

PENGGUNAAN KERTAS SARING SEBAGAI ALAT TRANSPOR SAMPEL DARAH UNTUK UJI SEROLOGI *PASTEURELLA MULTOCIDA*: ANALISIS DAN PERBANDINGAN KOMPOSISI PROTEIN ANTARA EKSTRAK KERTAS SARING DAN SERUM

LILY NATALIA dan ADIN PRIADI

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata No. 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 15 Juni 1998)

ABSTRACT

NATALIA, LILY and ADIN PRIADI. 1998. The use of filter paper as a transport device for serology of *Pasteurella multocida* infection : Analysis and comparison of protein composition of filter paper extract and serum. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 3 (3): 182-187.

Two methods for collecting blood specimens for measuring antibody to *Pasteurella multocida* were compared. Blood was collected on filter-paper strips, air-dried and stored at 4° C along with paired samples collected by venepuncture. Analysis using sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed that the protein composition of filter paper extract and serum was similar. Both samples had common proteins of 67, 52-58 and 27 kDa. However, there are two proteins bands of 14 and 30 kDa that were only found in filter-paper extract. Westernblot analysis also showed that samples from both sampling techniques reacted to *P. multocida* proteins of 43 kDa. Samples from experimental and field animals were also collected by the two techniques and assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *P. multocida* antibodies. The agreement between samples from experimental animals and the field using ELISA was analyzed. Samples from experimental animals, showed a very high correlation ($r = 0.931$) in ELISA results among samples collected by the two techniques. However, the correlation was lower ($r = 0.799$) in samples collected from the field. Cost analysis showed that filter-paper collection technique was 100 times more economical compared to venepuncture technique. It was concluded that eluates of whole blood dried on filter paper can be used as an alternative to sera in ELISA for measuring antibodies to *P. multocida*.

Key words : *Pasteurella multocida*, serological tests, filter paper

ABSTRAK

NATALIA, LILY dan ADIN PRIADI. 1998. Penggunaan kertas saring sebagai alat transpor sampel darah untuk uji serologi *Pasteurella multocida*: Analisis dan perbandingan komposisi protein antara ekstrak kertas saring dan serum. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 3 (3): 182-187.

Dua cara pengambilan sampel darah untuk uji terhadap antibodi *Pasteurella multocida* dibandingkan dalam penelitian ini. Darah dikumpulkan dengan menggunakan kertas saring dan tabung. Komposisi protein ekstrak kertas saring dan serum dianalisis dengan *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Analisis ini menunjukkan bahwa protein dengan bobot molekul 67, 52-58 dan 27 kDa adalah komponen yang ditemukan pada kedua teknik pengambilan sampel. Tetapi, ada 2 komponen protein 14 dan 30 kDa yang hanya ditemukan pada ekstrak kertas saring. Pemeriksaan *westernblot* membuktikan bahwa ekstrak kertas saring dan serum bereaksi sama terhadap *P. multocida*, yaitu pada protein 43 kDa. Pengamatan pada uji *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) menunjukkan terdapat hubungan yang erat antara tingkat densitas optikal sampel kertas saring dan serum dari hewan percobaan dan hewan lapangan. Pada sampel hewan percobaan, hubungan kedua teknik pengambilan sampel tersebut tinggi ($r=0,931$), sedangkan pada hewan lapangan hubungan tersebut lebih rendah ($r=0,799$). Perhitungan ekonomis terhadap biaya operasional pengambilan sampel di atas menunjukkan bahwa teknik kertas saring 100 kali lebih murah daripada sistem tabung. Disimpulkan bahwa ekstrak darah pada kertas saring dapat digunakan sebagai pengganti serum pada uji ELISA terhadap *P. multocida*.

Kata kunci : *Pasteurella multocida*, uji serologis, kertas saring

PENDAHULUAN

Penggunaan kertas saring untuk teknik pengambilan darah pada manusia dan hewan sudah

sejak lama pernah dilaporkan (ANDERSON *et al.*, 1961). Ekstrak kertas saring ini juga pernah digunakan untuk mendeteksi antibodi terhadap mikroba baik dengan teknik *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA),

westernblot, maupun *fluorescent antibody technique* (FAT). Deteksi antibodi dengan uji ELISA pernah dilakukan terhadap bakteri (MCLEAN dan HILBINK, 1989) dan virus (LANA *et al.*, 1983; HAMBLIN dan HEDGER, 1982), dengan uji ELISA dan *westernblot* terhadap virus (FARZADEGAN *et al.*, 1987). AL-ALAOUSI *et al.* (1980) menggunakan ekstrak kertas saring untuk mendeteksi parasit dengan teknik FAT. Hasil pemeriksaan di atas menunjukkan bahwa titer antibodi yang terdeteksi pada sampel kertas saring setara dengan yang diperoleh dari sampel serum. Dibandingkan dengan pengambilan darah melalui tabung, teknik ini mempunyai beberapa keunggulan. Sampel yang dikoleksi dengan kertas saring ringan, mudah disimpan, dapat dikirim lewat pos, tidak akan pecah atau tumpah dan tidak memakan tempat penyimpanan. Di samping itu, pengambilan sampel dengan teknik ini tidak memerlukan peralatan selain jarum dan kertas saring.

Untuk pemeriksaan serologis terhadap infeksi *Pasteurella multocida* pada sapi dan kerbau, teknik ELISA sudah banyak digunakan (JOHNSON *et al.*, 1988; NATALIA dan PATTEN, 1993). Pada pemeriksaan serologis di atas, hanya sampel serum yang diuji. Pada pelatihan petugas laboratorium kesehatan hewan tipe B di BPPH Wilayah V Denpasar Agustus 1995 dan BPPH Wilayah III Lampung Juni 1997 (BALAI PENELITIAN VETERINER, 1997) diperoleh masukan dari lapangan bahwa masalah pengambilan sampel yang murah, mudah dikirim dan tidak cepat rusak sangat dibutuhkan. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengembangkan teknik pengambilan darah yang murah dan praktis dengan kertas saring untuk pemeriksaan antibodi terhadap *P. multocida* dengan teknik ELISA. Dalam penelitian ini, diadakan perbandingan komposisi protein antara ekstrak kertas saring dan serum dengan SDS-PAGE, pola reaksi ekstrak kertas saring dan serum dalam *westernblot*, dan standardisasi pengenceran sampel kertas saring untuk menggantikan sampel serum pada ELISA. Di samping itu, dilakukan pula analisis ekonomi penggunaan kedua teknik pengambilan sampel ini.

MATERI DAN METODE

Kertas saring

Kertas saring Whatman no. 1 (Whatman Ltd., England) dibuat dalam bentuk strip 3 x 1,5 cm dengan salah satu ujung dilapisi karton untuk identifikasi sampel.

Koleksi darah

Darah untuk kertas saring diambil dengan menusuk pembuluh darah telinga dan membiarkan tetesan darah terserap jenuh. Kertas saring dikeringkan pada suhu kamar dan disimpan dalam kantong plastik. Di laboratorium, sampel disimpan di lemari pendingin bersuhu 4°C. Pengambilan darah dengan jarum dan tabung *venoject* vakum juga dilakukan pada hewan yang sama.

Ekstraksi

Pelubang kertas (*perforator*) yang berdiameter 6,0mm digunakan untuk melubangi kertas saring. Sebuah cakram kertas saring kemudian dilarutkan dalam *phosphate buffered saline* (PBS) yang mengandung Tween-20 (PBST) 0,05% dan kasein (PBST-K) 0,2%. Campuran ini dikocok selama 1 jam, lalu ekstrak kertas saring tersebut siap untuk uji ELISA, sedangkan sampel serum langsung diencerkan 1/100 dalam PBST-K.

Elektroforesis

Untuk membandingkan komponen ekstrak darah dalam kertas saring dan serum, dilakukan analisis komposisi protein kedua jenis sampel di atas dengan *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Gel 10% yang mengandung SDS 1% digunakan untuk memisahkan komponen *P. multocida* menurut metode LAEMMLI (1970). Masing-masing 10 µl ekstrak sebuah cakram kertas saring dalam 200 µl pelarut dan serum dengan enceran 1/100 digunakan sebagai sampel untuk elektroforesis. Gel kemudian diwarnai dengan *Coomassie brilliant blue* G-250.

Westernblot

Gel hasil SDS-PAGE ditransfer ke kertas nitroselulosa (Millipore, USA) menurut metode TOWBIN *et al.* (1979). Kertas nitroselulosa diblok dengan PBS yang mengandung kasein 0,3% selama 1 jam. *Blotting* dilakukan dengan mereaksikan serum yang diencerkan 1/50 dan ekstrak sebuah cakram kertas saring dalam 100 µl PBS-T-C dengan kertas nitroselulosa. Sesudah pencucian 3 kali dengan PBST, kertas nitroselulosa direaksikan dengan konjugat imunoglobulin kelinci anti-sapi selama 1 jam. Setelah pencucian 3 kali, nitroselulosa diwarnai dengan substrat H₂O₂ + *diaminobenzidine* (DAB).

Standardisasi kertas saring untuk uji ELISA

Untuk standardisasi ini telah divaksinasi 5 ekor sapi Bali di laboratorium dengan vaksin *Septicaemia epizootica* (SE) produksi PUSVETMA, Surabaya. Pengambilan sampel serum dan kertas saring dilakukan pada saat pravaksinasi dan 1 bulan pascavaksinasi.

Untuk mendapatkan densitas optikal yang setara antara sampel serum yang diencerkan 1/100 dan sampel kertas saring, dilakukan uji pada 10 sampel yang berpasangan dari hewan yang sama. Dari tiap sampel kertas saring, satu cakram kertas (diameter 6mm) dilarutkan dalam 200, 300 dan 400 µl PBST-C. Setelah dilakukan uji ELISA, dan hasilnya dianalisis, maka dapat dipilih satu pengenceran kertas saring yang paling setara dengan enceran serum 1/100.

ELISA untuk mendeteksi antibodi *P. multocida*

ELISA untuk mendeteksi antibodi *P. multocida* dilakukan menurut prosedur NATALIA dan PATTEN (1993). Antigen yang digunakan adalah *crude extract* dari *P. multocida* tipe B:2. Antigen ini dilarutkan dalam *coating buffer*, yaitu larutan penyangga karbonat pH 9,6.

Sebanyak 90 sampel serum enceran 1/100 dalam PBST-K atau sampel potongan kertas saring yang telah diekstraksi diuji dengan uji ELISA. Sebagai larutan pencuci digunakan larutan PBST.

Konjugat yang digunakan adalah IgG anti-sapi yang telah dilabel dengan *horse raddish peroxidase* (Silenus) dan diencerkan 1/3.500 dalam PBST-K. Substrat yang digunakan adalah 2,2' *azino-bis* (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, SIGMA) dalam larutan penyangga sitrat pH 4,2. Dalam setiap mikropelat selalu disertakan kontrol konjugat, kontrol serum negatif dan kontrol serum positif yang diencerkan secara seri.

Pembacaan densitas optikal pada *ELISA reader* dilakukan pada panjang gelombang 414 nm. Hasil ELISA dinyatakan dalam unit ELISA (EU) yang diperoleh dengan membandingkan densitas optikal sampel yang diuji dengan kurva standar kontrol serum positif. Kontrol positif tertinggi bernilai 1.024 EU dan terendah 16 EU (NATALIA *et al.*, 1993).

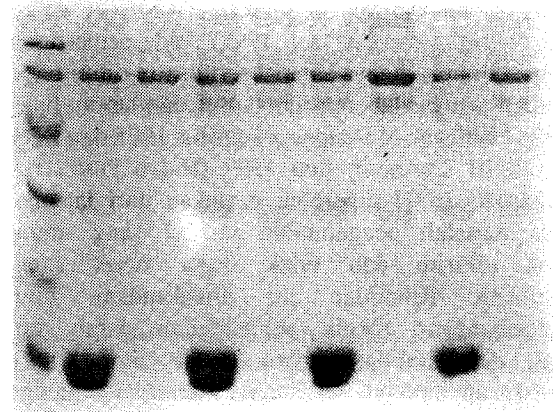
HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi ekstrak kertas saring

Secara umum hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa ekstrak kertas saring mempunyai persamaan komposisi protein dengan serum, kecuali pada

beberapa komponen tambahan yang mungkin berupa bagian dari sel darah merah seperti haemoglobin, enzim-enzim dan faktor pembekuan darah (Gambar 1). Persamaan komponen itu dijumpai pada protein dengan bobot molekul (BM) 67 kDa, 52-58 kDa dan 27 kDa. Intensitas warna tertinggi terlihat pada protein 67 kDa. Tetapi ada 2 komponen, yaitu protein 30 dan 14 kDa yang hanya dimiliki oleh sampel kertas saring. Komponen dominan yang merupakan haemoglobin yang dihasilkan oleh sel darah merah yang mengalami lisis juga ditemukan oleh EVENGARD dan LINDER (1988) pada ekstrak kertas saring. EVENGARD dan LINDER (1988) menunjukkan bahwa imunoglobulin G (IgG), IgM, IgA dan IgE dapat terserap baik pada kertas saring, sama seperti komponen yang terkandung pada serum. Imunoglobulin di atas adalah komponen utama yang dideteksi dalam teknik ELISA. Jadi, kertas saring dapat menggantikan serum sebagai sampel untuk pemeriksaan ELISA.

Standar 022K 022S 044K 044S CRK CRS Kd1K Kd1S



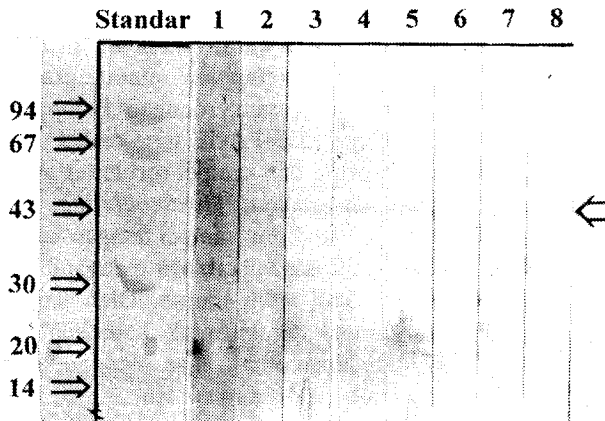
Gambar 1. Profil komponen 4 pasang (022, 044, CR, Kd1) sampel darah dari kertas saring (K) dan serum (S) pada gel 10% dalam SDS-PAGE

Westernblot

Gambaran *westernblot* memperlihatkan bahwa dari keempat pasang sampel, baik serum maupun ekstrak kertas saring, bereaksi pada komponen *P. multocida* yang sama. Komponen utama *P. multocida* yang bereaksi dengan kedua sampel tersebut adalah protein dengan BM 43 kDa (Gambar 2). Hanya pasangan sampel Kd1 yang menunjukkan reaksi tambahan yang ringan pada protein dengan BM 40 kDa.

Kesamaan reaksi ekstrak kertas saring dan serum dalam *westernblot* juga ditunjukkan oleh FARZADEGAN *et al.* (1987) pada pasien penderita HIV. Di samping itu, *westernblot* juga memberikan hasil yang sama

dengan uji ELISA (FARZADEGAN *et al.*, 1987). Gambaran *westernblot* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi 4 pasang kertas saring (1, 3, 5, dan 7) dan serum (2, 4, 6 dan 8) terhadap antigen *P. multocida* serotipe B:2 pada *westernblot*

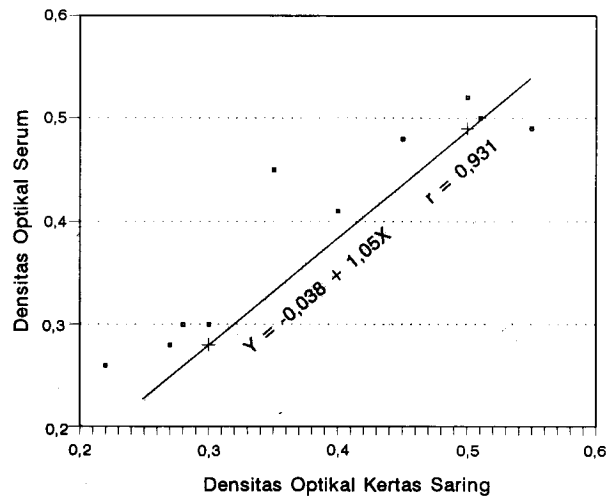
Standardisasi ekstrak kertas saring

Dari pelarut PBST 200µl, 300µl dan 400µl untuk satu cakram kertas saring, korelasi terdekat ditemukan pada pelarut 200µl (Tabel 1). Pada Tabel 1 terlihat bahwa ekstraksi kertas saring dengan volume 200µl memberikan nilai densitas optikal terdekat dengan sampel serum dibandingkan dengan ekstraksi dengan volume 300 dan 400µl. Hal ini menunjukkan bahwa ekstraksi kertas saring dengan 200µl setara dengan serum pengenceran 1/100 pada reaksi ELISA. Ekstraksi dengan volume yang lebih tinggi berakibat pada penurunan konsentrasi IgG sehingga tingkat densitas optikal menurun.

Tabel 1. Hasil uji ELISA (dalam densitas optikal) dari sampel kertas saring (a) dalam berbagai volume pelarut dan serum yang berpasangan (b)

Jenis sampel	Volume pelarut (µl)		
	200	300	400
1. a. Kertas saring	0,985	0,716	0,560
b. Serum	0,981	1,060	1,040
2. a. Kertas saring	0,600	0,529	0,304
b. Serum	0,585	0,610	0,617
3. a. Kertas saring	0,570	0,445	0,335
b. Serum	0,577	0,550	0,640
4. a. Kertas saring	1,220	0,950	0,730
b. Serum	1,150	0,990	1,103
5. a. Kertas saring	2,190	2,135	2,055
b. Serum	2,120	2,075	2,050

Dari 10 sampel kertas saring dan serum yang berpasangan didapatkan garis regresi hubungan antara densitas optikal sampel kertas saring dan serum $Y = -0,038 + 1,05X$ dan koefisien korelasi $r = 0,931$ (Gambar 3). Korelasi yang tinggi antara sampel kertas saring dan serum juga dilaporkan oleh HAMBLIN dan HEDGER (1982), LANA *et al.* (1983), FARZADEGAN *et al.* (1987) dan MCLEAN dan HILBINK (1989). Penyerapan darah yang merata dan jenuh sangat berpengaruh pada kesetaraan sampel kertas saring dan serum. Selanjutnya, pengenceran sebuah cakram kertas saring dalam 200µl dipakai untuk ekstraksi sampel dari kertas saring yang diperoleh dari lapangan.



Gambar 3. Hubungan antara densitas optikal serum 1/100 dan kertas saring (satu cetakan) dalam 200µl pelarut) pada uji ELISA

Korelasi unit ELISA antara sampel serum dan kertas saring dari spesimen lapangan

Dari hasil uji 90 sampel kertas saring yang berasal dari 90 ekor sapi di lapangan, terlihat ada perbedaan penyerapan darah pada kertas saring hewan dibandingkan dengan sampel kertas saring hewan percobaan di laboratorium (Gambar 4). Kondisi lapangan dan cara pengambilan sampel oleh petugas setempat menimbulkan cacat, antara lain banyak dijumpai darah yang tidak terserap secara jenuh pada kertas saring atau juga kertas saring tercemar bahan atau cairan lain, misalnya air hujan dan kotoran. Akibatnya, terjadi perbedaan korelasi serum/kertas saring antara sampel penelitian ($r = 0,931$) dan sampel lapangan ($r = 0,799$). Walaupun demikian, korelasi $r = 0,799$ ini masih positif nyata ($P < 0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa metode kertas saring dapat digunakan sebagai alternatif bagi pengambilan sampel darah/serum selain dengan metode tabung.

- serum for measurement of the temporal antibody response to avian infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 27(3): 813-821.
- MCLEAN, G. and F. HILBINK. 1989. Use of dried blood on filter paper in the ELISA for *Brucella abortus*. *J. Immunol. Methods* 123: 39-43.
- NATALIA, L., B.E. PATTEN, and A. SYAMSUDIN. 1993. Evaluation of bovine antibody responses to haemorrhagic septicaemia vaccine using ELISA and PMPT. *Pasteurellosis in Production Animals*. ACIAR Proceedings no. 43. Eds. B.E. PATTEN *et. al.*, Watson Ferguson Pty Ltd. Brisbane, Australia. 219-223.
- NATALIA, L. and B.E. PATTEN. 1993. The response of animals to *Pasteurella multocida* vaccination as measured by PMPT and ELISA. *Penyakit Hewan* 25 (46A): 15-20.
- TOWBIN, H., T. STAHELIN, and J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4350-4354.