

GOLD IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY (GICA) SEBAGAI IMUNOSENSOR MENDETEKSI ANTIBODI *Bacillus Anthracis* PENYEBAB PENYAKIT ZONOSIS

Gunarti, Yunan Jiwintarum, Awan Dramawan, Lale Budi Kusuma Dewi

Abstract: The purpose of this study was to identify patterns of protein antigens full / secretory antigens may be antigenic protein (PA) of *Bacillus anthracis* by the use of SDS-PAGE method (Laemmli) which can be used as bioreceptor on the test device fabrication method for detecting antibodies GICA of *Bacillus anthracis*, identify patterns of proteins that are antigenic protein (PA) or indicate the nature of the reactivity of *Bacillus anthracis* by using Western blotting and Determining the specificity and sensitivity of the test method to detect antibodies GICA *Bacillus anthracis* when using the results of the ELISA method as a reference. This study is a descriptive observational study. Research variable antigenic protein of *Bacillus anthracis* as bioreceptor and Antibodies from *Bacillus anthracis* as immunosensor. The test prototype test device made using 20 sample with ELISA as a reference for calculating the sensitivity and specificity. The results of this study were identified band – band of 92 kDa, 68 kDa, 54 kDa, 43 kDa, 29 kDa and 18 kDa that can be used as bioreceptor on GICA, identified a pattern of proteins that are antigenic or indicate the nature of the reactivity of the *Bacillus anthracis* 68 kDa by Western blotting using the method, extract secretory antigen (SA) *Bacillus anthracis* can be used as a test device bioreceptor on GICA method for the detection of IgG antibodies against *Bacillus anthracis* and sensitivity and specificity of the test method to detect antibodies GICA *Bacillus anthracis* when using the results of the ELISA method as a reference each is 100% and 87.5%.

Kata Kunci : Immunosensor, *Bacillus anthracis*, Gold Immunochromatographic Assay (GICA).

LATAR BELAKANG

Antraks merupakan penyakit prototipe dalam sejarah mikrobiologi yang disebabkan oleh *Bacillus anthracis*. Antraks terutama merupakan penyakit pada biri-biri, sapi kuda dan hewan lainnya. Infeksi pada manusia biasanya dengan masuknya spora melalui luka pada kulit atau selaput lendir dan dengan inhalasi spora kedalam paru-paru. Spora tumbuh pada jaringan tempat masuk, dan pertumbuhan organisme vegetatif mengakibatkan pembentukan edema gelatinosa dan kongesti. Bakteri kemudian menyebar melalui getah bening ke dalam aliran darah dan berkembang biak dengan bebas dalam darah dan jaringan segera sebelum dan sesudah kematian hewan. Tanah tercemar oleh spora

antraks dari bangkai hewan yang mati karena antraks. Spora-spora ini dapat tetap hidup selama puluhan tahun pada pH 6,5 pada suhu yang sesuai. Hewan merumput yang terinfeksi melalui luka pada selaput lendir menjadi penyambung rantai terus menerus. Kontak dengan hewan yang terinfeksi atau dengan kulit dan bulunya merupakan sumber infeksi pada manusia (Jawetz,1996). Ada tiga bentuk klinis antraks pada manusia, yaitu, pertama, antraks cutaneus (kulit). Sekitar 95 % antraks pada manusia merupakan antraks kulit. Kulit yang terkena akan lecet, menjadi papula kecil berwarna merah dan menimbulkan rasa gatal, yang kemudian menjadi gelembung yang berisi cairan (vesikel), kemudian pecah dan bagian tengahnya berwarna hitam. Luka ini tidak nyeri. Kuman dapat menjalar ke kelenjar

getah bening regional. Apabila penyakit berlanjut menimbulkan kuman beredar dalam aliran darah dan menyebabkan kematian. Kedua, antraks inhalasi (saluran pernafasan). Antraks inhalasi dapat terjadi karena orang menghirup udara yang mengandung spora antraks. Sering terjadi pada pekerja pengumpul wool. Dimulai setelah masa inkubasi 1 - 6 hari dengan gejala yang tidak khas seperti lesu, lelah, nyeri otot dan demam. Mungkin juga batuk yang kering dan rasa tidak nyaman pada dada. Kemudian disusul dengan sesak nafas dan nyeri dada yang hebat. Kematian dapat terjadi secara mendadak karena lumpuhnya otot pernafasan oleh toksin antraks. Angka kematian akibat antraks inhalasi sekitar 75 %. Bahkan antraks jenis ini sering terjadi pada daerah perang yang menggunakan antraks sebagai senjata biologis untuk melawan musuh. Ketiga, antraks gastrointestinal (saluran pencernaan). Terjadi bila orang mengonsumsi daging yang terkontaminasi kuman antraks. Masa inkubasi 2-5 hari. Pasien akan merasa sakit tenggorokan, demam, nyeri menelan, mual dan muntah kemudian menjadi nyeri perut yang sangat hebat yang dapat disertai muntah darah dan diare. Angka kematian pada antraks gastrointestinal sampai 60 % (Priyonggo dan Budiono, 2007). Indonesia merupakan daerah endemik antraks, menurut laporan Depkes R.I tahun 2003 tercatat 11 provinsi endemis antraks pada binatang, sedangkan 5 provinsi (Jabar, Jateng, NTB, NTT dan DI Yogyakarta) tercatat telah terjadi kasus antraks pada manusia. Siregar (2002), Sumatera (kecuali provinsi Jambi), Jawa Barat, Jawa Tengah, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tengah, Sulawesi Utara, dan Sulawesi Tenggara; Nusa Tenggara Barat dan

Nusa Tenggara Timur masih erupakan daerah yang mempunyai kecenderungan muncul wabah antraks secara periodik. Seringnya terjadi wabah penyakit, memerlukan usaha pengendalian penyakit yang terencana, termasuk cara diagnosa penyakit yang cepat dan tepat agar penyakit dapat segera diatasi (Siregar,E.A,2002;Depkes R.I,2003). Salah satu cara untuk pencegahan timbulnya prevalensi antraks adalah pada daerah bebas antraks, tindakan karantina berupa pelarangan masuknya hewan dari daerah tertular ke daerah bebas antraks. Tindakan preventif lainnya adalah hewan yang akan masuk ke dalam suatu wilayah bebas antraks diperiksa dahulu sebelum diberi ijin masuk wilayah tersebut (Priyonggo dan Budiono, 2007). Test diagnostik laboratorium yang biasa digunakan untuk indentifikasi adanya *Bacillus anthracis* adalah dengan : Pewarnaan sediaan kering dengan teknik pewarnaan immunofluoresensi akan terlihat bakteri berbentuk batang dengan penataan berantai. Bahan pemeriksaan yang diperlukan untuk pewarnaan ini adalah lesi lokal atau darah hewan yang mati. Test ini cepat dan mudah tapi membutuhkan ketrampilan dan pengalaman dari pemeriksa. Bahan pemeriksaan berupa cairan atau nanah dari lesi lokal, darah dan dahak dibiakkan dalam media yang sesuai dalam masa inkubasi tertentu. Setelah dibiakkan, biakan *Bacillus anthracis* disuntikkan pada marmot atau kelinci secara intraperitoneal untuk mengetahui virulensinya. Cara ini sangat akurat mengingat hasil yang dikeluarkan bisa sampai pada virulensi bakteri dan sensitivitasnya terhadap obat. Test serologi menggunakan prinsip reaksi antara antigen dan antibodi spesifik. Reaksi antara antibodi pada hewan

atau manusia yang terinfeksi atau divaksinasi dengan antigen yang sesuai akan memperlihatkan presipitasi atau hemaglutinasi. Metode ini mudah tetapi mahal dan cenderung sulit diterapkan di lapangan karena reagensia yang digunakan harus dalam suhu tertentu (4-8°C) (Jawetz, 1996). Berdasarkan kelemahan – kelemahan dari teknik diagnostik *Bacillus anthracis* maka perlu dipikirkan membuat suatu perangkat uji sederhana yang sensitif dan selektif dapat mendeteksi keberadaan antibodi terhadap *Bacillus anthracis* sangat diperlukan oleh masyarakat, terutama di daerah Nusa Tenggara Barat yang masyarakatnya banyak peternak Sapi, Kambing, Kuda, Kerbau dan konsumsi daging hewan – hewan tersebut pada masyarakat umum adalah tinggi. Pemeriksaan serologi, baik untuk mendeteksi antibodi maupun antigen, masih merupakan pilihan diagnostik yang sangat penting di bidang kedokteran, kedokteran hewan dan ilmu – ilmu biologi. Salah satu teknik yang sangat berkembang pesat dan paling banyak diterapkan adalah tes imunokromatografi yang salah satunya adalah metode *Gold Immunochromatographic Assay* (GICA). Format pemeriksaan deteksi antibodi atau antigen yang baru *Gold Immunochromatographic Assay* (GICA) adalah merupakan sebuah teknik imunokromatografi baru yang menggunakan *membrane selulose* sebagai pembawa dan koloidal emas berlabel antigen atau antibodi digunakan sebagai *tracer*. Teknologi ini memiliki banyak keuntungan dibandingkan dengan immunoassay yang lain, seperti prosedur yang sederhana, operasional yang cepat, hasil yang cepat, harga murah, tidak membutuhkan teknisi dengan kemampuan yang khusus atau peralatan mahal dan

dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antigen atau antibodi secara cepat dan yang paling penting dapat digunakan oleh semua golongan masyarakat. Protein antigenik yang baik dan terbukti mampu berikatan secara spesifik dengan antibodi *Bacillus anthracis* adalah *galactose/N-acetylglucosamine polysaccharide* yang merupakan komponen dari dinding sel *Bacillus anthracis*, dari hasil presipitat *Bacillus anthracis* yaitu dalam ekstrak guanidine, yang dicuci 2 kali dengan 1 volume aquadest dan dikering bekukan didapatkan hasil analisa SDS-PAGE menunjukkan berat molekul 91 kDa dan protein antigenik yang menentukan virulensi *Bacillus anthracis* terdapat pada kapsul yaitu toksin anthrax dan *poly-γ-D-Glutamic acid* (PGA) kapsul (Lyli N dan Rahmat SA,2008). Penelitian ini bertujuan membuat sebuah perangkat uji berdasarkan prinsip *Gold Immunochromatographic Assay* (GICA) untuk mendeteksi antibodi (imunosensor) dari *Bacillus anthracis* dengan menggunakan antigen penuh dari *Bacillus anthracis* sebagai bioreseptor yang diujikan pada serum hewan coba Sapi. Pemilihan hewan coba ini karena banyak terdapat diseluruh wilayah NTB, merupakan sumber penularan penyakit Anthrax ke manusia (penyakit zoonosis) dan banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Jenis penelitian ini adalah *onservasional analitik*. Analisa data untuk mengetahui sensitivitas dan spesifitas perangkat uji GICA dengan pembandingan menggunakan hasil pemeriksaan ELISA sebagai referensi. Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat bagi masyarakat luas karena dapat menghasilkan perangkat uji yang sederhana, spesifik dan sensitif untuk identifikasi antibodi *Bacillus*

anthracis yang dapat digunakan sebagai metode alternatif terhadap antibodi *Bacillus anthracis*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif yaitu penelitian yang menggambarkan kemampuan immunosensor dari ekstrak antigen penuh / sekretori antigens dari *Bacillus anthracis* dapat digunakan sebagai bioreseptor pada pembuatan perangkat uji metode GICA untuk mendeteksi antibodi dari *Bacillus anthracis* dan menentukan spesifisitas dan sensitivitas perangkat uji metode GICA untuk mendeteksi antibodi *Bacillus anthracis* bila menggunakan hasil pemeriksaan metode ELISA sebagai referensi. Populasi dan sampel dalam penelitian ini adalah menggunakan serum koleksi Unit Riset Biomedik RSUP NTB. Jumlah sampel yang digunakan adalah 20 serum koleksi.

Bahan Penelitian : Protein antigenik dari whole sel / sekretori antigens *Bacillus anthracis* yang didapatkan dari koleksi isolat Unit Riset Biomedik RSUP NTB, Serum coba (serum negatif dan serum kontrol positif). **Instrumen Penelitian :** Pipet mikro, *sonicator*, *centrifuge*, mikroskop, BioJet™3000, *cutter* kinematic automation PS-360, oven, apparatus mini-gel (Bio-Rad, Richmond, California). **Reagen Penelitian :** 1). Reagen yang digunakan untuk preparasi antigen adalah PBS.2). Reagen yang digunakan untuk elektroforesis dan *western blott* adalah Tris-HCL pH 6,8, SDS, β -*mercaptoethanol* (ME), marker BM, *bromphenol blue dye*, *comassie brilliant blue*, aquades, acrylamid, APS, TEMED, *Tris-buffered saline-*

Tween (TBST), *Tris-buffered saline* (TBS) *bovine serum albumin*, *alkaline phospatase-conjugated antihuman IgG Fab spesific* (*anti-human IgG conjugated*, Sigma), *5-bromo-4-chloro-3-indolyolphosphate* (BCIP-AP), *nitroblue tetrazolium*, *alkaline phospatase substrate buffer*. 3). Reagen yang digunakan dalam pembuatan perangkat uji adalah *Tris-buffered salin-Tween*, protein A – koloid emas, goat anti mouse, protein membrane *Bacillus anthracis* sebagai bioreseptor.

Cara pembuatan perangkat uji metode GICA untuk mendeteksi antibodi dari *Bacillus anthracis*:

1. Komponen penting dalam pembuatan GICA :

- a) Membran *Nitrocellulose* → sebagai tempat immobilisasi antigen dan Goat anti-Mouse IgG membentuk garis tes dan garis kontrol, dengan Spesifikasi Immunopore FP (Ref. 78336403) 1 Rolle/Roll.R : II/4. Ukuran : 25 mm x 50 mm, dengan ukuran pori : 5 μ m, dengan persyaratan daya kapilaritas 110 – 150 s / 4 cm², warna putih bersih (tidak ada bercak atau noda) dan bersifat Hidrofilik.
- b) *Signal Reagent Pad/Polyesther* → tempat dilekatkannya *Signal Reagent* (SR) berupa protein A-*Colloidal Gold*, dengan spesifikasi Rapid 24 (Cat. No. 8131.1750) , ukuran 17 mm x 50 mm, ukuran maximal pori : 22 μ m, ketebalan : 340 μ m, kapasitas penyerapan : 55 mg/cm, dengan persyaratan kapasitas penyerapan : 55 mg/cm, persentase *Gold-Conjugate* yang dilepaskan setelah 90 detik : 89 % serta daya kapilaritas : 38 s/4 cm².

- c) *Absorbent Paper* → Menyerap sisa – sisa sampel dan *buffer* / larutan dapar. Spesifikasi *Absorbent type CF6* (Cat. No. 81162750), ukuran 27 mm x 50 mm dengan ketebalan 1370 μ . Persyaratannya Daya kapilaritas 65 s/4 cm^2 . Daya serap air 128 mg/cm^2 dan bersifat hidrofilik.
- d) *Buffer* → Larutan dapar (penyangga pH), pencuci, menghilangkan ikatan non spesifik. Spesifikasi adalah larutan penyangga pH sekaligus pembersih (deterjen) karena mengandung campuran *Tween 20* dengan konsentrasi 1% dan tris 0,1 M. Persyaratan mampu meminimalisir ikatan – ikatan protein pengganggu yang menghalangi berikatannya *Signal reagent* dan antigen dengan antibodi spesifik.
- e) *Antigen* → Merupakan Protein antigenik dari whole sel / sekretori antigens *Bacillus anthracis*. Persyaratan merupakan antigen spesifik, berupa larutan antigen yang mengandung kadar protein 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- f) *Goat Anti-Mouse* → Antibodi sekunder yang mengikat sejumlah besar rantai Immunoglobulin G. Persyaratan mampu berikatan baik dengan *Signal Reagen* (SR) $\geq 90\%$.
- g) *Signal Reagen* (SR) → Merupakan suspensi dari partikel emas dengan protein A, berukuran 10 – 50 nm dan diameter 15 nm. Pada keadaan basa, suspensi ini akan mengalami perubahan warna menjadi merah, dengan suhu penyimpanan yang baik 4 °C. Persyaratan tidak bersifat toxic/beracun, dapat dikonjugasikan untuk berbagai macam molekul seperti protein / antibodi, polypeptida, karbohidrat, polymer, polysakarida, enzim, dan asam nukleat. Memberikan sensitifitas yang tinggi ($\geq 90\%$).
- h) *Kartu* → Kertas dengan ketebalan $\pm 0,05$ cm, yang permukaannya sedikit mengkilap, terdiri dari 2 lapisan yang direkatkan, ukuran panjang 13 cm, lebar 7,5 cm. Pada bagian depan kartu terdapat jendela pengamatan berukuran 1,2 cm x 1,5 cm. Persyaratan memiliki daya rekat yang baik, memiliki ketebalan yang cukup (tidak melebihi 0,05 mm) dan kuat/tidak mudah lapuk.
- i) *Silica gel* → Berbentuk butiran mirip kaca yang bersifat tidak elastis, dengan kemasan 1 gram. Persyaratan mampu mencegah terbentuknya kelembaban yang berlebih hingga 50% tanpa merubah kondisi zatnya. Kejenuhannya dapat diamati langsung dengan melihat perubahan warna butiran yang semula biru/ungu menjadi merah muda.
- j) *Botol Buffer* → Terbuat dari bahan plastik HDPE berdiameter $\pm 1,5$ cm. Berwarna putih dan ringan, dengan lubang tetes berdiameter 0,3 cm. Persyaratan kuat namun sedikit lentur,praktis,ringan. Aliran buffer keluar dalam bentuk tetesan, sehingga volume dapat terukur 30 μl .
- k) *Aluminium Foil* → Lembaran metal yang tipis, nampak mengkilap, dan ringan, dengan ketebalan $\pm 0,006$ mm. Persyaratan tidak robek, tidak berlubang dan praktis.

2. Format test dalam pembuatan perangkat uji GICA :

Format test → *Gold Immunochromatographic Assay* (GICA), sampel yang diuji berupa serum, luas strip : 1,25 cm² (0,5 cm x 2,5 cm), hasil atau garis yang terbentuk dapat langsung diamati dengan makroskopis. Terdiri dari 3 komponen penting yaitu Strip antigen, *Signal reagent Pad/Polyester, Absorbance Paper*. Pada strip antigen (*membrane Nitrocellulose*) terdapat 2 garis, salah satunya dilekatkan cairan *Goat Anti-Mouse* pada penanda garis tes. Penambahan *Signal Reagent* (SR) pada *Signal Reagen Pad* dan pemberian buffer pada bantalan sampel dan *Signal reagent Pad*.

3. Tahapan – tahapan kerja pembuatan perangkat uji GICA :

1) Sonikasi Protein membrane *Bacillus anthracis*.

Isolat murni *Bacillus anthracis* yang telah di tanam pada media BAP sebanyak 10 plate dipanen dalam larutan PBS, selanjutnya dilakukan sonikasi dengan alat *sonicated* sambil digetarkan untuk mendapatkan protein membrane antigenik. Hasil sonikasi dipusingkan pada 4000 rpm 4°C selama 15 menit. Supernatan diambil dan dilakukan pencucian dengan cara pellet disuspensi ulang dengan PBS dan disentrifus 10000 rpm selama 1 jam. Pencucian dilakukan sebanyak 3 kali. Setelah itu, pellet diresuspensi dengan PBS, disimpan sebagai protin antigenic membrane sel *Bacillus anthracis* untuk uji selanjutnya sehingga

dapat digunakan sebagai bioresseptor pada GICA.

2) Pemisahan fraksi protein dengan SDS-PAGE (Laemmli)

Protein yang diperoleh dipisahkan menurut bobot molekulnya menggunakan SDS_PAGE dalam apparatus mini-gel (Bio-Rad, Richmond, California). Sebelum dilakukan elektroforesis, protein dan marker dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit dalam buffer Tris-HCL pH 6,8 yang mengandung 2% SDS dan 5% β -mercaptoethanol (ME). Konsentrasi gel yang digunakan adalah 4,5% untuk *stacking gel* dan 11% untuk *separating gel*, protein yang dipisahkan sebanyak 20µl. Satu sumur diisi dengan 10 µl marker BM (SDS-PAGE *molecular weight standards, broad range*, Bio-Rad). Migrasi protein dilakukan di dalam tegangan listrik 30 volt hingga *bromphenol blue dye* mencapai tepi gel. Kemudian dilakukan pengecatan dengan *comassie brilliant blue* selama 24 jam.

3) Western blotting

Protein yang telah menjadi fraksi protein, dipindahkan ke membran *polyvinylidene difluorida* (PVDF) menggunakan *semi-dry blotter* dalam arus konstan 100 volt selama 60 menit. Membran blot kemudian dicuci dengan *Tris-buffered saline-Tween* (TBST) 0,05% dengan agitasi selama 10 menit, dan diblocking dengan *blocking buffer TBST* 0,1% yang mengandung *bovine serum albumin* 1 % semalam pada suhu 4°C.

Setelah itu membran dicuci 3x dengan TBST 0,05% masing-masing selama 10 menit agitasi. Membran blot diinkubasi dengan serum studi pengenceran 1:100 selama 1 jam pada suhu kamar dengan agitasi pelan, kemudian dicuci 3 kali dengan TBST 0,05% masing-masing selama 10 menit dengan agitasi. Selanjutnya membran blot diinkubasi dengan *alkaline phosphatase-conjugated antihuman IgG Fab spesifik (anti-human IgG conjugated, Sigma)* pengenceran 1:5000 selama 2 jam pada suhu kamar dengan agitasi pelan, kemudian dicuci 3 kali dengan TBST 0,5% dilanjutkan 1 kali dengan TBS selama 10 menit dengan agitasi. Langkah selanjutnya, membran blot yang telah berisi hibridisasi antigen-antibodi dideteksi dengan *5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP-AP)* sebagai substrat dan *nitroblue tetrazolium* sebagai indikator kromogenik dalam *alkaline phosphatase substrate buffer* pada ruangan gelap, suhu kamar, dengan agitasi pelan selama 1-10 menit sampai muncul pita pertama. Reaksi dihentikan dengan cara menuang *BCIP-AP substrate buffer* dan mencuci membran dengan aquabidest dalam agitasi pelan selama 5 menit.

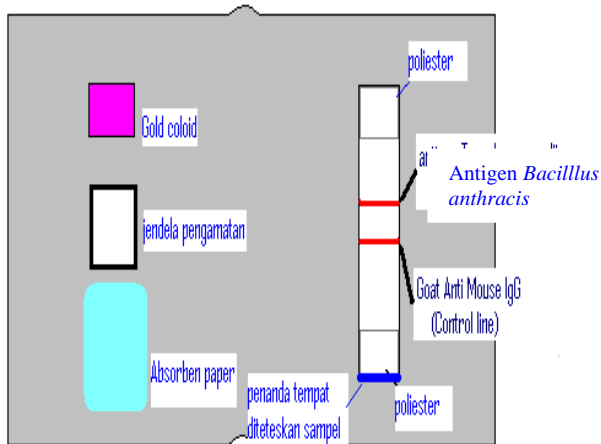
4) *Immunodot assay*

Immunodot assay merupakan uji pendahuluan sebelum antigen digunakan sebagai bioresseptor pada perangkat uji dengan prinsip GICA. Apabila dengan ekstrak antigen sekretori antigens (SA)

dapat memberikan hasil positif terhadap serum positif dan memberikan hasil negative terhadap serum negative atau memberikan hasil negative pada kontrol negative yaitu immunodot assay tanpa antigen, maka antigen tersebut dapat digunakan sebagai bioresseptor pada perangkat uji GICA. Adapun teknik kerjanya adalah sebagai berikut :

Diteteskan 5 µl protein *membrane antigenic / sekretori antigen Bacillus anthracis* pada permukaan membran nitroselulose, kemudian dikeringkan menggunakan inkubator selama 1 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 10 µl serum ditetaskan pada sumuran, dibiarkan hingga meresap kemudian ditetaskan 2 µl bufer dan dibiarkan hingga meresap, selanjutnya ditetaskan 5 µl *signal reagent (Gold colloidal)* dan diamati pembentukan spot berwarna merah (Peng rt all, 2007).

- 5) Rancangan alat yang dibuat sebagai mapping pemuatan perangkat uji *Bacillus anthracis* adalah menggunakan rancangan yang ada di Laboratorium PT Bioramp di Mataram yang digambarkan sebagai berikut:



Gambar 1 : Rancangan alat perangkat uji *Bacillus anthracis*

Mekanisme kerja perangkat uji adalah : Mula – mula disiapkan kartu sepanjang 300 nm yang terdiri atas membran nitroselulose yang akan digunakan sebagai tempat aplikasi antigen dan kontrol, pada sisi atas dan bawah membran ditemplei poliester dengan lebar 1 cm, dengan sedikit menutupi membran selulose. Antigen di aplikasikan secara linear di atas membran nitroselulose sebagai garis tes menggunakan BioJetTM3000 dengan konsentrasi 2,5 ug/ul dengan ketebalan 1 ul/mm membentuk garis sepanjang 280 mm (garis tes = garis line). Sejajar dengan garis tes, *goat anti mouse-IgG* diaplikasikan dengan disemprotkan berjarak 5 mm dari garis tes dan akan membentuk garis kontrol. Selanjutnya membran nitroselulosa tersebut dipotong berbentuk strip dengan lebar 5 mm menggunakan Kinematic

Automation PS-360. Membran nitroselulosa, *absorben paper* dan poliester dirakit pada kartu tes seperti pada gambar rancangan alat. Ditetaskan sebanyak 10 µl larutan *gold coloidal* pada poliester di atas jendela pengamatan dan dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 37°C selama 30 menit sampai dengan 1 jam, kartu dipotong – potong dengan 5 mm bentuk strip, dan ditempelkan pada kartu tes. Kartu diletakkan dengan posisi terbuka di atas tempat yang datar. Sebanyak 20 µl sampel serum ditetaskan pada bantalan poliester di dekat zona kontrol. Sebanyak 1 tetes larutan buffer ditetaskan pada bantalan yang sama dan 2 tetes buffer pada bantalan poliester tempat *signal reagen gold coloidal*, selanjutnya diinkubasi beberapa saat sampai sampel dan buffer meresap sampai garis batas. Kartu test segera ditutup dan diamati hasil pemeriksaan dari jendela pengamatan 15 sampai 20 menit kemudian. Hasil positif jika muncul 2 garis berwarna merah pada garis kontrol dan garis test. Hasil negatif jika muncul 1 garis berwarna merah pada garis kontrol. Hasil *invalid* jika tidak muncul garis sama sekali atau hanya muncul garis pada tes (Bioramp,2009). Hasil SDS PAGE dan *Western – Blotting* disajikan dalam bentuk deskriptif. Sensitivitas dan spesifisitas hasil pemeriksaan Antibodi terhadap *Bacillus*

anthracis menggunakan perangkat uji metode GICA dibandingkan dengan hasil pemeriksaan IgG terhadap *Bacillus anthracis* menggunakan metode ELISA sebagai referensi diukur berdasarkan : Cara menghitung sensitivitas adalah proporsi antara hasil uji positif terhadap sampel positif menggunakan metode GICA dengan hasil uji positif menggunakan metode ELISA. Spesifisitas adalah proporsi antara hasil uji negatif terhadap sampel negatif menggunakan GICA dengan hasil uji negatif menggunakan metode ELISA (Budiarto, 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Hasil

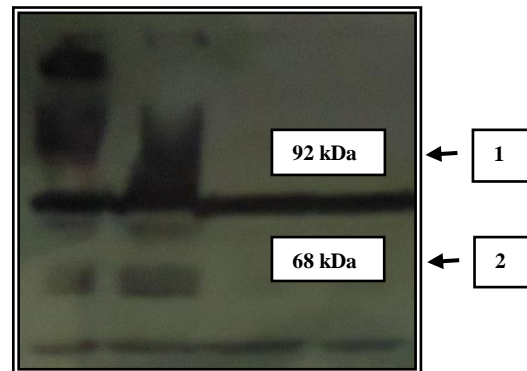
1. Hasil SDS-PAGE (Laemmli).

Hasil analisa protein SDS –PAGE menunjukkan bahwa hasil Analisa SDS – PAGE protein yang menunjukkan profil pemisahan protein yang terbaik adalah perbandingan antara Protein Antigenik (PA) dari *Bacillus anthracis* dengan *reducing Sampel Buffer (RBS)* dengan perbandingan 1: 1. Pita – pita protein yang terbentuk masih utuh dan jelas dengan urutan 92 kDa, 68 kDa, 54 kDa, 43 kDa, 29 kDa, dan 18 kDa sehingga dapat digunakan sebagai bioreseptor pada GICA.

2. Hasil *Western blotting* metode dari *Towbin*.

Analisa *Western blotting* metode dari *Towbin* bertujuan untuk mendapatkan jenis protein

yang diharapkan sebagai bioreseptor yang menunjukkan reaktivitas dengan antisera serum kontrol *Bacillus anthracis*. Adapun hasil dari Analisa *Western blotting* metode dari *Towbin* dari protein antigenik *Bacillus anthracis* yang pertama adalah :



Gambar 2. Hasil dari Analisa *Western blotting* metode dari *Towbin* dari protein antigenik *Bacillus anthracis* yang pertama

Gambar 2. menunjukkan hasil *Western blotting* pertama. Hasil ini menunjukkan terdapat dua pita protein yang diharapkan bersifat reaktif dan diharapkan dapat digunakan sebagai bioreseptor dalam perangkat uji metode GICA untuk mendeteksi antibodi dari *Bacillus anthracis*. Satu pita meragukan terlihat tebal (1) pita 92 kDa yang diperkirakan *galactose/N-acetylglucosamine polysaccharide* dari dinding sel *Bacillus anthracis* dan satu pita protein yang jelas (2) pita 68 kDa yang diperkirakan *poly-γ-D-glutamic acid (PDA)* dari kapsul *Bacillus anthracis*. Kedua protein antigenik yang muncul ini dapat digunakan untuk kandidat bioreseptor dalam perangkat uji. Untuk mendapatkan hasil yang lebih baik dari protein yang diinginkan untuk protein antigenik dalam perangkat uji maka dilakukan analisa *Western blotting* kedua. Adapun hasil uji *Western blotting* kedua adalah sebagai berikut :



Gambar 3. Hasil dari Analisa Western blotting metode dari Towbin dari protein antigenik *Bacillus anthracis* yang kedua

Gambar 3. menunjukkan hasil *Western blotting* kedua yang lebih jelas yang memperlihatkan satu pita protein yang jelas yaitu pita 68 kDa reaktif yang bersifat antigenik, diperkirakan *poly-γ-D-glutamic acid* (PDA) dari kapsul *Bacillus anthracis* yang dapat digunakan untuk kandidat bioreseptor dalam perangkat uji.

3. Hasil *Immunodot assay*

Hasil *Immunodot assay* dengan menggunakan ekstrak sekretorik antigen (SA), memberikan reaksi positif dengan serum positif yang ditandai dengan terbentuknya warna merah atau spot merah pada membran nitroselulosa dan sampel negatif memberikan hasil negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya warna/spot merah pada membra nitroselulosa. *Immunodot assay* merupakan uji pendahuluan sebelum antigen digunakan sebagai

bioreseptor pada perangkat uji dengan prinsip GICA. Apabila dengan ekstrak antigen sekretori antigens (SA) dapat memberikan hasil positif terhadap serum positif dan memberikan hasil negative terhadap serum negative atau memberikan hasil negatif pada kontrol negatif yaitu immunodot assay tanpa antigen, maka antigen tersebut dapat digunakan sebagai bioreseptor pada perangkat uji GICA.

4. Hasil optimalisasi kadar antigen yang ditempelkan pada perangkat uji *Bacillus anthracis* metode GICA

Optimalisasi dilakukan pada jumlah dan kadar antigen *Bacillus anthracis* yang akan ditempelkan pada perangkat uji dengan cara larutan antigen yang telah dipreparasi diencerkan menggunakan buffer carbonat pH 9,6 sehingga diperoleh serial kadar protein 1,0; 1,5; 2,0 ; 2,5 dan 3,0 ng/ul. Antigen ditempelkan pada membran nitroselulosa menggunakan mesin dispenser Biodot (USA) yang akan membentuk garis tes. Sedangkan garis kontrol berisi goat-anti-mouse IgG. Membran nitroselulosa kemudian dikeringanginkan untuk kemudian dipotong membentuk strip. Adapun hasil Optimalisasi tersebut adalah seperti terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Optimalisasi kadar antigen yang ditempelkan pada perangkat uji GICA

Jumlah Antigen (Ag) yang ditempelkan (ng/ul)	Sampel	Garis Kontrol	Garis tes
3,0	Blanko (Tris buffer)	+	+/-
2,5	Blanko	+	-
2,0	Blanko	+	-
1,5	Blanko	+	-
1,0	Blanko	+	-

Tabel 1. menunjukkan hasil optimalisasi perangkat uji terhadap kadar antigen yang ditempelkan. Hasil tersebut memberikan gambaran bahwa kelebihan jumlah antigen akan menimbulkan garis artefak sehingga menjadi positif palsu. Kadar antigen 2,5 ng/ul adalah kadar maksimal dari antigen yang ditempelkan yang akan digunakan. Sedangkan dari hasil optimalisasi kadar yang terbaik memberikan hasil adalah kadar 1 ug/ul.

5. Hasil Optimalisasi pada volume serum panel serum negatif dan panel serum positif.

Optimalisasi pada volume serum dilakukan dengan menggunakan variasi volume serum 5 ul, 10 ul, 20 ul dan 30 ul. Untuk test menggunakan volume serum yang masih terbatas pada serum koleksi orang normal untuk panel serum negatif sebanyak 5 tabung dan serum kontrol positif untuk panel serum positif sebanyak 5 tabung. Adapun hasil optimalisasi perangkat uji terhadap volume serum sebagai sampel seperti terlihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Optimalisasi volme serum yang digunakan pada perangkat uji GICA

No. Serum	Volume serum	Garis kontrol	Garis tes
N1	5	-/+	-
	10	+	-
	20	+	-
	30	+	-/+
N2	5	-	-
	10	+	-
	20	+	-
	30	+	-
N3	5	-/+	-
	10	+	-
	20	+	-
	30	+	-
N4	5	-	-
	10	+	-
	20	+	-
	30	+	-
N5	5	+	-
	10	+	-
	20	+	-
	30	+	-/+
K1	5	+	+
	10	+	+
	20	+	+
	30	+	-/+
K2	5	-/+	-/+
	10	+	+
	20	+	+
	30	+	+
K3	5	+	+
	10	+	+
	20	+	-/+
	30	+	-/+
K4	5	+	+
	10	+	+
	20	+	+
	30	-/+	-/+
K5	5	+	+

10	+	+
20	+	-/+
30	-/+	-/+

Keterangan : N 1-5 → Serum normal 1-5, K1-5 → Serum kontrol positif 1-5

Tabel 2. menunjukkan hasil optimalisasi perangkat uji terhadap volume serum/ volume sampel. Hasil tersebut memberikan gambaran bahwa volume yang terlalu sedikit menyebabkan garis kontrol tidak muncul. Sebaliknya kelebihan volume sampel serum menyebabkan garis artefak pada garis test, sehingga menyebabkan hasil positif palsu. Volume serum optimal yang digunakan adalah 10 ul.

6. Hasil uji coba protipe perangkat uji metode GICA untuk mendeteksi antibodi dari *Bacillus anthracis*.

Uji coba protipe perangkat uji pada pada 20 serum uji (serum negatif dan serum kontrol positif) yang dirandom dari 30 serum uji (serum negatif dan serum kontrol positif) dengan pemeriksaan ELISA sebagai referensi untuk menghitung Sensitifitas dan Spesifitas dari perangkat uji perangkat uji ekstrak antigen penuh/ sekretorik antigen dari *Bacillus anthracis* metode GICA. Adapun hasil uji tersebut dapat dilihat pada Tabel .3.

Tabel 3. Data hasil uji coba protipe perangkat uji metode GICA untuk mendeteksi antibodi dari *Bacillus anthracis*.

No	Kode Serum	Hasil ELISA		Hasil ICT <i>Bacillus anthracis</i> metode GICA	
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
1.	01-11	(+)		(+)	
2.	02-11	(+)		(+)	
3.	09-11		(-)		(-)
4.	23-11		(-)		(-)
5.	26-11	(+)		(+)	
6.	30-11	(+)		(+)	
7.	11-11	(+)		(+)	
8.	15-11	(+)		(+)	
9.	18-11		(-)	(+)	(-)
10.	21-11	(+)		(+)	
11.	03-11		(-)		(-)
12.	07-11	(+)			
13.	13-11	(+)			
14.	24-11		(-)		(-)
15.	27-11		(-)		(-)
16.	29-11	(+)		(+)	
17.	06-11	(+)		(+)	
18.	04-11	(+)		(+)	
19.	28-11		(-)	(+)	
20.	22-11		(-)		(-)
Jumlah		12	8	13	7

Tabel 3 menunjukkan hasil bahwa dari 20 serum yang di periksa dengan menggunakan metode

ELISA, 12 sampel serum (60%) dinyatakan positif dan 8 sampel serum (40%) dinyatakan negatif.

Sampel serum yang dilakukan pemeriksaan dengan perangkat uji metode GICA menunjukkan hasil 13 sampel serum (65%) dinyatakan positif dan 7 sampel serum (35%) dinyatakan negatif. Diantara 8 sampel serum yang dinyatakan negatif engan ELISA, 2 diantaranya dinyatakan positif dengan perangkat uji GICA. Teknologi ELISA digunakan sebagai referensi dalam penelitian ini, karena teknologi ELISA merupakan teknologi diagnosis paling utama digunakan dewasa ini dalam pemeriksaan serologis. Hal ini disebabkan tidak hanya sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dibanding teknik lain tetapi juga keluasan aplikasi aplikasi untuk berbagai tujuan cukup memadai. Salah satu keterbatasan utama dari ELISA adalah tidak mampu mendeteksi antigen atau antibodi terhadap *Bacillus anthracis* dalam jumlah yang kecil pada serum maupun jaringan. Pengembangan yang lebih sederhana saat ini juga telah dikembangkan uji cepat imunokromatografi dengan menggunakan ekstrak protein maupun rekombinan. Kemampuan uji serologis yang berbasis pada teknik ELISA tersebut dilaporkan memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang setara dengan teknik ELISA secara umum. Walaupun demikian kelemahan dari teknik imunokromatografi adalah tidak bersifat kuantitatif seperti ELISA (Subekti dkk., 2005). Cara menghitung sensitivitas adalah proporsi antara hasil uji positif terhadap sampel positif menggunakan metode GICA dengan hasil uji positif menggunakan metode ELISA. Spesifisitas adalah proporsi antara hasil uji negatif terhadap sampel negatif menggunakan GICA dengan hasil uji negatif menggunakan metode ELISA

(Budiarto, 2004). Adapun hasil perhitungannya dari hasil uji protipe adalah :

$$\text{Sensitivitas} = \frac{12}{12} \times 100 = 100 \%$$

$$\text{Spesifisitas} = \frac{7}{8} \times 100 = 87.5 \%$$

B. Pembahasan

Penyakit antraks merupakan penyakit bakteri akut atau per akut yang disebabkan oleh *Bacillus anthracis*. Penyakit antraks di Indonesia sudah menyebabkan kerugian ekonomi dan mengancam keselamatan manusia. Indonesia merupakan daerah endemik antraks, menurut laporan Depkes R.I tahun 2003 tercatat 11 provinsi endemis antraks pada binatang, sedangkan 5 provinsi (Jabar, Jateng, NTB, NTT dan DI Yogyakarta) tercatat telah terjadi kasus antraks pada manusia. Siregar (2002), Sumatera (kecuali provinsi Jambi), Jawa Barat, Jawa Tengah, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tengah, Sulawesi Utara, dan Sulawesi Tenggara; Nusa Tenggara Barat dan Nusa Tenggara Timur masih merupakan daerah yang mempunyai kecenderungan muncul wabah antraks secara periodik. Seringnya terjadi wabah penyakit, memerlukan usaha pengendalian penyakit yang terencana, termasuk cara diagnosa penyakit yang cepat dan tepat agar penyakit dapat segera diatasi (Siregar,E.A,2002;Depkes R.I,2003). Usaha pengendalian dan pengawasan penyakit antraks yang sangat membahayakan kesehatan masyarakat, harus diusahakan dibuat suatu perangkat uji yang mampu mendeteksi antraks dengan cepat. Metode isolasi dan identifikasi

Bacillus anthracis dengan media biakkan, uji biokimia, uji Ascoli precipitin test dan uji biologis menggunakan marmot atau mencit tidak praktis. Kelemahan uji tersebut diperlukan waktu yang cukup lama untuk mengetahui hasil uji. Seringkali juga pada usaha isolasi dan pembiakan *Bacillus anthracis* di laboratorium mengalami kegagalan walaupun gejala klinis pada hewan atau manusia sudah tampak jelas. *Bacillus anthracis* tidak dapat diisolasi atau ditumbuhkan (terutama pada manusia) jika bakteri sudah mati karena terhadap penderita sudah diberikan pengobatan antibiotika. Penelitian – penelitian terdahulu menunjukkan keunggulan *immunofluorescence assay*, yang didasarkan pada pembatan antibodi poliklonal terhadap antigen permukaan sel *Bacillus anthracis*, adalah mampu mengidentifikasi isolat – isolat, dan juga mampu secara langsung mengidentifikasi *Bacillus anthracis* dari hewan yang terinfeksi. Namun keterbatasan dalam uji yang telah dikembangkan, yaitu adanya reaksi silang dengan kelompok bakteri *Bacillus cereus* (Helgason *et al*, 2000). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi pola protein antigen penuh / sekretori antigen yang dapat bersifat protein antigenik (PA) dari *Bacillus anthracis* dengan menggunakan metode SDS- PAGE (Laemmli) yang dapat digunakan sebagai bioreseptor pada pembuatan perangkat uji metode GICA untuk mendeteksi antibodi dari *Bacillus anthracis*. Mengidentifikasi pola protein yang bersifat protein antigenik (PA) atau menunjukkan sifat reaktivitas dari *Bacillus anthracis* dengan menggunakan metode *Western Blotting*. Dan Menentukan spesifisitas dan sensitivitas perangkat uji metode GICA untuk mendeteksi antibodi *Bacillus*

anthracis bila menggunakan hasil pemeriksaan metode ELISA sebagai referensi. Analisa *Western blotting* pertama dari penelitian ini menunjukkan terdapat dua pita protein yang diharapkan bersifat reaktif dan diharapkan dapat digunakan sebagai bioreseptor dalam perangkat uji metode GICA untuk mendeteksi antibodi dari *Bacillus anthracis*. Satu pita meragukan terlihat tebal (1) pita 92 kDa yang diperkirakan *galactose/N-acetylglucosamine polysaccharide* dari dinding sel *Bacillus anthracis* dan satu pita protein yang jelas (2) pita 68 kDa yang diperkirakan *poly-γ-D-glutamic acid* (PDA) dari kapsul *Bacillus anthracis*. Kedua protein antigenik yang muncul ini dapat digunakan untuk kandidat bioreseptor dalam perangkat uji. Keberadaan komponen protein antigenik ini di perkuat oleh penelitian Lyli N dan Rahmat SA tahun 2008 yang mengidentifikasi adanya protein antigenik pada dinding sel *Bacillus anthracis* yaitu *galactose/N-acetylglucosamine polysaccharide* yang digunakan untuk membuat antibodi yang akan digunakan dalam pembuatan perangkat uji *Cell wall- Direct Fluorescent Assay* (CW-DFA) dan *poly-γ-D-glutamic acid* (PDA) dari kapsul *Bacillus anthracis*. Yang digunakan dalam perangkat uji *Capsule-Direct Fluorescent Assay* (CAP- DFA). Berat molekul dari *galactose/N-acetylglucosamine polysaccharide* sedikit berbeda dengan hasil penelitian yaitu 91 kDa. Selisih dari berat molekul ini mungkin terjadi karena perkiraan berat molekul berdasarkan perkiraan yang didasarkan dari perbandingan marker yang digunakan. Protein antigenik *galactose/N-acetylglucosamine polysaccharide* yang terdapat pada dinding sel *Bacillus anthracis* bersifat sebagai

antigen spesifik, menurut Choudhury *et al*,2006 bahwa struktur dari polisakarida utama dinding sel *Bacillus anthracis* adalah species specific. Secara keseluruhan, dinding sel *Bacillus anthracis* terdiri atas peptidoglican, suatu kompleks heteropolisakarida yang terbuat dari rantai glycan yang dihubungkan oleh peptida – peptida kecil. Bahan ini membentuk suatu jaringan yang menutupi seluruh bakteri, dan merupakan 40% dari seluruh masa sel. Rantai glycan terdiri atas unit *N-acetylglucosamine* dan *N-acetylmuramic acid*. Rantai glycan terhubung oleh peptida – peptida kecil membentuk bagian glycan dalam dinding sel. Komposisi utama dari polisakarida dinding sel *Bacillus anthracis* terutama terdiri atas *Galactose-N-acetylglucosamine polysaccharide* yang sangat unik untuk galur – galur *Bacillus anthracis* dan terbukti sangat potensial untuk membedakan dari spesies bacilli lainnya (Choudhury *et al*,2006). Hasil Analisa *Western blotting* kedua dari penelitian ini yang lebih jelas memperlihatkan satu pita protein yaitu pita 68 kDa reaktif yang bersifat antigenik, diperkirakan *poly-γ-D-glutamic acid* (PDA) dari kapsul *Bacillus anthracis* yang dapat digunakan untuk kandidat bioreseptor dalam perangkat uji. Hal ini di dukung oleh pendapat Fouet *et al* tahun 1999 dan Mesnage *et al* tahun 2000 *Bacillus anthracis* yang virulen membentuk kapsul in vivo dalam kondisi anaerobik, atau lingkungan yang mengandung 5% CO₂ atau media yang mengandung bikarbonat. Sel vegetatif akan mensekresikan kapsul polipeptida (PGA) dan membentuk koloni yang bersifat mukoid. Antigen ini bersifat spesifik karena keberadaanya dapat membedakan *Bacillus anthracis*

dengan bacilli lainnya yang tidak menghasilkan polimer kapsul ini. Hasil uji coba perangkat uji menggunakan kandidat protein antigenik dari antigen penuh *Bacillus anthracis* berdasarkan hasil analisa *Western blotting* terdeteksi satu pita 92 kDa yang diperkirakan *galactose/N-acetylglucosamine polysaccharide* dari dinding sel *Bacillus anthracis* dan satu pita protein yang jelas yaitu pita 68 kDa, diperkirakan *poly-γ-D-glutamic acid* (PDA) dari kapsul *Bacillus anthracis* yang digunakan dalam pembuatan perangkat uji menggambarkan kemampuan immunosensor dari ekstrak antigen penuh/sekretori antigens dari *Bacillus anthracis* sebagai bioreseptor metode GICA yang berguna untuk mendeteksi antibodi dari *Bacillus anthracis* menunjukkan hasil Sensitivitas dan spesifisitas perangkat uji metode GICA untuk mendeteksi antibodi *Bacillus anthracis* bila menggunakan hasil pemeriksaan metode ELISA sebagai referensi masing – masing adalah 100 % dan 87,5 %.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Teridentifikasi Pita – pita protein yang terbentuk masih utuh dan jelas dengan menggunakan analisa SDS-PAGE, dengan urutan 92 kDa, 68 kDa, 54 kDa, 43 kDa, 29 kDa, dan 18 kDa sehingga dapat digunakan sebagai bioreseptor pada GICA.
2. Teridentifikasi satu pola protein yang bersifat antigenik atau menunjukkan sifat reaktivitas dari *Bacillus anthracis* yaitu 68 kDa dengan menggunakan metode *Western Blotting*.

3. Ekstrak sekretorik antigen (SA) *Bacillus anthracis* dapat digunakan sebagai bioresseptor pada pembuaan perangkat uji metode GICA untuk mendeteksi IgG terhadap *Bacillus anthracis*.
4. Sensitivitas dan spesifisitas perangkat uji metode GICA untuk mendeteksi antibodi *Bacillus anthracis* bila menggunakan hasil pemeriksaan metode ELISA sebagai referensi masing – masing adalah 100 % dan 87,5 %.

Saran

Perlu penelitian lanjutan mengenai kestabilan dan daya tahan perangkat uji metode GICA pada Suhu dan kelembaban yang bervariasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bioramp,2009. *Manual Test Immunokromatografi Bio M Pylori*,Mataram.
- Budiarto,E.2004. *Metodologi Penelitian Kedokteran*. Sebuah pengantar.EGC, Jakarta.
- Choudrury,B.,C.Leoff,E.Saile,P.Wilkins,C.P.Quinn, E.L.Kannenberg and R.W.Carlson.2006. *The structure og major cell wall polysaccharide of Bacillus anthracis is species specific*. J.Biol.Chem.10:1074.
- Depkes R.I,2003. Pedoman Tata Lausana Kasus dan Pemeriksaan Laboratorium Penyakit Ántrax di Rumah Sakit. Dirjen Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan. Depkes R.I.
- Fouet,A,.S. Mesnage,E.Tosi-Couture,P.Gounon and M. Mock.1999. *Bacillus anthracis surface: capsule and S layer*.J.Appl.Microbiol.87:251-255.
- Helgason,E,D, H. Caugant,A.Johansen,M.Fouet and M.Mock,2000. *Bacillus anthracis, Bacillus cereus and Bacillus thuringensis – one species on the basis of genetic evidence*.Appl Environ. Microbio.66:2627-2630.
- Jawetz, Melnick dan Adelberg, 1996, *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi 20, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, Hal. 194-196.
- Lily N dan Rahmat SA,2008. Identifikasi Cepat *Bacillus anthracis* dengan Direct Flourescent Antibody Assay yang menggunakan Componen dinding sel dan kapsul. Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor.Dalam Jurnal JITV volume 13 no.2.
- Mesnage,S.,T. Fontaine,T.Mignot,M.Delepierre,M.Mock and A. Fouet.2000. *Bacterial SLH domain proteins are noncovalently anchored to the cell surface via a conserved mechanisms involving wall polysaccharide pyruvylation*. EMBO J.19:4473-4484.
- Priyonggo, Budiana, www.indonesia.com/poskup/2007/05/edisi_28/opini.htm, sitasi tanggal 25 Oktober 2005.
- Sacher, Mc Pherson, 2004, *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium*, Edisi 11, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, Hal.
- Siregar,E.A,2002. Anthraks: Sejarah masa lalu, situasi pada saat ini, sejarah diagnosa dan kecenderungan perkembangan ilmu di masa depan. Simposium sehari Penyakit Anthraks: Anthraks di Indonesia, masa lalu, masa kini dan masa depan. Balitvet,Bogor, 17 Juli 2002.
- Subekti,D.T.,W.T.Artama dan T. Iskandar,2005. *Perkembangan Kasus dan diagnosis Zoonosis*. Lokakarya Nasional Pnyakit Zoonosis.
- Peng,D.P.S.S, Hu,Y.Hua,Y.C.Xiao,Z.L.Li,X.L. Wang and D.R. Bi.2007. *Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies againt avian influenza*

virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays. Veter Immunol

Immunop 117;17-25.