

KAJIAN RETROSPEKTIF ANTRAKS DI DAERAH ENDEMIK MENGGUNAKAN UJI ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

S. HARDJOUTOMO dan M.B. POERWADIKARTA

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O.Box 52, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 9 September 1996)

ABSTRACT

HARDJOUTOMO, S and M.B. POERWADIKARTA. 1996. Anthrax retrospective analysis in endemic areas using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2 (2): 127-131.

About the end of 1995, an infectious disease among buffaloes as well as human beings was reported to occur in the District of Ngada, East Nusatenggara. Specimens of death animals, namely a piece of bones, hide, soil samples as well as blood and exudate smears and sera of the local inhabitants were submitted to Balitvet, Bogor laboratory for diagnosis. Bacteriological examinations of those specimens revealed that *B. anthracis* was the causative agent of the disease. Along the line, 40 humans sera comprised 20 sera of local exposed inhabitants and 20 sera of non-exposed outsider, examined by the antibody enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) confirmed the diagnosis. It was concluded that antibody ELISA is one of diagnosis tools for analyzing of an anthrax outbreak in the field.

Keywords : Anthrax, retrospective analysis, antibody ELISA, serum

ABSTRAK

HARDJOUTOMO, S dan M.B. POERWADIKARTA. 1996. Kajian retrospektif antraks di daerah endemik menggunakan uji enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2 (2): 127-131.

Pada penghujung tahun 1995, dilaporkan bahwa suatu penyakit menular telah berjangkit di Kabupaten Ngada, Nusatenggara Timur. Penyakit tersebut diketahui bukan saja menyerang ternak kerbau, tetapi juga menular kepada manusia penduduk setempat. Sejumlah spesimen berupa tanah, tulang hewan, kulit/bulu hewan, eksudat, preparat ulas darah dan eksudat serta serum manusia dikirimkan ke laboratorium Balai Penelitian Veteriner, Bogor untuk ditegakkan diagnosis. Pemeriksaan kultural bakteriologi serta pemeriksaan lain di laboratorium menyimpulkan bahwa penyakit yang sedang diperiksa adalah antraks. Dalam pada itu, setelah dianalisis data hasil ELISA terhadap 40 serum manusia yang terdiri dari 20 serum manusia terekspos dari penduduk setempat dan 20 serum manusia tak terekspos dari luar NTT menguatkan penegakan diagnosis penyakit. Disimpulkan bahwa teknik ELISA antibodi dapat digunakan sebagai perangkat diagnosis untuk kajian retrospektif antraks di daerah endemik.

Kata kunci : Antraks, kajian retrospektif, ELISA antibodi, serum

PENDAHULUAN

Antraks adalah penyakit menular yang disebabkan oleh *Bacillus anthracis*, bersifat fatal serta menyerang baik hewan maupun manusia (OIE, 1992). Oleh karena itu, antraks termasuk salah satu zoonosis yang keberadaannya di tanah air kita ini perlu diwaspadai. Menurut SOEMANAGARA (1958), antraks pada hewan di Indonesia telah dibuktikan keberadaannya secara laboratorik sejak tahun 1885.

Beberapa propinsi di Indonesia diketahui sebagai daerah antraks; salah satu di antaranya adalah Propinsi Nusatenggara Timur (NTT) (HARDJOUTOMO, 1996). Lebih jauh diketahui, bahwa Kabupaten Ngada merupakan salah satu daerah endemik antraks di propinsi tersebut. Sampai saat ini, di kabupaten tersebut secara klinis antraks masih sering dilaporkan dan antraks merupakan salah satu penyakit hewan menular yang masih menjadi masalah.

Pada penghujung tahun 1995, bertepatan dengan permulaan musim penghujan bagi daerah NTT, Departemen Kesehatan (Depkes) menerima laporan bahwa telah berjangkit suatu penyakit menular yang menyerang bukan saja ternak kerbau tetapi juga manusia di beberapa desa di Kabupaten Ngada.

Dalam hubungan dengan penyakit menular tersebut tadi, dilaporkan bahwa serangan pada manusia terbanyak bermanifestasi pada kulit, berupa ulkus/borok yang sulit sembuh. Selain itu, terdapat pula penderita yang mengalami gangguan pencernaan, berupa diare. Untuk konfirmasi kejadian antraks tersebut dilakukan diagnosis retrospektif dengan menggunakan teknik enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) antibodi antraks.

Dari spesimen yang dapat dikumpulkan dari lapangan secara laboratorik dilakukan pemeriksaan ke arah penyakit menular zoonosis yang paling mungkin sebagai penyebab penyakit.

Tulisan ini bertujuan untuk mengemukakan prosedur diagnosis secara laboratorik penyakit yang mewabah di NTT dan sekaligus mengkaji apakah teknik ELISA selaku perangkat uji serodiagnosis di laboratorium dapat digunakan untuk studi tentang kasus antraks di daerah endemik.

MATERI DAN METODE

Sampel dari lapangan

Sampel yang diperoleh dari lapangan berupa spesimen yang berisi tanah (5 sampel), tulang hewan (4 sampel), kulit/bulu (1 sampel), eksudat dari borok (9 sampel), preparat ulas darah dan eksudat (8 sampel) dan serum manusia penderita (20 sampel). Masih ditambah lagi dengan spesimen berupa tanah (5 sampel) yang diambil dari Desa-desa Daniu II dan Benteng Tawa (Tabel 1).

Pemeriksaan laboratorik

Di laboratorium, berdasarkan jenis spesimen yang diterima, maka dilakukan pemeriksaan sebagai berikut:

1. Pemeriksaan kultural (terhadap sampel tanah, tulang, kulit/ bulu dan eksudat), yang dilanjutkan dengan pemeriksaan biologik bila ditemukan isolat kuman yang dicurigai;
2. Pemeriksaan mikroskopik (terhadap sampel preparat ulas darah dan preparat eksudat);
3. Pemeriksaan serologik (terhadap sampel serum). Dalam hubungan dengan pemeriksaan serologik, kali ini teknik *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) digunakan sebagai perangkat kajian.

Pemeriksaan kultural bakteri dilakukan berdasarkan modifikasi cara FOX *et al.* (1977). Pemeriksaan biologik dan pemeriksaan mikroskopik dilakukan menurut cara

PESTI (1990), sedangkan teknik ELISA antibodi antraks menurut HARDJOUTOMO *et al.* (1993).

Pemeriksaan ELISA antibodi dilakukan terhadap serum darah manusia dengan menggunakan konjugat anti-human (Jackson) dan Syn-N protein antigen antraks (Balitvet). Perlu dijelaskan di sini, bahwa selain 20 sampel serum manusia yang diterima dari lapangan dan berasal dari daerah terekspos (Kabupaten Ngada, NTT) tadi diikuti sertakan pula 20 sampel serum manusia tak terekspos yang berasal dari luar NTT, sebagai serum negatif pembanding reaksi (Tabel 4).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan kultural dan mikroskopik dari seluruh spesimen yang diterima dari lapangan ternyata memberi hasil negatif kuman antraks, kecuali spesimen berupa kulit/bulu dari hewan yang memberi hasil dapat diisolasi kuman yang sangat dicurigai. Berdasarkan hasil pengujian biologik, isolat bakteri yang sangat dicurigai sebagai kuman antraks tadi menunjukkan sifat patogenik pada hewan percobaan marmot. Isolat tersebut dapat membunuh hewan percobaan marmot dalam waktu 48 jam pascapenyuntikan. Isolasi dan identifikasi kembali dari bakteri yang membunuh marmot percobaan tadi membuktikan bahwa isolat tadi memang *Bacillus anthracis* (Tabel 2).

Dalam pada itu, pemeriksaan serodiagnostik menggunakan Uji Ascoli terhadap ekstrak spesimen berupa kulit/bulu yang sama juga memberikan hasil positif (Tabel 5). Hal ini menguatkan hasil isolasi dan identifikasinya.

Karena hasil pemeriksaan secara kultural, biologik dan Ascoli telah membuktikan bahwa penyakit yang diperiksa itu adalah antraks, maka pemeriksaan laboratorik terhadap serum manusia penderita berasal dari lokasi wabah dilakukan untuk dapat menguatkan hasil-hasil pemeriksaan

Tabel 1. Spesimen dari Kabupaten Ngada, NTT untuk pemeriksaan bakteriologik di laboratorium Balitvet, Bogor

Nomor urut	Jenis spesimen	Banyak sampel	Nomor kode	Keterangan
1.	Kulit&bulu	1	A.01	Ternak kerbau
2.	Tanah	5	A.02 - A.06	Tanah panganan
3.	Tulang	4	A.07 - A.10	Ternak kerbau
4.	Eksudat	9	H.11 - H.19	Manusia penderita
5.	Ulas darah & ulas eksudat	8	H.20 - H.27	Manusia penderita
6.	Serum	20	H.28 - H.47	Manusia penderita
7.	Tanah	1	DN.01	Desa Daniu II
8.	Tanah	4	BT.01 - BT.04	Desa Benteng Tawa

Catatan: Setiap spesimen dikemas terpisah dalam tabung-tabung gelas bertutup (kapasitas 7 ml) atau dalam pot-pot plastik bertutup (kapasitas 20 ml) dan berlabel; keseluruhannya dimasukkan ke dalam satu kotak karton (ukuran 30x30x30 cm³), dikirim melalui kurir

Tabel 2. Morfologi dan reaksi biokimia *B. anthracis* isolat NTT

Karakteristik	<i>B. anthracis</i> isolat NTT	<i>B. anthracis</i> *)
Morfologi dan pertumbuhan		
Pewarnaan Gram	+	+
Bentuk sel	batang	batang
Kapsul	+	+
Anaerob	+	+
Penisilin 10 IU	-	-
Reaksi biokimia		
Katalase	+	+
Fermentasi		
- Glukosa	+	+
- Arabinosa	-	-
- Xilosa	-	-
Karbohidrat (hidrolisis)	+	-
Sitrat (penggunaan)	+	v
Gelatin	+	+
Nitrat (reduksi)	+	+
Voges-Proskauer	.	+
Lecithinase (aktivitas)	+	+
Patogenisitas pada marmot	+	+

*) = sumber data dari PESTI (1990)

+ = positif ; - = negatif ; v = variasi ; . = tidak dilakukan

bakteriologinya. Perlu dijelaskan, bahwa pada kasus-kasus yang dilaporkan tidak terdapat seorangpun dari manusia penderitanya mati akibat serangan antraks. Pemeriksaan laboratorik terhadap serum manusia tersebut dilakukan dengan teknik ELISA antibodi antraks.

Data hasil ELISA (Tabel 3) menunjukkan bahwa serum-serum manusia dari daerah terekspos (n=20) memiliki titer yang berkisar antara <16 ELISA unit (EU) sampai >1.024 EU. Serum-serum yang diperoleh dari daerah yang tidak terekspos (n=20) memiliki nilai titer berkisar antara < 16 EU sampai 54 EU. Nilai titer yang diperoleh dari serum-serum yang diambil dari daerah yang tidak terekspos tersebut digunakan sebagai tafsiran batas nilai titer antibodi negatif. Batas nilai titer antibodi (*cut off level*) yang diasumsikan sebagai tafsiran standar negatif adalah $(X + 3 SD) = 73$ EU. Dengan menggunakan batasan nilai titer ELISA negatif (<73 EU) dapat dikatakan bahwa serum-serum manusia yang memiliki titer antibodi 73 EU

Tabel 3. Data hasil ELISA antibodi antraks serum manusia

Jumlah sampel	Spesimen serum manusia	Titer antibodi (EU)			
		Positif	Jml.	Negatif	Jml.
n=20	Terekspos, dari NTT	75 - >1.024	7	>16 - 61	13
n=20	Tak terekspos, dari luar NTT	0	0	>16 - 54	20

Keterangan: Kisaran titer antibodi manusia terekspos di NTT dan kisaran titer antibodi manusia tak terekspos dari luar NTT diperiksa dengan ELISA antibodi antraks
EU = ELISA unit
Nilai $(X \pm 3 SD)$ ditetapkan sebagai standar negatif

merupakan serum manusia yang tidak mengandung antibodi antraks atau dengan kata lain negatif antraks.

Untuk sampel berupa serum manusia yang berasal dari desa-desa setempat yang terekspos di Kabupaten Ngada, NTT (n=20), berdasarkan hasil ELISA antibodi (Tabel 4) dapat dirinci sebagai berikut:

1. Positif keras (titer 146 EU - 1024 EU) ada 3 orang
2. Positif ringan (titer 74 EU - 84 EU) ada 4 orang
3. Negatif (titer EU - 61 EU) ada 13 orang.

Karena informasi yang didapat dari lapangan terbatas, maka pada tulisan ini masih belum dapat dijelaskan makna dari positif ringan tersebut. Apakah itu berarti bahwa seseorang yang termasuk ke dalam kriteria itu baru saja terinfeksi antraks atau hal itu berhubungan dengan manifestasi penyakit yang berbentuk kutan.

Hasil ELISA negatif dikuatkan dengan hasil kultural dari spesimen berupa eksudat serta hasil mikroskopik dari spesimen berupa preparat ulas darah/eksudat dari penderita yang sama, yang ternyata negatif pula. Namun, dari hasil yang diperoleh dengan metode-metode diagnosis yang dilakukan tersebut tidak dapat dikorelasikan. Hal ini dikarenakan beberapa sampel spesimen yang diperiksa macamnya berlainan antara berbagai metode pemeriksaan yang digunakan (Tabel 5). Selain daripada itu, pengambilan sampel spesimen yang dilakukan 2 bulan setelah kejadian tidak dijumpai lagi hewan-hewan yang klinis sakit, bahkan juga tidak bangkainya. Hal ini dapat menyulitkan dalam pelacakan penyebab antraks secara laboratorik (TITBALL *et al.*, 1991; POERWADIKARTA *et al.*, 1995; BEYER *et al.*, 1996). Ditambah pula, sampel spesimen berupa serum darah manusia yang diperiksa dengan teknik ELISA antibodi, eksudat borok dari manusia diperiksa secara mikroskopik dan kultur bakteriologik, dan preparat eksudat dan ulas darah manusia diperiksa secara mikroskopik seluruhnya diperoleh dari pasien setelah dilakukan beberapa kali pengobatan antibiotika (Tabel 6). Hal ini sangat berpengaruh pada hasil pemeriksaan laboratoriknya.

Berdasarkan umur penderita, manusia yang diklasifikasikan sebagai positif antraks ternyata adalah semuanya (7 orang) dari kelompok dewasa. Ditinjau dari kelamin manusia penderita yang sampelnya diperiksa, mereka yang dinyatakan positif antraks tadi (7 orang), ternyata semuanya adalah laki-laki. Hasil temuan ini mendukung penemuan yang dilaporkan oleh DOGANAY (1990), yang menyatakan bahwa di Turki laki-laki lebih banyak yang terkena antraks daripada perempuan. Dalam pada itu, mereka yang positif tadi adalah dari golongan dewasa, ini menandakan bahwa kelompok dewasa lebih aktif daripada kelompok anak-anak.

Dapat dikemukakan di sini, dari hasil-hasil penelitian di Balitvet dapat disimpulkan bahwa teknik ELISA dapat digunakan untuk mengukur kandungan antibodi pas-cavaksinasi dari ternak ruminansia yang divaksinasi antraks (HARDJOUTOMO *et al.*, 1990; HARDJOUTOMO *et al.*, 1993). Lebih lanjut, dari kajian kali ini diketahui bahwa

Tabel 4. Hasil ELISA antibodi terhadap serum manusia terekspos antraks di NTT berdasarkan seks, umur dan titer (EU)

Nomor kode	Jenis spesimen	Manusia penderita Nama	Umur	Seks	Hasil ELISA (EU)
H.28	Serum	Agus Kating	Dws	Lk	Negatif (53)
H.29	Serum	Lasarus Roge	Dws	Lk	Negatif (29)
H.30	Serum	Yosef Nano	Dws	Lk	Positif (146)
H.31	Serum	Arjun Grar	Dws	Lk	Negatif (40)
H.32	Serum	N. Nangga	Dws	Lk	Negatif (42)
H.33	Serum	Paskal.Liso	Dws	Lk	Negatif (52)
H.34	Serum	Thomas Ngola	Dws	Lk	Negatif (61)
H.35	Serum	Wens Law	Dws	Lk	Positif (74)
H.36	Serum	S. Nuskejo	Dws	Lk	Positif (80)
H.37	Serum	E. Lengga	Dws	Lk	Positif (84)
H.38	Serum	A. Lonko	Dws	Lk	Positif (232)
H.39	Serum	Monier Lau	Dws	Lk	Negatif (27)
H.40	Serum	Bone F. Laba	Dws	Lk	Negatif (28)
H.41	Serum	Nicol Mbot	Dws	Lk	Positif (75)
H.42	Serum	E. Mole	Dws	Lk	Negatif (19)
H.43	Serum	Dentia. Wede	Dws	Pr	Negatif (45)
H.44	Serum	Hendr. Seri	Dws	Lk	Negatif (30)
H.45	Serum	Ronce. Bebe	8th	Pr	Negatif (<16)
H.46	Serum	Joko. Ngaba	Dws	Lk	Negatif (54)
H.47	Serum	B. Nggani	Dws	Lk	Positif (>1.024)
S.01	Serum	Anonim	Tt	Tt	Negatif (<16)
s/d					s/d
S.20	Serum	Anonim	Tt	Tt	Negatif (54)

Keterangan : Lk = laki-laki; Pr = perempuan; EU = ELISA unit; Dws = Dewasa ; Anonim = Tidak diketahui; Tt = Tidak tercatat; Kode H.28 - H.47 = Serum dari daerah terekspos di NTT; Kode S.01 - S.20 = Serum dari daerah tak terekspos di luar NTT
 Batas nilai titer antibodi untuk standar serum negatif adalah 73 EU = (X ± 3 SD)

Tabel 5. Hasil pemeriksaan laboratorium terhadap spesimen yang diperoleh dari Kabupaten Ngada, NTT

No	Asal spesimen	Jenis spesimen	Jml (*)	Cara pemeriksaan			ELISA
				Mikro. (**)	Bakt. (***)	Ascoli	
1.	Manusia	Serum darah	20	-	-	-	7
		Ulas darah	6	0	-	-	-
		Ulas eksudat	2	0	-	-	-
		Eksudat	9	0	0	0	-
		Jumlah (1)	37	0	0	0	7
2.	Hewan	Kulit dan bulu	1	0	1	1	-
		Tanah	5	0	0	0	-
		Tulang	4	-	0	0	-
		Jumlah (2)	10	0	1	1	-

Keterangan : (*) = Jumlah spesimen, (**) = Pemeriksaan mikroskopik, (***) = Pemeriksaan bakteriologik, - = tidak diperiksa
 0 = negatif antraks

ELISA juga dapat digunakan untuk mengukur titer antibodi pada manusia yang terinfeksi kuman antraks. Dengan demikian, teknik ELISA dapat digunakan sebagai perangkat laboratorik untuk konfirmasi dan pengkajian

Tabel 6. Hasil pemeriksaan mikroskopik, bakteriologik, Ascoli dan ELISA terhadap spesimen antraks pada manusia dari Kabupaten Ngada, NTT

No.	Jenis pengujian	Jenis spesimen	Jumlah spesimen	Positif	Persentase (%)
1.	ELISA antibodi	Serum	20	7	35%
2.	Mikroskopik	Darah	6	0	0
		Eksudat	11	0	0
3.	Bakteriologik	Eksudat	9	0	0
4.	Ascoli	Eksudat	9	0	0

Keterangan : 0 = negatif antraks

secara retrospektif kasus-kasus antraks yang terjadi di daerah endemik, terutama pada kasus antraks manusia.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini, dapat ditarik kesimpulan bahwa teknik ELISA antibodi antraks dapat digunakan sebagai perangkat laboratorium untuk mengkaji secara

retrospektif kasus-kasus antraks (baik pada manusia maupun pada hewan) yang terjadi di daerah endemik di Indonesia.

Pengkajian semacam di atas dengan menggunakan spesimen serum manusia, disarankan untuk dapat dilakukan bagi kasus-kasus antraks di daerah-daerah endemik antraks lain di tanah air untuk dapat mengungkapkan berbagai hal dalam hubungan studi antraks pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- BEYER W., P. GLOCKNER, J. OTTO, and R. BOHM. 1996. A nested PCR and DNA amplification-Fingerprinting methods for detection and identification of *Bacillus anthracis* in soil samples from former tanneries. *Salisbury Medical Bulletin. Special Supplement* (87): 51.
- DOGANAY, M. 1990. Human anthrax in Sivas, Turkey. *Salisbury Medical Bulletin. Special Supplement* (68):13.
- FOX, M.D., J.M. BOYCE, A.F. KAUFMANN, J.B. YOUNG, and H. W. WHITFORD. 1977. An epizootiologic study of anthrax in Falls County, Texas. *JAVMA* 170 (3): 327-333.
- HARDJOUTOMO, S., B.E. PATTEN, K. BARKAH, and J. SUBIARJAT. 1990. The Response of animals to vaccination against anthrax as monitored by ELISA. *Proceedings of the 7th Congress of Federation of Asian Veterinary Associations (Supplement)*. Pattaya, Thailand.30-41.
- HARDJOUTOMO, S., M.B. POERWADIKARTA, B. PATTEN, and K. BARKAH. 1993. The applications of antibody ELISA to monitor the vaccinal response of anthrax vaccinated ruminants. *Penyakit Hewan*, 25 (46A); 7-10.
- HARDJOUTOMO, S. 1996. Incidence of anthrax in Indonesia: 1986-1995. *Salisbury Medical Bulletin. Special Supplement* (87): 9.
- OIE. 1992. Anthrax In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. Office International des Epizooties Second edition;142-157.
- PESTI, L. 1990. Methods for the diagnosis of anthrax. In : G.G. Alton, G.R. Carter, A.C. Kibor and L. Pesti. *Veterinary Diagnostic Bacteriology. A Manual of Laboratory Procedures for Selected Diseases of Livestock*. FAO Animal Production and Health Paper. 81:77-74.
- POERWADIKARTA, M.B., S. HARDJOUTOMO, dan E. MARTINDAH. 1995. Studi retrospektif laboratorik antraks di Indonesia 1973-1992. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Veteriner untuk Meningkatkan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan asal Ternak. Balai Penelitian Veteriner, Bogor. 159-164.
- SOEMANAGARA R.M.T., 1958. Ichtisar singkat dari penyakit radang limpa, penjakit ngorok dan radang paha di Indonesia. *Hemera Zoa*. 65:95-109.
- TITBALL, R. W., P.C.B. TURNBULL, and R.A. HUTSON. 1991. The monitoring and detection of *Bacillus anthracis* in the environment. *J. Appl. Bacteriol., Symp. Suppl.* 70: 98-188.