

**IDENTIFIKASI SEROLOGIS VIRUS *INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS* ISOLAT  
MANGESTONI FARM DENGAN UJI AGAR GEL PRESIPITASI  
DAN UJI NETRALISASI**

**SEROLOGICAL IDENTIFICATION OF *INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS* VIRUS  
MANGESTONI FARM ISOLATE USING AGAR GEL PRECIPITATION TEST  
AND NEUTRALIZATION TEST**

**Michael Haryadi Wibowo**

**Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Sekip Unit II, Bulaksumur,  
Jogjakarta 55281, Telp./Fax (0274) 563083**

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan melakukan peneguhan diagnosis virus *infectious laryngotracheitis* (ILT) isolat Mangestoni farm (MF) menggunakan uji agar gel presipitasi (AGP) dan uji netralisasi. Uji tersebut didasarkan pada terbentuknya kompleks antigen-antibodi yang teramati sebagai garis presipitasi pada media semisolid dan proses penghambatan pertumbuhan virus pada membran korioalantois telur ayam berembrio umur 9-12 hari. Uji netralisasi dikerjakan secara berpasangan/homolog dan disilangkan/heterolog menurut prosedur beta, dosis 500 dosis infeksi- 50. Hasil uji AGP antara virus ILT isolat MF dengan serum anti isolat MF dan serum anti vaksin positif terbentuk garis presipitasi di antara sumuran antigen dan antibodi tersebut. Hasil uji netralisasi teramati adanya penghambatan pertumbuhan virus pada membran korioalantois telur ayam berembrio. Makin tinggi pengenceran serum, maka semakin rendah aktivitas hambatan pembentukan plak pada membran korioalantois tersebut. Menurut penelitian ini dapat disimpulkan bahwa virus ILT isolat MF tersebut secara serologis terbukti positif sebagai virus ILT.

**Kata kunci:** infectious laryngotracheitis, kompleks antigen-antibodi, plak membran korioalantois

**ABSTRACT**

The purposed of this research was done to identify infectious Laryngotracheitis virus Mangestoni farm isolate by serological method using agar gel precipitation (AGP) test and neutralization test. These test were based on forming of antigen-antibody complex which were visualized on semisolid media as a precipitation line and the obstacle of plaque formation on chorioallantois membrane of 9-12 days old chicken embryonating egg. Neutralization test was carried out by beta-procedure by diluting multiseres of serum and constant virus with 500-egg infectious dose-50, and tested crossly between the used antigen and antibody. The examination of AGP test positively occurred precipitation line between the well of antigen virus isolate and the well of antibody induced from both vaccine virus and isolate virus. Neutralization activity could be observed by having plaque formative obstacle at chorioallantois membrane. The higher the dilution of serum the lower the activity of plaque formative obstacle. Based on the result of these test, a conclusion was that the virus of Mangestoni farm isolate was proved as ILT virus.

**Key words:** infectious Laryngotracheitis, antigen-antibody complex, plaque of chorioallantois membrane

## PENDAHULUAN

Penyakit *Infectious Laryngotracheitis* (ILT) merupakan penyakit infeksi saluran pernafasan atas pada unggas yang disebabkan oleh virus *infectious laryngotracheitis* yang termasuk virus dalam famili *Herpesviridae* (Fenner, *et al.*, 1993). Jordan (1990) mengklasifikasi lebih lanjut virus penyebab ILT ke dalam sub-famili *Alpha-herpesvirinae*. Virus ILT pertama kali diisolasi oleh Beaudette pada tahun 1930, tetapi baru pada tahun 1963 berhasil dikarakterisasi sebagai virus herpes (Cover, 1996).

Peneguhan diagnosis infeksi virus ILT dapat dicapai dengan isolasi dan identifikasi agen penyebab penyakit. Identifikasi secara langsung dilakukan dengan pengamatan morfologi virus, oleh sebab itu teknik ini sangat tergantung pada jumlah partikel virus yang terdapat dalam sample (Fatunmbi *et al.*, 1995; Jordan 1990). Identifikasi secara tidak langsung dapat dilakukan secara serologis dengan mengetahui antibodi virus ILT (Jordan, 1990). Tripathy dan Hanson (1989) menyatakan ada beberapa teknik uji serologis yaitu: uji agar gel presipitasi, uji netralisasi, uji *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), dan uji antibodi fluoresen dengan *fluorescein-isothiocyanate* yang dilabelkan pada antibodi spesifik terhadap virus ILT. Beberapa teknik identifikasi modern terus dikembangkan antara lain dengan analisis genom virus dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dan DNA probes. Teknik identifikasi tersebut cukup akurat tetapi perlu biaya yang relatif mahal dan teknik yang rumit.

Uji agar gel presipitasi (AGP) lebih dikenal sebagai uji imunodifusi ganda atau uji *Ouchterlony*, merupakan teknik imunodifusi yang paling sering digunakan untuk menganalisis antigen antibodi (Kresna, 2000). Teknik ini memungkinkan proses visualisasi kompleks antigen-antibodi dalam suatu bentuk presipitat pada media semi solid. Antigen maupun antibodi akan berdifusi dengan arah yang saling berlawanan dan akhirnya bertemu membentuk garis presipitasi di antara sumuran antigen dan antibodi. Teknik identifikasi imunodifusi merupakan teknik identifikasi yang dapat dikerjakan untuk virus ILT dengan akurat, murah dan mudah dikerjakan (Beard, 1989). Jordan (1990) menegaskan bahwa untuk mengetahui adanya antibodi spesifik terhadap virus ILT dapat dilihat dengan uji AGP, sedangkan Gillespie dan Timoney (1988) menyatakan bahwa uji AGP biasa digunakan untuk membuat suatu diagnosis cepat pada virus ILT. Uji AGP ini lebih bersifat kualitatif namun demikian tetap bermanfaat untuk mendeteksi antibodi ayam yang diduga terinfeksi virus ILT dalam suatu flock.

Uji netralisasi merupakan uji yang bertujuan untuk mengetahui adanya antibodi netralisasi, oleh sebab itu juga sering disebut sebagai serum netralisasi. Uji netralisasi tersebut didasarkan pada kenyataan bahwa aktivitas virus yang termanifestasi sebagai efek sitopatik pada kultur sel, lesi atau kematian embrio pada telur berembrio dan gejala klinis pada hewan percobaan, akan dihambat oleh serum anti spesifik yang dihasilkan oleh virus yang menstimulasi pembentukan antibodi tersebut (Robert dan Carter, 1976). Hal tersebut ditegaskan oleh Bagust dan Guy (1997); Hanson dan Bagust (1991) bahwa uji netralisasi dapat digunakan untuk menunjukkan ada dan tidaknya antibodi terhadap virus ILT. Menurut Barnet yang disitasi oleh Hanson dan Bagust (1991), aktivitas netralisasi serum antivirus ILT dapat diukur dengan melihat aktivitas pembentukan plak pada membran korioallantois telur ayam berembrio.

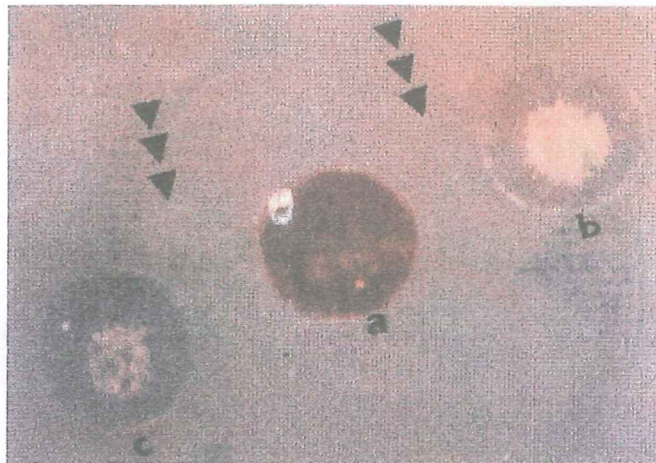
Penelitian ini bertujuan untuk melakukan peneguhan diagnosis virus ILT isolat Mangestoni farm dengan identifikasi serologis menggunakan uji AGP dan uji netralisasi.

## MATERI DAN METODE

### Titirasi virus ILT isolat MF dan virus vaksin.

Titirasi bertujuan untuk mengetahui titer virus, yang berguna untuk menentukan dosis infeksi dalam uji netralisasi. Stok virus ILT isolat MF, diambil dari tabung nitrogen cair di Laboratorium Ilmu Hayati, Universitas Gadjah Mada, *dithawing*, kemudian diambil sampel 0,1 ml untuk dititirasi. Virus vaksin aktif ILT produksi AAKO, Belanda, bentuk kering beku dilarutkan dengan PBS 10 ml yang mengandung penisilin 1000 IU per ml, streptomisin 100 ug per ml dan fungizone 5 ug per ml. Dari larutan vaksin tersebut diambil 0,1 ml kemudian diencerkan dengan PBS steril sebanyak 0,9 ml. Sampel titirasi diambil dari larutan vaksin terakhir sebanyak 0,1 ml.

Titirasi virus ILT isolat MF dan virus vaksin, menggunakan telur berembrio umur 9-12 hari, mengacu metode Burleson *et al.*, (1992). Kedua virus diencerkan bertingkat  $10^1$  sampai  $10^{10}$ , dengan PBS sebagai pengencer. Masing-masing enceran virus tersebut diinokulasikan ke-5 unit tes pada membran korioallantois telur ayam berembrio dengan dosis 0,1 ml. Kontrol digunakan 5 butir telur ayam berembrio yang diinokulasi dengan PBS. Dosis Infeksi-50 (DI-50) dihitung dengan rumus Reed dan Muench. DI-50 merupakan pengenceran virus tertinggi yang mampu menginfeksi atau membunuh embrio sebanyak 50% (Burleson *et al.*, 1992).



**Gambar 1.** Hasil uji AGP teramati garis presipitasi (tanda panah) antara sumuran antigen-antibodi. a. sumuran virus isolat, b. sumuran serum anti vaksin (kontrol positif) dan c. sumuran serum anti isolat.

### Produksi serum anti virus ILT.

Ayam petelur strain *Lohman Brown*, umur 50 hari sebanyak 6 ekor dibagi dalam 2 kelompok, masing-masing 3 ekor dan diadaptasi dalam kandang percobaan selama satu minggu. Kelompok pertama dipakai untuk memproduksi serum anti virus ILT dengan vaksin aktif ILT produksi AAKO, Belanda, diberikan tetes mata pada umur 58 hari dan di-booster satu bulan kemudian. Koleksi serum anti dilakukan pada minggu ke-3 pasca vaksinasi dan diulang setiap minggu sampai minggu ke-12 pasca vaksinasi pertama. Kelompok kedua digunakan untuk memproduksi serum anti virus ILT isolat MF.

Stok virus ILT isolat MF diinaktivasi dengan formalin 10% dengan konsentrasi 0,1% dari total volume supernatan yang akan diinaktivasi, kemudian diinkubasi pada suhu 24°C selama 2-4 jam. Virus yang telah inaktif tersebut ditambahkan adjuvant (*freund's complete adjuvants*) sebanyak supernatan dan diemulsikan menggunakan spuit sampai berbuih serta berwarna putih. Vaksin inaktif tersebut disuntikkan pada ayam kelompok kedua secara subkutan dosis 2-3 ml per ekor. Koleksi serum anti isolat MF tersebut diambil pada minggu ke-5, diulang setiap minggu sampai minggu ke-12 setelah vaksinasi.

### Identifikasi Serologis.

#### a. Uji Agar Gel Presipitasi (AGP).

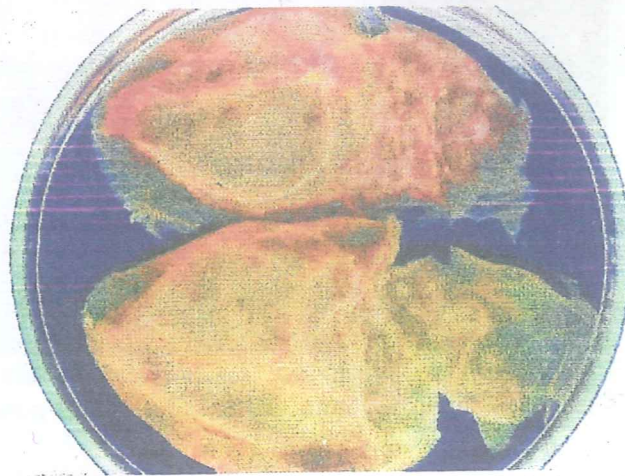
Agar murni (*purified agar*) 0,3% dilarutkan dalam aquadestilata steril, dipanaskan sampai mendidih, kemudian ditetaskan pelan-pelan pada obyek gelas yang ditempatkan di meja datar. Lapisan yang terbentuk didiamkan sampai padat dan dipindahkan ke dalam inkubator suhu 37°C selama

24 jam (proses pelapisan/*coating*). Kaca obyek tersebut kemudian diambil dan ditambahkan agar murni 1% dalam *phosphate buffer saline* (PBS), yang mengandung 8,5% NaCl sebanyak 5 ml dengan pipet ukur 5 ml. Setelah agar mengeras dibuat sumuran satu di tengah dan dikelilingi dua sumuran sesuai pola yang ada.

Spesimen virus ILT isolat MF sebanyak 50 mikroliter ditetaskan ke dalam sumuran di tengah menggunakan mikro pipet, sedangkan sumuran di sekelilingnya ditetaskan serum anti isolat MF dan serum anti virus ILT (kontrol positif) sebanyak 50 mikroliter. Kaca obyek tersebut kemudian ditempatkan dalam cawan petri yang berdiameter 20 cm yang dilapisi dengan kapas basah dan ditempatkan di atas meja datar serta diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam. Uji AGP positif bila terbentuk garis presipitasi di antara sumuran antigen dan antibodi (Beard, 1989).

#### Uji Netralisasi.

Prosedur uji netralisasi mengacu metode Beard (1989), yaitu: kedua serum anti virus, diinaktivasi dalam penangas air pada suhu 56°C selama 1 jam. Serum tersebut kemudian diencerkan secara bertingkat  $2^1$  sampai  $2^{10}$  dalam suatu tabung reaksi ukuran 7 ml. Tiap 0,5 ml enceran serum anti ditambahkan 0,5 ml virus ILT isolat MF yang didalamnya terdapat 10 kali 500 DI-50. Dosis inokulasi yang diberikan adalah 0,1 ml yang berarti tiap inokulasi mengandung virus 500 DI-50 (Sardjono, komunikasi pribadi). Sebagai kontrol digunakan serum normal atau PBS. Uji netralisasi dikerjakan secara berpasangan/homolog, dan secara silang/heterolog. Uji tersebut menggunakan telur



Gambar 2. Hasil uji netralisasi teramati lesi edematous, plak tebal dan merata hampir di seluruh permukaan membran korioalantois pada pengenceran serum anti  $10^{-8}$ .

ayam berembrio umur 9-12 hari dengan inokulasi pada membran korioalantois. Prosedur kerja inokulasi tersebut mengacu metode Burlison *et al.*, (1992).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji Agar Gel Presepitasi.

Serum anti vaksin ILT yang digunakan dalam uji AGP yang dikoleksi minggu ke-3 sampai minggu ke-7 maupun serum anti isolat MF yang dikoleksi pada minggu ke-5 sampai dengan minggu ke-7 belum dapat teramati garis presipitasi. Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi proses presipitasi kompleks antigen-antibodi adalah konsentrasi antigen dan antibodi sendiri; oleh sebab itu pada penelitian ini dicoba dengan pemekatan antigen dengan ultrasentrifugasi berpendingin suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dengan kecepatan putar 72.000 g selama satu jam. Antigen tersebut kemudian digunakan dalam uji AGP dengan serum yang dikoleksi pada minggu ke-8, 9, dan 10, tetapi juga belum berhasil terbentuk garis presipitasi, oleh karena itu serum anti yang dikoleksi pada minggu ke-11 dipekatkan dengan proses liopilisasi selama 24 jam. Antigen dan antibodi yang telah dipekatkan tersebut kemudian diuji AGP, dan berhasil diamati terbentuknya garis presipitasi diantara sumuran antigen dan antibodi. (gambar 1). Pada penelitian ini tidak didesain menggunakan serum anti yang berdekatan, oleh sebab itu tidak dapat ditunjukkan garis identitas (*line of identity*) tetapi ikatan kompleks antigen antibodi virus ILT tersebut dapat diamati pada garis presipitasi yang terbentuk diantara sumuran antigen dan antibodi.

Laporan beberapa peneliti, menyatakan bahwa mekanisme kekebalan humoral akibat infeksi virus ILT bukan mekanisme utama tetapi sebagai pertahanan sekunder; oleh sebab itu pengukuran sistem pertahanan humoral pada infeksi virus ILT tampaknya menjadi lebih sulit dan diperlukan modifikasi teknis tertentu sebagaimana dikonfirmasi dalam penelitian ini. Perlu juga diperhatikan beberapa faktor yang berperan dalam keberhasilan uji AGP antara lain: konsentrasi antigen-antibodi, yaitu bahwa baik antigen maupun antibodi harus mencapai perbandingan yang proporsional. Aviditas antibodi yang menentukan derajat stabilitas kompleks antigen-antibodi. Suhu, pH dan kelembaban juga mempunyai peranan dalam keberhasilan uji AGP (Kresno, 2000).

### Uji Netralisasi.

Hasil perhitungan titer virus menurut rumus Reed dan Muech adalah sebagai berikut: titer virus vaksin ILT adalah  $10^{3,57}$  per ml sedangkan titer virus isolat MF adalah  $10^{3,68}$  per ml. Nilai yang diperoleh tersebut masing-masing merupakan pengenceran virus yang mampu menginfeksi 50 % unit tes, pada telur ayam berembrio umur 9-12 hari.

Serum anti vaksin ILT dan serum anti isolat MF yang digunakan dalam uji netralisasi diambil pada minggu ke-12 setelah vaksinasi, hal tersebut mengacu penelitian Andreasen *et al.*, (1989). Secara kualitatif uji netralisasi dalam penelitian ini, baik serum anti yang dipasangkan secara homolog maupun heterolog, berhasil membuktikan bahwa aktivitas netralisasi antibodi teramati dengan adanya penghambatan pembentukan lesi plak pada membran

korioalantois telur ayam berembrio. Semakin tinggi pengenceran serum anti semakin kecil penghambatan antibodi terhadap pertumbuhan virus. Hal tersebut teramati pada semakin banyak dan tebal plak yang terbentuk pada permukaan membran korioalantois telur ayam berembrio, disamping itu secara makroskopis membran tersebut teramati lesi edematous yang sangat nyata (Gambar 2). Lesi membran tersebut dapat sebagai parameter adanya pertumbuhan virus ILT dan teramatinya aktivitas serum anti spesifik terhadap virus ILT tersebut merupakan indikator yang bermanfaat untuk mengetahui pendedahan virus ILT (Andreasen *et al.*, 1990).

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa virus ILT isolat MF secara serologis terbukti positif sebagai virus ILT. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengukur patogenisitas serta karakterisasi molekuler virus isolat MF tersebut.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Drs. B. Sarjono, MSc. Atas segala masukan yang telah diberikan kepada penulis. Terima kasih juga disampaikan kepada Direktur Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan bantuan penelitian melalui beasiswa Program Pasca Sarjana.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Andreasen Jr., J.R., Glisson, J.R., Goodwin, M.A., Resurreccion, R.S., Villegas, P. dan Brown, J. 1989. Studies of Infectious Laryngotracheitis Vaccines: Immunity in Layer. *Avian Dis.* 33: 516-523.
- Andreasen Jr., J.R., Brown, J., Glisson, J.R., dan Villegas, P. 1990. Reproducibility of a Virus-Neutralization Test for Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Dis.* 34: 185-192.
- Bagust, T.J. dan Guy, J.S. 1997. Laryngotracheitis. Dalam Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L. R., dan Saif, Y.M. (eds). *Diseases of Poultry*. Tenth edition. Iowa State University Press., Ames, Iowa. Hal.: 527-536.
- Beard, C.W. 1989. Serologic Procedures. Dalam Purchase, H.G., Arp, H. L., Domermuth, C. H., dan Pearson, J.E. (eds). *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. Third edition. Kendall/Hunt Publishing Company, Iowa. Hal.: 192-200.
- Burleson, F.G., Chamber, T.M., dan Wiedbrauk, D.L. 1992. *Virology a Laboratory Manual*. Academic Press Inc., San Diego. Hal.: 45-47 dan 68 - 73.
- Cover, M. S. 1996. The Early History of Infectious Laryngotracheitis. *Avian Dis.* 40: 494-500.
- Fatunmbi, O.O., Reed, W.M., Schwartz, D.L. dan Tripathy, D.N. 1995. Dual Infection of Chicken with Pox and Infectious Laryngotracheitis Confirmed with Specific Pox and Infectious Laryngotracheitis DNA Dot-Blot Hybridization Assay. *Avian Dis.* 39: 925-930.
- Fenner, F. J., Gibb, E. P., Murphy, F. A., Rott, R., Studdert, M. J., dan White, D. O., 1993. *Veterinary Virology*. Academic Press, Inc. Hal.: 337-368.
- Gillespie, J.H., dan Timoney, J.F. 1988. The Herpesviridae. Dalam Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W., dan Barlough, J.E. (eds). *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animal*. Comstock Publishing Associates, A Division of Cornell University Press, London. Hal.: 591-594 dan 628-630.
- Hanson, L.E., dan Bagust, T.J. 1991. Laryngotracheitis. dalam: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Reid, W.M. dan Yoder Jr., H.W. (eds). *Diseases of Poultry*. Ninth edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp: 485-592.
- Jordan, F.T.W. 1990. Infectious Laryngotracheitis. Dalam Jordan, F.T.W. (ed). *Poultry Diseases*. The University Press, Cambridge, Great Britain. Hal.: 154-158.
- Kresno, S.B. 2000. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur*. Edisi III. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. Hal.: 271-273.
- Robert, A. W. dan Carter, G. R. 1976. *Essensial of Veterinary Virology*. Michigan State University Press, Michigan. Hal.: 22.
- Tripathy, D.N., dan Hanson, L.E., 1989. Laryngotracheitis. Dalam Purchase, H.G., Arp, H.L., Domermuth, C.H. dan Pearson, J.E. (eds). *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogen*. Third edition. Kendall/Hunt Publishing Company, Iowa. Hal.: 85-87.