive serum *EBL* virus was inoculated in to rabbit to produce reference serum, and the negative serum was taken from a healthy sheep. (Antigen kit *EBL* kit is kept in one box containing antigen, positive control serum, weak positive control serum, negative control serum, reference serum and diluent)

Key words : Virus *EBL*.
Sel OL
Uji Ouchterlony (AGID)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PANITIA PENGUJI TESIS.....	ii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
RINGKASAN	viii
ABSTRAK.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah	8
1.3. Tujuan Penelitian.....	8
1.3.1. Tujuan Umum.....	8
1.3.2. Tujuan Khusus.....	9
1.4. Manfaat Penelitian.....	9
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1. Sejarah Perkembangan Imunologi.....	11
2.2. Dasar-dasar Imunokimia.....	12

2.2.1. Interaksi antigen – antibodi <i>in vitro</i>	12
2.2.2. Epitop, Spesifisitas dan Sensitivitas	14
2.3. Imunogen dan Antibodi	16
2.4. Immunopresipitasi	19
2.5. Virus <i>Enzootic Bovine Leukosis</i> (V. EBL)	22
2.6. Pengembangan Sel	23
2.7. Pengembangan Virus EBL galur lokal	23
2.8. Inaktivasi	26
2.9. Pemurnian Virus	26
2.10. Pembuatan anti serum, serum referen dan serum kontrol .	27
2.11. Uji Imuno Diagnostik	28
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	32
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	32
3.2. Hipotesis Penelitian	34
BAB 4 METODE PENELITIAN	35
4.1. Jenis Penelitian	35
4.2. Populasi, Sampel, dan Besar Sampel	37
4.2.1. Populasi	37
4.2.2. Sampel	37
4.2.2.1. Unit Sampel	37
4.2.2.2. Besar Sampel	38
4.2.2.3. Prosedur Pengambilan Sampel	39

4.3. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional.....	39
4.3.1. Identifikasi.....	39
4.3.2. Definisi Operasional.....	40
4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	41
4.4.1. Lokasi Penelitian.....	41
4.4.2. Waktu Penelitian.....	42
4.5. Bahan.....	42
4.5.1. Virus.....	42
4.5.2. Sel (Biakan Jaringan).....	42
4.5.3. Media.....	42
4.5.4. Hewan Percobaan.....	43
4.5.5. Agar difusi.....	43
4.6. Alat.....	43
4.7. Kandang Hewan Percobaan.....	44
4.8. Cara Kerja.....	44
4.8.1. Pengembangan Sel.....	44
4.8.2. Pengembangan Virus.....	44
4.8.3. Pembuatan Serum Referen.....	45
4.8.4. Pembuatan Serum Kontrol dan Serum Negatif.....	47
4.8.5. Pembuatan Pengencer Buffer.....	47
4.8.6. Pembuatan Agar Difusi.....	47
4.8.7. Uji Presipitasi.....	47

4.8.8. Pembotolan	48
4.8.9. Proses Kering Beku	48
4.8.10. Penutupan <i>Vial</i>	48
4.9. Pengujian	49
4.9.1. Uji Sterilitas	49
4.9.2. Uji Keamanan	49
4.9.3. Uji Stabilitas	50
4.9.4. Prosedur Pengumpulan Data	50
4.9.5. Metode Analisa Data	50
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA	51
5.1. Hasil Penelitian	52
5.1.1. Isolasi dan Uji Postulat Koch	52
5.1.2. Hasil Titrasi Virus <i>EBL</i>	53
5.1.3. Hasil Titer Antibodi pada Biakan Jaringan OL	54
5.1.4. Hasil <i>innocuity test</i>	55
5.1.5. Hasil Uji <i>Ouchterlony Antigen EBL</i>	56
5.1.6. Hasil Uji Stabilitas	57
5.2. Analisa Data	58
BAB 6 PEMBAHASAN	59
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	65
7.1. Kesimpulan	65
7.2. Saran	65
DAFTAR PUSTAKA	66

LAMPIRAN 1 : RENCANA LIFLET	75
LAMPIRAN 2 : BAHAN AGAR DIFUSI	78
LAMPIRAN 3 : PERSIAPAN ELEKTROFHORESIS	79
LAMPIRAN 4 : LIFLET KIT BOVINE LEUKEMIA GP 60 (USA).....	82
LAMPIRAN 5 : LIFLET KIT BOVINE LEUKEMIA AGID (PERANCIS)....	83
LAMPIRAN 6 : BOVILEUKO TEST (CANADA)	84
LAMPIRAN 7 : POPULASI TERNAK SAPI POTONG DAN PRODUKSI DAGING 1997	89
LAMPIRAN 8 : DATA HASIL UJI SENSITIVITAS	90
LAMPIRAN 9 : DATA HASIL UJI SPESIFISITAS	93
LAMPIRAN 10 : DATA PENYAKIT SAPI POTONG	96
LAMPIRAN 11 : DAFTAR RINCIAN HARGA PERANGKAT ANTIGEN <i>EBL</i> GALUR LOKAL	97
LAMPIRAN 12 : DAFTAR RINCIAN HARGA PERANGKAT ANTIGEN <i>EBL</i> IAF CANADA	100
LAMPIRAN 13 : HASIL UJI <i>EBL</i> SAPI POTONG JAWA TENGAH 1998...	101
LAMPIRAN 14 : LAPORAN PENYAKIT <i>EBL</i> DI PULAU JAWA DAN MADURA TAHUN 1988,1989, 1990, 1991, 1992 DAN 1999	102
LAMPIRAN 15 : HASIL ANALISIS DATA	103

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1 Media Eagle Overlay	24
Tabel 2 Media RPMI.....	47
Tabel 3 Pemilihan Hewan	30
Tabel 4 Imunogen dan Dosis yang dianjurkan.....	30
Tabel 5 Pengencer Buffer.....	31
Tabel 6 Hasil Uji Sensitivitas.....	89
Tabel 7 Hasil Uji Presipitasi	92
Tabel 8 Hasil Analisis Data	95

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1 : Kurve Immunopresipitasi.....	25
Gambar 2 : Tahap-tahap Perkembangan Virus Onkorna.....	73
Gambar 3 : Virus Onkorna Tipe C.....	74
Gambar 4 : Presipitasi pada Agar <i>Ouchterlony</i>	58
Gambar 5 : Biakan Jaringan OL dan CPE.....	63
Gambar 6.1 : Positif Virus <i>EBL</i> dalam Agar <i>Ouchterlony</i>	64
Gambar 6.2 : Negatif Virus <i>EBL</i> dalam Agar <i>Ouchterlony</i>	64
Gambar 7 : Perangkat Antigen <i>EBL</i> Lokal dan Import.....	85
Gambar 8.1 : Tumor pada Domba <i>Superficial</i>	86
Gambar 8.2 : Tumor Lambung.....	86
Gambar 9 : <i>Hepatomegali</i>	87
Gambar 10 : Pus (nanah) karena Leukemia Sapi (<i>EBL</i>).....	88

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Kepanjangan
FBL	Enzootic Bovine Leucosis
FKDL	Foetal Kidney Lamb
Sp	Spleen
OL	Ovine Lung
CPE	Cyto Pathogenic Effect
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
FBS	Foetal Bovine Serum
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEG	Poliethilen Glikol
Penstrep	Penisilin-streptomisin
RPMI-1640	Rosewell Park Memorial Institute Number 1640
UCF	Ultracentrifuge

BAB I

PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang Permasalahan

Menurut Dirjen Peternakan setiap tahunnya Indonesia mendatangkan stok sapi import sebanyak 70.000 ekor. Sedangkan stok sapi import yang masih ada 36.000 ekor. Indonesia berusaha mengimport sapi bunting dan membentuk kawasan sapi tertentu di Madura dan di Bali. Angka kelahiran sapi pertahun 1,6 sampai 1,8 juta ekor, populasi sapi terdiri dari 70 % sapi jantan dan 30 % sapi betina. Dari 30 % sapi betina tersebut, 60 % masih produktif. Sampai saat ini Indonesia sudah mempunyai populasi ternak sapi sebanyak 12 juta ekor. Empat setengah sampai dengan lima juta adalah sapi betina yang produktif. Pada tahun 2000 nanti diharapkan Indonesia sudah bisa swasembada daging khususnya. Upaya untuk swasembada ini diantaranya meningkatkan populasi sapi potong melalui penyediaan bibit unggul dan menyediakan sapi betina yang produktif yang bebas penyakit (Dirjen. Nak pada Seminar Nasional 20 Oktober 1999 di FKH Unair).

Salah satu masalah yang menghambat terwujudnya swasembada penyediaan sapi potong yang bebas penyakit di Indonesia ialah penyakit *Enzootic Bovine Leucosis (EBL)*. Penyakit ini telah diberitakan pertama kali di

Indonesia pada tahun 1957 oleh Resang pada kerbau di Bogor (Resang, 1976).

Penyakit *Enzootic Bovine Leucosis (EBL)* pada sapi disebut pula *Cattle Leucemia*, *Bovine Lymphosarcoma*, *Bovine Lymphocytomatosis* atau *Leukemia* sapi (Ferrer *et al.*, 1976).

EBL pertama kali ditemukan tahun 1771 pada sapi potong di Jerman Utara oleh Leiserin (Miller *et al.*, 1976). Pada tahun 1885 di daerah Timur Laut Jerman banyak sapi yang mati secara tiba-tiba, dimana sapi yang tadinya terlihat sehat, kemudian mati tanpa gejala klinis. Pada awal abad itu Siedamstratsky dari Jerman Utara mengadakan penelitian pada sapi-sapi yang mati karena penyakit *EBL* tersebut. Ditemukan adanya perubahan patologis-anatomis, seperti adanya pembengkakan menyolok pada semua kelenjar getah bening, pembesaran hati, ginjal, limpa, jantung, dan uterus, penebalan tidak merata di sub mucosa lambung, terutama bagian pilorus, ke usus disertai ulcerasi. Dimana bila diseksi pada bagian yang bengkak tersebut ditemukan adanya pus (nanah) kental, padat berwarna putih kekuningan, yang merupakan masa tumor karena *Lymphocytosis persistant* (Resang dkk., 1986).

EBL pada mulanya banyak ditemukan di Jerman Utara, Swedia Selatan dan Denmark. Karena tindakan pemberantasan yang radikal maka penyakit *EBL* di negara-negara tersebut dapat berkurang. Pada tahun 1956 penyakit *EBL* dinyatakan dapat menular cepat dan ganas.

Penyebab penyakit ini adalah virus *EBL berenvelop* yang merupakan *retro-virus* yang dapat menimbulkan *lekosis* atau *leukemogenik*. Struktur protein yang terpenting adalah *glikoprotein* yang mempunyai berat molekul 60.000 (Gp60). Di bawah elektron mikroskop berupa partikel tipe-C, mempunyai epitop yang sama di daerah manapun juga, dan tidak menular pada manusia (Trainin *et al.*, 1990).

Sampai sekarang penyakit *EBL* masih ditemukan di negara-negara Belgia, Canada, USA, Rusia, Negara-negara Eropa Timur dan Australia (Burney, 1987).

Di Indonesia *EBL* diduga masuk bersama sapi yang datang dari Australia. Pada tahun 1983 Dharma menemukan penyakit *EBL* pada sapi peranakan Onggole di Banyuwangi. Pada tahun 1985 Prabowo melaporkan pula adanya penyakit *EBL* yang ditemukan pada sapi peranakan Onggole di Bengkulu Utara. Pada saat itu dalam daerah yang berstatus Endemik, frekuensi penyakit dapat mencapai 30-100 kasus per 100.000 ekor sapi. Dan bila ada sapi yang terserang penyakit *EBL* kronis dalam sebuah peternakan, maka diperkirakan 1% - 5% dari jumlah sapi yang ada akan tertular *EBL* (Dirjen Nak, 1977; Djafar dkk, 1985). Karena penyakit *EBL* dapat menular secara vertikal dari induk ke fetus yang masih di dalam kandungan, maupun secara horisontal melalui kontak langsung, air kemih, alat suntik ataupun melalui

serangga penghisap darah seperti lalat *Tabanus* dan *Hippobosca Miliensis*. *EBL* dapat pula menular dari sapi ke hewan lain seperti kuda, domba, kambing, babi, rusa dan kerbau (Resang, 1986; Cockerel *et al.*, 1986). Penyakit *EBL* adalah penyakit yang fatal dan ganas, penyerang susunan *reticula-endotel* (RES) mempunyai masa inkubasi yang cukup panjang lebih kurang 1½ tahun sampai 2 tahun. Pada sapi yang terinfeksi berat tampak jumlah limfosit yang meningkat secara sedang atau menyolok. Dimana pada sapi yang normal terlihat jumlah limfosit berkisar 4-6 ribu sel per mm³ (Nakajima *et al.*, 1982). Infeksi biasanya berlangsung secara sub-klinis, dan pada stadium preklinis keadaannya umum tidak terganggu. Setelah masa inkubasi diperkirakan 80-95% dari sapi tertular *EBL* akhirnya akan mati. Sehingga menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup tinggi (Nac Donald *et al.*, 1976; Miller *et al.*, 1979).

Pengobatan maupun vaksin sampai saat ini belum ditemukan (Miller *et al.*, 1976; Boisseau *et al.*, 1981; Sugiura *et al.*, 1982), cara pencegahan penyakit *EBL* ini adalah tidak mendatangkan sapi-sapi dari daerah bagian negara yang tertular, karantina yang ketat dengan pemeriksaan laboratorium yang teliti. Menggunakan diagnosis dini melalui skrining terhadap sapi-sapi yang baru datang dari luar dengan uji serologi agar difusi (Resang, 1986; Ishino *et al.*, 1988). Selama ini untuk pengujian terhadap penyakit *EBL*

dikerjakan oleh Balai Penyidik Penyakit Hewan (BPPH) yang ada di seluruh Indonesia. Ada tujuh BPPH di Indonesia terdiri dari BPPH Wilayah I berpusat di Medan, BPPH wilayah II di Bukittinggi, BPPH Wilayah III di Tanjung Karang, BPPH Wilayah IV di Yogyakarta, BPPH Wilayah V di Banjar Baru Kalimantan, BPPH Wilayah VI di Bali dan BPPH Wilayah VII di Maros Ujung Pandang. Cara pengujian yang dilakukan dengan uji serologi agar difusi menggunakan *KIT test EBL* produksi *import* (Dirjen Nak, 1977; BPMSOH, 1990).

Dewasa ini penyakit *EBL* cukup meresahkan petani peternak maupun pengusaha peternakan sapi ataupun instansi yang terkait, karena dapat menimbulkan kematian sapi secara mendadak tanpa menunjukkan gejala-gejala klinis yang jelas, dan bersifat persisten. Dimana sekali saja sapi terkena infeksi *EBL*, maka infeksi berlangsung seumur hidup sampai menimbulkan kematian pada sapi tersebut (Dirjen Nak, 1977; Resang, 1986).

Kejadian penyakit *EBL* selalu dimonitoring oleh BPPH seluruh Indonesia, kemudian dilaporkan ke Pusat. Menurut laporan BPPH Ujung Pandang pada tahun 1985 ditemukan 7 sapi yang positif *EBL* dari 78 ekor sapi jenis Sahiwall Cross yang diperiksa. Sapi jenis Sahiwall Cross ini didatangkan dari Selandia Baru. Dari hasil pemeriksaan tersebut menggunakan antigen *KIT Bovine Leucemia glycoprotein 60* asal *ovine lung Cell line*, produksi

PITTMAN-MOORE, USA (Djafar dkk., 1985). Pada tahun 1988 dari BPPH Yogyakarta dilaporkan pula adanya sapi yang positif *EBL* sebanyak 3 ekor dari 30 serum lapangan yang diperiksa ($\pm 10\%$). Pada tahun yang sama Raharjo dari Balai Pengujian Mutu Sertifikasi Obat Hewan (BPMSOH) menemukan isolat positif *EBL* dari sapi lapangan di Lembang Jawa Barat (BPMSOH, 1990). Pada tahun 1998 dilaporkan kembali dari BPPH Yogyakarta ditemukan sapi yang positif *EBL* sebanyak 12 ekor dari 27 serum lapangan yang diperiksa. Pemeriksaan menggunakan antigen *test KIT EBL Glycoprotein 60* produksi IFFA MEUREUX Perancis (BPPH Yogyakarta, 1998 dan lampiran 13).

Diagnosis penyakit dapat dilakukan melalui gambaran darah, uji komplemen fiksasi (CFT), dan uji serologi menggunakan agar difusi (Boisseou *et al.*, 1981). Tetapi diagnosis yang umum dan lebih sering digunakan baik oleh peneliti yang terdahulu maupun pada saat sekarang adalah dengan uji serologi presipitasi (agar difusi); menggunakan perangkat antigen *EBL*. Penggunaan uji serologi agar difusi ini, sesuai dengan perjanjian para ahli *EBL* yang disepakati pada seminar *EBL* di Copenhagen Jerman tahun 1985 (Miller *et al.*, 1972; Baliga *et al.*, 1976; Driscoll, 1977). Perangkat (KIT) antigen *EBL* yang digunakan untuk pengujian penyakit *EBL* pada umumnya berisi antigen *EBL* murni, serum referen untuk pengujian, serum kontrol positif, serum kontrol positif lemah, serum kontrol negatif, pengencer *buffer* dan ada pula

yang dilengkapi dengan agar difusi. Tergantung dari kebutuhan masing-masing produsen (Yasutomi *et al.*, 1987). Bila uji serologi untuk mendeteksi antibodi dengan agar difusi ini membentuk garis presipitasi yang jelas, berarti sapi tersebut diduga positif *EBL*. Karena adanya keseimbangan antara antigen dan antibodi yang saling berikatan, maka akan terbentuklah garis presipitasi di dalam agar difusi. Yang berarti sebagian besar virus antigen *EBL* berada di dalam limfosit dan infeksi baru saja terjadi. Sehingga diagnosis dini melalui skrining sangatlah diperlukan (Sugiura *et al.*, 1982).

Selama ini Indonesia masih harus mengimport (mendatangkan) perangkat antigen *EBL*. Disamping harganya yang cukup mahal, juga harus menunggu lama sampai berbulan-bulan perangkat tersebut baru sampai di tempat. Dikhawatirkan sapi sudah banyak yang mati karena penyakit *EBL*, apalagi bila sampai terjadi letupan wabah, namun perangkat antigen *EBL* belum datang, terutama untuk daerah-daerah yang jauh dari jangkauan kota. Kendala yang lain yang mungkin pula terjadi adanya kerusakan-kerusakan pada partikel-partikel di dalam kandungan bahan perangkat tersebut, yang dapat menyebabkan *false diagnosis* karena terlalu lama di dalam perjalanan.

Berdasarkan permasalahan tersebut di atas, peneliti bermaksud melakukan penelitian tentang pembuatan dan penggunaan perangkat antigen *EBL galur lokal* yang akan dibandingkan dengan perangkat antigen *EBL* produk import yang ada di pasaran. Penggunaan galur lokal mengingat faktor

geografis tidak lepas dari faktor mutasi, lebih efektifitas, lebih ekonomis karena produksi dalam negeri dan bisa didapatkan dalam waktu yang relatif singkat dengan harapan penularan penyakit *EBL* dapat dicegah sedini mungkin dan terhindar dari letupan wabah penyakit. Virus *EBL* yang dipergunakan adalah virus *EBL galur lokal* pasasi 15 yang sudah *adapted*, didapat dari BPMSOH Gunung Sindur Bogor.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas maka dapat disusun rumusan masalah seperti yang di bawah ini :

- 1.2.1. Apakah ada perbedaan hasil uji *ouchterlony* agar dari perangkat antigen *EBL galur lokal* dengan perangkat antigen *EBL Produk IAF Canada* yang telah dipasarkan ?
- 1.2.2. Apakah ada perbedaan sensitivitas dengan uji *Serum Netralisasi* di antara kedua perangkat antigen *EBL* tersebut ?
- 1.2.3. Apakah ada perbedaan spesifisitas dengan uji ikatan antigen – antibodi spesifik di antara kedua perangkat antigen *EBL* tersebut ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui apakah perangkat antigen *EBL galur lokal* yang

dibuat dengan menggunakan virus *EBL galur lokal* dapat memberikan hasil yang minimal mendekati atau sama dengan perangkat *antigen EBL* yang telah dipasarkan.

1.3.2. Tujuan khusus

1. Isolasi dan identifikasi virus *EBL galur lokal*..
2. Karakterisasi dan purifikasi virus *EBL*.
3. Mengembangkan virus *EBL* dalam biakan jaringan OL untuk pembuatan antigen *EBL*, serum referen, serum kontrol positif, serum kontrol positif lemah, dan serum kontrol negatif.
4. Membandingkan hasil uji *ouchterlony*, hasil uji sensitivitas, hasil uji spesifisitas dari Perangkat antigen *EBL galur lokal* dan produk IAF Canada.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Untuk scrining, pengawasan terhadap sapi-sapi *import* khususnya, mencegah masuknya penyakit dari luar.
2. Membantu petani peternak meningkatkan pendapatannya.
3. Untuk penghematan biaya, memakai produk dalam negeri, sekaligus mempromosikan produksi sendiri, mudah mendapatkannya sewaktu-waktu diperlukan.
4. Untuk membantu memberikan informasi pada Dirjen Peternakan mengenai

gambaran dan peta penyakit *EBL*, mulai dari jenis sapi, kelompok jenis kelamin, kelompok umum, sehingga lebih memudahkan dalam pengawasan penyakit *EBL*, terutama di daerah sumber ternak dengan harapan dapat meningkatkan produksi dan produktivitas ternak sapi perah dan ternak sapi pedaging.

5. Memberikan sumbangan informasi dalam perkembangan ilmu pengetahuan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sejarah perkembangan imunologi

Pada saat ini imunologi mengalami perkembangan yang sangat pesat, terutama dalam penyempurnaan pencegahan, diagnostik dan pengobatan dari suatu penyakit. Perkembangan variolasi dimulai sejak abad ke-18. Teknik tersebut merupakan usaha pencegahan terhadap penyakit cacar, teknik ini dilakukan dengan cara menggores kulit orang yang sehat, kemudian dibubuhi bubuk yang berasal dari penderita cacar yang tidak parah. Kemudian cara ini dilarang karena membahayakan, dan kadang-kadang menimbulkan kematian.

Edward Jenner pada tahun 1749-1823, mencoba menggunakan bibit cacar dari sapi (*vacca*), yang ditularkan kepada manusia, ternyata cara ini dapat memberikan hasil yang lebih aman dan efektif dalam penanggulangan penyakit cacar. Karena itu maka istilah variolasi diganti dengan vaksinasi (Subowo, 1993 ; Dwyer, 1994). Di bidang kedokteran, perkembangan imunologi, telah melahirkan berbagai cabang ilmu seperti imunopatologi, imunogenetik, imunologi tumor, imunologi transplantasi, dan imunokimia. Sedangkan cabang imunologi yang relatif baru adalah psikoneuroimunologi, yang dipelopori oleh

Robert Ader pada tahun 1980.

Pengembangan diagnostik mengalami kemajuan yang sama, di mana ditemukannya suatu teknik pembuatan antibodi monoklonal oleh Georges Kohler dan Cesar Milstein pada tahun 1975. Ditemukannya uji serum netralisasi, RIA, ELISA, agar difusi serta uji-uji diagnostik lainnya, mengimbangi perkembangan teknologi yang ada (Miller *et al.*, 1976 ; Castel *et al.*, 1993).

2.2. Dasar – dasar Imunokimia

2.2.1. Interaksi antigen–antibodi *in vitro*

Interaksi antigen-antibodi *in vitro* yang merupakan dasar imunokimia dapat dibagi dalam dua kategori yaitu kategori primer dan kategori sekunder.

- a. Interaksi antigen-antibodi primer adalah permulaan reaksi dan merupakan pengikatan antigen-antibodi tingkat molekular. Biasanya reaksi ini tidak terlihat dengan mata biasa tetapi memerlukan suatu indikator, misalnya dengan melabel antigen atau antibodi dengan berbagai zat seperti radioisotop, enzim atau zat warna fluoresein dan lain-lain. Sesuai dengan label yang dipakai, maka teknik penetapan interaksi antigen-antibodi dengan label radioisotop disebut teknik RIA, dan teknik yang menggunakan label enzim disebut ELISA, sedangkan teknik yang



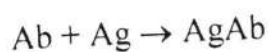
menggunakan indikator fluoresein disebut imunofluoresensi. Teknik-teknik itu bermanfaat untuk penetapan antigen atau antibodi yang kadarnya rendah.

- b. Interaksi antigen-antibodi sekunder dapat mengakibatkan presipitasi atau aglutinasi. Reaksi antigen-antibodi dapat terjadi langsung, tetapi kadang-kadang reaksi baru terjadi apabila ada komplemen. Apabila antigen yang ada dalam larutan direaksikan dengan antibodi spesifik, akan terbentuk kompleks antigen-antibodi yang besar sehingga kompleks mengendap dan terjadi presipitasi. Bila antigen itu terikat pada suatu partikel, misalnya partikel lateks, kuman, eritrosit maupun partikel lain, maka interaksi antigen-antibodi tersebut menyebabkan terjadinya gumpalan atau aglutinasi. Interaksi antigen-antibodi sekunder merupakan dasar berbagai jenis teknik uji *in vitro*, misalnya teknik imunodifusi, aglutinasi lateks, hemaglutinasi, uji fiksasi komplemen, turbidimetri, nefelometri dan lain-lain (Porter, 1979 ; Kresno, 1996).

Ada dua jenis kekuatan yang mengikat antigen pada antibodi. Pertama-tama daya *coulombic*, yaitu daya tarik menarik antar gugusan molekul antigen dan antibodi yang mempunyai muatan listrik yang berlawanan. Makin dekat jarak antigen dan antibodi, makin cepat keduanya berikatan. Daya lain yang

mengikat antigen pada antibodi adalah kekuatan van der waals. Dasar daya ikat ini adalah kesesuaian antara antigen dengan antibodi.

Ikatan antibodi dengan antigen merupakan ikatan yang reversibel dan mudah terlepas (disosiasi). Disosiasi bergantung pada kekuatan ikatan itu yang dinyatakan dengan suatu Konstante K, yang diperoleh dengan rumus :



$$K = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]}$$

[Ab] = Banyaknya antigen *combining site* pada antibodi

[Ag] = Konsentrasi antigen

Makin sesuai antibodi dengan antigen, reaksi makin bergeser ke kanan dan kompleks antigen-antibodi makin sulit berdisosiasi. Ini berarti bahwa antibodi mempunyai afinitas yang tinggi terhadap antigen bersangkutan (Roitt, 1985 ; Charles *et al.*, 1993).

2.2.2. Epitop, Spesifisitas dan Sensitivitas

Istilah epitop adalah bagian dari antigen yang bereaksi dengan antibodi atau reseptor spesifik pada limfosit T. Epitop dahulu disebut *antigenic determinant* (Hedde *et al.*, 1979).

Pada individu yang normal, imunogen dalam tubuh akan menimbulkan respons imun baik humoral (*humoral immune response*) maupun seluler (*cell-mediated immune respons*). Respons imun ini diatur oleh immune response gene (*irgenes*) yang berada dalam histocompatibility complex (MHC).

Gen ini akan mengatur respons seluler, yang kemudian melalui subset limfosit T. (T helper dan T Suppressor) akan mengatur respons humoral. Gen di MHC yang mengkode antigen dan terlibat pada penampilan imunogen asing adalah Gen kelas II. (Nisnoff, 1985 ; Abbas *et al.*, 1991 ; Putra, 1993). Limfosit, merupakan derivat dari stem sel yang telah mengalami proses diferensiasi dan maturasi (Rose, 1990). Proliferasi dan maturasi sel-sel darah yang normal akan dimulai dari sel-sel bakal (*precursor*) darah adalah suatu sel induk (*stem sel*) yang bersifat *pluri-potent* (PSC) ; PSC kemudian berdiferensiasi menjadi tiga macam sel induk, yaitu *megakaryocytic Stem Sel* (MeSc), *Erythropoietic Stem Sel* (ErSc) dan *Granulocytic-Macrophage Stem Sel* (G & MSc). Sedangkan LSC akan berdiferensiasi menjadi *B-Lymphocyte Stem Sel*, melalui suatu rangsangan menjadi sel plasma, dan *T-Lymphocyte Stem Sel* akan menjadi *T-Helper* (T-penolong), *T-Suppressori* (T-penghambat) serta *T-Killer* (T-pembunuh). Akibat gangguan gen dari salah satu khromosome, yang disebabkan oleh pengaruh virus, maka akan terjadilah gangguan dari proses diferensiasi dan proliferasi sel-sel darah. Karena

differentiasi terganggu maka terjadilah penghentian maturasi (*maturational-arrest*) pada suatu stadium tertentu dari proses maturasi sel-sel darah. Bila proses proliferasi berjalan terus, baik secara biasa maupun dipercepat, maka akan terjadilah penumpukan (*accumulation*) dari sel-sel yang terhenti maturasinya, disebut dengan leukemia. Leukemia Akuta (LA), adalah proliferasi abnormal dari sel-sel muda darah jenis blast dengan segala akibatnya (Roitt, 1986 ; Gosselin *et al.*, 1988).

Antibodi sangat bervariasi dalam hal spesifitas maupun sensitivitas. Suatu antibodi disebut spesifik apabila ia hanya beraksi dengan antigen yang merangsang produksinya. Semakin sensitif suatu teknik atau metoda, maka makin tidak spesifik pula metoda itu (Garvey *et al.*, 1917 ; Kresno, 1996).

2.3. Imunogen dan Antibodi

Imunogenitas suatu substansi menunjukkan sifat substansi bersangkutan yang mampu merangsang respons imun, baik respons selular maupun respons humoral atau keduanya, apabila substansi itu dimasukkan ke dalam tubuh (Roitt *et al.*, 1985 ; Subowo, 1993). Substansi yang demikian disebut imunogen, istilah lama, yaitu antigen. Sekarang digunakan untuk menyebutkan substansi yang mampu bereaksi dengan antibodi yang diproduksi atas rangsangan imunogen. Berarti semua imunogen adalah antigen (Kresno, 1996).

Faktor yang mempengaruhi imunogenitas atau antigenitas suatu bahan (substansi) di samping dipengaruhi oleh cara masuknya antigen ke dalam tubuh, juga dipengaruhi oleh ukuran molekul, kerumitan struktur kimiawi, konstitusi genetik, serta dosis yang diberikan (Goodman, 1991 ; Subowo, 1993).

Ciri pokok antigenisitas agar dapat bersifat antigenik adalah, molekul harus besar, kaku dan kimiawi kompleks. Walaupun molekul kecil dapat berlaku sebagai antigen, tetapi molekul besar jauh lebih baik, karena ukuran dan kerumitan strukturnya. Persyaratan lainnya bagi antigenisitas adalah keasingan dan sel peka antigen tidak akan bereaksi dengan bahan yang tidak begitu dikenalnya (Rosse, 1990). Pada permukaan makro molekul terdapat tempat untuk diarahkannya reaksi kebal dimana antibodi mengadakan ikatan yaitu pada *determinant* antigen atau epitop. Protein *EBL* terdiri glikoprotein yang mempunyai berat molekul 60.000 Dalton atau Gp 60 dan bersifat antigenik, mempunyai epitop yang sama di daerah manapun juga (Miller, 1979; Kamini *et al.*, 1991).

Antibodi diendapkan dari serum oleh amonium sulfat dan karena itu digolongkan sebagai globulin. Karena molekul antibodi adalah globulin, maka umumnya dikenal sebagai imunoglobulin (Ig). Istilah Ig dipakai untuk menggambarkan semua protein yang mempunyai aktivitas antibodi, maupun

beberapa protein yang mempunyai struktur imunoglobulin yang khas tetapi tak memiliki aktivitas antibodi (Ishino *et al.*, 1988). Pada sapi IgG adalah campuran dari dua subklas yang mempunyai antigenisitas berbeda, yang disebut IgG₁, dan IgG₂. Perbedaan IgG₁ dan IgG₂ terletak pada sifat antigeniknya. IgG₁ mempunyai mobilitas elektroforetik yang lebih cepat dari IgG₂. IgG₂ pada sapi dapat secara baik menggumpalkan partikulat antigen; sedangkan IgG₁ tidak. Sifat ini berguna dalam diagnosis imunologis dari penyakit menular seperti halnya EBL. (Ferrel *et al.*, 1977; Abbas *et al.*, 1991). Pada sapi jumlah IgG₁ lebih besar 50 % dari jumlah IgG yang ada, terdapat dalam serum dan susu. Sehingga pada sapi IgG merupakan Ig yang lebih utama dibandingkan IgA. IgG dapat melakukan opsonisasi, aglutinasi, dan presipitasi antigen. Jumlah relatif dari presipitat yang dibentuk pada spesies sapi adalah positif 4. Sedangkan tingkat IgG serum pada spesies sapi adalah 1700-2700 (Benacerraf *et al.*, 1980; Nisnoff, 1985; Yasutomi *et al.*, 1987).

Antigen murni dibuat dengan jalan menginokulasikan virus *antigen EBL galur lokal* ke dalam biakan jaringan OL dan FKL kemudian hasil inokulasi dikonsentrasikan dengan menambahkan amonium sulfat jenuh $\pm 30\%$, di centrifuge dan diambil endapan virusnya. Dilanjutkan kemurnian dengan SDS-PAGE electrophoresis dan sephadex chromatography (Trudel *et al.*, 1990; Artama, 1996).

Inaktivasi virus dilakukan dengan jalan menambahkan aminomethylated compounds of E-Leucine ($6,6 \times 10^2$ E-Leucine $6,6 \times 10^3$ Formaldehyde) dieramkan pada suhu 37°C selama 18 jam (Parfanovich *et al.*, 1983).

Untuk mendapatkan serum negatif, diambilkan dari domba muda yang baru lahir dan sehat. Virus *EBL galur lokal* diinokulasikan pada domba muda dieramkan selama 7 hari, kemudian serum positif lemah, di *booster* dan dieramkan 28 hari untuk membuat serum positif kuat. Pembuatan serum referen dengan jalan menginokulasikan virus *EBL galur lokal* pada kelinci (Harlow *et al.*, 1988). Sedangkan sebagai pengencer buffer dapat dibuat dari campuran posphat buffer saline di dalam bahan-bahan kimia lainnya (Miller *et al.*, 1972; Yasutomi *et al.*, 1987).

Pengujian yang dilakukan terhadap tiap-tiap materi perangkat antara lain uji sterilitas, uji potensi, uji keamanan dan uji stabilitas. Bila semua hasil pengujian baik, maka tiap materi perangkat diberi label dan leaflet, petunjuk cara penggunaan dan cara penyimpanan supaya tidak cepat rusak yang disertakan dalam satu Kotak perangkat (Nakajima *et al.*, 1982; Benjamin, 1991).

2.4. Imunopresipitasi

Teknik imunopresipitasi merupakan salah satu cara yang banyak dipakai

untuk mengukur kadar antigen atau antibodi. Antigen direaksikan dengan antibodi spesifik membentuk kompleks yang tidak larut (presipitat) yang dapat diukur dengan berbagai cara. Reaksi presipitat dapat dilangsungkan dalam media cair maupun media semi solid (gel) atau agar. Hal yang paling menentukan adalah spesifisitas antiserum yang digunakan, dan larutan standard dengan kadar yang pasti dan stabil, pH dari agar adalah 7,1–7,2 (Philips *et al.*, 1978).

Reaksi imunopresipitasi dipengaruhi pula oleh aviditas antibodi. Aviditas antibodi menentukan derajat stabilitas kompleks antigen-antibodi pada tempat pengikatan (*antigen binding site*). Kompleks yang terbentuk cenderung berdisosiasi bila antibodi mempunyai aviditas yang lemah, sebaliknya semakin tinggi aviditas antibodi makin stabil kompleks antigen-antibodi yang terbentuk. Selain itu pH, suhu, molaritas larutan yang dipakai, perbandingan konsentrasi antigen dengan konsentrasi antibodi harus diperhatikan pula (Cockerell, 1986 ; Roitt *et al.*, 1996).

Beberapa jenis reaktan menghasilkan imunopresipitasi yang optimal baik pada suhu 0°C maupun 37°C, sedangkan pH yang dianggap paling baik adalah pH yang netral antara 6 – 7,5. pH sebaiknya tidak kurang dari 6 dan tidak lebih dari 8,6. Pada pH kurang dari 6 dan lebih dari 8,6 kompleks antigen-antibodi mudah berdisosiasi sehingga tidak terjadi presipitasi. Larutan yang dipakai

Sebaiknya larutan dengan molaritas $< 0,15$ M. Karena larutan dengan molaritas $> 0,15$ M mencegah terjadinya presipitasi (Kresno, 1996).

Perbandingan antigen dengan antibodi merupakan faktor terpenting dalam reaksi presipitasi. Pembentukan presipitat terjadi apabila antara konsentrasi antigen dengan antibodi tercapai keseimbangannya. Kondisi antigen berlebihan akan mengakibatkan melarutnya kembali kompleks yang terbentuk. Bila antibodi berlebihan menyebabkan kompleks antigen-antibodi tetap ada dalam larutan. Hal yang pertama disebut *postzone effect* dan yang kedua disebut *prozone effect*. Zone ekuivalen merupakan daerah dimana antigen dan antibodi ada dalam keadaan seimbang (gambar 1). Zone ekuivalen ini sempit apabila antigen mempunyai sifat mudah larut; sebaliknya zone ekuivalen ini lebih besar apabila antigen tidak mudah larut dan bermolekul besar, atau bila dalam larutan terdapat beberapa jenis antigen (multi komponen). Pada umumnya teknik imunopresipitasi (agar difusi), diusahakan supaya reaksi presipitasi berlangsung dalam zone ekuivalen jadi antigen dan antibodi berimbang (Miller *et al.*, 1979; Trainin *et al.*, 1990).

Pada uji agar difusi, antigen dan antibodi dibiarkan berdifusi ke arah masing-masing dalam perbenihan agar. Tiap-tiap garis presipitat menyatakan satu sistem antigen-antibodi. *Plate* gelas ditutup dengan agarose 1%,

dieramkan pada ruang yang lembab selama 24 – 28 jam. Timbulnya presipitat menunjukkan positif antigen (Jawes, 1982; Ishino *et al.*, 1988; Kresno, 1996).

2.5. Virus *Enzootic Bovine Leucosis* (VEBL)

EBL termasuk anggota famili *retroviridae*, genus *oncovirinae* dan spesies *onkorna virus* atau *retrovirus* (*EBL*) yang dapat menimbulkan leukosis (*leukemogenic*). Di bawah mikroskop elektron *VEBL* berupa partikel tipe-C. *VEBL* tidak bersifat *zoonosis*, mempunyai *buoyant density* 1,18 gram/ml dan terdiri dari RNA 60 S-70 S yang berantai tunggal (*Single-stranded*) dan memiliki enzim *transcriptase* (Resang dkk, 1979 ; Jawes *et al.*, 1982), mempunyai diameter 100 – 200 nm. *VEBL* tersusun dari *envelop*, *capsid* dan *genom* (Donald *et al.*, 1976).

Envelop merupakan lapisan luar dari virion terdiri atas protein, karbohidrat dan lemak. Pada *envelop* terdapat penjurusan keluar panjang kira-kira 55 nm (Miller *et al.*, 1979). Susunan kimia virion adalah protein 60– 70% lemak 30 – 40% dan dalam protein yang mengalir keluar berisi karbohidrat 2% terutama glikoprotein (Gp 60). Glikoprotein mempunyai berat molekul 60.000 dalton pada *envelop*. Gp 60 bersifat *immunogenic* makro molekul, yang dapat menghasilkan antibodi dalam jumlah banyak. Mempunyai imuno-respon yang tinggi, merupakan antigen yang spesifik yang hanya dapat bereaksi

dengan antibodi yang dikenalnya (Philips et al., 1978).

2.6. Pengembangan Sel (Jaringan)

Jaringan yang digunakan untuk pengembangan virus EBL galur lokal adalah biakan jaringan paru sapi (OL), biakan jaringan ginjal domba muda (FKL), biakan jaringan limpa sapi muda (Sp) dan biakan jaringan paru kelelawar (*bat-sel*). Media untuk pengembangan jaringan adalah *eagle* atau MEM media, dicampur dengan serum sapi 10 % atau *Fetal Calf Serum* sebanyak 3 - 5 % (Tabel 5). Untuk pencegahan terhadap kontaminasi dapat ditambahkan pula 0,02 % penstrep dan 0,01 % mycostatin. Pengembangan sel dilakukan di dalam botol / roux di inkubasikan dalam inkubator suhu 37°C selama 2-5 hari sampai jaringan (sel) terlihat penuh ; kemudian dipanen (Johan et al., 1975 ; Ferrar et al., 1976).

2.7. Pengembangan Virus EBL galur Lokal

Biakan jaringan OL, FKL, Sp atau bat yang telah penuh dapat di inokulasi dengan suspensi virus EBL galur lokal sebanyak 10 % di inkubasikan dalam inkubator suhu 37°C selama satu jam. Selanjutnya ditambahkan media pengembangan virus yang terdiri dari *RPMI Medium*, *MEM Medium* atau *Eagle Medium* ditambah dengan serum sapi in aktif 2 % serta DEAE-dextran 1 % (Tabel 1 dan Tabel 2). Di inkubasikan kembali dalam inkubator suhu 37°C selama 1 - 7 hari sampai timbul CPE di bawah *inverted*

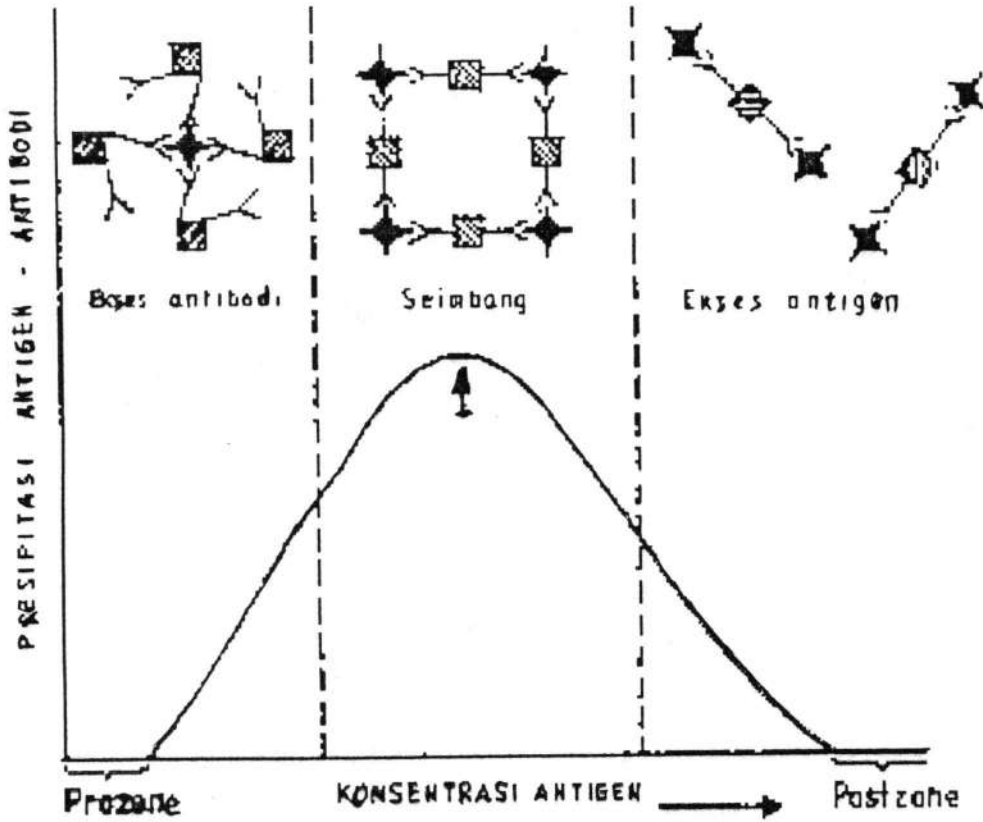


microscope (Onuma *et al.*, 1975 ; Baliga *et al.*, 1976).

Tabel 1. Media Eagle Overlay untuk pengembangan biakan jaringan

Nama Bahan	Jumlah Gram / Liter
NaCl	6,4
Kcl	0,4
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2
Glukose	4,5
Feri Nitrat . 9H ₂ O (0,1%)	0,1 ml
Na H ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	0,14
Glutamin	0,292
Ca Cl . 2H ₂ O	0,2
Na HCO ₃	2,75
PR (Phenol Red 0,1%)	13 ml
Amino Acid	50 ml
Vitamin Concentrate	4 ml
Penicillin	0,1
Kanamycin	0,1
Streptomycin	0,15
TPB (Tryptose Phosphat Broth) 6,6%	20 ml

Sumber : Johan *et al.*, (1987)



Gambar 1 • Kurve imunopresipitasi
(dikutip dari Nakamura et al., 1982)

2.8. Inaktivasi

Virus *EBL* galur lokal dapat di inaktivasi dengan *aminomethylated compounds* (Formaldehyde E - Leucine atau Lysine). Dengan dosis $6,6 \times 10^2$ E - Leucine dicampur dengan $6,6 \times 10^3$ formaldehyde, di inkubasikan pada suhu 37°C selama 18 jam. Perbandingan antara *Aminomethylated Compounds* dan virus *EBL* adalah 32 / 36 (Parfanovich et al., 1983).

2.9. Pemurnian Virus

Untuk pemurnian biasanya bahan permulaan merupakan sejumlah besar perbenihan biakan jaringan, cairan tubuh, atau sel-sel yang terkena infeksi (Jawez, 1982). Langkah pertama adalah mengkonsentrasikan partikel virus dengan amonium sulfat, polietilen glikol (PEG) dan pengendapan dengan *ultra sentrifug*. Elusi dapat digunakan untuk mengentalkan virus, bila sudah pekat virus dapat dipisahkan dari bahan tuan rumahnya melalui pemusingan differensial, pemusingan berdasarkan berat jenis, Khromatografi kolom, dan elektroforesis (Weiland et al., 1977 ; Trudel et al., 1990).

Virus *EBL* dapat dimurnikan dengan jalan mengkonsentrasikan virus dengan amonium sulfat dilanjutkan dengan *sucrose gradient density*

centrifugation 15-55 %. Kemudian dengan SDS – Polycrylamide gel elektroforesis untuk identifikasi, serta *ultracentrifugation* (Baliga *et al.*, 1976 ; Miller *et al.*, 1979).

2.10. Pembuatan Antiserum, Serum Referen, Serum Kontrol Positif Lemah, Serum Kontrol Negatif dan Pengencer Buffer

Antiserum (serum positif) dibuat dengan jalan menginokulasikan virus antigen EBL galur lokal 2ml yang dicampur dgn 2ml Freund adjuvan disuntikan secara sub cutan pada bagian punggung domba muda, pembuatan serum referen pada kelinci dan serum kontrol pada domba muda (Tabel 4).

Jika dibutuhkan antibodi yang mempunyai spesifisitas yang tinggi maka pemurnian antigen harus memenuhi standard tekniknya (Halaman 54).

Dalam penelitian ini pemurnian antigen yang sesuai dengan standard, yaitu menggunakan SDS-PAGE dan kolom kromatografi. Pada umumnya ada 5 kelompok hewan coba yang sering digunakan dalam laboratorium yaitu, kelinci, tikus, hamster dan marmot (Tabel 3).

Pemilihan hewan coba untuk diinokulasi harus mempertimbangkan 4 faktor yaitu : berapa jumlah serum yang dibutuhkan, dari spesies apa antigen tersebut diisolasi, apakah dibutuhkan antibodi monoklonal, dan berapa banyak

daripada uji pengikatan primer. Contohnya adalah uji anafilaksis kulit pasif.

Dalam penelitian ini menggunakan uji pengikat sekunder yaitu presipitasi. Teknik presipitasi dimaksudkan untuk mendeteksi reaksi antigen-antibodi dengan reaksi presipitasi. Di sini antibodi dan antigen bertemu dengan cara difusi. Penentu paling penting dalam reaksi ini adalah kadar relatif antigen dan antibodi.

Keunggulan teknik adalah bahwa kadar gradien antigen dan antibodi secara otomatis terbentuk dari proses difusi. Imunopresipitasi akan terjadi di suatu tempat antara sumuran asalkan diperoleh kadar yang setara pada suatu tempat di gradien antigen dan antibodi yang tumpang tindih.

Adanya satu garis presipitasi menunjukkan bahwa antiserum mengandung antibodi khas untuk antigen. Bila terdapat lebih dari satu garis, hal ini menunjukkan heterogenitas pada antigen dan antiserum.

Tidak adanya garis presipitasi menunjukkan tidak adanya antibodi dengan kekhususan untuk antigen, atau adanya antibodi tetapi tidak mampu membuat presipitasi antigen, atau adanya antibodi tetapi kadar antigen dan atau antibodi tidak sesuai, yaitu tidak diperoleh kesetaraan (Miller *et al.*, 1972 ; Nakajima *et al.*, 1982 ; Tizard *et al.*, 1987).

jumlah antigen yang tersedia.

Menurut Cohen dan Tissof (1991) kelinci merupakan hewan coba pilihan untuk sebagian besar penelitian di bidang imunologi, dan merupakan pilihan terbaik untuk memproduksi antiserum. Kelinci mudah dipelihara dan antibodi yang dihasilkan mempunyai karakteristik khusus (Harlow and Lane, 1988).

2.11. Uji Imuno Diagnostik

Imuno Diagnostik merupakan cabang imunologi yang mempelajari reaksi antigen-antibodi secara *in vitro*, ada 3 katagori uji serologi antara lain:

1. Uji pengikat primer, yang mengukur langsung interaksi antara antigen dengan antibodi, dan kemudian mengukur jumlah kompleks imun yang terbentuk. Contoh uji pengikat primer adalah *Radioimuno assay* (RIA), *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), uji yang melibatkan *imunofluoresensi*.
2. Uji pengikat sekunder, mengukur akibat pembentukan imunokompleks *in vitro*, karena itu secara teoritis uji ini kurang peka daripada uji pengikatan primer, tetapi sangat lebih mudah untuk dilakukan. Contoh uji ini antara lain presipitasi, aglutinasi, uji pengikatan komplemen.
3. Uji pengikatan tersier, mengukur akibat respon *in vivo* atau menggambarkan akibat praktis respon imun. Uji ini biasanya kurang peka

daripada uji pengikatan primer. Contohnya adalah uji anafilaksis kulit pasif.

Dalam penelitian ini menggunakan uji pengikat sekunder yaitu presipitasi. Teknik presipitasi dimaksudkan untuk mendeteksi reaksi antigen-antibodi dengan reaksi presipitasi. Di sini antibodi dan antigen bertemu dengan cara difusi. Penentu paling penting dalam reaksi ini adalah kadar relatif antigen dan antibodi.

Keunggulan teknik adalah bahwa kadar gradien antigen dan antibodi secara otomatis terbentuk dari proses difusi. Imunopresipitasi akan terjadi di suatu tempat antara sumuran asalkan diperoleh kadar yang setara pada suatu tempat di gradien antigen dan antibodi yang tumpang tindih.

Adanya satu garis presipitasi menunjukkan bahwa antiserum mengandung antibodi khas untuk antigen. Bila terdapat lebih dari satu garis, hal ini menunjukkan heterogenitas pada antigen dan antiserum.

Tidak adanya garis presipitasi menunjukkan tidak adanya antibodi dengan kekhususan untuk antigen, atau adanya antibodi tetapi tidak mampu membuat presipitasi antigen, atau adanya antibodi tetapi kadar antigen dan atau antibodi tidak sesuai, yaitu tidak diperoleh kesetaraan (Miller *et al.*, 1972 ; Nakajima *et al.*, 1982 ; Tizard *et al.*, 1987).

Tabel 3. Pemilihan hewan coba (Harlow and Lane, 1988)

Hewan Coba	Maksimum Serum (ml)	Keterangan
Kelinci	500	Kebutuhan antigen sedikit pilihan terbaik untuk produksi poliklonal antibodi
Mencit	2	Mempunyai respons imun yang baik dan pilihan terbaik untuk produksi Monoklonal antibodi
Tikus	20	Pilihan terbaik untuk produksi monoklonal antibodi
Hamster	20	Kebutuhan antigen sedikit pilihan terbaik untuk produksi poliklonal antibodi
Marmot	30	Susah dalam pengambilan darah

Tabel 4. Imunogen dan dosis yang dianjurkan untuk kelinci (Harlow and Lane, 1988)

Bentuk Antigen	Dosis ug	Cara Pemberian	Adjuvan	Keterangan
Protein Solubel	50 – 1000	Sc	+/-	Injeksi mudah
		Im	+/-	Penetrasi lambat
		Ld	+/-	Injeksi susah dan penetrasi lambat
		Iv	-/-	Imunisasi primer Tidak efektif
Protein Insolubel	50 – 1000	Sc	+/-	Sda
		Im	+/-	Sda
		Id	+/-	Sda
Protein Partikulat	50 – 1000	Sc	+/-	Sda
		Im	+/-	Sda
		Id	+/-	Sda
Karbohidrat	50 – 1000	Sc	+/-	Sda
		Im	+/-	Sda
		Id	+/-	Sda
		Iv	-/-	Sda

Tabel 5. Pengencer Buffer (PBS) +

No.	Nama Bahan	Jumlah Gram / Liter
I	NaCl	8
	KCl	0,2
	KH ₂ PO ₄	0,2
	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,15
	Aqua ad	600 ml
II	CaCl ₂	0,1
	Aqua ad	200 ml
III	MgCl ₂ 6 H ₂ O	0,1
	Aqua ad	200 ml

Sumber : Johan *et al.*, (1987)

Keterangan :

- Tiap komposisi dibuat masing-masing kemudian dicampur secara merata.

BAB 3

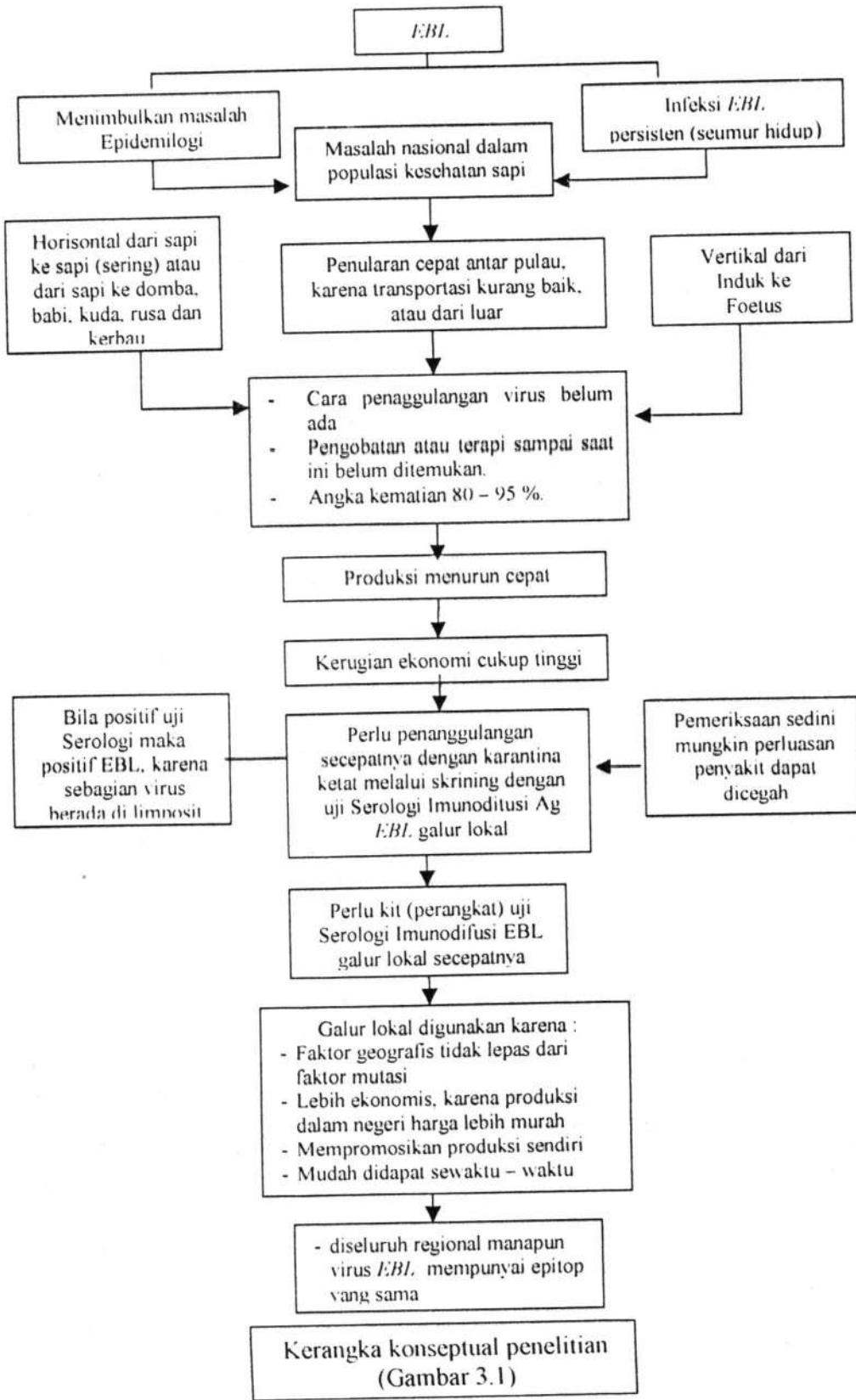
KERANGKA KONSEPTUAL & HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka konseptual

Sejak laporan Miller dan Burney pada tahun 1956 tentang penyakit *EBL* yang menular dan ganas, bersifat persintant dan fatal sehingga dapat menimbulkan kematian sapi dalam jumlah yang sangat besar. Maka sejak itu pula banyak penelitian mengenai penyakit *EBL* dilakukan di beberapa negara diantaranya negara Jerman dan Amerika (Berney *et al.*, 1987). Bahkan penyakit *EBL* ini dapat pula menimbulkan letupan wabah, bila tidak segera ditangani secara seksama. Sehingga didapat kesepakatan bersama dari para ahli *EBL* pada pertemuan seminar penyakit *EBL* seluruh dunia di kota Copenhagen pada tahun 1979 yang mengatakan bahwa untuk mendiagnosis penyakit *EBL* sebaiknya digunakan uji serologi agar difusi (Miller, 1979 ; Resang, 1986). Karena sampai saat ini pengobatan untuk penyakit *EBL* belum ditemukan, maka untuk mencegah terjadinya letupan wabah penyakit *EBL* adalah dengan mengadakan scrining terhadap sapi-sapi *import* khususnya, agar penyebaran penyakit dapat dicegah sedini mungkin (Dirjen Nak., 1977 ; Trainin *et al.*, 1990).

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. kerangka konseptual penelitian



Menurut Dirjen Nak (1997) hewan yang positif *EBL* dengan uji imuno Diagnostik, dagingnya sudah menunjukkan perubahan-perubahan klinis seperti adanya penonjolan-penonjolan tumor yang nekrosis, terdapat hampir pada seluruh bagian tubuh. Bila disayat bagian tumor yang menonjol tersebut akan mengeluarkan nanah kental, padat keras, berwarna putih kekuningan dan menimbulkan bau yang tidak sedap.

Jika dilihat dari struktur daging yang sudah tercemar tersebut, maka sebaiknya dihimbau kepada masyarakat untuk tidak mengkonsumsi daging hewan ternak yang dinyatakan positif *EBL*. (Miller, 1979; Resang 1986)

3.2 Hipotesis Penelitian

Pada penelitian ini dapat disusun beberapa hipotesis sebagai berikut :

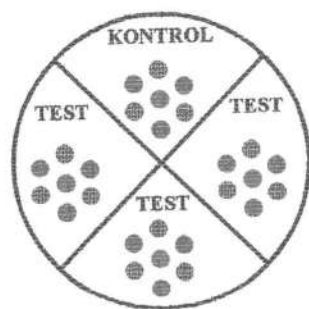
1. Pada kedua Perangkat antigen *EBL* galur lokal dan Produk IAF Canada yang dipasarkan, memberikan hasil difusi agar yang tidak berbeda dengan timbulnya garis presipitasi
2. Pada kedua Perangkat antigen *EBL* galur lokal dan Produk IAF Canada yang dipasarkan memberikan harga sensitivitas yang tidak berbeda.
3. Pada kedua Perangkat antigen *EBL* galur lokal dan Produk IAF Canada yang dipasarkan, memeberikan harga spesifisitas yang tidak berbeda.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

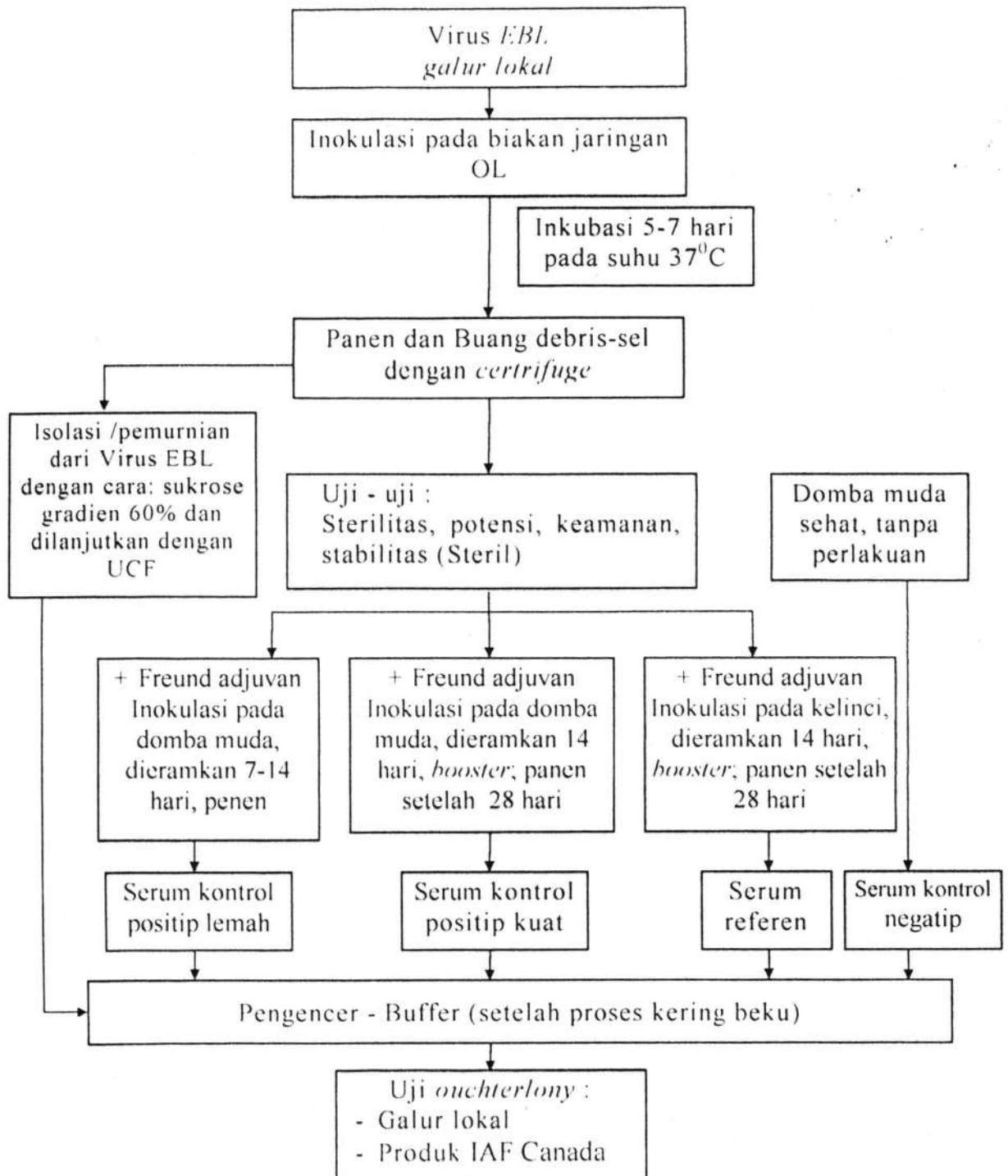
Jenis penelitian yang digunakan untuk membandingkan pembuatan dan penggunaan perangkat antigen *EBL GP₆₀ galur lokal* dengan perangkat dan penggunaan perangkat yang ada di pasaran adalah percobaan sungguhan (true experiment). Penelitian ini bersifat observasional komparatif. Pola ini terdiri dari tiga faktor pengaruh yaitu : faktor presipitasi dalam agar difusi, faktor sensitivitas, dan faktor spesifisitas. Pada uji presipitasi menggunakan plate besar berdiameter 10 cm, yang dapat digunakan untuk pengujian 9 sampel serum lapangan dan satu kontrol. Sampel minimal 78 (Shlesseiman, 1982). Sedangkan untuk uji sensitivitas dan uji spesifisitas dengan SN-test, menggunakan mikroplate 96 sumuran. Pada satu mikroplate digunakan untuk pengujian 80 sampel, dan 2 deret sumuran terakhir, sebanyak 2 x 8 sumuran = 16 sumuran, digunakan sebagai kontrol virus dan kontrol sel setiap perlakuan disertakan kontrol, dan perlakuan minimal akan dikerjakan sebanyak tiga kali.



Keterangan :

- = Serum yang diuji
- = Serum referen
- = Anti gen

4.1. BAGAN KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN



Kerangka Operasional Penelitian
(Gambar 4.1)

Bagan Rancangan Penelitian sebagai berikut :

Jenis Perlakuan	Perangkat antigen <i>EBL Gp 60</i>			
	Galur Lokal		Produksi <i>Import</i>	
	Serum Lapangan	Kontrol	Serum Lapangan	Kontrol
Uji Presipitasi pada agar difusi	9	1	9	1
% tase sensitivitas pada uji SN-Test	80	16	80	16
% tase spesifisitas pada ikatan antigen dan antibodi (Ouchterlony)	80	16	80	16

4.2. Populasi, Sampel, dan Besar Sampel

4.2.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah sapi yang berada di daerah Lembang Jawa Barat dan sapi di daerah Cipelang Jawa Barat.

Menurut laporan dari BPPH Yogyakarta (1979) dan laporan Balai Penyidik Penyakit Hewan (BPPH) Ujung Pandang (1985) serta laporan dari BPPH Yogyakarta (1998) masih adanya sapi-sapi yang terinfeksi *EBL* di Indonesia. Infeksi *EBL* pada sapi di Indonesia sudah mulai ada pada tahun 1957 yang menyerang kerbau di Bogor (Ressang, 1957).

4.2.2. Sampel

4.2.2.1. Unit Sampel

Unit sampel adalah personal sapi, yaitu sapi-sapi di daerah Lembang dan Cipelang; yang diambil serumnya.

4.2.2.2. Besar Sampel

Perhitungan dengan menggunakan rumus dari Schlesseiman, besar sampel minimal = 78 (Schlesseiman, 1982).

Harga n adalah :

$$\{2\alpha\sqrt{2pq} + 2\beta\sqrt{p_1q_1 + p_2q_2}\}^2 / (p_1 - p_2)^2$$

Keterangan :

$$\alpha = 0,05 = 1,96$$

$$\beta = 0,20 = 0,84$$

$$p_1 = 0,90 \rightarrow \text{dianggap kepekaan mendekati } 90\%$$

$$q_1 = 0,10$$

$$p_2 = 0,75 \rightarrow \text{dianggap kepekaan mendekati } 75\%$$

$$q_2 = 0,25$$

$$p = \frac{1}{2} (p_1 + p_2)$$

$$q = 1 - p$$

$$q_1 = 1 - p_1$$

$$q_2 = 1 - p_2$$

$$\text{Berarti } p = \frac{1}{2} (0,90 + 0,75) = 0,825$$

$$q = 0,175$$

$$P_1 = 0,90$$

$$P2 = 0,75$$

$$q1 = 0,10$$

$$q2 = 0,25$$

$$n = \frac{\{1,96 \sqrt{2 \times 0,825 \times 0,175} + 0,84 \sqrt{0,9 \times 0,1 + 0,75 \times 0,25}\}^2}{0,15^2}$$

$$n = \frac{1,0532 + 0,7031}{0,7523} = 78$$

4.2.2.3. Prosedur Pengambilan Sampel

Sebagai sampel dalam penelitian ini adalah serum dari sapi yang berada di B.I.B. (Balai Inseminasi Buatan) di daerah Lembang dan di daerah Cipelang Jawa Barat.

Sebagai kelompok kontrol adalah serum domba muda yang berada di daerah Surabaya (RPH Pegirian), karena domba yang akan dipotong di RPH (rumah potong hewan) tersebut adalah domba yang sehat.

4.3. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1. Identifikasi

Dalam penelitian ini digunakan variabel sebagai berikut :

1. Variabel bebas : Virus *EBL galur lokal*, spesifisitas, dan sensitivitas.
2. Variabel terikat : Reaksi antibodi spesifik dari serum yang diuji dengan antigen *EBL galur lokal*, dimana di dalam lubang agar difusi berupa garis presipitasi lurus, terang dan jelas.
3. Variabel kendali : Variabel yang berpengaruh terhadap presipitasi, sensitivitas dan spesifisitas yaitu : uji *ouchterlony*, uji serum netralisasi dan uji ikatan antigen dan antibodi spesifik.

4.3.2. Definisi Operasional

Virus *EBL* dapat menyebabkan penyakit leukemia pada sapi potong khususnya. Penyakit ini bersifat fatal, ganas dan menyebabkan angka kematian tinggi 80 – 90% serta bersifat persisten. Sebagian besar virus berada di limposit, sehingga pada uji imuno Diagnostik dengan menggunakan agar *ouchterlony* terlihat garis presipitasi yang jelas bila positif *EBL* (Yasutomi, 1987; Trudel *et al.*, 1990).

Reaksi antigen-antibodi spesifik yang berikatan, membuat suatu garis yang lurus, jelas dan terang di dalam agar difusi.

Penggunaan uji imuno Diagnostik dengan agar *ouchterlony* (*agar gel immunodiffusion*) untuk skrining penyakit *EBL* sesuai dengan kesepakatan bersama ahli *EBL* di seluruh dunia, pada pertemuan

seminar *EBL* di Copenhagen Oktober 1979; yang resmi digunakan sebagai uji penyakit *EBL* (Miller, 1979).

Harga sensitivitas dihitung dengan rumus karber, yang dihitung harga negatif CPE. Negatif CPE berarti positif antibodi; kriteria perhitungan CPE sebagai berikut :

$$\text{Log } 10 \text{ end point dilution} = \left[X_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r_i}{n_i} \right]$$

Where :

X_0 = *log 10 of the reciprocal of the lowest dilution at which all animals are positive.*

d = *log 10 of dilution factor*

n_i = *number of animals used at each individual dilution (after discounting accidental deaths)*

r_i = *number of positive animal (out of n_i)*

summation is started at dilution X_0

pengenceran yang digunakan adalah : *two fold dilution* (Bogel *et al.*, 1983).

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di daerah Lembang dan Cipelang Jawa Barat, pengerjaannya di Laboratorium Research dan

Pengembangan Pusat Veterinaria Farma Jl. A. Yani 68 - 70
Surabaya.

4.4.2. Waktu Penelitian

Bulan Pebruari 2000 sampai dengan April 2000

4.5. Bahan

4.5.1. Virus

Pada penelitian ini digunakan virus *EBL galur lokal* yang diperoleh dari BPMSOH Gunung Sindur Bogor pada tahun 1995. Virus mempunyai *buoyant density* 1,18 gram / ml. Virus yang diterima pada pasasi 15 dan dikembangkan sampai dengan pasasi 24; disimpan di dalam Revco (- 80⁰ C)

4.5.2. Sel (Biakan jaringan)

Biakan jaringan yang digunakan adalah OL.

4.5.3. Media

1. Media eagle 90 % ditambah serum sapi 10 %, digunakan untuk pengembangan biakan jaringan (Tabel 1.)
2. Media RPMI 98 % ditambah FCS 2 %, digunakan untuk pengembangan virus *EBL galur lokal*. (Tabel 2.)

4.5.4. Hewan Percobaan

Domba muda sampai dengan umur 1 bulan yang dibeli dari RPH Pegirian Surabaya.

Kelinci jantan dengan berat badan minimal 4 kilogram (sesuai dengan Harlow, 1988).

4.5.5. Agar difusi

Agar difusi yang digunakan untuk uji presipitasi, adalah agarose ditambah dengan beberapa macam bahan kimia.

4.6. Alat

Agar diperoleh data yang sesuai dengan tujuan penelitian ini, maka digunakan alat penelitian dalam pengambilan data yang meliputi antara lain :

1. Laminar flow : adalah tempat untuk mengerjakan pengembangan sel (biakan jaringan dan pengembangan virus.
2. *Microscope Inverted* cahaya : untuk melihat perkembangan sel dan perkembangan virus.
3. Tabung kokusan, botol roux, Erlen Meyer, Beker Gelas, Pipet : adalah alat-alat yang digunakan untuk pengerjaan sel dan virus.
4. 'Stirer' : alat untuk memutar *seed* sel dan *seed* virus, serta pengerjaan dialisa.
5. Centrifuge ; alat untuk mencentrifuge hasil sel dan hasil virus.

6. Water batch : alat penghangat media virus dan sel
7. Ultra centrifuge ; alat yang digunakan untuk memutar virus.
8. Puncher ; alat pelubang agar difusi
9. Elektroforesis : alat untuk mengidentifikasi berat molekul virus yang digabung dengan SDS-PAGE.
10. *Chromatography* : alat untuk memurnikan virus.

4.7. Kandang Hewan Percobaan

- 4.7.1. Empat ekor kelinci dipelihara pada empat kurungan kandang besi, masing-masing berukuran 70 x 120 cm, masing-masing kurungan diisi 1 ekor kelinci; yang terdiri dari 3 ekor kelinci dengan perlakuan, dan 1 ekor kelinci sebagai kontrol.
- 4.7.2. Domba muda dipelihara dalam 3 kandang tembok yang berukuran 4 x 3 m; masing-masing kandang diisi 1 ekor domba muda, yang terdiri dari 2 ekor domba muda dengan perlakuan ; dan 1 ekor domba muda sebagai kontrol.

4.8. Cara Kerja

4.8.1. Pengembangan sel

Seed sel diambil dari revco dicairkan, *dicentrifuge*, kemudian endapannya diberi media penumbuh sel. Dimasukkan ke dalam botol roux, diinkubasikan dalam suhu 37⁰ C selama 2 hari sampai

Tabel 2. Media RPMI untuk pengembangan virus

Nama Bahan	Jumlah Gram / Liter
Calcium Nitrat 4 H ₂ O	0,1
Magnesium Sulfate (Anhydrous)	0,04884
Potassium Chloride	0,4
Sodium Chloride	5,9
Sodium Phosphate dibasic (Anhydrous)	0,8
L-Arginine	0,2
L-Asparagine (Anhydrous)	0,05
L-Aspartic Acid	0,02
L-Cystine 2 HCl	0,0652
L-Glutamine Acid	0,02
L-Glutamine	0,3
Glycine	0,01
L-Histidine	0,015
L-Hydroxy proline	0,02
L-Isoleucine	0,05
L-Leocine	0,05
L-Lycine HCl	0,04
L-Methionine	0,015
L-Phenylalanine	0,015
L-Proline	0,02
L-Serin	0,03
L-Thrionine	0,02
L-Tryptophan	0,005
L-Tyrosine 2 Na 2H ₂ O	0,02883
L-Valine	0,02
D-Biotine	0,0002
Choline Chloride	0,003
Folic Acid	0,001
Myo Inositol	0,035
Niacinamide	0,001
P-Amino Benzoic Acid	0,001
D-Pantothenic Acid (Hemicalcium)	0,00025
Pyridoxine HCl	0,01
Riboflavine	0,0002
Thiamine HCl	0,001
Vit B ₁₂	0,000005
D-Glucose	4,5
Glutathione (reduced)	0,001
HEPES	3,5745
Phenol Red	0,0053

Sumber : Bogel et al., (1989)

sel telah penuh di permukaan botol (*Confluent*) kemudian dipanen. Setelah itu dibuat pengembangan sel dengan jalan *splitting*. (Gambar 4.1)

4.8.2. Pengembangan Virus

Sel yang *confluent* diinokulasi dengan virus *EBL galur lokal* sebanyak 5 ml untuk setiap botol roux, diinkubasikan dalam suhu 37° C selama 1 jam; kemudian ditambahkan media pengembangan virus sebanyak 125 ml. Setelah itu diinkubasikan lagi selama 5 – 7 hari sampai dengan terlihat adanya CPE. Bila CPE telah mencapai > 90% maka virus dipanen. Diinaktivasi dengan bahan inaktivan yang ada. Kemudian diadakan pemurnian melalui proses pemurnian yang ada. (Gambar 2.)

4.8.3. Pembuatan serum referen

Virus *EBL galur lokal* disuntikkan pada hewan kelinci sebanyak 4 ml, yang terdiri dari 2 ml virus ditambah 2 ml Freund adjuvan. Kemudian disuntikkan ke sembilan lokasi di daerah punggung (Harlow, 1988), dieramkan selama 7 hari kemudian disuntikkan kembali virus *EBL galur lokal* dengan dosis yang sama (*booster*) dieramkan selama 28 hari kemudian diambil darahnya, di *centrifuge* untuk mendapatkan serum referen.

Tabel 2. Media RPMI untuk pengembangan virus

Nama Bahan	Jumlah Gram / Liter
Calcium Nitrat 4 H ₂ O	0,1
Magnesium Sulfate (Anhydrous)	0,04884
Potassium Chloride	0,4
Sodium Chloride	5,9
Sodium Phosphate dibasic (Anhydrous)	0,8
L-Arginine	0,2
L-Asparagine (Anhydrous)	0,05
L-Aspartic Acid	0,02
L-Cystine 2 HCl	0,0652
L-Glutamine Acid	0,02
L-Glutamine	0,3
Glycine	0,01
L-Histidine	0,015
L-Hydroxy proline	0,02
L-Isoleucine	0,05
L-Leocine	0,05
L-Lycine HCl	0,04
L-Methionine	0,015
L-Phenylalanine	0,015
L-Proline	0,02
L-Serin	0,03
L-Thrionine	0,02
L-Tryptophan	0,005
L-Tyrosine 2 Na 2H ₂ O	0,02883
L-Valine	0,02
D-Biotine	0,0002
Choline Chloride	0,003
Folic Acid	0,001
Myo Inositol	0,035
Niacinamide	0,001
P-Amino Benzoic Acid	0,001
D-Pantothenic Acid (Hemicalcium)	0,00025
Pyridoxine HCl	0,01
Riboflavine	0,0002
Thiamine HCl	0,001
Vit B ₁₂	0,000005
D-Glucose	4,5
Glutathione (reduced)	0,001
HEPES	3,5745
Phenol Red	0,0053

Sumber : Bogel et al., (1989)

4.8.4. Pembuatan serum kontrol positif kuat, serum kontrol positif lemah dan serum negatif

Virus *EBL galur lokal* disuntikkan pada domba muda dieramkan selama 7 hari, setelah itu di *booster* dieramkan selama 28 hari dipanen darahnya, di *centrifuge* untuk mendapatkan serum kontrol positif kuat. Untuk serum kontrol positif lemah darah diambil pada hari ketujuh setelah penyuntikan virus. Sedangkan untuk serum kontrol negatif diambil dari domba muda yang sehat tanpa perlakuan.

4.8.5. Pembuatan pengencer buffer

Pengencer buffer dibuat dari posphat buffer saline ditambah calsium dan magnesium.

4.8.6. Pembuatan agar *ouchterlony*

Agar *ouchterlony* dibuat dari agarose dicampur dengan beberapa bahan kimia.

4.8.7. Uji presipitasi dengan agar *ouchterlony*

Dibuat agar difusi kemudian dituang ke dalam piringan gelas berdiameter 10 cm, dilubangi dengan alat puncher sebanyak 6 sumuran di tepi dan 1 sumuran di tengah. Satu sumuran di tengah diisi dengan antigen dan 6 sumuran di tepi diisi dengan

serum kontrol positif kuat, serum kontrol positif lemah, serum negatif; dan 3 sumuran diisi dengan serum referen. Bila hasil uji Imuno Diagnostik fusi positif *EBL* maka akan terbentuk garis presipitasi yang lurus, terang dan jelas.

4.8.8. Pembotolan

Dalam satu Perangkat *EBL galur lokal* berisi sebagai berikut :

1 botol antigen murni sebanyak	3 ml.
1 botol serum referen sebanyak	10 ml
1 botol serum kontrol positif kuat	1 ml.
1 botol serum kontrol positif lemah	1 ml
1 botol serum kontrol negatif	1 ml
1 botol pengencer buffer	20 ml
1 botol agar <i>ouchterlony</i>	100 ml

4.8.9. Proses kering beku

1. *Vial* yang berisi suspensi-suspensi perangkat *EBL galur lokal* dimasukkan ke dalam *freeze dryer* untuk dikering bekukan selama 24 jam.
2. Dilakukan penutupan *vial* dalam *freeze dryer*.

4.8.10. Penutupan *vial*.

1. *Vial* yang telah tertutup karet diberi tutup aluminium dengan alat *bottling machine*

2. *Vial* diberi label

4.9. Pengujian

4.9.1. Uji sterilitas

Uji sterilitas menggunakan agar nutrien dan agar broth yang ditetesi dengan suspensi sel dan suspensi virus diinkubasikan selama 7 – 14 hari. Tidak terdapat pertumbuhan kuman pada agar-agar tersebut (steril).

4.9.2. Uji Keamanan

Digunakan untuk mengetahui apakah virus tersebut sudah inaktif :

- a. Dilakukan pada sel monolayer, virus yang sudah inaktif ditanam pada sel kemudian diobservasi adanya CPE. Bila inaktif harus tidak terbentuk CPE. Transfer sampai dua kali, hasilnya harus baik (negatif CPE).
- b. Dilakukan pada anak tikus umur 5-7 hari. Virus inaktif disuntikkan pada anak tikus sebanyak 0,02 sampai 0,03 ml per ekor diobservasi selama 5 hari, harus tidak ada kematian dari anak-anak tikus tersebut, artinya hasil inoquity baik (Tabel 9).

4.9.3. Uji Stabilitas

Materi perangkat ditempatkan pada temperatur kamar ($25^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$) pada 1,2,3 dan 4 minggu kemudian dilakukan uji presipitasi agar *aouchterlony* ulangan, dengan prosedur yang sama pada petunjuk uji presipitasi agar *aouchterlony*.

4.9.4. Prosedur pengumpulan data

1. Mencari harga sensitivitas yang tepat
2. Mencari harga spesipisitas yang tepat
3. Membandingkan hasil uji serologi agar *aouchterlony* serum lapangan dari sapi Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang dan Cipelang Jawa Barat dengan menggunakan perangkat antigen *EBL galur lokal* dengan yang telah dipasarkan

4.9.5. Metode analisis data

Untuk menguji hipotesis dalam penelitian ini maka dalam analisis data digunakan uji statistika yaitu : Uji CHI-SQUARE. Hasil uji bermakna bila diperoleh harga $P \leq 0,05$ (Steel dan Torrie, 1980).

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Isolasi dan Uji *Postulat Koch* virus *EBL* galur lokal

Virus *EBL* yang didapat dari BPMSOII (lapangan) pasasi 15, diisolasi dan diadakan uji *postulat koch* untuk mengetahui keberadaan virus *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 diatas 22 rata-rata *CPE* melebihi 90 % dengan masa inkubasi selama 5 hari (tabel 7).

Tabel 7. Hasil Inokulasi virus *EBL* pada biakan jaringan OL.

No. Pasasi	Masa Inkubasi/hari	Prosentase <i>CPE</i>					
		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 prosentase *CPE*

Uji *Postulat koch* dilakukan dengan menyuntikkan virus *EBL* pada domba muda dengan dosis 10 ml /sub cutan per ekor, yang disuntikkan pada bagian punggung. Dieramkan selama 7 – 14 hari dan terlihat adanya gejala-gejala klinis dari penyakit *EBL* pada domba tersebut (gambar 8.1, 8.2, 9 dan 10).

Tabel 8. 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	SERUM KONTROL (PADA DOMBA MUDA)		
	Perlakuan				Positif	Positif lemah	Negatif
Pembengkakan Kelenjar Getah Bening	+	+	+	-	+	+	-
Pembengkakan Hati	+	+	+	-	+	+	-
Penebalan Sub Mucosa Lambung (<i>Ulcerasi</i>)	+	+	+	-	+	+	-
Jumlah Sel Limfosit/ m^3	*	*	*	*	11.762	9.836	4.010

Keterangan: * tidak dihitung

5.1.2. Hasil Titration Virus *EBL* Yang Dihitung Dengan Metode Karber ($TCID_{50}/ml$) Terhadap Biakan Jaringan OL

Virus *EBL* dari hasil inokulasi pada biakan jaringan OL dikumpulkan menjadi 1000 ml, dari 10 botol roux besar. Setelah dipisahkan dari debris sel dengan jalan dicentrifuge pada 1.500 rpm selama 15 menit, maka virus *EBL* dititration. Dari hasil titration didapat titer yang tinggi dimulai dari pasasi 22 yaitu $10^{7.4} TCID_{50}$. Sedangkan pada pasasi 16 titer masih rendah yaitu yaitu $10^{4.4} TCID_{50}$. Sedangkan titer

yang paling tinggi di sini adalah pada pasasi ke 29 yaitu $10^{8.2}$ TCID₅₀ Titrasi dilakukan pada mikroplate 96 sumuran , dengan pengenceran *ten fold dilution* (Tabel 9)

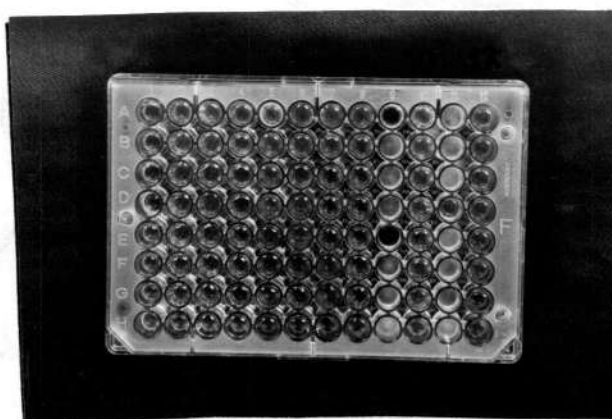
Tabel 9. Hasil Titrasi virus *EBL* pada biakan jaringan OL

Perla kuan	Pasasi													
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Biakan jaringan OL														
Dosis ino kulasi / ml	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Masa inkubasi (hari)	6	6	5	5	5	4	4	3	3	2	2	2	2	2
Jumlah suspensi virus (ml)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Titer virus (TCID ₅₀)	$10^{4.4}$	$10^{4.6}$	10^5	$10^{6.2}$	$10^{6.6}$	10^7	$10^{7.4}$	$10^{7.4}$	$10^{7.8}$	$10^{7.8}$	$10^{7.8}$	$10^{7.8}$	$10^{7.8}$	$10^{8.2}$

5.1.3. Hasil Titer Antibodi Pada Biakan Jaringan *OL* Dengan Uji Serum Netralisasi

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

Hasil sensitivitas yang didapat dari antigen *EBL*, galur lokal dan antigen *EBL*, IAF Canada adalah sama, yaitu 98,75% (lampiran 15).



Keterangan : Sumuran yang berwarna kuning adalah -CPE (K)
 Sumuran yang berwarna merah adalah +CPE (M)
 Pada deretan sumuran nomer 12 adalah kontrol virus, dan deretan sumuran nomer 10 adalah kontrol sel.

5.1.4. Innocuity Test

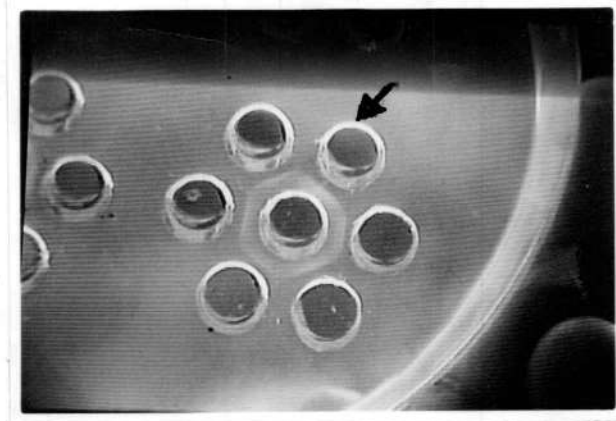
Digunakan untuk mengetahui apakah virus tersebut sudah inaktif.

- a. 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).

5.1.5. Hasil 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 10)



Gambar 4. Presipitasi pada pengenceran 1:1; 1:2 ; 1:4 ; 1:8; 1:16; 1:32.

Pada pengenceran pekat 1:1 garis presipitasi terlihat lebih tebal dan lebih terang; tetapi semakin tinggi pengenceran semakin tipis garis presipitasi yang terbentuk; karena antigen semakin kurang kepekatannya (gambar 4).

5.1.6. Hasil Uji Stabilitas

Perangkat antigen *EBL* galur lokal dan produk import ditempatkan pada temperatur kamar ($25^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$) pada 1,2,3 dan 4 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 import. Dengan uji *ouchterlony*, didapatkan hasil yang sama dengan hasil uji *ouchterlony* sebelumnya (Lampiran 8 dan 9).

Tabel 10 . Hasil 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

5.2. Analisis Data

Hasil analisis data tertera pada tabel 11

Tabel 11. Hasil presipitasi perangkat antigen *EBL* galur lokal dan perangkat antigen *EBL* IAF Canada dengan uji *ouchterlony*

Presipitasi	Galur		Jumlah
	Lokal	IAF Canada	
Positif	1 (1,25%)	1 (1,25%)	80
Negatif	79 (98,75%)	79 (98,75%)	80
Jumlah	80 (100%)	80 (100%)	160

Hasil uji : $\chi^2 = 0,51$ $p > 0,05$, tidak signifikan (lampiran 15)

BAB 6

PEMBAHASAN

EBL adalah penyakit ganas yang menyebabkan angka kematian 80 - 90%, dan menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup tinggi; sampai saat ini pengobatan maupun vaksinnnya belum ditemukan (Resang *et al.*, 1986; Burney *et al.*, 1987).

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 cutan; setelah melalui masa inkubasi 28 hari seperti *Hepato megali*, pembesaran lambung dan terlihat adanya nanah yang mengeras dan padat, berwarna putih kekuningan pada gambar 7.1.; 7.2., 8 dan 9 (Miller *et al.* 1979; Lannier *et al.*, 1991; Kresno, 1996).

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 gambar 5.1. dan 5.2. halaman 62. (Sugiura *et al.*, 1982; Bogel *et al.*, 1983; Trudel *et al.*, 1990).

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 Cutan. Pemberian dosis yang tepat untuk menghindari terjadinya imunotoleran (bila dosis terlalu kecil) atau *imuno supresif*

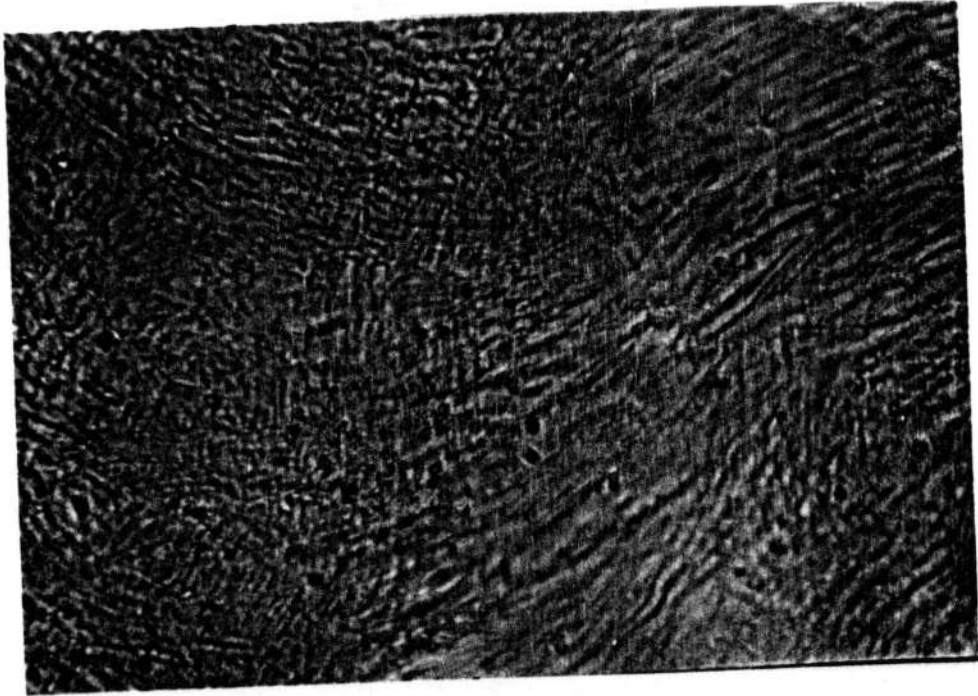
(bila dosis terlalu besar). Penambahan *adjuvant* didalam virus *EBL* pada penyuntikan kelinci, akan mempertinggi produksi antibodi. (Paffanovich *et al.*, 1983; Tizard, 1987; Sarjono, 1993).

Untuk mendiagnosis penyakit *EBL* menurut Miller, dan Van Der Meaten, 1979, 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 presipitasi 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 Conpenhagen tahun 1979, bahwa untuk diagnosis penyakit *EBL* adalah dengan menggunakan immunodiagnosis melalui uji *ouchterlony* dengan melihat adanya garis presipitasi (Miller *et al.*, 1979 ; Yasutomi *et al.*, 1987; Trainin *et al.*, 1990).

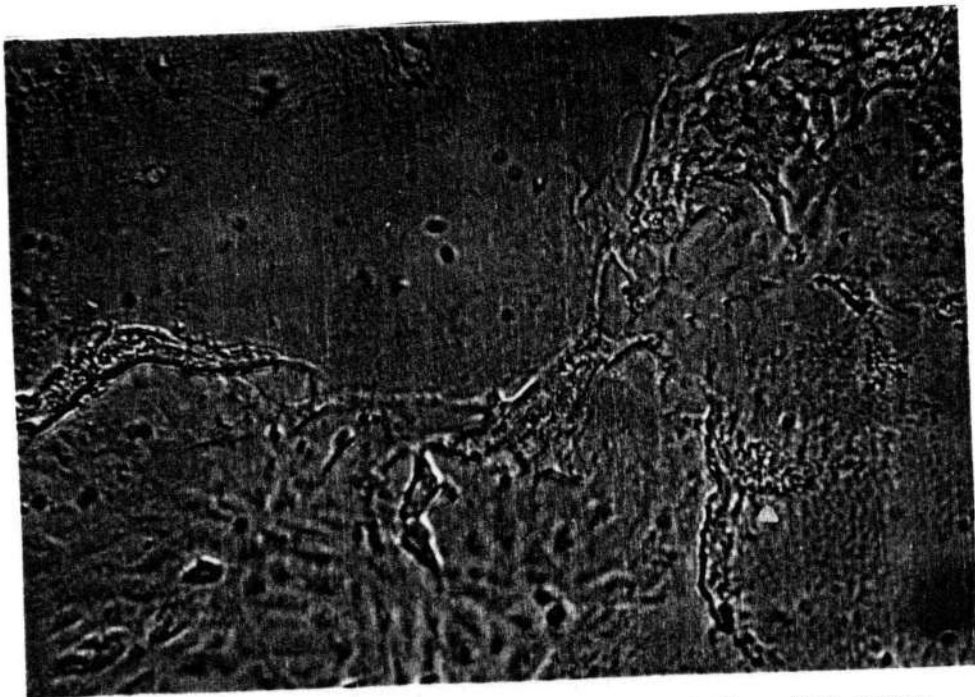
Pada uji *ouchterlony* yang diencerkan 1 : 2; 1 : 4; 1 : 8; 1 : 16; dan 1 : 32; didapat hasil positif sampai dengan pengenceran 1 : 32, yang berarti untuk penggunaan antigen dapat diencerkan 1 bagian antigen ditambah dengan 32 bagian PBS⁺. Pengenceran hanya sampai 1/32 karena pada pengenceran tersebut 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 ($25^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$) pada 1,2,3 dan 4 minggu, masih stabil karena sesuai pernyataan Miller *et al.*, 1979 bahwa virus *EBL* masih tahan hidup pada temperatur 50°C .

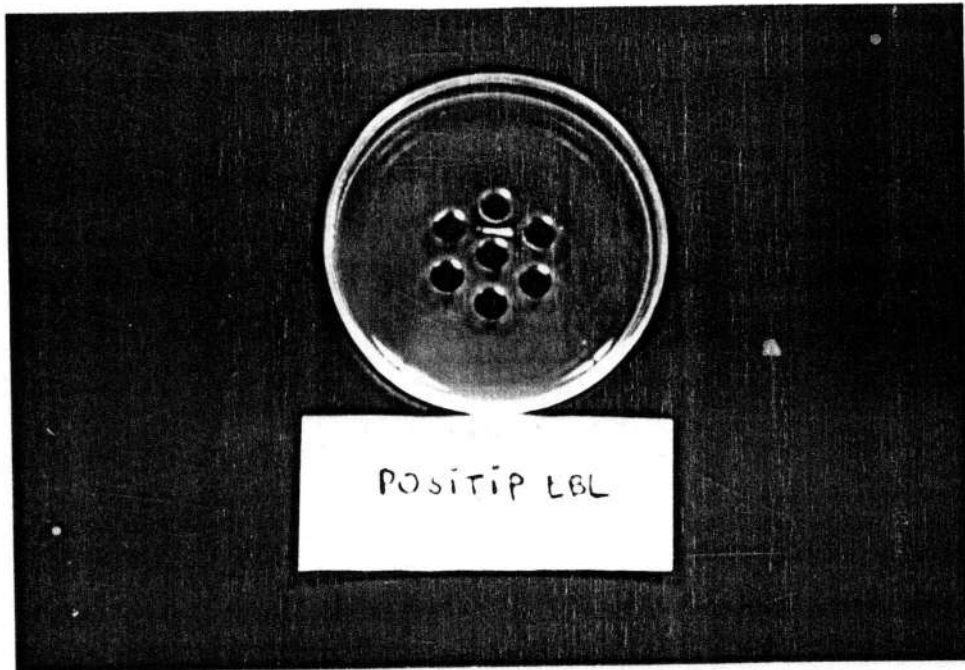
Hasil sensitivitas dan spesifisitas adalah 98,75%; berarti penelitian ini mempunyai nilai sensitiv dan spesifik yang baik ; untuk Perangkat antigen *EBL* galur lokal yang tidak berbeda dengan Perangkat antigen *EBL* produk IAF Canada sesuai dengan yang dikerjakan Onuma *et al.*, 1975 dan Philip *et al.*, 1976.



Gambar 5.1. Biakan Jaringan OL Normal yang *Confluent*



Gambar 5.2. Biakan Jaringan OL yang Terinfeksi Virus *EBV*. (*CPE*)



Gambar 6.1. Positif Virus *EBL* dengan Agar *Ouchterlony*



Gambar 6.2. Negatif Virus *EBL* dengan Agar *Ouchterlony*

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

1. Tidak ada perbedaan dari serum sapi potong pada uji *ouchterlony* dengan timbulnya garis presipitasi pada kedua Perangkat antigen *EBL* galur lokal dan produk IAF Canada.
2. Tidak ada perbedaan dari serum sapi potong dengan uji sensitivitas pada kedua Perangkat antigen *EBL* galur lokal dan produk IAF Canada.
3. Tidak ada perbedaan dari serum sapi potong dengan uji spesifisitas pada kedua Perangkat antigen *EBL* galur lokal dan produk IAF Canada.

7.2. Saran

1. Dengan diperolehnya Perangkat antigen *EBL* galur lokal yang tidak berbeda dengan Perangkat antigen *EBL* produk IAF Canada; maka Perangkat antigen *EBL* galur lokal dapat dipakai untuk diagnosis dini penyakit *EBL* di Indonesia.
2. Hasil penelitian ini merupakan sumbangan informasi mengenai cara terbaik untuk mencegah terjadinya wabah penyakit *EBL* di Indonesia dengan jalan mendiagnosis penyakit *EBL* sedini mungkin, dengan menggunakan Perangkat antigen *EBL* galur lokal; dan guna penelitian lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Poter j. S, (1991): *Celluler and Molecular Immunology*. USA WB Sounder's Company, p : 13 – 33
- Artama W. A, (1996) : *Metode Pembuatan Ekstrak Antigen Membran Sel*, PAU Biokimia UGM, Yogyakarta
- Benacerraf. B, Unanuc E R. (1980) : *Text Book of Immunology*, Willams and Wilikins, Baltimore London p : 80 – 89
- Bellanti j. A. (1993) : *Immunology III* (Wahab A S dkk, alih bahasa) *Immunology III*, Gajah Mada Univ. Press. Yogyakarta hal : 96 – 108, 180 – 184
- Bogel j. R. K dan Lorenz, (1983) : *Method's of calculation the sperman Karber Method federal Institut Faranimal virus Disease Tubingen Federal Republic of Germany*, p : 321 – 337
- Boisseou, j, Quentel. C. Pellen. J, Neugayoede, PH (1981); *Enzootic Bovine Leucosis : Preparation of antigen for agar gel Immunodiffusion test and statisticeal Comparison with other antigens*, Elseviers cienttifice in the Netherlands, Jpn, j Net. Microbiology (6) P : 247 – 257
- Baliga, C. Ferrer. j. F. Diglio. D. Graves. S. J. Kenyon. H. Mc Donald. C. piper and K. Wuu, (1976); *Recent – studies on the Characterization of the Bovine Leukimia Virus (BLV); development of new methods for the diagnosis of BLV Infection*. Vit. Microbiology (1) p : 158 – 184
- Brown A R, (1992) : *Immunological function of splenic B Limfocyte*, *Reu. Immuno II* (6), p : 395 – 417
- Benyamin E. Leskowitzs, (1991) : *Immunology Short Course 2 and edition*, New York : A John Wiley and Sons, Inc. Publication. p : 24 – 33

- Burney. A. Mamerickx, M, (1987) : *Enzootic Bovine Leucosis and Bovine Leucosis Virus*, Martinus Nij hooff Publishing Boston/Dordrenht/Lancafer, p : 3 – 44, 97 – 103
- Burke, CN and Rovozzo, (1973) : *A Manual of Basic Virological Techniques*, prentice – Hall, Inc, Engliwood Cliffs Nj. P : 39 – 48, 64 - 87
- BPM SOH, (1990) : *Pengujian Mutu Produk Biologik- Virus*, Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan. Gunung Sindur, Bogor, p : 20 – 23
- BPPH, (1998) : *Laporan Uji EBL di Yogyakarta dan sekitarnya* ed, Juni 1998
- Cockerell, (1986) : *Immunocompetence of Sheep experimentaly with Bovine Leucosis Virus*. *Vet. Imm and Immph* (13), p : 189 – 202
- Chesnut RW, Colon SM, Grey IIM, (1982) : *Antigen presentation by normal B cells, B Cell tumors, and macrophages : functional and biochemical Comparariasion*. *J. Immunol* 128 : 1764
- Castel BE, Khishimito. K, Stearns C, Brown ML, Kehri MR, (1993) : *j. Immunol* (151), p : 1777 – 1778
- Chopel H, Heney M, (1993); *Essential of Clinical immonology*, 3rd, cd, Blaackwell Scientific Publications London. Edinburg Boston Melbourne – Paris - Berlin Vienna, p : 108 – 110
- Cohen. C and R.G Tissot, (1991) : *The biological of the laboratory rabbit. Specialzed research applications : Serological genetics*. Academic Press Inc Sandiego, New York, p : 167 – 175
- Charles. A. Janewan j R, (1993) : *How the Immune System Recognizes*. *Scientific American Journal*, p : 73 – 75
- Dirjen Nak, (1977) : *Pedoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular*, jilid IV, Dirkeswan, Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian, Jakarta, hal : 1 – 4

- Djafar. M, (1985) : Pemeriksaan Enzootic Bovine Leucosis dengan metode agar gel diffusions test, Informasi penyakit hewan dari BPPH wilayah VII Maros (1), p: 3 – 9
- Driscoll, D. M. and Olson, C, (1977) : Bovine Leucosis Virus associated antigens in Lymphocyte cultures, A M, J. vet. Research (38), p : 197 – 199
- Ernawati . R. N. Sianita, A. P. Raharjo, F. A Rantam, Suwarno, W Tjahyaningsih, Y. Rahmadani, (1998) : Pedoman Pratikum Virologi FRH Unair
- Ferrer, j. K, Avila, L, Cobradilla, C, and Gupta, p, (1976) : Development of invitro infectivity assay for the C-type Bovine Leucosis Virus Can Research (36), p : 1069 - 1073
- Ferrer, j. K and Avilla, L, (1977) : Diagnosis of Bovine Leucosis Virus Infection; Evaluation of Serologic and Hematologic test by direct Infectivity detection assay. A M, j, vet. Research. Val 38, p : 12 – 18
- Garvey j. S, N. E Cremer and D. H. Sussdorfl, (1977) : Methods in Immunology, 3cd. W. A. Benyamin, Inc, Canada, p : 135- 210
- Gosselin E j, Tony. H P, Parker D C, (1988) : Characterization of antigen processing and presentation by resting B lymphocytes, j, Immunol (140), p : 1408 – 1413
- Goodman, j. w, (1991) : Immunogen and antigen specific, p : (101 – 120), In Daniel p. Stiles. Abbas,
- Heddle R. j, and Rowley . D, (1979) : Dog Immunologi bulins Immuno Chemical Charachterization of dog serum, Paratid Saliva, Colostrum, Milk and Small Bowel Fluid, Immunology (29), p : 185 – 195
- Harlow E, D. and D. Lane (1988) : Antibodies a laboratory manual cold spring Harbour Labaratory, p : 55 – 138
- Ishino, S. Nahara, S. Kono, Y. Sentsui, H, (1988); Experimental Infection of Bovine Leucosis Virus in Small, Laboratory Animal, National

- Institute on Animal Health, 1 – 3 Kannodai Sukuba, Ibaraki 305 Japan, *J. vet Sci* 50 (6), p : 1245 – 1251
- Johan, P, (1975) : *Cell and Tissue Culture* (Ed 5) Churchill Livingstone Edinburg London and New York, p : 261 – 290
- Jawetz, E, Melnick, j. L, Adelberg, E, A, (1982) : *Mikrobiologi untuk profesi kesehatan*, (dr. Gerard Bonang, alih bahasa) *Review of Medical Microbiology*, E. G. C Penerbit Buku Kedokteran, ATMAJAYA, Jakarta, hal : 463 – 490; 537 – 540
- Kuby, j, (1992) : *Immunology*, N, H, Freeman and Company, New York, p : 63 – 65, 142 – 178
- Kamani N. R Douglas. SD, (1991) : *Struktur and Development of Immun System* In : *Basic and Clinical Immunology* 7th edition. Edited by stiles D. P. Terr Al, New york : Prentice Hall International Inc p : 9 – 33
- Kresno. S. B, (1996) : *Immunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium* edisi ketiga, Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, p : 228 – 241; 268 – 280
- Lanier. L, (1991) : *Cell of the Immune respons : Lymphocyty and Mononuclear phogocyty*. In : *Basic and Clinical Immunology* 7th edition, USA : Pretice – Hall International, Inc
- Miller, j. M, Maaten, M. j, and Boothe, D, A, (1972) : *Brief Communication : precipitation antibody to an internal antigen of C – type virus associated with Bovine Lymphosarcoma*, *J N. C Ins*, p : 1450 – 1462
- Miller, j. M, and Marten, M. j, (1979) : *Infectivity test Secretions exretion from cattle infected with Bovine Leucosis Virus*. *J N. C Ins*, p : 125 – 428
- Miller, j. M, Marten, M. j, and Boothe, D. A, (1976) : *Serologic detection of Bovine Leucosis Virus Infection*. *Vet Mic* : (38), p : 195 – 202
- Macdonald, C. H, Graves C. D. and Ferrer. F, (1976) : *Detection, Qualitation, and Characterization of the Mayor Internal virion*

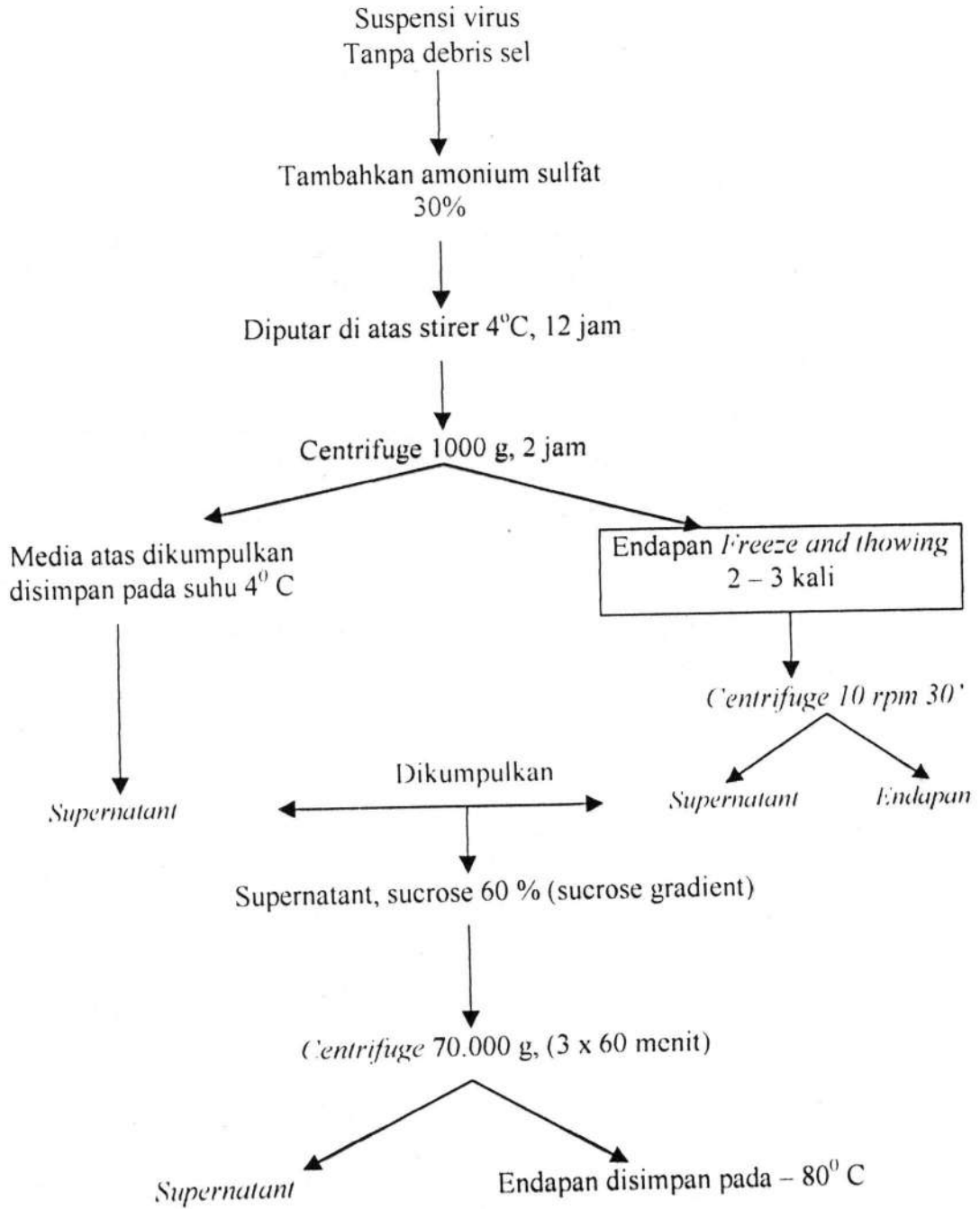
- antigen of the Bovine Leucosis Virus by radioimmunoassay J. N. C Ins, 57 (4), p : 875 – 882
- Nakajima, Hiroyuki, Oikawa, Shigeki Inumaru and Takeo Sugiura, (1982) : Immunodiffusion Studies in Bovine Leucosis Virus Jpn, J, vet. Sci 50 (6), p : 136 – 203
- Nisnoff. A. (1985) : Introduction to Molecular Immunology, 2nded Sanuer Associates. INC. Sunderland, Massachusetts Toppan Company Limited. Tokyo, p : 164 – 170, 201 – 202
- Onuma. M. and Olson. C, (1975) : Another Sensitive antigen associated Bovine Leucosis Virus Infection. J, N. C 55 (4), p :1155 – 1158
- Onuma. M. and Olson. C, (1977) ; Fetal Infection with Bovine Leucosis Virus in sheep Can, Research. 37 , p : 4057 – 4081
- Onuma. M. and Olson. C, (1981) : goat Lymphosarcoma from Bovine Leucemia Virus j. N. C. INS, p : 971 – 975
- Paul. P. S, Pameroy. K. A, Castro. A, E, Johnson. D, W. Muscoplat. C, and Sorensen, D. K, (1977) : Evidence for the Replication of Bovine Leucosis Virus in the B Lymphocytes Am. J. vet. Research
- Philip. M. Miller, j. M. and van der Marten, (1976) : Isolation of precipitating glycoprotein antigen from cell cultures persistently infected with Bovine Leucosis Virus. j. Nat. Can Ins, 60 : p : 213 – 217
- Porter. P, (1979) : Struktural and functional Characteristics of Immunoglobulins of the Commendomestic Species. Adv. Vet. Sci. Compamed (23), p : 1 – 21
- Parfanovich, V, zh dan ov, A. A, Lazarenko, E. M, Nommiyu, A. (1983) : The Possibility of Specific Protection against Bovine Leukimia Virus Infection Bovine Leukimia with Inactivated BLV. j. Br – vet (39), p : 137 – 146
- Resang, A. A, (1986) : Penyakit Viral pada hewan mamalia yang penting di Indonesia. Penerbit Universitas Indonesia I. U – I Press, hal : 110 – 119



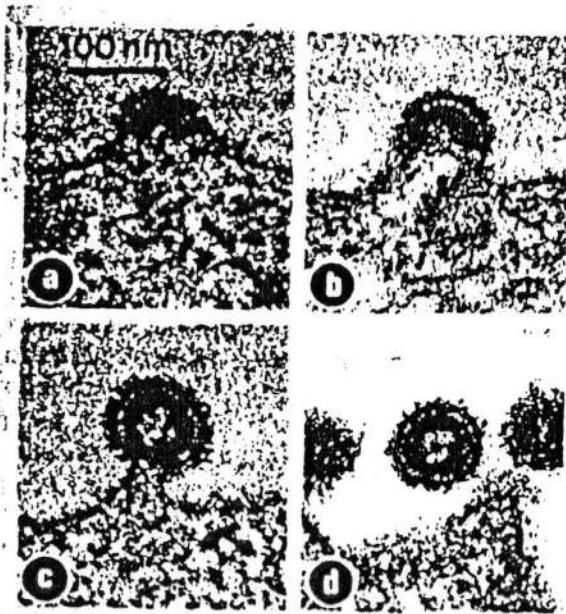
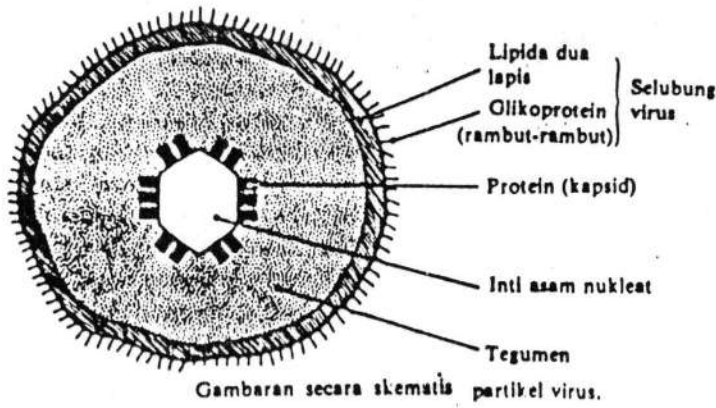
- Roitt, I. M. (1985) : Immunology. Printed in Hongkong by Mandarin offset Marketing (HK) Ltd, p : 3.1 – 3.8
- Roitt, I. M. (1994) : Essential Immunology, ed8. Balckwell Scientific Publications USA 54 University Street, Carition Victoria 3053 Australia, p : 81 – 92
- Roitt, I. M, Brostoff. Male, j D. K, (1996) : Immunology ed4. Blushed by Mosby an Imprint af Times Miror International (Publisher Limited) p : 3.1 – 4. 10
- Raharjo, E. (1988) : Laporan Pengujian Penyakit EBL pada sapi di Balai Inseminasi Buatan. Lembang dan sekitarnya.
- Schlesseiman, J.J; Stoilley, P.D. (1982) : Case control Studies Design, Conduct. Analisis New Tork, Oxford. Oxford University Press p : 144-170.
- Steel, G.D, Robert and Torrie, H. James. (1980) : Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik, P.T. Gramedia Pustaka Utama : p. 71 – 82.
- Sardjono, B, (1993) : Virus Patogen Hewan. Kursus singkat Virologi 4 Januari – 3 Pebruari 1993, PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Trainin, Z., Bernstein, S, Rosental and Berner J. (1990) : The Fat of Milk From Dairy Cattle Infected With Bovine Leucosis Virus, J. Vet. Research Communications (14) p : 167-171.
- Trudel, M. and Payment, P. (1990) : Concentartion and Purification of Virueses by Moleculer Filtration and Ultracentrifugation Methods, centre de Recherche and Virologie Institut Armand Frappier C.P. 100. Loyal. Quebec, Canada, J. Vet. Sci (34) p : 436-448.
- Tizard, I. (1982) : Pengantar Imunologi Veteriner WB Sunders Company Philadelphia, London, Toronto, Mexico City. p : 281 – 302.
- Weiland, F. and Straub, O.C. (1977) : In Bovine Leucosis : Various Methods of Moleculer Virology (A. Burny, ad), Commission Of The European Communities, Luxembourg. p : 405-432.

Yasutomi. Y, Takashi. K, Kurosawa. T, Sonada. M, (1987) : Early
Diagnosis of Enzootic Bovine Leucosis. J. vet. Sci 49(6). p : 957-
963

Zainuddin. M. (1988) : Metodologi Penelitian. Surabaya, hal : 75 – 76.

PEMURNIAN VIRUS EBL :

Sumber : (Miller *et al.*, 1979; Trudel *et al.*, 1990)



Gambar : 2. onkorna virus
Virus menjadi matang dalam biakan jaringan virus secara terus – menerus dilepaskan dari sel oleh penonjolan dari selaput sel.

Sumber : (Jawatz, *et al.*, 1982; Bellanti, 1993)

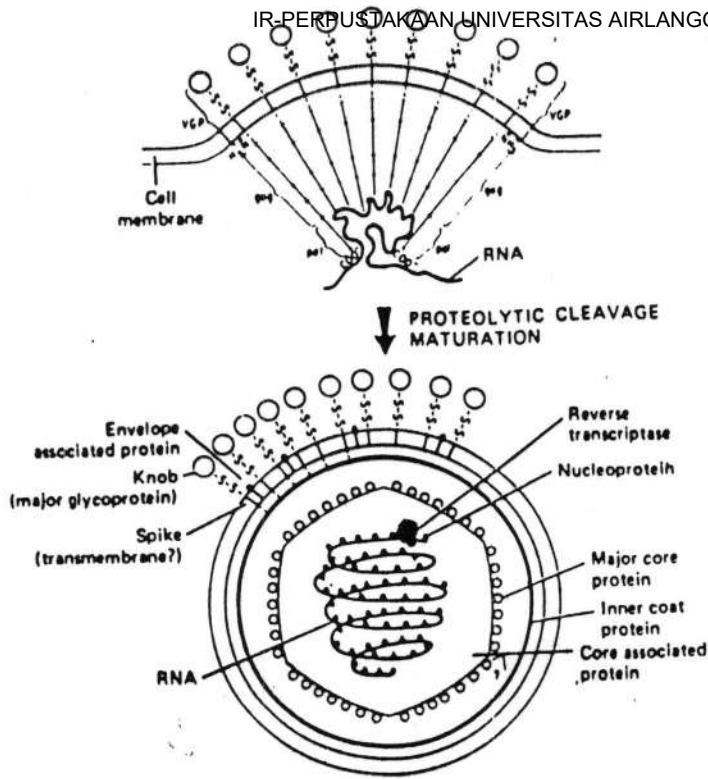


Diagram skematik dari mekanisme perakitan suatu virus onkorna tipe C. Komponen pembungkus virus disisipkan pada selaput sel, pada tempat dari mana virus akan menonjol keluar. Molekul-molekul pendahulu "gag" yang tidak dibelah, yang mengandung polipeptida virus internal, bergerak ke tempat penonjolan; satu ujung molekul berhubungan dengan kompleks pembungkus dan ujung lainnya dengan ARN virus. Enzim proteolitik membelah molekul-molekul pendahulu untuk menghasilkan polipeptida virus masing-masing, komponen-komponen menyusun diri sendiri untuk membentuk substruktur yang sesuai, dan virion yang matang menonjol keluar dari sel.

Gambar 3 : Virus Onkorna Tipe C

Sumber : (Jawatz, *et al.*, 1982)

Lampiran : Rencana Liflet

Rencana Brosur / Liflet : Perangkat

Antigen Enzootic Bovine Leucosis Gp60 galur lokal

INDIKASI

Perangkat EBL adalah perangkat untuk diagnosa serologis dari virus Bovine Leucemia. Tiap perangkat cukup untuk menguji 90 sampel serum dan 30 kontrol dengan menggunakan agar difusi (AGPT).

Perangkat EBL hanya untuk diagnosa hewan.

KOMPOSISI

Perangkat diformulasikan dalam bentuk kering beku, setiap dosisnya 0,05 – 0,08 ml ditetaskan kedalam sumuran agar difusi.

DOSIS DAN CARA PENGGUNAAN

Satu Perangkat EBL berisi 6 komponen dalam bentuk kering beku termasuk bahan pelarut untuk mencairkan komponen tersebut. Tiap lubang dalam AGPT dapat diisi masing-masing 0,05 sampai 0,08 ml.

Penggunaan sebagai berikut :

Membuat lapisan agar tipis pada plate gelas yang berdiameter 10 cm (AGPT) sebanyak 15 ml dibiarkan dingin sampai lebih kurang 1 jam, sampai dengan

terbentuk gel. Untuk menuangkan dibuat ketebalan yang rata dari gel tersebut. Pembuatan sumuran pada gel atau pada agar, dengan alat pelobang/puncher dari logam anti karat dibuat sedemikian rupa sehingga jarak antara sumuran satu dengan lainnya 3 mm. Dimana terdiri dari 1 sumuran di tengah dan 6 sumuran di sekelilingnya. Penampang sumuran setelah dicetak berdiameter 7 mm, dan untuk membersihkan sisa-sisa agar pada sumuran tersebut disedot dengan pompa vakum. Pengisian sumuran seaseptis mungkin, sumuran bagian tengah (7) diisi dengan antigen 0,08 ml. Sumuran 2, 4, 6 diisi dengan serum referen masing-masing 0,08 ml. Sumuran 1, 3, 5 diisi dengan serum yang akan diuji masing-masing 0,08 ml (rata pada permukaan agar). Diinkubasikan pada suhu kamar (kurang lebih 27 – 28o C), selama 48 jam dalam ruangan yang tertutup dan lembab atau inkubator CO2 dengan dialasi dengan kertas sari basah dalam kotak yang tertutup.

Kontrol serum :

Untuk setiap kali pengujian dibuat satu kontrol dengan perlakuan sebagai berikut :

Sumuran bagian tengah (7) diisi dengan antigen 0,08 ml dan sumuran nomor (1) diisi dengan serum negatip (-) 0,08 ml, sumuran nomor (3) dengan serum positip lemah (-) 0,08 ml, dan sumuran nomor (5) dengan serum positip (+) 0,08 ml, sumuran nomor 2, 4, 6, masing-masing 0,08 ml referen serum.

Pembacaan hasil :

Pertama dilakukan pada bagian kontrol, selanjutnya pembacaan pada bagian serum yang diuji.

Reaksi positif membentuk garis-garis presipitat yang terletak antara antigen dengan serum yang diuji, sedang serum negatif tidak akan memperlihatkan garis presipitat.

KEMASAN

Setiap perangkat terdiri dari :

Antigen Bovine Leucosis	1 x 3 ml	vial no. 1
Serum referen	1 x 10 ml	vial no. 2
Serum kontrol positif	1 x 1 ml	vial no. 3
Serum kontrol negatif	1 x 1 ml	vial no. 4
Serum kontrol positif lemah	1 x 1 ml	vial no. 5
Pelarut buffer	1 x 20 ml	vial no. 6

PENYIMPANAN

Simpan dalam lemari es pada suhu 2 - 8° C

Selama peredaran sebaiknya berada pada suhu 2 - 8° C

Kecuali pelarut buffer (diluen), seluruh perangkat EBL setelah pemakaian pertama

Sebaiknya disimpan pada suhu -20°C.

PERANGKAT HANYA UNTUK DIAGNOSA HEWAN

HARUS DENGAN RESEP DOKTER HEWAN

Lampiran 2. : Bahan agar difusi**A G P T (Agar Gell Presipitasi)**

R/ NaCl	9 gram
KCl	0,037 gram
Na ₂ HPO ₄	0,01 gram
GLUKOSA	0,1 gram
TRIS	0,3 gram
HCl	0,18 ml
NaN ₃	0,2 gram
AQUADEST	100 ml
AGAR NOBLE	1 %

Lampiran 3 : Persiapan Elektroforesis

SDS PAGE UNTUK ESTIMASI PROTEIN

1. Mencetak Running Gel

Bahan-bahan untuk membuat running gel dicampur jadi satu sampai homogen, dengan cepat masukkan kedalam gelas plate yang telah diberi spacer, fiksasi sedemikian rupa agar hasil running gel rata. Untuk meratakan bagian atas running gel diberi Butanol secukupnya, inkubasi selama 25 menit agar running gel memadat. Setelah running gel memadat, cuci butanol yang ada diatas running gel tadi dengan elektroporosis bufer yang sudah diencerkan 10 kali. Bersih dan keringkan dengan kertas filter (Whatman).

2. Mencetak Stacking Gel

Seperti cara running gel, setelah bahan stacking gel tercampur menjadi satu dan homogen, tuangkan pada cetakan running gel, lalu masukkan comb. Inkubasi selama 25 menit sampai stacking gel padat. Lepaskan comb cuci stacking gel dengan elektroforesis buffer dan bersihkan dari sisa-sisa gel.

3. Menyiapkan Sampel

Thowing sel lysat kemudian ambil 20 (l dan campurkan dengan buffer sebanyak 20 (l (buffer sebagai indikator warna). Panaskan pada suhu 100 C selama 5 menit. Sebelumnya tutup eppendarft tube diberi lubang.

4. Elektroforesis

Pasang gelas plate pada elektrophoresis (sebelum lepas spacenya). Fiksasi plate dengan baik, tuangkan sampel dan merker pada stacking gel. Pasang elektrophoresis.

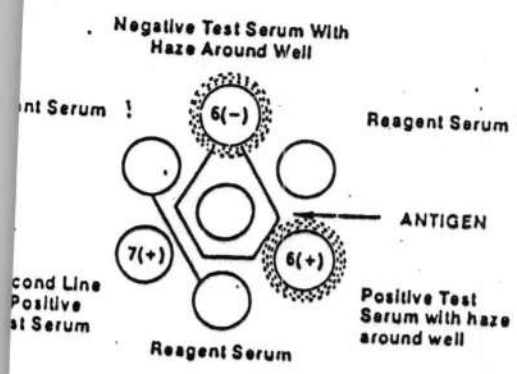
Apabila sampel masih berada pada stacking gel, voltase dipasang 40V, 10mA dan apabila sampel telah melewati stacking gel voltase dipasang 120V, 25 mA.

Tunggu sampai sampel turun melewati gel. Yang perlu diperhatikan jangan sampai ada gelembung udara.

Hasil elektrophoresis diproses dalam beberapa tahap : tahap pertama pencucian dengan methanol 50% dan asam asetat 7,5 (l dalam 200 ml aquadest selama 30 menit. Tahap kedua pencucian dengan methanol 5% dan asam asetat 7.5 % dalam 200 ml aquadest selama 30 menit. Tahap ketiga pencucian dengan glutaraldehyd 10% dalam 200 ml aquadest selama 30 menit. Tahap keempat pencucian dengan aquadest 200 ml selama 30 menit sebanyak 3 kali. Tahap kelima pewarna gel dimasukkan dan ditunggu 15 menit. Tahap keenam pencucian dengan aquadest 200 ml.

FIGURE 4

Test Pattern Reactions Seen with Serums Causing Haze In Agar and Those Producing a Second Line



Bovine Leukemia Glycoprotein Immunodiffusion Antigen, OVINE CELL LINE ORIGIN

Reagent Serum and Reference Serums, BOVINE ORIGIN

Leukassay[®] B

DESCRIPTION: The immunodiffusion test using a glycoprotein antigen of the virus for the diagnosis of bovine leukemia virus infection was described by Miller and Van Der Maaten.¹ The Bovine Leukemia Glycoprotein Immunodiffusion (BL-GID) kit contains the following: glycoprotein antigen, antigen diluent, reagent serum, negative, weak positive, and positive reference serums.

GENERAL INFORMATION: The BL-GID test is a serological test for detecting animals infected with bovine leukemia virus. The test indicates the presence of specific antibody to a glycoprotein antigen of bovine leukemia virus (BLV). This antibody appears 8 to 12 weeks after an animal is experimentally infected. A negative test, therefore, indicates freedom from infection 12 weeks prior to sampling. All negative animals exposed to possible sources of infection should be isolated and retested at regular intervals until two consecutive negative tests at 12 week intervals have been obtained. Only in this manner can one obtain a truly negative group of animals. These animals are then considered and expected to remain free of bovine leukemia virus unless exposed.

Positive serology is not evidence that tumor formation will occur because it is widely recognized that tumor formation is the infrequent rather than the usual result of infection with oncogenic viruses.

Bovine leukemia virus is an insidious agent which may infect up to 90% of the cattle in a herd. Clinical signs may not be apparent in such herds since the symptoms generally do not occur in young stock (animals up to 5 years of age). Symptoms of the disease may include enlarged lymph nodes, lymphoid tumors, loss of condition, lymphocytosis, drop in milk production, paralysis, infertility and gastrointestinal signs. These signs generally occur in older animals (over 5 years of age). Economic losses result from the above signs. Another economic effect of the disease is caused by importation regulations imposed by some countries requiring that cattle be from herds known to be free of bovine leukemia for a specified time period.

The basis for the BL-GID test is concurrent migration of the antigen and antibody toward each other through an agar containing a high salt concentration. High salt concentration is necessary to enhance the formation of the immunoprecipitate. As the antigen and antibody specifically combine, they form a precipitate which is trapped in the gel matrix. This produces a visible immunoprecipitin line. The precipitin line forms where the concentration of antigen and antibody are optimal. An extreme variation in the concentration of either antibody or antigen will alter the location and appearance of the immunoprecipitin line. Other factors which may affect the immunoprecipitin reaction are variations in the electrolyte concentration, pH, and temperature. High levels of lipid in samples also may affect the formation of immunoprecipitin lines.

The antigen for the BL-GID test is a glycoprotein antigen obtained from a persistently infected ovine cell line. The reagent serum contains antibody to the glycoprotein antigen of bovine leukemia virus. It has the ability to form a specific immunoprecipitin line with the glycoprotein antigen. Three reference serums are provided with the kit which serve as guidance for interpretation of the virus reactions of unknown serums. These are 1) a negative reference serum which contains no antibody to the glycoprotein antigen of bovine leukemia virus. It does not form an immunoprecipitate, nor does it cause a deviation of the control line (see Figure 2). 2) A weak positive reference serum which contains a very low level of antibody to bovine leukemia virus glycoprotein antigen, and causes a deviation of the line so that it bends toward the antigen well, but does not form a line of identity, and merely hooks toward the antigen well (see Figure 2). 3) A positive reference serum which causes an immunoprecipitin line with the antigen and forms a line of identity with the control line (see Figure 2).

INDICATIONS: The BL-GID test is used to determine if animals are infected with bovine leukemia virus by detecting the presence of serum antibody against a specific bovine leukemia virus glycoprotein antigen.

PRECAUTIONS: Store all reagents frozen after rehydration or first use. Antigen and accompanying reagent serum have been standardized and should be used together. Use a negative, positive and weak positive reference serum in one pattern on each plate where these would replace the test serum to assure proper sensitivity of the test. (see Figures 1 and 2). Fill all wells properly as described under 3 of preparation and use. Do not allow reagents to stand at room temperature for excessive periods of time while performing tests. Handle all reagents and their equipment as if capable of transmitting bovine leukemia. Contains sodium azide, gentamicin and a fungistat as preservatives. Burn all containers and all unused contents. Autoclave all disposable test components and test specimens after use.

*Trademark

the results by accurately drawing on a printed pattern.

Interpretation of the Test

It is generally accepted that BLV infected cattle are virus carriers for life. An adult animal that is positive on the immunodiffusion test should be considered to be infected. Positive serology is not evidence that tumor formation will occur because it is widely recognized that tumor formation is not rather than the usual result of infection with oncogenic viruses. Therefore, a positive test, therefore, indicates freedom from infection 12 weeks prior to sampling. All negative animals exposed to possible sources of infection should be isolated and retested at regular intervals until two consecutive negative tests at 12 week intervals have been obtained. Only in this manner can one obtain a truly negative group of animals. These animals are then considered and expected to remain free of bovine leukemia virus unless exposed. For a satisfactory result, the reference serums must react as shown.

Interpretation of Reactions May Arise in Certain Cases:

Animals which have consumed colostrum from infected cows can be expected to have passive antibody which usually disappears by six months of age. Many calves, however, who nurse infected dams do not become infected with BLV virus.

Reactions have been observed during an incubation period. If a sample is obtained a month later, the reaction should be negative.

Infected cattle do not develop high levels of precipitating antibody. Therefore, retesting rarely alters the reaction strength. Questionable results collected in the continental USA should be sent to Pitman-Moore Diagnostic Laboratory for verification. DO NOT SUBMIT SAMPLES FROM OUTSIDE THE CONTINENTAL USA.

Deviation from the directions stated may give unreliable results.

Each kit contains enough antigen, reagent serum, and reference serums for 90 tests and 30 control tests as follows:

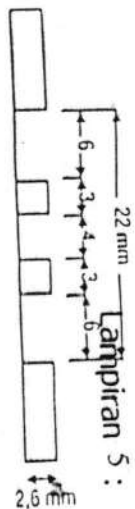
- Antigen—1ml (90 tests and 30 control tests)
- Diluent—3ml
- Reagent Serum—9ml (90 tests and 30 control tests)
- Reference Serum—1ml (10 control tests)
- Negative Reference Serum—1ml (10 control tests)
- Reference Serum—1ml (10 control tests)

Miller and Van Der Maaten, M. J.: Serological Detection of Bovine Leukemia Virus Infection, Proceedings of the 2nd CEC Seminar on Bovine Leukemia, Wageningen Oct. 17-18, 1975.

PITMAN-MOORE, INC.
WASHINGTON CROSSING, N.J. 08560

126,671 U.S. Veterinary License No. 284
 Printed in U.S.A.

Lampiran 4: **Liflet Kit Bovine Leukemia Glycoprotein produksi Pitman - More Inc USA**



Lifet Kit Bovine Leukemia AGIP produksi Rhone Merieux - Perancis

BOVINE LEUKOSIS ACID
SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF BOVINE LEUKOSIS

1. GENERAL

Cattle affected by enzootic Bovine Leukosis (EBL) may be carriers of the virus without presenting any apparent clinical symptoms. Nevertheless, all infected animals, sick or not, develop virus-specific antibodies. These antibodies generally appear 8 to 12 weeks after experimental infection. A negative serology test indicates that the animal has not been infected in the 12 weeks preceding the sampling.

The AGID bovine Leukosis immunodiffusion test reveals the presence of precipitating viral envelope glycoprotein (gp51) antibodies and to a lesser extent, the internal protein (p24) antibodies.

2. KIT PRESENTATION

One kit for 400 serodiagnosis contains :

- two vials of freeze-dried antigen to be reconstituted with 1.6 ml of diluent,
- two 2 ml vials of diluent for antigen reconstitution,
- three vials of freeze-dried positive reference serum (RS) to be reconstituted with 5 ml of diluent,
- three 5 ml vials of diluent for positive reference serum reconstitution,
- five 100 ml vials of agar for immunodiffusion. This media has precise values for pH and ionic force, allowing optimal immunodiffusion and/or precipitation.

3. TECHNIQUE

3.1 Materials (not furnished)

- Plate support : Standard Petri plates (90 mm diameter) in glass or plastic;
- Agar-cutter, made of 7 cutting cylinders arranged in circle in order to cut in the agar :
 - one 4 mm diameter central well,
 - six 6 mm diameter peripheral wells,
 - (3 mm distance between the edges of peripheral and central wells),
- Adjustable micropipette 20-100 µl (with disposable tips).

3.2 Agar preparation

The vial of agar is placed in a boiling water bath for 1.5 hrs. Once melted, the agar should be placed in a +56°C water bath for at least 1/2 hour.

The glass or plastic support plate is placed on a smooth horizontal surface. With the aid of a pre-beated pipette, distribute the agar in sufficient quantities in order to have a thickness of at least 2.6 mm. (19 ml of agar is needed for a standard 90 mm diameter Petri plate). Let the agar cool and solidify before cutting the wells. The solidification can be speed up by placing the plate at +5°C ± 3°C for one hour after distribution of the melted agar.

Using the agar-cutter, cut the 7 wells in the agar as shown in diagram n°1. Remove the cut agar cylinders by suction.

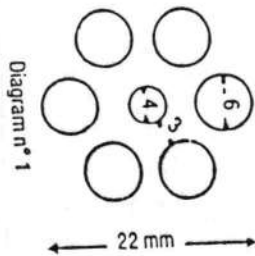


Diagram n° 2

INTERPRETATION OF THE RESULTS

- RS : Positive reference serum with one precipitation line (gp 51).
- A : Negative serum.
- B & D : Positive sera.
- C : Slightly positive serum.

Diagram n° 3

- RS : Positive reference serum with one precipitation line (gp 51).
- E : Doubtful serum.
- F : Positive serum with two precipitation lines (p 7% and gp 51).
- G : Positive serum with halo.
- H : Negative serum with one non-specific precipitation line (not related to the reference serum).

Diagram n° 4

- RS : Positive reference serum with one precipitation line (gp 51).
- I : Positive serum with two non-dissociated precipitation lines (p 7% and gp 51).
- J : Positive serum.
- K : Positive serum with one non-specific line.
- L : Negative serum with halo.

Diagram n° 5

NA950403.KLBA

Lampiran 6 : Lifet Kit Bovileuko Test produk IAF Canada

BOVILEUKO TEST*

DESCRIPTION

BOVILEUKO TEST* is a test kit for the serological diagnosis of Bovine Leukemia Virus infection. Each kit contains enough reagents to perform 90 tests and 30 controls to be used with agar-gel immunodiffusion (AGID) as described by Miller and Van Der Maaten (1).

BOVILEUKO TEST* is intended for *in vitro* veterinary diagnostic use only. Store the kit between 2 and 8°C.

PRINCIPLE OF THE TEST

In the immunodiffusion process the antigen and the corresponding antibody migrate towards each other in the gel to form an immunoprecipitate which appears as a visible and well-defined line whenever the concentration of antigen and antibody is optimal.

- this reaction is affected by:
 - antibody and antigen concentrations
 - electrolyte concentration in the gel
 - pH
 - ambient temperature
 - level of lipid in samples
 - humidity

GENERAL INFORMATION

BOVILEUKO TEST* is a serological test kit for detecting animals infected with Bovine Leukemia Virus (BLV). This test indicates the presence of specific antibody to a BLV glycoprotein antigen. These antibodies appear in the serum 8 to 12 weeks following infection. Therefore, a negative test indicates freedom from infection 12 weeks prior to sampling. It is very important to retest all negative animals from all possible sources of infection and to retest at regular intervals of 12 weeks until two consecutive negative tests have been obtained before considering an animal negative.



It is generally accepted that animals infected with Bovine Leukemia Virus are virus carriers for life. However, positive serology is not evidence of presence of tumor or that tumor formation will occur in the animal.

CONTENTS

The BOVILEUKO TEST* kit contains the following lyophilized reagents:

- glycoprotein antigen 1 x 3 mL Vial no. 1
- reference serum 2 x 5 mL Vials no. 2
- negative control serum 1 x 1 mL Vial no. 3
- weak positive control serum 1 x 1 mL Vial no. 4
- positive control serum 1 x 1 mL Vial no. 5

After first use all remaining reagents of the BOVILEUKO TEST* kit should be stored at -20°C.

PROCEDURE

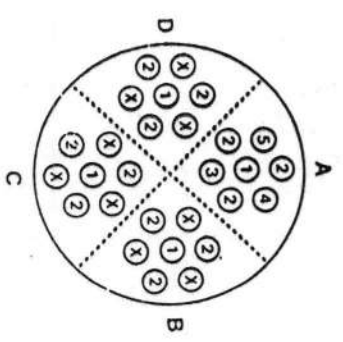
1. Reconstitute the antigen and lyophilized sera by aseptically adding the proper volume of sterile distilled water as indicated on the label of each vial of the BOVILEUKO TEST* kit. N.B. Shake the antigen suspension well before use.
2. Petri dish preparation for immunodiffusion:
 - a) buffer solution
 - 2 g NaOH
 - 70 g NaCl
 - 9 g H₂O₂

Note: the final pH of this solution should be 8.6 ± 0.1
dissolve 0.7 g of "Noble Agar" in 100 mL of boiled buffer solution and cool down to 55-60°C.

Pour 15 mL of agar medium into each Petri dish (use only Petri dishes free of scratches at the bottom). Leave the Petri dishes for one hour with lids ajar at room temperature (20-25°C) to allow evaporation of surplus humidity.
Keep the Petri dishes upside down on their lids at 4°C during 24 hours before use.

3. Perforation of wells in the agar
Using the punch, cut seven (7) wells of 7 mm diameter in the agar in each quadrant of the Petri dish. Wells should be no greater than 3 mm apart and disposed as shown in figure 1: one (1) central and six (6) peripheral wells.
Remove the agar plugs and residual moisture in the wells by suction using a Pasteur pipette connected to a vacuum line.

FIGURE 1



4. Test Procedure
Fill the center well of each quadrant (A, B, C and D) with the reconstituted antigen (vial no. 1)
Note: Proper identification of the wells and quadrants in each Petri dish is important to avoid errors in reporting test results.
Place the control sera (vials no. 3, 4 and 5) in alternate wells around the center well in the control pattern A, using a separate pipette for each serum. Fill the three wells identified X (Fig. 1)

5. R
R
R
R
R
R
R

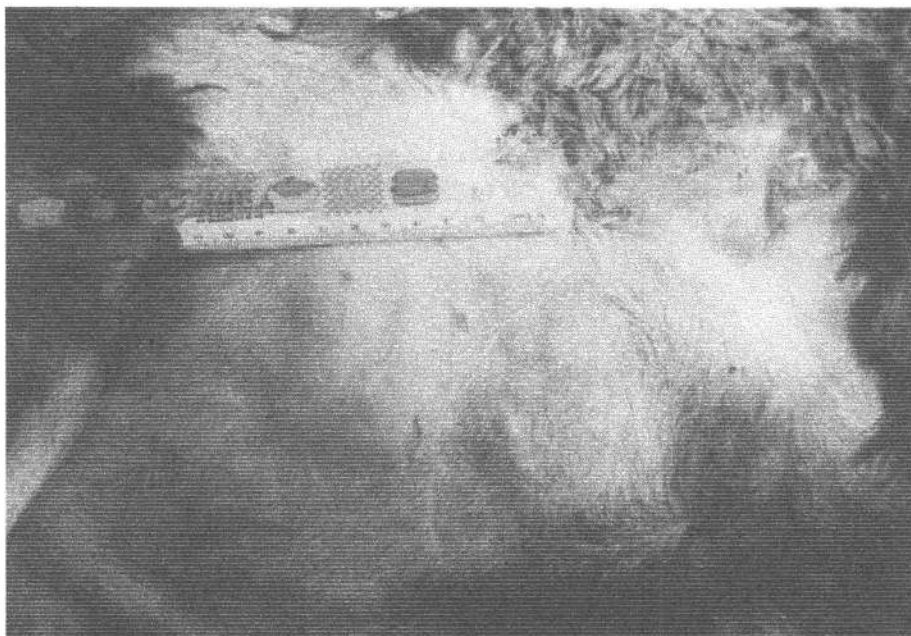
In q
a dil
Fill i
seru
line:
Can



Gambar 7 : 2 kotak perangkat antigen *EBL* : BOVI LEUKOTEST Product *IAF* Canada dan perangkat antigen *EBL* produk lokal.



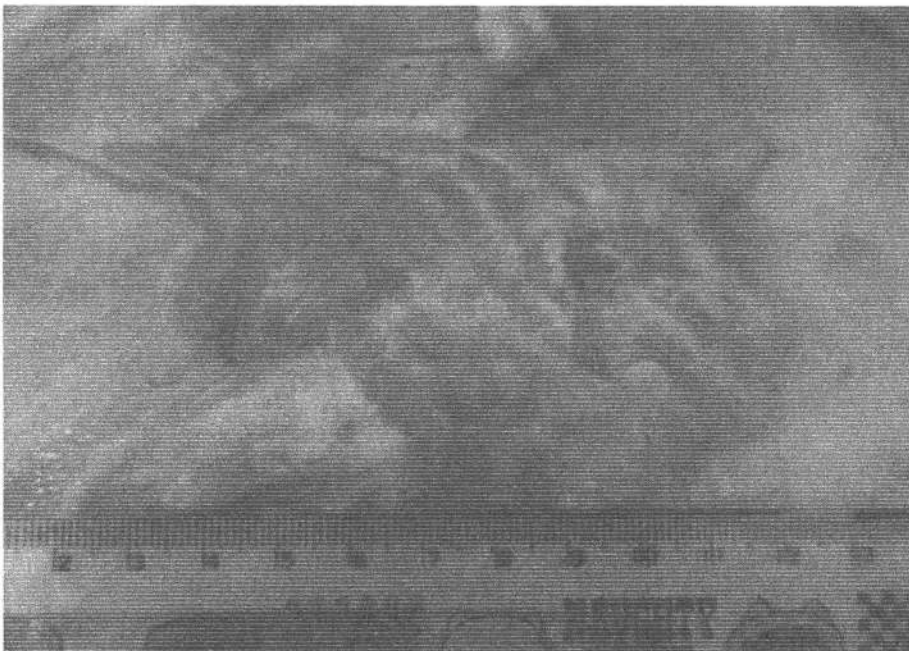
Gambar 8.1 : Bagian tubuh domba yang terkena tumor pada positip *EBL* dilihat dari luar.



Gambar 8.2 : Pembesaran lambung domba dan beberapa penonjolan yang berisi *pus* (nanah) pada positip *EBL*.



Gambar 9 : Pembesaran hati (*Hepatomegali*) yang berisi *pus* (nanah) pada positif *EBL*.



Gambar 10 : Bagian tumor pada positip *EBL*, setelah disayat (di-insisi) mengeluarkan *pus* (nanah) yang kental, padat dan keras, berwarna putih kekuningan.

Lampiran 7. Populasi Ternak Sapi Potong dan Produksi Daging Tahun 1997

No. Propinsi	Populasi Ternak Sapi Potong	Produksi Daging
1. DI ACEH	729.375	5.651.125
2. SUMUT	263.190	9.740.347
3. SUMBAR	418.227	9.541.416
4. RIAU	131.473	2.380.315
5. JAMBI	145.779	2.948.150
6. BENGKULU	123.301	1.089.910
7. SUMSEL	466.800	12.000.000
8. LAMPUNG	518.434	4.726.213
9. DKI JAKARTA	0	37.557.000
10. JABAR	223.394	62.358.519
11. JATENG	1.266.902	43.687.211
12. DI YOGYA	197.392	4.924.034
13. JATIM	3.374.071	95.613.000
14. KALBAR	168.970	3.271.680
15. KALTENG	50.128	1.531.625
16. KALSEL	191.317	3.479.538
17. KALTIM	87.907	8.286.200
18. SULUT	285.435	5.661.527
19. SULTENG	251.644	4.006.394
20. SULSEL	840.642	10.521.705
21. SULTRA	279.000	4.064.987
22. BALI	543.563	6.835.540
23. NTB	462.524	4.661.520
24. NTT	819.559	4.647.015
25. MALUKU	105.459	1.710.903
26. IRJA	69.800	2.962.566
27. TIMTIM	150.534	1.118.400
INDONESIA	12.164.820	354.976.840

Sumber : Hasil Rumusan Verifikasi dan Validasi Data Peternakan 1997

LAMPIRAN 8: DATA

HASIL SENSITIVITAS DENGAN MENGGUNAKAN UJI
SERUM NETRALISASI (SN tes) DARI SERUM SAPI DAERAH
LEMBANG JAWA BARAT
CEPELANG JAWA BARAT
DESA JINGAKERTA KECAMATAN UBUD KABUPATEN GIANYAR BALI

JENIS PERLAKUAN	PERANGKAT ANTIGEN EBL							
	Galur Lokal				Galur IAF Canada			
	No.	Nama Sapi / Ras	Hasil log SN 50	prosentase	No.	Nama Sapi / Ras	Hasil log SN 50	prosentase
Hasil perlakuan % tase Sesitivitas (daerah Lembang)	1	Papandian	1,2	1,13	1	Papandian	1,2	1,15
	2	Azalae	1,2	1,13	2	Azalae	1,2	1,15
	3	Valuri	1,2	1,13	3	Valuri	1,2	1,15
	4	Putrasago	1,2	1,13	4	Putrasago	1,2	1,15
	5	Bromo	1,2	1,13	5	Bromo	1,2	1,15
	6	Rekti	1,2	1,13	6	Rekti	1,3	1,24
	7	Stylis	1,2	1,13	7	Stylis	1,3	1,24
	8	Nakulo	1,2	1,13	8	Nakulo	1,2	1,15
	9	Kemang	1,3	1,23	9	Kemang	1,2	1,15
	10	Baruna	1,3	1,23	10	Baruna	1,2	1,15
	11	Bisma	1,2	1,13	11	Bisma	1,2	1,15
	12	Simon	1,3	1,23	12	Simon	1,3	1,24
	13	39 718	1,3	1,23	13	39 718	1,2	1,15
	14	Sebastian	6,8	6,43	14	Sebastian	7	6,69
	15	Buo	1,2	1,13	15	Buo	1,2	1,15
	16	Ornate	1,2	1,13	16	Ornate	1,2	1,15
	17	Baranang	1,4	1,32	17	Baranang	1,2	1,15
	18	Jonet	1,2	1,13	18	Jonet	1,2	1,15
	19	Setuka	1,2	1,13	19	Setuka	1,2	1,15
	20	Porgenango	1,2	1,13	20	Porgenango	1,2	1,15
	21	Lion	1,2	1,13	21	Lion	1,2	1,15
	22	Susi	1,2	1,13	22	Susi	1,2	1,15
	23	Oktaf	1,2	1,13	23	Oktaf	1,2	1,15
	24	Bahari	1,2	1,13	24	Bahari	1,2	1,15
	25	Oliver	1,2	1,13	25	Oliver	1,2	1,15
	26	Obany	1,2	1,13	26	Obany	1,2	1,15
	27	Sadewo	1,2	1,13	27	Sadewo	1,2	1,15

JENIS PERLAKUAN	PERANGKAT ANTIGEN EBL							
	Galur Lokal				Galur IAF Canada			
	No.	Nama Sapi / Ras	Hasil log SN 50	prosentase	No.	Nama Sapi / Ras	Hasil log SN 50	prosentase
	28	Brayin	1,3	1,23	28	Brayin	1,3	1,24
	29	Bimasakti	1,3	1,23	29	Bimasakti	1,2	1,15
	30	Badranaya	1,3	1,23	30	Badranaya	1,2	1,15
	31	Inorimer	1,4	1,32	31	Inorimer	1,2	1,15
	32	390 205	1,2	1,13	32	390 205	1,2	1,15
	33	391 05	1,2	1,13	33	391 05	1,2	1,15
	34	392 06	1,2	1,13	34	392 06	1,2	1,15
	35	391 01	1,1	1,04	35	391 01	1,2	1,15
	36	391 07	1,4	1,32	36	391 07	1,2	1,15
	37	391 09	1,2	1,13	37	391 09	1,2	1,15
	38	391 50	1,2	1,13	38	391 50	1,2	1,15
	39	391 82	1,3	1,23	39	391 82	1,3	1,24
	40	392 04	1,2	1,13	40	392 04	1,3	1,24
	41	392 10	1,2	1,13	41	392 10	1,4	1,34
Hasil perlakuan	42	392 12	1,2	1,13	42	392 12	1,2	1,15
% tase	43	392 13	1,4	1,32	43	392 13	1,4	1,34
Sesitivitas	44	392 14	1,2	1,13	44	392 14	1,2	1,15
(daerah Cipelang)	45	392 16	1,2	1,13	45	392 16	1,2	1,15
	46	392 18	1,2	1,13	46	392 18	1,3	1,24
	47	392 19	1,2	1,13	47	392 19	1,3	1,24
	48	392 20	1,2	1,13	48	392 20	1,2	1,15
	49	392 22	1,2	1,13	49	392 22	1,2	1,15
	50	392 23	1,2	1,13	50	392 23	1,3	1,24
	51	392 24	1,2	1,13	51	392 24	1,3	1,24
	52	392 25	1,3	1,23	52	392 25	1,2	1,15
	53	392 26	1,2	1,13	53	392 26	1,2	1,15
	54	392 27	1,3	1,23	54	392 27	1,3	1,24
	55	392 28	1,3	1,23	55	392 28	1,2	1,15
	56	392 29	1,3	1,23	56	392 29	1,2	1,15
	57	392 33	1,2	1,13	57	392 33	1,3	1,24
	58	392 34	1,2	1,13	58	392 34	1,2	1,15
	59	392 35	1,2	1,13	59	392 35	1,2	1,15

JENIS PERLAKUAN	PERANGKAT ANTIGEN EBL							
	Galur Lokal				Galur IAF Canada			
	No.	Nama Sapi / Ras	Hasil log SN 50	prosentase	No.	Nama Sapi / Ras	Hasil log SN 50	prosentase
Hasil perlakuan % tase sensitivitas (daerah JIngakerta)	60	392 36	1,2	1,13	60	392 36	1,2	1,15
	61	392 37	1,2	1,13	61	392 37	1,2	1,15
	62	392 39	1,2	1,13	62	392 39	1,2	1,15
	63	392 43	1,2	1,13	63	392 43	1,3	1,24
	64	392 47	1,2	1,13	64	392 47	1,3	1,24
	65	392 49	1,3	1,23	65	392 49	1,2	1,15
	66	392 54	1,3	1,23	66	392 54	1,2	1,15
	67	392 56	1,4	1,32	67	392 56	1,3	1,24
	68	392 02	1,4	1,32	68	392 02	1,3	1,24
	69	525	1,3	1,23	69	525	1,3	1,24
	70	BC 0793	1,2	1,13	70	BC 0793	1,3	1,24
	71	33 / Ras Bali	1,4	1,32	71	33 / Ras Bali	1,2	1,15
	72	19 / Ras Bali	1,4	1,32	72	19 / Ras Bali	1,2	1,15
	73	12 / Ras Bali	1,3	1,23	73	12 / Ras Bali	1,3	1,24
	74	31 / Ras Bali	1,4	1,32	74	31 / Ras Bali	1,2	1,15
	75	18 / Ras Bali	1,4	1,32	75	18 / Ras Bali	1,3	1,24
	76	11 / Ras Bali	1,4	1,32	76	11 / Ras Bali	1,3	1,24
	77	30 / Ras Bali	1,3	1,23	77	30 / Ras Bali	1,3	1,24
	78	17 / Ras Bali	1,2	1,13	78	17 / Ras Bali	1,2	1,15
	79	10 / Ras Bali	1,4	1,32	79	10 / Ras Bali	1,3	1,24
80	29 / Ras Bali	1,4	1,32	80	29 / Ras Bali	1,3	1,24	
Total		105,8	100	Total		104,6	100	

Keterangan :

Sensitivitas yang dihitung harga negatif CPE =

Sensitivitas yang dihitung harga negatif CPE =

$$\frac{79}{80} \times 100 \% = 98,75 \%$$

$$\frac{79}{80} \times 100 \% = 98,75 \%$$

Rumus yang digunakan adalah Spearman Karber :

$$\log_{10} \text{ endpoint dilution} = - \left(x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r_i}{n_i} \right)$$

Where :

x_0 = \log_{10} of the reciprocal of the lowest dilution at which all animals are positive

d = \log_{10} of the dilution faktor

n_i = number of animals used at each individual dilution (after discounting accidental deaths)

r_i = number of positive animal (out of n_i)

Summation is started at dilution x_0

Pengeceran yang digunakan adalah : two fold dilution (Boegel et al., 1983)

Lampiran 9. HASIL SPESIFISITAS DARI SERUM SAPI DAERAH: LEMBANG
 JAWA BARAT,
 CIPELANG JAWA BARAT,
 DESA JINGAKERTA KECAMATAN UBUD KABUPATEN
 GIANYAR BALI DENGAN UJI *OUCHTERLONY*

Jenis Perlakuan	<i>Perangkat antigen EBL</i>					
	Galur Lokal			Produksi IAF Canada		
	No. urut	No. sapi/ Nama sapi/ Ras	Hasil	No. urut	No. sapi/ Nama sapi/ Ras	Hasil
Hasil Spesifisitas dengan uji <i>Ouchterlony</i> (Daerah Lembang)	1.	Papandaian	negatip	1.	Papandaian	negatip
	2.	Azalae	negatip	2.	Azalae	negatip
	3.	Putrasago	negatip	3.	Putrasago	negatip
	4.	Valuri	negatip	4.	Valuri	negatip
	5.	Bromo	negatip	5.	Bromo	negatip
	6.	Rekti	negatip	6.	Rekti	negatip
	7.	Stylis	negatip	7.	Stylis	negatip
	8.	Nakulo	negatip	8.	Nakulo	negatip
	9.	Kemang	negatip	9.	Kemang	negatip
	10.	Baruna	negatip	10.	Baruna	negatip
	11.	Bisma	negatip	11.	Bisma	negatip
	12.	Simon	negatip	12.	Simon	negatip
	13.	39 718	negatip	13.	39 718	negatip
	14.	Sebastian	positip *	14.	Sebastian	positip *
	15.	Buo	negatip	15.	Buo	negatip
	16.	Ornate	negatip	16.	Ornate	negatip
	17.	Baranang	negatip	17.	Baranang	negatip
	18.	Jonet	negatip	18.	Jonet	negatip
	19.	Setuka	negatip	19.	Setuka	negatip
	20.	Porgenango	negatip	20.	Porgenango	negatip
	21.	Lion	negatip	21.	Lion	negatip
	22.	Susi	negatip	22.	Susi	negatip
	23.	Oktaf	negatip	23.	Oktaf	negatip
	24.	Bahari	negatip	24.	Bahari	negatip
	25.	Oliver	negatip	25.	Oliver	negatip
	26.	Ombany	negatip	26.	Ombany	negatip
	27.	Sadewo	negatip	27.	Sadewo	negatip
	28.	Brayin	negatip	28.	Brayin	negatip
	29.	Bimasakti	negatip	29.	Bimasakti	negatip
	30.	Badrayana	negatip	30.	Badrayana	negatip
	31.	Inorimer	negatip	31.	Inorimer	negatip

Jenis Perlakuan	<i>Perangkat antigen EBL</i>					
	Galur Lokal			Produksi IAF Canada		
	No. urut	No. sapi/ Nama sapi/ Ras	Hasil	No. urut	No. sapi/ Nama sapi/ Ras	Hasil
Hasil Spesifisitas dengan uji <i>Ouchterlony</i> (Daerah Cipelang)	32.	390 205	negatip	32.	393 205	negatip
	33.	391 05	negatip	33.	394 05	negatip
	34.	392 06	negatip	34.	395 06	negatip
	35.	391 01	negatip	35.	392 01	negatip
	36.	391 07	negatip	36.	392 07	negatip
	37.	391 09	negatip	37.	392 09	negatip
	38.	391 50	negatip	38.	393 50	negatip
	39.	391 82	negatip	39.	393 82	negatip
	40.	392 04	negatip	40.	394 04	negatip
	41.	392 10	negatip	41.	393 10	negatip
	42.	392 12	negatip	42.	393 12	negatip
	43.	392 13	negatip	43.	394 13	negatip
	44.	392 14	negatip	44.	392 14	negatip
	45.	392 16	negatip	45.	392 16	negatip
	46.	392 18	negatip	46.	392 18	negatip
	47.	392 19	negatip	47.	392 19	negatip
	48.	392 20	negatip	48.	392 20	negatip
	49.	392 22	negatip	49.	392 22	negatip
	50.	392 23	negatip	50.	392 23	negatip
	51.	392 24	negatip	51.	392 24	negatip
	52.	392 25	negatip	52.	392 25	negatip
	53.	392 26	negatip	53.	392 26	negatip
	54.	392 27	negatip	54.	392 27	negatip
	55.	392 28	negatip	55.	392 28	negatip
	56.	392 29	negatip	56.	392 29	negatip
	57.	392 33	negatip	57.	392 33	negatip
	58.	392 34	negatip	58.	392 34	negatip
	59.	392 35	negatip	59.	392 35	negatip
	60.	392 36	negatip	60.	392 36	negatip

	61.	392 37	negatip	61.	392 37	negatip
	62.	392 39	negatip	62.	392 39	negatip
	63.	392 43	negatip	63.	392 43	negatip
	64.	392 47	negatip	64.	392 47	negatip
	65.	392 49	negatip	65.	392 49	negatip
	66.	392 54	negatip	66.	392 54	negatip
	67.	392 56	negatip	67.	392 56	negatip
	68.	392 02	negatip	68.	393 02	negatip
	69.	525	negatip	69.	525	negatip
	70.	BC 0793	negatip	70.	BC 0793	negatip

Jenis Perlakuan	Perangkat antigen EBL					
	Galur Lokal			Produksi IAF Canada		
	No. urut	No. sapi/ Nama sapi/ Ras	Hasil	No. urut	No. sapi/ Nama sapi/ Ras	Hasil
Hasil Spesifisitas dengan uji <i>Ouchterlony</i> (Desa Jingakerta)	71.	33/Ras Bali	negatip	71.	33/Ras Bali	negatip
	72.	19/Ras Bali	negatip	72.	19/Ras Bali	negatip
	73.	12/Ras Bali	negatip	73.	12/Ras Bali	negatip
	74.	31/Ras Bali	negatip	74.	31/Ras Bali	negatip
	75.	18/Ras Bali	negatip	75.	18/Ras Bali	negatip
	76.	11/Ras Bali	negatip	76.	11/Ras Bali	negatip
	77.	30/Ras Bali	negatip	77.	30/Ras Bali	negatip
	78.	17/Ras Bali	negatip	78.	17/Ras Bali	negatip
	79.	10/Ras Bali	negatip	79.	10/Ras Bali	negatip
	80.	29/Ras Bali	negatip	80.	29/Ras Bali	negatip

PARASITOLOGI

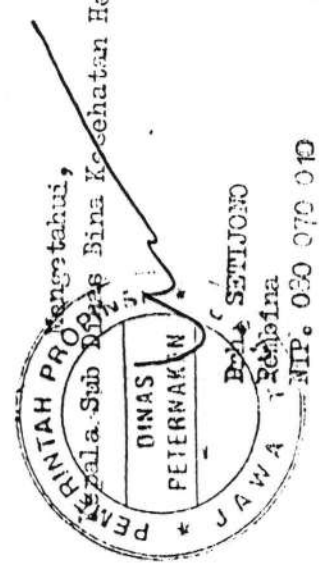
1. Apaplasmosis
2. Babesiosis
3. Theileriosis
4. Trypanosomiasis (Surra)
5. Trichomonosis (T. Foetus)
6. Cysticercosis
7. Fasciolosis
8. Kaskado

BAKTERIOLOGI

1. Actinobacillosis
2. Actinomycosis
3. Anthrax
4. Bovine Brucellosis
5. Contagious Bovine Pleuro Pneumonia
6. Clostridiosis
7. Colibacillosis
8. Dermatomycosis
9. Klebsiellosis
10. Selakarang (Lymphangitis Epizootica)
11. Mycoplasmosis
12. Pink Eyes
13. Septicaemia Epizootica (SE)
14. Staphylococcosis

VIROLOGI

1. Jembrana
2. Bovine Malignant Catarrh (BMC)
3. Rinderpest
4. Penyakit Mulut dan Kuku (PMK)
5. Penyakit Akabane
- 6. Erzootic Bovine Leukosis
7. Lumpy Skin Disease
8. Rift Valley Fever
9. Japanese Encephalitis
10. Penyakit Aujeszky's



Lampiran 11. Rincian Komponen dan Biaya Produksi Perangkat Antigen EBL Galur Lokal

Isi Tiap Tanding : 50 KIT

Isi Tiap KIT : 90 Sampel

NO	KOMPONEN	RINCIAN TAHUN 2000			JUMLAH HARGA (Rp)
		JML. BRG SAT	HARGA/KEMASAN (Rp)		
1	2	3	4		5
I	BAHAN PRODUKSI				
	A. ANTIBIOTIK DAN ANTIJAMUR				
1	Penicilin G (Meiji)	7.50gr	8.983,34	1 gr	67.375,00
2	Kanamycin Sulfat (Meiji)	7.50 gr	7.260,00	1 gr	54.450,00
3	Streptomycin Sulfat (Meiji)	11.25 gr	2.508,00	1 gr	28.215,00
	JUMLAH A				150.040,00
	B. ASAM AMINO DAN VITAMIN				
1	L-Arginine (E Merck, 1542)	15.00 gr	1.870,00	1 gr	28.050,00
2	L-Cysteine (E Merck, 2836)	4.89 gr	5.442,80	1 gr	26.615,30
3	L-Histidine (E Merck, 4351)	1.13 gr	5.772,80	1 gr	6.494,40
4	L-Isoleucine (BDH, 37123)	3.75 gr	11.330,00	1 gr	42.487,50
5	L-Leucine (BDH, 37121)	3.75 gr	3.520,00	1 gr	13.200,00
6	L-Lysine (BDH, 37129)	3.00 gr	880,00	1 gr	2.640,00
7	L-Methionine (E Merck, 5707)	1.13 gr	4.070,00	1 gr	4.578,76
8	L-Phenylalanine (BDH, 37138)	1.13 gr	5.500,00	1 gr	6.187,50
9	L-Threonine (BDH, 37150)	1.50 gr	5.362,50	1 gr	8.043,76
10	L-Thryptophan (E Merck, 8374)	0.38 gr	11.132,00	1 gr	4.174,50
11	L-Valine (BDH, 37160)	1.50 gr	374,00	1 gr	561,00
12	L-Pantothenic acid (BDH,144074)	1.41 gr	3.377,00	1 gr	4.749,08
13	L-Choline Chloride (BDH,42014)	0.23 gr	1.760,00	1 gr	396,00
14	Folic Acid (BDH, 42014)	0.08 gr	27.500,00	1 gr	2.062,50
15	Inositol (BDH, 38044)	2.63 gr	2.112,00	1 gr	5.544,00
16	Thiamine HCl (E Merck, 8181)	0.08 gr	5.500,00	1 gr	412,50
17	Riboflavin (BDH, 44088)	0.02 gr	12.650,00	1 gr	189,76
	JUMLAH B				156.386,56
	C. DILUENT DAN BAHAN KIMIA LAIN				
1	NaCl (BDH, 10241)	600.00 gr	101.750,00	1.000 gr	61.050,00
2	KCl (BDH, 29594)	30.00 gr	132.000,00	1.000 gr	3.960,00
3	MgSO4 (E Merck, 5886)	35.00 gr	187.000,00	1.000 gr	6.545,00
4	Na H2PO4 2H2O (BDH, 10245)	32.06 gr	231,36	1 gr	7.417,40
5	CaCl2 (E Merck, 2386)	16.50 gr	131.450,00	1.000 gr	2.168,92
6	KH2PO4 (E Merck, 4873)	30.00 gr	413,36	1 gr	12.400,80
7	MgCl2 6 H2O	1.50 gr	117.180,00	250 gr	703,08
8	Trypsine (difco 727469)	2.00 gr	11.000,00	1 gr	22.000,00
9	Versine (Sodium Edta (BDH, 28025)	0.40 gr	397.100,00	100 gr	1.588,40
10	Lactalbumin Hydrolisa (Oxoid-L.48	100.00 gr	396.000,00	500 gr	79.200,00

1	2	3	4	5
	PERANGKAT ANTIGEN EBL GALUR LOKAL			
	Bahan Kimia			
11	(NH ₄) ₂ SO ₄ (E, Merck 1217)	500.00 gr	148.500,00	1000 gr 74.250,00
12	BaCl ₂ (E Merck, 1719)	50.00	120.000,00	500 gr 12.000,00
13	Dialysa Tube	1.00 ft	1.288.000,00	10 ft 128.800,00
	SERUM KONTROL POSITIP			
	Bahan Baku			
14	Kambing	3 ekor	250.000,00	1ekor 750.000,00
	SERUM KONTROL POSITIP LEMAH			
	Bahan Baku			
15	Kambing			
	SERUM KONTROL NEGATIP			
	Bahan baku			
16	Kelinci	3 ekor	60.000,00	1 ekor 180.000,00
	JUMLAH C			1.342.083,60
	D. DESINFEKTAN DAN BAHAN-BAHAN LAIN			
1	Alkohol tehnis	5.000 ml	6.000,00	1000 ml 30.000,00
2	Kreolin	2.000 ml	4.500,00	1000 ml 9.000,00
3	Rinso	1.000 gr	6.000,00	1000 gr 6.000,00
4	Yudo	1.000 gr	400,00	1000 gr 400,00
5	Sabun Asepso	5.00 bh	1.750,00	1 bh 8.750,00
6	Teepol	1.000 ml	6.000,00	1000 ml 6.000,00
	Jumlah D			60.150,00
	E. EXPENDABLE MATERIAL			
1	Aluminium foil	1.00 rol	12.500,00	1 rol 12.500,00
2	Disposable syringe 5 ml	30.00 bh	1.100,00	1 bh 33.000,00
3	Disposable syringe 2,5 ml	10.00 bh	1.080,00	1 bh 10.800,00
4	Disposable syringe 50 ml	2.00 bh	3.000,00	1 bh 6.000,00
5	Kapas berlemak	0.50 kg	12.200,00	1 kg 6.100,00
6	Kapas putih	0.50 kg	23.000,00	1 kg 11.500,00
7	Kertas karton	2.00 kg	1.400,00	1 kg 2.800,00
8	Kertas tissue	1.00 rol	1.500,00	1 rol 1.500,00
9	Kertas pH 6,4 - 8,1 - 5	5.00 lbr	14.950,00	100 lbr 747,00
10	Keras Saring	3.00 lbr	1.600,00	1 lbr 4.800,00
11	Kain kasa	4.00 mt	40.250,00	1 mt 161.000,00
12	Tali rami	2.00 rol	1.500,00	1 rol 3.000,00
13	Masker	2.00 bh	2.200,00	1 bh 4.400,00
14	Autoclave tape	0.50 rol	44.000,00	1 rol 22.000,00
15	Spidol besar	1.00 bh	2.700,00	1 bh 2.700,00
	JUMLAH E			282.847,00

1	2	3	4	5
	F. HEWAN PERCOBAAN DAN MAKANAN			
1	Kelinci Dewasa	2 ekor	10.000,00	1 ekor 20.000,00
2	Makanan kelinci untuk 2bulan			
	- Sayuran	24 kg	370,00	1 kg 8.880,00
	- Wortel	150 kg	1.500,00	1 kg 225.000,00
	- Ubi-ubian	150 kg	550,00	1 kg 82.500,00
	JUMLAH F			336.380,00
II	KEMASAN			
	Vial 20 ml, lengkap dengan prop karet, aluminium cap, etiket, leaflet dll	100 set	750,00	1 bh 75.000,00
	Vial 5 ml, lengkap dengan prop karet, aluminium cap, etiket, leaflet dll	250 set	600,00	1 bh 150.000,00
				225.000,00
III	BIAYA SERTIFIKASI	1.0	150.000,00	1 150.000,00
IV	BIAYA EXPLOITASI SARANA PRODUKSI			
	Exploitasi disel, ketel uap, Krematorium, pendingin, sarana produksi, dll.	1.0	250.000,00	1 250.000,00
V	BIAYA TENAGA KERJA			
	Tenaga kasar, extra voeding pengamanan kesehatan personil, pakaian kerja, lembur karyawan dll	1.0	1.000.000,00	1 1.000.000,00
VI	PENGEMBANGAN KERUSAKAN	1.0	300.000,00	1 300.000,00
VII	BIAYA PERAWATAN	1.0	250.000,00	1 250.000,00
Jumlah biaya tiap tanding (50 kit)				4.502.887,16
Dibulatkan				4.502.000,00
Jadi harga satuan perangkat		4.502.000 : 50 = Rp. 90.040,00 untuk 1 perangkat		
Dibulatkan		= Rp. 90.000,00		

**Lampiran 12. Daftar Harga Perangkat Antigen *EBL* Produk IAF Canada dan
Laporan Penyakit *EBL* di Pulau Jawa dan Madura**

Satu Perangkat Antigen *EBL* Produk IAF Canada untuk 400 *tests* adalah
Rp 5.625.000 (Lima Juta Enam Ratus Dua Puluh Lima Ribu Rupiah)

Sumber : BPPH wilayah IV Yogyakarta (29 Agustus 2000)

Lampiran 13. Hasil Uji *Ouchterlony* Serum Sapi Kiriman BPPH Yogyakarta dari Monitoring Sapi Potong di Jawa Tengah 21 Juni 1998 dengan Menggunakan Perangkat Antigen *EBL* Galur Lokal Percobaan Awal yang Dibandingkan dengan Perangkat Import.

No	Kode Serum	Dengan Perangkat <i>EBL</i> Produksi	
		Galur Lokal	Import
1	1800	-	-
2	1328	+	+
3	2981	-	-
4	2082	+	+
5	0261	+	+
6	6873	+	+
7	6103	-	+
8	48 SES	+	+
9	6825	-	-
10	6865	+	+
11	5376	+	+
12	0240	+	+
13	S 136	-	-
14	S 176	+	+
15	S 154	-	-
16	S 160	+	+
17	S 192	-	-
18	S 141	+	+
19	S 114	-	-
20	S 66	+	+

Keterangan :

+ = diduga terinfeksi *EBL*

- = tidak terinfeksi *EBL*



Lampiran 14. Laporan Penyakit *EBL* di Pulau Jawa dan Madura Tahun 1988, 1989, 1990, 1991, 1992 dan 1999

Tahun	Kodya/Kab	Jenis Hewan	Jumlah Kasus
1988	Sukabumi	Sapi	1
	Bandung	Sapi	6
	Cilacap	Sapi	22
	Salatiga	Sapi	1
	Malang	Sapi	1
	Surabaya	Sapi	62
1989	Cilapap	Sapi	33
	Mojokerto	Sapi	1
	Rembang	Sapi	1
	Salatiga	Sapi	1
	Surabaya	Sapi	2
1990	Bandung	Sapi	1
	Jakarta	Sapi	15
1991	Malang	Sapi	9
1992	Bandung	Sapi	1
1999	Bandung	Sapi	1

Sumber : BPPH Wilayah IV Yogyakarta (1999/2000)

Lampiran 15

Hasil Analisis Data

Cross Tab / Chi-Square Tests

Observed values (Cell format : count/percent : total/percent : row/percent : col)

	LOKAL	IMPOR	TOTAL
Positif	1	1	2
	.63	.63	1.25
	50.00	50.00	
	1.25	1.25	
Negatif	79	79	158
	49.38	49.38	98.75
	50.00	50.00	
	98.75	98.75	
Total	80	80	160
	50.00	50.00	100.00

Chi-Square with continuity correction factor = .506, Prob. = .4767

Chi-Square without continuity correction factor = .000, Prob. = 1.0000

D.F. = 1

	LOKAL	IMPOR	TOTAL
IF	1 .63 50.00 1.25	1 .63 50.00 1.25	2 1.25
IF	79 49.38 50.00 98.75	79 49.38 50.00 98.75	158 98.75
TOTAL	80 50.00	80 50.00	160 100.00

CHISQUARE WITH CONTINUITY CORRECTION FACTOR = .506, PROB.= .4767

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

= 1