

Deteksi Antibodi terhadap *Mycoplasma gallisepticum* pada Serum Ayam dengan Pengujian Serologi *Rapid Serum Agglutination* (RSA), Kit ELISA Komersial, dan *inhouse*ELISA

(Detection of Antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in Chicken Serum by *Rapid Serum Agglutination* (RSA) Serology Testing, Commercial ELISA Kit, and *inhouse*ELISA)

Rachmawati F¹, Purba HHS¹, Desem MI¹, Azmi Z¹, Subekti DT¹, Wibawan IWT², Mayasari NLPI²

¹ Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30 Bogor 16114

² Institut Pertanian Bogor, Jl. Raya Dramaga, Babakan, Kec. Dramaga, Bogor 16680
fahera.08@gmail.com

ABSTRACT

Mycoplasma gallisepticum (MG) is a bacterium that causes chronic respiratory disease in chickens, commonly referred to chronic respiratory disease (CRD) and infectious sinusitis in turkeys. Losses due to MG infection in the poultry industry worldwide reach more than US \$780 million each year. Early detection and continuous monitoring are needed from the upstream, namely the hatchery to the downstream in the commercial farms. In Indonesia, CRD and CRD complex cases are still a problem in chicken farms. The presence of MG can be detected by means of isolation of the organism or detection of DNA from infected tissue or swab samples or by using serological test for diagnosis of the disease. Common types of serological tests are Rapid Serum Agglutination (RSA), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Haemagglutination Inhibition (HI). This study aimed to determine the antibody status of chickens from various conditions in the field using the RSA test, commercial ELISA and in-house ELISA (iELISA). Serological tests using 3 types of tests gave different results in detecting the presence of antibodies to MG from chicken serum samples with varying status. Commercial ELISA kits are more sensitive in detecting antibodies to MG, therefore this test gave the most positive results.

Key words: ELISA, *Mycoplasma gallisepticum*, serology, RSA

ABSTRAK

Mycoplasma gallisepticum (MG) adalah bakteri penyebab penyakit pernapasan kronis pada ayam yang sering disebut sebagai *chronic respiratory disease* (CRD) dan *infectious sinusitis* pada kalkun. Kerugian akibat infeksi MG pada industri perunggasan di dunia mencapai lebih dari US \$780 juta setiap tahun. Deteksi dini dan monitoring secara berkelanjutan sangat dibutuhkan dari hulu, yakni *hatchery* sampai ke hilir di peternakan komersial. Di Indonesia, kasus CRD maupun CRD kompleks sampai saat ini masih menjadi permasalahan di peternakan-peternakan ayam. Keberadaan MG

dapat dideteksi dengan cara isolasi organisme atau deteksi DNA dari jaringan yang terinfeksi atau sampel *swab* atau dengan menggunakan pengujian serologi untuk diagnosis penyakit ini. Jenis pengujian serologi yang sudah umum dilakukan adalah dengan *Rapid Serum Agglutination* (RSA), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), dan *Haemagglutination Inhibition* (HI). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui status antibodi ayam dari beragam kondisi di lapangan dengan uji RSA, ELISA komersial, dan *inhouse*ELISA (iELISA). Pengujian serologi dengan menggunakan 3 jenis pengujian memberikan hasil yang berbeda dalam mendeteksi antibodi terhadap MG pada sampel serum ayam dengan status yang bervariasi. Kit ELISA komersial lebih sensitif dalam mendeteksi antibodi terhadap MG, sehingga pengujian ini memberikan hasil positif paling banyak.

Kata kunci: ELISA, *Mycoplasma gallisepticum*, serologi, RSA

PENDAHULUAN

Mycoplasma gallisepticum (MG) merupakan bakteri penyebab penyakit pernapasan kronis pada ayam yang sering disebut sebagai *chronic respiratory disease* (CRD) dan *infectious sinusitis* pada kalkun. Secara ekonomi penyakit ini dapat mengakibatkan kerugian ekonomi pada peternakan ayam, karena menyebabkan penurunan produksi telur, kualitas karkas ayam, efisiensi pakan, dan daya tetas, sehingga biaya pengobatan meningkat. Infeksi ini sudah menyebar di dunia, termasuk Indonesia (Soeripto 2009; Armour 2020) dengan kerugian mencapai lebih dari US \$780 juta per tahun (CABI 2020).

Infeksi MG pada ayam dapat bersifat klinis maupun subklinis (Armour 2020), dan ayam tersebut akan menjadi karier (Soeripto 2009), sehingga deteksi dini dan monitoring secara berkelanjutan sangat dibutuhkan dari hulu, yakni *hatchery* sampai ke hilir di peternakan komersial. Di Indonesia, kasus CRD maupun CRD kompleks sampai saat ini masih menjadi permasalahan di peternakan-peternakan ayam. Keberadaan MG dapat dideteksi dengan cara isolasi organisme atau deteksi DNA dari jaringan yang terinfeksi atau sampel *swab* atau dengan menggunakan pengujian serologi yang sudah banyak dilakukan untuk diagnosis penyakit ini (OIE 2018). Deteksi secara serologis penting untuk dilakukan untuk mengetahui keberadaan antibodi terhadap MG terutama pada ayam dengan gejala subklinis. Deteksi serologis digunakan untuk konfirmasi metode diagnostik lain. Jenis pengujian serologi yang sudah umum dilakukan adalah dengan *Rapid Serum Agglutination* (RSA), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), dan *Haemagglutination Inhibition* (HI). Industri-industri peternakan unggas banyak menggunakan ELISA untuk uji *screening* terhadap antibodi terhadap penyakit (OIE 2018; CABI 2020).

Deteksi antibodi terhadap MG dengan RSA, HI maupun ELISA masih dilakukan dalam berbagai penelitian sampai saat ini (Sory 2011; Feizi et al. 2013; Ali et al. 2015; Meutia et al. 2015; Diyantoro & Wulandari 2017; Abbas et al. 2018; Haider

et al. 2019). Uji kit ELISA komersial untuk deteksi antibodi MG sudah banyak beredar dan sudah digunakan dalam penelitian maupun monitoring pada peternakan komersial maupun *breeder*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui status antibodi ayam dari beragam kondisi di lapangan yang diuji dengan metoda RSA, kit ELISA komersial dan *inhouse*ELISA (iELISA).

MATERI DAN METODE

Sampel serum ayam

Serum ayam yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 100 sampel. Sampel serum yang berasal dari ayam petelur yang tidak divaksinasi dengan vaksin MG, ayam petelur yang divaksin dengan *killed vaccine* MG, *lived vaccine* MG, ayam *clean*, ayam SPF (*Specific Pathogen Free*), *breeding farm*, dan dari sampel diagnostik BBLitvet yang secara secara pasif masuk lewat sampel diagnostik. Jenis ayam jantan dan betina, umur bervariasi antara 16-28 minggu, dan pemeliharaan pada kandang baterey.

Pengujian sampel serum ayam

Pengujian sampel serum ayam dilakukan secara serologi yaitu dengan RSA (*Rapid Serum Agglutination*), kit ELISA komersial, dan iELISA.

Rapid Serum Agglutination test (RSA test)

Sampel serum diuji dengan RSA menggunakan antigen berwarna MG (BB Litvet) berdasarkan (Soeripto 1997) dengan modifikasi. Sebelum dilakukan pengujian serum dan antigen disesuaikan suhunya dengan suhu ruang. Serum dan antigen masing-masing diambil sebanyak 25 µl dicampur di atas *agglutination plate*. Hasil pencampuran antigen dan serum dibaca setelah 2 menit. Hasil interpretasi positif atau negatif antibodi terhadap MG ditentukan berdasarkan pada ada atau tidaknya reaksi aglutinasi.

ELISA kit komersial

Sampel serum diuji dengan kit ELISA komersial (IDVet) sesuai dengan protokol pengujian kit tersebut.

*inhouse*ELISA (iELISA)

Pengujian sampel serum ayam dengan menggunakan ELISA yang dikembangkan (iELISA) sesuai dengan Rachmawati et al. (2018).

Analisa data

Data hasil pengujian RSA, ELISA kit komersial, dan iELISA dianalisa secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian sampel serum ayam secara serologi dengan RSA, kit ELISA komersial, dan iELISA tercantum pada Tabel 1. Pada Tabel tersebut dapat dilihat bahwa dari 100 sampel yang diuji, dengan RSA menunjukkan positif 9% dan negatif 91%, dengan kit ELISA komersial positif 36% dan negatif 64%, dengan iELISA positif 9% dan negatif 91%. Selanjutnya, dari hasil pengujian RSA yang negatif sebanyak 91% diuji dengan kit ELISA komersial dan iELISA diperoleh hasil positif sebanyak 28 sampel (31,87%) dan 8 (8,79%). Sedangkan sampel diuji RSA hasil positif diuji dengan kit ELISA komersial dan iELISA diperoleh hasil negatif sebanyak 1 sampel (11,11%) dan 8 (88,89%).

Tabel 1. Hasil pengujian sampel serum ayam dengan metoda RSA, ELISA kit komersial, dan iELISA, bila memungkinkan dikelompokkan untuk masing-masing kelompok yang sama

Hasil metode pengujian			
RSA	ELISA kit komersial	ELISA yang dikembangkan	Jumlah sampel
Neg	Neg	Neg	60
Neg	Neg	Pos	3
Neg	Pos	Neg	23
Neg	Pos	Pos	5
Pos	Pos	Pos	1
Pos	Pos	Neg	7
Pos	Neg	Pos	0
Pos	Neg	Neg	1
Negatif 91%	Negatif 36 %	Negatif 91%	100
Positif 9 %	Positif 64 %	Positif 9 %	

Keseluruhan sampel dikoleksi dari ayam yang tidak menunjukkan gejala sakit. Dari hasil keseluruhan pengujian, kit ELISA komersial lebih akurat dalam mencerminkan titer antibodi pada sampel dibanding iELISA. Hal ini menunjukkan bahwa kit komersial lebih sensitif dalam mendeteksi antibodi terhadap MG karena perbedaan antigen yang digunakan dalam kit ELISA. Antigen pada kit ELISA komersial berdasarkan manual prosedur dari produsen (IDVet) merupakan antigen

rekombinan, sedangkan antigen yang digunakan pada iELISA adalah antigen yang dipreparasi dengan *freeze-thawing* (Rachmawati et al. 2018).

Pada kelompok ayam yang divaksinasi yang diuji dengan ELISA titer antibodinya lebih tinggi namun dengan RSA titernya rendah (Noormohammadi et al. 2002b). Hal ini sesuai dengan sifat vaksin dari MG yang dipengaruhi oleh jenis, dosis pemberian dan respons individu (Noormohammadi et al. 2002a), sehingga dengan kemampuan level deteksi RSA yang memang lebih rendah dibandingkan dengan ELISA, maka sangat wajar ketika uji dengan RSA tidak dapat menggambarkan kondisi serologis flock yang sudah divaksinasi (Noormohammadi et al. 2002b). Hal ini juga sejalan dengan penelitian Ferguson-Noel et al. (2012) menyebutkan bahwa respons antibodi dengan pengujian RSA dan ELISA berbeda jika jenis vaksin yang digunakan berbeda. Selain itu pelaksanaan vaksinasi juga harus dilakukan pada umur, dosis dan rute pemberian yang tepat (Noormohammadi et al. 2002a; Shil et al. 2011).

Pada uji kit ELISA komersial maupun iELISA antibodi dapat dideteksi pada ayam yang tidak divaksinasi MG karena ayam tersebut telah terinfeksi secara alami. Keberadaan MG pada kawanan burung liar juga telah dilaporkan, adanya informasi ini membuka peluang untuk penelitian lebih lanjut terkait potensi penyebaran MG pada beragam hospes (Sawicka et al. 2020). Selain itu hasil serologis yang menunjukkan respons antibodi pada ayam *clean* dan SPF yang hanya terdeteksi dengan iELISA. Hal ini mungkin disebabkan perbedaan antigen baik itu strain MG atau preparasi antigen yang digunakan pada RSA, kit ELISA komersial, dan iELISA (Feizi et al. 2013).

Hasil uji serologis pada penelitian ini memperlihatkan bagaimana pentingnya respons sistem imun dalam menunjukkan keberadaan agen infeksi dalam suatu lokasi dan jika digunakan dengan sistematis pengambilan sampel yang proporsional dapat memberikan gambaran penyebaran penyakit dalam suatu kawasan (Noormohammadi et al. 2002b). Selain itu respons antibodi pada ayam terhadap MG tidak selalu dihubungkan dengan munculnya gejala klinis (Ahmad et al. 2008). Dari hasil pengujian secara serologis menunjukkan bahwa ayam dengan umur, jenis, dan pemeliharaan yang berbeda dapat terpapar MG, oleh karena itu diperlukan program pencegahan dan pengendalian MG secara intensif seperti manajemen pemeliharaan yang baik, monitoring, dan vaksinasi sangat diperlukan dalam pemeliharaan unggas.

KESIMPULAN

Antibodi terhadap MG yang dideteksi secara serologis dengan pengujian yang berbeda, yaitu dengan RSA, kit ELISA komersial, dan iELISA pada ayam dengan status, kondisi dan jenis yang berbeda diperoleh hasil yang berbeda. Pengujian dengan RSA diperoleh hasil negatif 91%, positif 9%, kit ELISA komersial negatif 36%, positif 64%, iELISA negatif 91%, dan positif 9%. Hal ini menunjukkan bahwa

kit ELISA komersial lebih sensitif dalam mendeteksi antibodi terhadap MG, dan iELISA memerlukan pengembangan dan penyempurnaan lebih lanjut. Ayam dengan umur atau jenis yang berbeda dapat terpapar MG. Deteksi serologis MG uji RSA pada satu peternakan harus memperhatikan riwayat vaksinasi dan umur serta pertumbuhan ayam agar dapat memberikan gambaran serologis suatu flock. Deteksi antibodi MG membutuhkan uji yang saling melengkapi dan tidak dapat berdiri sendiri untuk mengetahui status MG pada suatu peternakan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Hasanudin, Eko S Purwanto yang membantu dalam terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas N, Suleman M, Khan NA, Ali I, Rauf M, Ur Rahman S. 2018. Prevalence of mycoplasma gallisepticum in poultry and wild life birds suspected of chronic respiratory disease in northern Pakistan. Pak J Zool. 50:1071–1077.
- Ahmad A, Rabbani M, Yaqoob T, Ahmad A, Shabbir MZ, Akhtar F. 2008. Status of IGG antibodies against *mycoplasma gallisepticum* in non-vaccinated commercial poultry breeder flocks. J Anim Plant Sci. 18:61–63.
- Ali MZ, Rahman MM, Sultana S. 2015. Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* antibody by ELISA and serum plate agglutination test of laying chicken. Vet World. 8:9–14.
- Armour NK. 2020 Diseases of poultry. 14th ed. Swayne DE. New Jersey (USA): Wiley-Blackwell.
- [CABI] Centre for Agriculture and Bioscience International. 2020. avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). [diakses 20 Agustus 2020]. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/92922>.
- Diyantoro, Wulandari S. 2017. Deteksi Antibodi *Salmonella pullorum* dan *Mycoplasma gallisepticum* pada anak ayam (DOC) pedaging beberapa perusahaan uang dijual di Kabupaten Lamongan. Agroveteriner 5:152-157.
- Feizi A, Nikpiran H, Bijanzad P, Moggadam RJ, Hosseini H. 2013. Comparative evaluation of serological test in diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infection in Iranian North-west rural. 4:50–53.
- Ferguson-Noel N, Cookson K, Laibinis VA, Kleven SH. 2012. The efficacy of three commercial *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in laying hens. Avian Dis. 56:272–275.
- Haider S, Maqbool A, Pervez T, Parveen S, Ahmad A, Iqbal Z, Iqbal J, Mehmood S, Khan A, Umar S. 2019. Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* in Commercial Poultry

- Birds Showing Respiratory Clinical Signs in Chakwal District. Pakistan. Pak J Zool. 51:1-4.
- Meutia H, Astuti LS, Istiyaningsih, Andesfha E, Rahayuningtyas I, Daulay K, Amijaya D, Sarji, Atikah N. 2015. Gambaran seroprevalensi *Mycoplasma gallisepticum* pada ayam layer dengan uji RPA dan ELISA. Buletin Pengujian Mutu Obat Hewan 24.
- Noormohammadi AH, Browning GF, Cowling PJ, O'Rourke D, Whithear KG, Markham PF. 2002a. Detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* vaccine ts-11 by an autologous pMGA enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis. 46:405–411.
- Noormohammadi AH, Jones JF, Underwood G, Whithear KG. 2002b. Poor systemic antibody response after vaccination of commercial broiler breeders with *mycoplasma gallisepticum* vaccine ts-11 not associated with susceptibility to challenge. Avian Dis. 46:623–628.
- OIE (Office International des Epizooties). 2018. Avian Mycoplasmosis. [diakses 20 Agustus 2020]. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.05_%20AVIAN_MYCO.pdf.
- Rachmawati F, Wibawan IWT, Mayasari NLPI. 2018. Penggunaan antigen *mycoplasma gallisepticum* freeze-thawing dalam teknik *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. JSV 37:151–159.
- Sawicka A, Durkalec M, Tomczyk G, Kurska O. 2020. Occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds: A systematic review and metaanalysis. PLoS One. 15:1–24.
- Shil PK, Kanci A, Browning GF, Marenda MS, Noormohammadi AH, Markham PF. 2011. GapA+*Mycoplasma gallisepticum* ts-11 has improved vaccine characteristics. Microbiology. 157:1740–1749.
- Soeripto. 1997. Penggunaan natrium piruvat dan natrium hidroksida untuk meningkatkan jumlah koloni dan panen antigen berwarna *Mycoplasma gallisepticum*. JITV. 2:204-207.
- Soeripto. 2009. Chronic Respiratory Disease (CRD) pada Ayam. Wartazoa. 19:134–142.
- Sory MRA, 2011. Studi Seroprevalensi *Mycoplasma gallisepticum* Subang. [Skripsi]. [Bogor (Indones)]: Institut Pertanian Bogor.

DISKUSI

Pertanyaan

1. Apakah ELISA yang dikembangkan sudah divalidasi? Bagaimana spesifikasi dan presisi antara kit ELISA komersial dan ELISA yang dikembangkan?
2. Mengapa hasil antara RSA dan ELISA yang dikembangkan sama?

3. *Mengapa ELISA yang dikembangkan kurang sensitif dibanding dengan kit ELISA komersial. Jika diperbaiki bagian metodologi yang mana yang harus ditingkatkan?*

Jawaban

1. *ELISA yang dikembangkan sudah divalidasi (dapat dilihat pada artikel Rachmawati F, Wibawan IWT, Mayasari NLPI. 2018. Penggunaan Antigen Mycoplasma gallisepticum Freeze-Thawing dalam Teknik Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. JSV 37:151–159). Sedangkan untuk spesifikasi dan presisi tidak dibahas dalam makalah ini. Fokus dalam makalah ini adalah hanya untuk mengetahui status atau adanya antibodi terhadap MG dengan 3 pengujian, jadi tidak membandingkan 2 pengujian dengan ELISA.*
2. *Secara keseluruhan hasil pengujian anantara RSA dan ELISA yang dikembangkan sama, tetapi hasil dari masing-masing pengujian ada perbedaan pada sampel yang sama.*
3. *Adanya perbedaan sensitifitas dalam mendeteksi antibodi dimana kit ELISA komersial lebih banyak mendeteksi atau lebih sensitif dalam pengujian ini menurut saya dimungkinkan karena bakteri MG yang digunakan sebagai antigen coating berbeda strain dan perbedaan preparasi antigen untuk antigen coating. Bagian metodologi yang ditingkatkan adalah dalam hal preparasi antigen untuk coating, dalam hal ini kemungkinan protein yang terlarut hasil preparasi belum optimal.*