

UJI BANDING ANTAR LABORATORIUM TERHADAP TITER ANTIBODI AYAM PASCA VAKSINASI CORYZA DENGAN METODE HI (*Haemagglutination Inhibition*)

SYAEFURROSAD, NENENG ATIKAH, DAN NI MADE RIA ISRIYANTHI

Unit Uji Bakteriologi

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur, Bogor, Jawa Barat

ABSTRAK

Telah dilakukan uji banding pengujian serum pasca vaksinasi coryza antara Unit Uji Bakteriologi, Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) dengan dua laboratorium swasta (Laboratorium I dan Laboratorium II) pada bulan November tahun 2011. Pengujian titer antibodi coryza dilakukan dengan metode *Haemagglutination Inhibition* pada 10 (sepuluh) sampel serum ayam SPF (*Specific Pathogen Free*) pascavaksinasi vaksin coryza tipe A. Masing-masing laboratorium menguji sampel yang sama. Hasil uji banding pengujian titer antibodi coryza dengan metode *Haemagglutination Inhibition* (HI) antara laboratorium BBPMSOH dengan dua laboratorium lain tidak ada perbedaan karena perbedaan hasil titer tidak lebih dari satu kelipatan, sedangkan antara Laboratorium I dengan Laboratorium II terdapat perbedaan pada serum nomor 9 (sembilan) karena perbedaan hasil titer lebih dari satu kelipatan.

Kata Kunci: uji banding, *Haemagglutination Inhibition*, titer antibodi coryza

ABSTRACT

Inter laboratory comparison testing of serum post vaccination of coryza between - Bacteriology Assay Unit - National Veterinary Drug Assay Laboratory (NVDAL), with two private laboratories (Laboratory I and Laboratory II) on November 2011 have been conducted. Testing of Coryza antibody titer by Haemagglutination Inhibition method using ten serum of SPF chickens post vaccinated with coryza vaccine type A. Each laboratory tested the same samples. The results of inter laboratory comparison testing of antibody titer of coryza by Haemagglutination Inhibition (HI) methods between NVDAL with two other laboratories were found no differences, due to differences of the titer is not more than one multiplier, while the samples number 9 has been showed difference result between Laboratory I with Laboratory II which the result of serum titer was found more than one multiplier.

Keywords: inter comparison testing, *Haemagglutination Inhibition*, *Coryza* antibody titre

PENDAHULUAN

Infectious Coryza atau snot menular merupakan penyakit yang disebabkan oleh *Haemophilus paragallinarum* (Hpg), menginfeksi saluran pernafasan bagian atas pada ayam petelur, ayam pedaging atau unggas lain. Di Indonesia penyakit snot menular telah dilaporkan sejak tahun 1974, menyerang ayam petelur pada berbagai peternakan ayam ras. Bakteri *Haemophilus paragallinarum* telah diisolasi dan terdiri dari 3 serovar yaitu A, B dan C (3,4,5). Diagnosa penyakit coryza dilakukan secara konvensional dengan teknik isolasi dan identifikasi untuk menentukan agen penyebab utama. Diagnosa lain bisa dilakukan secara molekuler yaitu dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), diagnosa serologis secara *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dan diagnosis serologik secara *Haemagglutination Inhibition* (HI) (8).

Hingga saat ini banyak uji serologik yang dipakai untuk peneguhan diagnosis infeksi *Haemophilus paragallinarum* (Hpg), akan tetapi yang paling populer

dipakai ialah uji HI (1), terdiri atas: *simple*, *extracted* dan *treated tests*. Uji HI yang paling sederhana didasarkan pada penggunaan sel utuh *H. paragallinarum* serovar A dan sel eritrosit ayam (2). Teknik ini hanya dapat mendeteksi antibodi pada ayam hasil vaksinasi atau yang pernah terinfeksi/terpapar oleh Hpg serovar A. Metode *extracted* HI didasarkan pada *potassium thiocyanate* (KSCN) - ekstraksi dari sel Hpg yang disonikasi dan eritrosit ayam yang difiksasi dengan glutaraldehid (6). Uji ini dapat membedakan antibodi spesifik serovar C pada darah ayam yang terinfeksi atau divaksinasi dengan Hpg serovar C. Kelemahan dari uji *extracted* HI, yaitu ayam yang terinfeksi secara alamiah akan bereaksi negatif. Uji *treated* HI dilakukan berdasarkan pada perlakuan hialuronidase sel utuh Hpg dan eritrosit ayam yang difiksasi dengan formaldehid (10). Teknik ini belum distandarisasi dan belum banyak dipakai. Uji ini dipakai untuk deteksi antibodi pada ayam yang divaksinasi dengan vaksin coryza serovar A, B dan C tapi hanya antibodi serovar A dan C yang menunjukkan hasil titer yang tinggi (9). Teknik ini pernah

dipakai untuk *screening* serum ayam di Indonesia untuk mendeteksi antibodi serovar A, B, dan C pada ayam yang terinfeksi secara alamiah (9). Evaluasi terhadap metode *treated HI test* untuk deteksi respon antibodi pada ayam hasil vaksinasi, dilaporkan bahwa pada titer 1 : 5 atau lebih dapat memberikan proteksi terhadap ujiantang. Akan tetapi, tidak banyak hasil penelitian atau data yang mendukung korelasi antara titer dan proteksi pada uji vaksin *coryza* di lapangan (6).

Seperti diketahui sampai saat ini di Indonesia terdapat banyak laboratorium baik pemerintah, perguruan tinggi maupun swasta yang mempunyai aktifitas pengujian *coryza* secara serologis HI. Pelaksanaan uji banding merupakan salah satu cara untuk melaksanakan jaminan mutu hasil oleh suatu laboratorium pengujian. Adanya perbedaan masa kerja, pengalaman, ketrampilan dan peralatan maka untuk mengetahui kinerja dan menyelaraskan hasil uji HI antar laboratorium perlu diadakan uji banding untuk pengujian ini.

MATERI DAN METODE

Serum sampel

Serum yang digunakan untuk uji banding ini diambil dari serum ayam SPF yang telah divaksinasi dengan vaksin *coryza* tipe A. Sepuluh ekor ayam SPF umur 4 (empat) minggu divaksin dengan dosis 0,5 ml/dosis secara subkutan dan setelah 2 (dua) minggu dilakukan *booster* vaksinasi dengan dosis dan cara yang sama, dan setelah 2 (dua) minggu pasca vaksinasi yang kedua, sepuluh ekor ayam tersebut diambil serumnya untuk dilakukan uji serologis dengan metode HI.

Dari 10 (sepuluh) serum yang terkumpul tersebut kemudian masing-masing dibagi menjadi tiga bagian dan dikirim ke dua laboratorium lain untuk dilakukan uji serologis dengan metode yang sama.

Uji Serologis

Pengujian (*HI Test*) dilakukan di Unit Uji Bakteriologi BBPMSOH dan dua laboratorium lain yang kompeten. *Red Blood Cell* (RBC) 0,5 % dan antigen *Coryza* tipe A disiapkan sebelum melakukan uji ini. Berikut adalah prosedur pembuatan RBC 0,5 %. Pengambilan darah ayam untuk pembuatan RBC 0,5 % dilakukan dengan menggunakan *syringe* 10 ml yang telah terisi larutan *alvear* 5 ml. Darah ayam SPF diambil sebanyak 5 ml (1:1) kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 – 2000 rpm selama 10 menit, kemudian buang supernatan. Tambahkan dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 5 ml lalu disentrifus kembali dan supernatan dibuang. Proses ini diulang 3 (tiga) kali dengan cara dan kecepatan sentrifus yang sama. Kemudian buat RBC 0,5 % dengan PBS sebagai *diluent*.

Untuk mengetahui titer antigen *coryza* tipe A yang digunakan, dilakukan uji *Haemagglutination (HA) Test* dengan metode sebagai berikut. Masukkan 40 µl PBS ke dalam masing-masing *well* pada *microplate* bentuk V kecuali pada *well* pertama dimasukkan sebanyak 80 µl. Setelah itu masukkan 20 µl antigen *coryza* pada *well* pertama dan kemudian antigen diencerkan 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, terakhir dibuang dan pada *well* ke-8 digunakan sebagai kontrol RBC. Pada *well* pertama dibuang sebanyak 20 µl dan masukkan RBC 0,5 % ke dalam masing-masing *well* sebanyak 40 µl. Setelah di *shaker* sampai tercampur kemudian didiamkan pada temperatur kamar 40-50 menit dan dibaca hasil titernya.

Setelah RBC 0,5 % tersedia dan titer antigen *coryza* tipe A diketahui, maka dilakukan pengujian titer serum dengan metode *HI Test*. Berikut prosedur pengujian *HI Test* pada serum *coryza* tipe A. Masukkan 20 µl PBS ke dalam masing-masing *well* pada *microplate* bentuk V kecuali pada *well* pertama sebanyak 80 µl dan masukkan 20 µl serum *coryza* pada *well* pertama. Kemudian serum diencerkan dengan pengenceran 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, terakhir dibuang dan pada *well* ke-8 digunakan sebagai kontrol. Pada *well* pertama dibuang sebanyak 40 µl. Masukkan antigen *coryza* tipe A 4 HAU sebanyak 20 µl ke dalam masing-masing *well* (1-7) kecuali *well* ke -8 (kontrol). Setelah di diaduk dengan *shaker plate* sampai tercampur dan didiamkan pada suhu kamar 15-20 menit. Setelah didiamkan masukkan RBC 0,5 % ke dalam masing-masing *well* sebanyak 40 µl. Lalu di *shaker* sampai tercampur dan didiamkan pada temperatur kamar selama 40-50 menit. Pembacaan hasil titer serum *coryza* dilakukan dengan melihat *plate* dari atas. Positif HI terlihat adanya endapan RBC di *well* bagian bawah atau dengan memiringkan *plate* agar terlihat adanya aliran RBC, aliran RBC menunjukkan positif HI.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang diuji pada uji banding ini adalah serum ayam pasca vaksinasi yang disiapkan oleh BBPMSOH. Sepuluh sampel dikirim ke 2 (dua) perusahaan yang memiliki laboratorium untuk pengujian HA/HI *coryza* yaitu Laboratorium I dan Laboratorium II. Ketiga peserta melakukan pengujian serum dengan metode dan antigen yang sama. Adapun hasil pengujian sebagaimana dalam tabel berikut :

No	Sampel	Nilai Titer HI (IU)		
		Laboratorium I	Laboratorium II	BBPMSOH
1	Serum 1	10	20	10
2	Serum 2	40	20	40
3	Serum 3	40	40	40
4	Serum 4	160	160	160
5	Serum 5	160	80	80

Saluran 6	160	160	160
Saluran 7	40	40	40
Saluran 8	160	160	160
Saluran 9	5	20	10
Saluran 10	80	80	80

Keterangan : * laboratorium swasta

Interpretasi hasil dilakukan dengan melihat pada *microplate v bottom* dengan melihat dari atas. Hasil positif HI ditunjukkan dengan adanya endapan pada bagian bawah *well* atau dengan memiringkan *plate* agar terlihat adanya aliran RBC, aliran RBC menunjukkan positif HI. Pada serum nomor 9, dari hasil titer ketiga laboratorium antara Laboratorium I dengan BBPMSOH tidak ada perbedaan karena perbedaan hasil titer tidak lebih dari satu kelipatan (5:10). Demikian juga jika dibandingkan dengan Laboratorium II dan BBPMSOH untuk sampel nomor 9 tidak ada perbedaan, karena hasil titer tidak lebih dari 1 kali kelipatan (20:10). Akan tetapi hasil titer antara Laboratorium I dengan Laboratorium II untuk sampel no. 9 terdapat perbedaan hasil, karena perbedaan hasil titer lebih dari satu kelipatan (20:5).

Dari tabel hasil uji banding pengujian titer serum pasca vaksinasi coryza antar ketiga laboratorium tersebut terlihat ada 6 serum sampel (60%) yang memiliki hasil titer yang sama yaitu pada serum nomor 3,4,6,7,8 dan 10. Sedangkan yang memiliki hasil titer yang berbeda tetapi hasil tersebut masih bisa dianggap sama karena perbedaan hasilnya hanya satu kali kelipatan ada 3 serum sampel (30%) yaitu pada serum nomor 1,2 dan 5. Hasil sampel yang memiliki perbedaan hasil karena hasil titer lebih dari satu kelipatan ada 1 sampel (10%) pada sampel serum nomor 9, yaitu antara Laboratorium I dan Laboratorium II.

Hasil dari pengujian titer antigen yang digunakan untuk uji HI ini dari ketiga laboratorium menunjukkan hasil yang sama yaitu 160 HAU, sedangkan untuk uji HI serum nomor 9 terdapat perbedaan antara Laboratorium I dan Laboratorium II hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain penanganan serum oleh penguji sebelum dilakukan pengujian HI, kemampuan penguji untuk membaca hasil titer, perbedaan masa kerja penguji, kemampuan penguji untuk melakukan pengenceran serum yang tepat dan konsisten dan juga proses pembuatan reagen-reagen yang digunakan.

KESIMPULAN

Hasil uji banding pengujian titer antibodi coryza dengan metode *Haemagglutination Inhibition (HI)* antara laboratorium Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) dengan dua laboratorium lain tidak ada perbedaan karena perbedaan hasil titer tidak lebih dari satu kelipatan, sedangkan antara Laboratorium I dengan Laboratorium II terdapat perbedaan yaitu pada serum nomor 9 karena perbedaan titer lebih dari satu kelipatan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Blackall PJ, and Yamamoto R. 1998. *Infectious Coryza*. In : A. Laboratory Manual For The Isolation And Of Avian Pathogens 4 Edition. SWANINE D.E (ED) American Association of Avian Pathologist. Philadelphia.pa pp 29-34.
2. Iritani YG, Sugimori and Katagiri K. 1977. Serologic response To *Haemophilus paragallinarum* Inartificially Infected And Vaccinated Chicken. Avian Dis. 21: 1 – 8.
3. Poernomo S. 1975. *Haemophilus gallinarum* pada ayam.I. Isolasi *Haemophilus Gallinarum* Pada Ayam, Bull. LPPH. 8-9: 11-13
4. Poernomo S, Sutarma dan Nazarudin Y. 1997. *Haemophilus paragallinarum* Pada Ayam di Indonesia.II.Sifat-sifat Fisiologik dan Biokimiawi Isolat *Haemophilus spp.* Dari Ayam Sakit. JTV2(4): 263-269.
5. Poernomo S, Sutarma, Rafiee M, and Blackall PJ. 2000. Characterization of Isolate of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia. Aust. Vet-J. 78:759-762
6. Sawata A, Kume, and Nakase Y. 1982. Hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* Serotype 2 Organism : Occurrence And Immunologic Properties of Hemagglutinin. Am.J.Vet.Res.43:1311 - 1314
7. Takagi MT, Takahashi N, Hirayama, Istianingsih, Mariana S, Zarkasie KJ, Ogata M, and Ohta S.1991. Survey of Infectious *Coryza* Of Chickens In Indonesia. J. Vet. Med. Sci. 53: 637 – 642.
8. Ariyanti T, dan Supar. 2007. Pengendalian *Coryza* Infeksius Pada Ayam, *Wartazoa Vol. 17 No. 4 Balai Besar Penelitian Veteriner*. 185-188
9. Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y, and Hayashi Y. 1991. Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* Serovar B Strains. Avian Dis. 35: 965 – 968.
10. Yamaguchi T, Iritani Y and Hayashi Y. 1989. Hemagglutinating Activity And Immunological Properties Of *Haemophilus Paragallinarum* Field Isolates In Japan. Avian Dis. 33: 511 – 515.