

B A B III

MATARI DAN METODA

III.1. Materi

Pengambilan bahan contoh serum darah babi untuk pemeriksaan Rose Bengal Test (RBT) dan Serum Aglutinasi Test (SAT) diperoleh dari rumah potong hewan Pegirian Kotamadya Surabaya sebanyak 150 contoh, bahan diambil secara acak. Untuk pengambilan sampel darah di rumah tersebut bagi kami tidaklah begitu sulit karena hanya menunggu babi-babi di sembelih. Adapun cara penyembelihan babi di rumah potong pegirian, yaitu dengan cara stunning hingga babi tak sadarkan diri baru dilakukan penusukan dibawa pangkal leher babi, (menurut Ressang, 1962 penusukan tersebut terjadi diantara kedua tulang iga pertama). Begitu pisau penusuk dicabut biasanya keluar darah memancar dan dari sinilah kami mengambil darah dengan tabung steril yang tersedia.

Antigen Rose Bengal yang dipakai untuk uji RBT ini merupakan suspensi kuman *Brucella* strain 1119 dengan konsentrasi 8 % ditambah zat warna Rose Bengal dalam larutan phosphat buffer pH 3,65 sedang antigen yang dipakai untuk pemeriksaan Serum Aglutinasi Test merupakan suspensi kuman *Brucella* strain 99 dalam larutan phenol saline, yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

III.2. Metoda pemeriksaan di laboratorium

Darah-darah yang terdapat dalam tabung-tabung tertutup hasil penampungan, kami bawa ke laboratorium dengan menggunakan thermos es kemudian dibiarkan selama 3 jam pada suhu kamar biasanya serum sudah terpisah dari gumpalan (bekuan) darah. Bila serum sudah cukup banyak dan berada diatas gumpalan darah maka pada waktu itu juga dapat dilakukan pemeriksaan, tetapi bila serum lambat terpisah, maka bekuan darahnya kita tusuk-tusuk dengan sonde steril, lalu bagian cairnya disentrifuge. Kalau tidak disentrifuge maka tabung yang berisi gumpalan darah tersebut setelah ditusuk-tusuk harus disimpan lagi semalam dalam lemari es ($0 - 4^{\circ}\text{C}$). Setelah terpisah baru dilakukan pemeriksaan.

III.2.1. Rose Bengal Test

Pada mikropate ditetesi serum dengan menggunakan pipet Eppendorf sebanyak 0,025 ml kemudian ditetesi antigen Rose Bengal sebanyak 0,025 ml. Dimana sebelum dipakai antigen Rose Bengal diletakkan pada suhu kamar dan dikocok sampai merata. Antigen dan serum dicampur dengan menggunakan mesin penggoyang kemudian digoyang-goyangkan dengan gerakan berputar selama 4 menit dan segera dilihat dan ditafsirkan reaksinya.

Tafsiran reaksi :

Positip 3 (+++) : Terjadi aglutinasi sempurna yaitu adanya penggumpalan yang jelas dan kasar, cairan

antigen jernih

- Positip 2 (++) : Terjadi aglutinasi halus dengan batas tepi yang jelas, terlihat pula penjernihan cairan antigen.
- Positip 1 (+) : Terjadi aglutinasi yang halus dan kadang-kadang tidak begitu jelas dan terlihat batas seperti lingkaran, cairan tetap homogen
- Negatif 0 (-) : Tidak terjadi aglutinasi dan juga tidak ada batas seperti lingkaran, cairan tetap homogen.

III.2.2. Serum Aglutinasi Test

Uji ini pada diagnosa brucellosis adalah sebagai uji lanjutan dari screening test. Digunakan untuk mengetahui tinggi titer antibodi yang terdapat dalam serum yang positif pada uji RBT.

Dibuat beberapa pengenceran serum pada tabung reaksi yang sudah diberi nomer 1 sampai 8, pengenceran dibuat mulai 1 : 5; 1 : 10; 1 : 20; 1 : 40; 1 : 80 dan seterusnya sampai 1 : 640. Setelah itu ditambahkan antigen sama banyak maka titer serum yang diencerkan menjadi dua kali lipat yaitu 1 : 10 pada tabung nomer 1 dan 1 : 20 pada tabung nomer 2 demikian seterusnya sampai pada tabung kedelapan 1 : 1280. Sebagai kontrol atau pembanding dibuat pada tabung nomer 9, 10, 11, 12, 13.

Tabung nomer 9 : Sebagai kontrol aglutinasi 100 % yaitu pa-

da tabung diisi phenol saline 1 ml

Tabung nomer 10 : Sebagai kontrol aglutinasi 75 % yaitu pada tabung diisi 0,75 ml phenol saline dan 0,25 antigen.

Tabung nomer 11 : Sebagai kontrol aglutinasi 50 % yaitu pada tabung diisi 0,5 ml phenol saline dan 0,5 antigen.

Tabung nomer 12 : Sebagai kontrol aglutinasi 25 % yaitu pada tabung diisi 0,25 ml phenol saline dan 0,75 antigen.

Tabung nomer 13 : Sebagai kontrol tidak terjadi aglutinasi pada tabung diisi 1 ml antigen.

Kemudian semua tabung tersebut diinkubasikan dalam almari penangas 37°C selama 24 jam. Pembacaan reaksi didasarkan atas terjadinya aglutinasi dan pengendapan serta kejernihan dari cairan yang ada di atasnya dengan cara membandingkan dengan tabung kontrol yang kemudian diberi nilai 0 hingga 4 (++++).

Pembacaan reaksi :

Positip 4 (++++) : Aglutinasi sangat jelas, cairan diatas jernih sebanding dengan tabung nomer 9.

Positip 3 (+++) : Aglutinasi dengan batas tidak rata, cairan diatas sedikit keruh sebanding dengan tabung nomer 10.

Positip 2 (++) : Terlihat aglutinasi 50 %, cairan diatasnya sebanding dengan tabung nomer 11.

- Positip 1 (+) : Terjadi aglutinasi 25 %, aglutinasinya halus terlihat endapan yang berupa titik-titik yang kurang jelas, cairan di atasnya keruh sebanding dengan tabung nomer 12.
- Nilai 0 (—) : Terlihat endapan sel antigen, cairan di atasnya keruh sebanding dengan tabung nomer 13.

Penafsiran dilakukan berdasarkan nilai aglutinasi pada pengenceran akhir dengan membandingkan tabung kontrol, kemudian disertai tingkat titernya (kandungan antibodinya) dan dinyatakan dalam International Unit. Interpretasi hasil disesuaikan dengan rekomendasi yang tertera dalam laporan F.A.O / W.H.O yang menyatakan bahwa batas titer 100 IU / ml atau lebih dikatakan babi tersebut positip brucellosis sedangkan titer 50 IU / ml sampai 100 IU / ml dikatakan dubius dan kurang dari 50 IU / ml dikatakan negatif.

Penafsiran dari hasil pembacaan Serum Aglutinasi Test yang dinyatakan dalam International Unit menurut anjuran F.A.O / W.H.O dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Penafsiran dari hasil pembacaan serum aglutinasi test yang dinyatakan dalam International Unit menurut anjuran F.A.O / W.H.O (Alton, G.G. et al 1975).

Pengenceran akhir dari pada sera	!	Reaksi pada pengenceran akhir	!	I.U. / ml
1 : 10	!	+	!	17
	!	++	!	20
	!	+++	!	23
	!	++++	!	27
1 : 20	!	+	!	34
	!	++	!	40
	!	+++	!	47
	!	++++	!	57
1 : 40	!	+	!	67
	!	++	!	80
	!	+++	!	93
	!	++++	!	106
1 : 80	!	+	!	134
	!	++	!	160
	!	+++	!	186
	!	++++	!	212
1 : 160	!	+	!	268
	!	++	!	320
	!	+++	!	372
	!	++++	!	424
1 : 320	!	+	!	536
	!	++	!	640
	!	+++	!	744
	!	++++	!	848
1 : 640	!	+	!	1072
	!	++	!	1280
	!	+++	!	1488
	!	++++	!	1692