PENGGUNAAN INDIRECT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (IND-ELISA) DALAM MEMANTAU TINGKAT INFEKSI *Pseudomonas pseudomallei* SUBKLINIK PADA PETERNAKAN BABI[1)]

THE USE OF INDIRECT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (IND-ELISA) FOR MONITORING OF SUBCLINICAL INFECTION OF *Pesudomonas pseudomallei* IN THE PIGGERIES

G. R. MOEKTI[2)] dan R. G. HIRST[3)]

ABSTRAK

Berdasarkan hasil dua metode diagnosis yakni pemeriksaan kesehatan daging di rumah potong hewan (RPH) dan pembiakan kuman di laboratorium, babi-babi yang terdapat di tiga perusahaan peternakan di Ayrs, Queensland Utara, Australia, dinyatakan terinfeksi secara subklinik oleh kuman *Pseudomonas pseudomallei*. Oleh karena penyakit tersebut dianggap dapat menular kepada manusia, maka beberapa tindakan pengamanan telah dilakukan di antaranya: (1) pelarangan mengkonsumsi daging atau bahan pangan asal babi dari peternakan tertular, (2) pengisolasian dan pembatasan kontak peternakan tertular dengan wilayah sekitar, serta (3) pemantauan tingkat infeksi secara serologik dengan menggunakan *indirect enzyme-linked immunosorbent assay* (IND-ELISA) terhadap hewan-hewan rentan termasuk kambing yang terdapat di wilayah sekitar. Selama kurang lebih satu tahun, semua sampel serum yang akan diuji diambil setiap 16 minggu dan dilakukan secara simultan dengan pemeriksaan kesehatan secara patologi anatomik (pa) pada babi-babi yang dikirim oleh peternakan tertular ke RPH. Hasil pemeriksaan serologik menunjukkan hubungan yang nyata ($p<0,05$) antara kelainan patologi anatomik (abses) dan seroreaktivitas terhadap antigen P. *pseudomallei*. Selanjutnya juga diketahui bahwa kejadian infeksi melioidosis hanya terbatas pada hewan-hewan *yang* terdapat di ketiga peternakan yang dilaporkan tertular; sedangkan tak satupun sampel serum baik dari peternakan babi ataupun kambing yang terdapat di daerah sekitar yang terditeksi sebagai seropositif. Hal yang

[1)] Makalah disampaikan pada Kongres Nasional VI Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia, Surabaya 2 - 4 Desember 1993.

[2)] Balai Penelitian Veteriner, Bogor.

[3)] Department of Biomedical and Tropical Veterinary *Science*, James *Cook* University of North Queensland, Townsville Australia.

menarik dan patut dicatat dari hasil penelitian ini yakni tingkat prevalensi dari infeksi melioidosis pada musim penghujan di ketiga peternakan tertular cenderung lebih tinggi ($p<0,01$) bila dibandingkan dengan yang terdeteksi pada musim kering.

Kata-kata kunci: *Pseudomonas pseudomallei*, IND-ELISA, melioidosis

ABSTRACT

Based on both routine abattoir inspection methods for pig carcasses and bacterial culture three piggeries in Ayrs, northern Queensland Australia, were declared as being subclinically infected with *Pseudomonas pseudomallei*, and on the ground of public health the animal carcasses derived from the respective farms were condemned for human consumption. In attempts to safeguard surrounding areas from contamination, the affected farms were isolated and the infection rates either in pigs among the affected piggeries or in any susceptible animals existing in the areas, such as goats, were regularly monitored by employing an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (IND-ELISA). Over a period of one year, tested serum samples were collected at an interval of 16 weeks simultaneously with abattoir ispections on slaughtered animals supplied by the respective piggeries. On the basis of seroreactivity determined by the IND-ELISA, gross pathological changes depicted by abscesses were found to be strongly associated ($p<0.05$) with serological evidence. It was also showed that cases of the disease appear to be localized in the three piggeries with previous history of the subclinical infections. However, neither goat herds nor pig farms with no history of subclinical melioidosis in the areas were detected to be seropositive. Furthermore it was noted that a number of seroreactors in the affected farms indicated during monsoon appeared to be significantly higher ($p<0.01$) than that detected during dry season.

Key words: *Pseudomonas pseudomallei*, IND-ELISA, melioidosis

PENDAHULUAN

Melioidosis atau dikenal juga sebagai "glanders-like disease" merupakan penyakit infeksius yang disebabkan oleh *Pseudomonas pseudomallei*. Organisme penyebab tersebut adalah kuman berbentuk batang, Gram-negatif, motil, tidak berspora dan memiliki bentuk yang berkesan bipolar jika diwarnai secara Gram. Penyakit melioidosis dapat terjadi pada babi, domba, kambing, sapi, kuda dan bahkan pada manusia (zoonosis). Sampai saat ini, melioidosis dianggap sebagai penyakit yang umumnya berjangkit baik secara endemik maupun sporadik di daerah tropika dan subtropika seperti halnya di wilayah utara benua Australia (Queensland utara).

Kejadian penyakit melioidosis pada babi di Queesland utara pertama kali dilaporkan oleh Olds dan Lewis pada tahun 1955. Hal tersebut terjadi pa& seekor babi di sebuah peternakan yang sekitar lima minggu sebelumnya diberi pakan asal daging kambing (swill feeding) yang diduga tertular infeksi P. pseudomallei. Meskipun demikian penularan penyakit tersebut terbukti tidak bertalian dengan tindakan swill feeding tadi yang pernah dilakukan lima minggu sebelum kejadian penyakit teramati. Oleh karena itu, penularan penyakit pada kasus tersebut diduga melalui mekanisme lain, seperti kontak antara hewan rentan dengan tanah tercemar kuman dan/atau dengan air yang terkontaminasi. Lebih lanjut dugaan-dugaan demikian dapat dibuktikan dengan temuan-temuan men—— transmisi infeksi melioidosis pada babi-babi yang diternakkan secara ekstensif terjadi melalui tanah yang tercemar kuman P. *pseudomallei* (Thomas, 1981); sedangkan pada hewan yang dipelihara secara intensif, melioidosis umumnya terjadi akibat kontaminasi kuman pada suplai air minum (Thomas et *al*., 1981).

Pemeriksaan terhadap infeksi P. pseudomallei pada hewan dapat didasarkan pada kelainan pasca mati, pengisolasian kuman dan pemeriksaan antibodi di dalam serum. Uji serologik yang pernah dicoba antara lain serum aglutinasi (Lewis and Olds, 1952; Olds and Lewis, 1954), *fluorecent antibody* staining technique (FAT) (Ashdown, 1981), uji fiksasi komplemen (Nigg and Johnson, 1961; Thomas *et al*., 1988) dan hemaglutinasi tak langsung (Thomas et al., 1988); sedangkan pemeriksaan antibodi pada manusia metode enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) telah dikembangkan (Ashdown et *al*., 1980; Ashdown, 1982). Metode uji ELISA pada pemeriksaan melioidosis pada manusia selanjutnya disarankan dapat menjadi alternatif uji hemaglutinasi tak langsung. Selain itu metode ELISA belakangan ini dianggap sebagai piranti seroepidemiologik yang cukup layak dan sangat bermanfaat, terutama dalam mengetahui keadaan infeksi pada tingkat subklinik di dalam anggota populasi yang cukup besar jumlahnya. Untuk itu, pada penelitian kali ini metode pengujian secara indirect-ELISA (IND-ELISA) digunakan sebagai piranti analisis serologik pada hewan, khususnya babi dan kambing, yang sejauh pengetahuan kami penggunaan metode tersebut belum pernah dilaporkan sebelumnya.

MATERIAL DAN METODA

Kuman *Pseudomonas pseudomallei* dan *Pseudomonas aeruginosa*

Beberapa galur *P. pseudomallei* asal isolat manusia (AN) telah didapat dari Dr. L. Ashdown (Townsville General Hospital, Queensland, Australia); sedangkan masing-masing asal isolat tanah (C2), domba (J53), kambing (X1003) dan babi (1328) diperoleh dari Dr. A. Thomas ("Oonoonba" Veterinary Laboratory, the Queensland Department of Primary Industry, Townsville, Australia). Kuman P. *aeruginosa* yang selanjutnya digunakan sebagai bahan penyiapan antigen kontrol juga didapat dari Dr. A. Thomas.

Preparasi Antigen

Metode pembuatan antigen ELISA pada percobaan kali ini mengikuti prosedur yang digunakan oleh Ashdown (1982). Semua galur kuman dibiakkan di atas medium agar *brain-heart infusion* (BHI) (Difco Laboratories, USA) dengan cara mencurahkan pupukan primer (starter) hasil pengeraman selama empat jam di dalam medium cair BHI. Medium agar BHI yang terinokulasi kemudian dieramkan pada temperatur 37°C sampai didapat biakan kuman yang konfluen. Setelah itu biakan tersebut dipanen dan disuspensikan di dalam air suling steril sebanyak lima ml per cawan petri medium agar BHI. Suspensi kuman dapatan disimpan di dalam penangas air bertemperatur 70°C selama satu jam. Selanjutnya kuman dipecahkan dengan sonikasi selama 10 menit dan pecahan sel kuman hasil perlakukan tersebut dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 10000 *xg* selama 30 menit. Supernatan dapatan diambil dan disaring secara bertahap pada filter (Sartorius GambH, Germany) yang berukuran masing-masing 0,45 dan 0,2 µm. Kandungan protein terlarut di dalam filtrat dapatan diukur dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951), kemudian didistribusikan secara aseptik ke dalam vial sekitar dua ml per alikuot, dan disimpan di dalam lemari pembeku pada suhu -20°C sampai dengan saat digunakan sebagai antigen ELISA.

Serum Kebal dan Serum Normal

Untuk kontrol positif serum kebal telah didapat baik dari babi yang diimunisasi dengan antigen kuman mati galur babi (1328), maupun dari kambing yang diinokulasi dengan antigen kuman mati galur kambing (X1003). Sedangkan untuk kontrol negatif serum normal telah diperoleh dari masing-masing babi dan kambing yang terbukti tidak menimbulkan aglutinasi ketika direaksikan dengan antigen homolog.

Serum Sampel

Serum sampel dikumpulkan dari lima peternakan babi dan satu peternakan kambing perah, dengan rincian sebagai berikut: tiga peternakan babi yang dinyatakan tertular melioidosis setelah ditemukan kelainan pasca mati berupa abses yang menyeluruh terutama pada limpa (Gambar 1) dan kelenjar limfe bronkhial pada pemeriksaan kesehatan daging di RPH, serta pengisolasian kuman P. *pseudomallei* dari sediaan yang diambil dari sekitar abses; dua peternakan babi lainya dan satu peternakan kambing perah yang terdapat di sekitar wilayah tertular dengan radius lebih kurang 10 km. Tata cara pengambilan sampel darah di peternakan mengacu pada metode sampling yang disarankan oleh Cannon dan Roe (1986) mengenai tatacara penarikan "penduga populasi" dari kelompok ternak yang terkena penyakit menular. Metode tersebut merupakan pedoman dalam menetapkan banyaknya sampel penduga yang harus diambil sehingga memberikan keyakinan paling tidak satu diantaranya positif jika asumsi tingkat prevalensi penyakit serendah-rendahnya 5% pada selang kepercayaan 90%. Pengambilan darah dimulai pada musim penghujan dengan interval 16 minggu dalam tempo sekitar satu tahun. Pemeriksaan serologik dengan IND-ELISA juga dilaksanakan sebagai tindakan praobservasi terhadap kelainan karkas di RPH dan hasil pengisolasian kuman dari jaringan limfoid hewan yang dipotong. Untuk itu pengambilan darah di RPH dilakukan pada 36 babi yang dikirim oleh tiga peternakan tertular. Tanda-tanda kelainan patologi anatomik (pa), terutama abses pada limpa dan kelenjar limfe bronkhial, dari semua karkas tersebut dicatat sebagai data yang berpadanan dengan menganalisis hubungan antara kelainan PA dan tingkat seroreaktivitas terhadap antigen kuman P. *pseudomallei* secara uji IND-ELISA.

Optimasi Reagen dan Diluen

Standardisasi metode ELISA yang digunakan dilakukan melalui titrasi *checkerboard* konvensional terhadap masing-masing pereaksi yakni antigen ELISA, serum reaktor dan nonreaktor, konjugat serta diluen serum dan konjugat yang berupa larutan bufer *Tris-(Hydroxymethyl) aminomethane- EDTA-NaCl* (TEN) pH 9,6 mengandung *solid-phase blocker* kasein 0,02% (w/v) dan diterjen Tween 20 0,05% (v/v) (TEN-TC). Blocker tersebut digunakan sebagai komponen pencegah reaksi nonspesifik antara konjugat dengan *solid-phase matrix* (cawan ELISA mikrotiter dari bahan *polyvinylchloride* (PVC)).

Penggunaan Indirect Enzyme-linked immunosorbent assay (IND-ELISA) pada Pemeriksaan Serum Sampel

Sebanyak 5μg per ml antigen di dalam buffer karbonat-bikarbonat pH 9,6 dilekatkan pada masing-masing lubang cawan ELISA mikrotiter dengan dasar lubang berbentuk U melalui pengeraman semalam pada suhu 4°C. Setelah itu cawan ELISA dicuci tiga kali dengan *phosphate buffered saline* (PBS) mengandung Tween-20 0,05% (PBS-T). Sebanyak 50 µl larutan serum sampel 1:100 di dalam diluen TEN-T mengandung kasein 0,02% (TEN-TC) dimasukkan ke dalam masing-masing lubang cawan ELISA tadi; kemudian dieramkan pada suhu kamar selama satu jam. Selanjutnya pencucian dengan menggunakan PBS-T serupa di atas kembali dilakukan. Dua jenis konjugat masing-masing anti IgG babi untuk pengujian sampel asal babi dan anti IgG kambing untuk yang asal kambing telah digunakan. Kedua konjugat tersebut dirunut dengan enzim *horse radish peroxidase, HRP* (Bio Rad Laboratories USA), dan dilarutkan di dalam diluen TEN-TC. Kemudian sebanyak 50 µl ditambahkan ke dalam masing-masing lubang lempeng ELISA, dan dieramkan pada suhu kamar selama satu jam. Selanjutnya, cawan ELISA dicuci seperti perlakuan serupa di atas. Sebanyak 100 µl larutan substrat 0,1 M bufer sitrat-fosfat pH 4,2 mengandung 1,04 mM ABTS (Boehringer Mannheim GambH, Germany) ditambahkan ke dabm masing-masing lubang cawan ELISA dan dieramkan pada suhu kamar selama satu jam. Densitas optikal (OD) dari perubahan warna diukur dengan *ELISA-plate reader* Titertek Multiskan MCC (Flow Laboratories, Finland) pada panjang gelombang ganda 414 nm dan 492 nm. Pada setiap cawan ELISA selalu diikutsertakan kontrol serum reaktor dan nonreaktor, kontrol antigen negatif asal kuman P. *aeruginosa*, serta kontrol konjugat. Sedangkan untuk menentukan batas reaktivitas sampel yang diuji *cutoff point* yang diturunkan dari nilai rataan OD serum normal (kontrol nonreaktor) ditambah tiga kali standar deviasi (Cousins dan Robertson, 1986) digunakan pada penelitian ini.

Analisis Statistik

Perbedaan tingkat infeksi di antara peternakan tertular dan tak tertular serta antara musim kering dan penghujan diuji dengan metode *analysis of variance* (ANOVA) dua arah. Oleh karena data yang digunakan dalam analisis tersebut terdiri dari bilangan presentase (prevalensi) yang juga beranggotakan nilai nol, maka transformasi logaritma log $(y+1)$ telah dilakukan sebagai upaya normalisasi (Steel and Torrie, 1987). Selanjutnya uji X^2 digunakan untuk menganalisis hubungan antara kelainan PA (abses) dengan tingkat seroreaktivitas. Semua analisis statistik tersebut di atas dilakukan dengan menggunakan paket program STATISTIX versi 3.1 (Analytical Software, Minnesota, USA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hubungan Abses dengan Seroreaktivitas

Penelitian ini menunjukkan bahwa metode IND-ELISA dapat dijadikan sebagai piranti diagnostikum penduga yang layak bagi infeksi P. *pseudomallei* pada babi. Hal ini terbukti karena asosiasi antara kelainan PA (keberadaan abses) dan seroreaktivitas terhadap kuman cukup nyata ($X^2 = 4,1$; $p<0,05$). Meskipun demikian dari 36 sampel yang diperiksa terdapat 19,4% (7) reaktor melioidosis yang berasal dari 19 hewan yang tidak menunjukkan tanda-tanda abses. Hal ini kemungkinan besar karena sifat alamiah dari ELISA yang sangat peka, sehingga antibodi sebagai tanggap kebal terhadap infeksi akan dapat terditeksi jauh sebelum kelainan PA dapat teramati. Gambaran mengenai kelainan PA dan reaktivitas pada IND-ELISA dari jumlah hewan yang diperiksa disajikan pada Tabel I.

Tabel 1. **Gambaran mengenai kelainan patologi anatomik** (abses) **dan aktivitas serologik IND-ELISA pada** 36 **babi asal tiga peternakan tertular melioidosis.**

IND-ELISA	Abses		Total
	Negatif	Positif	
Negatif	12	5	17
Positif	7	12	19
Total	19	17	36

Pemantauan Serologik

Sebanyak empat kali pemeriksaan serologik dalam kurun lebih kurang satu tahun telah dilakukan pada dua kelompok peternakan tertular dan yang dikhawatirkan tertular melioidosis.

Hubungan Abses dengan Isolasi Kuman

Upaya pengisolasian kuman *P. pseudomallei* pada ke-36 babi tersebut di atas juga dilakukan dan menghasilkan 12 isolat. Sepuluh di antaranya didapat dari hewan yang menunjukkan tanda-tanda abses. Hal ini menggambarkan hubungan yang nyata ($X^2 = 9,41$; $p<0,01$) antara kelainan PA (abses) dan tingkat kontaminasi kuman *P. pseudomallei* pada babi. Akan tetapi dari 24 sampel yang negatif *P. pseudomallei*, terdapat tujuh di antaranya yang memiliki tanda-tanda abses. Tidak terisolasinya *P. pseudomallei* dari sediaan tersebut mungkin menggambarkan bahwa jumlah bakteri di dalam hewan tertular tadi, termasuk dengan yang terlokalisasi sekitar daerah abses, sudah mencapai tingkat minimal sebagai akibat dari proses infeksi yang sudah melewati fase bakteriemia.

Seperti halnya ditegaskan oleh peneliti terdahulu (Laws dan Hall, 1963) tingkat keberhasilan pengisolasian kuman *P. pseudomallei* dari babi dengan gejala abses hanya mencapai sebesar-besarnya 30%. Selain itu gejala abses umumnya sulit dibedakan dari kelainan sejenis yang disebabkan oleh kuman lain seperti *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Salmonella* spp., *Brucella suis* dan *Erysipelothrix insidiosa*. Di dalam Tabel 2 disajikan gambaran mengenai hubungan antara frekuensi kelainan PA dengan tingkat isolasi kuman dari 36 sampel yang diperiksa.

Tabel 2. Gambaran mengenai hubungan antara kelainan patologi anatomik (abses) dengan tingkat *recovery* kuman (isolasi) dari 36 sampel yang diperiksa.

Isolasi kuman	Abses		Total
	Negatif	Positif	
Negatif	17	7	24
Positif	2	10	12
Total	19	17	36

Sampling pertama dilakukan pada musim penghujan sedangkan yang terakhir dilakukan pada musim kering. Rincian hasil pemantauan serologik secara IND-ELISA selanjutnya disajikan di dalam Tabel 3. Sedangkan gambaran prevalensi penyakit di tiga peternakan tertular diilustrasikan dalam Gambar 2.

Dari hasil pemeriksaan serologik dapat dilihat bahwa tingkat infeksi melioidosis pada musim penghujan di tiga peternakan tertular cenderung lebih tinggi ($p<0,01$) daripada tingkat infeksi yang terdeteksi pada musim kering. Pola serupa itu sesuai dengan hasil yang pernah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Ketterer *et* al., 1986). Peningkatan angka curah hujan di daerah infeksi sering mengakibatkan banjir dan peluapan air permukaan. Hal ini mungkin merupakan salah satu mata rantai dari penyebab kenaikan tingkat infeksi, karena pencemaran tanah oleh kuman semacam P. *pseudomallei* dapat terjadi pada kondisi semacam itu. Meskipun demikian jenis transmisi penyakit masih sulit dibuktikan, bila peternakan dikelola secara intensif. Dalam keadaan demikian kemungkinan terjadinya kontak antara hewan dengan tanah yang terkontaminasi kuman akan sangat minimal. Demikian halnya dengan babi-babi di tiga peternakan tertular dalam penelitian kali ini, diduga tidak terinfeksi melalui tanah secara langsung, akan tetapi melalui suplai air minum peternakan tersebut yang terkontaminasi dengan lumpur yang mengandung kuman yang pada akhirnya menjadi sumber kontaminasi (Thomas *et al.* 1981).

Dugaan mengenai pola penularan penyakit melalui suplai air minum tersebut di atas selanjutnya tersubstansiasi dengan bukti bahwa ketiga peternakan babi yang terinfeksi mendapatkan suplai air minum dari sumber yang sama yakni sebuah kubangan yang menyerupai "empang tadah air hujan". Berbeda dengan dua peternakan babi dan satu peternakan kambing yang juga dipantau dalam penelitian ini. Masing-masing dari peternakan yang tidak tertular memiliki sumber air sendiri yang berasal dari sumur "bor" yang kemudian ditampung baik di dalam "dam" maupun di dalam bejana penampung air.

Selama pemantauan dilakukan, tingkat infeksi melioidosis hanya terdeteksi pada babi-babi dari peternakan yang sudah dilaporkan tertular. Hal ini mungkin membuktikan tingkat efektivitas garis "demarkasi" yang sengaja dibuat untuk menangkal penyebaran penyakit dari daerah tertular. Disamping itu terdapat tingkat kesadaran yang cukup tinggi dari para peternak dalam mematuhi "larangan sementara" untuk tidak melakukan mobilisasi hewan rentan meliodosis dari dan ke daerah tertular; meskipun garis batas yang dinyatakan tersebut secara fisik masih dapat dikategorikan "imajiner".

Gambar 1. **Abses** (anak **panah**) pada **limpa seekor** babi yang **diperiksa di rumah** potong **hewan** (RPH) merupakan salah satu tanda kelainan **patologi** anatomik dari **melioidosis**