

**PENENTUAN TITRASI ANTISERA UNTUK
DETEKSI ANTIGEN RABIES DAN *AVIAN INFLUENZA*
DENGAN METODE IMMUNOHISTOKIMIA
DI BALAI BESAR VETERINER MAROS**

Alfinus¹, Wahyuni¹, R. Damayanti² dan R. Mudigdo¹

¹ Kepala dan Staf Medik Veteriner Balai Besar Veteriner Maros

² Staf Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

ABSTRAK

Pendeteksian antigen virus Rabies dan *Avian Influenza* pada preparat histopatologi dengan metode immunohistokimia telah dilakukan oleh Balai Besar Veteriner bekerjasama dengan Balai Penelitian Veteriner Bogor pada akhir November 2005. Metode ini menggunakan serum kelinci antivirus rabies dan antivirus *Avian Influenza* H5N1 dengan menggunakan kit LSAB 2, DAKO, Denmark, K0672. Prinsip dari metoda ini adalah pemeriksaan sampel otak hewan penular rabies yang diduga rabies dan organ Telur Ayam Bertunas positif *Avian Influenza* yang diproses sebagai preparat histopatologi direaksikan dengan serum kelinci antivirus rabies dan antivirus *Avian Influenza* H5N1 dengan avidin-biotin kompleks peroksidase. Antigen yang terdapat pada jaringan otak hewan penular rabies dan organ ayam dapat divisualisasikan dengan penambahan warna/substrat 3-Amino 9-Ethyl Carbazole (AEC) yang menghasilkan warna coklat kemerahan dengan menggunakan mikroskop cahaya. Pada kesempatan kali ini kami akan mengetahui titrasi optimal dari serum kelinci antivirus rabies dan antivirus *Avian Influenza* yang memberikan hasil memuaskan untuk teknik immunohistokimia.

Hasil titrasi serum kelinci antivirus rabies dan antivirus *Avian Influenza* H5N1 yang memberikan hasil memuaskan adalah 1: 50 pada pengujian *Avian Influenza* dan 1:100 pada pengujian rabies.

Teknik pewarnaan ini terbukti cepat dan akurat untuk mengkonfirmasi diagnosa pada preparat histopatologi dan membuktikan bahwa hewan terinfeksi oleh virus rabies dan flu burung.

Kata kunci : Immunohistokimia, Rabies dan *Avian Influenza*

PENDAHULUAN

Penyakit rabies atau lebih dikenal sebagai penyakit anjing gila adalah penyakit virus menular yang sangat ganas pada hewan mamalia khususnya anjing, kucing dan kera yang bersifat. Penyakit rabies disebabkan oleh virus RNA yang bersifat neurotropis dari kelompok *Lyssavirus* dalam keluarga *Rhabdoviridae*.

Penyakit flu burung (*Avian Influenza* atau AI) dibagi dua kelompok yaitu sangat patogenik (*Highly Pathogenic Avian Influenza* atau HPAI atau *fowl plaque*) dan kurang patogenik atau *Low Pathogenic Avian Influenza* atau LPAI). Kedua bentuk flu burung tersebut disebabkan oleh virus yang tergolong kedalam *Orthomyxoviridae* tipe A (Easterday et al.,1991)

Pada laboratorium Patologi Balai Besar Veteriner Maros pengujian rabies dan *Avian Influenza* masih dilakukan dengan pewarnaan rutin yaitu Hematoksilin Eosin (H&E), pewarnaan H&E pada pengujian rabies dapat terlihat *negri bodies* dan pada pengujian *Avian Influenza* dapat menggambarkan jenis dan distribusi lesi, tetapi tidak dapat mendeteksi antigen virus karena ukurannya yang sangat kecil.

Teknik Immunohistokimia memiliki keunggulan diantaranya waktu yang relatif singkat (sekitar 5-6 jam), reaksi warna yang terjadi sebagai hasil ikatan antigen-antibodi kompleks, tergolong cukup permanen sehingga tidak perlu dilihat dengan mikroskop fluorescent, selain visualisasi antigen, jaringan organ yang terinfeksi dan derajat keparahan lesi dapat terlihat dengan jelas (Brown et al., 1992, Damayanti dan Darminto, 2001)

Percobaan ini bertujuan untuk mendapatkan hasil titrasi antisera rabies dan *Avian Influenza* yang optimal dengan metode Immunohistokimia (IHK) juga untuk mengetahui ada atau tidaknya antigen yang terdapat pada organ/jaringan hewan yang diduga rabies dan *avian influenza*.

MATERI DAN METODE

Sampel otak dan organ ayam

Sampel otak yang dipakai berasal dari sampel otak yang positif terdapat *negri bodies* pada pengujian *seller's* sedangkan pada organ ayam berasal dari blok paraffin Balitvet (Balai Penelitian Veteriner, Bogor) yang terdapat antigen virus *avian influenza* (sebagai kontrol positif) dan Telur Ayam Bertunas (TAB) dari Maros yang terdapat antigen *Avian Influenza* juga sebagai kontrol positif. Kontrol negatif dilakukan setiap pengujian dengan cara tidak memberikan primer antibodi (antisera) sehingga secara otomatis tidak terjadi visualisasi antigennya.

Serum kelinci antivirus rabies dan Avian Influenza

Serum kelinci anti virus rabies diperoleh dengan cara memberikan suntikan vaksin rabies (rabisin, Romindo) kepada dua ekor kelinci dewasa diberikan sebanyak 1 cc secara subkutan, suntikan kedua dilakukan berselang 2 minggu dengan dosis 1 cc secara subkutan dan berselang 1 minggu kemudian disuntik lagi 1 cc secara subkutan

Pengambilan darah kelinci dilakukan sebelum suntikan vaksin kedua dan suntikan vaksin ketiga masing-masing sekitar 20 cc secara intacardial lalu dilakukan pemisahan serumnya dan serum kedua kelinci digabung menjadi satu lalu dimasukkan kedalam tips dan disimpan di dalam freezer, pada pengujian ini menggunakan antisera kelinci antivirus rabies sebelum suntikan vaksin ketiga.

Serum kelinci antivirus Avian Influenza H5N1

Serum kelinci anti virus Avian Influenza diperoleh dengan cara memberikan suntikan Avian Influenza kepada satu ekor kelinci dewasa diberikan sebanyak 0,5 cc secara subkutan pengambilan darah kelinci dilakukan berselang 2 minggu setelah vaksin pertama dengan terlebih dahulu diukur titer antibodi (2^{11}) dikarenakan titer yang sudah cukup tinggi maka dilakukan panen serum kelinci anti Avian Influenza sebanyak 50 cc). Titer antibodi dinyatakan positif

Titirasi Antisera

Titer antibody Avian Influenza dengan metode HI memberikan hasil 2^{11} maka kami memperkirakan pada titrasi dimulai dari 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 dan 1:3200 dengan blok paraffin dari Balitvet yang sudah terdapat antigen Avian Influenza dan Telur Ayam Bertunas yang juga terdapat antigen Avian Influenza.

Hasil titrasi pada 1:200 masih memberikan hasil yang kurang memuaskan pada pewarnaan antigennya maka kami menurunkan titrasi dari control negative, pekat sampai dengan 1:100.

Titirasi antisera rabies kami lakukan dari control negative, pekat 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 dan 1:400.

Pewarnaan Immunohistokimia dengan Metode Avidin Biotin Peroksidase.

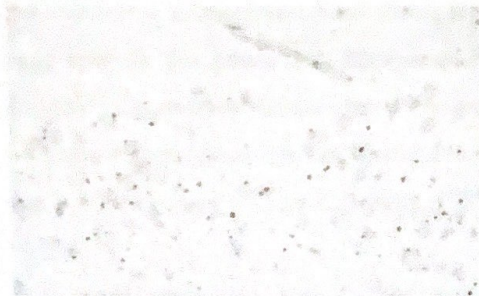
Pewarnaan imunohistokimia pada percobaan ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh (HSU et al., 1981) dengan menggunakan Kit komersial LSAB2, DAKO, Denmark, K 0672. Blok parafin organ ayam yang mengandung antigen Avian Influenza dan otak yang diduga mengandung antigen rabies mula-mula dipotong sekitar 4 mikron dan diletakkan pada kaca obyek glass yang telah diberikan Poly-L-Lysin sebagai perekat lalu kaca obyek diparafinisasi sesuai dengan metode standard dan siap ditripsin 0,1 % dalam larutan Calcium chloride 0,1% (dalam aquades) yang berpH 7,8 (titrasi dengan 0,1 M NaOH) selama 20 menit didalam waterbath dengan suhu 37°C, reaksi distop dengan cara merendam *slide* pada air dingin yang telah disiapkan. *Slide* diatur dalam rak khusus dan di bilas 3 kali dengan larutan Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7, selama 5 menit. Konsentrasi antisera yang dipakai dilakukan standardisasi melalui *checkerboard titration* yaitu pada pengujian rabies konsentrasi antisera dari pekat, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 dan 1:400 sedangkan pada antisera avian influenza dari pekat 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 dan 1:3200 dalam larutan PBS pH 7,4 yang diberi susu skim 0, 1% yang diinkubasikan selama 60 menit kemudian dibilas dengan PBS 3 kali selama 5 menit. Lalu dilakukan aktifitas peroksidase endogen dalam jaringan diblok dengan hidrogen peroksida (H₂O₂) yang tersedia dalam kit sebanyak 2-3 tetes dan diinkubasikan selama 20 menit. Kemudian dibilas dengan PBS kali selama 5 menit selanjutnya, *slide* diberikan antibodi sekunder pada kit sekitar 2-3 tetes dan diinkubasikan selama 30 menit lalu dibilas dengan PBS 3 kali 5 menit lalu Avidin biotin peroksidase pada kit sekitar 2-3 tetes, diinkubasikan selama 30 menit dan dibilas dengan PBS 3 kali 5 menit. Untuk memvisualisasikan antigen yang terdapat pada *slide* ditambahkan substrat Amino Ethly Carbazole (AEC) pada kit sekitar 2-3 tetes dan diinkubasikan selama 2-5 menit lalu *slide* direndam dalam air mengalir selama 1-2 menit setelah itu *slide* direndam dalam larutan hematoksin selama 5 menit lalu *slide* direndam dalam air mengalir selama 1-2 menit dan *slide* direndam dalam larutan Scott selama 1-2 menit setelah itu *slide* ditutup dengan meneteskan aquaous medium.

Pemeriksaan Mikroskopik

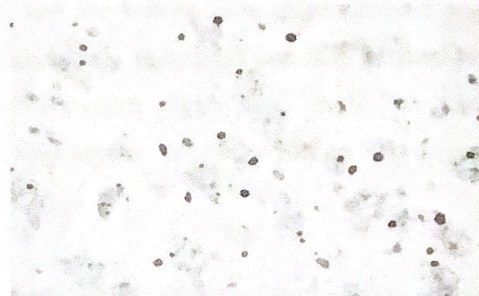
Pemeriksaan mikroskopik dilakukan untuk menentukan lokasi dan distribusi antigen pada organ otak dan ayam yang terinfeksi virus rabies dan virus AI. Karena substrat yang dipakai AEC berwarna merah kecoklatan maka antigen yang dideteksi pada jaringan organ juga berwarna demikian, sangat kontras dengan latarbelakang jaringan yang berwarna biru yang menandakan bahwa area tersebut tidak mengandung antigen.

HASIL

Hasil dari titrasi antisera rabies yang optimal pada pengujian metode imunohistokimia adalah 1:100 (dapat dilihat pada gambar 1 dan 2 dibawah ini)



Gambar 1. Hipokampus, 200X

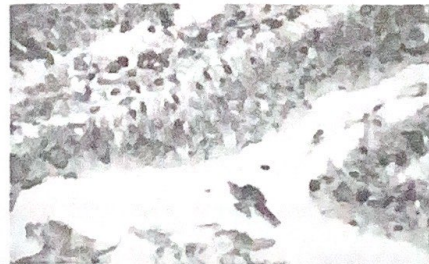


Gambar 2. Hipokampus, 400X

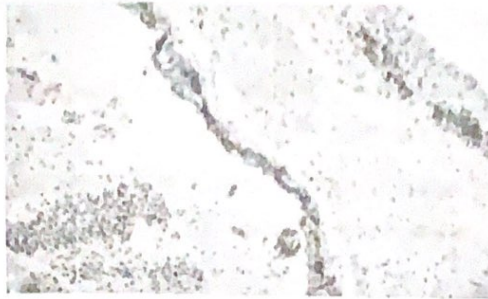
Sedangkan hasil dari titrasi antisera Avian Influenza yang optimal pada pengujian metode imunohistokimia adalah 1:50 (dapat dilihat pada gambar 3, 4, 5 dan 6 dibawah ini)



Gambar 3. Balitvet, 200X



Gambar 4. Balitvet, 400X



Gambar 5. TAB Maros, 200 X



Gambar 6. TAB Maros, 400 X

PEMBAHASAN

Penilaian atau interpretasi hasil titrasi terdiri dari dua kriteria yaitu pewarnaan antigen yang spesifik dan pewarnaan *background*/latarbelakang yang tidak spesifik. Pewarnaan antigen yang spesifik terdiri dari *Very good*, *Very good*, *slightly pale*, *Good*, *Pale* dan *Negative* sedangkan untuk *background* terdiri dari *Intense*, *Moderate*, *Slight*, *Very slight* dan *No background* (Janice A.Bourne, 1980).

Dari Hasil percobaan kali ini didapatkan hasil titrasi antisera rabies 1:100 untuk pengujian antigen rabies dan titrasi antisera Avian Influenza 1:50 untuk pengujian antigen Avian Influenza merupakan titrasi yang optimal dengan kriteria pewarnaan antigen yang spesifik *very good* dan *background Moderate* dan pada pengeceran diatas dan dibawahnya memberikan hasil yang kurang bagus.

Menurut Momotami (1994) teknik imunohistokimia ini mempunyai banyak keunggulan yaitu dapat mendeteksi antigen pada jaringan dengan akurat, preparat dapat diperiksa dengan menggunakan mikroskop biasa bukan mikroskop elektron atau mikroskop flourescents, hasil permanen hingga beberapa bulan dan waktu pengerjaan yang lebih singkat selain itu teknik ini dapat dipakai untuk studi retrospektif dan untuk mempelajari patogenesis penyakit seperti predileksi antigen pada jaringan, kerusakan jaringan (lesi), distribusi lesi dan derajat keparahannya,

KESIMPULAN

Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa antigen rabies dan Avian Influenza berhasil dideteksi dengan pewarnaan imunohistokimia dengan metode Avidin Biotin Peroksidase Kompleks (ABC) dengan titrasi antisera yang optimal adalah 1: 50 pada antisera Avian Influenza dan 1:100 pada antisera Rabies.

DAFTAR PUSTAKA

Brown,CC., J.J.Olander and D.A. Senne.,1992.A Pathogenesis Study of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N2 in Chickens, using immunohistochemistry.J.Comp.Path 107:314-348

Demayanti,R dan Darminto, 2001. Deteksi antigen virus Infectious Bronchitis dengan teknik imunohistokimia pada ayam pedaging yang diinfeksi dengan isolat IB-269 atau disuntik dengan vaksin hidup H-120,JITV 6:239-246

Easterday,B.C and V.S. Hinshaw. 1991. Avian Influenza in Disease of Poultry 9th ed.B.w.Calnek, H.J.Barnes, C.W.Beard, W.m. Reid and H.w.Yoder (Jr) (eds). Iowa State University Press, Ames, pp.532-551.

Momotami,E.1994. Principles of Immunohistochemistry technique and their application. National Institute of Animal Health BioDefence Research Division, Laboratory of Immunopathology, Tsukuba, Japan.pp 1-21.

Damayanti R, Dharmayanti.N.L.P.I.,Indriani R.A.Wiyono dan Darminto.,2004, Deteksi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 pada organ Ayam yang terserang Flu Burung Sangat Patogenik di Jawa Timur dan Jawa Barat dengan Teknik Imunohistokimia., JITV.,Vol.9,No.3, hal :197-203

Janice A.Bourne, 1980, Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods. Immunochemistry DAKO Corporation. pp 18-19