

PENDETEKSIAN TITER ANTIBODI SWOLLEN HEAD SYNDROME DENGAN UJI ELISA TAK LANGSUNG

LIES PAREDE dan NGEPEK GINTING

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O.Box 52, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 20 Agustus 1995)

ABSTRACT

PAREDE, L. and NG. GINTING. 1996. Antibody titre detection of swollen head syndrome using indirect ELISA test. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 1(3) : 174-177.

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was standardised using vaccine strain to detect antibody response raised to swollen head syndrome (SHS). This technique can be used as an alternative serologic test due to its quickness, simple and relatively cheap. Besides, it would be suitable as a preliminary test before using serum neutralisation test (SNT) for reassuring diagnosis which takes time and costly for developing poultry industries.

Key words: Antibody titre; swollen head syndrome; indirect ELISA

ABSTRAK

PAREDE, L. dan NG. GINTING. 1996. Pendeteksian titer antibodi *swollen head syndrome* dengan uji ELISA tak langsung. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 1(3) : 174-177.

Uji *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) tak langsung telah dibakukan dengan menggunakan galur virus vaksin untuk mendeteksi respon antibodi (Ab) terhadap penyakit *swollen head syndrome* (SHS). Teknik ini dapat digunakan sebagai uji serologik alternatif karena cepat, sederhana dan relatif murah. Di samping itu, teknik ini dapat pula digunakan sebagai uji pendahuluan sebelum menegakkan diagnosis dengan uji netralisasi serum (SNT) yang relatif membutuhkan waktu yang lama dengan biaya yang cukup mahal bagi industri peternakan yang sedang berkembang.

Kata kunci: Titer antibodi; *swollen head syndrome*; ELISA tak langsung

PENDAHULUAN

Penyakit dengan gejala kepala membesar dan muka bengkak dikenal dengan nama *swollen head syndrome* (SHS), disebabkan oleh Pneumovirus (ALEXANDER, 1991). Kejadian pertama kali dilaporkan pada peternakan kalkun, dan sekarang kejadiannya sudah mulai dilaporkan pada peternakan ayam, terutama peternakan pembibit (PATTISON *et al.*, 1989; GOUGH *et al.*, 1994). Ayam segala umur dapat terserang penyakit ini, terutama pada minggu-minggu pertama produksi, sehingga produksi telur menurun sampai 30% tanpa memperlihatkan perubahan bentuk dan kualitas telur. Morbiditas dapat mencapai 100%, walaupun angka kematiannya rendah.

Virus penyebab SHS ini berkembang biak pada alat respirasi bagian atas, terutama lapisan epitel bersilia pada trakhea. Seperti diketahui, silia-silia tersebut ber-

fungsi sebagai alat penghambat/pencegah infeksi bakteri atau virus sekunder lain. Infeksi ikutan ini mengakibatkan isolasi virus penyebab SHS agak sulit dilakukan, di samping gejala klinisnya mirip dengan Coryza.

Di Indonesia, keberadaan penyakit ini sudah dilaporkan baik secara klinis dan patologis (RANGGA TABBU, 1995) maupun secara uji serum netralisasi (JUSA *et al.*, 1995).

Pencegahan dilakukan dengan program vaksinasi menggunakan vaksin aktif dan diulang dengan vaksin inaktif. Di samping uji serum netralisasi atau imuno-fluoresen yang dapat digunakan pada uji serologik, saat ini teknik enzimatis mulai disukai dan berkembang sangat cepat untuk membuat alat bantu diagnostik di segala bidang biologi, karena berbagai pertimbangan praktis (NICHOLAS dan THORNTON, 1986). Tulisan ini menjabarkan teknik ELISA tak langsung untuk mendeteksi titer kekebalan terhadap SHS.

MATERI DAN METODE

Virus

Virus yang dipakai untuk penyediaan antigen SHS adalah vaksin aktif (Produksi Rhone-Merieux, disediakan oleh PT. Romindo, Primavetcom). Virus pokok ini kemudian diperbanyak dengan cara ditumbuhkan pada sel lestari Vero (*green monkey kidney cells*).

Sel lestari Vero

Sel lestari Vero dipasase terbatas dengan medium penumbuh (RPMI 1641 ditambah 5% FBS, Na bicarbonat, L-Glutamin, Antibiotik Penisilin 100 IU dan Streptomisin 100 µg) pada tabung-tabung plastik 75 cm², lalu diinkubasikan pada inkubator bersuhu 37⁰C dengan konsentrasi CO₂ 5% selama 24-48 jam sampai membentuk selapis sel (*monolayer*). Konsentrasi sel yang dibutuhkan adalah 10³ sel/ml medium penumbuh, dan dipakai sebanyak 15-20 ml medium penumbuh per tabung plastik.

Pembuatan antigen

Virus pokok SHS diperbanyak pada sel lestari Vero di dalam tabung-tabung plastik 75 cm² dengan konsentrasi 10²CCID₅₀ per tabung dengan 20 ml medium penumbuh. Tabung diinkubasikan pada suhu 37⁰C selama 9-11 hari atau bila terlihat 80-90% perubahan efek sitopatik. Suspensi sel dan supernatan terinfeksi dibeku-cairkan sebanyak 3-4 kali, lalu dipanen dan dipisahkan dengan metode Amicon filter atau penarikan air dengan Aquacide III sampai perbandingan kepekatan 1:100 dari volume asal. Bahan pekat ini kemudian diproses memakai Triton X-100 0,01% selama 5 menit, lalu disentrifuse 11.000 rpm (mikrosentrifuse) selama 5 menit secara bertahap sebanyak 3 kali. Supernatan dipanen sebagai antigen pokok, disimpan pada suhu -20⁰C, dan siap distandardisasi. Sel-sel lestari Vero tanpa diinfeksi diperlakukan seperti di atas dan disiapkan sebagai kontrol negatif.

Standar serum

Serum ayam sebagai antibodi positif (Ab +) disiapkan dari ayam yang divaksinasi ulang dengan vaksin SHS (PT. Romindo, Primavetcom). Serum ayam negatif (Ab -) disiapkan dari ayam bebas patogen (*specific pathogen free*, SPF, Australia).

Prosedur standardisasi teknik ELISA

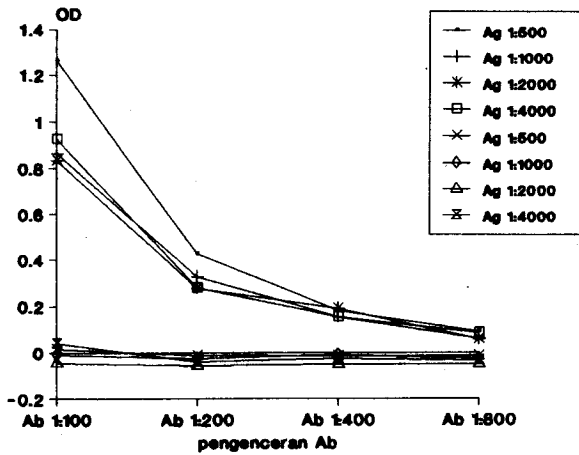
Metode ELISA yang dikerjakan dimodifikasi dari cara VOLLER *et al.* (1979). Rinciannya sebagai berikut: Mikroplat 96 lubang (*rigid polystyrene*) dilapisi dengan 100 ml antigen SHS dengan pengenceran 1:500; 1:1.000; 1:2.000 dan 1:4.000 dengan larutan penyangga karbonat (pH 9.6; 170 mM Na₂CO₃ ditambah 330 mM NaHCO₃), dibiarkan semalam pada suhu 4⁰C. Kemudian mikroplat tersebut dicuci 3-4 kali dengan larutan *phosphate buffered saline* (PBS) ditambah 0,05% Tween-20 (PBS-T = 140 mM NaCl ditambah 3 mM NaH₂PO₄.2H₂O, 7 mM NaHPO₄ *anhydrous* dan 0,05% Tween-20). Setiap lubang diberi serum Ab (+) atau Ab (-) dengan pengenceran 1:100; 1: 200; 1:400 dan 1:800 memakai pelarut PBS-T ditambah kasein 2%, diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Sesudah plat dicuci dengan PBS-T 3-4 kali, ke dalam setiap lubang dimasukkan 50 µl Ab domba anti-ayam yang dilabel dengan HRPO (1:2.000) dengan PBS-T ditambah kasein 2%. Mikroplat diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar, kemudian dicuci 3-4 kali dengan PBS-T, ditambah 100 µl substrat ABTS per lubang [1mM 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzthiazoline-sulfonicacid) (Sigma Ltd) ditambah 0,5 mM H₂O₂ (pH 4,2) dalam pelarut 0,01M penyangga sitrat]. Setelah diinkubasi selama 15 menit di tempat gelap pada suhu kamar, perubahan warna (*optical density*, OD) dapat dibaca dengan memakai panjang gelombang 415 nm pada ELISA reader (Titertek, Multiskan^R, UK).

Sampel serum

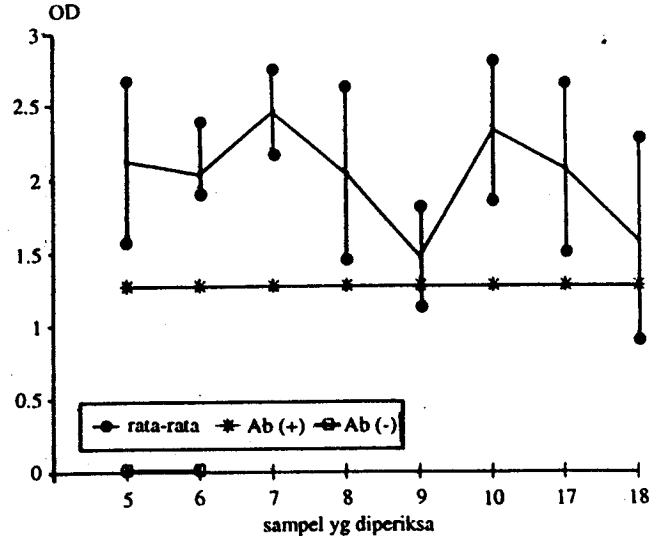
Serum yang akan diuji diambil dari kelompok ayam *breeder* yang sudah divaksinasi terhadap SHS. Sampel I berasal dari 8 kandang ayam berumur 15 minggu, yang sesudah 5 minggu divaksinasi dengan AVIFFA-RTI. Sampel II yang diperiksa berasal dari ayam petelur sesudah 4,5 bulan pascavaksinasi dengan OVO-4. Serum tersebut diencerkan 1:100 dengan PBS-T, kemudian dikerjakan menurut prosedur di atas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Standardisasi uji tersebut menunjukkan bahwa OD yang optimum pada ELISA terlihat bila dipakai pengenceran antigen 1:500 pada sampel serum (+) 1:100 (Gambar 1) dengan angka perbandingan positif terhadap negatif (rasio P/N) tertinggi 84,27 (Tabel 1). Angka



Gambar 1. Standardisasi uji ELISA untuk menentukan pengenceran Ag dan Ab optimum



Gambar 2. Hasil pemeriksaan titer antibodi rata-rata ayam terhadap SHS sesudah 5 minggu divaksinasi dengan AVIFFA-RTI

Tabel 1. Perbandingan optical density serum (+) terhadap serum (-) (rasio positif/negatif)

Serum	Pengenceran		Antigen	
	Ab		1:500	1:1000
1:100	+		1,264	0,864
	-		0,015	0,012
	+/-		84,27	72,000
1:200	+		0,426	0,326
	-		0,012	0,025
	+/-		35,50	13,04
1:400	+		0,183	0,191
	-		0,015	0,05
	+/-		12,20	3,80
1:800	+		0,019	0,154
	-		0,014	0,026
	+/-		6,50	5,92

Keterangan: +/- = rasio positif/negatif

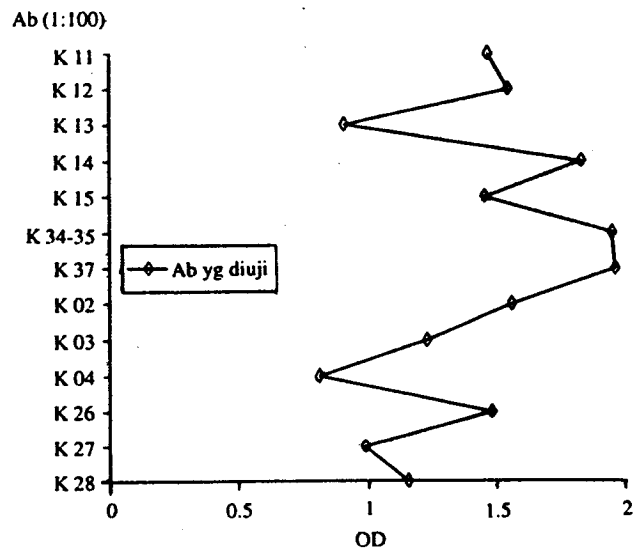
perbandingan pengenceran Ag dan Ab ini dipakai pada pengujian selanjutnya.

Dengan memakai pengenceran optimum antigen 1:500 dan antibodi 1:100, hasil uji ELISA yang dilakukan terhadap sampel serum yang diperiksa disajikan pada Gambar 2.

Hasil uji sampel serum I yang berasal dari 8 kandang ayam berumur 15 minggu, sesudah 5 minggu vaksinasi dengan AVIFFA-RTI disajikan dalam Gambar 2. OD yang rata-rata tinggi pada semua kelompok dibandingkan dengan kontrol positif menunjukkan adanya stimulasi kekebalan pada ayam yang cukup tinggi setelah vaksinasi dengan AVIFFA-RTI sesudah 5 minggu. Hal

ini membuktikan bahwa uji ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi titer antibodi terhadap SHS. Vaksinasi dengan AVIFFA-RTI melalui air minum merangsang titer antibodi cukup tinggi sesudah 5 minggu pascavaksinasi.

Hasil uji sampel serum II yang diperiksa berasal dari 13 kandang ayam petelur sesudah 4,5 bulan pascavaksinasi dengan OVO-4 disajikan pada Gambar 3. Ada 2 kandang dengan hasil titer rata-rata lebih rendah daripada yang lain (OD 0,906 dan 0,81), walaupun masih



Gambar 3. Hasil pemeriksaan titer Ab ayam terhadap SHS divaksinasi dengan OVO-4

dapat dikatakan cukup tinggi, karena masih lebih tinggi bila dibandingkan dengan serum positif pada pengenceran 1:200 (OD 0,426). Hal ini dimungkinkan karena masalah teknis yang kadang-kadang muncul dalam pemakaian vaksin mati yang disuntikkan ataupun faktor individu/kelompok ayam tersebut.

Cara pembuatan stok antigen untuk uji ELISA sangat tergantung dari sifat virus atau bakteri yang akan digunakan, yang kadang-kadang membutuhkan proses yang panjang dan kompleks (HARTANINGSIH *et al.*, 1993). Proses antigen yang tepat murni akan menghasilkan reaksi yang sangat berbeda antara yang positif dan negatif. Penyiapan Ag SHS dengan cara yang sederhana di atas dan penggunaannya dengan konsentrasi yang sedikit menjadikan uji ELISA pada SHS dapat mudah dan murah dikerjakan. Penelitian terdahulu yang dilakukan dengan teknik *agar gel precipitation* (AGP) untuk mendeteksi titer antibodi SHS tidak mendapatkan hasil yang memuaskan. Teknik AGP membutuhkan konsentrasi antigen yang cukup tinggi untuk dapat mendeteksi titer antibodi di dalam serum yang juga harus cukup tinggi. Teknik ELISA sudah dikenal sebagai uji serologik yang sensitif, spesifik, cepat dan relatif lebih murah untuk mengukur respon antibodi (BURGESS, 1988).

Dari hasil uji coba teknik ini dengan menggunakan 3 asal serum yang berbeda, dapat dikatakan bahwa teknik ini dapat digunakan untuk mendeteksi respon antibodi (Ab) terhadap penyakit SHS sesudah vaksinasi. Dalam uji coba ini terlihat bahwa pemakaian antigen homolog (berasal dari vaksin RTI) dan antibodi (berasal dari serum ayam yang divaksinasi dengan galur vaksin yang sama RTI) pada suatu uji enzimatik menunjukkan reaksi yang sensitif. Dengan demikian, teknik ini perlu dicoba untuk mendeteksi serum yang berasal dari daerah ter-sangka terserang SHS.

Sayangnya pada waktu standardisasi teknik ini belum diketahui data yang dapat menunjukkan pada titer (OD) berapa kelompok ayam yang sudah divaksinasi akan tahan terhadap serangan wabah ataupun gejala klinis bila titer rendah sesudah vaksinasi. Teknik ini dapat digunakan sebagai uji serologik alternatif karena cepat, sederhana dan relatif murah. Di samping itu, dapat digunakan sebagai uji pendahuluan sebelum me-

negakkan diagnostik dengan uji serum netralisasi yang relatif membutuhkan waktu yang lama dan cukup mahal bagi industri peternakan yang sedang berkembang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Risa Indriani, Kusmaedi, Maria dan Heri atas bantuan teknis yang baik, dan kepada Drh. Johnson dari PT. Romindo, Primavetcom atas sumbangan virus vaksin SHS dan serum positif.

DAFTAR PUSTAKA

- ALEXANDER, D.J. 1991. Pneumovirus infections (Turkey rhinotracheitis and swollen head syndrome of chickens). In: *Diseases of Poultry*; 9th ed; eds: B.W. Calnek *et al.* Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, USA. pp. 669-673.
- BURGESS, G.W. 1988. ELISA Technology in Diagnosis and Research. Graduate School of Tropical Veterinary Science, James Cook University of North Queensland, Townsville, Australia.
- GOUGH, R.E., R.J. MANWELL, S.E.N. DRURY, and D.B. PEARSON. 1994. Isolation of an avian pneumovirus from broiler chickens. *Vet. Rec.* 134: 353-354.
- HARTANINGSIH, N., G.E. WILCOX., M. TENAYA, and S. SOEHARSONO. 1993. Development of an ELISA for detection of antibodies to Jembrana disease in Bali cattle. *Penyakit Hewan* 25(46): 37-43.
- JUSA E.R., R.D. SOEJOEDONO., C.S. LAKSMONO., M.A.R. NOOR., S.B. SIREGAR, and M. PARTADIREJIA. 1995. Serological investigation on swollen head syndrome in Indonesia. Seminar Sehari tentang Swollen Head Syndrome di Jakarta, 11 April 1995.
- NICHOLAS R.A.J., and D.H. THORNTON. 1986. The use of the enzyme-linked immunosorbent assay in detecting antibodies to avian viruses. A review. *Vet. Bull.* 56: 337-343.
- PATTISON, M., N. CHETTLE, C.J. RANDALL, and P.J. WYETH. 1989. Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. *Vet. Rec.* 125: 229-231.
- RANGGA TABBU, C. 1995. Pengamatan penyakit SHS (swollen head syndrome) pada peternakan ayam komersial di Indonesia. Seminar Sehari tentang Swollen Head Syndrome di Jakarta, 11 April 1995.
- VOLLER, A., D.E. BIDWELL and A. BARTLETT. 1979. *The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. A Guide with Abstracts of Microplate Applications. Dynatech Lab. Inc. Virginia 22314, USA.