

**SKRIPSI**

**PERBEDAAN TITER ANTIBODI *Brucella abortus* S-19 INAKTIF dan  
*Brucella abortus* S-19 AKTIF PADA MENCIT (*Mus musculus*)  
dengan *Indirect* ELISA**



Oleh :

**M. ILHAM AKBAR HUSNI**  
KEDIRI – JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2005**

**PERBEDAAN TITER ANTIBODI *Brucella abortus* S-19 inaktif dan  
*Brucella abortus* S-19 aktif PADA MENCIT (*Mus musculus*)  
dengan *Indirect* ELISA**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

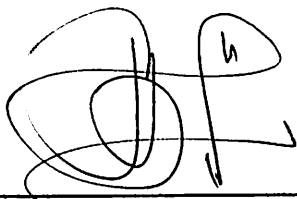
Oleh :

M. ILHAM AKBAR HUSNI

NIM. 060233102

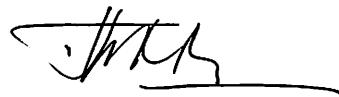
Menyetujui,

Komisi Pembimbing,



(Mas'ud Hariadi, M. Phil., Ph, D., drh)

Pembimbing Pertama



(Wiwiek Tyasningsih, M. Kes., drh)

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Menyetujui  
Panitia Penguji,



Sri Chusniati., M. Kes., drh

Ketua



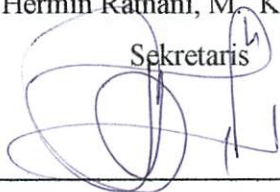
Dr. Susilohadi Wibowo, MS., drh.

Anggota



Hermin Ratnani, M. Kes., drh.

Sekretaris



Mas'ud Hariadi, M. Phil., Ph. D., drh.

Anggota



Wiwiek Tyasningsih, M. Kes., drh.

Anggota

Surabaya, 8 - Juni - 2005

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh.

NIP. 130687297

**PERBEDAAN TITER ANTIBODI *Brucella abortus* S-19 INAKTIF dan  
*Brucella abortus* S-19 AKTIF PADA MENCIT (*Mus musculus*)  
dengan *Indirect* ELISA**

M. Ilham Akbar Husni

**ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa imunisasi *Brucella abortus* S-19 inaktif dengan menggunakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan dilakukan imunisasi ulang (*booster*) dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) memberikan respon antibodi yang lebih tinggi dibandingkan dengan imunisasi *Brucella abortus* S-19 aktif.

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Balb/C*) umur 6 minggu sebanyak 30 ekor, menggunakan desain percobaan *The Post-Test Only Group Design*. 15 ekor mencit diimunisasi *Brucella abortus* S-19 inaktif dengan dosis  $7-20 \times 10^9$  sel utuh dalam 0,15 ml yang dilarutkan dalam *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan diimunisasi ulang (*booster*) dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA). 15 ekor mencit berikutnya diimunisasi dengan *Brucella abortus* S-19 aktif dengan dosis yang sama dan diimunisasi ulang (*booster*) tanpa penambahan *adjuvant*. *Booster* dilakukan setiap interval dua minggu sebanyak tiga kali dengan dosis yang sama.

Dua minggu setelah *booster* terakhir dilakukan pengambilan darah untuk diuji *Indirect* ELISA. Hasil uji ELISA berupa angka-angka yang menerangkan titer antibodi yang dinyatakan dengan nilai *Optical Density* (OD). Data yang diperoleh ditabulasikan dan dianalisis dengan uji t.

Hasil yang didapat menunjukkan bahwa mencit yang diimunisasi *Brucella abortus* S-19 inaktif dengan menggunakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan diimunisasi ulang (*booster*) dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) memberikan respon antibodi yang lebih tinggi dibandingkan dengan imunisasi *Brucella abortus* S-19 aktif.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur yang tak terhingga kehadiran Allah S.W.T atas segala limpahan karunia-Nya serta shalawat dan salam bagi junjungan kita nabi Muhammad S.A.W kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dengan judul “ Perbedaan titer antibodi *Brucella abortus* S-19 Inaktif dan *Brucella abortus* S-19 aktif Pada Mencit (*Mus musculus*) dengan *Indirect* ELISA “.

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa imunisasi *Brucella abortus* S-19 inaktif dengan menggunakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan diimunisasi ulang (*booster*) dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) memberikan respon antibodi yang lebih tinggi dibandingkan dengan imunisasi *Brucella abortus* S-19 aktif.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan berbagai pihak penyusunan tulisan ini tidak akan berhasil. Dengan penuh rasa hormat penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada Bapak Mas'ud Hariadi, M. Phil., Ph..D., drh. selaku dosen pembimbing pertama dan Ibu Wiwiek Tyasningsih, M. Kes., drh. selaku dosen pembimbing kedua atas saran serta bimbingannya selama ini.

Demikian pula penulis menyampaikan terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Bapak Prof. Dr. Ismudiono, MS., drh serta seluruh Civitas akademika atas bantuan moral dan material serta kesempatan yang diberikan sehingga dapat menyelesaikan tulisan ini.

Pada kesempatan ini pula penulis juga tidak lupa menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Ibu Rr. Ratih Ratnasari, SU., drh. sebagai pembimbing yang dengan sepenuh dan keikhlasan hati membantu menyelesaikan penulisan skripsi dan Bapak Suwarno, M. Si., drh. sebagai pembimbing dalam mengerjakan penelitian .
2. Kepada Bapak, Ibu, adik Ossy dan Ocha atas dorongan semangat, bantuan spiritual maupun material terutama doa restu yang diberikan selama penyelesaian penulisan skripsi ini. Tak lupa penulis sampaikan kepada Yulianna Puspitasari yang telah banyak meluangkan waktu, doa, dukungan dan kesabarannya.
3. Kepada proyek DUE-Like batch III yang telah memberikan bantuan dana dalam melaksanakan penelitian ini, sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.
4. Teman penelitian Iffah, Trikun dan Yuk Thur atas kerja samanya selama ini yang senantiasa mendukung dalam mengerjakan dan menyelesaikan penelitian.
5. Teman-teman alih jenjang angkatan 2002 khususnya Miko, Komandan, Nachienk, mbak Fifin, mbak Dini dan seluruh teman-teman angkatan 2001 Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kekeluargaan dan kekerabatannya selama ini.
6. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah memberikan bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung.

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna. Semua saran dan kritik sangat penulis harapkan demi kesempurnaan tulisan ini. Semoga hasil yang dituangkan dalam tulisan ini dapat memberikan manfaat dan nilai tambah bagi ilmu pengetahuan.

Surabaya, Maret 2005

Penulis

**DAFTAR ISI**

ABSTRAK .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang Permasalahan .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan Penelitian .....	3
1.4. Manfaat Penelitian .....	4
1.5. Hipotesa Penelitian .....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1. <i>Brucellosis</i> .....	5
2.1.1 Sejarah <i>Brucellosis</i> .....	5
2.1.2 Penyebab <i>Brucellosis</i> .....	5
2.1.3 <i>Brucella abortus</i> S-19 .....	7
2.1.4 Diagnosis <i>Brucellosis</i> .....	7
2.2. Sistem Imun .....	8



2.3. Imunisasi .....	9
2.4. Vaksin <i>Brucella abortus</i> S-19 .....	11
2.5. Antigen Bakteri .....	11
2.6. Antibodi .....	12
2.6.1 Pengertian Antibodi .....	12
2.6.2 Antibodi <i>Brucella</i> .....	13
2.7. <i>Adjuvant</i> .....	13
2.8. Hewan Coba .....	14
2.9. <i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	14
2.9.1. Metode ELISA .....	14
2.9.2. <i>Indirect</i> ELISA .....	15
<b>BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN .....</b>	<b>16</b>
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian .....	16
3.2. Materi Penelitian. ....	16
3.3. Metode Penelitian .....	18
3.3.1. Imunisasi Pada Hewan Coba .....	18
3.3.2. Koleksi Sampel Serum Darah Mencit.....	19
3.3.3. Pembiakan Kuman <i>B. abortus</i> S-19 .....	19
3.3.4. Pembuatan Antigen Sel Utuh Kuman <i>B. abortus</i> S-19 ...	20
3.3.5. Pengukuran Titer Antibodi dengan Metode <i>Indirect</i> <i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	20
3.4. Rancangan Penelitian dan Analisis Data .....	22

BAB IV HASIL PENELITIAN .....	23
4.1. Pembiakan Kuman B. abortus S-19 .....	23
4.2. Pembuatan Antigen Sel Utuh ( <i>whole cell</i> ) Kuman B. abortus S-19 .....	24
4.3. Pengukuran Titer Antibodi dengan Uji <i>Indirect</i> ELISA .....	24
BAB V PEMBAHASAN .....	27
5.1. Pembiakan Kuman B. abortus S-19 .....	27
5.2. Pembuatan Antigen Sel Utuh ( <i>whole cell</i> ) Kuman B. abortus S-19 .....	28
5.3. Pengukuran Titer Antibodi dengan Uji <i>Indirect</i> ELISA .....	28
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	31
6.1. Kesimpulan .....	31
6.2. Saran .....	31
RINGKASAN .....	32
DAFTAR PUSTAKA .....	34
LAMPIRAN .....	37

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
4.1 Nilai OD Pada Pemeriksaan Antibodi Mencit yang Diimunisasi <i>B. abortus</i> S-19 .....	25
4.2 Nilai rata-rata OD Hasil Pengujian Antibodi anti <i>B. abortus</i> S-19 Inaktif dan Aktif .....	26

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Imunisasi pada mencit secara subcutan .....	18
2.2 Tehnik pengambilan darah pada mencit melalui <i>vena orbitalis</i> .....	19
4.1 Hasil pembiakan kuman <i>Brucella abortus</i> S-19, pada media <i>Potato's Agar</i> (A) dan pada media <i>Trypticase Soy Agar</i> (B) .....	23
4.2 Hasil uji <i>Indirect ELISA</i> .....	25

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Kerangka Operasional Penelitian .....	37
2. Prosedur Pelaksanaan Metode <i>Indirect</i> ELISA Untuk Pengukuran Titer Antibodi Kuman B. abortus S-1 Aktif .....	38
3. Prosedur Pelaksanaan Metode <i>Indirect</i> ELISA Untuk Pengukuran Titer Antibodi Kuman B. abortus S-19 Inaktif ....	39
4. Data Lengkap Nilai OD Antibodi Mencit pada <i>Indirect</i> ELISA .....	40
5. Analisis Statistik Uji t Nilai OD .....	41

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Permasalahan

Pembangunan di bidang peternakan merupakan salah satu usaha untuk meningkatkan produktivitas ternak dalam rangka untuk memenuhi kebutuhan protein hewani yang semakin meningkat, tetapi hal tersebut tidak diimbangi dengan pengembangan ternak sehingga populasi ternak terutama ternak potong dari tahun ke tahun mengalami penurunan. Penurunan populasi tersebut disebabkan oleh beberapa hal antara lain karena pemotongan sapi betina yang masih produktif, penurunan jumlah kelahiran pedet, gangguan reproduksi, pengelolaan dan penyakit (Soehadji, 1993).

Salah satu penyakit yang dapat menyerang ternak potong antara lain sapi, kambing, domba dan babi adalah *brucellosis* yaitu suatu penyakit *zoonosis* yang disebabkan oleh kuman *Brucella spp.*

*Brucella abortus* sering menyerang ternak sapi dan dapat mengakibatkan gangguan reproduksi dan abortus atau keluron menular pada umur kebuntingan 5-8 bulan, penyebarannya terdapat di seluruh dunia dan secara praktis dapat menyebar kemana-mana.

Kerugian ekonomi yang disebabkan oleh *brucellosis* sangatlah besar, walaupun mortalitasnya rendah. Pada ternak kerugian dapat berupa keluron, anak hewan yang dilahirkan lemah kemudian mati, terjadinya gangguan alat-alat reproduksi yang mengakibatkan kemajiran temporer atau permanen. Kerugian

pada sapi perah berupa turunnya produksi susu (Tizzard, 1988), sedang pada hewan jantan menyebabkan orchitis dan epididimitis (Hardjopranto, 1995).

Berbagai upaya telah dilakukan untuk mencegah penyebaran penyakit ini. Dari pengamatan dan penyidikan tersebut telah diperoleh data dan dasar yang dapat digunakan sebagai acuan untuk program pemberantasan penyakit *Brucellosis*. Penyidikan terhadap adanya beberapa kasus *Brucellosis* telah dilakukan pada tahun 1990-1991 (Anonimus, 1991). Salah satu pengendaliannya adalah melalui program vaksinasi.

Saat ini vaksin yang sering digunakan di lapangan adalah vaksin *Brucella abortus* strain 19 (S-19), merupakan vaksin aktif yang dapat merangsang sistem imun dan produksi antibodi pada hewan yang divaksinasi agar resisten terhadap penyakit *brucellosis* (OIE, 2002).

Imunisasi dengan menggunakan vaksin aktif dapat menimbulkan kekebalan umum dan kekebalan lokal di selaput lendir. Sedangkan vaksin inaktif yang pada umumnya dalam bentuk emulsi minyak jika diaplikasikan secara suntikan dapat menimbulkan kekebalan yang lebih tinggi dan lama jika dibandingkan dengan vaksin aktif (Levy and Rones, 1993).

Vaksin inaktif dibuat dari bakteri hidup yang masih utuh yang kemudian diinaktifkan dengan cara fisis (panas, penyinaran, ultraviolet) dan khemis (penambahan bahan kimia *fenol*, *chloroform*, *betapropiolakton*), sedangkan campuran yang terdiri dari *formalin* atau *betapropiolakton* dalam emulsi minyak adalah bahan kimia yang sering dipakai. (Ernawati dkk, 2002).

Kemajuan yang pesat di bidang biologi molekuler juga mendukung pendeteksian adanya antibodi. Di dalam penelitian ini dilakukan pengukuran titer antibodi mencit yang telah diimunisasi dengan *B. abortus* S-19 aktif dan *B. abortus* S-19 inaktif dengan penambahan *adjuvant*. Titer antibodi diukur dengan metode *indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dengan cara menilai absorbennya melalui *Optik Density* (OD). (Goers, 1993 dan Rantam, 2003).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan maka rumusan masalah yang dapat diajukan adalah apakah imunisasi *B. abortus* S-19 inaktif dengan menggunakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan diimunisasi ulang (*booster*) dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) memberikan respon antibodi yang lebih tinggi dibandingkan dengan imunisasi *B. abortus* S-19 aktif?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa imunisasi *B. abortus* S-19 inaktif dengan menggunakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan diimunisasi ulang (*booster*) dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) memberikan respon antibodi yang lebih tinggi dibandingkan dengan imunisasi *B. abortus* S-19 aktif.



#### **I.4 Manfaat Penelitian**

Dengan mengetahui perbedaan titer antibodi mencit antara imunisasi *B. abortus* S-19 inaktif dengan *B. abortus* S-19 aktif, maka diharapkan dapat memberikan tambahan informasi kepada para praktisi dan pihak yang berwenang tentang penggunaan vaksin *B. abortus* S-19 inaktif dalam melakukan tindakan pencegahan, pengendalian dan pemberantasan penyakit *brucellosis* agar lebih efektif.

#### **I.5 Hipotesis penelitian**

Imunisasi *B. abortus* S-19 inaktif dengan menggunakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan diimunisasi ulang (*booster*) dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) memberikan respon antibodi yang lebih tinggi dibandingkan dengan imunisasi *B. abortus* S-19 aktif.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Brucellosis*

##### 2.1.1 Sejarah *Brucellosis*

*Brucellosis* merupakan penyakit zoonosis yaitu suatu penyakit yang dapat menular dari hewan ke manusia dan telah menyebar ke seluruh dunia terutama pada negara yang penduduknya beternak sapi, kambing, domba maupun babi serta dapat menyebabkan keguguran dan kemajiran (Comerci, *et al.*, 1998).

Kuman penyebab *brucellosis* pertama kali diisolasi oleh Bruce pada tahun 1887 yang pada waktu itu dikenal sebagai Demam Malta atau Mediteranean Fever, sedangkan kuman penyebabnya diberi nama *Micrococcus melitensis*. Disebut *Micrococcus* karena kuman ini berbentuk batang kecil hampir menyerupai kokus dan *melitensis* sebab penyakit penderita terjadi setelah minum air susu domba. Kuman *Brucella* pada sapi telah berhasil diisolasi dari plasenta pada sapi yang mengalami keguguran oleh Bang pada tahun 1897. Kuman tersebut diberi nama *Brucella abortus* dan penyebab penyakit dikenal pula sebagai penyakit *Bang* atau *Contagious abortion* (Merchant & Packer, 1971).

##### 2.1.2 Penyebab *Brucellosis*

*Brucellosis* disebabkan oleh kuman *Brucella*. Beberapa spesies dari *Brucella* yang dapat menyebabkan masalah pada ternak antara lain *Brucella abortus* yang sering menyerang pada ternak sapi (Subronto, 1995).

Klasifikasi dari bakteri ini menurut Dwidjoseputro (1995) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plant
Filum	: Thalophyta
Klas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Family	: Brucellaceae
Genus	: Brucella
Spesies	: <i>Brucella abortus</i>

Morfologi berbentuk batang pendek atau kokobasili dengan diameter 0,5 - 0,7  $\mu$  sedangkan panjangnya antara 0,6 - 1,5  $\mu$ . *B. abortus* tidak bergerak, tidak tahan asam, tidak membentuk spora, gram negatif dan bersifat aerobik (Jawetz *et al.*, 2001)

Keguguran yang disebabkan oleh *B. abortus* biasanya terjadi pada umur kebuntingan 5 - 8 bulan. Meskipun kelenjar susu tidak menunjukkan gejala klinis tetapi dalam air susunya dapat ditemukan kuman *Brucella*. Hal ini penting sekali dalam zoonosis karena dapat merupakan sumber penularan bagi manusia (Hardopranjoto, 1995). Tidak semua keguguran disebabkan oleh *B. abortus* dan tidak semua infeksi oleh *B. abortus* mengakibatkan keguguran, tetapi terjadinya keguguran pada kebuntingan 5-8 bulan dapat merupakan indikasi adanya infeksi *B. abortus*, meskipun ini bukan merupakan gejala yang spesifik (Jenning, 1979). Penularan penyakit *Brucellosis* tidak selalu diikuti dengan tanda-tanda klinis

yang mudah untuk diamati, meskipun pada tubuh hewan yang terinfeksi terbentuk respon antibodi (USDA, 2001).

### 2.1.3 *Brucella abortus* S-19

Salah satu strain atau galur yang dimiliki oleh *Brucella abortus* adalah strain 19 (S-19). Kuman *Brucella abortus* S-19 dapat diisolasi dari susu. Kuman tersebut bila disuntikkan pada sapi yang bunting masih dapat mengakibatkan keluron. Kuman *B. abortus* S-19 merupakan biotipe I *B. abortus*. yang memiliki kekhususan karena pertumbuhannya yang dihambat oleh thionin blue (1:500.000), eritritol (1mg/ml) dan penicillin 5 IU/ml dan untuk pertumbuhan S-19 tidak memerlukan karbondioksida (OIE, 2004). Kuman *B. abortus*. S-19 dapat menyebar dari satu hewan ke hewan yang lain. Untuk pejantan, kuman *B. abortus* S-19 dapat menurunkan fertilitas, menyebabkan orkhitis dan epididimitis (Subronto, 1995).

### 2.1.4 Diagnosis *Brucellosis*

Diagnosis *brucellosis* pada sapi dapat dilakukan berdasarkan gejala klinis, pemeriksaan bakteriologis kuman *Brucella* serta pemeriksaan serologis yang diantaranya adalah dengan *Enzym Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Rantam, 2003). Bahan yang dapat diambil untuk pemeriksaan serologis tersebut berupa darah, air susu, uterus, kotiledon, sekresi vagina, selaput fetus, jaringan fetus yang abortus, plasenta, limpa dan kelenjar limfe (Subronto, 1995).

## 2.2 Sistem Imun

Imunitas (kekebalan) merupakan jawaban reaksi tubuh terhadap adanya bahan asing secara molekuler maupun seluler (Rantam, 2003). Pada proses ini terjadi serangkaian mekanisme yang meliputi pengenalan, penempatan, netralisasi dan eliminasi bahan-bahan dari dalam tubuh. Secara garis besar mekanisme kekebalan terbagi menjadi dua, yaitu :

1. *Innate immunity* (kekebalan bawaan / sistem imun tidak spesifik / seluler)
2. *Adaptive immunity* (kekebalan didapat / sistem imun spesifik / humoral)

*Innate immunity* adalah pertahanan tubuh yang didapat karena adanya respon yang tidak spesifik dan merupakan bagian dari sistem imun yang berfungsi sebagai barrier terdepan pada awal terjadinya infeksi penyakit. Perangkat imun yang berperan pada sistem imun tidak spesifik adalah makrofag, sel darah merah, sel asesoris, monosit, sel NK (*Natural Killer*), sel-sel toksik dan sekresi lisosim.

*Adaptive immunity* merupakan sistem pertahanan tubuh lapis kedua, apabila *innate immunity* tidak mampu mengeliminasi agen penyakit. Hal ini terjadi akibat fagosit tidak mengenali agen infeksius. Penanggulangannya diperlukan molekul spesifik yang akan berikatan langsung dengan agen infeksius yang dikenal dengan antibodi, sehingga dapat menstimulir proses fagositosis (Rantam, 2003). Pada sistem imun spesifik, kekebalan dapat ditingkatkan baik kualitas maupun kuantitasnya dengan stimulasi berulang dari molekul asing yang sama (Artama, 1995). Sel yang berperan sebagai mediator pada proses ini adalah sel limfosit yang dapat mensintesis sel reseptor sesuai dengan antigen determinan yang masuk.

### 2.3 Imunisasi

Imunisasi merupakan suatu tehnik dengan pemanfaatan sistem imun spesifik yaitu dengan tidak melalui kontak langsung terhadap suatu antigen, akan tetapi hanya dengan bagian tertentu dari antigen tersebut yang bersifat imunogen dalam rangka mendapatkan suplai antibodi terhadap imunogen (antigen tersebut). Antibodi yang didapatkan dari imunisasi ini dikenal sebagai antibodi poliklonal (Smith, 1995).

Imunisasi secara berulang dengan selang waktu tertentu akan meningkatkan respon imun suatu individu. Penyuntikan suatu molekul antigen berarti akan menstimulir sejumlah klon sel limfosit B yang spesifik terhadap antigen determinan dari molekul tersebut yang menyebabkan masing-masing sel akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi imunoblast dan sentroblast. Imunoblast akan berkembang menjadi limfoblast dan dideterminasi menjadi sel plasma yang tidak lagi membelah sebagai pabrik antibodi. Sentroblast akan menjadi sel memori yang dapat meningkatkan respon imun pada kontak berikutnya dengan antigen yang sama (Baratawidjaja, 2002).

Dua jalur sel utama, limfoid dan myeloid, berasal dari sel pluripoten dalam sumsum tulang. Progenitor limfoid mempunyai kemampuan untuk berkembang menjadi limfoid B dan T. Sel B berkembang dalam sumsum tulang dan bila sudah matang akan menjadi sel plasma yang membentuk antibodi. Progenitor limfoid-limfoid yang menjadi matang di timus, berkembang menjadi sel T dan subsetnya. Progenitor myeloid berkembang menjadi sel mast, granulosit (basofil, eosinofil dan neutrofil), monosit yang berdiferensiasi menjadi makrofag bila

masuk ke dalam jaringan dan megakariosit/trombosit. Netrofil (leukosit polimorfonuklear/PMN) adalah granulosit dalam sirkulasi dan bermigrasi ke jaringan sebagai respon terhadap migrasi microbial. Sel imun tidak spesifik lain adalah sel NK (Baratawidjaja, 2002).

*Antigen Presenting Cells* (APCs) adalah sel asesoris yang berfungsi mempresentasikan antigen terhadap limfosit agar respon imun berhasil dengan baik. Jenis sel yang dapat bertindak sebagai APCs antara lain makrofag, sel dendrite, sel B dan sel Langerhans (Rantam, 2003).

Ada dua cara untuk membuat hewan kebal terhadap penyakit menular yaitu imunisasi pasif dan aktif. Pada imunisasi pasif menghasilkan resistensi sementara dengan memindahkan antibodi dari hewan resisten ke hewan rentan. Antibodi ini memberikan perlindungan yang cepat, tetapi cepat dikatabolisis. Sedangkan pada imunisasi aktif akan menghasilkan perlindungan yang berlangsung lama. Ada dua macam vaksin yang digunakan di dalam imunisasi aktif yaitu vaksin hidup dan vaksin mati (inaktif), keduanya mempunyai kelebihan dan kekurangan. Vaksin aktif bersifat imunitas kuat, tidak memerlukan *adjuvant*, tidak stabil dalam penyimpanan, dan dapat bereplikasi di dalam sel. Vaksin mati bersifat mantap dalam penyimpanan, tidak bereplikasi di dalam tubuh sehingga cenderung menghasilkan tanggap kebal yang lebih rendah dibandingkan dengan vaksin hidup (Tizzard, 1988).

## 2.4 Vaksin *Brucella abortus* S-19

Vaksin *B. abortus* yang sering digunakan adalah strain S-19. *B. abortus* S-19 memiliki sifat stabil, patogenitasnya rendah terhadap sapi dan cukup memberikan proteksi terhadap keguguran. Nilai protektifitas dapat mencapai 70 – 80 %, dengan resiko terhadap keguguran rendah (Anonimus. 1996).

Dosis yang dianjurkan adalah dosis standar yang berisi kuman hidup  $4-12 \times 10^{10}$  CFU / ml. Vaksinasi umumnya diberikan pada anak sapi umur 3 atau 4 bulan sampai 12 bulan. Vaksinasi pada anak sapi akan tahan terhadap penyakit selama 7 tahun atau lima kali kebuntingan. Pada sapi dewasa setelah masa pubertas pemberian vaksin *B. abortus* S-19 dapat memberikan antibodi persisten sehingga dapat terjadi reaksi positif palsu. Penggunaan vaksin *B. abortus* S-19 bisa saja memberikan efek samping. Efek samping yang mungkin timbul adalah keguguran terutama pada akhir masa kebuntingan (Anonimus, 1996).

## 2.5 Antigen Bakteri

Menurut Rantam (2003), antigen adalah substansi yang dapat dikenali dan diikat dengan baik oleh sistem imun. Bagian dari antigen yang secara langsung berikatan dengan molekul reseptor (seperti antibodi) dikenal dengan nama epitop. Hal ini menandakan bahwa antigen mempunyai beberapa epitop (determinan antigen). Adapun molekul dikatakan bersifat imunogen bila terjamin keasingannya dan memiliki berat molekul lebih dari 5 kDa, dan untuk molekul yang lebih kecil dikatakan imunogenik bila terkait pada makromolekul sebagai karier (Tizard, 1988).



Secara umum ada beberapa macam antigen dari bakteri yaitu : 1). Bakteri utuh; 2). Bakteri utuh yang dirusak secara mekanis, fisik atau kimiawi seperti penggerusan, pengocokan dengan manik-manik kaca, sonikasi, vorteks homogenizer, pemanasan dengan suhu tinggi, pendidihan, autoklaf, surfaktan non ion, anion atau kation; 3). Ekstrak kasar bakteri yang dirusak dengan cara pemusingan seperti dengan fraksinasi dengan garam dan kromatografi; 4). Senyawa kimia murni atau setengah murni (Spencer, 1995).

## 2.6 Antibodi

### 2.6.1 Pengertian antibodi

Menurut Rantam (2003), antibodi adalah immunoglobulin yang disekresi oleh sel B yang teraktifasi oleh antigen. Semua molekul antibodi mempunyai empat rantai polipeptida dasar yang terdiri dari dua rantai berat (*heavy chain*) dan dua rantai ringan (*light chain*) yang identik dan dihubungkan satu sama lain oleh ikatan disulfide.

Ada dua jenis rantai ringan (*kappa* dan *lambda*) yang terdiri dari 230 asam amino serta lima jenis rantai berat yang tergantung pada kelima jenis immunoglobulin yaitu IgM, IgG, IgA, IgE dan IgD. IgM merupakan antibodi dalam respon imun primer terhadap kebanyakan antigen. Kebanyakan sel B mengandung immunoglobulin M pada permukaannya sebagai reseptor antigen. IgM dibentuk terlebih dahulu pada respon imun primer dibandingkan dengan IgG, sedangkan IgG merupakan immunoglobulin utama dalam serum normal dan merupakan antibodi utama dari respon imun spesifik (Baratawidjaja, 2002).

### 2.6.2 Antibodi *Brucella*

Kuman *Brucella* mempunyai beberapa antibodi dalam bentuk immunoglobulin (Ig) yang dapat terstimulasi pada saat proses infeksi. Dalam proses infeksi yang berlangsung secara alami, IgM akan terbentuk terlebih dahulu, antibodi tersebut segera akan menurun jumlahnya, kemudian terbentuk IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>2</sub> yang merupakan antibodi utama. Setelah dilakukan vaksinasi dengan vaksin *B. abortus* S-19, respon yang baik segera terjadi dengan terbentuknya IgM dan IgG<sub>1</sub> yang kurang serta IgG<sub>2</sub> yang tinggi jumlahnya (Subronto, 1995).

### 2.7 Adjuvant

*Adjuvant* adalah substansi-substansi tertentu yang dapat meningkatkan secara tidak spesifik efektifitas imunologis dari agen pengimunisasi. *Adjuvant* mempunyai sifat-sifat tertentu sebagai karakteristiknya terutama membuat depo antigen dan melepas antigen sedikit demi sedikit sehingga memperpanjang perjalanan antigen dengan sistem imun dan memacu sistem imun dengan afinitas yang tinggi (Baratawidjaja, 2002). Salah satu *adjuvant* yang sering digunakan adalah *Complete Freund's Adjuvant*, dan *Incomplete Freund's Adjuvant* yang digunakan sebagai *booster*. *Adjuvant Freund's* terdiri atas campuran minyak mineral dan pengemulsi dengan mikobakteria (CFA) atau tanpa mikobakteria (IFA) (Smith, 1995).

Menurut Tizzard (1988), cara yang terbaik dalam pemberian antigen dalam *Complete Freund's Adjuvant* dan *Incomplete Freund's Adjuvant* adalah secara subkutan atau intradermal.

## 2.8 Hewan Coba

Pemilihan spesies hewan didasarkan pada jumlah serum yang dibutuhkan dan jumlah hewan coba yang tersedia. Pada kebanyakan penelitian, mencit biasanya lebih banyak dipakai. Karena hewan ini murah, gampang dipelihara, daya tahannya tinggi dan mudah untuk diambil darahnya. Lebih dari 500  $\mu\text{l}$  – 800  $\mu\text{l}$  darah dapat dikumpulkan per-minggu tanpa pengaruh yang jelek (Smith, 1995). Produksi antibodi dengan menggunakan hewan jantan dapat memproduksi antibodi lebih banyak dibandingkan betina, karena pada betina lebih cepat terjadi pengotoran lewat urine dan kotorannya, sehingga terjadi stress dan akhirnya cairan yang dihasilkan menjadi sedikit (Rantam, 2003).

Setiap hewan coba mempunyai spesifitas yang berbeda dalam tehnik pengambilan darah (Rantam, 2003). Hewan coba mencit pengambilan darah yang cukup efektif adalah melalui *vena orbitalis* atau pembuluh darah mata, hanya saja harus hati-hati agar tidak menyebabkan kebutaan (Rantam, 2003).

## 2.9 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

### 2.9.1 Metode ELISA

Metode ELISA pertama kali diperkenalkan oleh Engvall dan Perlmann pada tahun 1971 dengan cara mengkonjugasikan enzim dalam immunoassay. Aplikasi dari metode ini salah satunya adalah dipergunakan untuk mendeteksi antibodi dengan cara menilai absorbennya melalui *Optic Density* (OD) (Burgess, 1995). ELISA terbagi menjadi dua sistem, yaitu sistem homogen dan heterogen. Sistem heterogen terdapat dua model, yaitu kompetitif dan *non* kompetitif ELISA.

*Non kompetitif* ELISA adalah sistem yang paling banyak digunakan dan dikembangkan karena lebih sensitif dibandingkan dengan model sistem yang lain. Contoh dari sistem ini adalah *indirect* ELISA (antibodi kedua yang dilabel), *direct* ELISA (antibodi pertama yang dilabel), *sandwich* ELISA, *capture* ELISA, dan sel ELISA (Rantam, 2003), sedangkan menurut komponen yang dilabel enzim, pada dasarnya ELISA dibagi menjadi tiga jenis yaitu pelabelan pada antibodi (Ab), antigen (Ag) atau anti-imunoglobulin (anti-Ig) (Suwarno dkk, 2003).

### 2.9.2 *Indirect* ELISA

Model ini banyak digunakan diberbagai tingkat penelitian laboratorium, karena bahan yang digunakan untuk uji ini banyak dipasarkan dan mudah dibeli dipasaran (Rantam, 2003). Model ini tidak memerlukan keahlian khusus. Antibodi dapat dideteksi dengan cara antigen diikatkan pada benda padat kemudian ditambah dengan antibodi pertama yang akan dicari, setelah itu ditambahkan antibodi kedua (*conjugated*) yang bertanda enzim (*Alkaline Phosphatase*). Langkah terakhir adalah dengan menambahkan substrat kromogenik yang menimbulkan warna akibat bereaksi dengan enzim. Perubahan warna yang terjadi sesuai dengan jumlah enzim yang diikat dan sesuai pula dengan kadar antibodi yang dicari.

### BAB III

## MATERI DAN METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk pengambilan sampel serum darah mencit dan perkembangbiakan kuman *Brucella abortus* S-19; Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Laboratorium Imunologi dan Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk pengujian serum darah dengan metode *indirect* ELISA serta Tropical Disease Centre (TDC) Universitas Airlangga untuk pembacaan kadar protein dan hasil uji *Indirect* ELISA. Pelaksanaan penelitian ini berlangsung dari bulan Juni sampai dengan Desember 2004.

### 3.2 Materi Penelitian

Bahan yang digunakan untuk imunisasi pada hewan coba meliputi vaksin *B. abortus* S-19 aktif dan *B. abortus* S-19 inaktif, *Complete Freund's Adjuvant* (CFA), *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA). Vortex mixer, alkohol 70 %. Peralatan yang digunakan adalah spuit 1 ml *disposable*, glove karet, masker hidung dan kapas.

Bahan yang digunakan untuk keperluan koleksi sampel serum darah mencit meliputi *whole blood* dan aquadest, sedangkan peralatan yang digunakan adalah kateter kecil, *micro cup*, sentrifuges, kapas dan tabung *Eppendorf*.

Bahan yang digunakan untuk pengukuran titer antibodi kuman *B. abortus* S-19 aktif dengan metode *indirect* ELISA meliputi antigen *B. abortus* S-19 sel utuh, Buffer Carbonat Bicarbonat (Buffer Coating), PBS Tween – 20 (Buffer Washing), PBS Skim 4%, Aquadest, serum darah mencit yang mengandung kuman *B. abortus* S-19 aktif sebagai AB I, Buffer inkubasi, AB II conjugated (Promega) product information, Anti Mouse IgG (Fc) AP Conjugate katalog # S 3731 size 100 µl, Substrat pNPP (Sigma Chemical Company N – 2640 pNPP 15 mg LOT : 060k – 8252) dan Natrium oksida (NaOH). Peralatan yang diperlukan meliputi mikropate, mikropipet 10 µl dan 100 µl merk (Socores), *Incubation Water Bath* model Julabo F32, timbangan digital, *yellow tube*, tabung ukur, tissue dan ELISA reader (Immuno Mini NJ2300 Japan).

Bahan yang digunakan dalam pengukuran titer antibodi kuman *B. abortus* inaktif dengan metode *indirect* ELISA meliputi antigen *B. abortus* S-19 sel utuh, Buffer Carbonat Bicarbonat (Buffer Coating), PBS Tween – 20 (Buffer Washing), PBS Skim 4%, Aquadest, serum darah mencit yang mengandung kuman *B. abortus* inaktif sebagai AB I, Buffer inkubasi, AB II conjugated (Promega) product information, Anti Mouse IgG (Fc) AP Conjugate katalog # S 3731 size 100 µl, Substrat pNPP (Sigma Chemical Company N – 2640 pNPP 15 mg LOT : 060k – 8252) dan NaOH. Peralatan yang digunakan meliputi mikropate, mikropipet 10 µl dan 100 µl merk Socorex, *Incubation Water Bath* model Julabo F32, timbangan digital, *yellow tube*, tabung ukur, tissue dan ELISA reader Immuno Mini NJ2300 Japan.

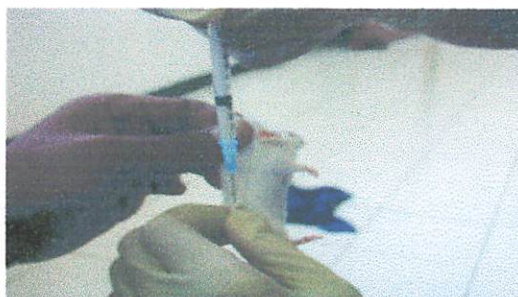
### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan, meliputi: imunisasi pada hewan coba, pengambilan darah sampel, pembiakan kuman *B. abortus* S-19, pembuatan antigen sel utuh kuman *B. abortus* S-19 dan pengukuran titer antibodi serum darah dengan menggunakan metode *indirect* ELISA.

#### 3.3.1 Imunisasi Pada Hewan Coba

30 ekor mencit *Balb/C* jantan umur 6 minggu dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama terdiri dari 15 ekor mencit diimunisasi dengan *B. abortus* S-19 aktif, sedangkan kelompok kedua terdiri dari 15 ekor mencit diimunisasi dengan *B. abortus* S-19 inaktif. Penyuntikan dilakukan secara subkutan, seperti terlihat pada gambar 2.1.

Imunisasi pertama dilakukan pada mencit umur 6 minggu dan dilakukan pengulangan dengan interval tiap dua minggu sekali dengan total pengulangan (*booster*) sebanyak tiga kali, *booster* pertama pada imunisasi inaktif ditambahkan dengan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan pada minggu berikutnya ditambahkan dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA). Hal ini bertujuan agar respon imun hewan coba dapat meningkat.



**Gambar 2.1. Imunisasi pada mencit secara subkutan**

### 3.3.2 Koleksi Sampel Serum Darah Mencit

Pengambilan darah (*bleeding*) untuk memperoleh serum yang mengandung antibodi *B. abortus* S-19 inaktif dan *B. abortus* S-19 aktif dilakukan pada minggu kedelapan. Pengambilan darah dilakukan melalui vena orbitalis, seperti terlihat pada gambar 2.2. Darah yang didapat ditampung dalam *micro cup* kemudian dilakukan sentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit ( $\pm$  30 menit setelah pengambilan) guna mendapatkan serum. Kemudian dilakukan pemindahan serum ke dalam tabung *Eppendorf* dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk dilakukan penelitian lebih lanjut.



**Gambar 2.2.** Teknik pengambilan darah pada mencit melalui *vena orbitalis*.

### 3.3.3 Pemiakan Kuman *B. abortus* S-19

Kuman *B. abortus* S-19 dibiakkan pada media *Potato Agar (PA)* dan media *Trypticase Soy Agar (TSA)*, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48-72 jam. Pada media tersebut perlu ditambahkan serum kuda 5% (Alton *et al.*, 1988).



### 3.3.4 Pembuatan Antigen Sel Utuh Kuman *B. abortus* S-19

Pembuatan antigen sel utuh kuman *B. abortus* S-19 didapatkan dengan cara biakan dari kuman *B. abortus* S-19 pada media *Trypticase Soy Agar (TSA)* ditambahkan dengan 0,5 % fenol dingin. Koloni dicampur, kemudian disaring dengan kain kasa steril rangkap empat dan tampung hasil saringan dalam tabung sentrifus, berikutnya suspensi disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan pellet diresuspendi kembali dengan menambahkan 0,5 % fenol dingin dan disentrifus kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah selesai dilakukan sentrifus kembali, supernatan dibuang dengan meninggalkan presipitatnya. Presipitat tersebut ditimbang untuk mengetahui berat keringnya kemudian pada presipitat tersebut ditambahkan dengan 2 ml *destilat water* dan dihitung kadar proteinnya dengan menggunakan spektrofotometer untuk menentukan dosis imunisasi dan pengenceran antigen pada uji *Indirect ELISA* (Spencer, 1995).

### 3.3.5 Pengukuran Titer Antibodi dengan metode *Indirect Enzym Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

- **Titer antibodi imunisasi *Brucella abortus* S-19 aktif :**

*B. abortus* S-19 sel utuh sebagai antigen dengan konsentrasi 10 µg/ml diencerkan dengan buffer coating. Isi tiap *well* dengan 100 µl dari pengenceran antigen diatas, kemudian inkubasikan ke dalam *incubation water bath* 37°C selama semalam. Cuci mikroplate dengan buffer washing 200 µl tiga kali. Blocking dengan PBS Skim 4% 100 µl dan inkubasi 37°C selama satu jam. Cuci

mikroplate dengan buffer washing 200  $\mu$ l tiga kali. Lakukan pengenceran 100x terhadap antibodi primer (AB I). Kemudian isi tiap *well* dengan 100  $\mu$ l dengan pengenceran tersebut diatas dan inkubasi 37<sup>0</sup>C selama satu jam. Isi tiap *well* dengan antibodi II conjugated @100  $\mu$ l, inkubasi 37<sup>0</sup>C selama 1 jam Cuci mikroplate dengan buffer washing 200  $\mu$ l tiga kali. Isi tiap *well* dengan 150  $\mu$ l dengan substrat pNPP dan inkubasi inkubasi 37<sup>0</sup>C selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan NaOH 1N 50  $\mu$ l, kemudian amati dengan ELISA reader  $\lambda$ 405 nm. Lebih jelasnya dapat dilihat pada lampiran 2.

- **Titer antibodi imonisasi *Brucella abortus* S-19 inaktif :**

*B. abortus* S-19 sel utuh sebagai antigen dengan konsentrasi 10  $\mu$ g/ml diencerkan dengan buffer coating. Tiap *well* pada mikroplet diisi dengan 100  $\mu$ l dari pengenceran antigen diatas, kemudian diinkubasikan kedalam *incubation water bath* 37<sup>0</sup>C selama semalam. Mikroplate dicuci dengan buffer washing 200  $\mu$ l tiga kali. *Blocking* dengan PBS Skim 4% 100  $\mu$ l dan inkubasi 37<sup>0</sup>C selama satu jam. Mikroplate dicuci dengan buffer washing 200  $\mu$ l tiga kali. Lakukan pengenceran 100x terhadap antibodi primer (AB I). Kemudian diisi tiap *well* dengan 100  $\mu$ l dengan pengenceran tersebut diatas dan inkubasi 37<sup>0</sup>C selama satu jam. Lalu isi tiap *well* dengan antibodi II conjugated @100  $\mu$ l, inkubasi 37<sup>0</sup>C selama 1 jam. Cuci mikroplate dengan buffer washing 200  $\mu$ l tiga kali. Tiap *well* diisi dengan 100  $\mu$ l dengan substrat pNPP dan inkubasi inkubasi 37<sup>0</sup>C selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan NaOH 1N 50  $\mu$ l, kemudian amati dengan ELISA reader  $\lambda$ 405 nm. Lebih jelasnya dapat dilihat pada lampiran 3.

### **3.4 Rancangan Penelitian dan Analisis Data**

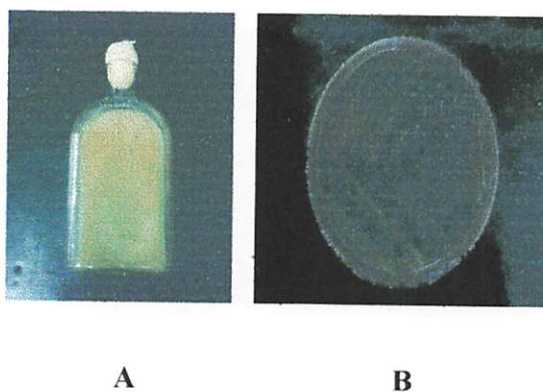
Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *The Post Test Only Control Group Design* (Zainuddin, 1993). Data yang diperoleh pada uji ELISA, ditabulasikan kemudian di analisis dengan uji t, menggunakan *Statistical Program and Service Solution (SPSS) rel 10,0 for Windows* (Santoso, 2000)

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

#### 4.1 Pemiakan Kuman *B. abortus* S-19

Pada penelitian ini kuman *B. abortus* S-19 dibiakkan pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA) dan media *Potato Agar* (PA). Biakan pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA) dengan metode *streak* menghasilkan koloni kuman yang tampak kecil dan halus dengan tepi rata, bulat dengan diameter 2-4 mm, jernih dan mengkilat dengan warna krem atau seperti warna madu. Pada media *Potato Agar* (PA) dengan metode tuang menghasilkan biakan yang difus dengan ketebalan merata yang tampak berwarna krem. Hasil identifikasi dengan pewarnaan Gram menunjukkan, bahwa kuman *B. abortus* S-19 terlihat berwarna merah dengan latar belakang putih dengan bentuk *coccobacilli*, berpasangan atau bergerombol. Hasil pemiakan kuman *B. abortus* S-19 dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil pemiakan kuman *Brucella abortus* S-19, pada media *Potato's Agar* (A) dan pada media *Trypticase Soy Agar* (B).

#### **4.2 Pembuatan Antigen Sel utuh (*whole cell*) Kuman *B. abortus* S-19**

Pembuatan antigen sel utuh kuman *B. abortus* S-19 didapatkan dengan cara biakan kuman *B. abortus* S-19 pada media *Trypticase Soy Agar (TSA)* yang sudah berumur 4 hari ditambah dengan 0,5 % fenol dingin. Koloni dicampur kemudian disaring dengan kain kasa steril rangkap empat, berikutnya suspensi disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan pellet diresuspensi kembali dengan menambahkan 0,5 % fenol dingin dan disentrifus kembali, supernatan dibuang dan ditambahkan dengan *destilat water*.

Supernatan tersebut kemudian diukur kadar proteinnya dengan alat spektrofotometer. Hasil pengukuran diperoleh kadar protein kuman *B. abortus* S-19 sebesar 7,77 g %.

#### **4.3. Pengukuran Titer Antibodi dengan Uji *Indirect* ELISA**

Setelah dilakukan pengambilan darah pada mencit baik sebagai kontrol maupun perlakuan kemudian dipisahkan dengan serumnya dengan menggunakan tehnik sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum tersebut digunakan sebagai antibodi yang diukur titernya dengan menggunakan uji *Indirect* ELISA, seperti terlihat pada Gambar 4.2.



**Gambar 4.2. Hasil Uji *Indirect* ELISA.**

Hasil uji *Indirect* ELISA tersebut diatas kemudian ditentukan nilai *Optical Density* (OD) nya dengan menggunakan *ELISA reader* yang secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 1. Setelah diperoleh nilai OD secara keseluruhan, kemudian ditentukan nilai OD positif yang nilainya diatas dua kali kontrol negatif tertinggi pada pengenceran tertinggi pada tiap perlakuan, sehingga diperoleh nilai OD seperti yang ditunjukkan pada tabel 4.1.

**Tabel 4.1. Nilai OD Pada Pemeriksaan Antibodi Mencit yang Diimunisasi *B. abortus* S-19 Inaktif dan Aktif dengan Uji *Indirect* ELISA**

Antibodi (Pengenceran 1 : 100)	
Inaktif	Aktif
0,389	0,048
0,337	0,076
0,352	0,092
0,392	0,226
0,415	0,514
0,429	0,046
0,318	0,106
0,312	0,063
0,346	0,084
0,333	0,189
0,475	0,171
0,279	0,110
0,138	0,048
0,285	0,050
0,319	0,420

Hasil tersebut kemudian dianalisis statistik menggunakan uji T. Dari hasil analisis diketahui terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ) antara antibodi *B. abortus* S-19 inaktif dengan *B. abortus* S-19 aktif. Perhitungan secara statistik dapat dilihat pada lampiran 2. Sedangkan rata-rata nilai OD dapat dilihat pada tabel 4.2.

**Tabel 4.2. Nilai rata-rata OD Hasil Pengujian Antibodi anti *B. abortus* S-19 Inaktif dan aktif pada *Indirect ELISA***

Perlakuan	Nilai OD ( $\bar{X} \pm SD$ )	Kisaran Titer	Kontrol negatif (pengenceran 1/100)
Inaktif	0,341 $\pm$ 0,079 <sup>a</sup>	20-5120	0,025, COV=0.050
Aktif	0,149 $\pm$ 0,141 <sup>b</sup>	0-640	0:039, COV=0.078

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ )

Dari hasil tersebut diatas tampak perbedaan rata-rata nilai OD antara inaktif dengan aktif. Rata-rata nilai OD dari inaktif tampak lebih tinggi dibandingkan dengan rata-rata nilai OD aktif.

## BAB V

### PEMBAHASAN

#### 5.1 Pemiakan Kuman *B. abortus* S-19

Salah satu strain atau galur yang dimiliki oleh *B. abortus* adalah strain 19 (S-19). Kuman *B. abortus* S-19 dapat diisolasi secara rutin dari air susu. Kuman tersebut bila disuntikkan pada sapi yang bunting masih dapat mengakibatkan keluron. Kuman S-19 merupakan biotipe I *B. abortus* yang memiliki kekhususan karena pertumbuhannya dapat dihambat oleh thionin blue (1:500.000), eritritol (1 mg/ml) dan penicillin 5 IU/ml dan untuk pertumbuhan *B. abortus* S-19 tidak memerlukan karbon dioksida (OIE, 2004). Kuman S-19 dapat menyebar dari satu hewan ke hewan yang lain. Pada sapi pejantan kuman *B. abortus* S-19 dapat menurunkan fertilitas, menyebabkan orchitis dan epididimitis.

Pada penelitian yang telah dilakukan, kuman *B. abortus* S-19 didapat dengan cara membiakkannya pada media *Trypticase Soy Agar (TSA)* dan media *Potato Agar (PA)*. Hasil biakan pada media TSA dengan metode *streak* dapat menghasilkan koloni kuman yang tampak kecil dan halus dengan tepi yang merata berbentuk bulat dengan diameter antara 2-4 mm. Koloni kuman terlihat sangat jernih dan mengkilat serta berwarna krem atau seperti warna madu. Sedangkan pada media PA dengan metode tuang didapatkan koloni kuman yang difus dan mempunyai ketebalan yang merata. Seperti halnya biakan pada media TSA koloni kuman *B. abortus* S-19 mempunyai warna koloni yang sama yaitu berwarna krem atau seperti madu.



## 5.2 Pembuatan Antigen Sel utuh (*whole cell*) Kuman *B. abortus* S-19

Antigen sel utuh kuman *B. abortus* S-19 diperoleh dari biakan kuman *B. abortus* S-19 pada plate yang telah berumur 4 hari dalam media *Trypticase Soy Agar (TSA)* dan ditambahkan 0,5 % fenol dingin. Hal ini bertujuan untuk memisahkan koloni kuman yang tumbuh dari medianya sehingga kuman dan media tidak tercampur. Setelah koloni tersebut terpisah dari media, selanjutnya disaring dengan kain kasa steril rangkap empat, kemudian dilakukan sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, supernatan yang ada dibuang dan presipitat diresuspensi kembali dengan 0,5 % fenol dingin, kemudian disentrifus kembali sampai supernatan kelihatan bening dan supernatan dibuang.

Presipitat yang tertinggal ditambahkan dengan 2 ml *destilat water* dan langkah selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar protein dengan menggunakan alat spektrofotometer (Spencer, 1995). Dari hasil pemeriksaan didapatkan kadar protein dari kuman *B. abortus* S-19 sebesar 7.77 g %. Angka tersebut digunakan sebagai dasar penentuan dosis imunisasi pada mencit dan pengenceran antigen pada uji *Indirect ELISA* pada tahap *coating* antigen.

## 5.3 Pengukuran Titer Antibodi Pada Uji *Indirect ELISA*

Serum diperoleh dengan cara sampel darah mencit didiamkan 30-60 menit kemudian dilakukan senrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Berbagai bahan larut tanpa sel yang merupakan molekul dari antibodi dapat terkandung dalam serum. Untuk mengukur titer antibodi tersebut dapat dilakukan dengan uji *Indirect ELISA*. Alasan dipilihnya uji ini selain bahan yang digunakan

telah banyak dipasarkan dan tidak memerlukan keahlian khusus untuk proses konjugasi, juga hasil dari uji ini dapat lebih spesifik jika dibandingkan dengan metode *direct* ELISA, meskipun di satu pihak uji *Indirect* ELISA memerlukan biaya yang sedikit lebih besar (Rantam, 2003).

Dari hasil uji *Indirect* ELISA yang telah dilakukan diperoleh nilai *Optical Density* (OD) (tabel 4.1) terlihat bahwa nilai OD dari *B. abortus* S-19 inaktif lebih tinggi daripada nilai dari *B. abortus* S-19 aktif. Sehingga terdapat perbedaan yang sangat nyata antara *B. abortus* S-19 inaktif dengan *B. abortus* S-19 aktif. Hal tersebut menunjukkan bahwa respon imun yang ditimbulkan dari imunisasi *B. abortus* S-19 inaktif memberikan respon yang lebih tinggi. Tingginya nilai OD ini disebabkan imunisasi *B. abortus* S-19 inaktif dilakukan dengan penambahan *adjuvant*, yaitu *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA). *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) merupakan emulsi air dalam minyak yang mempunyai efek kuat karena mengandung *Mycobacterium tuberculosis* (Tizzard, 1988). Adanya *Mycobacterium tuberculosis* dapat menghasilkan puncak respon imun sekunder 10 kali lebih tinggi daripada respon imun primer. *Adjuvant* ini berfungsi untuk meningkatkan kekebalan seluler dan humoral, dengan mengaktifasi sel  $T_{\text{helper}}$  untuk merangsang sel B dalam menghasilkan antibodi.

Proses terbentuknya antibodi merupakan bagian respon imun dari mencit dalam menanggapi antigen yang diimunisasikan, dalam hal ini antigen yang dimaksud adalah *B. abortus* S-19. Adapun proses tersebut diawali dengan penangkapan antigen oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) yang merupakan bagian

dari makrofag, untuk dipresentasikan kepada sel limfosit dalam bentuk yang dikenalnya (Baratawidjaja, 2000). Adapun pada uji *Indirect* ELISA tersebut konjugat yang digunakan adalah konjugat *anti mouse* yang telah dilabel dengan enzim *alkalin fosfatase*. Untuk pemilihan enzim tentu saja berdasarkan atas homogen, murah, spesifik dan stabil (Rantam, 2003).

Titer antibodi yang dinyatakan dalam nilai *Optical Density* (OD) pada pembacaan dengan menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm dan dianalisis statistik dengan menggunakan uji t menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata antara mencit yang diimunisasi *B. abortus* S-19 inaktif ditambahkan CFA dan IFA dengan *B. abortus* S-19 aktif. Menurut Abbas *et al* (2000) sifat imunogenitas protein sangat berkaitan dengan tingkat keasingan protein terhadap hospes, kelarutan, berat molekul dan konsentrasi protein. Maka dari itu tanggapan kebal atau respon imun terhadap antigen juga sangat tergantung pada hal-hal tersebut diatas.

Faktor lain yang mempengaruhi titer antibodi yang diperoleh diantaranya adalah kualitas antigen yang digunakan, rute aplikasi, dosis protein, jumlah dan interval imunisasi (Kusnoto, 2003). Pada penelitian ini aplikasi imunisasi yang dilakukan secara *subcutan* dengan harapan melalui cara tersebut depo protein dapat dilepas secara bertahap (*gradual*). Dosis penyuntikan 0,15 ml/ekor, kemudian dilakukan *booster* dengan interval dua minggu sebanyak tiga kali sehingga diharapkan respon imun mencit dalam membentuk antibodi terhadap *B. abortus* S-19 inaktif maupun *B. abortus* S-19 aktif dapat maksimal dan kadarnya tetap terjaga dalam darah.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa imunisasi *Brucella abortus* S-19 inaktif dengan menggunakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan diimunisasi ulang (*booster*) dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) memberikan respon antibodi yang lebih tinggi dibandingkan dengan imunisasi *Brucella abortus* S-19 aktif.

#### 6.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan dari penelitian ini adalah diharapkan agar para praktisi dan pihak yang berwenang menggunakan vaksin *B. abortus* S-19 inaktif dalam usaha pencegahan, pemberantasan dan pengendalian *Brucellosis*.

## RINGKASAN

**M. Ilham Akbar Husni.** Perbedaan titer antibodi *Brucella abortus* S-19 inaktif dan *Brucella abortus* S-19 aktif pada mencit (*Mus musculus*) dengan *Indirect* ELISA (dibawah bimbingan Bapak Mas'ud Hariadi, M. Phil., Ph.D., drh. sebagai pembimbing pertama dan Ibu Wiwiek Tyasningsih, M. Kes., drh. sebagai pembimbing kedua).

*Brucellosis* pada sapi merupakan suatu penyakit menular dan bersifat zoonosis yang disebabkan oleh kuman *Brucella abortus*. Penyakit ini sangat merugikan para peternak karena dapat menyebabkan abortus, produksi susu menurun serta kemajiran yang bersifat temporer maupun permanen. Berbagai upaya telah dilakukan untuk mencegah penyebaran penyakit ini, salah satunya adalah melalui program vaksinasi. Vaksin yang sering digunakan adalah vaksin *Brucella abortus* S-19, yang merupakan vaksin aktif. Penegakkan diagnosis *Brucellosis* memerlukan uji dengan sensitifitas yang tinggi seperti uji ELISA.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa imunisasi *Brucella abortus* S-19 inaktif dengan menggunakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan di imunisasi ulang (*booster*) dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) memberikan respon antibodi yang lebih tinggi dibandingkan dengan imunisasi *Brucella abortus* S-19 aktif.

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Balb/C*) umur 6 minggu sebanyak 30 ekor, menggunakan desain percobaan *The Post-Test Only Group Design*. 15 ekor mencit diimunisasi *Brucella abortus* S-19 inaktif dengan dosis  $7-20 \times 10^9$  sel utuh dalam 0,15 ml yang dilarutkan dalam

*Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan diimunisasi ulang (*booster*) dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA). 15 ekor mencit berikutnya diimunisasi dengan *Brucella abortus* S-19 aktif dengan dosis yang sama dan diimunisasi ulang (*booster*) tanpa penambahan *adjuvant*. *Booster* dilakukan setiap interval dua minggu sebanyak tiga kali dengan dosis yang sama. Dua minggu setelah *booster* terakhir dilakukan pengambilan darah untuk diuji *Indirect* ELISA. Hasil uji ELISA berupa angka-angka yang menerangkan titer antibodi yang dinyatakan dengan nilai *Optical Density* (OD). Data yang diperoleh ditabulasikan dan dianalisis dengan uji t menggunakan *Statistical Program Service Solution* (SPSS) for Windows rel 10.0.

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata nilai OD antibodi *B. abortus* S-19 inaktif adalah  $0,341 \pm 0,079$  sedangkan antibodi *B. abortus* S-19 aktif adalah  $0,149 \pm 0,141$ . Analisis yang dilakukan terhadap hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antara antibodi *B. abortus* S-19 inaktif dengan *B. abortus* S-19 aktif. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa mencit yang diimunisasi *Brucella abortus* S-19 inaktif dengan menggunakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan diimunisasi ulang (*booster*) dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) memberikan respon antibodi yang lebih tinggi dibandingkan dengan imunisasi *Brucella abortus* S-19 aktif.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abbas, A. K., Lichtman, A H., and Pober, J. S. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*. 4<sup>th</sup> ed. Saunders Company. Philadelphia.
- Alton, G. G., L. M. Jones, R. D. Angus and J. M. Verger. 1988. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. INRI, Paris, Franch.
- Anonimus. 1991. *Annual Report 1990/1991*. Research Institute for Veterinary Science Agency for Agricultural Research and Development. Bogor. Hal. 28.
- Anonimus. 1996. *Buku Panduan Pelaksanaan dan Pengendalian Brucellosis di Indonesia*. Direktorat Bina Kesehatan Hewan I Dirjen Peternakan. Jakarta.
- Artama, W.T. 1995. *Antibodi Monoklonal, Teori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan* Ed. 1. PAU-Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Hal.8-9 dan 28-31.
- Baratawidjaja, K.G. 2002. *Imunologi Dasar*. Edisi Kelima. Balai penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal. 13,29,33 dan 336.
- Burgess G. W. 1995. *Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian*. Cetakan Pertama. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Comerci D. J., Pollevick G. D., Vigliocco A. M., Frasch A. C., and Ugalde R. 1998. *Vector Development for the Expression of Foreign Proteins in the Vaccine Strain Brucella abortus S-19*. Universidad Nacional de General San Martin. Buenos Aires. Argentina.
- Dwidjoseputro D. 1995. *Dasar Dasar Mikrobiologi*. Penerbit Djambatan. Hal. 69. 103. 118-120.
- Ernawati ,R., Soelistyanto., Rahardjo ,A. P., Sianita ,N., Rantam, F. A., Rahmahani, Y., Suwarno. 2002. *Virologi Veteriner*. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya 51-55.
- Ewalt D. R and Bicker B. J. 2000. *Validation of the Abbreviated Brucella Amos PCR as a Rapid Screening Method for Differentiation of Brucella abortus Field Strain Isolates and the Vaccine Strain, 19 and RB51*. U. S Department of Agriculture. Ames. Iowa. .

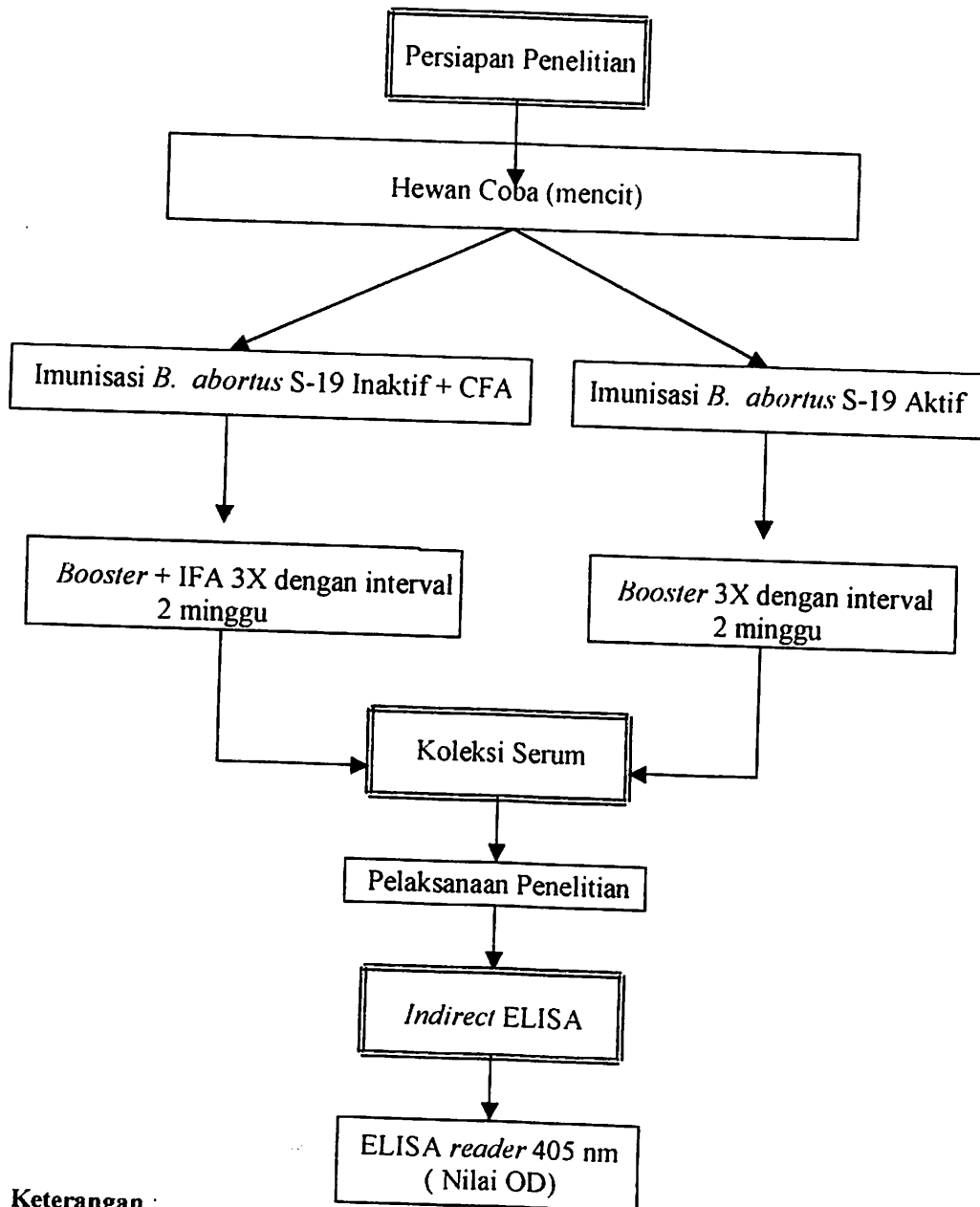
- Goers, J. 1993. *Immunochemical Techniques Laboratory Manual*. Academic Press. Harcourt Brace Javanovich, Publisher. California.
- Hardjopranto, S. 1995. *Ilmu Kemajiran pada Ternak*. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya. 51, 77, 124 dan 173.
- Jawetz, E., Joseph L. Melnick and Edward Adelberg's. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran Ed. 2*. Penerbit Salemba Medika. Jakarta. Hal.403-405.
- Jenning, A. R. 1979. *Animal Pathology*. 1<sup>st</sup> Ed. Bailliere Tindall and Cassell. London.
- Kusnoto. 2003. *Isolasi dan Karakterisasi Protein Imunologi Larva Stadium II Toxocara cati Isolat Lokal*. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Levy, R. and Z. Ronen. 1993. *Imunization of Chicken With and Inactivated Oil Adjuvant Newcastle Disease Virus Vaccine*. *Avian Diseases*. 17..598-604.
- Merchant, I. A. and R. A. Packer. 1971. *Veterinary Bacteriology and Virology*. 7<sup>th</sup> Ed 3<sup>rd</sup> printing. The Iowa State University Press, Ames, Iowa. USA.
- OIE. 2002. *Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines 2000*. OIE. Bovine Brucellosis.
- OIE. 2004. *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE. Refferences Laboratories for Bovine Brucellosis.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Imunologi*. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 3-8, 13, 43, 63, 79-80, 82, 105 dan 161.
- Santoso, S. 2000. *SPSS Statistik Parametrik*. PT. Elex Media Komputindo. Kelompok Gramedia-Jakarta. Hal. 23
- Smith, J.R. 1995. *Produksi Serum Hiperimun*. Dalam: *Tcknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian* (Burgess, G.W. ed.). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 20, 23-24 dan 28-30.
- Soehadji. 1993. *Prospek Pembangunan Sub Sektor Peternakan Dalam Meningkatkan kesejahteraan Masyarakat Pada Pembangunan Nasional Jangka Panjang Tahap II*. Prosiding Pada Pekan Temu Ilmiah dan Olahraga Ikatan Senat Mahasiswa Kedokteran Hewan se-Indonesia Di Yogyakarta. 11-12.



- Spencer, T. L. 1995. Penyiapan Antigen Bakteri Untuk ELISA. Dalam: Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian ( Burgess, G.W. ed.). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 405 – 420.
- Subronto. 1995. Ilmu Penyakit Ternak I. Edisi Ketiga. Gadjah Mada University Press. 464-484.
- Suwarno, Ernawati, R., Rahardjo, A. P., Sianita, N., Rahmahani, J dan Rantam F. A. 2003. Prinsip Dasar, Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji ELISA. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hal. 1-10, 13-15
- Tizard, I. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 46, 117-178.
- USDA. 2001. Veterinary Service National Animal Health Program. United States Departement of Agriculture. USA.
- Zainuddin, M. 1993. Metode Penelitian. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya. Hal. 47

## Lampiran 1.

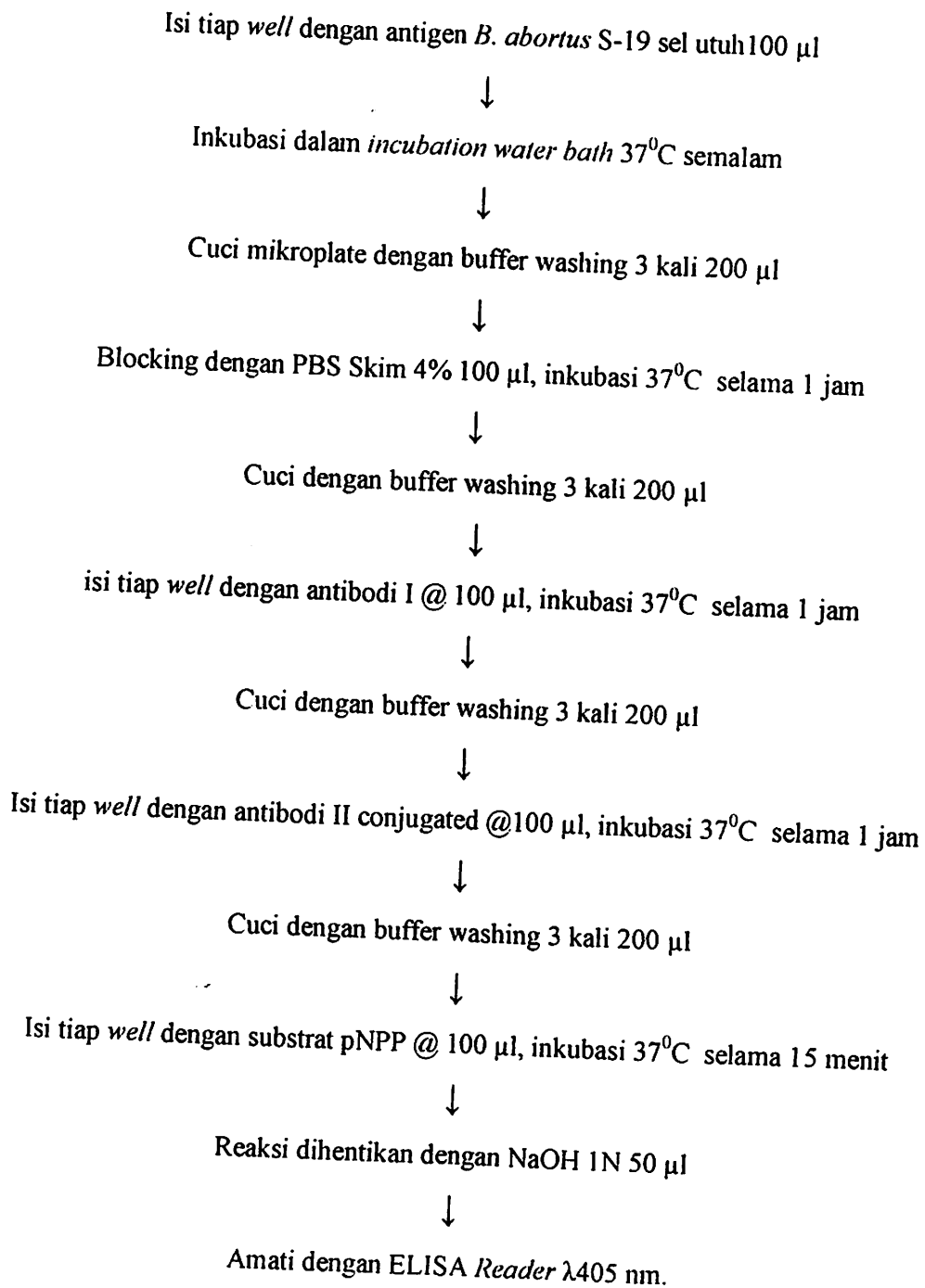
## Kerangka Operasional Penelitian

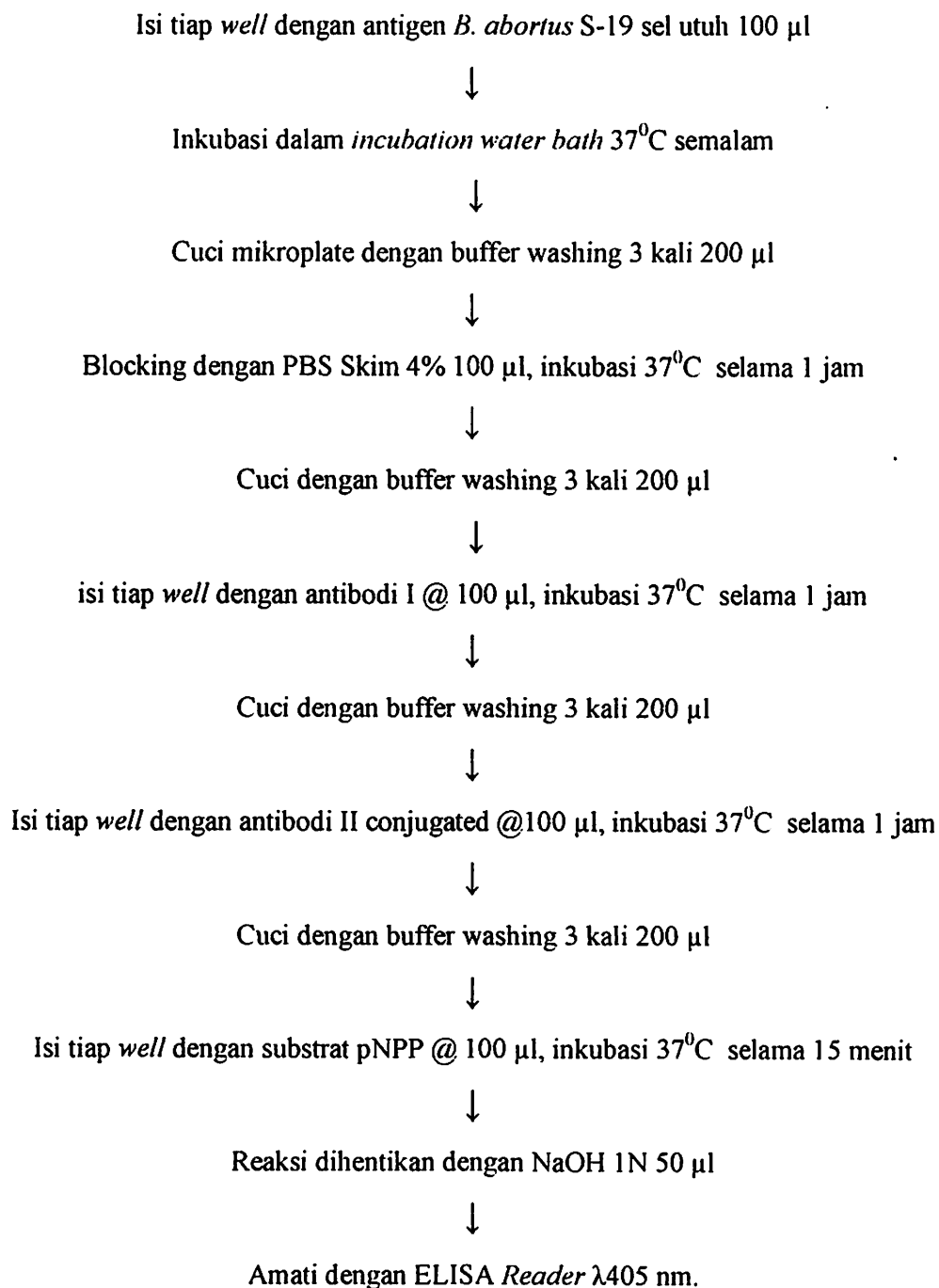


**Keterangan :**

CFA : *Complete Freund's Adjuvant*

IFA : *Incomplete Freund's Adjuvant*

**Lampiran 2.****Prosedur pelaksanaan metode *indirect* ELISA Untuk Pengukuran Titer Antibodi Kuman *B. abortus* S-19 Aktif.**

**Lampiran 3.****Prosedur pelaksanaan metode *indirect* ELISA Untuk Pengukuran Titer Antibodi *B. abortus* S-19 Inaktif.**

**Lampiran 4. Data lengkap nilai OD Antibodi Mencit pada *Indirect* ELISA**

Case Summaries <sup>a</sup>

			OD (v)	Transformasi Vv	Titer (v <sup>2</sup> )	Transformasi log(v <sup>2</sup> +1)
Antigen	Inaktif	1	.389	.624	2560	3.408
		2	.337	.581	1280	3.108
		3	.352	.593	2560	3.408
		4	.392	.626	2560	3.408
		5	.415	.644	2560	3.408
		6	.429	.655	2560	3.408
		7	.318	.564	640	2.807
		8	.312	.559	640	2.807
		9	.346	.588	1280	3.108
		10	.333	.577	1280	3.108
		11	.475	.689	5120	3.709
		12	.279	.528	640	2.807
		13	.138	.371	20	1.322
		14	.285	.534	640	2.807
		15	.319	.565	640	2.807
	Total	N	15	15	15	15
		Sum	5.119	8.698	24980	45.431
		Mean	.34127	.57987	1665.33	3.02870
		SD	.078535	.073289	1318.711	.558121
	Aktif	1	.048	.219	0	.000
		2	.076	.276	0	.000
		3	.092	.303	0	.000
		4	.226	.475	160	2.207
		5	.514	.717	640	2.807
		6	.046	.214	0	.000
		7	.106	.326	20	1.322
		8	.063	.251	0	.000
		9	.084	.290	0	.000
		10	.189	.435	80	1.908
		11	.171	.414	40	1.613
		12	.110	.332	20	1.322
		13	.048	.219	0	.000
		14	.050	.224	0	.000
		15	.420	.648	320	2.507
	Total	N	15	15	15	15
		Sum	2.243	5.342	1280	13.686
		Mean	.14953	.35613	85.33	.91239
		SD	.141183	.155963	176.711	1.078494
Total	N		30	30	30	30
		Sum	7.362	14.040	26260	59.116
		Mean	.24540	.46800	875.33	1.97055
		SD	.148686	.165174	1224.831	1.367553

a. Limited to first 100 cases.

**Lampiran 5. Analisis Statistik Uji t Nilai OD****Group Statistics**

Antigen	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
OD (y) Inaktif	15	.34127	.078535	.020278
Aktif	15	.14953	.141183	.036453

**Independent Samples Test**

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
OD (y) Equal variances assumed	3.046	.092	4.596	28	.000	.19173	.041714
Equal variances not assumed			4.596	21.907	.000	.19173	.041714