

Deteksi Antibodi *Avian Influenza* dalam Kuning Telur Ayam Pasca Vaksinasi (AI) Subtipe H5N1

Antibody Detection of Avian Influenza (AI) in Egg Yolk Post Vaccination of AI H5N1 Subtype

R. Indriani dan NLP I. Dharmayanti

Balai Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata 30, Bogor, Indonesia 16114

Abstract

The outbreaks of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus among poultry in Indonesia have occurred since 2003. Indonesian government has established 9 (nine) strategies including vaccination for controlling the disease. Indonesian veterinary laboratory routinely conduct serological of blood to detect antibody post vaccination, but not from egg yolk. The egg yolk is rich of antibody content, because chicken transmitted the antibody for their progeny through the eggs. The purpose of this study to detect of antibody in egg yolk from vaccinated chickens, unvaccinated chicken and eggs from retail market by using haemagglutination inhibition (HI) test and agar gel immunodiffusion test (AGID). The result of this study showed that antibody of AI can be detected in egg yolk from vaccinated chicken and can be used as alternative to detect antibody in vaccination chickens.

Keywords: Avian influenza, vaccination, egg yolk, antibody

Pendahuluan

Virus avian influenza (AI) merupakan famili dari Orthomyxoviridae yang terbagi menjadi tiga tipe yaitu virus influenza tipe A, B dan C (Cox *et al.*, 2000). Virus influenza A diklasifikasikan berdasarkan antigenitas dari glikoprotein hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) yang diekspresikan pada permukaan partikel virus. Virus AI mempunyai 16 subtipe HA dan 9 subtipe NA yang telah dideteksi pada burung-burung liar dan unggas di dunia (Fouchier *et al.*, 2005).

Di Indonesia, penyakit AI telah bersirkulasi sejak tahun 2003 dan merupakan subtipe H5N1 (Dharmayanti *et al.*, 2005). Berbagai upaya telah dilakukan untuk menanggulangi penyakit ini di antaranya dengan melakukan vaksinasi pada unggas, seperti tertuang pada sembilan strategi pengendalian penyakit avian influenza (Dit Kes Wan, 2005).

Pengawasan terhadap penyakit AI diperlukan untuk memperoleh status bebas AI pada peternakan yang akan mengirim unggas atau produknya, baik di dalam negeri maupun dari dan ke luar negeri. Perpindahan produk asal unggas atau unggas memerlukan sertifikat untuk menjamin produk unggas tersebut bebas penyakit AI. Penentuan status AI pada suatu flock dapat dilakukan dengan mendeteksi antibodi dalam sampel serum yaitu

dengan uji hemagglutinasin inhibisi (HI) atau Agar Gel Presipitasi (AGP). Uji HI merupakan uji spesifik pada hemagglutinin subtipe virus AI (H1-H16), dan berlandaskan pada aktivitas *haemagglutinin* yang dimiliki oleh virus AI, sedangkan Uji AGP merupakan uji yang berlandaskan pada kemiripan *antigenically nucleocapsid* dan *matrix* yang dimiliki oleh group virus AI.

Deteksi antibodi dapat juga menggunakan sampel kuning telur, seperti yang telah dilakukan pada beberapa penyakit tertentu. Hal ini karena kuning telur merupakan sumber antibodi (Cumming, 1988) yang diturunkan oleh induk yang pernah terinfeksi agen penyakit atau induk yang mendapat program vaksinasi tertentu.

Diagnosis dan monitoring penyakit atau evaluasi program vaksinasi penyakit pada unggas dapat terpenuhi dengan mengevaluasi sampel. Sampel yang berasal dari kuning telur, dapat diperoleh tanpa mengganggu unggas saat pengambilan contoh sampel. Hal ini lebih efisien digunakan dalam mendeteksi antibodi AI pada unggas.

Tujuan studi ini adalah untuk mendeteksi antibodi AI H5N1 dari ayam yang mendapat program vaksinasi menggunakan vaksin inaktif AI H5N1 pada sampel kuning telur.

Metode Penelitian

Vaksin Inaktif *Avian Influenza* H5N1 Isolat Lokal

Vaksin inaktif *avian influenza* H5N1 isolat lokal yang digunakan pada studi ini, yaitu (1) Vaksin yang dipersiapkan dari virus inaktif *avian influenza* H5N1 A/Chicken/West Java/67-2/2003 dengan partikel 10^8 ELD₅₀ per dosis (Dit Kes Wan, 2004) dan di formulasi-kan dengan adjuvan menurut formula Stone (1987). (2) Vaksin inaktif AI H5N1 komersial yang diperoleh dari salah satu produsen vaksin AI di dalam negeri (Indonesia), berupa vaksin inaktif dalam adjuvan. Vaksin diberikan secara intramuskuler dengan dosis 0,5 ml per dosis per ekor.

Sampel Telur dan Serum Ayam Percobaan Laboratorium

Sampel telur dan serum darah dikoleksi dari ayam yang sama. Sejumlah 12 butir telur dan 12 serum darah ayam dikoleksi dari kelompok 1, yaitu ayam yang mendapat vaksinasi inaktif AI H5N1 formula Stone (1987) sebanyak 3 kali. Sejumlah 13 butir telur dan 13 serum darah dikoleksi dari kelompok 2, yaitu ayam yang mendapat vaksinasi inaktif AI H5N1 isolat lokal komersial sebanyak 3 kali. Sejumlah 5 butir telur dan 5 serum darah ayam dikoleksi dari kelompok yang tidak divaksinasi (sebagai kontrol). Kuning telur dan serum dari setiap individu dikoleksi pada hari yang sama. Semua sampel di uji serologik hambatan hemaglutinasi (HI) dan agar gel presipitasi (AGP) untuk mendeteksi antibodi virus AI H5N1.

Sampel Telur Ayam Bukan Percobaan

Sebanyak 70 butir telur ayam berasal dari perusahaan komersial (10 butir telur *spesifik pathogenic free* / SPF), pasar Swalayan (20 butir telur ayam ras), pasar tradisional (20 butir telur ayam buras) dan peternakan tradisional (20 butir telur ayam kampung).

Ekstraksi Kuning Telur

Telur yang diperoleh dari ayam percobaan di laboratorium, ayam SPF dan ayam di lapangan diekstraksi. Ekstraksi kuning telur dilakukan dengan menambahkan satu bagian kuning telur ditambah satu bagian *phosphat bufer salin* (PBS). Selanjutnya campuran di kocok dengan alat *mixer*, setelah itu ditambah dua bagian *Chloroform* (Beck *et al.*, 2003; Selleck, 2005). Campuran ini diinkubasikan pada suhu ruangan selama 30 menit dan dikocok dengan alat *mixer* setiap 5 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.

Uji Serologik

Uji HI menggunakan antigen yang dipersiapkan dari cairan alantois telur ayam berembrio *spesifik pathogenic free* (SPF) yang diinfeksi virus AI H5N1 A/Chicken/West Java/67-2/2003 mengikuti prosedur OIE (2000). Uji ini untuk mendeteksi adanya antibodi virus AI H5N1 di dalam sampel.

Uji AGP dipersiapkan sesuai metode OIE (2000), antigen AGP diproduksi dari *chorion allantoic membranes* telur ayam berembrio *spesifik pathogenic free* (SPF) yang diinfeksi virus AI H5N1 A/Chicken/West Java/67-2/2003. Uji ini dapat mendeteksi adanya anti *nucleocapsid* dan *matrix* virus AI di dalam sampel.

Hasil dan Pembahasan

Hasil ekstraksi kuning telur berupa cairan yang berwarna putih dan jernih terdapat pada lapisan paling atas. Cairan ini telah terpisah dari lemak-lemak yang terkandung pada kuning telur, disebabkan oleh kerja *chloroform* yang mampu mengikat lemak tersebut (Selleck, 2005). Selanjutnya cairan digunakan sebagai sampel uji.

Hasil uji serologik dari ekstrak kuning telur dan serum ayam percobaan di laboratorium ditunjukkan pada Tabel 1. Ekstrak kuning telur dikoleksi dan di uji hemaglutinasi dari kelompok I yaitu, ayam yang mendapat vaksinasi AI A/Chicken/ West Java/67-2/2003 memperlihatkan positif antibodi AI H5N1 sebanyak 12 dari 12 sampel. Kelompok II ayam yang mendapat vaksinasi AI isolat lokal komersial memberikan positif antibodi AI H5N1 sebanyak 13 dari 13 sampel. Pada kelompok III (ayam kontrol) 5 sampel memberikan hasil negatif antibodi. Pada sampel serum dari kelompok I dan kelompok II memberikan antibodi AI H5N1 positif sebanyak 12 dari 12 sampel dan 13 dari 13 sampel secara berurutan. Sedangkan pada kelompok kontrol memberikan hasil antibodi AI H5N1 negatif.

Hasil uji AGP terhadap ekstrak kuning telur memberikan hasil positif, pada kelompok I sebanyak 12 dari 12 sampel, kelompok II sebanyak 13 dari 13 sampel, dan kelompok III memberikan hasil negatif. Pada sampel serum dari kelompok I dan II memberikan hasil positif AI sebanyak jumlah sampel yang diuji, sementara pada kelompok III (kontrol) memberikan hasil negatif.

Pada studi ini uji serologik HI dapat mendeteksi antibodi di dalam serum darah, maupun ekstrak kuning telur yang dikoleksi dari ayam-ayam umur 32 minggu dan mendapat program vaksinasi AI sebanyak 3 kali. Studi ini juga memperlihatkan sampel ekstrak kuning telur dan serum baik dari flock yang divaksinasi dengan vaksin AI A/Chicken/ West Java/67-2/2003, maupun flock yang divaksinasi

dengan vaksin AI komersial, memberikan hasil positif antibodi virus AI H5N1 dengan uji HI, dan memberikan positif anti *nucleocapsid* atau *matrix* virus AI dengan uji AGP (Tabel 1). Hasil titer antibodi virus AI H5N1 terlihat berkisar antara 2 - 9 log₂ pada ekstrak kuning telur dan serum berkisar antara 4 - 8 log₂ (Tabel 1). Perbedaan ini mungkin disebabkan kandungan antibodi yang diturunkan oleh induk dalam kuning telur mempunyai titer antibodi lebih rendah dari kandungan titer antibodi yang terdapat di dalam serum induk. Beck *et al.*, (2003) mendeteksi antibodi dari serum dan kuning telur yang berasal dari ayam 21 hari pasca vaksinasi AI adjuvan memperlihatkan antibodi terdeteksi lebih awal dengan uji AGP dari pada uji HI, baik dari dalam ekstra kuning telur maupun serum. Beck *et al.*, (2003) menyatakan juga bahwa antibodi AI dapat dideteksi lebih awal dari ayam yang terinfeksi virus hidup dari pada ayam yang divaksinasi AI adjuvan.

Hasil deteksi antibodi dari ekstrak kuning telur yang berasal dari ayam SPF maupun ayam di lapangan disampaikan di dalam Tabel 2. Ekstrak kuning telur asal ayam SPF memberikan hasil antibodi negatif baik dengan uji HI maupun dengan uji AGP. Hal ini tentu disebabkan karena ayam SPF merupakan ayam yang bebas dari infeksi patogen (OIE, 2000). Ekstrak kuning telur asal pasar swalayan dengan uji HI memberikan hasil positif antibodi AI H5N1 dengan titer antibodi antara 4-11 log₂ dan positif anti protein matrix AI dengan uji AGP, sebanyak jumlah sampel yang diuji. Dari hasil uji ini kelompok telur ayam asal pasar swalayan dapat diketahui berasal dari induk ayam yang pernah

terinfeksi antigen AI karena program vaksinasi atau virus *low pathogenic* (LPAI) di lapangan. Pada kelompok ekstrak kuning telur ayam buras asal pasar tradisional maupun peternak tradisional memberikan hasil negatif antibodi, baik dengan uji HI maupun uji AGP. Hal ini menunjukkan kelompok telur tersebut berasal dari induk ayam tidak divaksinasi atau terinfeksi virus AI.

Hasil studi ini terlihat bahwa, ekstrak kuning telur baik dari ayam percobaan maupun bukan percobaan asal lapangan (Tabel 1. dan Tabel 2.) dapat digunakan dalam uji HI dan AGP. Adanya antibodi virus AI telah digunakan di dalam *surveillance* dan program sertifikasi untuk meyakinkan adanya infeksi di dalam flock unggas (Easterday *et al.*, 1997). Pengambilan darah pada unggas untuk koleksi serum biasa dilakukan secara rutin di dalam flock. Serum ayam dapat digunakan untuk monitoring berbagai kejadian penyakit dan efektivitas pada program vaksinasi. Pada flock ayam petelur, deteksi antibodi pada kuning telur ini merupakan satu alternatif, karena telur merupakan sumber antibodi dan pernah digunakan untuk serologik monitoring flock ayam petelur pada berbagai agen penyakit unggas, termasuk *Newcastle Disease* (ND) (Beck *et al.*, 2003).

Prosedur ekstraksi kuning telur dikembangkan dan digunakan untuk menentukan status AI pada flock terkena wabah AI H5N2, selama tahun 1983-1984 di Amerika utara (Beck *et al.*, 2003). Walaupun kuning telur tidak disahihkan sebagai mana sampel serum, namun dapat dijadikan sebagai alternatif yang dapat diterima untuk uji serologik.

Tabel 1. Hasil Deteksi Antibodi AI H5N1 dalam Sampel Ekstrak Kuning Telur dan Serum dari Ayam Percobaan di Laboratorium

Kelompok Ayam	Jumlah sampel	Hasil uji Hemaglutinasi (positif antibodi/ Σ sampel)		Hasil uji AGP (positif antibodi/ Σ sampel)	
		Ekstrak kuning telur	serum	Ekstrak kuning telur	serum
I. Vaksinasi AI A/Chicken/West Java/67-2/2003	12	12* / 12	12# / 12	12 / 12	12 / 12
II. Vaksinasi AI komersial	13	13* / 13	13# / 13	13 / 13	13 / 13
III. Kontrol	5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5

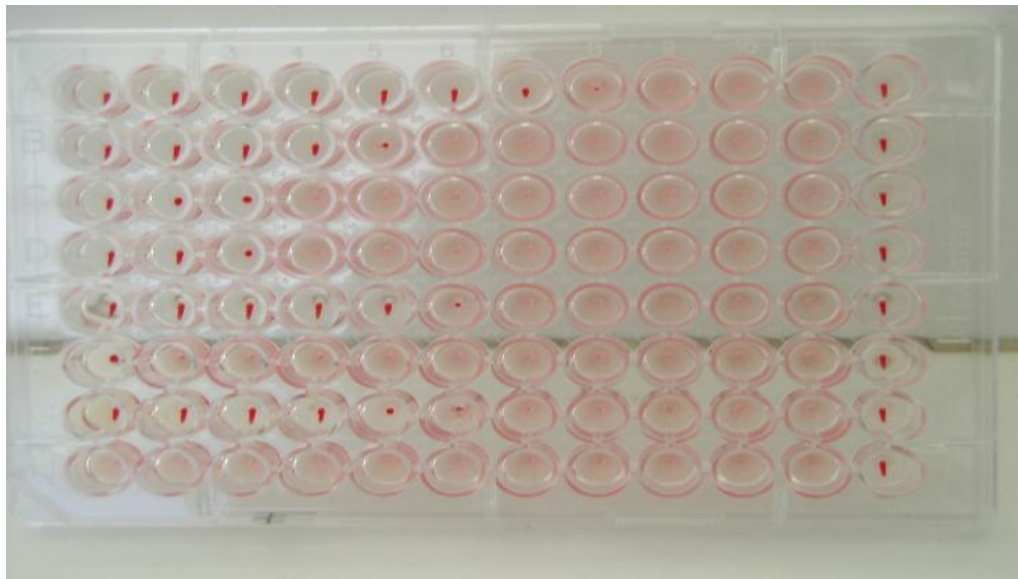
* titer HI pada ekstra kuning telur berkisar 2 - 9 log₂

titer HI pada sampel serum berkisar 4 - 8 log₂

Tabel 2. Hasil Deteksi Antibodi AI H5N1 dalam Sampel Ekstrak Kuning Telur

Kelompok asal telur	Jumlah sampel	Ekstrak kuning telur (positif antibodi / $\sum$ sampel)	
		Uji Hemaglutinasi	Uji AGP
I. Telur ayam ras asal pasar swalayan	20	20* / 20	20 / 20
II. Telur ayam buras asal pasar tradisional	20	0 / 20	0 / 20
III. Telur ayam buras asal peternakan tradisional	20	0 / 20	0 / 20
IV. Telur ayam SPF	10	0 / 10	0 / 10

* titer HI pada ekstrak kuning telur berkisar 4 - 11 log₂



Gambar 1. Hasil uji HI ekstrak kuning telur terhadap antibodi virus AI H5N1. Bentuk butir darah merah yang menyerupai tetesan air mata merupakan adanya reaksi aglutinasi hambat yang disebabkan adanya antibodi anti hemagglutinin di dalam sampel uji dengan antigen virus AI H5N1.

Kesimpulan

Dari studi ini disimpulkan ekstrak kuning telur asal ayam percobaan dan bukan percobaan dapat digunakan sebagai alternatif sampel pengganti serum untuk deteksi antibodi AI dalam program vaksinasi atau infeksi virus dilapang dengan uji hambat hemaglutinasi maupun uji agar gel presipitasi.

Daftar Pustaka

Beck, J.R., D.E. Swayne, S. Davison, S. Casavant, dan C. Gutierrez. 2003. Validation of Egg Yolk Antibody Testing as a Method to Determine Influenza Status in White Leghorn Hens. *Avian Dis.* 47. 1196-1199

- Cox, N.J., F.Fuller., N. Kaveria., H.D. Klenk., R.A. Lamb., B.W.J. Mahy., J. McCauley., K. Nakamura., P. Palese and R.G. Webster. 2000. Orthomyxoviridae, p. 585-597. In : M.H.V. Van Rogenmortel., C. Malinoff., M.A. Myo., D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner (ed). Virus Taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, Calif.
- Cumming, R.B. 1988. The value of non SPF edds in poultry diseases work. Poultry Health Conference. Surfer Paradise. Australia. 23-25 September 1988. Proceeding 112. pp 318-320.
- Dharmayanti, NLP. I., R. Damayanti, R. Indriani, A. Wiyono, dan RMA. Adjid. 2005. Karakterisasi Molekuler Virus Avian Influenza Isolat Indonesia. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. 10 (2) : 127 - 133
- Direktorat Kesehatan Hewan. 2004. Petunjuk Teknis Pengujian Vaksin Avian Influenza inaktif. Direktorat Jendral Bina Produksi Peternakan . Departemen Pertanian.
- Direktorat Kesehatan Hewan. 2005. Kebijakan dan pengendalian dan situasi avian infleunza pada unggas di Indonesia. Disampaikan pada Workshop Nasional Avian Influenza. Cisarua, Bogor. 2-5 Mei 2005.
- Easterday, B.C., V.S Hinshaw, and D.A. Halvorson. 1997. Influenza. In: Diseases of Poultry. (ed. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald, Y.M.Saif). Iowa , USA. pp 583 -605.
- Fouchier, R.A.M., V. Munster., A. Wallensten., T.M. Bestebroer., S. Herfst., D. Smith., G.F. Rimmelzwaan., B. Olsen and A.D.M.E. Osterhaus. 2005. Characterization of novel influenza A virus haemagglutinin subtype (H16) obtained black-headed gulls. J. Virol. 79. (5): 2814-2822
- Office International des Epizooties. 2000. Manual Of Standards for Diagnostik tests and vaccines. pp 212 - 219
- Stone, H.D. 1987. Efficacy of avian influenza oil - emulsion vaccines in chickens of various ages. Avian Diseases. 31. 483 - 490
- Selleck, P. 2005. Internet communication. Paul.Selleck@csiro.au. 11 July 2005.