

Pengembangan Teknik *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* untuk Mendeteksi adanya Antibodi Terhadap Virus *Infectious Laryngotracheitis* dalam Serum Ayam

RISA INDRIANI, R.M ABDUL ADJID, DARMINTO, dan HELMY HAMID

Balai Penelitian Veteriner, PO BOX 151, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 09 Oktober 2002)

ABSTRACT

INDRIANI R., R.M ABDUL ADJID, DARMINTO, dan HELMY HAMID. 2002. The development of an *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* for detecting *Infectious laryngotracheitis* viral antibodies in chicken serum. *JITV* 7(2): 130-137.

The aim of this study was to develop an Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibody against gallid herpes virus, the causal agent of infectious laryngotracheitis (ILT) in chicken. Its application in experimental chicken under laboratory condition was also evaluated. Results showed that ELISA for ILT was developed successfully with sensitivity and specificity was 98% and 97,14% respectively. The ELISA was able to determine the dynamic of antibodies respond in experimental chickens following vaccination and artificial infection with ILT virus. It was concluded that this ELISA offers a simple, sensitive and specific antibody assay for detection of antibodies against ILT virus in chickens arising from vaccination or infection.

Key words: ELISA, antibody, chicken, *Infectious laryngotracheitis*

ABSTRAK

INDRIANI R., R.M ABDUL ADJID, DARMINTO, dan HELMY HAMID. 2002. Pengembangan teknik *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* untuk mendeteksi adanya antibodi terhadap virus *Infectious laryngotracheitis* dalam serum ayam. *JITV* 7(2): 130-137.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan *Enzyme-Linked Immunosorbents Assay* (ELISA) yang berfungsi untuk mendeteksi adanya antibodi *gallid* herpes virus, penyebab penyakit *infectious laryngotracheitis* (ILT) pada ayam. Aplikasi ELISA pada serum ayam hewan percobaan pada kondisi laboratorium juga dievaluasi. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa ELISA telah berhasil dikembangkan dengan tingkat sensitifitas dan spesifisitas masing-masing secara berurutan 98% dan 97,14%. ELISA ILT yang dikembangkan dapat mengetahui dinamika respon antibodi pada hewan percobaan yang sengaja divaksinasi dan kemudian diinfeksi lagi dengan virus ILT. Disimpulkan bahwa ELISA yang dikembangkan dapat digunakan sebagai perangkat uji serologi untuk mendeteksi adanya antibodi terhadap virus ILT dalam serum ayam, baik ayam yang divaksinasi maupun akibat infeksi.

Kata kunci : ELISA, antibodi, ayam, *Infectious laryngotracheitis*

PENDAHULUAN

Infectious Laryngotracheitis (ILT) adalah penyakit saluran pernafasan pada unggas, terutama ayam (HANSON dan BAGUST, 1991). Penyakit ini disebabkan oleh virus, yaitu gallid herpes virus (MURPHY *et al.*, 1995). Terdapat 2 bentuk penyakit ILT, yaitu bentuk *severe epizootic* dan *mild enzootic*. Bentuk *severe epizootic* ditandai dengan gejala gangguan pernafasan: batuk, pilek; muntah darah, serta kematian yang tinggi (90–100%). Bentuk *mild enzootic* ditandai dengan kelesuan, penurunan produksi telur, mata berair, radang konjungtiva, pembengkakan sinus orbital, dan penyumbatan hidung (BAGUST *et al.*, 2000). Penelitian virus ILT pernah dilakukan pada ayam dan anak ayam, meliputi virulensi serta karakterisasi virus seperti, morfologi, ukuran plaque pada jaringan sel dan bentuk

poks pada membran korion telur ayam tertunas (BAGUST dan GUY, 1997). Virus ILT memiliki lebih dari satu strain, akan tetapi virusnya hanya memiliki satu tipe antigenik. Dengan demikian untuk keperluan serologik cukup digunakan satu strain saja untuk mendeteksi antibodi terhadap infeksi semua strain virus ILT (BAGUST *et al.*, 2000).

ELISA merupakan salah satu uji serologi untuk mendeteksi adanya antibodi dalam serum hewan. Teknik ini sangat disukai karena secara umum lebih sensitif, spesifik, sangat efektif dan efisien untuk menguji sampel dalam jumlah besar, lebih murah, serta cukup mudah pengerjaannya. Penggunaan ELISA untuk penyakit unggas sudah banyak dilakukan oleh peneliti sebelumnya diantaranya SLAGHT *et al.* (1978), HOWIE dan THORESEN (1981). Deteksi antibodi terhadap virus ILT dengan uji ELISA pertama kali dikembangkan oleh MEULEMANS dan HALEN (1982). Uji ini dikembangkan

sebagai uji alternatif dengan hasil yang cepat, sensitif, dan spesifik. ADAIR *et al.* (1985) dan BAUER *et al.* (1999) melaporkan bahwa ELISA memiliki sensitifitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan uji serum netralisasi.

Di Indonesia, penggunaan kit ELISA komersial ILT yang berasal dari luar negeri untuk mendeteksi adanya reaktor antibodi terhadap ILT, pada ayam ras dan buras telah dilakukan oleh MANGUNWIRYO *et al.* (1995), dan WIYONO *et al.* (1996). Hasilnya memperlihatkan bahwa prevalensi reaktor ILT pada ayam ras dan buras masing-masing secara berurutan mencapai 90% dan 73-92,5%. Penggunaan ELISA komersial asal impor tersebut memerlukan waktu dan biaya yang tidak sedikit, bahkan dapat menyebabkan ketergantungan akan produk impor. Dalam rangka menyaingi krisis moneter yang berkepanjangan, laboratorium virologi Balitvet sedang mengembangkan produk diagnostik untuk ILT. Uji ELISA untuk mendeteksi adanya antibodi virus ILT dalam serum ayam yang metode pengembangannya mengikuti standar OIE (1996) dan para peneliti sebelumnya (MEULEMANS dan HALEN, 1982), tentunya dengan modifikasi sesuai kondisi dan kemampuan yang tersedia. Adanya perangkat uji ELISA dalam negeri yang dapat diperoleh setiap saat ini diharapkan dapat mengatasi ketergantungan akan produk impor dan menurunkan besarnya biaya yang diperlukan.

MATERI DAN METODE

Penyiapan antigen ELISA ILT

Antigen ELISA ILT dibuat dan disiapkan mengikuti prosedur MEULEMANS dan HELEN (1982) dengan beberapa modifikasi. Virus yang dipergunakan adalah virus ILT yang telah diatenuasi (Laryng-Vac Intervet). Virus ini ditumbuhkan pada biakan sel yang dibuat dari sel hati embrio ayam *specific pathogenic free* (SPF) pada *flask* plastik ukuran 175 cm². Sel ini selanjutnya disebut *cell liver* (CELi). Sel yang telah diinfeksi virus ILT diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48-72 jam. Bila pada biakan sel telah terlihat *cytopathogenic effect* (CPE), sel kemudian dibeku-cairkan dua kali. Cairan supernatan dari biakan sel diambil dan dipusing dengan kecepatan 5.000 x g selama 30 menit. Selanjutnya cairan supernatan tadi dipusing kembali menggunakan sentrifuse ultra dengan kecepatan 50.000 x g pada suhu 4°C selama 120 menit. Pelet yang dihasilkan ditambah larutan tris buffer pH 7,4 dan disimpan pada suhu -30°C.

Kontrol antigen disiapkan dari biakan jaringan sel CELi yang tidak diinfeksi dengan virus ILT. Cel ini dibeku-cairkan dua kali. Selanjutnya diproses dan disimpan sama seperti pembuatan antigen ELISA ILT dan disimpan pada suhu -30°C.

Antigen ELISA kemudian dititrasi kandungannya dengan mengacu pada metode LOWRY (dalam PATTERSON, 1989).

Pembuatan serum standar ILT

Serum standar negatif diperoleh dari 8 ekor ayam SPF berumur 6 minggu. Sedangkan serum standar ILT dibuat pada 8 ekor ayam SPF umur 6 minggu yang divaksin dengan vaksin komersial (Laryngo-vac, Intervet). Vaksinasi pertama diberikan melalui intra trakea dengan dosis 10²⁻⁴ TCID₅₀. (MEULEMANS dan HALEN, 1982). Setelah 3 minggu ayam diinfeksi dengan virus asal vaksin ILT komersial (Laryngo-vac, Salsbury Lab. Inc. Charles City, Iowa) secara intra muskuler. Virus vaksin ini ditumbuhkan terlebih dahulu pada biakan jaringan CELi dan dimurnikan. Pemurnian virus ini menggunakan sentrifuse ultra dengan kecepatan 50.000 x g pada suhu 4°C selama 120 menit dan selanjutnya pellet virus yang diperoleh dimasukkan pada sucrose gradient dengan konsentrasi 30% dan 50% kemudian di pusing dengan kecepatan 50.000 x g pada suhu 4°C selama 120 menit. Lapisan awan antigen yang terbentuk kemudian dicampur dengan *Freund's Complete Adjuvant* dengan perbandingan 1:1 (YORK *et al.*, 1983). Darah ayam diambil pada minggu ke 2 dan 3 pasca vaksinasi ke dua. Serumnya dipisahkan dan dikumpulkan (pooled sera). Serum ini memiliki titer antibodi uji ELISA dengan uji ELISA (kit produksi Tropbio) yaitu, pada standar group ELISA 7 atau 256 ELISA unit (Eu). Serum ini dapat digunakan sebagai standar positif serum terhadap virus ILT (YORK *et al.*, 1983).

Prosedur ELISA

Prosedur dari teknik ELISA yang dikembangkan mengikuti prosedur OIE (1996) dengan modifikasi yaitu, menggunakan lempeng mikrotiter dari bahan polysterene (Nunc Laboratories). Setiap lubang lempeng mikrotiter diisi 50 µl antigen, dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 60 menit. Lempeng mikrotiter dicuci 3 kali dengan fosfat buffer saline (PBS) pH 7,2 mengandung 0,05% tween-20 (PBST). Sebanyak 50 µl serum ayam diencerkan 1:100 dalam Tris-EDTA-NaCl (TEN) dan 5% casein (TENC) lalu ditambahkan ke dalam lempeng mikrotiter. Selanjutnya lempeng mikrotiter diinkubasi selama 60 menit pada suhu kamar dan dicuci dengan PBST sebanyak 3 kali. Kemudian 50 µl konjugat Rabbit anti-chicken IgG-HRPO (Sigma. Cat. log no. A.9046) ditambahkan kedalam setiap lubang lempeng mikrotiter dan dibiarkan selama 60 menit pada suhu kamar, selanjutnya lempeng mikrotiter dicuci dengan PBST 3 kali. Setiap lubang lempeng ditambahkan 100 µl

substrat 2,2-Azino-di-(3-athyl-benzthiazolinsulfonat)(6) (ABTS) (Sigma. Cat. log no. A.1888) dan dibiarkan pada suhu kamar selama 60 menit. Intensitas warna yang dihasilkan diukur dengan alat pembaca ELISA pada panjang gelombang 490 nm dan dinyatakan dalam nilai densitas optik (OD).

Penentuan enceran optimal dari antigen, serum dan konjugat

Penentuan enceran antigen, serum dan konjugat yang memberikan reaksi optimal (MEULEMANS dan HELEN, 1982) dilakukan dengan *checkerboard*. Stok antigen (mengandung 1295 µg/ml) dilarutkan dalam buffer karbonat-bikarbonat pH 9,6 menjadi enceran yang mengandung antigen dengan konsentrasi 10µg/ml, 5µg/ml, 2,5µg/ml dan 1,25µg/ml. Serum standar ILT dan serum negatif SPF diencerkan dalam TENC 1:100 dan 1:200. Konjugat diencerkan dalam TENC 1:2.000, 1:5.000 dan 1:10.000. Reaksi ulang dilakukan sebanyak 12 kali. Enceran yang menghasilkan rasio reaksi optimum antara serum positif dan serum negatif (P/N ratio) dengan nilai lebih besar atau sama dengan 10 digunakan dalam prosedur teknik ELISA.

Penentuan nilai *cut-off* untuk ELISA

Nilai *cut off* reaksi spesifik untuk ELISA yang dikembangkan diperoleh dengan menguji 140 serum ayam SPF. Serum ayam ini telah diperiksa dengan uji serum netralisasi (SN) dan hasilnya negatif terhadap adanya antibodi virus ILT. Nilai rata-rata densitas optik (OD) dari seluruh serum yang diuji kemudian ditambah 3 kali nilai standard deviasi (sd) dijadikan nilai *cut off* dari uji ELISA.

Evaluasi adanya reaksi silang dengan infeksi virus pernafasan lainnya

Untuk mengetahui adanya reaksi silang terhadap virus penyakit pernafasan lain seperti, infectious bronchitis (IB), maka dilakukan pengujian ELISA terhadap serum yang mengandung antibodi spesifik untuk virus IB.

Uji serum netralisasi (SN)

Uji SN yang digunakan mengikuti prosedur BAUER *et al.* (1999), menggunakan lempeng mikrotiter 96 lubang (Nunc) steril. Sebanyak 0,05 ml serum uji secara duplikat, yang telah diinaktifkan pada suhu 56°C selama 30 menit, diencerkan secara serial kelipatan dua dalam 0,05 ml cairan media sel (*Hank's medium* 199 dengan NaHCO₃ yang mengandung 100 IU/ml penicillin, 0,1 mg streptomycin/ml, 2,5 µg/ml *fungizone*, 8% *foetal calf serum* (FCS) , 10 ml HEPES buffer/ 500ml dan

1,75 ml glutamin/500 ml). 0,05 ml cairan media sel yang mengandung 100 TCID₅₀ virus ILT NS-175 (BPM SOH) ditambahkan ke dalam setiap lubang pada lempeng mikrotiter. Kemudian lempeng mikrotiter diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian 0,1 ml cairan yang mengandung sel *chicken embryo fibroblast* (CEF) dengan konsentrasi 10⁶ cell/ml dalam media penumbuh ditambahkan ke dalam setiap lubang pada lempeng mikrotiter lalu diinkubasi pada suhu 37°C. Pembacaan titer antibodi dilakukan setelah 3 – 4 hari masa inkubasi. Kontrol virus dan sel disertakan dalam setiap lempeng mikrotiter sebagai pembanding.

Evaluasi sensitifitas dan spesifisitas ELISA

Evaluasi sensitifitas dan spesifisitas dari teknik ELISA yang dikembangkan dibandingkan dengan uji standar serum netralisasi (SN) yaitu dengan memeriksa serum-serum ayam percobaan di laboratorium. Serum ayam SPF (belum terinfeksi ILT) dan serum ayam yang diinfeksi secara buatan dengan virus ILT digunakan untuk evaluasi ILT. Serum belum terinfeksi ILT (SPF) sebanyak 140 serum diperiksa dengan uji SN hasilnya negatif. Sementara itu, serum ayam terinfeksi virus ILT sebanyak 100 sampel serum SPF yang diinfeksi buatan dengan isolat BGR-6; dan isolat BKS-3 dengan SN hasilnya menunjukkan adanya antibodi terhadap ILT. Uji ELISA kemudian digunakan untuk menguji semua serum tersebut.

Sensitifitas dari uji ELISA merupakan porsi dari sampel terinfeksi yang menghasilkan nilai ELISA positif. Sementara itu, spesifitas dari uji ELISA merupakan porsi dari sampel bebas ILT (uji SN negatif) yang menghasilkan nilai ELISA negatif (BALDOCK, 1988).

Aplikasi ELISA dalam mendeteksi antibodi virus ILT dalam serum ayam

Aplikasi ELISA untuk mendeteksi adanya respon antibodi terhadap virus ILT dilakukan pada serum ayam percobaan. Enam ekor ayam SPF umur 6 minggu divaksin dengan vaksin hidup komersil (Laryngo-vac, Intervet) dengan dosis 10^{2,4} TCID₅₀ secara intratrakea. Kemudian 9 minggu pasca vaksinasi, ayam tersebut diinfeksi dengan virus ILT isolat lapang 10⁴ EID₅₀ per 0,1 ml secara intratrakea. Serum dikoleksi dan diuji ELISA pada minggu ke 1- 9 pasca vaksinasi dan 1-3 minggu pasca infeksi. Serum tersebut kemudian diuji dengan ELISA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian memperlihatkan antigen yang dihasil dari penumbuhan virus ILT pada 6 *flask* plastik berukuran 175 Cm² biakan sel CELi diperoleh 2 ml

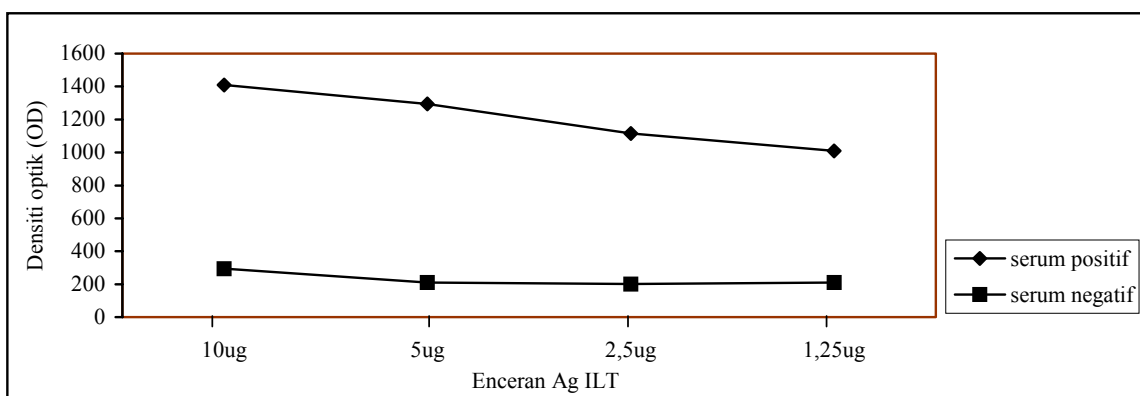
antigen ELISA. Dengan metode LOWRY (dalam PATTERSON, 1989) diketahui kandungan protein antigen yaitu, 1295 µg/ml.

Untuk mengetahui jumlah antigen yang memberikan reaksi optimum dalam uji ELISA maka dilakukan titrasi reaksi antigen menggunakan sistem *checkerboard* bersama sama dengan titrasi konjugat dengan enceran serum standar positif dan negatif. Empat enceran antigen yang mengandung 10; 5; 2,5; dan 1,25 µg; setiap ml; 3 enceran konjugat 1/10.000; 1/5.000; 1/2.000 serta menggunakan satu enceran serum (1/100) diteliti reaksinya dalam ELISA. Hasil disajikan pada Gambar 1; 2; dan 3.

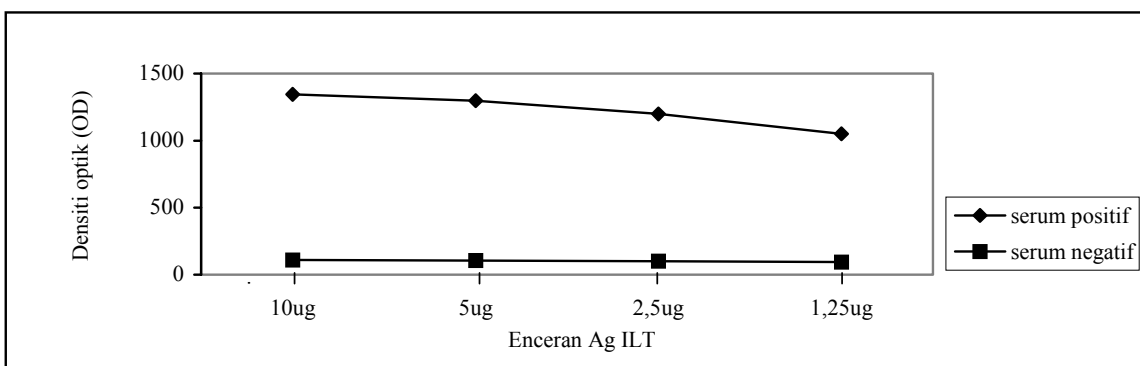
Dari Gambar 1 terlihat reaksi antigen antibodi pada beberapa konsentrasi antigen ILT 10; 5; 2,5; dan 1,25 µg dengan konjugat 1/2.000 memberikan reaksi antigen-antibodi dengan P/N ratio < 10, hal ini terlihat dari nilai OD serum negatif yang cukup tinggi yaitu diatas 0,200 sedangkan OD serum positif tertinggi 1,409. Pada Gambar 2 reaksi beberapa enceran antigen

ILT dengan enceran konjugat 1/5.000 memperlihatkan OD serum negatif lebih rendah dan OD serum positif cukup tinggi, berbeda dengan reaksi antigen-antibodi pada enceran konjugat 1/10.000 yang mana OD serum negatif cukup rendah akan tetapi OD serum positif pun rendah (Gambar 3). Untuk mengurangi adanya reaksi antigen antibodi yang bersifat non spesifik dan penggunaan konjugat yang lebih ekonomis maka pengenceran 1/5.000 dipilih sebagai enceran konjugat yang optimum.

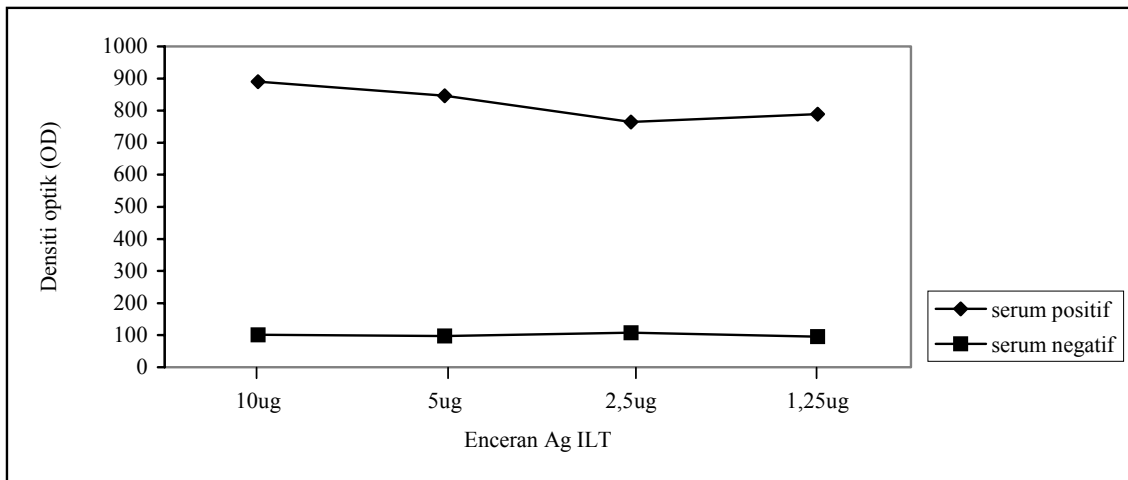
Selanjutnya reaksi antigen-antibodi dari enceran antigen ILT 10µg/ml dengan enceran konjugat 1/5.000 memperlihatkan nilai OD tertinggi pada serum positif yaitu, 1,346 dan OD serum negatif 0,109 berbeda pada enceran antigen ILT 5µg/ml yang mana OD serum positif lebih rendah yaitu, 1,298 dan OD serum negatif 0,105. Untuk lebih melihat pengaruh antigen ILT pada uji ELISA maka di pilih enceran konsentrasi antigen ILT 10 µg/ml sebagai enceran antigen pelapisan, hal ini diperlihatkan P/N ratio >10 (Gambar 2).



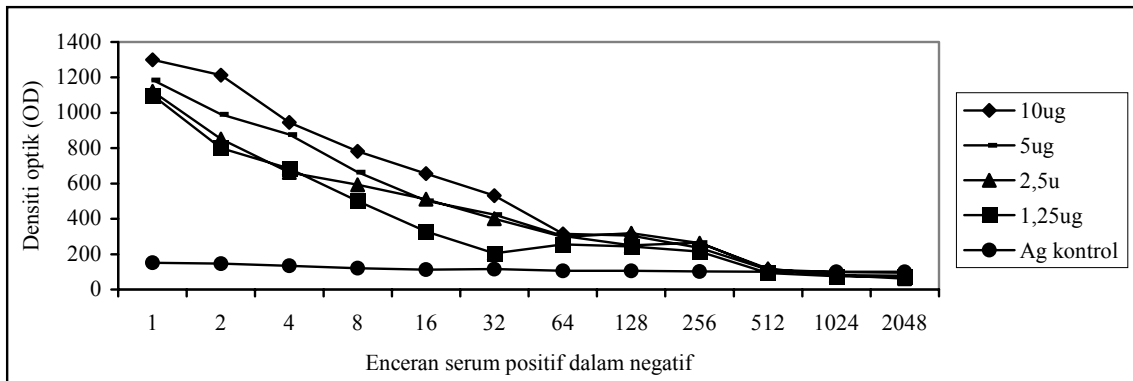
Gambar 1. *Checkerboard* beberapa enceran Ag ILT dengan enceran konjugate 1/2.000 dan enceran serum 1:100



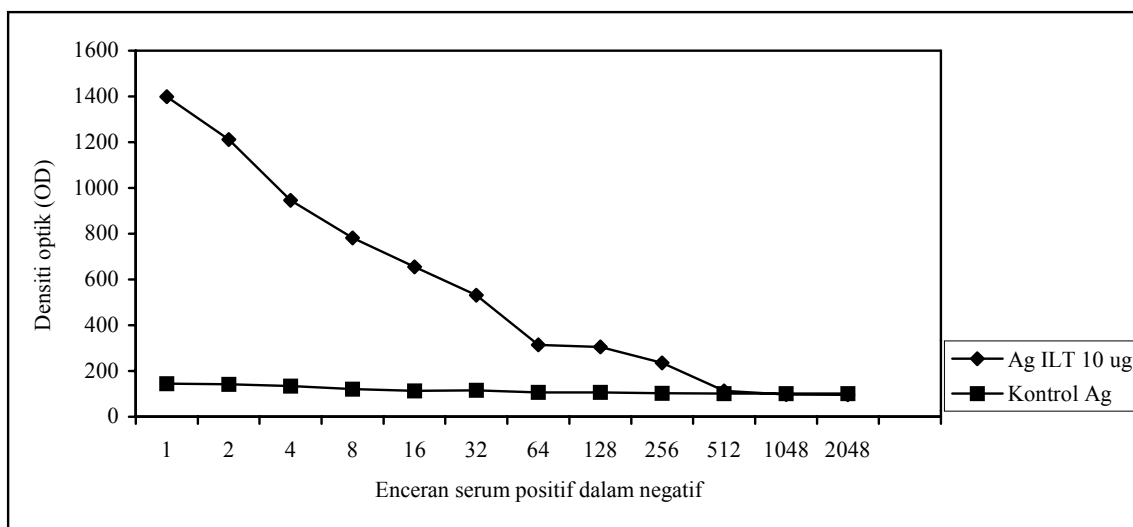
Gambar 2. *Checkerboard* beberapa enceran Ag ILT dengan enceran konjugat 1/5.000 dan enceran serum 1:100



Gambar 3. Checkerboard beberapa enceran Ag ILT dengan beberapa enceran konjugat 1/10.000 dan enceran serum 1:100



Gambar 4. Beberapa enceran Ag ILT dengan enceran konjugat 1/5.000 dan serum 1/100 untuk optimasi pelapisan lempeng mikrotiter



Gambar 5. Kurva standar dengan kombinasi Ag 10 ug/ml, konjugat 1/5.000 dan serum 1/100

Gambar 4 memperlihatkan beberapa kurva yang dibentuk dari beberapa pengenceran Ag ILT, Ag control dengan enceran konjugat 1/5.000 dan serum spesifik ILT yang diencerkan secara serial kelipatan dua kali dalam serum negatif antibodi ILT. Gambar 5 memperlihatkan kurva standar ILT pada konsentrasi antigen 10µg/ml serta menggunakan enceran konjugat 1/5.000 memperlihatkan nilai OD tertinggi 1,399. Sementara itu reaksinya dengan antigen kontrol OD tertinggi hanya 0,145. Bentuk kurva standar ini cukup landai dan baik untuk digunakan dalam uji ELISA (Gambar 5).

Penentuan nilai *cut off* ELISA ILT didasarkan atas hasil uji 140 serum ayam SPF yang memperlihatkan rata-rata OD 0,073± 0,032 dengan penambahan 3 sd. Dengan demikian nilai *cut off* ELISA ILT adalah 0,169, yang berarti bahwa setiap reaksi dalam ELISA dengan nilai OD di atas nilai tersebut dianggap reaksi positif dan sebaliknya (ADAIR *et al.*, 1985).

Hasil identifikasi adanya reaksi tidak spesifik terhadap virus lainnya, infectious bronchitis (IB) terlihat pada Tabel 1. Reaksi non spesifik terhadap antibodi penyakit IB pada uji ELISA dengan antigen ILT memberikan rata-rata nilai OD 0,103 ± 0,023, sementara dengan antigen kontrol 0,102 ± 0,022. Dilain fihak rata-rata nilai OD serum ILT 1,212 ± 0,064; dan antigen kontrol 0,132 ± 0,018 (Tabel 1). Gambaran OD tersebut menegaskan bahwa reaksi silang yang diberikan antigen ELISA ILT dengan serum antibodi IB sangat rendah dan dapat dianggap tidak ada. Hal serupa juga dijumpai oleh MEULEMANS dan HALEN (1982)

bahwa tidak ada reaksi silang antara antigen ELISA ILT dengan antibodi IB.

Sensitifitas dan spesifisitas ELISA memperlihatkan bahwa ELISA ILT yang dikembangkan sangat tinggi. Dari 100 serum berasal dari ayam terinfeksi ILT (dengan uji SN positif), 98 diantaranya bereaksi positif. Sementara itu dari 140 serum berasal dari ayam tidak terinfeksi ILT (dengan uji SN negatif), 136 bereaksi negatif. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa, sensitifitas ILT adalah 98% dengan tingkat spesifisitas 97,14% (Tabel 2).

ELISA ILT yang dikembangkan kemudian digunakan untuk mendeteksi antibodi ILT pada 6 ekor ayam SPF hewan percobaan (Gambar 6) yang divaksinasi dengan vaksin ILT komersial (Laryngo-vac, Intervet) dan ditantang dengan virus ILT isolat lokal. Hasil uji memperlihatkan dinamika respon antibodi pada ayam SPF tersebut. Rataan nilai OD pada saat sebelum divaksin dan setelah vaksinasi terlihat dengan jelas. Rataan nilai OD setelah vaksinasi terus meningkat dan mencapai puncaknya pada minggu ke 5, selanjutnya menurun perlahan. Setelah ayam diinfeksi lagi dengan virus ILT pada minggu ke 9, nilai rata-rata OD terus meningkat lagi.

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa ELISA yang dikembangkan dalam penelitian ini memperlihatkan kemampuan yang baik untuk mendeteksi antibodi dalam serum ayam yang divaksinasi dan diinfeksi buatan. Hal ini juga pernah diterangkan oleh peneliti sebelumnya bahwa ELISA dapat mendeteksi antibodi pada hewan percobaan. (SLAGHT *et al.*, 1978; HOWIE dan THORESEN, 1981; MEULEMANS and HALEN, 1982).

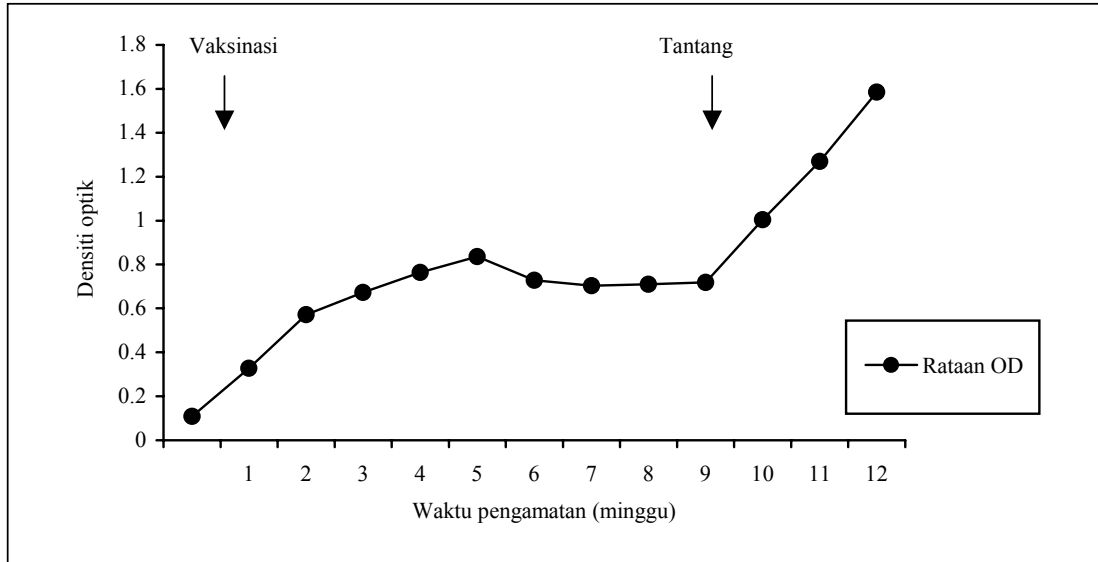
Tabel 1. Identifikasi reaksi non spesifik antara serum IB dengan antigen ILT pada uji ELISA

Serum (n)	ELISA (ILT)		ELISA (Antigen kontrol)	
	Rataan OD	Standar deviasi	Rataan OD	Standar deviasi
Serum kontrol (10)	0,083	0,035	0,068	0,033
Serum ILT (16)	1,212	0,064	0,132	0,018
Serum IB (10)	0,103	0,023	0,102	0,022

Tabel 2. Sensitifitas dan spesifisitas uji ELISA ILT terhadap uji SN

Reaksi ELISA	Hasil uji SN		Sensitifitas (%)
	Positif	Negatif	
Positif	98 (a)	4 (b)	98
Negatif	2 (c)	136 (d)	97,14

$$\text{Sensitifitas} = \frac{(a)}{(a) + (c)} ; \quad \text{Spesifisitas} = \frac{(d)}{(d)+(b)} \quad (\text{BALDOCK, 1988})$$



Gambar 6. Perkembangan respon serologi pada ayam percobaan setelah vaksinasi ILT dan tantang

KESIMPULAN DAN SARAN

ELISA ILT yang dikembangkan memperlihatkan kemampuan serta akurasi yang baik dengan sensitifitas 98% dan spesifisitasnya sebesar 97,14%, sehingga uji ini dapat digunakan sebagai perangkat uji serologi dalam mendeteksi adanya antibodi terhadap virus ILT dalam serum ayam, sebagai akibat vaksinasi maupun infeksi. ELISA ILT yang dikembangkan perlu dikaji dan diaplikasikan pada serum ayam lapang dalam jumlah yang lebih besar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Heri Hoerudin, Apipudin dan semua pihak yang telah membantu baik dalam penulisan maupun dalam kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

ADAIR, B.M., D. TODD, E. R. MCKILLOP and K. BURNS. 1985. Comparison of serological tests for detection of antibodies to infectious Laryngotracheitis virus. *Avian Pathol.* 14:461-469.

BAUER, B., J.E.LOHR, and E.F.KALETA. 1999. Comparison of commercial ELISA test kits from Australia and the USA with the serum neutralization test in cell culture for the detection of antibodies to the infectious laryngotracheitis virus of chicken. *Avian Pathol.* 28:65-72.

BALDOCK, F. C. 1988. Epidemiological evaluation of immunological test. Elisa technology in diagnosis and research. JCU, Townsville, Australia. p. 90-95.

BAGUST, T. J, JONES R.C, dan GUY J, S. 2000. Avian infectious laryngotracheitis. *Rev.Sci. Tech.Off. Epiz.* p. 19 (2): 483 - 492

HOWIE, R, and J. THORESEN (1981). An enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for infectious bursal diseases viruses. *Can. J. of Comp. Med.* 45:51-55.

MURPHY, F.A., C.M. FAUQUET, D.H.L. BISHOP, S.A. GHABRIAL, A.W. JARVIS, G.P. MARTELLI, M.A. MAYO, and M.D. SUMMERS. 1995. Virus Taxonomy. Vienna and New York.

MANGUNWIRYO, H., DARMINTO dan ZULKIFLI, 1995. Survei serologik terhadap infectious laryngotracheitis (ILT) pada ayam buras dan ras di Jawa Barat. Dalam : Prosiding Seminar Nasional Teknologi Veteriner Untuk Meningkatkan Kesehatan Hewan Dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak. Cisarua, Bogor 22-24 Maret 1994. Balai Penelitian Veteriner. Bogor. p. 140-147.

OIE, 1996. Avian Infectious Laryngotracheitis, OIE, p: 549-554.

MEULEMANS, G., dan P. HALEN., 1982. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detecting Infectious laryngotracheitis viral antibodies in chicken serum. *Avian Pathol.* 11: 361-368.

PATTERSON, R.M, 1989. A consultancy Report. Establishing Applied Immunology. Submitted to the Research Institute For Veterinary Science. Bogor. Indonesia.

- SLAGHT, S.S., YANG, T. J., dan VAN DER HELDER, L (1978). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting chicken anti-reovirus antibody at high sensitivity to the avian system. *Avian Dis.* 22: 802-805.
- WİYONO, A., MUHARAM, S., ANTONIUS, S., dan DARMINTO, 1996. Sebaran titer antibodi infectious laryngotracheitis (ILT) pada ayam ras dan buras di Kabupaten Cianjur, Tangerang dan Krawang. Dalam: Prosiding Temu Ilmiah Nasional Bidang Veteriner. Balai Penelitian Veteriner, Bogor, p. 88-95.
- YORK, J.J., FAHEY, K.J., dan BAGUST T.J., 1983. Development and evaluation of an ELISA for the detection of antibody to infectious laryngotracheitis virus in chicken. *Avian Dis.* 27:409-421.