

KORELASI UJI HAMBATAN HEMAGLUTINASI DAN ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY UNTUK EVALUASI TITER ANTIBODI SETELAH VAKSINASI DENGAN VIRUS INFECTIOUS BRONCHITIS PADA AYAM

THE CORELATION OF HAEMAGGLUTINATION INHIBITION TEST AND ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR EVALUATION OF ANTIBODY TITRES AFTER VACCINATION WITH INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS ON CHICKEN

Tri Untari

Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta .

ABSTRAK

Uji hambatan hemaglutinasi (HH) dan *enzyme linked immunosorbent assay (Elisa)* cocok digunakan sebagai uji serologi secara rutin, walaupun berbeda spesifisitas dan sensitivitasnya. Pemantauan hasil vaksinasi infectious bronchitis (IB) secara reguler dapat membantu dalam mengevaluasi tingkat respon terhadap vaksin yang diaplikasikan. Pada penelitian ini digunakan sampel serum sebanyak 16 yang berasal dari peternakan ayam petelur I dan II. Serum diambil 2 minggu pasca revaksinasi dengan vaksin hidup virus IB galur Massachussetts H-120 kemudian diuji HH dan Elisa. Titer antibodi dianalisa berdasarkan korelasi antara hasil uji HH dengan hasil Elisa. Berdasarkan dari kedua uji tersebut, hasil titer dengan uji HH pada serum dari peternakan I menunjukkan geometrik *mean* titernya adalah: 8,6 sedangkan dengan Elisa *mean* titernya adalah: 26.343,4. Pada peternakan II, geometrik *mean* titer dengan uji HH adalah: 78,8 dan dengan Elisa *mean* titernya: 10.276,5. Kesimpulan dari penelitian tersebut adalah uji HH dan Elisa terdapat korelasi ($R:0,725$) selama di lapangan tidak ada indikasi adanya infeksi oleh virus IB galur baru atau varian.

Kata kunci: Virus Infectious bronchitis, Hambatan Hemaglutinasi, *Enzyme Linked Immunosorbant Assay*.

ABSTRACT

Haemagglutination inhibition (HI) test and enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) are suitable for routine serology, although they differ in their specificity and sensitivity. Regular monitoring of sera from flock for Infectious bronchitis (IB) antibody titres may help to indicate the level of vaccine response. This research used 16 sera sample from layer flock I and II. The sera measuring after 2 week post revaccination with live vaccine IBV Massachussetes H-120 strain, then tested using HI and Elisa. The corelation of antibody titer used HI test and Elisa was analize. The result of this reaserch were the geometric mean titer antibody used HI test from flock I was: 8,6 whereas with Elisa the mean titer was: 26.343,4. From flock II, the geometric mean titer used HI test was: 78,8 and with Elisa the mean titer was: 10.276,5. The conclusion of this reaserch were the antibody titres using HI test have corelation ($R: 0,725$) with Elisa if in the field were not indication exposure with new strain IBV or varian.

Key word: Infectious bronchitis virus, Hemagglutination Inhibition, Enzyme Lynked Immunosorbant Assay.

PENDAHULUAN

Infectious bronchitis (IB) merupakan penyakit pada ayam yang sangat menular dan menyebabkan kerugian ekonomi. Penyakit tersebut ditandai adanya gangguan respirasi terutama pada anak ayam dan kematian bisa mencapai 30%. Pada ayam petelur penyakit tersebut mengakibatkan penurunan produksi telur baik kualitas maupun kuantitas, sedangkan pada ayam pedaging dapat mengakibatkan gangguan ginjal dan penurunan produksi daging (Jordan, 1990).

Penyebab dari penyakit tersebut adalah virus RNA untai tunggal, *positif sense*, beramplop, termasuk dalam genus *Coronavirus*, famili *Coronaviridae*. Amplop virus IB terdiri dari *lipid bilayer*, dan 3 glikoprotein yaitu M, S dan HE. Glikoprotein M sebagai transmembran protein berperan sebagai matrik protein pada amplop virus. Glikoprotein S berikatan dengan reseptor yang menyebabkan fusi membran. Glikoprotein HE merupakan hemaglutinin esterase yang dapat berikatan dengan eritrosit (Gillespie dan Timoney, 1988). Glikoprotein S1 berperan menginduksi antibodi hambatan hemaglutinasi dan netralisasi virus (Cavanagh dan Naqi, 1991).

Banyaknya galur virus menjadi masalah tersendiri dalam vaksinasi untuk melindungi serangan virus IB di lapangan. *Coronavirus* yang menyerang ayam dikelompokkan 2 kelompok tipe yaitu Massachusetts dan Connecticut (Gillespie dan Timoney, 1988). Sampai sekarang vaksin dari tipe Massachusetts merupakan vaksin yang sering digunakan untuk melindungi serangan virus IB dari galur lain (Jordan, 1990). Beberapa faktor yang mempengaruhi kekebalan terhadap virus IB yaitu adanya serotipe yang multipel dan variasi virulensi virus (Cavanagh dan Naqi, 1991).

Untuk evaluasi hasil vaksinasi virus IB dapat diukur titer antibodi dalam serum dengan menggunakan berbagai metode diantaranya uji hambatan hemaglutinasi (HH), yang juga dapat dipakai untuk *serotyping* virus IB (King dan Hopkins, 1984) dan untuk melihat hubungan antigenik virus IB tipe Massachusetts dengan 9 serotipe yang lain (Lasgari dan Newman, 1984). Keuntungan uji HH yaitu sederhana, cepat dan murah jika dibanding dengan menggunakan kultur jaringan (Hatcher *et al.*, 1984). *Enzyme linked immunosorbant assay* (Elisa) juga dikembangkan untuk mengukur titer antibodi, mempunyai sensitivitas lebih tinggi untuk bereaksi dengan bermacam-macam serotipe dibandingkan uji netralisasi serum (Zellen dan Thorsen, 1987).

Pada penelitian ini akan dikaji korelasi uji HH dan Elisa untuk mengevaluasi hasil titer antibodi pada serum ayam pasca vaksinasi virus IB.

MATERI DAN METODE

Bahan

Sampel yang diuji berupa serum sejumlah 16. Sepuluh sampel berasal dari peternakan I dan 6 sampel dari peternakan II dengan lokasi yang berbeda. Serum diambil 2 minggu pasca revaksinasi dengan vaksin hidup galur Massachusetts H-120 (Intervet).

Untuk uji HH bahan yang digunakan adalah antigen virus vaksin hidup IB galur Massachusetts H-120, telur ayam berembrio *specific pathogen free* (SPF) yang diambil dari balai penyidikan penyakit veteriner (BPPV) Wates, Jogjakarta, *phospholipase C* tipe I (PLC I) (Sigma), eritrosit ayam 0,5 %, *phosphat buffer saline* (PBS).

Bahan untuk uji Elisa terdiri dari 1 set *Infectious Bronchitis Antibody Test Kit* (Kirkegaard and Perry Laboratories/ KPL, Maryland) yang terdiri dari *antigen IB coated plate*, *Goat-anti chicken Ig G peroxidase conjugate*, *substrate ABTS-hydrogen peroxidase*, *stop solution*, *buffer* pencuci.

Cara Kerja

Persiapan antigen virus IB.

Metode yang digunakan untuk produksi antigen virus IB seperti metodenya King (1983) dengan modifikasi. Virus vaksin hidup dengan *embryo infectious dose* (EID) $50:10^3$ diencerkan dengan 1 ml PBS kemudian diinokulasikan sebanyak 0,1ml pada telur ayam berembrio umur 10 hari melalui ruang alantois. Telur tersebut kemudian diinkubasi 37° C dalam mesin penetas selama 30 jam. Cairan alantois dipanen setelah telur tersebut dimasukkan dalam almari es 4° C. Cairan alantois diputar 1000 g selama 45 menit, supernatan diambil dan diputar lagi 39.000 g selama 90 menit. Pelet disuspensikan dalam PBS 1:100, kemudian dengan volume yang sama ditambahkan PLC I (1 unit/ml) sehingga konsentrasinya 0,5 unit/ml dan diinkubasi 37° C dalam inkubator selama 2 jam. Untuk uji hemaglutinasi (HA) digunakan pelat mikro yang bagian dasarnya U 96 sumuran. Masing-masing sumuran diisi PBS 0,05 ml kemudian ditambahkan virus IB 0,05 ml pada sumuran nomor 1 selanjutnya diencerkan seri 2 kali sampai sumuran nomor 11 dengan menggunakan *diluter*. Eritrosit ayam 0,5 % ditambahkan pada virus tersebut dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Titer HA dibaca setelah 30 menit atau setelah kontrol eritrosit pada sumuran nomor 12 mengendap. Titer HA merupakan kebalikan dari pengenceran virus tertinggi yang masih mampu menimbulkan hemaglutinasi. Untuk uji HH digunakan antigen virus IB 4 HA unit.

Uji HH.

Untuk uji HH digunakan metodenya Hatcher *et al.* (1984), berguna untuk mengukur titer antibodi terhadap IB dalam sampel serum ayam. Untuk uji HH digunakan pelat mikro yang bagian dasarnya U 96 sumuran. Masingmasing sumuran diisi 0,025 ml PBS kemudian dalam sumuran nomor 1 diisi serum 0,025 ml, dengan diluter serum tersebut diencerkan seri 2 kali sampai sumuran nomor 10. Sumuran nomor 1 untuk kontrol serum, nomor 11 untuk kontrol virus, nomor 12 untuk kontrol eritrosit. Sumuran nomor 2-10 diisi antigen virus 4 HA sebanyak 0,025 ml dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Eritrosit ayam 0,5% ditambahkan pada semua sumuran. Titer HH dibaca setelah 30 menit atau setelah kontrol eritrosit mengendap. Titer HH merupakan kebalikan dari pengenceran serum tertinggi yang masih mampu menghambat hemaglutinasi.

Enzyme linked immunosorbant assay (Elisa)

Antigen virus IB yang telah di *coat* pada pelat mikro, ditambah 50 µl serum yang telah diencerkan dengan bufer 100 kali kemudian diinkubasi 30 menit pada suhu kamar. Pelat mikro tersebut dicuci 2 kali dengan bufer pencuci, kemudian ditambah *goat-anti chicken Ig-G peroxidase conjugate* dan diinkubasi 30 menit pada suhu kamar. Pelat mikro dicuci 2 kali dengan bufer pencuci kemudian ditambah 100µl substrat dan diinkubasi 15 menit pada suhu kamar. Untuk menghentikan reaksi pada pelat mikro tersebut ditambah *stop solution* 100µl, kemudian hasil dibaca

dengan pembaca Elisa pada 405 nm. Hasil yang didapat berupa nilai absorbansi. Nilai titer dikonversikan sebagai berikut:

$$SP = \frac{\text{absorbansi sampel-rata-rata absorbansi kontrol normal}}{\text{Absorbansi kontrol positif}}$$

$$\text{Log } 10 \text{ titer} = (1,64 \times \log SP) + 3,568$$

$$\text{Titer} = \text{antilog dari log } 10 \text{ titer}$$

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh titer antibodi dalam serum ayam pasca vaksinasi virus IB dengan uji HH dan Elisa seperti pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 tersebut setelah dilakukan perhitungan, pada peternakan I rata-rata titer HH (log)2 adalah 3,1± 2,5 sehingga geometrik *mean* titernya adalah 8,6 sedangkan titer antibodi dengan Elisa adalah 26.343,4. Pada peternakan II rata-rata titer HH (log)2 adalah 6,6± 1,7 sehingga geometrik *mean* titernya adalah 78,8, sedangkan dengan Elisa *mean* titernya adalah 10.276,5. Hasil tersebut setelah dilakukan analisa statistik menunjukkan bahwa hasil titer antibodi terhadap virus IB dengan uji HH dan Elisa pada peternakan I tidak ada korelasi (Gambar grafik 1), sedangkan hasil titer antibodi terhadap virus IB dengan uji HH dan Elisa pada peternakan II terdapat korelasi (R: 0,725) (Gambar grafik 2). Pada peternakan ayam I, dengan Elisa titer antibodi yang terukur sangat tinggi sedangkan dengan uji HH titer antibodinya rendah. Elisa merupakan uji yang kurang spesifik tetapi lebih sensitif untuk bereaksi

Tabel 1. Titer antibodi terhadap virus IB pada serum ayam pasca vaksinasi IB dengan uji HH dan Elisa.

No.	Titer HH (log)2	Titer Elisa
Peternakan I		
1.	4	31.476
2.	3	31.060
3.	5	27.535
4.	8	31.816
5.	2	33.457
6.	0	24.627
7.	0	21.531
8.	4	25.606
9.	5	18.899
10.	0	17.427
mean	3,1± 2,5	26.343,4
Peternakan II		
1.	8	11.927
2.	8	12.649
3.	6	5.504
4.	6	9.190
5.	7	19.827
6.	3	5.504
mean	6,6 ± 1,7	10.276,5

dengan berbagai macam serotipe, sehingga antibodi yang ditimbulkan oleh infeksi virus galur lain dalam jumlah kecilpun dapat terdeteksi, sebagai akibatnya titer antibodi yang dihasilkan lebih tinggi (Zellen dan Thorsen, 1987) dibanding uji HH bersifat kurang sensitif, tetapi lebih bersifat galur-spesifik Penelitian dengan uji HH dilakukan King dan Hopkins (1984^b), yang melaporkan bahwa hasil reaksi silang antara galur yang heterolog adalah lebih rendah dibandingkan dengan galur yang homolog sehingga uji HH tersebut lebih bersifat galur-spesifik sedangkan uji netralisasi serum lebih bersifat serotipe-spesifik (Zellen dan Thorsen, 1987).

Pada peternakan I tersebut titer antibodi sangat rendah yaitu 8,6, menurut Lashgari dan Newman (1982), titer antibodi dengan uji HH yang *mean* titernya kurang dari 32 dikategorikan kurang protektif dan berdasarkan standard pabrik dari KPL hasil titer dengan Elisa dengan *mean* titer yang terlalu tinggi (26.343,4) dikategorikan pada peternakan ayam tersebut dalam kondisi *outbreak* IB. Pada peternakan II *mean* titer antibodi ayam lebih bagus dibandingkan dengan titer antibodi pada ayam di peternakan I sehingga dikategorikan dalam titer yang protektif. Pada peternakan I tersebut kemungkinan di lokasi tersebut terdapat infeksi virus IB galur baru ataupun varian sehingga titer antibodi hasil vaksinasi tersebut tidak dapat melindungi adanya serangan virus IB di lapangan. Pada penelitian ini tidak dikontrol ada tidaknya infeksi virus IB sehingga perlu dilakukan isolasi dan identifikasi virus di lapangan. Untuk mengetahui tingkat protektivitas hasil vaksinasi dapat dilihat dari ketahanan terhadap uji tantang setelah 3-4 minggu pasca vaksinasi yaitu dievaluasi ada tidaknya sindrom respirasi dan hasil isolasi virus (Cavanagh dan Naqi, 1997).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa titer antibodi setelah vaksinasi virus IB dengan uji HH dan Elisa terdapat korelasi selama tidak ada indikasi adanya infeksi virus IB galur baru atau varian di lapangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih sebesar-besarnya disampaikan kepada bagian proyek DIKS Fakultas Kedokteran Hewan yang telah memberi dana dalam penelitian ini. Ucapan terimakasih juga disampaikan paada tim evaluator Fakultas Kedokteran Hewan UGM Drh. Darjono, M.Sc. Ph.D., DR. Drh. Slamet Subagyo, DR.

Drh. Siti Isrina O.S., yang telah memberi banyak saran dan masukan dalam penyusunan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Gillespie, J.H. and J.F. Timmone, 1988. Hagan and Bruner's Infectious Disease of Domestic Animals. 7th ed. Cornell University Press, Itaca, London.
- Hatcher, J.A., Skeeles, J.K., Blore, P.J. and Story, J.D. 1984. Comparison of The Haemagglutination-Inhibition Test with The Constant virus Diluting Serum Microneutralization Test for Detecting Antibody to Avian Infectious Bronchitis Virus. Avian Dis. Vol.27: 1157-1161.
- Cavanagh, D. and Naqi, S.A. 1997. Avian Infectious Bronchitis, dalam Diseases of Poultry. Nine ed. OIWA States University Press, Ames, USA. Hal: 487-503.
- Jordan, F.T.W. 1990. Poultry Diseases. Third ed. Balliere Tindal, London. Hal: 159-166.
- King, D.J. and Hopkins, S.R. 1984^a. Rapid serotyping of Infectious Bronchitis Virus Isolates with The Haemagglutination-Inhibition Test. Avian Dis. Vol. 28: 727-733.
- King, D.J. and Hopkins, S.R. 1984^b. Evaluation of The Haemagglutination-Inhibition Test for measuring The response of Chicken to Avian Infectious Bronchitis Virus Vaccination. Avian Dis. Vol. 27: 100-112.
- Lasghari, M.S. and Newman, J.A. 1984. Determination fo The antigenic Relationship within the Massachussets (M) Type of Infectious Bronchitis Virus Using The Haemagglutination-Inhibition Test. Avian Dis. Vol. 28: 444-452.
- Lasghari, M.S. and Newman, J.A. 1982. Preparing Haemagglutination Antigen From Isolates of Infectious Bronchitis Virus. Avian Dis. Vol. 26:509-519.
- Zellen, G.K. and Thorsen, J. 1987. Determination of The Antigenic Relationship Among Six Serotypes of Infectious Bronchitis Using The Enzyme-Linked Immunosorbant Assay Assay and serum Neutralization Test. Avian Dis. Vol. 31: 455-458.