

TESIS

PERBANDINGAN TITER ANTIBODI ANTI *Brucella abortus* DENGAN CFT DAN IELISA PADA SAPI DENGAN RBT POSITIF

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Oleh :

ENI ROHYATI

NIM. 061214453005

**PROGRAM STUDI MAGISTER
VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPETIKA
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2015**

PERBANDINGAN TITER ANTIBODI ANTI *Brucella abortus* DENGAN CFT DAN IELISA PADA SAPI DENGAN RBT POSITIF

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**Untuk memperoleh gelar Magister
Dalam Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika
Pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya**

Oleh :

ENI ROHYATI

NIM. 061214453005

**PROGRAM STUDI MAGISTER
VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPETIKA
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2015**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul:

Perbandingan Titer Antibodi Anti *Brucella abortus* Dengan CFT Dan iELISA Pada Sapi Dengan RBT Positif

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 09 September 2015



ENI ROHYATI

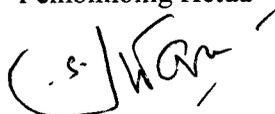
NIM 061214453005

Lembar Persetujuan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
Tanggal 9 September 2015

Oleh:

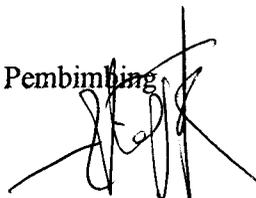
Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Suwarno, Drh., M.Si

NIP. 196105151989031002

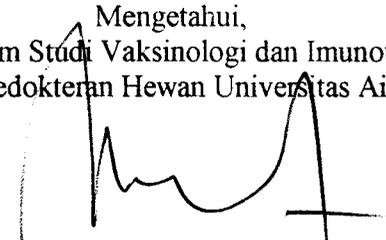
Pembimbing



Dr. A.T. Soelih Estoepangestie, Drh

NIP. 195609151987012001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Fedik A. Rantam, Drh., PhD

NIP. 195910031987011001

Tesis Ini Telah diuji dan dinilai pada

Tanggal: 18 Agustus 2015

PANITIA PENGUJI USULAN PENELITIAN TESIS

Ketua : Prof. Dr. Rahaju Ernawati, drh.,M.Sc

Sekretaris : Didik Handijatno, drh.,MS.,PhD

Anggota : 1. Dr. Soeharsono, drh.,M.Si
2. Prof. Dr. Suwarno, drh.,M.Si
3. Dr. A.T.Soelih Estoepangestie, drh

Surabaya, 9 September 2015

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Hj. Ramziah Sidik, drh.,PhD

NIP. 195312161978062001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan tesis dengan judul **Perbandingan Titer Antibodi Anti *Brucella abortus* Dengan CFT dan iELISA Pada Sapi Dengan RBT Positif.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Ramziah Sidik, drh.,PhD., dan Ketua Program Studi S2 Vaksinologi dan Imunoterapetika Prof. Fedik A. Rantam, drh.,PhD., atas kesempatan mengikuti pendidikan di Program Studi S2 Vaksinologi dan Imunoterapetika Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Prof. Suwarno, drh.,Msi., selaku pembimbing ketua dan Dr. A.T. Soelih Estoepangestie, drh selaku pembimbing, atas saran dan bimbingannya.

Prof. Rahaju Ernawati, drh., M.Sc., selaku penguji ketua, Didik Handijatno, drh.,MS,PhD., selaku penguji sekretaris, dan Dr. Suharsono, drh.,M.Si atas sarannya.

Seluruh staf pengajar Program Studi S2 Vaksinologi dan imunoterapetika Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan Magister.

Seluruh staf pengajar di Departemen Mikrobiologi atas bantuan dan sarannya, Mas Ardi selaku staf Laboratorium Virologi dan Imunologi serta Mas Deni dan Pak Giri selaku staf Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi atas bantuannya.

Seluruh staf pegawai di Bagian Akademik terkhusus Pak Udi, seluruh staf pegawai di Bagian Sarana Prasarana, seluruh staf pegawai di Bagian Kemahasiswaan, dan Bu Jum selaku staf pegawai di Bagian Dekanat atas segala kerjasama dan bantuannya.

drh. Siswani, drh. Syaiful, dan Kak Rosmiaty selaku staf medik dan paramedik Laboratorium Serologis BBVet Maros atas bantuan dan kerjasamanya.

Teman-teman seperjuangan di Prodi Vaksinologi dan Immunoterapetika; Helen, SKM, drh. Nova, drh. Nora, drh. Nurus, drh. Risti, drh. Ernisa, drh. Deya, drh. Abril, atas bantuan, kebersaaan dan kekompakkannya. Warga kos putri ayu; Dian, Dee, Mba Eny, Mba Anis, Mba Amelia, Rahayu atas kebersamaanya.

Keluargaku tercinta: Orang tuaku (ayahanda H. M. Yakub Nurdin (Alm) dan Ibunda Ene (Alm)), Kakak-kakakku dan Iparku, Ponakanku atas segala cinta, kasih sayang, doa, serta dukungan moril dan material selama ini.

Surabaya, Sepetember 2015

Penulis

RINGKASAN

Perbandingan Titer Antibodi Anti *Brucella abortus* Dengan CFT dan iELISA Pada Sapi Dengan RBT Positif

Brusellosis pada sapi sering disebut “*contagious abortion*” yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Brucella abortus* dan dapat menimbulkan penyakit pada manusia yang dikenal sebagai “*undulant fever*” dan termasuk dalam prioritas tinggi (*high priority*) berdasarkan skala prioritas penyakit zoonosis Indonesia”. Brusellosis pada sapi dapat menyebabkan abortus atau lahir prematur, infertilitas, orchitis, epididimitis, retensio plasenta dan higroma. Kasus brusellosis di Pulau timor NTT (Nusa Tenggara Timur), telah ada sejak Tahun 1986 dan tahun 2012 prevalensi reaktornya sudah menunjukkan penurunan, kecuali di Kabupaten Belu yang masih tinggi yaitu 13,7%. Angka prevalensi ini telah menjadikan Kabupaten Belu sebagai wilayah tertular berat brusellosis, sehingga perlu dilakukan upaya pengendalian. Pengendalian dapat dilakukan dengan cara vaksinasi, uji dan pematangan bersyarat. Pengujian untuk mendeteksi brusellosis dapat dilakukan dengan kultur bakteri, biologi molekuler dan serologis. Uji serologis untuk brusellosis bangsa sapi yang memenuhi standar internasional adalah *Rose Bengal Test* (RBT), *Buffered plate agglutination test* (BPAT), *Complement Fixation Test* (CFT), *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs); indirect (iELISA) dan competitive (cELISA), dan *fluorescence polarisation assay* (FPA). *Rose Bengal Test* (RBT) merupakan uji skrining untuk brusellosis, dan dilanjutkan dengan uji konfirmasi. Pada uji ini, sel *B. abortus* S99 atau S11119.3 diwarnai dengan *Rose Bengal* dan disuspensikan dengan buffer yang saat dicampur serum pH akhir adalah 3.65. *Complement Fixation Test* (CFT) merupakan uji yang sudah secara umum digunakan sebagai uji konfirmasi brusellosis, tetapi uji ini menantang secara teknis karena membutuhkan titrasi reagen dan komplemen dan membutuhkan banyak reagen. Uji ini juga mahal karena membutuhkan reagen banyak dan tenaga kerja yang bekerja intensif. *Indirect enzyme-linked immunosorbent assays* (iELISA) merupakan uji yang memiliki sensitivitas tinggi dan juga spesifisitas yang tidak terlalu jauh lebih rendah dari uji CFT, dan uji ini jauh lebih murah dan mudah dibanding uji CFT. Hal ini menjadi alasan perlu dilakukan penelitian untuk mengukur performa iELISA dengan menggunakan antigen LPS *B. abortus* S19 dengan harapan uji ini dapat digunakan sebagai uji konfirmasi brusellosis alternatif selain uji CFT.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan performa uji iELISA menggunakan antigen LPS *B. abortus* S19 dan CFT menggunakan antigen sel utuh *B. abortus* S99 dalam mendeteksi antibodi *B. abortus* pada serum sapi di Kabupaten Belu.

Sebanyak 251 sampel serum dikoleksi secara acak pada sapi peternakan rakyat di Kabupaten Belu dengan rincian 42 ekor jantan dan 209 betina. Semua

sampel serum tersebut diuji secara serologis dengan menggunakan uji RBT. Serum positif RBT diuji lanjut dengan uji iELISA menggunakan antigen LPS *B.abortus* S19 dan CFT menggunakan antigen sel utuh *B.abortus* S99.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa koefisien jalur (koefisien β) langsung dan tidak langsung dari uji RBT ke iELISA menggunakan antigen LPS *B.abortus* S19 yaitu 0,839 dan 1,128 lebih kuat dibanding koefisien β langsung dan tidak langsung dari uji RBT ke CFT yaitu 0,580 dan 0,998, dan bahwa terdapat kesesuaian yang ideal ($Kappa= 1$) antara uji iELISA menggunakan antigen LPS *B.abortus* S19 dengan uji CFT. Berdasarkan hasil ini disarankan dilakukan penelitian lebih lanjut dengan membandingkan performa uji iELISA menggunakan antigen LPS *B.abortus* S19 terhadap performa uji CFT menggunakan antigen sel utuh *B.abortus* S99 dengan menggunakan sampel serum yang lebih banyak dan variabel pembanding yang lebih variatif. Disarankan juga membandingkan performa uji iELISA menggunakan antigen LPS RB51 atau antigen LPS *B.abortus* isolat lapang atau antigen bagian lain dari sel *B.abortus* terhadap uji CFT menggunakan antigen sel utuh S99.

SUMMARY

COMPARISON OF ANTIBODY TITRE OF ANTI *Brucella abortus* USING CFT AND iELISA TO CATTLE WITH POSITIVE OF RBT

Brucellosis in cattle often called as “*contagious abortion*” caused by the *Brucella abortus* bacterium infection and can cause disease in humans is known as “*undulant fever* and based on Indonesian zoonotic diseases priority” brucellosis included in high priority diseases. Bovine brucellosis can cause abortion or premature birth, infertility, orchitis, epididymitis, retained placenta and hygroma. Cases of brucellosis in Timor Island NTT (East Nusa Tenggara) have been around since 1986 and in 2012 the reactor prevalence already shows a decline, except in Belu Regency which is still high at 13.7% of prevalence. Therefore Belu Regency has expressed as a heavy brucellosis infected area and it is necessary to control and eradication. The control and eradication of bovine brucellosis can be done by means of vaccination, test and slaughter. The tests to detect brucellosis can be done with a bacterial culture, molecular biology and serological. Internationally accepted serological tests for bovine brucellosis are the Rose Bengal Test (RBT), Buffered plate agglutination test (BPAT), the Complement Fixation Test (CFT), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs); both indirect (iELISA) and competitive (cELISA), and the fluorescence polarisation assay (FPA). The Rose Bengal Test is screening test for brucellosis, followed by confirmatory testing. In these test, *B. abortus* S99 or S1119.3 cells are stained with Rose Bengal, and suspended in a buffer which when mixed with the appropriate volume of serum result in final pH of 3.65. The Complement Fixation Test is a widely used confirmatory test for brucellosis but this test is technically challenging because the large number of reagents is required. It is also an expensive test because of the large number of reagents needed and because it is labour intensive. Indirect enzyme-linked immunosorbent assays is a test having high sensitivity and with specificity which is not too much lower than the CFT, and this test is low expensive and easier than the CFT. Therefore, this research needed to measure the iELISA using LPS antigen of *B. abortus* S19 performance with the hope that this test can be used as alternative confirmatory test of brucellosis beside CFT.

The purpose of this research was aimed to compare the performance of indirect ELISA (iELISA) test using LPS antigen of *B. abortus* S19 and Complement Fixation Test (CFT) using whole cells antigen of *B. abortus* S99 to detect antibody *B. abortus* in serum of cattle in Belu Regency.

A total of 251 serum samples were collected randomly from cattle ranches in Belu Regency which includes of 42 males and 209 females. The sera have been analyzed using Rose Bengal Test (RBT). All 17 RBT positive results were further tested by iELISA test using LPS antigen of *B. abortus* S19 and CFT using whole cells antigen of *B. abortus* S99.

The results showed that the direct and indirect regression coefficients (β coefficients) from RBT to iELISA test (0.839 and 1.128) were stronger than the direct and indirect regression coefficients from RBT to CFT (0.580 and 0.998), and that there was an ideal agreement (Kappa = 1) of iELISA test using LPS antigen of *B.abortus* S19 with CFT using whole cells antigen of *B.abortus* S99. Based on this results, it is advisable to conduct further research to compare the performance of iELISA test using LPS antigen of *B.abortus* S19 and the performance of CFT using whole cell antigen of *B.abortus* S99 using sample serum more and more varied comparative variable. It is also recommended to compare the performance of iELISA test using LPS antigen of *B.abortus* RB51 or LPS antigen of *B.abortus* field isolate or using the other antigen of *B.abortus* to CFT using whole cell antigen of *B.abortus* S99.

Abstract**Comparison Of Antibody Titre Anti *Brucella abortus* Using CFT And iELISA To Cattle With Positive of RBT**

The purpose of this research was aimed to compare the performance of indirect ELISA (iELISA) test using LPS antigen of *B.abortus* S19 and Complement Fixation Test (CFT) using whole cell antigen of *B.abortus* S99 to detect antibody *B.abortus* in serum of cattle in Belu Regency. A total of 251 serum samples were collected randomly from cattle ranches in Belu Regency which includes of 42 males and 209 females. The sera have been analyzed using Rose Bengal Test (RBT). All 17 RBT positive results were further tested by iELISA test using LPS antigen of *B.abortus* S19 and CFT using whole cell antigen of *B.abortus* S99. The results showed that the direct and indirect regression coefficients (β coefficients) from RBT to iELISA test (0.839 and 1.128) were stronger than the direct and indirect regression coefficients from RBT to CFT (0.580 and 0.998), and that there was an ideal agreement (Kappa = 1) of iELISA test using LPS antigen of *B.abortus* S19 with CFT using whole cell antigen of *B.abortus* S99.

Keywords: Brucella, LPS, iELISA, CFT, RBT

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL DALAM.....	i
PERSYARATAN GELAR.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
PERSETUJUAN.....	iv
PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
RINGKASAN.....	vii
SUMMARY.....	ix
ABSTRACT.....	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Hasil Penelitian	4

1.4.1. Manfaat Teoritis	4
1.4.2. Manfaat Praktis	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Brusellosis	5
2.1.1. Gambaran Umum Brusellosis	5
2.1.2. Gejala Klinis	8
2.1.3. Patogenesis	9
2.1.4. Transmisi	12
2.1.5. Diagnosis	13
2.1.6. Preventiv, Treatmen dan Kontrol	18
2.2. RBT, CFT dan ELISA.....	20
2.3. Kabupaten Belu.....	36
2.4. <i>Brucella</i>	38
2.4.1. Biologi <i>Brucella</i>	38
2.4.2. Antigen <i>Brucella</i>	39
2.5. Lipopolisakarida (LPS)	41
2.6. Sistem Immunitas.....	45
2.7. Interaksi antara Sistem Immun dengan <i>Brucella</i>	60
2.8. Vaksin Terhadap Brusellosis	66
BAB 2 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	69
3.1. Kerangka Konseptual	69
3.2. Hipotesis	71
BAB 4 MATERI DAN METODE	72

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	72
4.2. Populasi, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel.....	72
4.3. Variabel Penelitian	73
4.4. Definisi Operasional.....	73
4.5. Bahan Penelitian	74
4.6. Instrumen Penelitian.....	75
4.7. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	76
4.8. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data.....	76
4.8.1. Prosedur Koleksi dan Prosesing Darah	76
4.8.2. Prosedur Uji RBT.....	77
4.8.3. Prosedur Uji iELISA.....	78
4.8.4. Prosedur Uji CFT.....	79
4.9. Kerangka Operasional	81
4.10. Analisa data.....	81
BAB 5. ANALISIS HASIL PENELITIAN.....	83
BAB 6. PEMBAHASAN.....	87
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN.....	94
DAFTAR PUSTAKA.....	95
LAMPIRAN.....	100

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Pembacaan ELISA Berdasarkan Penggunaan Konjugat dan Substrat.....	35
2.2. Mekanisme Dasar Aksi Efektor Terhadap <i>Brucella</i>	64
2.3. Cara <i>Brucella</i> Menghindari dan Memanipulasi Imunitas Inang..	65
5.1. Hasil Uji RBT, iELISA, dan CFT terhadap Serum Sapi di Kabupaten Belu.....	84
5.2. Hasil Analisa Deskriptif Uji RBT, iELISA dan CFT.....	86

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
3.1.	Kerangka Konseptual Penelitian	69
4.1.	Interpretasi Hasil Uji RBT.....	78
4.2.	Interpretasi Hasil Uji CFT.....	80
4.3	Kerangka Operasional Penelitian	81
5.1.	Bagan Hasil Analisis Jalur RBT, iELISA dan CFT.....	85

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	HALAMAN
1 Rekapitulasi keterangan keseluruhan sampel penelitian.....	101
2 Keterangan sampel yang memberikan hasil positif uji RBT.....	111
3 Hasil uji iELISA dan perhitungan titer iELISA.....	112
4 Kalkulator dan hasil perhitungan titer CFT, serta data hasil uji CFT di Laboratorium BBVet Maros	113
5 Hasil analisa Kappa antara CFT dan iELISA dengan menggunakan Software SPSS 22 dan Ms.Excel.....	115
6 Data transformasi hasil uji RBT, iELISA dan CFT terhadap serum sapi di Kabupaten Belu NTT.....	116
7 Hasil analisa deskriptif hasil uji RBT, iELISA dan CFT	117
8 Hasil Analisa regresi atau jalur uji RBT, iELISA dan CFT....	118
9 Hasil uji CFT di laboratorium serologis BBVet Maros terhadap serum sapi asal Kabupaten Belu NTT.....	122

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

Ab	= Antibodi
ADCC	= Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity
AP	= Activator Protein
APC	= Antigen Presenting Cell
ATPase	= Adenin Triphosphatase
BCV	= <i>Brucella</i> Containing Vacuole
BPS	= Badan Pusat Statistik
BvrR	= Brucella Variant Rough
BvrS	= Brucella Variant Smooth
cELISA	= Competitive ELISA
CFT	= Complement Fixation Test
CLRs	= C-Type Lectin Receptors
DC	= Dendritic Cells
DNA	= Deoxyribonucleat Acid
EDTA	= Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	= Ethylen Glicol Tetra-Acetic Acid
ELISA	= Enzyme Linked Immunosorbed Assay
FcR	= Fragment Complement Receptor
FPA	= Fluorencence Polarization Assay
Hsp	= Heat Shock Protein
ICFTU	= International Complement Fixation Test Unit

iELISA	= Indirect ELISA
IFN	= Interferon
Ig	= Immunoglobulin
IgA	= Immunoglobulin A
IgD	= Immunoglobulin D
IgE	= Immunoglobulin E
IgG	= Immunoglobulin G
IgM	= Immunoglobulin M
IHA	= Indirect Heamaglutination Assay
IL	= Interleukin
INF	= Interferon
IRF	= Infection Regulation Factor
KDO	= Keto-deoxyoctonic
LAMPs	= Lysosome Associated Membrane Proteins
LPS	= Lipopolisakarida
MAb	= Monoclonal Antibodi
MHC	= Molecule Histocompality
MRT	= Milk Ring Test
NF	= Nuclear Factor
NK	= Natural Killer
NKT	= Natural Killer T
NLRs	= Nucleotide Oligomerisation Domain-Like (NOD-like) Receptors
NO	= Nitric Oxide

NPV	= Negative Predictive Value
OD	= Optical Density
OIE	= Office International des Epizooties
OMP	= Outer Membrane Protein
OPS	= O Polisakarida
PAb	= Polyclonal Antibodi
PAMPs	= possess Pathogen Associated Moleculer Patterns
PBS	= Phosphate Buffered Saline
PPV	= Positive Predictive Value
PRR	= Pattern Recognition Receptor
R	= Rough
RBT	= Rose Bengal Test
RDTL	= Republik Demokratik Timur Leste
RER	= Rough Endoplasmic Reticulum
RIV	= Rivanol Test
RLPS	= Rough LPS
RLRs	= RIG-Like Receptors
RNA	= Ribonucleat Acid
ROS	= Reactive Oxygen Species
S	= Smooth
SAT	= Standard Aglutination Tube
SD	= Sel Dendritik
SLPS	= Smooth LPS

SOD	= Superoxidase Dismutase
SRBCs	= Sheep Red Blood Cells
SRs	= Scvenger Receptors
STT	= Standard Tube Agglutination Test
Th	= Sel T helper
TLR	= Toll-Like Receptor
TTS	= Timur Tengah Selatan
TTU	= Timur Tengah Utara
VB	= Veronal Buffer
WHO	= World Health Organisation

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Brusellosis pada sapi sering disebut “*contagious abortion*” yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Brucella abortus* dan dapat menimbulkan penyakit pada manusia yang dikenal sebagai “*undulant fever*”. Brusellosis pada sapi dapat menyebabkan abortus atau lahir prematur, infertilitas, retensio plasenta, orchitis, vesikulitis, epididimitis, kegagalan produksi semen yang diikuti oleh infertilitas parsial dan permanen pada jantan, serta higroma (OIE,2009; Poester *et al*, 2010; AHVLA, 2013, Poester, 2013). Berdasarkan klasifikasi prioritas penyakit zoonosis di Indonesia, brusellosis termasuk dalam prioritas tinggi (*high priority*) (Perkins *et al*, 2007). Kasus brusellosis di Pulau timor NTT (Nusa Tenggara Timur), telah ada sejak Tahun 1986 dan tahun 2012 prevalensi reaktornya sudah menunjukkan penurunan, kecuali di Kabupaten Belu yang masih tinggi yaitu 13,7% (BBV Denpasar, 2013).

Deteksi dini, kontrol dan eliminasi reaktor merupakan hal penting yang harus dilakukan dalam rangka kontrol brusellosis. Diagnosis brusellosis dapat dilakukan melalui berbagai metode, mulai dari kultur bakteri, uji serologis aglutinasi dan non aglutinasi, serta uji biomolekuler (Poester, 2010; Munir *et al* 2008). Uji serologis untuk brusellosis bangsa sapi yang memenuhi standar internasional adalah *Rose Bengal Test* (RBT), *Buffered plate agglutination test* (BPAT), *Complement Fixation Test* (CFT), *enzyme-linked immunosorbent assays*

(ELISAs); indirect (iELISA) dan competitive (cELISA), dan *fluorescence polarisation assay* (FPA) (Ragam *et al*, 2013).

Rose Bengal Test (RBT) merupakan uji skrining untuk diagnosis brusellosis dan merupakan uji aglutinasi yang menggunakan antigen yang diasamkan, dimana sel *B.abortus* S99 atau S1119.3 diwarnai dengan *Rose Bengal* atau *Brilliant Green* dan di suspensikan dalam buffer sampai mencapai pH 3.65. *Complement Fixation Test* (CFT) merupakan uji konfirmasi brusellosis yang telah digunakan lama dan luas diseluruh dunia tetapi merupakan metode yang kompleks (tidak mudah atau sederhana) untuk dilakukan karena membutuhkan berbagai macam reagen, fasilitas laboratorium yang bagus, staf laboratorium yang terlatih dan siap bekerja intensif dan membutuhkan waktu yang lama karena uji ini memerlukan titrasi reagen tiap hari dan kontrol reagen dan reaksi (OIE, 2009; Poester *et al*, 2010; Nielsen dan Yu, 2010).

Indirect enzyme-linked immunosorbent assays (iELISA) sebagai salah satu uji serologis yang umumnya memiliki sensitivitas yang sangat tinggi karena mampu mendeteksi antibodi dari hewan yang tervaksinasi dengan *B.abortus* S19 dan antibodi dari reaksi silang, walaupun spesifisitas dapat sedikit lebih rendah dibanding pada hasil uji di wilayah yang tidak tervaksinasi (Poester *et al*, 2010; Munir *et al*, 2008). Uji ini umum digunakan untuk mendeteksi brusellosis dan tergantung pada enzim yang digunakan, selalu melalui tahap perlekatan secara pasif SLPS pada matriks polisiterin untuk kemudian ditambahkan dengan serum atau susu yang telah diencerkan (Nelsen dan Yu, 2010). Berdasarkan prespektif klinis, deteksi antibodi terhadap Br-LPS umumnya digunakan untuk diagnosis

bruselosis pada ternak dan manusia (Skendors dan Baura, 2013). LPS (lipopolisakarida) sebagai virulen utama dan memegang peranan penting dalam virulensi *Brucella* karena dapat mencegah terbunuhnya bakteri oleh komplemen dan merangsang resistensi mikroba terhadap peptida antimikrobial. LPS menjadi target utama dari sistem imun innate mamalia tetapi mampu menginduksi produksi antibodi dari sel B (Cardoso *et al*, 2006; Rojas *et al*, 2004; Poester, 2013).

Faktor utama yang mendukung performa setiap uji serologis adalah jenis antigen yang digunakan, karena antigen yang berbeda akan berbeda pula reaktivitasnya terhadap antibodi dalam serum uji sehingga akan mempengaruhi tingkat performa dari tiap uji. Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian untuk mengukur dan membandingkan performa uji iELISA dengan menggunakan antigen LPS *B.abortus* S19 dan performa uji CFT yang menggunakan antigen sel utuh *B.abortus* S99 untuk mendeteksi antibodi terhadap *B.abortus* pada serum sapi di Kabupaten Belu, perlu dilakukan guna pengembangan alat diagnostik konfirmasi brusellosis alternatif selain CFT.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka yang menjadi permasalahan adalah; Apakah uji iELISA dengan menggunakan antigen LPS *B.abortus* S19 dapat memiliki performa yang sama baiknya jika dibandingkan dengan CFT yang menggunakan antigen sel utuh *B.abortus* S99 dalam mendeteksi antibodi *B.abortus* pada serum sapi di Kabupaten Belu?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui perbandingan antara performa uji iELISA dengan menggunakan antigen LPS *B.abortus* S19 CFT yang menggunakan antigen sel utuh *B.abortus* S99 dalam mendeteksi antibodi *B.abortus* pada serum sapi di Kabupaten Belu.

1.1. Manfaat Hasil Penelitian

1.1.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan kontribusi pada pengembangan penelitian dalam bidang kedokteran hewan tentang perbandingan performa uji iELISA dengan menggunakan antigen LPS *B.abortus* S19 dan uji CFT yang menggunakan antigen sel utuh *B.abortus* S99 dalam mendeteksi antibodi *B.abortus*.

1.1.2. Manfaat Praktis

Manfaat praktis yang diharapkan bisa didapatkan dari hasil penelitian ini adalah uji iELISA dengan menggunakan LPS *B.abortus* S19 dapat digunakan sebagai uji konfirmasi brusellosis alteratif selain CFT yang menggunakan antigen sel utuh *B.abortus* S99.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Brusellosis

2.1.1. Gambaran Umum Brusellosis

Brusellosis awalnya merupakan masalah yang timbul di *United Kingdom* yaitu di Malta yang menyebabkan kematian tentara. Dr. David Bruce yang merupakan dokter tentara yang mencoba untuk mengatasi masalah tersebut. Dia mengkoordinasi tim peneliti yang sukses mengisolasi *Micrococcus melitensis* pada Tahun 1887 dari susu kambing mentah yang dikonsumsi para tentara sebagai agen penyebab. Kemudian bakteri tersebut diberi nama *Brucella melitensis*. Spesies lain dari genus *Brucella* adalah *B. abortus* yang diisolasi oleh Bang pada tahun 1897 dan *B. suis* yang pertama kali dideskripsikan oleh Traum. Tiga spesies tersebut merupakan spesies penting pada kesehatan dan ekonomi masyarakat (Poester *et al*, 2010). Spesies *Brucella* lainnya adalah *B. neotomae*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. microti* dan dua spesies baru yaitu *B. ceti* dan *B. pinnipedialis* yang menginfeksi mamalia laut dan berpotensi patogen terhadap manusia (Walker, 1999; Poester *et al*, 2010).

B. abortus merupakan spesies utama penyebab brusellosis pada hewan bangsa sapi seperti kerbau, bison, dan elk. Di daerah enzootik, hewan lain yang juga terpengaruh dengan *B. abortus* adalah kuda, domba, domba gunung, kambing, *chamois*, babi, *raccoon*, *opossums*, anjing, *coyotes*, *fox*, srigala dan spesies hewan lainnya. Brusellosis pada hewan bangsa sapi

jarang disebabkan oleh *B.melitensis* dan *B.suis*. *B.abortus* merupakan spesies yang sangat penting secara ekonomi karena dapat menyebabkan abortus pada sapi bunting dan juga dalam bidang pertahanan suatu Negara karena dapat digunakan sebagai senjata bioteroris. *B.abortus* ditemukan diseluruh dunia pada wilayah yang terdapat sapi kecuali Jepang, Kanada, beberapa Negara Eropa, Australia, New Zealand dan Israel karena telah sukses dikendaikan (*The center for The Center For Food Security & Public Health And Institute For International Cooperation In Animal Biologics*, 2007; OIE, 2009). *B.abortus* merupakan spesies yang paling dominan yang menyebabkan brucellosis pada manusia dengan insidensi <0.01 sampai >200 per 100.000 populasi (Corbel,1997).

Brucellosis pada hewan bangsa sapi yang tidak hanya menyerang hewan yang termasuk dalam bangsa sapi, namun manusiapun dapat terinfeksi penyakit ini dan berperan dalam persistensi dan transmisi penyakit. Secara umum ruminansia sangat peka terhadap penyakit ini, kerbau, unta, rusa, kambing dan domba merupakan spesies ruminansia selain sapi yang sangat peka terhadap infeksi brucellosis (Aparicio, 2013).

Kasus brucellosis di Pulau timor NTT (Nusa Tenggara Timur), telah ada sejak Tahun 1986 dan tahun 2012 prevalensi reaktornya sudah menunjukkan penurunan yaitu di Kabupaten TTU (Timor Tengah Utara) 0,18%, Kabupaten Kupang 1,58% dan TTS (Timor Tengah Selatan) 0,11%, kecuali di Kabupaten Belu yang masih tinggi yaitu 13,7% (BBV Denpasar, 2013).

Hasil penelitian Tae Lake *et al* (2010), tentang epidemiologi bruselosis di Kabupaten Belu menunjukkan bahwa rata-rata prevalensi bruselosis ditingkat peternakan adalah sebesar $14,9\pm\%$ dengan kisaran antara 0% sampai dengan 100%. Jumlah kepemilikan atau *herdsize* ternak sapi rata-rata 10 ekor/peternak dengan kisaran antara 2-37 ekor. Sistem pemeliharaan yang diterapkan adalah semi intensif dengan ciri penggembalaan secara lepas dan terikat, penggunaan padang penggembalaan secara bersama, sapi dikandangkan malam hari pada kandang padat dan gabungan, digembalakan diluar dusun asal sapi. Induk partus masih ditangani secara tradisional, tidak ada kandang khusus induk dan tetap digembalakan postpartus, plasenta dibiarkan tanpa ada perlakuan khusus. Sumber air yang digunakan untuk ternak bervariasi yaitu sumur, mata air, kolam/embung, dan sungai. Cakupan vaksinasi rata-rata sebesar $31,74\pm 0,02\%$ dengan kisaran 0-100%. Peternak yang memiliki reaktor sebesar 17,7% (39/220), peternak yang pernah mendapat sapi dari luar desa hanya 18,6% (41/220). Faktor keberadaan ternak baru dalam satu kelompok peternak berasal dari aktivitas jual beli dalam Desa atau dari Dinas atau swasta dalam bentuk bantuan ternak. Berdasarkan faktor diatas para peneliti menyimpulkan bahwa faktor yang berasosiasi dengan prevalensi tinggi ditingkat peternakan adalah gembala bersama, kandang gabungan, dan keberadaan reaktor, sedangkan faktor yang berasosiasi dengan prevalensi rendah adalah *herdsize* dan sumber air minum ternak.

2.1.2. Gejala Klinis

Bruselosis biasanya asimtomatis pada betina tak bunting, tetapi pada dewasa bunting yang terinfeksi oleh *B.abortus* akan menunjukkan plasentitis yang mengakibatkan abortus pada bulan ke 5 dan ke 6 masa kebuntingan. Jika tidak terjadi abortus, maka bakteri akan diekskresikan melalui plasenta, cairan fetus, dan eksudat vagina. Kelenjar mamari dan limfonodus regional dapat juga terinfeksi dan bakteri dapat terekskresi dalam susu. Induk akan abortus pada kebuntingan berikutnya setelah terinfeksi, tetapi 80% induk terinfeksi hanya abortus satu kali dan pada kebuntingan berikutnya praktis tak terlihat gejala atau hanya muncul gejala berupa anak lahir lemah (Aparicio, 2013). Gejala lain bruselosis pada bangsa sapi selain abortus atau lahir prematur adalah, infertilitas, *orchitis*, epididimitis, seminal vesikulitis, abses testis, metritis, retensio plasenta, penurunan produksi susu, dan higroma (*The center for The Center For Food Security & Public Health And Institute For International Cooperation In Animal Biologics*, 2007; AHVLA, 2013).

Bruselosis pada satwa liar dikarakteristik oleh gangguan reproduksi seperti abortus, retensi plasenta, metritis, mastitis subklinis, infertilitas, *orchitis* atau epididimitis yang kebanyakan berakhir dengan infertilitas dan sterilitas. Terlihat juga hygroma artikular dan periartikular, tetapi lebih banyak terjadi pada kasus kronis. Abortus merupakan gejala klinis utama dan sering terjadi selama masa kebuntingan ke-2. Pada 75-95% kasus, kasus abortus hanya terjadi sekali. Fetus yang lahir dari induk yang

bruselosis, akan menjadi carier laten (sampai 5%) dan hanya dapat diidentifikasi dengan uji imunologi setelah kebuntingan pertama atau kedua (Godfroid *et al*, 2013).

2.1.3. Patogenesis

Patogenesis bruselosis secara umum diawali dengan periode laten yang relatif panjang sebelum muncul gejala klinis, kebanyakan tergantung pada umur, jenis kelamin dan kondisi psikologi hewan. *Brucella* masuk tubuh secara ensensial melalui mulut, nasofaring, konjungtiva dan mukosa reproduksi. Setelah penetrasi, terjadi reaksi inflamasi submukosa yang dikarakteristisasi oleh infiltrasi mononuklear, polimorf nuklear dan produksi eosinofil. Invasi bakteri berpindah ke regio limfonodus melalui sirkulasi limfatik. Pada kondisi ekperimental, *Brucella* bertahan pada limfonodus target yang dekat dengan tempat masuk selama 2-3 minggu. Bersamaan dengan semakin parahnya limpadenitis, bakteri masuk ke darah melalui limfe efferen dan terjadi bakterimia yang menyebabkan infeksi sistemik pada organ retikulo-endotelia, limfonodus dan kelenjar reproduksi asesoris. Bakteri dapat diisolasi dari hati, ginjal, limpa, testis, epididimis, kelenjar visikular, prostat dan bulbo-uretra, kemudian uterus, kelenjar mammae, sumsum tulang, dan limfonodus; submaxilaris, parotid, retroparingeal, prescapular, precrural, supramammary, iliaka dan limfonodus reproduksi (Godfroid *et al*, 2013).

Kemampuan *Brucella* spp untuk menyebabkan penyakit membutuhkan tahap kritis infeksi. *Brucella* spp dapat masuk ke dalam sel

epitel inang selama infeksi melalui permukaan mukosa dan sel M intestine yang diidentifikasi sebagai pintu masuk untuk *Brucella* spp. Setiap *Brucella* spp invasi (biasanya melalui traktus digesti atau respirasi), akan dapat bertahan hidup intraseluler pada sel fagositik atau non fagositik inang. *Brucella* spp memiliki kemampuan interferensi terhadap lalu lintas intraseluler, mencegah fusi *Brucella-containing vacuole* (BCV) dengan marker lisosom, dan mengatur pergerakan kompartemen vakuol retikulum endoplasma kasar (*Rough Endoplasmic Reticulum* "RER") yang sangat toleran terhadap replikasi intraseluler *Brucella*. Mekanisme *Brucella* spp invasi ke dalam sel belum terlalu jelas, tetapi walau interaksi antara reseptor spesifik inang dengan *Brucella* belum teridentifikasi, masuknya *Brucella* ke dalam sel praktis membutuhkan perubahan sitoskeleton. Invasi *Brucella* melalui digesti tidak akan memicu adanya respon inflamasi dari sel inang, sehingga *Brucella* dapat masuk sel tanpa diketahui atau dideteksi oleh sistem imun seluler inang. Hal tersebut karena reseptor toll/interleukin-1 (*Toll/interleukine-1 receptor*) *Brucella* mengandung protein yang dapat mencegah signaling *Toll-like receptor* (TLR)2 melalui reaksi interferensi dengan MyD88 dan juga menghambat maturasi DC (*dendritic cell*, sel dendritik), menghambat sekresi sitokin dan penghambatan presentasi antigen. *Brucella abortus* dapat menginduksi supresi transkripsi mediator pro-inflamasi dalam sel tropoblastik pada tahap awal infeksi. Tromboplas merupakan sel plasenta yang menjadi sel target selama infeksi pada induk bunting. Setelah supresi awal terhadap

transkripsi pro inflamasi, *B.abortus* menginduksi ekspresi semokin pada sel tromboplas yang dikultur, yang berkorelasi dengan ekspresi yang terobservasi secara in vivo pada sapi betina yang plasentanya terinfeksi (Poester *et al*, 2013).

Pada bangsa sapi, tingkat kepekaan terhadap infeksi *Brucella* tergantung pada rute dan dosis paparan, dan juga umur serta tahap kebuntingan hewan. Sapi induk lebih sensitif terhadap infeksi dan terlebih lagi pada induk bunting, maka kepekaannya semakin tinggi. Kepekaan tersebut berhubungan dengan konsentrasi gula erythritol pada uterus hewan bangsa sapi bunting. Organisme *Brucella* masuk ketubuh inang melalui mikroabrasi pada kulit atau melalui membran mukosa dan bereplikasi dalam limfonodus letrofaringeal sehingga terbentuk limfadenopati, kemudian organisme menyebar melalui aliran darah sembari bereplikasi dalam makrofag (Rojas *et al*, 2004).

B.abortus dapat ditemukan di intervilli plasenta sapi bunting yang pernah abortus. Pada sapi bunting, *B.abortus* dapat menyebabkan infeksi kronis, replikasi bersama dengan replikasi tropoblas karioalantois plasenta sehingga terjadi plasentitis, kematian fetus, abortus yang biasanya terjadi pada trimester ke tiga kebuntingan, fetus lahir lemah atau tidak tertolong, dan retensio plasenta (Rojas *et al*, 2004; Poester *et al*, 2013).

Pejantan yang terinfeksi akan menunjukkan gejala klinis yang semakin sistemik, tetapi lesio yang paling signifikan akibat infeksi *B. abortus* pada jantan adalah orchitis dan diikuti oleh seminal vesiculitis

dan epididimitis. Orchitis kronis dan fibrosis parenkima testikular jantan terinfeksi, sering diikuti oleh kegagalan produksi semen, dan infertilitas parsial atau permanen (Poester, 2013).

2.1.4. Transmisi

Transmisi antar hewan sensitif *B.abortus* terjadi melalui kontaminasi pakan dan minum atau melalui kontak langsung dengan material partus hewan terinfeksi, dan transmisi di padang gembalaan melalui rumput yang terkontaminasi feses hewan terinfeksi (Schumaker, 2013).

Transmisi *B.abortus* antar sapi lebih sering terjadi melalui inseminasi buatan (IB) dengan semen yang terkontaminasi yang merupakan sumber infeksi potensial, sedangkan transmisi melalui venereal bukan merupakan rute utama infeksi pada kondisi alami. Fetus abortusan, membran fetal dan cairan alantois abortusan menjadi sumber kontaminasi bagi lingkungan karena mengandung banyak bakteri, sehingga menjadi sumber transmisi infeksi pada hewan peka (Poester, 2013; Aparicio, 2013).

Transmisi vertikal dari induk ke anak merupakan transmisi paling sering terjadi (60-70%), terinfeksi pada saat lahir atau melalui kolostrum atau susu dari induk yang terinfeksi. Model transmisi ini harus mendapat perhatian karena bisa menjadi model transmisi dari sapi satu ke sapi lain. Hal yang sama juga terjadi pada peternakan sapi perah jika dalam pemerahan menggunakan mangkok puting yang sama antara yang sehat dan yang terinfeksi (Aparicio, 2013).

Manusia dapat tertular dan terinfeksi *B.abortus* melalui ingesti

organisme melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi dan melalui kontak langsung membran mukosa serta kulit yang terluka dengan organisme atau melalui inhalasi material aerosol terinfeksi (Corbel,1997; Baldi dan Giambaltolomei, 2013).

2.1.5. Diagnosis

Diagnosis brucellosis pada hewan sangat rumit oleh karena sedikitnya gejala klinis yang muncul, dan hal ini menyebabkan diagnosis melalui gejala klinis akan sulit diterima dan dipercaya tanpa dukungan informasi epidemiologi, akan tetapi dilapangan informasi ini seringkali tak ada. Kultur bakteri sangat penting untuk konfirmasi adanya penyakit, tetapi karena beberapa alasan seperti harus koleksi sampel pada saat terjadi abortus, membutuhkan biaya besar, sulit dan berbahaya, maka perlu dikembangkan beberapa metode alternatif. Metode alternatif tersebut diantaranya adalah identifikasi asam nukleat dari bakteri menggunakan teknologi biologi molekuler seperti deteksi dan amplifikasi DNA, serta sejumlah besar uji serologis. Uji atau pemeriksaan asam nukleat lebih efektif karena dapat menggunakan bahan yang mudah tersedia seperti darah, serum, swab dan susu. Uji serologi efektif karena material diagnostik yang mudah didapat, uji yang relatif mudah, dan sensitif. Empat hal yang harus dikembangkan pada serodiagnosis sehingga signifikan digunakan dalam program kontrol dan eradikasi brucellosis adalah pengurangan biaya, peningkatan spesifisitas, pengembangan mobilitas, dan pengembangan kemampuan uji dalam membedakan hewan terinfeksi dengan hewan

tervaksinasi (McGiven, 2013).

Diagnosis serologis adalah uji presumtif untuk memastikan infeksi. Tingkat akurasi dari setiap uji serologis berbeda-beda dan umumnya digunakan uji panel dan digunakan hasil mayoritas sebagai indikator keterpaparan. Uji serologis secara umum dibagi menjadi 3 bagian yaitu uji klasik atau konvensional, *primary binding test* dan pengembangan teknologi (Poester *et al*, 2010).

Uji konvensional yang merupakan kelompok uji serologis yang meliputi uji aglutinasi (*agglutination tests*), *complement fixation tests* (CFT) (terdiri dari dingin, hangat, *hemolysis in gel*, dan *indirect hemolysis*), dan *precipitation tests* (terdiri dan *Agar gel immunodiffusion* dan *radial immunodiffusion*). Uji aglutinasi terdiri dari dua yaitu aglutinasi lambat (butuh waktu 8-24 jam) dan aglutinasi cepat (hanya beberapa menit). Aglutinasi lambat terdiri dari *standard agglutination tube* (SAT), SAT dengan pengurangan agen seperti 2-mercatoethanol atau dithiothreitol, SAT dengan penambahan rivanol untuk presipitasi glikoprotein, SAT dengan penambahan EDTA untuk mengurangi perlekatan IgM, SAT dengan penambahan antiglobulin untuk meningkatkan aglutinasi, dan milk ring tests (MRT). Uji aglutinasi cepat terdiri dari *Rose Bengal*, *Modified Rose Bengal*, *Buffered antigen plate agglutination*, *Card*, antigen ditambah rivanol, pemanasan serum, dan penambahan 10% sodium chloride. Kelompok uji serologis kedua adalah *Primary Binding Assay* yang terdiri dari *Radioimmunoassay*, *Fluorescence immunoassay*, *Particle counting*

fluorescence immunoassay, Indirect enzyme immunoassay, Competitive enzyme immunoassay, Fluorescence polarization assay (Nielsen dan Yu, 2010).

Uji serologis untuk brucellosis bangsa sapi yang memenuhi standar internasional adalah *Rose Bengal Test (RBT), Buffered plate agglutination test (BPAT), Complement Fixation Test (CFT), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs); indirect (iELISA) dan competitive (cELISA), dan fluorescence polarisation assay (FPA)* (Ragam *et al*, 2013). Berdasarkan prespektif klinis, deteksi antibodi terhadap Br-LPS umumnya digunakan untuk diagnosis brucellosis pada ternak dan manusia (Skendors dan Baura, 2013).

RBT, ELISA, *Indirect Haemagglutination Assay (IHA)*, dan *Standard Tube agglutination Test (STT)* merupakan uji serologis yang mampu mendeteksi antigen S-LPS dan antibodi terhadap S-LPS. RBT dan STT merupakan dua uji aglutinasi yang mampu mendeteksi antigen LPS, sedangkan IHA dan ELISA merupakan dua uji yang mampu mendeteksi antibodi terhadap S-LPS. STT merupakan uji standar untuk diagnosis brucellosis dengan spesifisitas rendah, sedangkan ELISA adalah kandidat terbaik sebagai alternatif untuk uji skrining (Christopher *et al*, 2013).

Uji polarisasi fluoresens (*Fluorescence Polarization Assay (FPA)*) adalah uji yang berdasar pada tingkat rotasi molekul dalam larutan yang sebanding dengan ukuran molekul tersebut. Perlambatan atau pengurangan laju rotasi ini berbanding lurus (berkorelasi) dengan jumlah antibodi. FPA

merupakan uji homogeneous, tidak membutuhkan tahap pencucian atau penghapusan komponen yang tak berreaksi. FPA dapat dilakukan pada format plate 96 sumuran atau format tabung. Format tabung dapat dipakai dilapangan atau diagnosis cepat. Disaat menguji serum atau susu, waktu inkubasi minimal 2 menit, sedangkan jika menguji darah maka dibutuhkan waktu inkubasi maksimal 15 detik. Uji ini relatif mudah dan murah karena hanya membutuhkan dua reagen, antigen dan larutan buffer. FPA sangat akurat dan tingkat sensitifitas/spesifisitas yang dapat dimanipulasi dengan mengatur nilai *cut-off* antara reaksi positif dan negatif terhadap uji skrining sensitif tinggi sebagai uji konfirmasi sensitif tinggi. FPA dapat membedakan antibodi hasil vaksinasi pada banyak hewan tervaksinasi dan dapat mengeliminasi reaktivitas oleh antibodi reaksi silang dengan baik (Nielsen dan Yu, 2010). FPA dapat digunakan dilapangan untuk deteksi antibodi terhadap *Brucella spp* dalam darah atau susu, sehingga relatif mengurangi biaya laboratorium dan program pengendalian dibandingkan dengan *Primary Binding Assays* lainnya dan uji konvensional (Gall dan Nielsen, 2004).

Pada umumnya diagnosis ditetapkan berdasarkan dari dua atau lebih macam tes, hal ini disebabkan oleh tidak adanya uji serologis yang 100% akurat, karenanya tidak ada uji serologis yang tunggal yang bagus untuk semua situasi epidemiologi sebab semua uji ada keterbatasannya masing-masing dan karenanya reaksi positif sampel terhadap sebuah uji harus dikonfirmasi dengan menggunakan uji lainnya. Hal ini menjadi

alasan digunakan uji skrining (*screening test*) sebagai uji permulaan yaitu uji dengan sensitivitas tinggi walau kadang kurang spesifik. Uji tapis biasanya relatif lebih murah, cepat dan mudah. Jika terjadi reaksi positif pada uji tapis, maka uji konfirmasi harus dilakukan. Uji konfirmasi adalah uji dengan sensitivitas bagus dan spesifik tinggi, dan kadang dapat mengeliminasi beberapa reaksi positif palsu, tetapi kebanyakan uji konfirmasi lebih rumit dan mahal. Contohnya uji skrining dengan antigen yang diasamkan atau *indirect enzyme immunoassay* dan uji konfirmasinya menggunakan *competitive enzyme immunoassay* (OIE, 2009; Poester *et al*, 2010).

Kehatian-hatian perlu diterapkan pada semua faktor yang dapat berefek pada relevansi metode uji dan hasil uji pada interpretasi diagnostik spesifik atau aplikasi. Pada unit epidemiologikal dimana dilaksanakan vaksinasi dengan *smooth Brucella*, reaksi positif palsu mungkin akan terjadi pada hewan tervaksinasi karena antibodi hasil vaksinasi bereaksi silang dengan antibodi hasil infeksi strain lapang (OIE, 2009).

Pengembangan uji untuk deteksi antibodi terhadap *B.abortus* pada serum beberapa jenis inang akan bermuara pada kontrol terbaik terhadap penyakit dan percepatan pemberantasan. Selama kebanyakan *Brucella* merupakan spesies spesifik sensitif, maka beberapa reaksi silang akan terjadi. Selama perangkat uji tidak bekerja dengan baik, maka perangkat uji memiliki indikasi perubahan hasil penilaian dan karenanya terjadi perubahan nilai *cutoff* pada tiap situasi. Suatu wilayah dimana kasus

brusellosis telah dikendalikan suatu waktu, *cutoff* menghasilkan nilai spesifikasi tinggi, hal ini kemungkinan dapat menjadi alasan dihilangkannya biaya penelusuran kembali. Sama halnya dengan itu, sensitivitas akan bermuara pada terdeteksinya lebih banyak hewan terinfeksi, khususnya pada tahap awal infeksi, sehingga program kontrol menjadi lebih efisien (Nielsen *et al*, 2005).

Sejama prosedur uji sesuai dalam metodologi, reagen, dan kriteria klasifikasinya, maka data sensitivitas dan sensitifitas darinya dapat dijadikan dasar perbandingan. Penggunaan indeks performans (performace indice) akan lebih menyerderhanakan perbandingan selama dikaitkan dengan nilai sensitivitas dan spesifisitas, sehingga penentuan uji akan dijalankan secara serial atau paralel saat skrining atau konfirmasi/penegasan infeksi *Brucella* dapat dilakukan menggunakan analisa statistik. Uji baru dapat mengganti uji lama atau baku mendukung program nasional, jika performans diagnostiknya sama atau lebih baik dan biaya lebih efektif, dikaitkan dengan jumlah reagen yang dibutuhkan (Gall dan Nielsen, 2004).

2.1.6. Preventiv, Treatmen dan Kontrol

Usaha pengendalian brusellosis di lapangan dilakukan berdasarkan Kepmentan Nomer. 828/kpts/OT.210/10/98 tentang pengendalian brusellosis pada ternak di Indonesia. Pengendalian ini dilakukan melalui dua strategi pemberantasan berdasarkan tingkat kejadian (prevalensi) yaitu jika prevalensi reaktor $\geq 2\%$ dengan kategori tertular berat, maka metode pemberantasannya dengan cara vaksinasi, sedangkan pada daerah tertular

rendah (prevalensi <2%) ditetapkan metode pemberantasannya dengan cara uji dan pemotongan bersyarat (*test and slaughter*) (Bbalitvet, 2012).

Pencegahan brucellosis pada manusia tergantung pada kontrol penyakit pada hewan dan pencegahan serta pengendalian terbaik adalah sukses mengendalikan penyakit pada hewan bangsa sapi terutama di Negara industri yang diikuti program kontrol di Negara lainnya (Corbel, 1997).

Komponen kontrol dan preventif brucellosis terdiri dari beberapa tahap yaitu 1). Legislasi, 2). Inventarisasi penyakit (melalui sensus peternakan, penentuan asesmen, analisa resiko, surveilans penyakit, faktor resiko peyebaran dan penularan, pengetahuan dan implementasi), 3). Kontrol dan preventif melalui vaskinasi masal yang tergantung pada ketersediaan vaksin yang dibutuhkan, penyimpanan dan distribusi vaksin, asuransi kualitas vaksin, monitoring, dan tingkat proteksi vaksin, 4). Kontrol dan preventif melalui penilaian beberapa faktor pendukung seperti identifikasi hewan dan induk, informasi dan edukasi tentang penyakit, kontrol pergerakan hewan dan isolasi, uji dan potong (*test and slaughter*), higeini peternakan dan sanitasi makanan, kesehatan masyarakat, perawatan dan pencegahan penyakit, 5). Kontrol pasca vaksinasi melalui surveilans penyakit serta uji dan intervensi (vaksinasi, isolasi dan potong) (Smith, 2013).

Walker (1999) mengatakan bahwa kontrol dan preventif brucellosis tergantung pada spesies hewan, spesies *Brucella*, praktek manajemen, dan ketersediaan serta efikasi vaksin yang digunakan. Pendekatan yang

digunakan untuk kontrol brucellosis adalah; 1). Imunisasi, 2). Uji dan eliminasi hewan terinfeksi disertai program imunisasi, dan 3). Uji dan eliminasi tanpa imunisasi.

Treatment atau pengobatan untuk penderita brucellosis dapat menggunakan preparat tetrasiklin dan dehidrostreptomisin pada infeksi *B. ovis* pada kambing/domba dengan hasil yang bervariasi. Pada anjing diperlukan pemberian antibiotik dalam waktu panjang yaitu kombinasi dehidrostreptomisin dan tetrasiklin atau minosiklin selama periode 2-4 minggu. Antibiotik golongan quinolon juga dapat digunakan, walau informasi efektivitasnya sangat terbatas. Sebagai catatan penderita yang sudah terpalpasi ada lesio epididimitis, terapi antibiotik tidak akan bermanfaat karena lesio tersebut merupakan hasil ekstrasvasasi sperma. Adanya abses atau fibrosis pada jaringan atau organ asesoris reproduksi akan mempersulit penetrasi antibiotik (Walker, 1999)

2.2. RBT, CFT dan ELISA

Rose Bengal Test (RBT) merupakan uji yang menggunakan antigen yang diasamkan, dimana sel *B. abortus* S99 atau S1119.3 diwarnai dengan *Rose Bengal* dan di suspensikan dalam buffer sampai mencapai pH 3.65. Reaksi aglutinasi harus dibaca dalam 4 menit, karena jika diinkubasi dalam periode lebih lama kadang-kadang terjadi reaksi palsu akibat pembetukkan gumpalan. pH asam akan mereduksi aglutinasi oleh IgM tetapi mendukung aglutinasi oleh IgG1, sehingga mengurangi reaksi silang. RBT sangat sensitif dan seperti uji lain kadang memberikan hasil positif karena vaksinasi dengan S19 atau reaksi positif

palsu (FPSR). Reaksi positif sebaiknya diinvestigasi menggunakan uji konfirmasi yang tersedia (menggunakan uji lain atau investigasi epidemiologi), sementara reaksi negatif palsu pada uji ini bisa terjadi tetapi jarang. Kebanyakan reaksi negatif palsu disebabkan oleh *prozoning* dan dapat dideteksi dengan cara serum diencerkan atau dilakukan uji ulang 4-6 minggu lagi, karena reaksi *prozoning* ini sering terjadi pada serum dengan level antibodi yang sangat tinggi (OIE, 2009; Poester *et al*, 2010; Nelsen and Wu, 2010). Uji ini memiliki keterbatasan karena tidak dapat dilakukan pada sampel darah atau plasma (Vorstel *et al*, 2014).

Rose Bengal Test (RBT) memiliki sensitivitas tinggi, tetapi spesifisitasnya rendah dan secara umum digunakan sebagai uji skrining brucellosis, khususnya pada negara berkembang karena uji lain perlu dilakukan dalam skala besar dan atau membutuhkan peralatan dan keterampilan khusus. Walau demikian, uji ini tetap memiliki keterbatasan ditempat yang catatan vaksinasi dan kesehatannya tidak tersedia, maka uji konfirmasi seperti ELISA, CFT, SAT harus ada untuk memastikan status brucellosis suatu daerah (Cadmus *et al*, 2008).

Complement Fixation Test (CFT) merupakan uji konfirmasi brucellosis yang telah digunakan secara luas diseluruh dunia tetapi merupakan metode yang mahal dan kompleks (tidak mudah atau sederhana) untuk dilakukan karena membutuhkan berbagai macam reagen, fasilitas laboratorium yang bagus, staf laboratorium yang terlatih dan siap bekerja intensif dan karena membutuhkan titrasi rutin tiap hari. CFT juga merupakan metode yang menantang keterampilan teknis dan membutuhkan waktu yang lama karena uji ini memerlukan titrasi reagen tiap hari dan kontrol reagen dan reaksi. Hal tersebut menyebabkan CFT

tidak digunakan secara ekstensif sebagai uji diagnostik (OIE, 2009; Poester *et al*, 2010; Nielsen dan Yu, 2010). Selama hanya isotipe IgG1 yang terfiksasi komplemen, maka spesifikasi uji menjadi tinggi dan uji tidak hanya digunakan untuk deskriminasi atau membedakan derivat antibodi terhadap *B.abortus* S19. Masalah lain adalah subyektifitas interpretasi hasil uji, inkonsistensi atau tidak teraturnya aktivasi langsung komplemen oleh serum (aktivitas antikomplementari (*anticomplementary activity*)), dan ketidakmampuan uji untuk digunakan pada sampel serum hemolisis. CFT walau merupakan uji yang cepat dan akurat tapi tidak mampu membedakan antara antibodi hasil infeksi dan antibodi hasil vaksinasi. Walau demikian, tanpa mempedulikan faktor yang dapat mempengaruhi atau mengganggu, CFT tetap menjadi aset berharga sebagai uji konfirmasi pada program kontrol atau pemberantasan brusellosis (Poester *et al*, 2010; Nielsen dan Yu, 2010). CFT spesifik mendeteksi antibodi tipe IgM dan IgG1 dan lebih sensitif pada tipe IgG1 (Vorster *et al*, 2014). CFT tidak mengikat IgG2, tetapi pada faktanya IgG2 dapat menyebabkan *prozoning* atau reksi negatif palsu pada serum yang mengandung IgG1, padahal disisi lain IgG1 akan bereaksi positif kuat. Sekarang sudah jelas bahwa jumlah antibodi IgG2 secara ekstensif dapat menginduksi *prozoning*, yang belum jelas adalah kondisi atau faktor yang menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah IgG2 secara ekstensif. Diyakini peningkatan jumlah IgG2 secara ekstensif disebabkan oleh faktor umur hewan, terpapar oleh antigen secara berulang, kondisi lingkungan yang memicu stress, dan transfer aktif IgG1 kedalam kolostrum. CFT ditemukan memberikan hasil positif palsu akibat residu antibodi setelah vaksinasi dengan vaksin S19, tetapi hal

ini lebih jarang dibanding beberapa uji yang umum digunakan (Chappel, 1989).

Terdapat beberapa jenis CFT yang dapat digunakan, tetapi lebih banyak digunakan bentuk mikrotiter. Inkubasi serum, antigen dan komplemen dapat dilakukan dalam dua metode yaitu hangat (37°C selama 30 menit) atau dingin (4°C selama 14-18 jam). Beberapa faktor yang mempengaruhi pemilihan metode adalah aktivitas komplemen dalam serum yang berkualitas rendah akan lebih baik jika digunakan fiksasi dingin, dibanding fiksasi pada suhu 37°C yang akan meningkatkan frekuensi dan intensitas prozon, dan jumlah pengencer harus diukur untuk tiap sampel. Beberapa metode yang dilakukan untuk menyempurnakan CFT yaitu menggunakan RBC domba (*sheep red blood cells* (SRBCs)) baru atau lama dengan konsentrasi yang berbeda (konsentrasi yang direkomendasikan adalah 2%, 2.5% atau 3%) yang disensitivitas dengan serum kelinci anti SRBC dalam volume sama yang diencerkan beberapa kali (2-5 kali) untuk mencapai konsentrasi minimum yang dibutuhkan untuk menghasilkan SRBCs yang lisis 100% pada larutan komplemen babi (*guinea pig complement*). Selanjutnya dilakukan titrasi terpisah (ada atau tidaknya antigen tergantung metode) untuk mengukur jumlah komplemen yang dibutuhkan untuk membuat SRBCs lisis 50% atau 100% per unit volume suspensi standar yang disebut unit komplemen atau dosis hemolitik minimum 50% atau 100% ($\text{C}'\text{H}$ atau MHD_{50} atau $\text{C}'\text{H}$ atau MHD_{100}). Secara umum direkomendasikan untuk titrasi komplemen setiap sebelum uji, makrometode akan lebih baik untuk determinasi optimal pada $\text{C}'\text{H}_{50}$. Biasanya dosis yang digunakan dalam tes adalah 1.25-2 $\text{C}'\text{H}_{100}$ atau 5-6 $\text{C}'\text{H}_{50}$. *Barbital (veronal) buffered saline* merupakan pengencer standar untuk uji CFT.

Pengencer ini dibuat dari tablet yang tersedia secara komersil atau dibuat dari larutan sodium klorit (42,5 g), asam barbiturik (2.875 g), *sodium diethyl barbiturate* (1.875 g), *magnesium sulphate* (1.018 g) dan *calcium chloride* (0.147 g) dalam 1 liter aqua destilata dan diencerkan dengan ditambahkan 4 volume larutan gelatin 0.04% sebelum digunakan (OIE, 2009). SRBCs dibuat dengan cara darah dari domba sehat yaitu yang negatif terhadap antibodi anti *Brucella*, dikoleksi secara aseptik dalam volume yang sama dengan larutan *Alsever's*. *Alsever's* merupakan larutan yang tersusun oleh *sodium chloride* 4.2 g, *Dextrose* 20.5 g, *Citrate acid* 0.55 g, *Sodium Citrate* 8.09 g, aqua destilata > 1000 ml, yang diinkubasi pada 110⁰C dan disimpan pada 4⁰C. Darah domba dan *Alsever's* dicampur secara hati-hati kemudian disentrifugasi pada 1200 rpm selama 10 menit. Setelah itu supernatan dibuang sampai lapisan tipis sel darah putih dan eritrosit dibagian sedimen dicuci dua kali, yang pertama menggunakan PBS dan yang kedua dengan menggunakan *veronal buffer* (VB dengan cara disentrifugasi 5000 rpm selama 10 menit). Selanjutnya dibuat suspensi eritrosit 1% dengan cara; 100 µl eritrosit disuspensi dengan 9.9 ml larutan VB. Hemolisin (antibodi anti eritrosit domba yang diperbanyak dalam kelinci (*anti-sheep erythrocytes antibody raised in a rabbit*)) dibuat dengan cara; menginokulasi SRBCs 1% secara intravena pada kelinci sehat. Imunisasi untuk dapatkan hemolisin ini dilakukan dalam periode waktu 20 hari, setelahnya kelinci dibunuh dengan cara *cardiac puncture*. Darah yang terkoleksi dari kelinci diproses menjadi serum. Selanjutnya serum titer tinggi tersebut disimpan pada kulkas 4⁰C. Serum dari *guinea pig* digunakan sebagai sumber komplemen dengan kualitas baik. (Chothe

et al, 2014).

Uji CFT pada dasarnya tersusun oleh antigen sel utuh *B.abortus* yang diinkubasi dengan serum yang diinaktivasi panas (pemanasan untuk menghancurkan komplemen yang ada dalam serum) dan titrasi serum asal komplemen (serum babi). Setelah waktunya tepat, dilakukan penambahan eritrosit yang diselaputi antibodi kelinci. Jika kompleks imun primer (sel *B.abortus* dan serum uji) terbentuk yang berarti ada antibodi IgG1 dalam serum dan komplemen teraktivasi sehingga komplemen tidak bisa bereaksi dengan kompleks imun sekunder (eritrosit domba dengan antibodi kelinci) dengan hasil tidak terjadi atau hanya sedikit lisis eritrosit. Jika kompleks imun primer tidak terbentuk, komplemen akan menyebabkan semua eritrosit domba yang sensitif lisis. Kemudian jumlah hemoglobin dalam larutan diukur dari aktivitas antibodi anti *Brucella* (Nelsen dan Yu, 2010; Poester *et al*, 2010). Antigen yang digunakan dalam uji CFT antigen yang harus dibuat dari strain S *B.abortus*, seperti S99 atau S1119-3 dan distandarisasi mengacu pada OIEISS. Antigen untuk uji CFT dapat dibuat melalui prosedur khusus atau dapat digunakan antigen sel utuh setelah diencerkan suspensi stok seperti PCV suspensi antigen kental untuk CFT sebaiknya mencapai 2% sebelum distandarisasi terhadap OIEISS. Antigen sebaiknya distandarisasi untuk fiksasi 50% pada pengenceran 1/200 OIEISS dan harus juga menunjukkan fiksasi sempurna pada pengenceran terendah serum, karena antigen dengan konsentrasi terlalu lemah atau terlalu tinggi, kemungkinan tidak menghasilkan fiksasi 100% pada serum pengenceran terendah. Disaat tersedia dua pengenceran antigen, maka suspensi antigen yang lebih

konsentrat harus dipilih untuk menghindari terjadinya prozon (OIE, 2009).

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) adalah suatu teknik diagnosis dengan ciri utama menggunakan indikator enzim untuk reaksi imunologi. ELISA telah mengalami banyak perubahan sejak pertama kali dipublikasikan dan telah berkembang sampai pada tingkatan yang sangat sulit untuk membuat generalisasi tentang kemampuan kinerja berbagai konfigurasi. Tersedia banyak konfigurasi dan pilihan, sehingga tidak ada dua kelompok penelitian menggunakan ELISA dengan konfigurasi identik penampilan dan kinerjanya (Burgess, 1995).

Konfigurasi ELISA berdasarkan substansi yang diberi label enzim dapat dikelompokkan dalam tiga jenis, yaitu pelabelan pada antibodi, pelabelan pada antigen, dan pelabelan pada anti-immunglobulin. Berdasarkan pelabelan antibodi terdapat lima konfigurasi yaitu Direct ELISA, Double Antibody sandwich/Direct Sandwich ELISA, Direct inhibition ELISA, Antibody Competition ELISA/Inhibition ELISA, Indirect Capture ELISA. Berdasarkan pelabelan antigen, terdapat tiga konfigurasi yaitu Antigen Competitve ELISA, Titration ELISA, dan Direct Capture ELISA. Kelompok terakhir adalah kelompok konfigurasi berdasarkan pelabelan anti-immunoglobulin yang terdiri dari Indirect ELISA, Double Antibody Sandwich Anti-globulin/Indirect Sandwich ELISA, Indirect Inhibition ELISA, dan Isotyping ELISA (Suwarno dkk. 2010).

iELISA (*Indirect Enzyme Immunoassay*) biasanya tergantung pada keberadaan antibodi dalam serum atau cairan tubuh yang lain yang akan bereaksi dengan antigen immobilisasi dan kemudian dideteksi menggunakan sistem deteksi

dengan molekul penanda (*marker molecule*). Sistem investigasi ini bervariasi mulai dari antiglobulin dilabel isotipe terhadap fluorokrom dan terhadap enzim. Umumnya lebih banyak menggunakan sistem yang bergantung pada enzim untuk deteksi dan S-LPS secara pasif dilekatkan pada matriks polistiren yang biasanya berjumlah 96 sumuran, kemudian diikuti dengan penambahan susu atau serum. Sistem deteksi bervariasi tetapi lebih sering digunakan antibodi monoklonal spesifik untuk rantai epitop dari spesies yang diuji dan dikonjugasikan dengan *horseradish peroxidase*. Enzim lain yang mungkin digunakan adalah enzim *alkalin phosphatase*. iELISA pada umumnya memiliki sensitivitas yang sangat tinggi karena mampu mendeteksi antibodi dari hewan yang tervaksinasi dengan *B.abortus* S19 dan antibodi dari reaksi silang, akan tetapi spesifisitas dapat sedikit lebih rendah dibanding pada hasil uji di wilayah yang tidak tervaksinasi. Hal tersebut diakibatkan oleh karena iELISA menggunakan S-LPS atau OPS sebagai antigen dengan sensitifitas tinggi untuk deteksi antibodi anti *Brucella*, tetapi tidak membedakan secara baik terhadap antibodi hasil dari vaksinasi dengan S19. Masalah positif palsu kemungkinan dapat diatasi dengan iELISA menggunakan *rough* LPS (R-LPS) atau antigen sitosol. Kebanyakan positif palsu merupakan hasil dari reaksi silang dengan bagian OPS dari molekul S-LPS, sedangkan reaksi silang pada bagian inti LPS jarang terjadi. iELISA skrining dibuat kaya S-LPS atau OPS dan digunakan sebagai antigen optimal, dan terdapat banyak protokol yang dapat digunakan untuk mempersiapkan antigen (OIE, 2009; Poester *et al*, 2010; Nielsen dan Yu, 2010). iELISA tersedia dalam bentuk kit komersial dari berbagai sumber dan dalam beberapa variasi tingkat akurasi, dikembangkan

sebagai uji individual yang sangat bagus sebagai *screening assay* pada diagnosis bruselosis, khususnya pada uji individual hewan atau serum atau susu ((Poester *et al*, 2010).

Beberapa jenis iELISA dibedakan berdasarkan perbedaan preparasi antigen, konjugasi antiglobulin-enzim dan substrat kromogen. iELISA komersil pada umumnya menggunakan sel utuh, SLPS atau OPS sebagai antigen yang telah divalidasi melalui uji ekstensif lapangan, dan telah tersedia serta digunakan secara umum. Pada tujuan harmonisasi internasional, 3 sera standar ELISA OIE harus digunakan oleh laboratorium referensi nasional untuk kalibrasi metode uji khususnya. Uji ini harus dikalibrasi tingkat *optical density* (OD) dengan serum standar ELISA OIE yang positif kuat yang angkanya representatif pada bagian linear dari tipikal kurva tingkat respon sebelum plateau. Serum standar ELISA OIE yang positif lemah, secara konstan memberikan reaksi positif palsu pada bagian linear kurva tingkat respon yang sama atau sedikit di atas nilai positif/negatif. Serum negatif dan kontrol buffer selalu memberikan reaksi yang lebih lemah dibanding nilai positif/negatif, sehingga akhirnya *cut-off* pada uji populasi tetap menggunakan teknik validasi terbaik. Antiglobulin monoklonal atau poliklonal, atau protein G atau konjugat enzim AG kemungkinan dapat digunakan tergantung pada ketersediaan dan kebutuhan. MAb spesifik untuk IgG1 *bovine* mungkin akan merangsang peningkatan spesifitas, tetapi pada sisi lain terjadi penurunan sensitivitas selama protein G atau enzim konjugat AG merangsang reagen yang digunakan untuk uji berbagai spesies mamalia (OIE, 2009).

Hasil penelitian Rojas dan Alonso (2014), melakukan penelitian diagnosa dan epidemiologi infeksi *B.abortus* pada sapi di Chili dengan cara membandingkan metode diagnostik brusellosis (RBT, Rivanol (RIV), iELISA berkonjugasi antibodi monoklonal (iELISA_m), dan iELISA berkonjugasi antibodi poliklonal (iELISA_p)) dengan uji CFT. Penelitian ini menggunakan 1251 serum dari induk sapi yang dibagi kedalam 3 kelompok epidemiologi yang berbeda: 1). 244 dari sapi induk yang terinfeksi dan divaksinasi S19 pada saat muda, 2). 507 dari peternakan (campuran pejantan dan induk) yang bebas infeksi dan waktu muda divaksinasi dengan S19, 3). 500 dari induk yang terinfeksi dan tidak divaksinasi. CFT digunakan sebagai “gold standard” sensitifitas pada metode lainnya yaitu; RBT 87.1%, RIV 87.1%, iELISA_m 100%, dan iELISA_p 100%. Hasil kalkulasi spesifisitas adalah; RB 100%, RIV 100%, iELISA_p 96.4%, dan iELISA_m 100%. Pada kelompok terinfeksi, masing-masing metode memberikan hasil positif; RBT 13,5%, RIV 11,9%, CFT 12.7%, iELISA_p 50.8%, dan iELISA_m 22,9%. Hasil untuk kelompok tidak terinfeksi adalah RBT 0.2%, RIV 11,9%, CFT 0.2%, iELISA_p 6.9%, dan iELISA_m 2.9%. Jumlah reaktor yang terdeteksi oleh iELISA_p lebih tinggi dibanding CFT karena dapat mendeteksi ke-4 isotope Ig, ditambah oleh hanya IgG1 yang terdeteksi oleh CFT. Sama halnya dengan iELISA_m juga terjadi peningkatan jumlah sampel positif dibanding CFT, hal ini dikarenakan fakta bahwa iELISA_m mampu mendeteksi IgG1 dalam jumlah lebih sedikit dibanding CFT. Hal ini sangat penting untuk deteksi tahap awal infeksi disuatu wilayah karena keberadaan Ig dapat dikaitkan dengan infeksi.

Competitive Immunoassay (cELISA) merupakan tipe uji kompetitif yang

digunakan untuk diagnosis serologi bruselosis. Pada kedua tipe, antibodi di immobilisasi, antibodi kompetitif, spesifik untuk OPS dengan atau tanpa sistem deteksi, ditambahkan larutan predeterminan, kemudian diikuti oleh penambahan larutan serut yang diuji dan pada beberapa kasus dilakukan melalui sistem deteksi terpisah. Uji tipe pertama merupakan immunoassay konsentrasi partikel fluoresen yang telah digunakan secara luas di Amerika. Tipe ini menggunakan *plate polistiren* yang dilapisi antigen yang akan berikatan dengan serum yang diuji dan antibodi spesifik *Brucella* poliklonal yang dilabel dengan fluorokrom. Jumlah fluorokrom berlabel antibodi yang melekat pada plate merupakan jumlah antibodi dalam serum. Tipe kedua merupakan uji kompetitif yang lebih umum digunakan dan tipe ini menggunakan S-LPS pasif yang diimmobilisasi pada dinding 96 sumuran plate polistiren. Penambahan antibodi monoklonal spesifik untuk epitop OPS dan serum uji harus dilakukan, keduanya sangat baik untuk melihat kompetisi antara keduanya. Antibodi monoklonal dapat secara langsung dilabel dengan enzim atau antibodi anti-tikus sekunder yang dilabel enzim, mungkin perlu juga ditambahkan pada sumuran. cELISA dikembangkan untuk mengatasi beberapa masalah yang berasal dari residu antibodi vaksinal *B.abortus* S19 dan dari antibodi reaksi silang. Seleksi antibodi monoklonal dengan afinitas yang cenderung tinggi terhadap antigen dibanding antibodi vaksinal/reaksi silang kebanyakan, tetapi afinitasnya lebih rendah dibanding antibodi yang berasal dari infeksi perlu dilakukan. Reaktivitas dengan antibodi vaksinal dapat dieliminasi pada kebanyakan kasus. Spesifisitas cELISA sangat tinggi, walaupun sensitivitas cenderung lebih rendah dibanding iELISA. cELISA merupakan uji konfirmasi

yang sangat bagus untuk diagnosis *Brucella* pada kebanyakan spesies mamalia dan kit cELISA telah tersedia secara komersial dari berbagai sumber (Poester *et al.*, 2010).

Direct ELISA adalah salah satu model ELISA yang langsung terjadi ikatan antara antigen dan antibodi yang dilabel dengan enzim, sehingga diperlukan keterampilan khusus untuk melakukan konjugasi dan melabel antibodi dengan enzim tetapi metode ini sedikit murah. *Sandwich* ELISA adalah model ELISA yang menggunakan perangkat 3 macam antibodi. Antibodi pertama biasanya menggunakan antibodi monoklonal, antibodi kedua adalah sampel serum yang akan diuji dan antibodi ketiga yaitu fragmen anti Ig yang akan dideteksi. Model ini lebih sensitif dan spesifik dibanding iELISA dan *direct* ELISA, maka sering digunakan pada antibodi dengan konsentrasi lebih rendah seperti dalam plasma atau cairan serebrospinal, saliva dan air mata. *Capture* ELISA adalah model yang dikembangkan khusus untuk deteksi IgM karena deteksi IgM sering negatif oleh faktor *reumatoid*, sehingga sering terjadi positif palsu. Sel ELISA dikembangkan untuk deteksi antigen atau agen yang terdapat dalam sel, sehingga hanya butuh fiksasi sel yang diinokulasikan sampel agennya, kemudian direaksikan dengan antibodi monoklonal atau poliklonal. Antibodi yang sering digunakan untuk deteksi agen dalam sel adalah antibodi monoklonal, karena agen yang terdeteksi di dalam sel belum tentu merupakan antigen yang utuh tetapi bagian tertentu yang dapat menstimulasi antibodi. Hal ini yang membuat metode ini menjadi cukup sensitif (Rantam, 2003).

Teknologi ELISA memiliki beberapa fungsi diantaranya untuk deteksi

antigen, deteksi antibodi, penentuan kadar antibodi dan antigen, penentuan stadium penyakit, penentuan kadar Ig E dan histamin pada penderita alergi, penentuan subklas Immunoglobulin, penentuan dua agen yang memiliki hubungan antigenik, penentuan antibodi asal infeksi atau hasil vaksinasi, penentuan serotype spesifik, penentuan spesies asal daging, deteksi kontaminan dalam makanan, deteksi vektor penyakit, deteksi dini kebuntingan, deteksi sel penghasil sitokin atau antibodi (Suwarno dkk, 2010).

Penggunaan ELISA sebaiknya memahami dan memenuhi asas dasarnya, diantaranya adalah 1). substrat padat; konfigurasi ELISA umumnya menggunakan substrat padat dan pada asai aslinya menggunakan permukaan gelas untuk meningkatkan adsorpsi baik antigen maupun antibodi. Dewasa ini, permukaan gelas telah diganti dengan plastik yang telah digunakan secara universal dan tersedia dengan berbagai daya adsorpsi. Sebelum merancang suatu asai, dianjurkan untuk menyediakan waktu yang banyak ditahap awal untuk memilih substrat padat yang cocok dengan mempertimbangkan rancangan akhir asai. Polimer yang dipilih harus merupakan suatu bahan dengan daya adsorpsi tinggi terhadap produk yang dikehendaki namun dengan variasi minimal dari asai ke asai. Dasar pemilihan harus ditentukan sesuai dengan tujuan pengujian. 2). adsorpsi ke substrat padat; antibodi atau antigen dapat teradsorpsi secara pasif atau dapat juga secara aktif dengan teknik pengikatan tertentu dengan variasi pengikatan yang berbeda. Variasi pengikatan dapat dipengaruhi oleh pH yang berbeda, kekuatan ion, komposisi penyangga, deterjen dalam penyangga, dan perbedaan suhu. 3). Penyangga dan larutan pencuci; perbedaan jenis penyangga

yang digunakan akan berpengaruh besar pada hasil pengujian, begitu juga pada penggunaan larutan pencuci yang berbeda. Kebanyakan larutan pencuci mengandung deterjen yang digunakan untuk mengurangi reaksi pengikatan non spesifik, dan perbedaan daya kerja tiap deterjen akan mempengaruhi hasil uji.

3). konjugat dan substrat; kedua bahan ini menjadi penentu utama konfigurasi ELISA. Enzim telah tersedia dalam berbagai jenis, begitupun substrat. Enzim berfungsi untuk mengikat secara langsung antibodi atau antigen atau secara tidak langsung melalui biotin/streptavidin atau jembatan A. Perbedaan kombinasi enzim dan substrat akan memberikan hasil yang berbeda (Tabel 2.1) (Burgess, 1995).

4). pembacaan lempeng atau hasil; metode pembacaan ELISA terdiri dari dua metode yaitu semi kuantitatif/kuantitatif dan kualitatif. Metode kualitatif dilakukan dengan menggunakan mata telanjang atau visual dengan melihat perubahan warna antara kelompok diperiksa kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol (positif dan negatif). Metode semi kuantitatif/kuantitatif dilakukan dengan menggunakan fotometer (*ELISA reader*) yang berdasarkan pada nilai absorbansi/ kerapatan optik (*optical density*, OD) dengan menggunakan konfigurasi panjang gelombang yang tepat, maka akan didapat hasil yang lebih obyektif. Pembacaan hasil dengan menggunakan *ELISA reader*, penting untuk memperhatikan profil absorpsi substrat yang digunakan. Apabila memungkinkan, maka sebaiknya menggunakan dua panjang gelombang yang berbeda, sehingga variasi antara sumbu dapat dikurangi. Panjang gelombang primer harus bertepatan dengan absorbansi puncak produk. Panjang gelombang sekunder harus bertepatan dengan dataran landai (Burgess, 1995; Suwarno dkk, 2010).

Beberapa metode membaca ELISA secara semikuantitatif/kuantitatif menurut Suwarno, dkk (2010), adalah; 1). Metode adsorbans yaitu pengukuran aktivitas antibodi-antigen dapat diekspresikan berdasarkan hasil nilai adsorbans (OD) yang terserap setelah penambahan substrat., 2). Metode positif atau negatif, hasil dibaca sebagai positif atau negatif. Hasil dikatakan positif jika nilai adsorbans sampel diatas nilai rata-rata kontrol negatif (*cut off value*, COV). Pada metode ini ada beberapa kesepakatan untuk menyatakan hasil positif yaitu jika jumlah sampel < 10 , maka COV dihitung 2-3 kali rata-rata kontrol negatif. Jika jumlah sampel 10-100 besarnya COV ditetapkan dengan cara rata-rata nilai kontrol negatif ditambah 2-3 SD (standar deviasi). Pada beberapa pengujian, rata-rata kontrol negatif tidak boleh melebihi 0,2., 3). Metode rasio yang meliputi rasio antara positif terhadap negatif (positif : negatif, P/N) atau antara sampel terhadap positif (sampel : positif, S/P). Sampel dinyatakan positif, jika memiliki nilai $P/N > 2$ atau 3 ; atau memiliki nilai $S/P > 0.2$. 4). Metode Titration atau *Endpoint Titer*; digunakan untuk mengukur titer antibodi berdasarkan pengenceran tertinggi yang masih mampu menunjukkan reaksi positif di atas nilai rata-rata kontrol negatif. Jika disepakati nilai COV adalah 2 kali rata-rata kontrol negatif, maka OD sera kontrol positif pada masing-masing pengenceran pada kisaran \geq COV dinyatakan positif. 5). Metode dosis efektif, mirip dengan metode titrasi hanya saja acuan yang diambil hanya pada nilai tengah kurva respons sigmoid., 6). Metode unit/kadar, pelaksanaan pembacaan hasilnya sama dengan metode titrasi. 7). Metode MONA (*multiple of normal activity*) yaitu metode pembacaan ELISA berdasarkan hubungan parabolik antara adsorbans dengan

kandungan antibodi atau aktivasi sampel serum.

Tabel 2.1. Pembacaan ELISA Berdasarkan Penggunaan Konjugat dan Substrat

Label Enzim (konjugat)	Substrate	Bufer Substrate	Obsorbans (nm)	Warna Produk
Horseradish Peroksidase (HRP)	ABTS (1mM) + 0.002% H ₂ O ₂	Fosfat-Sitrate (pH 4,2)	414	Hijau
	TMB (0.4mM) + 0.004% H ₂ O ₂	Asetat (pH 5,6)	650 (sebelum reaksi distop)	Biru
			450 (setelah reaksi distop)	Kuning
	OPD (4mM) + 0.004% H ₂ O ₂	Fosfat-Sitrat (pH 5,0)	492	Oranye
	5-AS (5mM) + 0.006% H ₂ O ₂	Fosfat (pH 6,8)	450	Coklat
	O-toluidin (1mM) + 0.002% H ₂ O ₂	Fosfat-Sitrate (pH 4,2)	652 (sebelum reaksi distop)	Biru
450 (setelah reaksi distop)			Kuning	
Alkaline Phosphate (AP)	p-NPP (2,7 mM)	Dietahaolamin (10 mM) dan MgCl ₂ (0,5 mM) (pH 9,8)	405	Kuning
	PMP (3mM)	Dietahaolamin (1,1 mM) dan MgCl ₂ (2 mM) (pH 8,6)	550	Merah
B-galakto Sidase	ONPG (3mM)	MgCl ₂ (10mM) dan 2-ME (0,1 M) atau PBS (pH 7,5)	410	Kuning
	CPRG (5mM)	Hepes (0,1 M), NaCl (0,15 M), L-aspartat (5mM), BSA (1%), Tween-20 (0,05%) pH 7,3	578	Merah
Urease	Urea-bromokresol (0,12 M)	NaOH (0,01 M), Urea (16 mM), dan EDTA (0,2 mM) pH 4,8	588	Ungu

Sumber; Burgess (1995)

2.3. Kabupaten Belu

Kabupaten Belu adalah salah satu kabupaten/kota di Provinsi NTT, yang terletak di daratan Timor dengan luas wilayah 2.445.57 km² atau 5.16% dari luas wilayah Provinsi Nusa Tenggara Timur, keseluruhannya berupa daratan dan terbagi dalam 24 Kecamatan. Posisi geografis Kabupaten Belu dalam dataran Timor Provinsi NTT adalah dibagian paling timur dan berbatasan langsung dengan Negara Republik Demokratik Timor Leste (RDTL). Kabupaten Belu secara geografis meliputi wilayah dengan batas-batas; sebelah utara berbatasan dengan Selat Ombai, sebelah selatan berbatasan dengan Laut Timor, sebelah timur berbatasan dengan wilayah RDTL, dan sebelah barat berbatasan dengan wilayah Kabupaten TTU, TTS dan Malaka. 24 Kecamatan yang termasuk dalam wilayah Kabupaten Belu yaitu Kecamatan Malaka Barat, Rinhat, Wewiku, Weliman, Malaka Tengah, Sasita Mean, Io Kufeu, Botin Leobebe, Malaka Timur, Laen Manen, Raimanuk, Kobalima, Kobalima Timur, Tasifeto Barat, Kakuluk Mesak, Nanaet Dubesi, Kota Atambua, Atambua Barat, Atambua Selatan, Raihat, Lasiolat, Lamaknen, dan Lamaknen Selatan. Kabupaten Belu merupakan wilayah yang berbukit-bukit dan bergunung-gunung dengan ketinggian bervariasi 0-1500 m.dpal (meter diatas permukaan air laut), variasi ketinggian dataran rendah 0-150 m.dpal, dataran sedang 200-500 m.dpal. Dataran tinggi Kab Belu hanya pada bagian timur yang berbatasan dengan RDTL. Secara umum Kab.Belu beriklim tropis dengan musim hujan yang sangat pendek (Desember-Maret) dan musim kemarau yang panjang (April-November). Temperatur udara di Kab.Belu rata-rata 27.6⁰C dengan interval 24-34⁰C, temperatur terendah 24⁰C terjadi di Bulan

Agustus dan tertinggi yaitu $33,7^{\circ}\text{C}$ pada Bulan November (Pemerintah Kabupaten Belu, 2014; EPS Kabupaten Belu, 2011).

Berdasarkan catatan BPS Kabupaten Belu (2013), populasi sapi/kerbau di Kabupaten Belu Tahun 2013 adalah 116.528 ekor atau meningkat 3,24% dibanding populasi tahun 2011, dengan distribusi tiap Kecamatan adalah; Malaka Barat; 3992 ekor, Rinhat; 7271 ekor, Weweiku; 4223 ekor, Weliman; 3404 ekor, Malaka Tengah; 9117 ekor, Sasita Mean; 3389 ekor, Botin Leo Bele; 1441 ekor, Io Kufeu; 1703, Malaka Timur; 5062 ekor, Laen Manen; 6831 ekor, Rai Manuk; 7317 ekor, Kobalima; 7006 ekor, Kobalima Timur; 4470 ekor, Tasifeto Barat; 9236 ekor, Kakuluk Mesak; 5665 ekor, Nanaet Dubesi; 4725 ekor, Atambua; 2643 ekor, Atambua Barat; 1243 ekor, Atambua Selatan; 955 ekor, Tasifeto Timur; 9010 ekor, Raihat; 5011 ekor, Lasiolat; 3679 ekor, Lamaknen; 5232 ekor, Lanaknen Selatan; 4497 ekor. BPS Kabupaten Belu (2009), kendala dalam usaha peningkatan populasi di Kabupaten Belu adalah lalulintas mutasi ternak keluar yang semakin sulit dikendalikan dan ancaman penyakit bruselosis. Mutasi ternak yang dimaksud adalah ternak dipotong dan diantar pulaukan. Pada tahun 2008 jumlah total ternak sapi yang dipotong adalah 2656 ekor dengan rincian dipotong di luar RPH 6 ekor dan di dalam RPH 2650 ekor, sedangkan yang diantar pulaukan adalah sebanyak 8693 ekor. Total sapi yang tervaksinasi Bruselosis adalah 12600 ekor.

2.4. *Brucella*

2.4.1. Biologi *Brucella*

Spesies *Brucella* kebanyakan berukuran kecil (0.6 x 0.6 sampai 1.5 μm), non motil, berbentuk cocobasil, dan merupakan bakteri gram negatif. *Brucella* termasuk kedalam kelas MZN positif karena tidak terwarnai oleh asam asetik (acetic acid) 0.5% dalam teknik pewarnaan ziehl-neelsen (MZN). *B. ovis* dan beberapa biotipe *B. abortus* membutuhkan CO₂ 5-10% untuk isolasi utamanya. Media yang kaya akan darah dan serum sangat dibutuhkan untuk kultur *B. abortus* (Quinn *et al*, 2002).

Brucella akan tumbuh baik pada lingkungan aerobik pada suhu 37⁰C dengan kisaran suhu 20-40⁰C dengan pH optimum 6.6-7.4. *B. ovis* dan beberapa biovar *B. abortus* membutuhkan penambahan konsentrasi CO₂ untuk optimalisasi pertumbuhannya, sedangkan *B. ovis* dan *B. abortus* biovar 2 membutuhkan media yang diperkaya dengan serum 5%. Pada isolasi, koloni tidak akan muncul sampai 3-5 hari inkubasi dan kebanyakan koloni akan terdeteksi pada 10-14 hari masa inkubasi, tetapi pada beberapa kasus dibutuhkan inkubasi lebih dari 21 hari. Koloni *Brucella* memiliki ciri berwarna kebiruan disaat diperiksa dengan *obliquely transmitted light*. Morfologi koloni antara yang *smooth* dan *nonsmooth* dibedakan dengan ada dan tidaknya rantai polisakaridari pada lipopolisakarida. Koloni *smooth* berwarna putih, cekung dan berkonsistensi seperti krim, sedangkan koloni *nonsmooth* memiliki bentuk sedang, kasar (*rough*) dan mukoid. Koloni *Rough* berwarna kuning dan konsistensi padat (Walker, 1999).

Brucella dapat bertahan beberapa bulan pada kondisi kelembaban tinggi, temperatur rendah dan tanpa sinar matahari. *Brucella* tidak rusak dan terpengaruh oleh pengeringan khususnya disaat ada material organik dan dapat bertahan hidup dalam debu dan tanah, serta dapat bertahan hidup lama pada temperatur rendah terutama saat suhu mulai membeku (*The center for The Center For Food Security & Public Health And Institute For International Cooperation In Animal Biologics*, 2007).

Brucella abortus terdiri dari 7 biovar yaitu biovar 1,2,3,4,5,6,7, serta biovar 9, dan biovar yang sering dilaporkan menginfeksi adalah biovar 1,2,3,4 dan 9 walaupun semua biovar dari *B.abortus* responsif untuk brucellosis pada bangsa sapi (Aparicio, 2013; Godfroid, 2013).

B.melitensis terdiri dari 3 biovar (1,2 dan 3), dan ketiganya merupakan agen penyebab brucellosis pada ruminansia kecil dan manusia. *B.suis* terdiri dari 5 biovar (1,2,3,4,5) yang semuanya responsif untuk brucellosis babi. *B.ovis* terhadap domba (Godfroid, 2013). *B.ceti* dan *B.pennipedialis* merupakan dua spesies yang menginfeksi mamalia laut (Hernández-Mora, 2013).

2.4.2. Antigen *Brucella*

Faktor virulensi bakteri *Brucella* Spp adalah eksotoksin, sitolisin, kapsul, fimbrae, flagela, plasmid, *lysogenic phage*, *endotxin lipopolisacharide* (LPS) dan pemicu apoptosis sel inang. Dua mekanisme virulensi penting lain dari *Brucella* BvrR/BvrS yaitu dua komponen sistem regulasi yang dibutuhkan untuk memodulasi sel sitoskeleton inang yang

diinvasi *Brucella*, serta untuk regulasi ekspresi *outer membrane proteins* (OMP) yang dibutuhkan untuk virulensi utuh (Poester *et al*, 2013).

Antigen protektif *Brucella* Spp terdiri dari 5 jenis yaitu *O-side chain*, *superoxidase dismutases* (SOD), *Outer Membrane Proteins* (OMP), *Heat shock proteins* (Hsp), dan L7/L12. *O-side chain* merupakan rantai polisakarida yang menjadi antigen utama *Brucella* Spp. SOD merupakan enzim metallo yang mengkatalisator dismutasi superoksida menjadi peroksida hidrogen dan molekul oksigen yang mencegah kerusakan oleh oksigen reaktif spesies (*reactive oxygen spesies* (ROS)). Superoksida merupakan produk sampingan (*byproduct*) dari respirasi aerobik melalui berbagai reaksi, termasuk produksi mikrobisidal ROS selama respirasi dalam fagolisosom makrofag terinfeksi. SOD termasuk determinan virulen utama pada beberapa spesies bakteri karena SOD menjadikan bakteri resisten terhadap aktivitas bakterisidal dari superoksida radikal. OMP kelompok bakteri *Brucella* merupakan protein immunogenik dan namanya menunjukkan lokasinya yang berada dimembran luar organisme. Analisis serologikal serum mencit dan manusia yang terinfeksi mengindikasikan adanya sejumlah respon terhadap antigen ini. Hsp merupakan protein sitoplasmik yang terinduksi selama periode stress. Protein ini bekerja sebagai saperon yang mendukung penyelimutan, pengikatan dan transport protein. Kebanyakan Hsp *Brucella* telah dianalisis sebagai antigen GroES/EL. L7/L12 merupakan protein ribosomal yang telah dikaji pada beberapa model vektor dan vaksinasi dan dikenal sebagai antigen reaktif

sel T. Respon antibodi dan hipersensitif tipe tertunda (*delayed type hypersensitive* (DTH)) terhadap protein ini telah didemonstrasikan pada sapi dan mencit yang terivaksinasi dengan strain 19 atau terinfeksi dengan strain virulen 2308 (Rojas *et al*, 2004).

2.5. Lipopolisakarida (LPS)

Strain *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis* dapat menjadi strain *rough* atau *smooth* dan mengekspresikan *rough* LPS (R-LPS) atau *Smooth* LPS (S-LPS) sebagai antigen permukaan utama, sedangkan *B.ovis* dan *B.canis* merupakan dua spesies R alami yang mengekspresikan R-LPS sebagai antigen utamanya (Cardoso *et al*, 2006).

LPS memegang peranan penting dalam virulensi *Brucella* karena dapat mencegah terbunuhnya bakteri oleh komplemen dan merangsang resistensi bakteri terhadap peptida antimikrobal seperti defensin dan laktoferin (Poester *et al*, 2013).

LPS sangat vital untuk integritas struktural dan fungsional membran luar (*outer membrane*) bakteri gram negatif dan merupakan target utama dari sistem imun *innate* mamalia. LPS diidentifikasi sebagai virulen utama *Brucella* dan memiliki tiga bagian utama yaitu lipid A, olisakarida inti (*oligosaccharide core*), dan antigen O atau *O-chain* polysaccharide (Moriyón dan López-Goñi, 1998; Cardoso *et al*, 2006; Rojas *et al*, 2004).

Lipid A disakarida lebih sering bersubstitusi dengan fosfat, molekul 1 atau 2 ortofosfat pada disakarida GlcN3N-GlcN3N *B.abortus*. Walaupun komposisi gula pada Lipid A terlihat konstan, heterogenitas lipid A yang berkaitan dengan

tingkat substitusi fosforilasi dan asil. Struktur LPS polisakarida inti pada beberapa spesies *Brucella* belum diketahui secara jelas. *Mannosa dan 2-amino-2,6-dideoxy-D-glucose (quinovosamine)* merupakan komponen LPS inti. Heterogenitas LPS inti pada beberapa mutan spesies *Rough* juga pernah dilaporkan. Polisakarida O mengontrol hidrolisis asam polisakarida S-LPS, dimana pada *B.abortus* tipe 1 hal itu disubstitusi oleh cabang homopolimer (polisakarida *O-chain*) α -1,2-linked 4-formamido-4,6-dideoxy-D-mannose (*N-formyl-perosamine*) dengan residu gula (Moriyón dan López-Goñi, 1998).

Oligosakarida inti disusun oleh ketodeoksioktonat (KDO(2-keto-3-deoxyoctonic acid), gula karbon 7 (heptoses), glukosa, galaktosa, dan asetilglukosamin N. Sama halnya dengan polisakarida inti, polisakarida O juga mengandung glukosa, rhamnosa, dan manosa (semua gula karbon 6) serta terdapat juga satu atau lebih gula dideoksi yang tidak biasa seperti abequosa, kolitosa, paratosa atau tyvelosa. Gula-gula tersebut terhubung pada 4 atau 5 sekuens membrane. Saat sekuens berulang, maka akan terbentuk polisakarida O yang panjang. Bagian lipid dari lipopolisakarida disebut lipid A, bukan lipid gliserol tetapi asam lemak yang dihubungkan oleh ikatan ester amin ke disakarida yang membentuk fosfat asetilglukosamin. Disakarida ini akan menempel pada polisakarida O melalui KDO. Asam lemak yang umum ditemukan pada lipid A adalah *caproic, lauric, myristic, palmitic, dan stearic acid*. Pada membran luar, LPS berhubungan dengan bermacam protein untuk membentuk bagian luar dari unit struktur membran (Madigan *et al*, 2004).

S-LPS mengandung immonodominan *O-polysaccharide* (OPS) yang secara kimiawi didefinisikan sebagai homopolimer *4,β-dideoxy-4-formaldehyde-α-D-mannose* berikatan melalui ikatan *glycosidic* (Poester *et al*, 2010). S-LPS merupakan endotoksin yang berada dipermukaan *Brucella smooth* (Moriyón dan López-Goñi, 1998). Tidak semua spesies dan strain *Brucella* memiliki *O-chain* dan hanya spesies yang memiliki koloni halus "*smooth*" yang memilikinya. Spesies *smooth* diantaranya adalah *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis* dan spesies pada mamalia laut yaitu *B.pinnipedae* dan *B.cetacea*. Spesies dan strain yang sedikit mengandung *O-side chain* disebut strain *Rough* dan berwarna ungu pada pewarnaan kristal violet (Rojas *et al*, 2004). Spesies alami strain *Rough* adalah *B.ovis* dan *B.canis* dan kedua spesies ini sedikit mengandung komponen OPS dan sebagai hasilnya mereka hanya memiliki R-LPS dan antigen protein (Poester *et al*, 2010; Rojas *et al*, 2004). Spesies yang termasuk *smooth* lebih virulen dibanding spesies *rough* (Rojas *et al*, 2004).

R-LPS dalam *B.abortus* RB51 yang merupakan R-LPS stabil hasil mutasi dari strain *S* virulen 2308. Strain mutan R ini tidak mengandung antigen O (rantai polisakarida pada LPS *smooth*), karena itu secara umum virulensi tipe mutan lebih rendah dibanding tipe lapang, kecuali *B.ovis* dan *B.canis* yang walaupun tipe R tapi virulen. Mutan R lebih sensitif terhadap lisis oleh komplemen, mampu bereplikasi dalam sel walau tanpa antigen O. Vaksin LPS dari mutan R menginduksi proteksi lebih rendah dibanding vaksin *smooth* S19 (Cardoso *et al*, 2006).

S-LPS diproduksi dari *B.abortus* S1119-3 atau S99 yang diekstraksi dengan cara pemanasan 5 g berat kering (50 g berat basah) suspense sel dalam 170 ml air destilasi pada suhu 66°C diikuti dengan penambahan fenol 90% (v/v) 190 ml pada suhu 66°C. Campuran tersebut distirer selama 15 menit pada suhu 66°C, kemudian didinginkan dan disentrifugasi 10.000 g selama 15 menit pada suhu 4°C. Fenol coklat yang berada dibagian bawah (sedimen) dibuang dengan menggunakan kanula panjang dan debris sel besar dibuang dengan cara filtrasi (jika perlu menggunakan filter *whatman* no.1). S-LPS dipresipitasi dengan menambahkan 500 ml metanol dingin yang mengandung 5 ml metanol yang disaturasi dengan sodium asetat. Setelah diinkubasi pada suhu 4°C selama 2 jam, presipitat dibuang dengan cara disentrifugasi 10,000 g selama 10 menit. Selanjutnya presipitan distirer dengan 80 ml air destilata selama 18 jam dan disentrifugasi pada 10,000 g selama 10 menit. Larutan supernatan disimpan pada suhu 4°C, sedangkan presipatan diresuspensi dalam 80 ml air destilasi dan distirer selama 2 jam pada suhu 4°C. Supernatan dikembalikan pada kondisi normal dengan sentrifugasi 10,000 g selama 10 menit, kemudian disimpan pada suhu 4°C. Selanjutnya, pada 160 ml LPS mentah ditambahkan 8 g *trichloroacetic acid*, setelah itu distirer selama 10 menit. Selanjutnya presipitan dibuang melalui cara konjugasi dan larutan supernatan translusen didialisis kembali dengan air destilata (dua kali dengan masing-masing 4000 ml) dan kemudian dikering bekukan (*freeze dried*). LPS kering beku ditimbang dan direkonstruksi menjadi 1 mg/ml dalam 0.05 M buffer karbonat pH 9,6 dan disonikasi dalam bak es (*ice bath*) menggunakan daya mencapai 6 watt 3 kali masing-masing 1 menit. Selanjutnya LPS dikering

bekukan dalam dosis atau ukuran 1ml dan disimpan dalam suhu ruangan (OIE, 2009).

LPS dan *O-side chain* menstimulasi produksi antibodi dari set B melalui inisiasi sinyal transduksi kaskade pada interaksinya dengan pola respon reseptor spesifik. LPS *Brucella* memiliki karakteristik yang berbeda dengan LPS dari bakteri gram negatif lainnya yaitu kandungan endotoksin yang lebih sedikit. Hal ini bisa ditutupi oleh modifikasi asam lemak lipid A yang hanya bisa terjadi pada *Brucella* virulen hidup dan tergantung pada keberhasilan sistem regulasi BvrRS. Sistem ini dibutuhkan untuk homeostasi OM dan sangat penting untuk invasi seluler yaitu sebagai perangsang polimerasi aktin yang berfungsi sebagai modulator selama invasi *Brucella*. Struktur O-chain dalam komponen *Brucella* adalah unit ulangan dari *4,6-dideoxy-4-formamido- α -D-pyranosyl* yang diikat oleh *al-2 linkage*. Variasi ikatan rantai tersebut tergantung pada karakteristik LPS, yang akhirnya dapat diklasifikasi dua strain yaitu strain A dan M. Strain A hemopolimer yang diikat oleh *al-2 linkage*, sedangkan strain M mempunyai *al-3 linkage* antara setiap residu ke Lima (Rojas *et al*, 2004).

2.6. Sistem Imunitas

Respon imun inang secara fungsional dibagi menjadi imunitas *innate* atau tidak spesifik (*non spesific*) dan imunitas adaptif atau spesifik. Sistem imun *innate* merupakan garis pertama pertahanan terhadap invasi patogen. Komponen sistem imun *innate* adalah barier anatomik (kulit dan lapisan epitel internal), molekul sekretoris (bermacam semokin dan sitokin, sistem komplemen dan opsonin) dan populasi seluler seperti sel fagosit (netrofil, monosit/makrofag, dan sel dendritik).

dan kelompok limfosit *innate* (natural killer (NK) dan sel T $\gamma\delta$). Dibagian lain imunitas adaptif, yaitu limfosit T yang bertanggung jawab dalam produksi sitokin dan sitotoksitas (imunitas seluler) dan limfosit B yang memproduksi antibodi (imunitas humoral) (Skendros dan Boura, 2013).

Makrofag, sel dendritik dan sel B termasuk kedalam kelompok *antigen presenting cells* (APC) professional. APC merupakan leukosit yang khusus membantu melawan benda asing yang masuk ke dalam tubuh. APC akan mengeluarkan sinyal kepada sel T (sel imun lain) disaat antigen masuk tubuh. Setiap sel akan berikatan dengan pathogen yang berbeda, dapat berupa bakteri, virus atau toksin (Wellness.Com, 2012). APC ini akan mencerna dan memecah protein antigen dalam bentuk epitop peptida, kemudian mengikatkan epitop tersebut pada MHC I yang kemudian memunculkan epitop tersebut pada permukaannya guna memberikan sinyal pada reseptor sel T. APC mengekspresikan MHC I (molekul HLA kelas I yang terbuat oleh sel bernukleus dalam tubuh, berfungsi mengikat epitop peptide antigen endogenous untuk mengaktifkan sistem imun melalui sel T8) dan molekul MHC-II (molekul HLA kelas yang terbentuk oleh APC). MHC II berfungsi mengikat epitop peptida dari antigen eksogenus untuk mengaktifkan sistem imun melalui sel T4) dan mempunyai dua fungsi utama bersama imunitas adaptif (humoral): sel-sel yang termasuk APC mengontrol dan memproses antigen untuk kemudian dipresentasikan pada sel T dan kemudian melepaskan sinyal yang dibutuhkan dalam proliferasi dan diferensiasi sel T (Kaiser, 2010; Cruse dan Lewis, 2004). APC professional memiliki kemampuan untuk mengaktivasi sel T helper (sel Th)

walau sebelumnya tidak pernah berikatan dengan antigen. Sel-sel tersebut mampu menghancurkan antigen secara cepat melalui proses fagositosis. Setiap sel T mengidentifikasi dan berikatan dengan kompleks molekul MHC, maka APC akan mengeluarkan sinyal stimulator untuk mengaktifkan sel T (Wellness.Com, 2012; Stagg dan Knight, 2001).

Makrofag merupakan monosit yang berasal dari sumsum tulang yang seterusnya hidup dalam jaringan sebagai makrofag residen pada semua hewan vertebrata, berbentuk khusus dan diberi nama sesuai jaringan yang ditempatinya. Makrofag memiliki dua fungsi utama yaitu sebagai fagosit profesional dan sebagai APC. Makrofag disebut juga fagosit karena memiliki kemampuan untuk menangkap, memakan dan mencerna antigen eksogen, seluruh mikroorganisme, partikel tidak larut dan bahan endogen seperti sel debris. Setiap makrofag mencerna patogen, patogen tersebut akan terperangkap dalam vakuol dan kemudian dihancurkan oleh lisosom yang merupakan toksik peroksida dalam makrofag. Makrofag dalam fungsinya sebagai APC karena kemampuannya mengikat dan mencerna antigen dan kemudian mempresentasikannya pada sel T. Makrofag memiliki masa hidup berkisar bulanan sampai tahunan dan dapat mencerna lebih dari 100 bakteri sebelum dia mati. Makrofag akan masuk masa istirahat sampai diaktivasi oleh respon imun. Setelah diaktivasi, makrofag akan bergerak masuk kebagian yang mengalami gangguan dan memakan patogen. Makrofag dapat mensekresikan interferon, lisozim, komplemen dan sitokin yang semuanya memberikan kontribusi dalam sistem imun nonspesifik dan spesifik (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Makrofag mengikat dan mengeluarkan berbagai macam antigen dan kerusakan intraseluler sebagai jalan mengganti ketidakmampuan respon imun adaptif. Makrofag akan melepaskan sejumlah reseptor termasuk reseptor manose (*macrophage mannose receptor*) dan reseptor scavenger (*scavenger receptor*) yang akan berikatan dengan komponen mikroba, sehingga organisme akan dihancurkan melalui proses yang disebut fagositosis dan degradasi. Beberapa mekanisme penting untuk mengeliminasi bakteri yang dilakukan oleh makrofag adalah melalui ekspresi level rendah molekul MHC II dan molekul kostimulator, tetapi mekanisme tersebut dapat dikacaukan oleh produk mikroba. Kebanyakan molekul makrofag sedikit sekali terkarakteristik, tetapi pada kasus endotoksin bakterial (*lipopolysaccharide*, LPS) maka molekul CD14 kemungkinan akan berikatan dengan kompleks LPS dan protein terikat LPS. Molekul tersebut sering disebut *Toll-like receptor 4* (TLR4). Disebut demikian karena adanya homologi dengan protein Toll dari laiat buah *Drosophila*, yang dihasilkan untuk meningkatkan transmisi sinyal kedalam sel, sehingga antigen dari degradasi mikroba dapat dipresentasikan pada sel T spesifik. Presentasi ini akan menyebabkan ekspansi lokal dari sel T, dan yang paling penting adalah respon dari sinyal sel T akan mengaktivasi makrofag dan secara dramatis merusak regulasi aktivitas mikrosidal. Sejumlah bakteri patogen dan parasit memiliki mekanisme untuk bertahan hidup ketika berada dilingkungan makrofag, karena beberapa makrofag menjadi inang utama yang mereka infeksi. Hanya makrofag yang teraktivasi menjadi mikrosidal yang dapat mengeliminasi beberapa patogen. Mekanisme umpan balik dari sel T setelah presentasi antigen oleh makrofag

merupakan hal yang sangat esensial dalam mekanisme eliminasi patogen oleh makrofag. Mekanisme yang paling penting adalah produksi produk yang secara langsung menjadi toksik untuk mikroba, seperti; *nitric oxide* (NO) yang diproduksi oleh enzim *inducible NO synthase* (iNOS) dan toksik metabolit oksigen seperti *superoxide* dan *hydrogen peroxide*. Mekanisme lain seperti melalui produksi enzim lisosim yang dapat merusak dinding sel bakteri gram negatif, produksi peptida antimikrobal (seperti defensin) dan metabolik kompetitor seperti laktoferrin yang mengikat zat besi. Mekanisme yang paling utama adalah reaktivasi makrofag melalui produksi interferon gamma (IFN γ) disaat CD4 spesifik sel Th1 mengenali antigen pada permukaan makrofag yang terinfeksi. Reaktivasi juga meningkatkan reseptor untuk TNF α dan produksi autokrin TNF setelah stimulasi oleh produk mikroba yang dikombinasi dengan interaksi antara CD40 pada makrofag dan CD40 terikat pada sel T teraktivasi. Walaupun semua produk dari makrofag bersifat toksik untuk bakteri, produksi yang berkepanjangan atau tidak terkontrol dari produk tersebut dapat menyebabkan kerusakan sel inang. Pembatasan aktivasi faktor melalui presentasi pada sel T spesifik yaitu produksi sitokin yang terbatas hanya pada lingkungan lokal dan aktivasi tersebut hanya ditargetkan pada sel terinfeksi (Stagg dan Knight, 2001).

Sel dendritik (SD) (*dendritic cells* (DC)) merupakan sel imunostimulator yang sangat potensial yang dibutuhkan untuk mempresentasikan antigen dan mengolahnya menjadi sinyal yang akan mengaktivasi sel T *resting*. SD hanya merupakan salah satu sel unik yang menyebabkan agregasi dan diikuti aktivasi sel

T pada paparan pertama dengan antigen. SD juga merupakan APC potensial untuk menstimulasi sel T memori yang terekpos kembali oleh antigen. Beberapa SD dapat langsung berinteraksi dengan sel B dan kemungkinan dapat meningkatkan stimulasi langsung respon sel B (Austyn dan Wood, 1994; Stagg dan Knight, 2001).

SD berasal dari sel dalam *bone marrow* atau prekursor monosit dalam darah atau monosit itu sendiri. SD dari sel induk hemapoetik akan berkembang menjadi sel *progenitor myeloid* bersama yang selanjutnya berdiferensiasi menjadi SD langerhans imatur (jaringan epitel) yang akan maturasi menjadi SD langerhans, SD interstisial imatur (jaringan non epitel) yang akan mengalami maturasi menjadi SD interstisial, monosit dan prekursor SD plasmasitoid yang mengalami maturasi dan diferensiasi menjadi SD asal monosit dan SD asal plasmasitoid (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

SD dapat diisolasi dari berbagai macam jaringan limfoid termasuk limpa, limfonodus, tonsil, *payers patches*, dan timus. SD mengandung sedikit lisosom sehingga fungsi pinositiknya sangat lemah, mengandung sedikit enzim intraseluler karenanya normal SD selalu berasosiasi dengan sel fagositik, dan mengandung sedikit retikulum endoplasma kasar karena itu tidak aktif sebagai sel sekretoris serta memiliki inti atau nukleus yang tidak beraturan (Austyn dan Wood, 1994). SD ditemukan di kulit, epitel hampir semua organ, kelenjar limfoid sebagai sel interdigit dan parakorteks sinus marginal limfatik eferen (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

SD tidak mengekspresikan marker sel T seperti CD3 dan reseptor sel T, dan

juga tidak mengekspresikan membran Ig karakteristik sel B. SD mengekspresikan molekul MHC-II dalam level tinggi, tetapi ekspresi tersebut tidak konstitutif, berlawanan dengan makrofag yang ekspresinya induksif. SD juga mengekspresikan molekul MHC-I dan reseptor komplemen tipe 3 dalam level rendah (Austyn dan Wood, 1994).

SD yang merupakan APC yang berperan pada awal pengenalan protein asing, mengawali respon imun seluler dan humoral melalui aktivasi sel T naïf, Th, CTL dan sel B. Aktivasi sel Th tersebut perlu diatur dengan baik oleh karena respon terhadap antigen dapat fatal. Salah satu pengamanan terhadap aktivasi sel Th adalah melalui TCR yang hanya mengenal antigen yang dipresentasikan melalui MHC-II oleh APC seperti makrofag, sel B dan SD. SD mempresentasikan fragmen peptida antigen dengan bantuan molekul konstimulator B7 yang secara terus menerus diekspresikan pada sel T dalam level tinggi. Konstimulator atau koreseptor adalah protein permukaan sel yang meningkatkan sensitivitas reseptor antigen melalui ikatan dengan ligan yang sesuai dan memfasilitasi aktivitas sinyal. SD mempresentasikan peptida antigen ke sel T CD4⁺ melalui MHC-II atau ke sel T CD8⁺ melalui MHC-I, sehingga dapat mengaktifkan sel CD4 dan sel CD8 secara langsung. Molekul CD4 dan CD8 adalah koreseptor sel T yang mengikat bagian nonpolimorfik dari molekul MHC secara bersamaan dengan ikatan TCR dan residu polimorfik dan peptida (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Limfosit B atau Sel B merupakan 5-25% dari limfosit dalam darah yang berasal dari liver fetus pada masa tahap awal perkembangan embrional dan paling

banyak berasal dari sumsum tulang yaitu 50%. Pada unggas, sel B berkembang dalam bursa fabrisius dan pada mamalia sel B berkembang dan matang dalam sumsum tulang (*bone marrow*) (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010; Cruse dan Lewis, 2004). Antibodi disintesa oleh Sel plasma karena adanya sel B atau precursor sel B (Cruse dan Lewis, 2004). Pada tahap awal perkembangannya, sel B terdiri dari Pre-Pro sel B, Pre sel B dan *small pre* sel B (Austyn dan Wood, 1994). Berdasarkan ekspresinya, sel B terdiri dari sel B *mature*, sel B-1, dan sel B-2. Sel B *mature* merupakan sel B yang mengekspresikan IgM dan IgD dan dari awal terbentuk langsung berfungsi dan memiliki kemampuan berespon terhadap antigen. Sel B *mature* merupakan tahap ahir pematangan sel B dalam *bone marrow* dan kemudian bermigrasi ke organ limfoid periferal. Sel B-1 merupakan sel B yang mengekspresikan glikoprotein CD5 dan mensintesis antibodi spesifisitas tinggi (*broad specificities*), merupakan sel B dengan populasi minor dan disebut sel B CD5. Sel B-2 merupakan sel B yang gagal mengekspresikan CD5, mampu mensintesis antibodi spesifisitas rendah (*narrow spesificities*) dan merupakan populasi terbesar sel B (Cruse dan Lewis, 2004).

Sel B resting memiliki kemampuan ekspresi permukaan sel level tinggi melalui MHC kelas II tetapi tidak mampu menstimulasi respon sel T. Sel B resting tidak mampu mengekspresikan molekul kostimulator yang dibutuhkan untuk efisiensi presentasi antigen, walau aktivasi molekul tersebut tergantung induksi dari sel B. Sel B teraktivasi lebih potensial menjadi APC. Antibodi pada sel B dibentuk pada permukaan Ig sel yang berfungsi sebagai reseptor spesifik antigen. Deteksi dan presentasi protein antigen terlarut melalui rute ini sangat

efisien, tetapi tidak pada presentasi antigen nonspesifik yang terdeteksi. Ekspresi sel B, khususnya reseptor diperkirakan memiliki frekuensi antara $1/10^4$ dan $1/10^6$ pada individu secara alami dan frekuensi rendah ini kemungkinan membatasi fungsi sel B sebagai APC pada respon imun tahap awal. Malahan, peranan sel B sebagai APC sangat baik dalam mendeteksi antigen melalui permukaan Ig dan dipresentasikan pada epitop sel T terkait untuk preaktivasi sel T selama respon lanjutan. Interaksi ini serta kemampuan sel B untuk merespon sinyal perkembangan dan diferensiasi dari sel T dikenal sebagai 'help'. Inisiasi interaksi ini terjadi utamanya pada fokus proliferasi sel B dalam area dominan sel T di limfonodus, termasuk juga induksi ligan untuk molekul CD40 yang merupakan molekul yang dapat menuntaskan ekspresi CD40 pada sel B resting. Adesi molekul (LFA-1 pada sel T dan ICAM-1 pada sel B) menstabilkan ikatan interaksi antara limfosit, yang diikuti oleh reorganisasi sitoskeletal dan polarisasi pelepasan sitokin interleukin (IL) 4. Sinyal terlarut dari sel T merupakan target untuk sel B spesifik. Kombinasi sinyal melalui CD40 dan IL-4 memicu ekspansi klonal sel B. Interaksi antara sel B dan sel T pada pusat germinal juga termasuk dalam sel B memori (Stagg dan Knight, 2001).

Sel B teraktifasi setelah berinteraksi dengan antigen sel Th, selanjutnya sel B mempresentasikan antigen ke permukaan melalui MHC II agar dikenali oleh sel Th (CD4+) yang selanjutnya akan mensekresi limfokin yang sesuai sebagai stimulator, sedangkan sel B memproduksi antibodi. Adanya ikatan antara sel B dan antigen akan mengaktifkan sel fagosit dan komplemen yang berfungsi untuk melisis sel target (Rantam, 2003). Antibodi pada fungsi netralisasinya, bekerja

sebagai opsonin yang akan memfasilitasi fagositosis bakteri oleh APC, aktivasi komplemen dan merangsang *antibodi-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) oleh makrofag, netrofil dan sel NK (Skendors dan Baura, 2013).

Antibodi adalah protein imonoglobulin yang disekresikan oleh sel B yang teraktivasi oleh antigen. Berat molekul antibodi berkisar 150.000 sampai 950.000 Da, tergantung pada kelasnya. Semua molekul antibodi terdiri dari dua rantai peptida pendek yang sama dikenal dengan *light chain*, sedangkan yang terdiri dari untaian peptida yang panjang dikenal dengan nama *heavy chain*. Keduanya terjadi ikatan kovalen bersama yang disebut ikatan disulfida. Imunoglobulin memiliki struktur yang terdiri dari fragmen ab (Fab) dan fragmen c (Fc) yang keduanya dirangkai oleh untaian dua sulfida (s-s). Fab merupakan bagian yang terdiri dari asam amino yang bertugas untuk mengikat antigen yang dikenal dengan side binding antigen (bagian yang berikatan dengan antigen), sedangkan Fc terdiri dari karbohidrat yang sering berikatan dengan komplemen (Rantam,2003).

Ig terdiri dari 5 kelas yaitu IgM, IgG, IgE, IgD dan IgA. IgM berperan sebagai reseptor permukaan sel B dan disekresi pada tahap awal respon sel plasma. IgM dengan proporsi 8% memiliki *heavy chains* Mu, Ig terbanyak ketiga dalam serum, Ig pertama yang dibuat oleh fetus dan oleh sel B virgin saat distimulasi oleh antigen, sebagai pengikat komplemen terbaik karena berstruktur pentamer sehingga efisien dalam melisis dan mengaglutinasi mikroorganisme (fungsi aglutinasi terbaik), mampu berikatan dengan banyak sel serta merupakan Ig permukaan sel B sebagai reseptor antigen. IgG memiliki *heavy chains* gamma.

dan terdiri dari 4 subkelas (IgG1, IgG2, IgG3 dan IgG4), merupakan Ig terbanyak dalam serum dan ekstrasvaskuler, dapat ditransfer secara plasental sehingga merupakan Ig yang satu-satunya yang dapat menembus barier plasenta menuju fetus dan memberikan imunitas pada masa awal perkembangan fetus, mampu mengikat komplemen, berikatan dengan sel (makrofag, monosit, netrofil dan beberapa limfosit yang memiliki reseptor Fc). IgA memiliki *heavy chain* alfa dan terdiri dari 2 subkelas (IgA1 dan IgA2), dan merupakan Ig terbanyak kedua dalam serum, Ig terbanyak pada sekresi air mata, saliva, kolostum, dan mukus sehingga penting untuk imunitas lokal, tidak mengikat komplemen tetapi berikatan dengan sel netrofil dan limfosit. IgD memiliki *heavy chains* delta, berjumlah sedikit dalam serum, utamanya ditemukan pada permukaan sel B sebagai reseptor antigen, dan mengikat komplemen. IgE merupakan Ig yang memiliki *heavy chains* epsilon, paling sedikit terdapat dalam serum, terikat sangat kuat dengan reseptor Fc basofil dan sel mast sebelum berinteraksi dengan antigen sehingga terlibat dalam reaksi alergi (hipersensitif), tidak mengikat komplemen, dan secara signifikan meningkat pada serum pasien yang terinfeksi parasit cacing (Harti, 2013).

Antibodi monoklonal (*monoclonal antibody* (mAb) merupakan satu satunya antibodi yang dipisahkan dari banyak antibodi poliklonal dan karena itu mAb digunakan untuk menemukan epitop spesifik (Glen, 2012). Antibodi monoklonal dapat dibuat dengan cara *in vivo* dan *in vitro*. Secara *in vitro* diproduksi dengan cara hibridisasi sel myeloma dan sel limfa kemudian dibiakan pada mikroplate 96 sumuran dan diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37⁰C, sedangkan

secara *in vivo* setelah dihibridisasi diinkokulasi pada ruang peritoneal mencit, kemudian cairan asites diisolasi dan dimurnikan sebagai antibodi monoklonal (Rantam, 2003).

Beberapa perbedaan antara MAb dan PAb adalah; (1). Produksi PAb secara umum lebih cepat, murah dan membutuhkan sedikit keterampilan dibanding pada produksi Mab. Sebagai contoh, produksi PAb butuh beberapa bulan untuk inisiasi imunisasi, sedangkan produksi MAb yang secara umum melalui hibridisasi membutuhkan waktu lebih dari setahun. (2). MAb lebih homogen (monospesifik), sehingga dapat digunakan untuk evaluasi perubahan konformasi molekul, interaksi protein-protein dan tahap fosforilasi, serta identifikasi anggota baru yang termasuk dalam kelompok protein. MAb dengan monospesifiknya sangat terbatas penggunaannya, sedikit perubahan dalam struktur dan epitop dapat mempengaruhi fungsi dari MAb, oleh karenanya sebaiknya diproduksi sesuai kondisi antigen yang akan dideteksi. PAb lebih heterogen dan dapat mendeteksi epitop antigen, efek dari perubahan satu atau lebih epitop tidak berpengaruh secara signifikan pada fungsi PAb. (3). PAb lebih stabil pada perubahan pH dan konsentrasi garam, sedangkan MAb dapat sangat sensitif dengan perubahan kedua hal tersebut. (4). Produksi MAb dilakukan melalui hibridisasi menggunakan hibridoma, sedangkan PAb diproduksi menggunakan banyak hewan melalui imunisasi. (5). PAb lebih spesifik dibanding MAb, karena PAb diproduksi dari banyak klon sel B yang masing-masing memproduksi antibodi yang spesifik epitop dan serum poliklonal disusun oleh antibodi dengan spesifitas unik. Konsentrasi antibodi spesifik dalam serum poliklonal berkisar 50-200 $\mu\text{g/mL}$ dan

total konsentrasi Ig dalam serum poliklonal berkisar antara 5 dan 20 mg/mL, sedangkan MA_b yang diproduksi dari asites atau sel kultur khusus 10 kali lebih rendah konsentrasinya dan lebih tinggi kemurniannya. (6). MA_b secara umum tidak digunakan pada uji yang tergantung pada reaksi silang dengan antigen (contohnya hemaglutinasi), terlepas antigen yang digunakan adalah antigen numerik atau multiemerik atau antigen yang terikat pada fase padat. (7). Afinitas hanya dapat diukur dengan menggunakan PA_b karena PA_b disusun oleh banyak antibodi dengan afinitas masing-masing (Lipman, 2014).

Limfosit *innate* merupakan interferensi antara imunitas *innate* dan adaptif, termasuk didalamnya adalah sel *natural killer* (NK), natural killer T (NKT), dan sel T $\gamma\delta$. Jika dibandingkan dengan sel T spesifik antigen konvensional ($\alpha\beta$ TCR CD4+ dan limfosit T CD8+), limfosit *innate* berpopulasi lebih sedikit dalam populasi sel darah perifer dan merespon antigen non pertida (glikolipid dan fosfolipid) tanpa restriksi MHC. Kebanyakan hasil kajian meyakini limfosit *innate* berperan penting sebagai produsen awal dan cepat INF γ pada imunitas terhadap patogen intraseluler sebelum terjadi ekspansi respon spesifik Th1 (Skendors dan Boura, 2013).

Sapi memiliki rumen yang merupakan faktor ekologi yang dapat menghasilkan mikroba dalam jumlah besar yang berperan dalam pencernaan hijauan, produksi dan pelepasan *possess pathogen associated moleculer pattern* (PAMPs) yang direspon oleh makrofag melalui pola pengenalan reseptor (*pattern recognition receptors* (PRR)) dan mengantarkan sapi pada regulasi dasar. Hal inilah yang menyebabkan sapi memiliki regulasi yang sangat ketat terhadap

respon inflamasi *innate* (Rojas *et al*, 2004; Hurley, 2013).

Sapi memiliki netrofil dan sel mononuklear yang dalam sirkulasi. Sel inflamasi memproduksi *nitric oxide* (NO) dan *radical oxygen species* (ROS) yang berperan penting pada reaksi inflamasi langsung dalam mengontrol invator berbahaya pada sapi. Sapi juga memiliki respon imun intermedia (diatur oleh lipid dan phospho-protein atau lipo-protein) untuk mengontrol infeksi. Sapi juga memiliki sel gamma-delta dalam jumlah yang relatif tinggi dalam sirkulasi, dimana sel ini mampu mengidentifikasi antigen dalam konteks antigen CD1. Kontrol respon imun tidak tergantung pada PAMP, tetapi melalui identifikasi langsung struktur yang dihasilkan oleh invator ganas yang mungkin menjadi bagian dari cara yang digunakan oleh sapi dalam mengatur respon inflamasi dan mengurangi kerusakan akibat paparan reguler oleh produk mikroba. Sapi memiliki lebih banyak kemiripan dengan manusia dibanding dengan mencit dalam hal diferensiasi respon Th1/Th2 terhadap antigen. Sapi dapat menunjukkan respon spesifik yang tinggi dalam konteks respon Th1 atau Th2, tetapi tidak muncul pada respon memori. Immunoglobulin (Ig) sapi memiliki kemiripan dengan Ig pada manusia dan mencit (manusia dan mencit tidak sama), misalnya Ig sapi representatif terhadap gen *single light chain* (sama dengan mencit), tetapi berbeda dengan mencit yang menggunakan Ig Kappa, sapi menggunakan lambda. Selain itu, sapi memiliki IgG1 sebagai sekreta Ig sebagai tambahan pada IgA. Sapi juga memiliki FcR yang unik yang hanya mengidentifikasi IgG2b dan penting pada kontrol infeksi bakteri (Hurley, 2013).

Berbagai data penelitian telah menunjukkan hubungan kuat antara imunitas

innate dan respon imun adaptif. Imunitas *innate* adalah imunitas non spesifik yang mendeteksi struktur molekul mikrobial (pathogen associated molecular patterns atau PAMPS) dalam jumlah terbatas melalui PRRs yang berada di beberapa tempat seperti membran plasma, vesikel endosomal dan ruang sitoplasma, yang mampu mendeteksi mikroba pada lokasi masing-masing. PRRs terdiri dari *Toll-like receptors* (TLRs), *nucleotide oligomerisation domain-like* (NOD-like) *receptors* (NLRs), *C-type lectin receptors* (CLRs) dan *RIG-like receptor* (RLRs). Deteksi mikrobial oleh PRRs pada membran sel akan memicu terjadinya fagositosis. PRRs juga ada dalam fagosom dan dapat meningkatkan harmonisasi dan efektivitas proses imun *innate* dan adaptif. PRRs dalam ruang sitoplasma mampu mendeteksi DNA dan RNA, sehingga menginduksi interferon tipe 1 dan sitokin inflamasi lainnya. Jalur sinyaling TLRs dapat meningkatkan harmonisasi dan efektivitas proses fagositosis, lalu lintas fagosom dan autofagi, sehingga berefek pada terinduksinya ekspresi sitokin, aktivasi SD dan induksi ekspresi permukaan molekul kostimulator dan MHC kelas II, serta induksi peningkatan prosesing dan presentasi antigen. SD akan memproses peptida dalam fagosom untuk dipresentasikan pada ikatan MHC kelas II dan TLR yang selanjutnya menginduksi translokasi kompleks MHC-peptida dari endosom ke membran plasma, kemudian akan dipresentasikan pada sel T CD4⁺. Melalui jalur presentasi silang, pemendekan akses antigen pada retikulum endoplasma (RE) melalui fusi fagosom dengan RE, sehingga terjadi pelepasan antigen pada molekul MHC kelas I dan presentasi antigen pada permukaan sel T CD8⁺. TLRs dalam perannya sebagai imunitas protektif terhadap patogen intraseluler, dapat

melakukan fungsinya melalui perantara respon sel T helper 1 (Th1) oleh sel T CD4⁺ dan respon sitokin oleh sel T CD8⁺, maka TLRs sistem imun *innate* dapat memicu peningkatan imunitas adaptif setelah infeksi atau vaksinasi (Olsen, 2013).

2.7. Interaksi Antara Sistem Imun dan *Brucella*

Makrofag dan SD memegang peranan pada imunitas *innate*, mengidentifikasi dan menginduksi kemampuan imunitas adaptif terhadap bakteri intraseluler seperti *Brucella Spp*, dan interaksi antara dua sel ini dengan *Brucella Spp* terjadi dalam banyak bentuk. Kedua tipe sel ini memiliki banyak mekanisme induksi untuk eliminasi bakteri (Tabel 2.2). Sementara disisi lain bakteri dapat masuk kedalam sel fagosit tersebut untuk menghindari respon imun seluler dan mempertahankan infeksi dalam waktu lama. *Brucella Spp* mempertahankan infeksi dalam waktu lama dengan cara mengekspresikan faktor virulensi (PAMP) yang akan berinterferensi dengan atau tidak merespon antimikrobal dan potensial presentasi antigen dari makrofag dan SD. Karakteristik strategi tersebut adalah penurunan aktivitas stimulasi dan toksisitas pada APC, peningkatan tingkat replikasi intraseluler sebelum terjadinya aktivasi respon imun Th1 (Tabel 2.3) (Skendors dan Boura, 2013).

Brucella yang berbeda akan berbeda kemampuannya dalam menginvasi dan bertahan hidup dalam makrofag dan kemampuan itu berkorelasi dengan virulensinya. Virulensi *Brucella* akan muncul untuk aktifnya pengaturan kembali lalulintas melalui kompartemen sampai akhir hubungan kompartemen dengan retikulum endoplasma serta lalulintas dalam vakuol sistem autofagik (Rojas *et al*, 2004). Autofagik adalah proses homeostatik seluler dimana sitoplasma target

diisolasi dalam vesikel membran ganda yang disebut autofagosom dan kemudian dipindahkan ke lisosom untuk didegradasi. Autofagik menjadi mekanisme imun *innate* penting yang hasilnya adalah eliminasi langsung berbagai macam patogen melalui degradasi hidrolitik dalam autofagolisosom (xenofagi, lihat Tabel 2.2). Patogen yang ditelan oleh APC, sinyaling TLR dan INF γ yang disekresi oleh sel Th1 merupakan induktor potensial pada mesin autofagi terhadap bakteri intraseluler. Deteksi dan sinyaling oleh TLR merupakan hal krusial bagi aktivasi APC dan menjadi substansi yang digunakan untuk hasilkan imunitas adaptif. TLR mendeteksi berbagai macam PAMP bakteri termasuk LPS, lipoprotein dan asam nukleat, kemudian dilepas untuk aktivasi faktor transkripsi dasar yaitu *nuclear factor* (NF)- κ B), *activator protein* (AP)-1, dan *IFN regulatory factor* (IRF)3/IRF7. Sinyal TLR kemudian memediasi produksi berbagai macam sitokin proinflamasi (TNF α , Interleukin (IL-12, IL-6, IL-1 β , type 1 IFN)) dan ekspresi molekul ko-stimulan (CD80, CD86), kemudian diakhiri oleh imunitas *innate* dan adaptif (Skendors dan Boura, 2013).

Brucella difagosit dengan fagositosis zipper-like konvensional melalui interaksi berbagai macam ikatan lipid menggunakan bermacam reseptor promotor fagositosis (FcR, C3bR, Scvenger Receptors (SRs)). Fagositosis oleh sel M, makrofag dan neutrofil dihindari melalui mekanisme *Zipper like* yang merupakan mekanisme invasi yang berefek penting pada lokalisasi seluler dari organisme yang tertelan dan ini penting karena; bakteri teropsonisasi lebih efisien terbunuh dan terdegradasi oleh makrofag dengan disertai fusi antara fagosom dan lisosom dibanding organisme yang tidak teropsonisasi. Walaupun pada saat masuk

makrofag dan sel SD, kebanyakan bakteri (90%) terbunuh pada 1 jam pertama, akan tetapi beberapa dari bakteri ini dapat bertahan hidup dan kemudian berreplikasi. Cara *Brucella* memanipulasi imunitas inang dan mengambil manfaat darinya dapat dilihat pada Tabel 2.3 (Skendors dan Boura, 2013; Rojas *et al*, 2004).

B. abortus memodulasi respon imun *innate* sel tropoblas, menekan ekspresi mediator proinflamasi selama tahap awal infeksi, kemudian diikuti oleh tertundanya dan rendahnya ekspresi proinflamasi semakin pada plasentom (Poester *et al*, 2013). *Brucella abortus* sangat berbeda dengan patogen intraseluler lain karena tidak menghasilkan eksotoksin, memiliki kapsul anti fagositik atau memiliki dinding yang tebal, berbentuk resisten atau fimbri dan tidak menunjukkan perubahan jika ada perubahan antigen. Aspek kunci virulensi *Brucella* adalah kemampuannya berproliferasi dalam sel fagosit profesional dan non profesional. Hal itu menyebabkan *Brucella* sangat sukses menghindari efek bakterisidal dari fagosit. virulensi serta infeksi kronik darinya menjadi dua kemampuannya untuk menghindar dari mekanisme penyingkiran dan eliminasi oleh sel inang. Beberapa studi dengan menggunakan sel fagosit non profesional menunjukkan bahwa *Brucella* masuk ke dalam sel inang dengan membawa serta sesuatu organel seperti vakuol. Vakuol tersebut sangat cepat melebur (fusi) dengan autofagosom awal yang menurunkan maturasi vacuolar H^+ -ATPase dan *lysosome-associated membrane proteins* (LAMP) menjadi autofagosom akhir. Hal tersebut akan menghambat fusi atau peleburan autofagosom dan lisosom yang akhirnya menyebabkan replikasi vakuol berjalan normal dalam retikulum

endoplasma. Respon terhadap keberadaan LPS oleh sel seperti monosit dan makrofag telah dikembangkan beberapa abad lalu pada mamalia dengan respon dan reaksi cepat terhadap infeksi gram negatif. Respon cepat sistem imun seluler terhadap LPS tersebut secara tipikal meningkatkan pelepasan sejumlah mediator proinflamasi seperti, TNF α , IL-6, IL-12 dan IL-1 pada tempat infeksi dan dalam level menengah yang memberikan manfaat untuk inang dalam memicu inflamasi yang merupakan respon imun pertama untuk mengeliminasi organisme. Walaupun disaat tubuh terekspos oleh LPS secara ekseksif atau sistemik akan menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi sistemik yang berakibat terjadinya gagal atau kerusakan fungsi multi organ, shok dan kematian. Respon terhadap LPS bakteri dimediasi oleh CD14 yang merupakan sel yang membutuhkan sedikit transmembran dan material intraseluler untuk mentransduksi sinyal dan membutuhkan sejumlah molekul untuk masuk ke famili TRL. TRL merupakan bentuk protein reseptor respon mamalia (Cardoso *et al*, 2006).

Peranan imunitas humoral dalam melawan infeksi bakteri intraseluler sebenarnya terbatas dan tidak protektif. Antibodi berperantara opsinisasi oleh imonoglobulin (IgM, IgG1, IgG2a dan IgG3), merangsang dan memicu fagosit menangkap bakteri, membatasi level inisiasi infeksi oleh *Brucella*, tetapi memiliki sedikit efek pada rute intraseluler dari infeksi *Brucella*. Berdasarkan prespektif klinis, deteksi antibodi terhadap Br-LPS umumnya digunakan untuk diagnosis bruselosis pada ternak dan manusia (Skendors dan Baura, 2013).

Respon antibodi terhadap infeksi *B.abortus* pada sapi biasanya diawali

dengan produksi isotype IgM, rata rata muncul pada 5-15 hari pasca vaksinasi. Respon antibodi IgM yang sangat pendek akan segera diikuti oleh produksi antibodi isotype IgG1 dan disusul oleh IgG2 dan IgA. Oleh karena onset dini produksi IgM, maka secara teoritikal pengukuran isotype ini akan menjadi indikator keterpaparan, walaupun banyak mikroorganisme lain yang memiliki antigen dengan epitop sama terhadap OPS dan respon antibodi utama terhadap reaksi silang antigen IgM. Oleh karena itu pengukuran antibodi IgM kadang- kadang memberikan reaksi positif palsu pada uji serologis dan spesifitas rendah. Produksi isotype IgG2 dan IgA terjadi ditahap lanjut infeksi dan karenanya pengukuran antibodi tersebut secara umum akan rendah sensitivitasnya, sehingga untuk mengukur antibodi pada uji serologis terhadap brucellosis digunakan IgG1 (Poester *et al*, 2010).

Tabel 2.2. Mekanisme Dasar Aksi Efektor Terhadap *Brucella*

Mekanisme efektor	Cara kerja
Fagositosis dan autofagi (xenofagi)	Degradasi oleh enzim fagolisosom/autofaglisosom
Antimicrobial cationic peptides (defensif)	Bunuh secara langsung
Pemecah oksidatif	Bunuh langsung dengan menggunakan ROS
Produksi sitokin; TNF α IL-12	Peningkatan kekuatan aktivitas bakterisidal fagosit Produksi respon imun Th1, produksi INF γ , dan sitokin terhadap infeksi <i>Brucella</i>
Sekresi semokin (makrofag) MCP-1, RANTES, MIP1a/MIP1b Presentasi antigen	Migrasi sel imun dan mempertahankan inflamasi untuk batasi infeksi Produksi respon imun spesifik, produksi INF γ dan CTL (sitotoksin)

Sumber: Skendors dan Baura (2013)

Tabel 2.3. Cara *Brucella* Menghindari Dan Memanipulasi Imunitas Inang

Faktor virulensi atau PAMP	Cara kerja	Hasil
Sistem sekresi tipe IV (virB)	Membuat diversi lalulintas intraseluler khusus untuk replikasi	Kestabilan paratisme intraseluler
Sistem regulasi BvrS/BvrR	Kontrol sistem yang esensial untuk lalulintas intraseluler	Kestabilan paratisme intraseluler
Periplasmic β -cyclic glucan	Biogenesis BCV	Kestabilan paratisme intraseluler
Proline Racemase	Mitogen sel B dan T independen menstimulasi sekresi IL-10	Supresi imunitas seluler
PrPA	Berinterferensi dengan sinyaling TLR2 dan TLR4, pembatasan aktivitas induksi My-88 terhadap NF κ B	Subversi respon imun <i>innate</i> dan respon proinflamasi
Btp1/TcpB	Penghambatan sitoksin CTL	Bebas dari imunitas adaptif
Flagelum	Mengurangi induksi konektivitas reseptor TLR5	Bebas dari deteksi imun <i>innate</i>
LPS	Pelemahan respon endotoksik	Bebas dari imunitas <i>innate</i> dan stabil sebagai parasit intraseluler
	Penghambatan fusi fagolisosom	Kestabilan paratisme intraseluler
	Penghambatan fungsi fagositosis dan bakterisidal	Subversi imunitas <i>innate</i>
	Proteksi dari serangan komplemen	Subversi imunitas <i>innate</i>
	Menggagalkan presentasi antigen MHC II	Bebas dari imunitas adaptif
	Induksi produksi IL-10	Supresi imunitas seluler
	Berinterferensi dengan TLR4/MD-2 menghambat maturasi	Subversi imunitas <i>innate</i> ,
Lipoprotein Omp19	Penghambatan ekspresi molekul MHC II dan presentasi antigen pada limfosit T CD4+ pada monosit manusia	Bebas dari imunitas adaptif
Lipoprotein Omp25	Induksi apoptosis sel T manusia	Bebas dari imunitas adaptif
?	Mengacaukan regulasi produksi TNF α pada makrofag dan SD manusia	Bebas dari imunitas adaptif
?	Deteksi transduksi sinyal IFN- γ pada makrofag manusia yang terinfeksi	Bebas dari imunitas <i>innate</i> dan stabil sebagai parasit intraseluler
	Subversi atau eksploitasi xenofagi	Bebas dari imunitas <i>innate</i> , stabil sebagai parasit intraseluler dan terprofokasinya infeksi (infeksi menyebar dari sel ke sel)

Sumber: Skendors dan Baura (2013)

2.8. Vaksin Terhadap Bruselosis

Vaksin yang tersedia untuk kontrol bruselosis pada sapi adalah vaksin *B.abortus* strain 19, vaksin *B.abortus* strain RB51, vaksin *B.melitensis* strain Rev.1, dan vaksin strain 82. Vaksin strain 19 dan RB51 lebih banyak digunakan pada sapi, hal ini dikarenakan tidak ada hasil eksperimen yang membuktikan bahwa vaksin Rev 1 memiliki efikasi terhadap infeksi *B.melitensis* pada sapi. Selain itu tingkat keamanan vaksin ini pada sapi belum diketahui. Selama tingkat keamanan dan efikasinya belum diketahui, maka vaksin Rev 1 tidak dianjurkan digunakan pada sapi (Ragan, 2013).

Vaksin *B.abortus* strain 19 digunakan sebagai vaksin aktif dan normal diberikan pada sapi betina umur antara 3-6 bulan dosis tunggal melalui rute subkutan dengan dosis $5-8 \times 10^{10}$ organisme. Dosis yang dikurangi dari 3×10^9 menjadi 3×10^8 organisme dapat diberikan melalui rute subkutan pada sapi dewasa, tetapi beberapa hewan akan memiliki titer antibodi yang terus naik dan kemungkinan akan terjadi aborsi dan hewan akan mengekskresikan organisme strain vaksin dalam susu. Alternatifnya adalah pemberian vaksin pada sapi pada umur tertentu dengan satu atau dua dosis 5×10^9 organisme, diadministrasikan melalui rute konjungtiva; hal ini akan memberikan proteksi tanpa respon antibodi persisten dan berkurangnya resiko abortus serta berkurangnya ekskresi organisme dalam susu ketika vaksinasi dilakukan pada sapi dewasa. Vaksin *B.abortus* strain 19 dapat menginduksi imunitas yang bagus terhadap ujiantang dengan organisme virulen (OIE, 2009).

Vaksin *B.abortus* strain RB51 merupakan vaksin yang telah digunakan secara umum di beberapa negara sejak Tahun 1996. Vaksin *B. abortus* strain RB51 adalah strain *rough* yang merupakan derivat *B. abortus* strain 2308 yang dilemahkan melalui pasase pada mencit dan sapi, kemudian diuji kemampuannya untuk menginduksi proteksi pada sapi terhadap *B. abortus* virulen melalui ujiantang. Pada dua pasase terakhir strain 2308 mengalami mutasi LPS jalur biosintetik. Mutasi ini sangat stabil, telah diuji dan dijamin tidak terjadi reversi menjadi *smooth* baik secara invitro dan invivo. Beberapa kajian telah dilakukan pada sapi untuk membandingkan potensi vaksin RB51 dan S19. Kajian tersebut dilakukan dengan cara sedikit membedakan metode administrasi vaksin pada beberapa negara. Di USA, sapi muda divaksinasi pada umur 4-12 bulan dengan $1-3.4 \times 10^{10}$ organisme strain RB51 melalui rute subkutan (sc). Vaksinasi sapi umur diatas 12 bulan hanya boleh dilakukan atas ijin dan pengawasan kantor federasi kesehatan hewan, dan direkomendasikan dosis $1-3 \times 10^9$ organisme strain RB51. Di Negara lain, direkomendasikan vaksinasi sapi pada umur 4-12 bulan dengan dosis $1-3.4 \times 10^{10}$, kemudian dilakukan vaksinasi ulangan pada umur 12 bulan dengan dosis yang sama. Kesimpulan umum dari kajian tersebut adalah bahwa RB51 secara signifikan tidak bisa menginduksi proteksi yang lebih tinggi dibanding S19 dan secara konvensional S19 tetap lebih superior. Hasil lain adalah ketika vaksin RB51 diberikan dalam dosis penuh melalui rute intravenus, maka terjadi plasentitis dan infeksi plasenta, serta terjadi ekskresi sejumlah organisme vaksin dalam susu sapi yang divaksin. Akan tetapi ketika dosis dikurangi (1×10^9 CFU) dan diadministrasikan melalui rute subkutan pada sapi

bunting, tidak terjadi abortus atau lesio plasentitis (Lubroth *et al*, 2007; OIE, 2009).

Vaksin strain Rev 1 merupakan vaksin dari isolat *B.melitensis* dan masih diperdebatkan efikasi protektifnya terhadap *B. melitensis* pada sapi dibanding vaksin S19, walau hipotesisnya vaksin Rev 1 lebih efektif dalam kondisi tersebut. Berdasarkan eksperimen, tidak ada hasil yang menunjukkan efikasi vaksin Rev 1 terhadap infeksi *B.melitensis* pada sapi. Selain itu belum diketahui keamanan vaksin ini pada sapi. Vaksin Rev 1 sebaiknya tidak direkomendasikan pada sapi sebelum dinyatakan aman untuk sapi pada status fisiologis berbeda dan sebelum ada bukti efikasi vaksin ini terhadap *B. melitensis* dalam kondisi terkontrol (OIE, 2009).

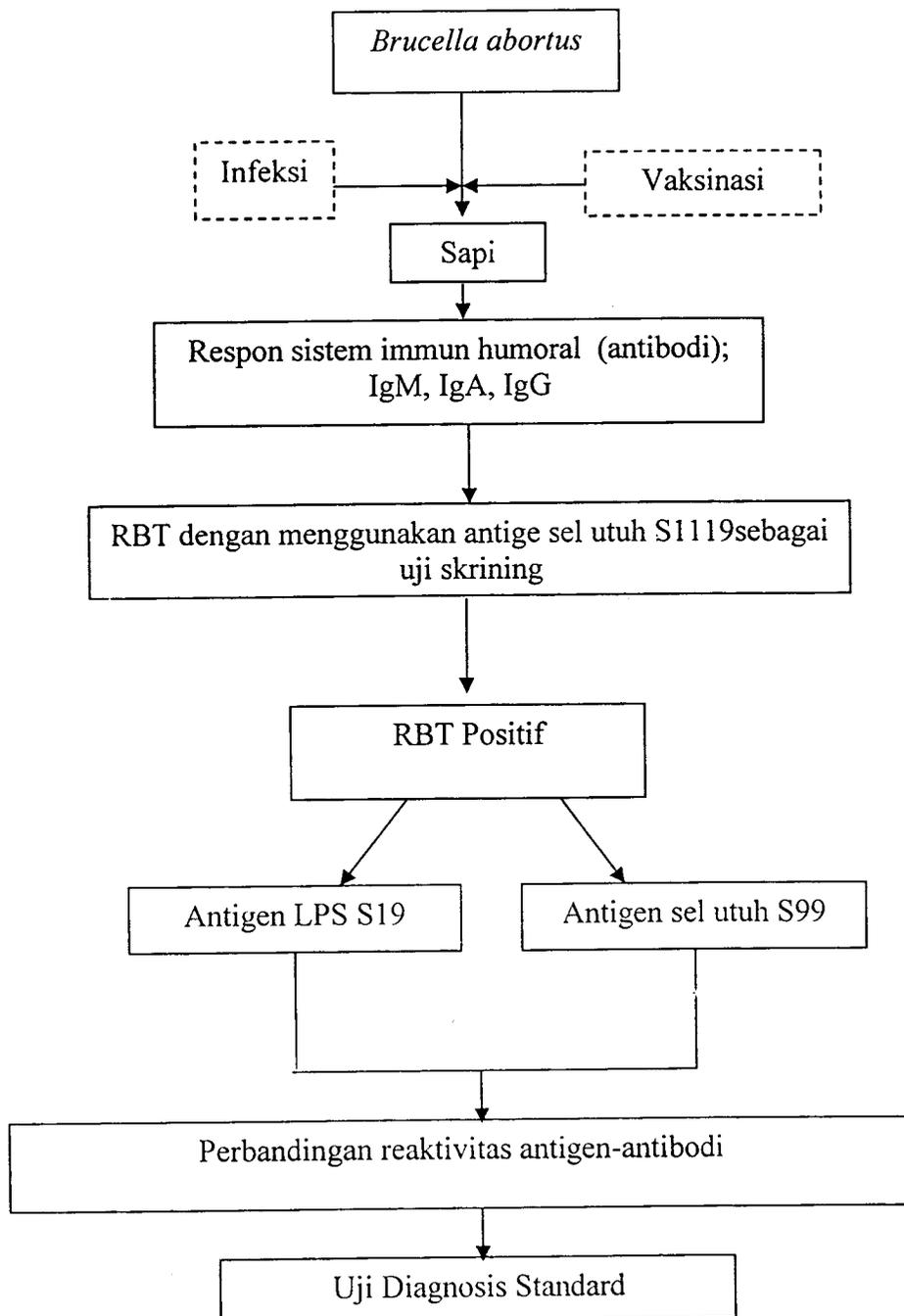
Vaksin strain 82 merupakan vaksin yang sangat sukses digunakan untuk proteksi sapi terhadap *B.abortus*. Strain ini memiliki kemampuan sedang dalam mengekspresikan antigen O pada permukaannya, tetapi respon humoral kurang kuat dengan durasi yang pendek saat dideteksi dengan uji diagnostik (Olsen, 2013).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Kerangka kenseptual penelitian

Tidak dilakukan

Brucella abortus sebagai salah satu spesies *Brucella* yang dapat menyebabkan brusellosis pada hewan sapi, dewasa ini telah banyak diteliti untuk dikembangkan sebagai vaksin dan antigen diagnostik. Penggunaan *Brucella abortus* sebagai antigen diagnostik dapat dilakukan melalui dua cara yaitu menggunakan sel utuh *Brucella abortus* atau menggunakan salah satu atau kombinasi antigen *Brucella abortus*. Vaksinasi dan infeksi tidak dilakukan pada penelitian ini, kedua kegiatan tersebut mengikuti kondisi lapangan di Kabupaten Belu NTT yang merupakan daerah endemis brusellosis dengan prevalensi 13,7% pada tahun 2013. Angka prevalensi merupakan representasi dari jumlah individu yang terinfeksi dalam suatu populasi, dan 13,7% merupakan indikasi tertular berat (>2%) dan indikasi banyaknya reaktor dalam suatu populasi. Kondisi tersebut dapat menjadi gambaran bahwa di Kabupaten Belu NTT terdapat peluang besar terjadinya infeksi alam brusellosis. Berdasarkan Kepmentan Nomer. 828/kpts/OT.210/10/98 tentang pengendalian brusellosis pada ternak di Indonesia, pengendalian dilakukan melalui dua strategi pemberantasan berdasarkan tingkat kejadian (prevalensi) yaitu jika prevalensi reaktor $\geq 2\%$ dengan kategori tertular berat, maka metode pemberantasannya dengan cara vaksinasi. Infeksi dan vaksinasi akan berefek sama pada inang yaitu perangsangan respon kekebalan tubuh inang yaitu respon imun innate (seluler) dan adaptif (humoral). Respon imun adaptif tubuh inang terhadap infeksi atau vaksinasi *B. abortus* adalah pembentukan antibodi (immunoglobulin: Ig) yaitu IgA, IgM dan IgG.

Diagnosa serologis yang direkomendasikan secara internasional oleh OIE sebagai organisasi kesehatan hewan dunia adalah *Rose Bengal Test* (RBT),

Buffered plate agglutination test (BPAT), *Complement Fixation Test* (CFT), *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs); indirect (iELISA) dan competitive (cELISA), dan *fluorescence polarisation assay* (FPA). Penelitian ini menggunakan 3 diagnosis serologis yaitu RBT (*Rose Bengal Test*) yang menggunakan antigen sel utuh *Brucella abortus* S1119.3, CFT (*Complement fixation test*) menggunakan antigen sel utuh *Brucella abortus* S 99, dan yang ketiga adalah uji iELISA (*Indirect Enzyme Immunosorbent Assay*) menggunakan antigen LPS dari *Brucella abortus* S19 koleksi pribadi Prof.Dr. Suwarno, drh., Msi. *Rose Bengal Test* (RBT) mendeteksi IgG1, CFT mampu mendeteksi IgG1, dan iELISA mampu mendeteksi IgM, semua IgG, dan IgA. *Rose Bengal Test* dalam penelitian ini dijadikan sebagai uji tapis atau skrining, di mana serum positif pada hasil uji RBT digunakan sebagai bahan pengujian performa iELISA dan CFT. *Complement fixation test* (CFT) merupakan uji konfirmasi brusellosis yang telah digunakan secara luas di seluruh dunia dan akan dibandingkan dengan performa iELISA melalui cara membandingkan tingkat reaktivitas antigen dari masing-masing uji terhadap antibodi serum uji. Penentuan performa iELISA terhadap CFT ditentukan dengan analisa Kappa dan analisa jalur atau regresi.

3.2. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah bahwa iELISA dengan menggunakan antigen LPS S19 dapat memiliki performa yang sama baiknya dengan uji CFT, sehingga dapat menjadi uji konfirmasi brusellosis selain CFT.

BAB 4

MATERI DAN METODE

BAB 4. MATERI DAN METODE

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bersifat observatif.

4.2. Populasi, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelompok sapi yang ada di Kabupaten Belu NTT dengan umur > 6 bulan dan besar sampel 182. Sampel berupa serum darah dalam penelitian diambil dengan teknik langsung secara acak. Jumlah sampel didapatkan dengan rumus sebagai berikut (Danardono, 2014);

$$n = \frac{Z^2 \times P (1 - P)}{E^2}$$

n = jumlah sampel,

Z = standar skor pada tingkat kepercayaan 95% (1,96),

P= proporsi atau pevalesi (13,7%),

E = Proporsi sampling error (5%)

$$n = \frac{1,96^2 \times 0,137 (1-0.137)}{0.005^2}$$

$$n = \frac{3,8416 \times 0,137 \times 0.863}{0,0025}$$

$$n = \frac{0,454}{0,0025} = 181,6 = 182.$$

4.3. Variabel Penelitian

Variabel bebas dari penelitian ini adalah jenis antigen dan serum, variabel perantaranya adalah jenis uji sedangkan variabel tergantung adalah titer antibodi.

4.4. Definisi Operasional

1. Titer antibodi adalah konsentrasi antibodi dalam serum yang dapat ditentukan dengan menggunakan uji serologis
2. Titer RBT adalah titer antibodi *B.abortus* berdasarkan uji RBT yang ditentukan berdasarkan tingkat aglutinasi yang terbentuk oleh ikatan antara antigen dalam alat uji dengan antibodi dalam serum. Tingkat aglutinasi ini ditetapkan dengan skoring negatif, positif 1 (+1), positif 2 (+2) dan positif 3 (+3).
3. Titer iELISA adalah titer antibodi *B.abortus* berdasarkan uji iELISA yang ditentukan berdasarkan tingkat kerapatan warna substrat yang terserap (nilai OD (*optical density*) atau nilai kerapatan optik) yang terbentuk sesuai dengan antibodi yang terikat dengan antigen dalam alat uji. Nilai OD ini ditentukan secara kuantitatif dengan menggunakan alat baca yaitu ELISA *reader* dan kemudian ditentukan positif atau negatifnya berdasarkan nilai COV (*cut of value*). COV dapat ditentukan dari nilai OD serum kontrol negatif atau dapat juga ditentukan dengan bantuan analisa statistik ROC (*Receiver Operating Characteristic*) terhadap OD serum uji.
4. Titer CFT adalah titer antibodi *B.abortus* berdasarkan uji CFT yang ditentukan kompleks ikatan tiga komponen yaitu antigen yang digunakan

dalam alat uji, antibodi dalam serum uji dan komplemen dalam alat uji. Ikatan ini dibaca berdasarkan tingkat lisis yang diskoring mulai dari 0-4 dengan cara diamati langsung dengan bantuan cermin (mirror reader) atau pada bagian bawah mikroplate dialasi kertas putih, kemudian dibandingkan dengan kontrol lisis SRBCs. Skor akan semakin tinggi jika tingkat lisis SRBCs semakin berkurang dan konsentrasi antibodi (Ab) dalam serum semakin tinggi. 0 berarti lisis SRBCs 100%, 1 berarti lisis SRBCs 75%, 2 berarti lisis SRBCs 50%, 3 berarti lisis 25% SRBCs dan 4 berarti tidak terjadi lisis SRBCs. Skor yang terbaca kemudian digunakan sebagai dasar penentuan titer dan kadar. Penentuan titer dan kadar dilakukan dengan memasukan skor dan pengencerannya kedalam kalkulator CFT. Penentuan positif ditetapkan dengan mengacu pada ketentuan OIE yaitu titer ≥ 20 ICFTU/ml.

4.5. Bahan Penelitian

Bahan penelitian ini terdiri dari bahan yang digunakan untuk koleksi, prosesi dan transportasi serum, bahan untuk uji iELISA, dan bahan untuk uji CFT. Bahan yang digunakan untuk mengoleksi dan memproses dan mentransport serum yaitu alkohol 70%, kapas steril, es batu/dry ice. Bahan yang digunakan untuk uji RBT adalah serum dan antigen RB. Bahan yang digunakan untuk pengukuran titer antibodi dengan teknik iELISA yaitu serum, antigen LPS *B.abortus* S19 (diperoleh dari Prof.Dr. Suwarno, drh.,Msi), PBS-Tween tanpa NaN_3 (tween 20 0,5 ml, PBS 1000 ml) , konjugat anti *bovine* yang berlabel *alkaline phosphatase* (AP), substrat p-NPP, *coating buffer* pH 9,6 (Na_2CO_3 1.59 g.

NaHCO_3 2.93 g, NaN_3 0.2 g, aquades 1000 ml), *stopping reagent* (NaOH 1 N), *whasing buffer*. Bahan yang digunakan untuk uji *Rose Bengal Test* (RBT) adalah, Reagen Rose Bengal produksi Pusvetma, serum, antigen, sedangkan bahan yang digunakan untuk uji CFT adalah serum uji, serum standar, komplemen, anti komplemen, *veronal buffered saline*, hemolisin, dan eritrosit domba (SRBCs).

4.6. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian ini dibagi menjadi dua kelompok, yaitu instrumen untuk keperluan koleksi, processing dan transportasi serum, dan instrumen untuk keperluan uji (RBT, iELISA dan CFT).

Instrumen yang digunakan untuk koleksi, prosesing dan transport serum yaitu, syringe/spoit, venoject, tabung tanpa antikoagulan, mesin sentrifugasi, mikropipet, lemari es, tabung avendorf, kertas label, spidol/bolpoin, box transport.

Instrumen yang digunakan pada uji RBT adalah mesin sentrifugasi, plate haemaglutinasi WHO, *freezer* -20°C dan kulkas, mikropipet, iluminator dan *shacker*. Pada uji iELISA instrumen yang digunakan adalah mesin sentrifugasi, mikropipet, *shacker*, *microplate polistiren 96 well*, *freezer* -20°C dan kulkas, inkubator, ELISA reader, gelas ukur (50-250 ml), dan cawan petri, sedangkan instrumen untuk uji CFT adalah *microplate polistiren 96 well*, pipet, mikropipet, mesin sentrifugasi, tabung sentrifugasi, inkubator, *water bath*, *microwave*, *reading mirror*, inkubator, spectrophotometer, cold room, mikropipet, *freezer* -20°C dan kulkas.

4.7. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi pengambilan sampel serum dan observasi adalah di Kabupaten Belu NTT, sedangkan lokasi pengujian RBT adalah di Laboratorium Keswan Dinas Peternakan Kabupaten Belu, iELISA di Laboratorium Virologi dan Imunologi Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga serta CFT di Laboratorium Balai Besar Penelitian Veteriner (BBVet) Maros. Pengambilan sampel serum dilakukan Bulan Oktober 2014, pengujian CFT dilakukan pada Bulan November 2014, sedangkan pengujian iELISA dilakukan Bulan Maret-Mei 2015.

4.8. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.8.1. Prosedur koleksi dan prosesing darah

Darah dikoleksi dari sapi secara langsung dengan menggunakan venoject pada vena jugularis. Koleksi darah dilakukan dengan cara vena jugularis atau cogsigea dibendung dengan ibu jari, jarum yang terbungkus karet dimasukkan dalam *plastic holder*, sedangkan jarum yang tidak terbungkus karet ditusukkan dalam pembuluh darah dengan cepat dan lembut untuk mengurangi rasa sakit. Selanjutnya tabung vakum dimasukan ke dalam *holder* dan didorong hingga tutup karet tabung vakum ditembus jarum, maka darah akan mengalir otomatis ke dalam tabung vakum.

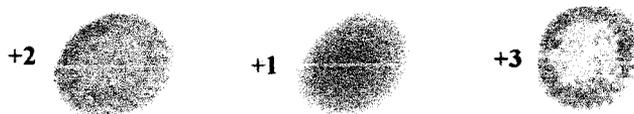
Darah yang terkumpul selanjutnya diprosesing menjadi serum dengan cara mebiarkan darah membeku pada suhu kamar selama 20-30 menit. (untuk mendapatkan serum dalam jumlah yang lebih banyak, tabung disimpan dalam posisi miring) Selama proses pembekuan, sampel

darah disimpan di suhu kamar dan tidak disimpan dalam pendingin agar tidak terjadi lisis. Bekuan dipisahkan dan dikeluarkan dari tabung dengan cara ditarik dengan menggunakan stick kawat berujung bengkok, kemudian tabung kembali ditutup dan disentrifugasi pada 2000-3000 rpm selama 10 menit. Serum yang sudah jadi dimasukkan ke dalam tabung avondorf dan diberi label untuk selanjutnya digunakan untuk uji RBT secara bersamaan.

4.8.2. Prosedur Uji RBT

Serum dan antigen dipindahkan dari refrigerator atau freezer ke tempat bersuhu ruang ($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$) dan hanya antigen yang digunakan pada hari tersebut yang dikeluarkan dari refrigerator. Tiap sampel serum ditempatkan pada plate haemaglutinasi WHO sebanyak 25-30 μl . Plate digoyang dengan lembut dan kemudian antigen diteteskan dekat setiap tempat serum di teteskan sebelumnya dengan volume yang sama. Sesaat setelah meneteskan antigen yang terakhir, serum dan antigen dicampur dengan cara plate digoyang. Campuran tersebut dipusingkan selama 4 menit pada suhu kamar pada pemusing rocker. Setelah 4 menit, dilakukan pembacaan adanya reaksi aglutinasi dan setiap reaksi yang terlihat adalah indikasi positif. Interpretasi; Negatif jika tidak terjadi aglutinasi yaitu antigen dan serum tetap homogen dan berwarna ungu kemerah-merahan, positif 1(+) jika terbentuk garis putus-putus dengan tepi dikelilingi partikel halus, positif 2 (++) jika aglutinasi halus dengan batas tepi jelas dan cepat, membentuk partikel aglutinasi kasar dengan tepi pinggiran lebar. Positif 3 (+++) jika aglutinasi sempurna, cepat dan

membentuk partikel lebih kasar serta cairan jernih. Gambaran interpretasi hasil uji RBT tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Interpretasi Hasil Uji RBT (Microbeonline, 2013).

4.8.3. Prosedur Uji iELISA

Pada penelitian ini digunakan prosedur iELISA dari Shafee *et al* (2012) yaitu; antigen LPS dengan kadar 1,25 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan dengan bufer karbonat dan dilekatkan pada mikroplate ELISA sebanyak 100 $\mu\text{l/sumuran}$. Mikroplate kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama semalaman. Sumuran kemudian diblokir dengan menggunakan creamer 4%, masing-masing sebanyak 200 $\mu\text{l/sumuran}$ dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Mikroplate kembali dicuci dengan cara yang sama untuk selanjutnya ditambahkan dengan serum yang diuji. Serum uji diduga mengandung antibodi terhadap *B.abortus* diencerkan 1:100 dengan bufer assay dan ditambahkan ke dalam sumuran mikroplate @100 $\mu\text{l/sumuran}$. Sebagai kontrol digunakan serum kontrol positif yang diencerkan dengan pengenceran 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400 dan 1/12800, serta kontrol negatif diencerkan pada pengenceran 1/100, masing-masing dimasukkan ke dalam mikroplate sebanyak 100 $\mu\text{l/sumuran}$. Mikroplate diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 1 jam dan dicuci dengan cara yang sama. Berikutnya ditambahkan konjugat anti-bovine yang

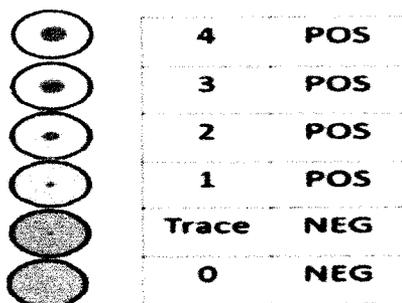
berlabel alkalin fosfatase pada pengenceran 1:2500 dengan cara yang sama untuk selanjutnya ditambahkan substrat p-NPP dengan kadar 1 mg/ml, masing-masing sebanyak 100 µl/sumuran, dan diinkubasi pada suhu kamar di ruang gelap selama 15-30 menit. Reaksi kemudian dihentikan dengan pemberian larutan stopping NaOH 1N sebanyak 50 µl/sumuran dan dibaca pada ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm.

4.8.4. Prosedur Uji CFT

Pelaksanaan uji CFT diperlukan beberapa persiapan sebelumnya, diantaranya preparasi serum uji, pembuatan SRBCs, titrasi komplemen dan haemolisin. Semua tahap pada uji CFT dilakukan di Laboratorium BBVet Maros dengan mengacu pada petunjuk Morrisy (1998); dilakukan pembuatan SRBCs (*sheep red blood cells*), Titrasi Komplemen dan haemolysin dan pelaksanaan pengujian.

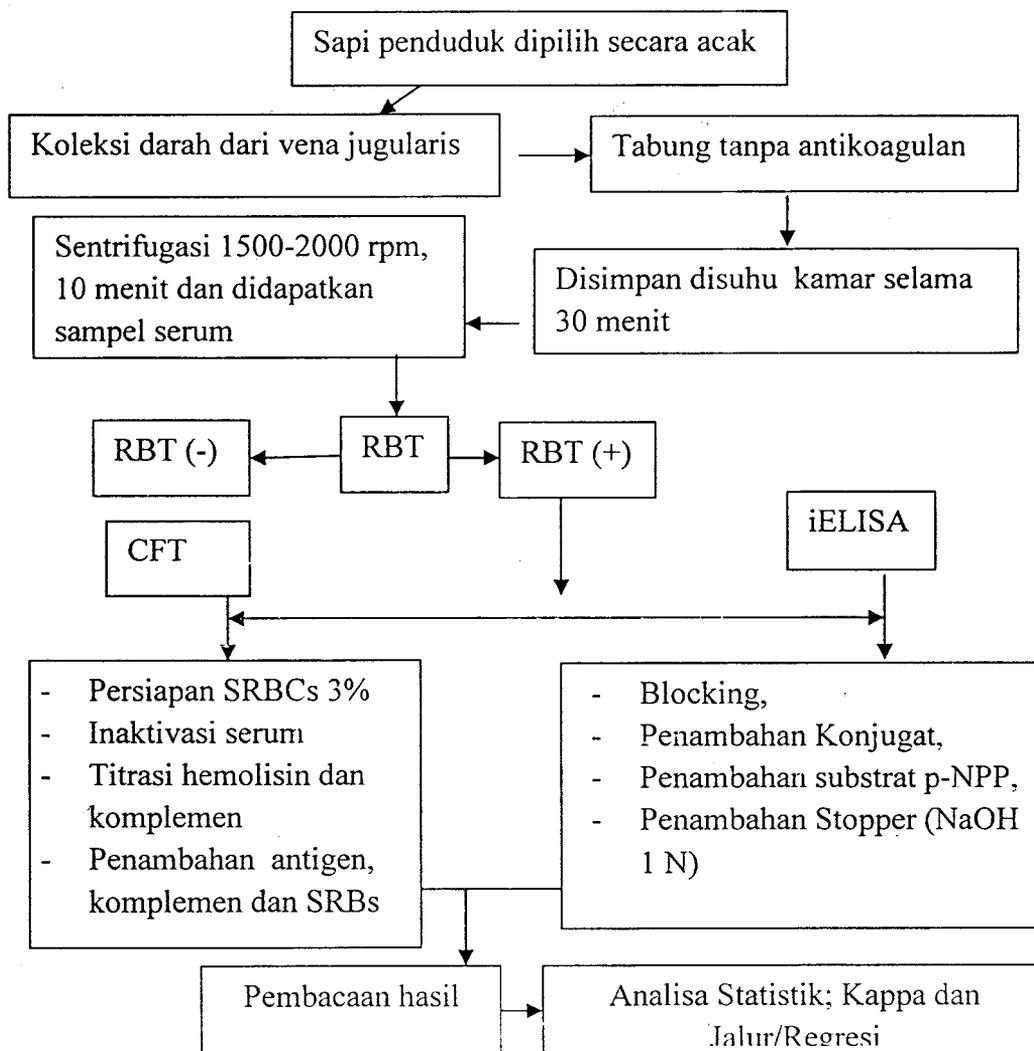
Serum uji dan serum standar diinaktivasi dengan menggunakan penangas air (*water bath*) selama 34 menit pada suhu 58⁰C. Sebanyak 50 µl serum uji ditambahkan pada sumuran pertamadan masukan 25 µl VBSG (*veronal buffered saline*) pada tiap sumuran pada semua baris sumuran uji dan semua sumuran kontrol antigen kecuali kolom I. Selanjutnya dilakukan pengenceran serial berganda dengan cara memindahkan 25 µl serum dari sumuran pertama sampai sumuran terakhir dan 25 µl dari sumuran terakhir dibuang. 25 µl/sumuran VBSG ditambahkan pada sumuran kolom ke-2. Masukkan 25 µl/sumuran antigen yang telah diencerkan pada tiap sumuran pada kolom 2. Komplemen yang telah diencerkan menjadi 5

HC'50 dalam VBSG ditambahkan 25 μ l pada tiap sumuran kecuali sumuran kolom 2 (kontrol HS), kemudian goyangkan plate dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 30 menit. Setelah inkubasi, tambahkan 25 μ l SRBC's yang telah sensitisasi pada setiap sumuran, kemudian bungkus plate dengan menggunakan *acetat plate sealer* dan campur SRBC's dan sampel dengan cara menggoyang plate. Setelah itu, inkubasi pada suhu 37⁰C selama 30 menit, goyang setelah 15 menit. Sentrifugasi plate pada 600g selama 10 menit dan baca dengan menggunakan *reading mirror*. Nilai dari tiap sumuran dicatat (4-0 untuk lisis 0%-100%). Catat tingkat akurasi serum dan antigen kontrol (anti atau pro komplemen), tingkat akurasi komplemen kontrol (rendah atau tinggi), sensitivitas sel kontrol (utuh atau lisis). Catat titer serum uji dan kontrol pada pengenceran tertinggi menunjukkan 25% atau fiksasi tinggi, contoh 3/128 berarti 75% terfiksasi pada pengenceran 1/128. Interpretasi: hasil dibaca berdasarkan tingkat lisis yang diskoring mulai dari 0-4. Skor akan semakin tinggi jika tingkat lisis SRBCs semakin berkurang dan konsentrasi antibodi (Ab) dalam serum semakin tinggi. 0 berarti lisis SRBCs 100%, 1 berarti lisis SRBCs 75%, 2 berarti lisis SRBCs 50%, 3 berarti lisis 25% SRBCs dan 4 berarti tidak terjadi lisis SRBCs. Gambaran interpretasi hasil uji CFT dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Interpretasi Hasil Uji CFT (Lunt, 2014).

4.9. Bagan Kerangka Operasional



Gambar 4.3. Kerangka Operasional.

4.10. Analisa Data

Hasil uji iELISA dan CFT dilakukan analisa nilai kesesuaian atau nilai *KAPPA(K)* dengan mengacu pada kaidah tabel 2x2 dan rumus (Thrusfield, 2005): Nilai *K* didapat dengan terlebih dahulu menghitung *EP+* (*expected propotion agreement by chance (both positive)*), *EP-* (*expected propotion agreement by chance (both negative)*), *OP* (*observation propotion agreement between two*

test), OA (*observed agreement beyond chance*), MA (*maximum possible agreement beyond chance*);

$$EP+ = \left\{ \frac{a+b}{n} \right\} \times \left\{ \frac{b+d}{n} \right\}$$

$$EP- = \left\{ \frac{c+d}{n} \right\} \times \left\{ \frac{b+d}{n} \right\}, EP = (EP+) + (EP-)$$

$$OP = \frac{a+d}{n}$$

$$OA = OP - EP, MA = 1 - EP$$

$$K = OA / MA$$

Perhitungan nilai *K* antara antara uji iELISA dan CFT dilakukan dengan menggunakan software statistik SPSS 22, dan dengan *software* yang sama dilakukan juga analisis jalur atau regresi langsung dan tidak langsung dari uji RBT ke iELISA serta dari RBT ke CFT.

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

BAB 5. ANALISIS HASIL PENELITIAN

Berdasarkan perhitungan jumlah sampel, maka sampel minimal yang harus terkumpul sebagai syarat kevalidan jumlah sampel penelitian adalah 182. Pada penelitian ini, sebanyak 251 sampel serum telah dikumpulkan dari hewan sapi pada peternakan rakyat di lima Kecamatan di Kabupaten Belu dengan rincian 42 ekor jantan dan 209 betina. Semua sampel tersebut dikumpulkan dengan disertai data tambahan berupa jenis keiamin, umur, status vaksin, Desa serta Kecamatan asal sampel (Lampiran 1). Semua sampel yang terkumpul telah diperiksa dan diuji serologis dengan uji RBT (*Rose Bengal Test*) secara serempak dengan hasil 17 sampel menunjukkan hasil positif dan 234 negatif. Semua sampel serum yang positif RBT berasal dari sapi betina dengan kisaran umur 1.5 – 8 dan rata-rata 4,5 Tahun.

Berdasarkan skema kerangka operasional penelitian bahwa sampel yang menunjukkan hasil positif pada uji RBT akan dilakukan uji CFT dan iELISA, maka ke-17 sampel positif RBT dilakukan uji CFT di laboratorium serologis BBVet Maros yang mengacu pada metode uji CFT oleh Morrissy (1998) dan iELISA di laboratorium virologi dan imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dengan mengacu pada metode uji iELISA oleh Shafee *et al* (2012). Titer dari tiap sampel pada uji RBT, iELISA dan CFT dapat dilihat pada Tabel 5.1.

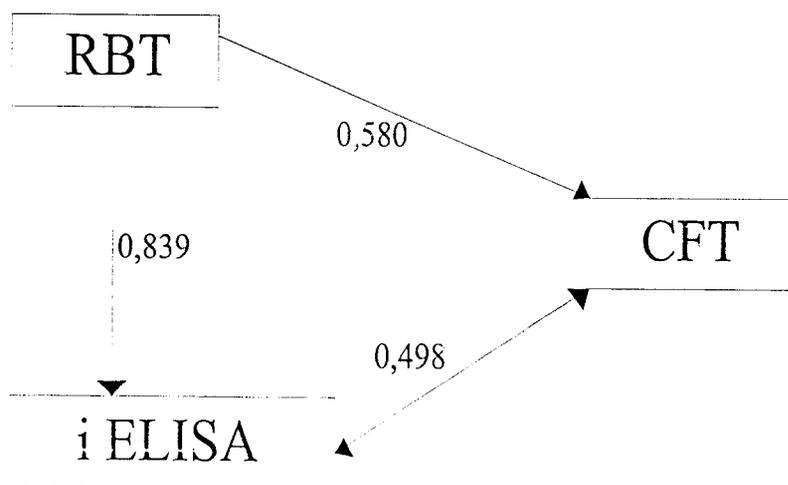
Tabel 5.1. Hasil Uji dan Hasil Transformasi Data Hasil Uji RBT, iELISA dan CFT Terhadap Serum Sapi di Kabupaten Belu NTT

No	Kode	RBT		iELISA		CFT	
		Hasil Uji	Hasil transformasi data	Hasil uji	Hasil transformasi data	Hasil uji	Hasil transformasi data
1	7	+2	0,69	6400	8,76	95	4,55
2	31	+2	0,69	12800	9,46	761	6,63
3	34	+3	1,10	0	-	0	-
4	126	+3	1,10	12800	9,46	761	6,63
5	131	+3	1,10	12800	9,46	1522	7,33
6	140	+3	1,10	12800	9,46	1522	7,33
7	141	+3	1,10	12800	9,46	1522	7,33
8	142	+3	1,10	12800	9,46	1522	7,33
9	143	+3	1,10	12800	9,46	1280	7,15
10	147	+3	1,10	12800	9,46	453	6,12
11	151	+3	1,10	12800	9,46	905	6,81
12	183	+3	1,10	12800	9,46	453	6,12
13	184	+3	1,10	12800	9,46	1522	7,33
14	193	+1	0,00	3200	8,07	226	5,42
15	195	+3	1,10	12800	9,46	1522	7,33
16	196	+3	1,10	6400	8,76	1522	7,33
17	197	+2	0,69	6400	8,76	1522	7,33
Total		17		17		17	

Hasil pada Tabel 5.1 dilakukan analisa Kappa dengan menggunakan software Ms Excel dan SPSS 22 dengan hasil nilai kesesuaian atau nilai *KAPPA* (*K*) antara iELISA dan CFT adalah 1 yang berarti kesesuaian kedua uji ideal dengan nilai probabilitas adalah $P = 0.000$ atau < 0.005 yang berarti nilai *K* benar-benar signifikan (Lampiran 3).

Hasil pada Tabel 5.1 juga dilakukan analisa statistik koefisien jalur (koefisien β) dengan software spss 22 dengan sebelumnya dilakukan transformasi bentuk data dari ordinal ke nominal (Lampiran 6). Hasil dari analisa jalur tersebut adalah koefisien β langsung dari RBT ke iELISA adalah 0,839 dan dari RBT ke

CFT adalah 0,580, ini berarti bahwa koefisien β langsung RBT ke iELISA lebih kuat dan efisien secara struktural dan operasional dibanding RBT ke CFT. Berdasarkan analisis yang sama, diketahui bahwa koefisien β tidak langsung dari RBT ke iELISA adalah 1,128 lebih kuat dibanding koefisien β langsung dari RBT ke CFT yaitu 0,998. Secara keseluruhan, hasil analisis koefisien β langsung ataupun tidak langsung dari RBT ke iELISA lebih kuat dibanding koefisien β langsung ataupun tidak langsung dari RBT ke CFT. Hal ini menunjukkan bahwa iELISA sebagai uji lanjut dari uji RBT baik secara maupun melalui tahap uji perantara CFT, tetap memberikan hasil sensitivitas dan spesifisitas yang lebih baik jika dibanding uji CFT yang dijadikan uji lanjut. Hal ini juga berarti iELISA lebih mampu mendeteksi sampel yang tidak mampu dideteksi oleh uji RBT dibanding CFT. Hasil analisis koefisien β dapat dilihat pada Lampiran 5, dan dalam bentuk bagan dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1. Bagan Hasil Analisis Jalur RBT, iELISA dan CFT.

Selain analisa Kappa dan regresi linear (koefisien jalur (β)) hasil dari ketiga uji juga dianalisa dengan analisa deskriptif menggunakan software SPSS 22 untuk mengetahui nilai rata-rata, standar deviasi, nilai maksimum dan minimum, dari masing-masing uji, dan hasil analisa tersebut dapat dilihat pada Lampiran 4 dan Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Hasil Analisa Deskriptif Uji CFT, iELISA dan RBT Berdasarkan Data Hasil Transformasi

Jenis Uji	Rata-Rata	Standar Deviasi	Nilai Maksimum	Nilai Minimum
CFT	6,7538	0,82699	7,33	4,55
iELISA	9,2406	0,41733	9,46	8,07
RBT	0,9539	0,30168	1,10	0,00

Berdasarkan analisa deskriptif terlihat bahwa nilai rata-rata tertinggi terlihat pada uji iELISA kemudian disusul secara berurutan oleh rata-rata uji CFT dan RBT. Standar deviasi secara berurutan dari tertinggi sampai terendah adalah CFT, iELISA dan RBT, sedangkan nilai maksimum dan minimum paling tinggi terlihat pada uji iELISA dan kemudian CFT dan RBT.

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6. PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisa Kappa antara uji iELISA dan CFT terdapat kesesuaian yang ideal antara iELISA dengan CFT. Hal tersebut menunjukkan bahwa iELISA dengan menggunakan antigen LPS S19 sebagai kandidat uji konfirmasi brusellosis alternatif selain CFT memiliki performa yang sama bagusnya dengan uji CFT yang merupakan uji serologis standar atau konfirmasi yang sudah lama digunakan untuk diagnosis brusellosis.

Berdasarkan analisis koefisien jalur (Koefisien β) yang membandingkan koefisien β langsung dan tidak langsung antara koefisien β dari RBT ke iELISA dan koefisien β dari RBT ke CFT, di dapatkan hasil bahwa koefisien β langsung dan tidak langsung dari RBT ke iELISA lebih kuat daripada koefisien β RBT ke CFT. Berdasarkan hasil tersebut, terlihat bahwa reaktor yang tidak terdeteksi pada uji RBT akan lebih besar kemungkinan terdeteksi jika pengujian dilanjutkan atau dikonfirmasi dengan uji iELISA dibanding dilanjutkan dengan uji CFT.

Kesesuaian yang ideal antara uji iELISA dan CFT serta koefisien β langsung dan tidak langsung dari RBT ke iELISA yang lebih kuat daripada koefisien β RBT ke CFT disebabkan oleh karena antigen yang digunakan pada uji iELISA adalah antigen LPS yang diekstraksi dari *B.abortus* S19 lapang, sedangkan antigen yang digunakan dalam uji CFT adalah sel utuh *B.abortus* S99 atau S1119-3 dan distandarisasi mengacu pada OIEISS (OIE, 2009). LPS memegang peranan penting dalam virulensi *Brucella* karena dapat mencegah terbunuhnya bakteri oleh komplemen dan merangsang resistensi bakteri terhadap peptida antimikrobal seperti defensin dan laktoferin (Poester *et al*, 2013). LPS

diidentifikasi sebagai virulen utama *Brucella* dan memiliki tiga bagian utama yaitu lipid A, oligosakarida inti (*oligosaccharide core*), dan antigen O atau *O-chain polysaccharide* (Moriyón dan López-Goñi, 1998; Cardoso *et al*, 2006; Rojas *et al*, 2004). Smooth lipopolisS-LPS mengandung immonodominan *O-polysaccharide* (OPS) yang secara kimiawi didefinisikan sebagai homopolimer *4,f-dideoxy-4-formaldehyde-alpha-mannose* berikatan melalui ikatan *glycosidic* (Poester *et al*, 2010). S-LPS merupakan endotoksin yang berada dipermukaan *Brucellasmooth* (Moriyón dan López-Goñi, 1998). LPS *Brucella* memiliki karakteristik yang berbeda dengan LPS dari bakteri gram negatif lainnya yaitu kandungan endotoksin yang lebih sedikit. Hal ini bisa ditutupi oleh modifikasi asam lemak lipid A yang hanya bisa terjadi pada *Brucella* virulen hidup dan tergantung pada keberhasilan sistem regulasi BvrRS. Sistem ini dibutuhkan untuk homeostasi OM dan sangat penting untuk invasi seluler yaitu sebagai perangsang polimerasi aktin yang berfungsi sebagai modulator selama invasi *Brucella*. Struktur O-chain dalam komponen *Brucella* adalah unit ulangan dari *4,6-dideoxy-4-formamido-a-D-pyranosyl* yang diikat oleh *al-2 linkage*. Variasi ikatan rantai tersebut tergantung pada karakteristik LPS, yang akhirnya dapat diklasifikasi dua strain yaitu strain A dan M. Strain A hemopolimer yang diikat oleh *al-2 linkage*, sedangkan strain M mempunyai *al-3 linkage* antara setiap residu ke Lima. LPS dan *O-side chain* menstimulasi produksi antibodi dari set B melalui inisiasi sinyal transduksi kaskade pada interaksinya dengan pola respon reseptor spesifik (Rojas *et al*, 2004). Sementara itu, pada uji CFT yang menggunakan sel utuh *B.abortus*, intraksi antibodi dengan antigen uji akan mengikuti pola interaksi dari tiap antigen.

yang terdapat pada sel utuh *B.abortus* atau interaksi antibodi dari serum uji tidak terfokus atau terbagi ke beberapa faktor virulensi dari *B.abortus*. Hal ini didukung oleh pernyataan Burgess, antigen yang tidak murni sangat tidak dikehendaki karena kompetisi antigen akan membatasi reaksi dengan antibodi (Burgess, 1995). Faktor virulensi bakteri *Brucella Spp* adalah eksotoksin, sitolisin, kapsul, fimbriae, flagela, plasmid, *lysogenic phage*, *endotoxin lipopolisacharide* (LPS) dan pemicu apoptosis sel inang (Poester *et al*, 2013). Perbedaan virulensi dari tiap antigen yang digunakan dalam tiap uji akan menghasilkan perbedaan respon terhadap antibodi yang ada dalam sampel serum. Hal tersebut terjadi karena imunoglobulin memiliki struktur yang terdiri dari fragmen ab (Fab) dan fragmen c (Fc) yang keduanya dirangkai oleh untaian dua sulfida (s-s). Fab merupakan bagian yang terdiri dari asam amino yang bertugas untuk mengikat antigen yang dikenal dengan side binding antigen (bagian yang berikatan dengan antigen), sedangkan Fc terdiri dari karbohidrat yang sering berikatan dengan komplemen (Rantam, 2003).

Faktor lain yang mendukung sehingga terjadi kesesuaian yang ideal antara uji iELISA dan CFT serta koefisien β langsung dan tidak langsung dari RBT ke iELISA yang lebih kuat daripada koefisien β RBT ke CFT, adalah karena menurut iELISA mampu mendeteksi ke-4 isotipe Ig dibanding CFT yang hanya mampu mendeteksi IgG1, selain itu iELISA mampu mendeteksi IgG1 dalam jumlah lebih sedikit dibanding uji CFT (Rojas dan Alonso, 2014), dan menurut Molavi *et al*, ELISA mampu mendeteksi IgM, IgA, IgG, dan sedikit IgE (Molavi *et al*, 2014), dan mampu mendeteksi semua IgG (Rantam, 2010). IgG terdiri dari 4 subkelas

(IgG1, IgG2, IgG3 dan IgG4), merupakan Ig terbanyak dalam serum dan ekstrasvaskuler, dapat ditransfer secara plasental sehingga merupakan Ig yang satu-satunya yang dapat menembus barier plasenta menuju fetus dan memberikan imunitas pada masa awal perkembangan fetus, mampu mengikat komplemen, berikatan dengan sel (makrofag, monosit, netrofil dan beberapa limfosit yang memiliki reseptor Fc)(Harti 2013), dan menurut Hurley (2013), sapi memiliki IgG1 sebagai sekreta tambahan pada IgA. Sapi juga memiliki FcR yang unik yang hanya mengidentifikasi IgG2b dan penting pada kontrol infeksi bakteri. Selain itu ELISA juga mampu mendeteksi IgM, sebagaimana kesimpulan penelitian Hassan *et al* (2010), ELISA lebih terpercaya dibanding metode konvensional lainnya karena sensitivitas dan spesifisitasnya tinggi terhadap IgM dan IgG. Hal ini didukung oleh pernyataan Ozmir *et al* (2011), bahwa ELISA mampu mendeteksi dua immunoglobulin (IgM dan IgG) secara bersamaan pada pasien yang terinfeksi brusellosis. Berdasarkan hal ini dapat dinyatakan bahwa iELISA lebih mampu mendeteksi brusellosis akut dan kronis dibanding uji CFT, karena mampu mendeteksi ke 4 isotipe Ig yang merupakan respon antibodi terhadap infeksi *Brucella*, sementara CFT hanya mampu mendeteksi IgG1, karena menurut Poester *et al* (2010), respon antibodi terhadap infeksi *B. abortus* pada sapi biasanya diawali dengan produksi isotipe IgM, rata-rata muncul pada 5-15 hari pasca vaksinasi. Respon antibodi IgM yang sangat pendek akan segera diikuti oleh produksi antibodi isotipe IgG1 dan disusul oleh IgG2 dan IgA. Oleh karena onset dini produksi IgM, maka secara teoritikal pengukuran isotipe ini akan menjadi indikator keterpaparan. Produksi isotipe IgG2 dan IgA terjadi ditahap lanjut

(IgG1, IgG2, IgG3 dan IgG4), merupakan Ig terbanyak dalam serum dan ekstrasvaskuler, dapat ditransfer secara plasental sehingga merupakan Ig yang satu-satunya yang dapat menembus barier plasenta menuju fetus dan memberikan imunitas pada masa awal perkembangan fetus, mampu mengikat komplemen, berikatan dengan sel (makrofag, monosit, netrofil dan beberapa limfosit yang memiliki reseptor Fc)(Harti 2013), dan menurut Hurley (2013), sapi memiliki IgG1 sebagai sekreta tambahan pada IgA. Sapi juga memiliki FcR yang unik yang hanya mengidentifikasi IgG2b dan penting pada kontrol infeksi bakteri. Selain itu ELISA juga mampu mendeteksi IgM, sebagaimana kesimpulan penelitian Hassan *et al* (2010), ELISA lebih terpercaya dibanding metode konvensional lainnya karena sensitivitas dan spesifisitasnya tinggi terhadap IgM dan IgG. Hal ini didukung oleh pernyataan Ozmir *et al* (2011), bahwa ELISA mampu mendeteksi dua immunoglobulin (IgM dan IgG) secara bersamaan pada pasien yang terinfeksi brucellosis. Berdasarkan hal ini dapat dinyatakan bahwa iELISA lebih mampu mendeteksi brucellosis akut dan kronis dibanding uji CFT, karena mampu mendeteksi ke 4 isotipe Ig yang merupakan respon antibodi terhadap infeksi *Brucella*, sementara CFT hanya mampu mendeteksi IgG1, karena menurut Poester *et al* (2010), respon antibodi terhadap infeksi *B. abortus* pada sapi biasanya diawali dengan produksi isotipe IgM, rata-rata muncul pada 5-15 hari pasca vaksinasi. Respon antibodi IgM yang sangat pendek akan segera diikuti oleh produksi antibodi isotipe IgG1 dan disusul oleh IgG2 dan IgA. Oleh karena onset dini produksi IgM, maka secara teoritikal pengukuran isotipe ini akan menjadi indikator keterpaparan. Produksi isotipe IgG2 dan IgA terjadi ditahap lanjut

infeksi. Menurut Molavi *et al* (2014) IgM akan muncul 5 sampai 7 hari infeksi brusellosis dan mencapai jumlah maksimal selama 13 sampai 21 hari setelah penetrasi bakteri dalam tubuh. Sejumlah kecil IgA pada peralihan akhir kemunculan IgM dan awal kemunculan IgG. Titer IgG sangat tinggi dan bertahan selama sakit. Signifikansi survei serologis brusellosis tergantung pada waktu dilakukan pengujian. Hal tersebut diperkuat oleh hasil penelitian Hewitt dan Payne, bahwa pasien dalam kondisi terinfeksi kronis oleh *Brucella* menunjukkan peningkatan IgG dan pada pasien akut menunjukkan peningkatan IgM (Hewitt dan Payne, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Apan *et al* (2007), menunjukkan bahwa analisis kelas imunoglobulin dari RBT positif menggunakan ELISA memberikan hasil positif 75% dengan *Brucella* ELISA IgG dan 25% hasil positif dengan *Brucella* ELISA IgM.

Faktor lain yang mendukung sehingga terjadi kesesuaian yang ideal antara uji iELISA dan CFT serta koefisien β langsung dan tidak langsung dari RBT ke iELISA yang lebih kuat daripada koefisien β RBT ke CFT, adalah karena pada uji iELISA ikatan antara antibodi dalam serum uji dengan antigen LPS pada uji iELISA dioptimasi oleh adanya substrat dan konjugat. Menurut Burgess (2005), substrat pada uji iELISA merupakan enzim yang akan berkonjugasi secara spesifik dengan antibodi.

Beberapa syarat uji serologis dapat digunakan untuk diagnosis brusellosis adalah murah, mudah, sensitivitas dan spesifisitas tinggi serta mampu membedakan hewan terinfeksi dengan hewan ter vaksinasi (Mcgiver, 2013). Ditinjau dari murah dan mudah, maka iELISA lebih murah dan mudah dibanding

CFT. *Complement Fixation Test* (CFT) merupakan uji konfirmasi bruselosis yang telah digunakan secara luas diseluruh dunia tetapi merupakan metode yang mahal dan kompleks (tidak mudah atau sederhana) untuk dilakukan karena membutuhkan berbagai macam reagen, fasilitas laboratorium yang bagus, staf laboratorium yang terlatih dan siap bekerja intensif dan karena membutuhkan titrasi rutin tiap hari. CFT juga merupakan metode yang menantang keterampilan teknis dan membutuhkan waktu yang lama karena uji ini memerlukan titrasi reagen tiap hari dan kontrol reagen dan reaksi. Hal tersebut menyebabkan CFT tidak digunakan secara ekstensif sebagai uji diagnostik (OIE, 2009; Poester *et al*, 2010; Nielsen dan Yu, 2010).

iELISA pada umumnya memiliki sensitivitas yang sangat tinggi karena mampu mendeteksi antibodi dari hewan yang tervaksinasi dengan *B.abortus* S19 dan antibodi dari reaksi silang, akan tetapi spesifisitas dapat sedikit lebih rendah dibanding pada hasil uji diwilayah yang tidak tervaksinasi. Hal tersebut diakibatkan oleh karena iELISA menggunakan S-LPS atau OPS sebagai antigen dengan sensitifitas tinggi untuk deteksi antibodi anti *Brucella*, tetapi tidak membedakan secara baik terhadap antibodi hasil dari vaksinasi dengan S19. Masalah positif palsu kemungkinan dapat diatasi dengan iELISA menggunakan *rough* LPS (R-LPS) atau antigen sitosol. Kebanyakan positif palsu merupakan hasil dari reaksi silang dengan bagian OPS dari molekul S-LPS, sedangkan reaksi silang pada bagian inti LPS jarang terjadi. iELISA skrining dibuat kaya S-LPS atau OPS dan digunakan sebagai antigen optimal, dan terdapat banyak protokol yang dapat digunakan untuk mempersiapkan antigen (OIE, 2009; Poester *et al*,

2010; Nielsen dan Yu, 2010), akan tetapi pada penelitian ini antigen yang digunakan untuk uji iELISA adalah hanya bagian SLPS saja, sehingga hasil positif palsu dari hasil reaksi silang dengan bagian OPS dapat terhindar.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan analisis hasil dan pembahasan, dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa uji serologis iELISA dengan menggunakan antigen LPS S19 memiliki performa yang sama baiknya dengan performa uji CFT, sehingga iELISA dengan menggunakan antigen LPS S19 dapat menjadi uji konfirmasi alternatif untuk diagnosis brucellosis selain CFT.

7.2. Saran

1. Disarankan dilakukan penelitian perbandingan performa CFT dengan antigen sel utuh *B.abortus* S99 dan uji iELISA dengan antigen LPS S19 dengan menggunakan jumlah sampel yang lebih banyak dan atau dengan menggunakan variabel pembanding yang lebih variatif
2. Disarankan untuk dilakukan penelitian dengan membandingkan performa uji CFT menggunakan antigen sel utuh *B.abortus* S99 dan uji iELISA menggunakan antigen LPS RB51 atau antigen LPS *B.abortus* isolat lapang atau antigen bagian lain dari sel *B.abortus*.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Adone R, P.Pasquali, 2013. Epidemiosurveillance of Brucellosis. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.*, 2013, 32 (1), 199-205.
- Apan T Zafer, Murat Yildirim, Ersin Istambulluoglu, 2007. Seroprevalensi of Brucellosis in Human, Sheep, and Cattle Population in Kirikkale (Turkey). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2007; 31 (1): 75-79
- Aparicio, E.D, 2013. Epidemiology of Brucellosis in Domestic Animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.*, 2013, 32 (1), 53-60.
- Austyn J M, Wood K I, 1994. Principles of Cellular dan Molecular Immunology. Oxford University Press. Oxford. New York. Tokyo.
- Baratawidjaja K G, Rengganis I, 2010. Immunologi Dasar. Edisi Ke-9. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Bbalitvet, 2012. Mini Review Brusellosis pada sapi. Balai Besar Penelitian Veteriner (Bbalitvet) Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Kementrian Pertanian Republik Indonesia.
- BPS Kabupaten Belu, 2009. Kabupaten Belu dalam Angka. Belu Regency in Figures 2009. Katalog BPS: 1403.5306. ISSN.0215.6962. Badan Statistik Kabupaten Belu. Atambua
- Burgess, G. W, 1995. Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. Terjemahan Artana, W. T., Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- BPS Kabupaten Belu, 2013. Angka Sementara Hasil Sensus Pertanian 2013. St2013 Sensus Pertanian. Badan Statistik Kabupaten Belu. Atambua.
- Cardoso P G, GC Macedo, V Azevedo, SC Oliveira., 2006. *Brucella Spp* Noncanonical LPS: Structure, Biosynthesis, and Interaction with Immune System. *Bio Med Central. Microbial Cell Factories* 2006, 5:13
- Chappel, R J., 1989. Diagnosis of Bovine Brucellosis: Principles, Practice and Problems. Surveillance Vol. 16 No.2. 1989. Departement of Agriculture and Rural Affairs, Victoria Veterinary Research Institute. Atwood and Parkville. Victoria. Australia.

- Chothe Shubhada., Hari M Saxena, Mudit Chandra, 2014. Enhancement of the Efficacy of Complement Fixation Test. Research Article. A Simple innovative Modification to Enhance the Efficacy of the Complement Fixation Test. *Advance in Animal and Veterinary Science*. 2 (IS): 13-16.
- Christopher S, Umapathy B.L, Ravikumar K.L, 2013. Evaluation of Sonicated and Heat Extrated Lipopolysaccharide *Brucella abortus* Antigen by Direct Heamagglutination and Enzyme Linked Immunosorbant Assays. *National Journal of Basic Medical Sciences*. Vol-II, Issue-4.
- Corbel, M.J, 1997. Brucellosis: an Overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses Jerusalem, Israel. Vol. 3, No.2, April-June 1997. National Institute of Biological Standars and Control, Heartfordshire. United Kingdom.
- Cruse J M , Lewis R E, 2004. Atlas of Immunology.2nd Edition. CRC press LLC. USA
- Ekgatat Monaya., Reka Kanitpun, Pittaya Khunchit, Surre Thammasart, and Surapong Wongkasemjit, 2009. The Accuracy of an Indirect ELISA for Diagnosis of *Brucella spp.* Infection in Cattle and Goats. *Kasetsart Veterinarians*. Vol. 19 No.1. 2009.
- Danardono, 2014. Modul 13 Ukuran Sampel. Biostatistik. Program Studi Statistik. Jurusan Matematika. FMIPA Universitas Gadjah Mada. Jogjakarta. www.danrdono.staff.ugm.ac.id/.../m13.
- Gall, D., Neilsen K, 2004. Serological Diagnosis of Bovine Brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.*, 2004, 23 (3), 989-1002.
- Glen, M.E, 2012. "Choosing a Methode for Epitope Mapping. "Methods in Moleculer Biology.1996. Epitop Mapping Protocols.
- Godfroid, J., B.Garin-Bastuji, C.Saegerman, J.M.Blasco., 2013. Brucellosis in Terrestrial Wildlife. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.*, 2013, 32 (1), 27-42.
- Hassan Jabbar S, Haidar F Ghazi, Haidar A Shamran, 2011. Comparative Study of Enzyme Linked Immunosorbant Assay and Agglutination Test in Dignosis of Human Brucellosis in Baghdad. Dept. of Microbiology, Medical Research Unit, College of Medicine, Al-Nahrain University. Iraq JMS.

- Hernández-Mora G, J.D. Palacios-Alfaro, R.Gonzalez-Barrientos, 2013. Wildlife Reservoirs of Brucellosis Brucella in Aquatic Enviromentals. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.*, 2013, 32 (1), 89-103.
- Hewitt, W G and Payne D J., 2015. Estimation of IgG and IgM Brucella Antibodies in Infected and Non-Infected Persons by a Radioimmune Capture. *J Clin Pathol* 1984 37; 692-696
- Hurley, D.J, 2014. The Immunology of Large Animals. Associate Professor of Population Health and Large Animal Medicine, and Molecular Microbiologist, Food Animal Health and Management Program . College of Veterinary Medicine. University of Georgia. Athens
- Kaiser Gary E., 2010. The Adaptive Immune System. [Doc Kaiser's Microbiology Home Page](#)
- Lipman, N.S, L.R.Jackson, L.J.Trudel, F.Weis-Garcia, 2014. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Application, and Information Resources. *ILAR Journal*.
- Lubroth J, Rweyemamu M.M, Viljoen G, Diallo A, Dungu B, Amanfu W, 2007. Veterinary Vaccine and Their Use in Developing Countries. *Rev.sci.tech.Off.int. Epiz*, 2007, 26 (1), 179-201.
- McGiven, J.A., 2013. New Development in The Immunodiagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Rev.sci.tech.Off.Int.Epiz.*, 2013, 32 (1), 163-176.
- Molavi MA, HS. Sajjadi, AA. Nejatizade, 2014. Effective Methods For Appropriate Diagnosis Of Brucellosis In Humans And Animals (Review Article). *Online Journal of Animal and Feed Research Volume 4, Issue 3: 60-66*
- Moriyón I, I.López-Goñi., 1998. Structure and Properties of The Outer Membranes of Brucella abortus and Brucella mellitensis. *Internal Microbial* (1998) 1:19-26.
- Munir R, UR Rehman,S.T, Kausar R, Saqlan Naqwi, S.M, Farooq, U.,2008. Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Brucellosis in Buffaloes. *ACTAVET.BRNO* 2008, 77: 401-406;
- Nielsen K, P.Smith, W.Yu, P.Nicoletti, P.Elzer, C.Robles, R.Bermudez, T.Renteria, F.Moreno, A.Ruiz, C.Massengill, Q.Muenks, G.Jurgensen, T.Tollersrud, L.Samartino, S.Conde, L.Forbes, D.Gall, B.Perez, X.Rojas, A.Minas., 2005. Toward Single Screening Test for Brucellosis. *Rev.Sci.Tech.Off.Int.Epiz.*,2005,24 (3), 1027-1038.

- Nielsen K, Yu WL., 2010. Serological Diagnosis of Brucellosis. Contribution, Sec. Biol. Med. Sci., MASA, XXXI, 1, p. 65-89.
- OIE, 2009. Bovine Brucellosis. OIE Terrestrial Manual. Version Adopted by The World Assembly of Delegates of The OIE in May 2009.
- Olsen, S.C, 2013. Recent Development in Livestock and Wildlife Brucellosis Vaccination. Rev.sci.tech.Off.int.Epiz., 2013, 32 (1), 207-217.
- Özdemir Mehmet, Bahadır Feyzioğlu, Muhammed G Kurtoğlu, Metin Doğan, Hatice T Dağı, Şerife Yüksekaya, Recep Keşli, Bülent Baysal, 2011. A Comparison of Immuncapture Agglutination and ELISA Methods in Sero-logical Diagnosis of Brucellosis. *International Journal of Medical Sciences* 2011; (5):428-432.
- Pemerintah Kabupaten Belu, 2014. Gambaran Umum Wilayah Kabupaten Belu. Pemerintah Kabupaten Belu. Pemerintah Provinsi Nusa Tenggara Timur. www.belukab.go.idwww.nttprov.go.id Atambua.
- Perkins, N, Ian P, Mahomed P, 2007. Assesment of Zoonotic Disease in Indonesia. Final Report. Small Research and Development Activity. Australian Government. Australain Centre for International Agriculture Research. ACIAR. Australia.
- Poester, F.P, L.E.Samartino, R.L.Santos, 2013. Pathogenesis and Pathobiology of Brucellosis in Livestock. Rev.sci.tech.Off.int.Epiz., 2013, 32 (1), 105-115.
- Poester, F.P, K Nielsen, L.E.Samartino, Wei Ling Yu.,2010. Dianosis of Brucellosis. The Open Veterinary Science Journal, 2010, 4, 46-60.
- Praktiknya, A.W, 2001. Dasar Dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan. Ed.1. Cet.4. PT.Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Ragan, V., G. Vroegindewey, S.Babcock, 2013. International Standars for Brucellosis Prevention and Management. Rev.sci.tech.Off.int.Epiz., 2013, 32 (1), 189-198.
- RAGS, 2001. Appendix A. Sensitivity Analysis: How Do We Know What's Important?. RAGS Volume 3 Part A-Process for Conducting Probabilistic Risk Assesment. Appendix A-December 31, 2001.
- Ramos-Sanches M.C, A.Orduna-Domingo, A.Rodriguez-Torres, F.J. Martin-Gil, J.Martin-Gil 1993. Low Temperature Thermal Behaviour of

Lipopolysaccharides from *Brucella* and Other Gram Negative Bacteria. *Thermochimica Acta*, 215 (1993) 227-233.

Rantam, F.A., 2003. *Metode Immunologi. Cet.1.* Airlangga University Press. Surabaya.

Reny1 Septyawati , Nyoman Sadra Dharmawan2, Nyoman Suartha1, 2013. Serodeteksi *Brucella abortus* pada Sapi Bali di Timor Leste. Indonesia Medicus Veterinus 2013 2(5) : 504 - 514

Research indonesia, 2012. Uji Konsistensi Cohen's Kappa. Research-Indonesia.blogspot.com

Rojas X, Alonso, O., 2014. ELISA for Diagnosis and Epidemiology of *Brucella abortus* Infection in Cattle in Chile. Instituto de Microbiologia, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Rojas, A P C, Gerhardt.G.S, Chair S, A.A, Stephen M.B, Joseph O.Falkinham III, Nammalwar S, Ramesh V., 2004. *Brucella abortus* RB51 Vaccine: Testing its Spectrum of Protective and Curative Characteristics. Dissertation Submitted to The Faculty of The Virginia Polytechnic Institute and State. University in Partial Fulfilment of Requirement for The Degree of Doctor of Philosophy in Veterinary Medical Sciences. Blacksburg, Virginia.

Skendros P, P.Baura, 2013. Immunity to Brucellosis. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.*, 2013, 32 (1), 137-147.

Smith, H.L, 2013. Brucellosis in Pastoral and Confined Livestock: Prevention and Vaccination. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* , 2013, 32 (1), 219-228

Stagg Danrew J, Knight Stella C, 2001. Antigen-Presenting Cells. *Encyclopedia of Life Sciences/@2001 Nature Publishing Group/www.els.net*

Tae Lake, P.R.M, Asmarini K, Setyawan B., 2010. Faktor Resiko Bovine Brucellosis pada Tingkat Peternakan Di Kabupaten Belu , Provinsi Nusa Tenggara Timur. *J.Sain Vet.* Vol.28 No.1 Th.2010

The Center for Food Security and Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, 2009. Bovine Brucellosis: *Brucella abortus*. Undulant Fever, Contangious Abortion, Bang's Disease. P:1-5. College of Veterinary Medicine. Iowa State University.

Vorster. J.H., P.H.Mapham, S Chisi, 2014. Brucellosis Diagnostics. *Vetdiagnostix Veterinar, Patholog, Service, Cascades. Veterinary House Hospital,*

Pietermaritzburg. Allerton Provincial Veterinary Laboratory,
Allerton.

Walker, R L, 1999. Brucella. In. Dwight C.H and Yuan Chunh Zee. Veterinary Microbiology. Blackwell Science. School of Veterinary Medicine. University of California. Davis, California.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Rekapitulasi Keterangan Keseluruhan Sampel Penelitian

Data Pengambilan Serum Darah Brusellosis Tahun 2014

Kabupaten: Belu

Kecamatan : Tasifeto Timur

Desa : Manleten

Dusun :

Tgl Sampling : 28-10-2015

Jmlh Sampel : 54

No	Kode	Sex	Umur (Tahun)	Ket Vaksin	RBT Result	Keterangan lain
1	1	Betina	4	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
2	2	Betina	4	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
3	3	Betina	4	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
4	4	Betina	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
5	5	Betina	5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
6	6	Betina	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
7	7	Betina	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	+2	
8	8	Betina	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
9	9	Betina	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
10	10	Betina	4	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
11	11	Betina	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
12	12	Betina	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
13	13	Betina	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
14	14	Betina	4	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
15	15	Betina	4	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
16	16	Betina	3	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
17	17	Betina	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
18	18	Betina	4	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
19	19	Betina	3	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
20	20	Betina	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
21	21	Betina	3	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
22	22	Betina	4	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
23	23	Betina	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
24	24	Betina	4	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
25	25	Betina	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
26	26	Betina	4	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
27	27	Betina	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
28	28	Betina	2	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
29	29	Jantan	2	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
30	30	Betina	3	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
31	31	Betina	4	tdk vaksin 1thn terakhir	+2	
32	32	Betina	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
33	33	Jantan	2	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
34	34	Betina	3	tdk vaksin 1thn terakhir	+3	
35	35	Jantan	2	tdk vaksin 1thn terakhir	-	

Data Pengambilan Serum Darah Brusellosis Tahun 2014

Kabupaten : Belu

Kecamatan : Tasifeto Timur

Desa :

Dusun :

Tgl Sampling :

Jmlh Sampel :

No	Kode	Sex	Umur (Tahun)	Ket Vaksin	RBT Result	Keterangan lain
1	36	Jantan	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
2	37	Jantan	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
3	38	Jantan	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
4	39	Jantan	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
5	40	Betina	3	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
6	41	Jantan	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
7	42	Jantan	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
8	43	Jantan	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
9	44	Jantan	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
10	45	Jantan	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
11	46	Jantan	3	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
12	47	Jantan	3,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
13	48	Betina	2	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
14	49	Jantan	3	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
15	50	Jantan	4	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
16	51	Jantan	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
17	52	Betina	3	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
18	53	Betina	2,5	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
19	54	Betina	4	tdk vaksin 1thn terakhir	-	
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						
32						
33						
34						
35						

Data Pengambilan Serum Darah Brusellosis Tahun 2014

Kabupaten : Belu

Kecamatan : Lasiolat

Desa : Dualasi, Lakanmau, Fatulola

Dusun :

Tgl Sampling : 28-10-2015

Jmlh Sampel : 53

35	166	Betina	Urøur	Tidak vaksin	RBT	Desa Fatulola
No	Kode	Sex	(Tahun)	Ket Vaksin	Result	Keterangan lain
1	55	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
2	56	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
3	57	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
4	58	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
5	59	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
6	60	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
7	61	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
8	62	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
9	63	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
10	64	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
11	65	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
12	66	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
13	67	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
14	68	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
15	69	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
16	70	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
17	71	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
18	72	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
19	73	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
20	74	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
21	75	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
22	76	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
23	77	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
24	78	Betina	≥2-6	Tidak vaksin	-	Desa. Dualasi
25	156	Betina	5	Tidak vaksin	-	Desa Lakanmau
26	157	Betina	6	Tidak vaksin	-	Desa Lakanmau
27	158	Betina	4	Tidak vaksin	-	Desa Lakanmau
28	159	Betina	4	Tidak vaksin	-	Desa Lakanmau
29	160	Betina	9	Tidak vaksin	-	Desa Lakanmau
30	161	Betina	3	Tidak vaksin	-	Desa Lakanmau
31	162	Betina	3	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
32	163	Betina	5	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
33	164	Betina	13	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
34	165	Betina	4	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
35	166	Betina	6	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola

Data Pengambilan Serum Darah Brusellosis Tahun 2014

Kabupaten : Belu Kecamatan : Lasiolat
 Desa : Dualasi, Lakanmau, Fatulola Dusun :
 Tgl Sampling : 28-10-2015 Jmlh Sampel : 53

No	Kode	Sex	Umur (Tahun)	Ket Vaksin	RBT Result	Keterangan lain
1	167	Betina	2	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
2	168	Betina	7	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
3	169	Betina	4	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
4	170	Betina	9	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
5	171	Betina	5	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
6	172	Betina	3	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
7	173	Jantan	2	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
8	174	Jantan	2	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
9	175	Betina	8	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
10	176	Betina	5	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
11	177	Jantan	2	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
12	178	Betina	6	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
13	179	Betina	4	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
14	180	Betina	4	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
15	181	Betina	5	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
16	182	Betina	4	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
17	244	Betina	4	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
18	245	Betina	4	Tidak vaksin	-	Desa Fatulola
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						
32						
33						
34						
35						

Data Pengambilan Serum Darah Brusellosis Tahun 2014

Kabupaten : Belu

Kecamatan : Lamaknen Selatan

Desa : Ekin

Dusun :

Tgl Sampling : 28-10-2015

Jmlh Sampel : 39

No	Kode	Sex	Umur (Tahun)	Ket Vaksin	RBT Result	Keterangan lain
1	117	Betina	3,5	tidak vaksin	-	
2	118	Betina	4	tidak vaksin	-	
3	119	Betina	3	tidak vaksin	-	
4	120	Betina	3,5	tidak vaksin	-	
5	121	Betina	5	tidak vaksin	-	
6	122	Betina	3	tidak vaksin	-	
7	123	Betina	4,5	tidak vaksin	-	
8	124	Betina	2,5	tidak vaksin	-	
9	125	Betina	3,3	tidak vaksin	-	
10	126	Betina	3	tidak vaksin	+3	
11	127	Betina	2	tidak vaksin	-	
12	128	Betina	3,5	tidak vaksin	-	
13	129	Betina	3	tidak vaksin	-	
14	130	Betina	3	tidak vaksin	-	
15	131	Betina	4	tidak vaksin	+3	
16	132	Betina	3	tidak vaksin	-	
17	133	Betina	3,5	tidak vaksin	-	
18	134	Betina	4,5	tidak vaksin	-	
19	135	Betina	3	tidak vaksin	-	
20	136	Betina	2	tidak vaksin	-	
21	137	Betina	2,5	tidak vaksin	-	
22	138	Betina	3	tidak vaksin	-	
23	139	Betina	2,5	tidak vaksin	-	
24	140	Betina	4	tidak vaksin	+3	
25	141	Betina	3	tidak vaksin	+3	
26	142	Betina	3,5	tidak vaksin	+3	
27	143	Betina	2,5	tidak vaksin	+3	
28	144	Betina	3,5	tidak vaksin	-	
29	145	Betina	2,5	tidak vaksin	-	
30	146	Betina	3	tidak vaksin	-	
31	147	Betina	3	tidak vaksin	+3	
32	148	Betina	4	tidak vaksin	-	
33	149	Betina	3,5	tidak vaksin	-	
34	150	Betina	5,5	tidak vaksin	-	
35	151	Betina	4	tidak vaksin	+3	

Data Pengambilan Serum Darah Brusellosis Tahun 2014

Kabupaten : Belu

Kecamatan : Lamaknen Selatan

Desa : Ekin

Dusun :

Tgl Sampling : 28-10-2015

Jmlh Sampel : 39

No	Kode	Sex	Umur (Tahun)	Ket Vaksin	RBT Result	Keterangan lain
1	152	Betina	3	tidak vaksin	-	
2	153	Betina	2,5	tidak vaksin	-	
3	154	Betina	3,5	tidak vaksin	-	
4	155	Betina	3	tidak vaksin	-	
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						
32						
33						
34						
35						

Data Pengambilan Serum Darah Brusellosis Tahun 2014

Kabupaten : Belu Kecamatan : Tasifeto Barat

Desa : Bakustulana, Naitimu, Tukuneno Dusun :

Tgl Sampling : 28-10-2015 Jmlh Sampel : 60

	Kode	Sex	Umur (Tahun)	Ket Vaksin	RBT Result	Keterangan lain
1	183	Betina	6	Tidak vaksin	+3	Bakustulana
2	184	Betina	8	Tidak vaksin	+3	Bakustulana
3	185	Betina	4	Tidak vaksin	-	Bakustulana
4	186	Betina	7	Tidak vaksin	-	Bakustulana
5	187	Jantan	2	Tidak vaksin	-	Bakustulana
6	188	Betina	1,5	Tidak vaksin	-	Bakustulana
7	189	Betina	4	Tidak vaksin	-	Bakustulana
8	190	Betina	8	Tidak vaksin	-	Bakustulana
9	191	Betina	5	Tidak vaksin	-	Bakustulana
10	192	Betina	1	Tidak vaksin	-	Bakustulana
11	193	Betina	2	Tidak vaksin	+1	Bakustulana
12	194	Jantan	2	Tidak vaksin	-	Bakustulana
13	195	Betina	3	Tidak vaksin	+3	Bakustulana
14	196	Betina	1,5	Tidak vaksin	+3	Bakustulana
15	197	Betina	2	Tidak vaksin	+3	Bakustulana
16	198	Betina	3	Tidak vaksin	-	Bakustulana
17	199	Betina	9	Tidak vaksin	-	Bakustulana
18	200	Betina	7	Tidak vaksin	-	Bakustulana
19	201	Betina	6	Tidak vaksin	-	Bakustulana
20	202	Betina	4	Tidak vaksin	-	Bakustulana
21	203	Betina	1,5	Tidak vaksin	-	Bakustulana
22	204	Jantan	1	Tidak vaksin	-	Bakustulana
23	205	Betina	4	Tidak vaksin	-	Ds. Naitimu
24	206	Jantan	1	Tidak vaksin	-	Ds. Naitimu
25	207	Betina	7	Tidak vaksin	-	Ds. Naitimu
26	208	Betina	6	Tidak vaksin	-	Ds. Naitimu
27	209	Betina	1	Tidak vaksin	-	Ds. Naitimu
28	210	Betina	2	Tidak vaksin	-	Ds. Naitimu
29	211	Betina	4	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
30	213	Betina	3	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
31	214	Betina	8	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
32	215	Betina	5	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
33	216	Jantan	3	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
34	217	Betina	1	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
35	218	Betina	0,8	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno

Data Pengambilan Serum Darah Brusellosis Tahun 2014

Kabupaten : Belu Kecamatan : Tasifeto Barat

Desa : Bakustulana, Naitimu, Tukuneno Dusun :

Tgl Sampling : 28-10-2015 Jmlh Sampel :

No	Kode	Sex	Umur (Tahun)	Ket Vaksin	RBT Result	Keterangan lain
1	219	Betina	2	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
2	220	Betina	1	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
3	221	Betina	7	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
4	222	Betina	6	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
5	223	Betina	9	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
6	224	Jantan	0,7	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
7	225	Betina	4	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
8	226	Betina	6	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
9	227	Betina	8	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
10	228	Betina	1	Tidak vaksin	-	Ds. Tukuneno
11	229	Betina	5	Tidak vaksin	-	
12	230	Betina	1,5	Tidak vaksin	-	
13	231	Jantan	1	Tidak vaksin	-	
14	232	Betina	8	Tidak vaksin	-	
15	233	Betina	12	Tidak vaksin	-	
16	234	Betina	10	Tidak vaksin	-	
17	235	Betina	2	Tidak vaksin	-	
18	236	Betina	4	Tidak vaksin	-	
19	237	Betina	1	Tidak vaksin	-	
20	238	Jantan	1	Tidak vaksin	-	
21	239	Betina	5	Tidak vaksin	-	
22	240	Betina	6	Tidak vaksin	-	
23	241	Betina	7	Tidak vaksin	-	
24	242	Betina	1	Tidak vaksin	-	
25	243	Betina	11	Tidak vaksin	-	
26						
27						
28						
29						
30						
31						
32						
33						
34						
35						

Data Pengambilan Serum Darah Brusellosis Tahun 2014

Kabupaten : Belu

Kecamatan : Raihat

Desa : Dusun :

Tgl Sampling : 28-10-2015

Jmlh Sampel : 45

No	Kode	Sex	Umur (Tahun)	Ket Vaksin	RBT Result	Keterangan lain
1	246	Jantan	1	Vaksin 2012	-	
2	247	Betina	8	Vaksin 2012	-	
3	248	Betina	8	Vaksin 2012	-	
4	249	Betina	4	Vaksin 2012	-	
5	250	Betina	3	Vaksin 2012	-	
6	251	Betina	2,5	Vaksin 2012	-	
7	252	Betina	2,5	Vaksin 2012	-	
8	253	Betina	5	Vaksin 2012	-	
9	254	Betina	2	Vaksin 2012	-	
10	255	Betina	2,5	Vaksin 2012	-	
11	256	Betina	5	Vaksin 2012	-	
12	257	Jantan	2	Vaksin 2012	-	
13	258	Jantan	2	Vaksin 2012	-	
14	259	Jantan	2,5	Vaksin 2012	-	
15	260	Jantan	2,5	Vaksin 2012	-	
16	261	Jantan	2	Vaksin 2012	-	
17	262	Jantan	2	Vaksin 2012	-	
18	263	Jantan	1,8	Vaksin 2012	-	
19	264	Betina	8	Vaksin 2012	-	
20	265	Betina	6	Vaksin 2012	-	
21	266	Betina	4	Vaksin 2012	-	
22	267	Betina	7	Vaksin 2012	-	
23	268	Betina	8	Vaksin 2012	-	
24	269	Betina	6	Vaksin 2012	-	
25	270	Betina	6	Vaksin 2012	-	
26	271	Betina	8	Vaksin 2012	-	
27	272	Betina	6	Vaksin 2012	-	
28	273	Betina	8	Vaksin 2012	-	
29	274	Betina	8	Vaksin 2012	-	
30	275	Betina	8	Vaksin 2012	-	
31	276	Betina	1	Vaksin 2012	-	
32	277	Betina	2	Vaksin 2012	-	
33	278	Betina	2	Vaksin 2012	-	
34	279	Betina	8	Vaksin 2012	-	
35	280	Betina	8	Vaksin 2012	-	

Data Pengambilan Serum Darah Brusellosis Tahun 2014

Kabupaten : Belu

Kecamatan : Raihat

Desa : Dusun :

Tgl Sampling : 28-10-2015

Jmlh Sampel :

No	Kode	Sex	Umur (Tahun)	Ket Vaksin	RBT Result	Keterangan lain
1	281	Betina	8	Vaksin 2012	-	
2	282	Betina	8	Vaksin 2012	-	
3	283	Betina	8	Vaksin 2012	-	
4	284	Jantan	2	Vaksin 2012	-	
5	285	Jantan	2	Vaksin 2012	-	
6	286	Betina	8	Vaksin 2012	-	
7	287	Betina	1	Vaksin 2012	-	
8	289	Betina	4	Vaksin 2012	-	
9	290	Betina	4	Vaksin 2012	-	
10	291	Betina	4	Vaksin 2012	-	
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						
32						
33						
34						
35						

Lampiran 2. Keterangan Sampel yang Memberikan Hasil Positif Uji RBT

Kode	Hasil	Sex	Umur (thn)	Keterangan vaksinasi	Kecamatan
7	+2	Betina	7	Tidak vaksin	Tasifeto Timur
31	+2	Betina	4	Tidak vaksin	Tasifeto Timur
34	+3	Betina	3	Tidak vaksin	Tasifeto Timur
126	+3	Betina	3	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
131	+3	Betina	4	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
140	+3	Betina	4	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
141	+3	Betina	3	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
142	+3	Betina	3,5	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
143	+3	Betina	2,5	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
147	+3	Betina	3	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
151	+3	Betina	4	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
183	+3	Betina	6	Tidak vaksin	Tasifeto Barat
184	+3	Betina	8	Tidak vaksin	Tasifeto Barat
193	+1	Betina	2	Tidak vaksin	Tasifeto Barat
195	+3	Betina	3	Tidak vaksin	Tasifeto Barat
196	+3	Betina	1,5	Tidak vaksin	Tasifeto Barat
197	+2	Betina	2	Tidak vaksin	Tasifeto Barat

Lampiran 3. Hasil Uji iELISA dan Perhitungan Titer iELISA

No	OD Sampei				no	OD Kontrol Negatif			OD Kontrol Positif			
	1	2	3	rata2		1	2	3	184	184	196	196
7	1.826	1.772	1.693	1.764	3	0.474	0.452	0.501	2.135	2.098	2.128	2.211
31	2.146	2.088	2.114	2.116	4	0.288	0.290	0.302	1.943	1.924	1.898	1.970
34	0.719	0.706	0.709	0.711	8	0.368	0.345	0.342	1.805	1.971	1.784	1.846
126	2.196	2.028	2.045	2.090	8	0.337	0.366		1.665	1.796	1.583	1.677
131	2.153	1.973	2.045	2.057	blank	0.150	0.150		1.594	1.651	1.587	1.752
140	2.190	2.065	2.045	2.100					1.327	1.551	1.279	1.348
141	2.214	2.040	2.027	2.094					1.044	1.334	1.155	1.331
142	2.115	1.936	2.029	2.027					0.821	0.986	1.138	1.178
143	2.141	2.190	2.154	2.162								
147	2.020	2.146	2.112	2.093								
151	2.046	2.118	2.087	2.084								
183	1.973	1.982	2.114	2.023								
184	1.995	1.897	2.034	1.975								
193	1.958	1.551	1.634	1.714								
195	1.893	1.981	1.859	1.911								
196	1.873	1.936	1.841	1.883								
197	1.820	1.877	1.614	1.770								

Perhitungan Nilai Titer Berdasarkan Kisaran Nilai Optical Density (OD) Uji iELISA dengan COV (cut of value) 0,813

No	Pengenceran	Kisaran OD	Titer
1	1/100	≥2.135	12.800
2	1/200	1.944 – 2.135	6.400
3	1/400	1.805 – 1.943	3.200
4	1/800	1.665 – 1.804	1.600
5	1/1600	1.594 - 1.664	800
6	1/3200	1.327 – 1.593	400
7	1/6400	1.044 – 1.326	200
8	1/12.800	0.822 – 1.043	100
9	0	< 0.821	0

Lampiran 4. Kalkulator dan Hasil Perhitungan Titer CFT, serta Data Hasil Uji CFT Di Laboratorium BBVet Maros

Brucella CF Titre calculator

Referenc e positive		Test serum	
Score	Dilution	Replicate 1	Replicate 2
2	200	3	2
Log: 7,64		16	Average
Titre IU/ml		4/25	
1000		19	
		95	
		POS	

Average equivalent titre

CF reading equivalent to 20 IU/ml = 2 / 4

Assay threshold of 20 IU/mL

Score	Dilution	Titre	Log ₂	IU/ml

- This sheet will calculate the IU value of test sera based on the IU value that has been assigned to a positive reference serum.
To use this sheet you need to:
1. Set the assay threshold: use the drop down to choose either 20 IU/ml or the titre score (1 / 4 or 2 / 4)
 2. Enter the IU/mL value of the reference positive (e.g the OIE standard is 1000 IU/mL). Note: the reference standard or a calibrated secondary standard must be included in the same CF test as the test sera.
 3. Enter the titre and fixation score of the reference positive (e.g. if there is 3+ fixation at an end point titre of 64 (i.e. 3 / 64), enter 3 as the score and 64 for the dilution.
 4. Enter the dilution and fixation score of the test serum
 5. If there is a replicate result, enter the dilution and fixation score in replicate 2 (otherwise leave this blank)

Note:
Enter data in the GREEN fields
Results are calculated in the GREY fields.

Comment
The sheet converts titres with a fixation score of 2+ to the log₂ values at that dilution, so a reading of 2 / 8 has a titre of 8. This titre is adjusted by increments of log₂ 0.25 below or above the dilution point titre, depending on the fixation score. So for a serum with a titre of 3/8, for the purpose of conversion to IU, this titre is taken as 10 (i.e. 2^{3+0.25}). After the sheet converts titres to a single log₂ value, the ratio of the test to reference serum can be calculated. This ratio is used to calculate the IU/mL value.

The OIE has set 20 IU/mL as the minimum positive titre. If a laboratory fixes the threshold at 20 IU/mL, there can be some fluctuation in the titre threshold. The laboratory should set limits (e.g. from 1 / 4 to 2 / 8) about this fluctuation so that invalid test results are not accepted.

The spreadsheet only transforms the expression of the data; it does not validate the data. Validation depends on the quality controls and systems that are used by the laboratory.

You can report problems with the sheet to ross.lunt@csiro.au

Hasil Perhitungan Titer CFT							
Nomor sampel	score	dillution	titer	log2	Kadar(iu/ml)	Hasil	
7	3	16	19	4.25	95	Positif	
31	3	128	152	7.25	761	Positif	
34	0	0	0	0	0	Negatif	
126	3	128	152	7.25	761	Positif	
131	3	256	304	8.25	1522	Positif	
140	3	256	304	8.25	1522	Positif	
141	3	256	304	8.25	1522	Positif	
142	3	256	304	8.25	1522	Positif	
143	2	256	256	8.00	1280	Positif	
147	4	64	91	6.50	453	Positif	
151	4	128	181	7.50	905	Positif	
183	4	64	91	6.50	453	Positif	
184	3	256	304	8.25	1522	positif	
193	4	32	45	5.50	226	positif	
195	3	256	304	8.25	1522	positif	
196	3	256	304	8.25	1522	positif	
197	3	256	304	8.25	1522	positif	

Lampiran 5. Hasil Analisa Kappa antara CFT dan iELISA dengan Menggunakan Software SPSS 22 dan Ms. Excel

Hasil Analisa Kappa dengan Menggunakan Software SPSS 22

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
iELISA * CFT	17	100.0%	0	0.0%	17	100.0%

iELISA * CFT Crosstabulation

Count

		CFT		Total
		positif	negatif	
iELISA	positif	16	0	16
	negatif	0	1	1
Total		16	1	17

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	1.000	.000	4.123	.000
N of Valid Cases		17			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Hasil Analisa Kappa dengan Menggunakan Software Ms Excel

KAPPA - measures the agreement between two tests.

Enter the data in cells C8, D8, C10, D10.

[Press F9 to calculate]

iELISA	T+	16	0	16
	T-	0	1	1
				17

% Observed agreement	100,0 %
% Expected agreement	88,9 %
% Actual agreement beyond chance	11,1 %
% Potential agreement beyond chance	11,1 %
Kappa	1,00

nilai KAPPA (K) berkisar dan -1 sampai 1

Uji dinyatakan memiliki tingkat kesesuaian kurang baik jika nilai KAPPA < 0.6

Uji dinyatakan memiliki tingkat kesesuaian baik jika nilai KAPPA = 0.6 - 0.8

Uji dinyatakan memiliki tingkat kesesuaian sangat baik jika nilai KAPPA = > 0.8

Uji dinyatakan memiliki tingkat kesesuaian ideal jika nilai KAPPA = 1

Lampiran 6. Data Transformasi Hasil Uji RBT, iELISA dan CFT terhadap Serum Sapi di Kabupaten Belu NTT

No	Kode	RBT		iELISA		CFT	
		Hasil	Ket	Hasil	Ket	Hasil	Ket
1	7	0,69	Positif	8,76	Positif	4,55	Positif
2	31	0,69	Positif	9,46	Positif	6,63	Positif
3	34	1,10	Positif	-	Negatif	-	Negatif
4	126	1,10	Positif	9,46	Positif	6,63	Positif
5	131	1,10	Positif	9,46	Positif	7,33	Positif
6	140	1,10	Positif	9,46	Positif	7,33	Positif
7	141	1,10	Positif	9,46	Positif	7,33	Positif
8	142	1,10	Positif	9,46	Positif	7,33	Positif
9	143	1,10	Positif	9,46	Positif	7,15	Positif
10	147	1,10	Positif	9,46	Positif	6,12	Positif
11	151	1,10	Positif	9,46	Positif	6,81	Positif
12	183	1,10	Positif	9,46	Positif	6,12	Positif
13	184	1,10	Positif	9,46	Positif	7,33	Positif
14	193	0,00	Positif	8,07	Positif	5,42	Positif
15	195	1,10	Positif	9,46	Positif	7,33	Positif
16	196	1,10	Positif	8,76	Positif	7,33	Positif
17	197	0,69	Positif	8,76	Positif	7,33	Positif
Total positif/ Rata-Rata		0,954	17	9,241	16	6,754	16

Lampiran 7. Hasil Analisa Deskriptif Uji RBT, iELISA dan CFT
Hasil Analisa Deskriptif Uji RBT

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
RBTtrans	16	,00	1,10	,9539	,30168
Valid N (listwise)	16				

Hasil Analisa Deskriptif Uji iELISA

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
iELISAtrans	16	8,07	9,46	9,2406	,41733
Valid N (listwise)	16				

Hasil Analisa Deskriptif Uji CFT

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
CFTtrans	16	4,55	7,33	6,7538	,82699
Valid N (listwise)	16				

Lampiran 8. Hasil Analisa Regresi atau Jalur Uji RBT, iELISA dan CFT**Analisa Regresi dari RBT ke CFT****Variables Entered/Removed^a**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	RBTtrans ^b	.	Enter

a. Dependent Variable: CFTtrans

b. All requested variables entered.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,580 ^a	,337	,290	,69705

a. Predictors: (Constant), RBTtrans

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	3,456	1	3,456	7,114	,018 ^b
	Residual	6,802	14	,486		
	Total	10,259	15			

a. Dependent Variable: CFTtrans

b. Predictors: (Constant), RBTtrans

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5,236	,595		8,797	,000
	RBTtrans	1,591	,597	,580	2,667	,018

a. Dependent Variable: CFTtrans

Hasil Analisa Regresi atau Jalur dari RBT ke iELISA

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	RBTtrans ^b		Enter

a. Dependent Variable: iELISAtans

b. All requested variables entered.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,839 ^a	,703	,682	,23535

a. Predictors: (Constant), RBTtrans

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1,837	1	1,837	33,167	,000 ^b
	Residual	,775	14	,055		
	Total	2,612	15			

a. Dependent Variable: iELISAtans

b. Predictors: (Constant), RBTtrans

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	8.134	,201		40,478	,000
	RBTtrans	1.160	,201	,839		

a. Dependent Variable: iELISAtans

Analisa Regresi atau Jalur dari CFT ke iELISA

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	CFTtrans ^b		Enter

a. Dependent Variable: iELISATrans

b. All requested variables entered.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,498 ^a	,248	,194	,37464

a. Predictors: (Constant), CFTtrans

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	,648	1	,648	4,613	,050 ^b
	Residual	1,965	14	,140		
	Total	2,612	15			

a. Dependent Variable: iELISATrans

b. Predictors: (Constant), CFTtrans

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	7,544	,796		9,483	,000
	CFTtrans	,251	,117	,498	2,148	,050

a. Dependent Variable: iELISATrans

Hasil Analisa Regresi atau Jalur dari iELISA ke CFT

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	iELISAtans ^b		Enter

a. Dependent Variable: CFTtrans

b. All requested variables entered.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,498 ^a	,248	,194	,74239

a. Predictors: (Constant), iELISAtans

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2,543	1	2,543	4,613	,050 ^b
	Residual	7,716	14	,551		
	Total	10,259	15			

a. Dependent Variable: CFTtrans

b. Predictors: (Constant), iELISAtans

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-2.363	4.248		-.556	,587
	iELISAtans	,987	,459	,498	2.148	,050

a. Dependent Variable: CFTtrans

**Lampiran 9. Hasil Uji CFT di Laboratorium Serologi BBVet Maros
Terhadap Serum Sapi Asal Kabupaten Belu NTT**

Kode	Hasil	Interpre tasi	Sex	Umur (thn)	Keterangan vaksinasi	Kecamatan
7	3/16	Positif	Betina	7	Tidak vaksin	Tasifeto Timur
31	3/128	Positif	Betina	4	Tidak vaksin	Tasifeto Timur
34	0	Negatif	Betina	3	Tidak vaksin	Tasifeto Timur
126	3/128	Positif	Betina	3	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
131	3/256	Positif	Betina	4	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
140	3/256	Positif	Betina	4	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
141	3/256	Positif	Betina	3	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
142	3/256	Positif	Betina	3,5	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
143	2/256	Positif	Betina	2,5	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
147	4/64	Positif	Betina	3	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
151	4/128	Positif	Betina	4	Tidak vaksin	Lamaknen Selatan
183	4/64	Positif	Betina	6	Tidak vaksin	Tasifeto Barat
184	3/256	Positif	Betina	8	Tidak vaksin	Tasifeto Barat
193	4/32	Positif	Betina	2	Tidak vaksin	Tasifeto Barat
195	3/256	Positif	Betina	3	Tidak vaksin	Tasifeto Barat
196	3/256	Positif	Betina	1,5	Tidak vaksin	Tasifeto Barat
197	3/356	Positif	Betina	2	Tidak vaksin	Tasifeto Barat



IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
KEMENTERIAN PERTANIAN
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
BALAI BESAR VETERINER MAROS

07141113

✓KAN

Jl. Dr Sam Ratulangi
Maros, 90514
Sulawesi Selatan

Telp : (0411) 371105/372257
email: bbvetmaros@yahoo.com
Website : <http://www.bbvet-maros.web.id>

Model E-30b

No. : 5558/PD.650/F.5.G/1114
Lamp. : 1 (satu) Berkas
Perihal : Hasil Uji Laboratorium
Tgl. Kirim/No : 10 Nopember 2014 /
Tgl. Terima : 11 Nopember 2014
No. Epi : 07141113
Jns. Layana : Perorangan
Tgl. Jawab : 12 Nop 2014

KEPADA YTH:

Drh. Eni Rohyati
Fak. Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
SURABAYA

HASIL UJI – Lihat lampiran

KESIMPULAN DIAGNOSA

BRUCELOSIS (19)

BRUCELOSIS. NEGATIF (4)

Manajer Puncak

[Signature]
drh. Bagoes Poernadjaja, M.Sc.
NIP. 19630820 199003 1 003

Maros, 12 Nopember 2014

Manajer Diagnostik

[Signature]
Dr. drh. Faizah, M.T.A.
NIP. 19710416 200003 2 001

TEMBUSAN :

- 1 Direktur Kesehatan Hewan
- 2 Bendahara Penerima PNPB BBVET Maros

LAMPIRAN JAWABAN

No. : 5558/PD.650/F.5.G/1114

No. Epi : 07141113

HASIL UJI LABORATORIUM

ID	Kec	Desa	Pemilik	Spesimen	Kode	Jenis & Hasil Uji	Pos	Neg	Tgl Uji
1	ATAMBUA K		Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	7	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	31	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	34	Brucella CFT		1	11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	80	Brucella CFT		1	11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	82	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	88	Brucella CFT		1	11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	90	Brucella CFT		1	11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	92	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	100	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	126	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	131	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	140	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	141	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	142	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	143	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	147	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	183	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	151	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	184	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	193	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	195	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	196	Brucella CFT	1		11-11-14
			Drh.Eni Rohyati	Serum Sapi	197	Brucella CFT	1		11-11-14

Maros, 12 Nopember 2014

Manajer Diagnostik

Dr. drh. Faizah, M.T.A.
NIP. 19710416 200003 2001

TAGIHAN BIAYA PENGUJIAN SPESIMEN NO : 07141113

Sesuai Peraturan Pemerintah Nomor 48 Tahun 2012 tentang Jenis & Tarif PNBPN yg berlaku pada Kementerian Pertanian RI.

No. ID	Spesimen	Jenis Uji	Jum	Biaya(Rp)	Total(Rp)	Verf. Ptgs PNBPN
1	Serum Sapi	Brucella CFT	23	40.000	920.000	
Total Tagihan Biaya :				Rp.	920.000	

Catatan Tagihan :

- Jumlah tagihan biaya pengujian yg tertera telah diverifikasi kebenarannya oleh petugas pengelola PNBPN
- Biaya pengujian dibayar langsung atau transfer melalui BRI Cabang Maros No. Rek. 0224-01-000189-30-3
- Pengiriman/transfer uang harap cantumkan instansi pengirim dan No. Epi yang dibayar.
- Abaikan tagihan ini jika telah melakukan pembayaran.

**BALAI BESAR VETERINER MAROS
LABORATORIUM SEROLOGI**

JAWABAN HASIL UJI LABORATORIUM
DISAMPAIKAN KEPADA MANAJER DIAGNOSTIK DAN INFORMASI VETERINER

No Buku Lab : SERO-0714-96
No EPID : 07141113
Tgl. Terima : Tuesday, November 11,
Tgl. Jawab : 12 Nov 2014

HASIL UJI LABORATORIUM

No	Spesimen	Pengawet	ID	Jenis & Hasil Uji	J Spes	Pos	Neg	Rsk	TglUji	A	M	P
1	Serum Sapi	Tanpa pengaw	1	Brucella CFT	23	19	4		111114	mr	ros	sis

KESIMPULAN

IC: Kesimpulan

- Uji CFT kode 7 positif dengan titer 3/16 ()
 Uji CFT kode 31 positif dengan titer 3/128 ()
 Uji CFT kode 34 Negatif ()
 Uji CFT kode 80 Negatif ()
 Uji CFT kode 82 positif dengan titer 4/32 ()
 Uji CFT kode 88 Negatif ()
 Uji CFT kode 90 Negatif ()
 Uji CFT kode 92 positif dengan titer 4/128 ()
 Uji CFT kode 100 positif dengan titer 4/256 ()
 Uji CFT kode 126 positif dengan titer 3/128 ()
 Uji CFT kode 131 positif dengan titer 3/256 ()
 Uji CFT kode 140 positif dengan titer 3/256 ()
 Uji CFT kode 141 positif dengan titer 3/256 ()
 Uji CFT kode 142 positif dengan titer 3/256 ()
 Uji CFT kode 143 positif dengan titer 2/256 ()
 Uji CFT kode 147 positif dengan titer 4/64 ()
 Uji CFT kode 183 positif dengan titer 4/64 ()
 Uji CFT kode 151 positif dengan titer 4/128 ()
 Uji CFT kode 184 positif dengan titer 3/256 ()
 Uji CFT kode 193 positif dengan titer 4/32 ()
 Uji CFT kode 195 positif dengan titer 3/256 ()
 Uji CFT kode 196 positif dengan titer 3/256 ()
 Uji CFT kode 197 positif dengan titer 3/256 ()

Email Data

Halaman 1 dan 2

Ajal : Mima Amanah Sam
Media : Rosmiaty
Penguji : Dri. Siswani
Input data : Mima Amanah Sam
Verifikator : Rosmiaty

Maros, 12 November 2014

Medik Veteriner



Dr. Siswani

NIP. 19830912 201101 2 015