

## PERBANDINGAN PENGUJIAN VAKSIN IBD AKTIF MENGGUNAKAN METODE UJI *ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY* (ELISA) KIT KOMERSIAL DAN *SERUM NEUTRALIZATION TEST* (SNT)

RAHAJENG SETIAWATY, EMILIA, YATI SUYATI, NENI NURYANI

*Unit Uji Virologi*

*Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor 16340*

### ABSTRAK

*Infectious Bursal Disease* (IBD) atau gumboro adalah penyakit yang disebabkan oleh virus dari genus *Avibirnavirus* family *Birnaviridae*. Hewan yang rentan terhadap penyakit ini adalah kalkun, bebek, *guinea fowl*, burung unta dan ayam. IBD dapat mengakibatkan immunosupresi pada ayam yang terinfeksi sehingga lebih rentan terserang penyakit. Virus IBD terdiri dari 2 jenis serotipe, yaitu serotipe 1 dan 2. *Serum Neutralization* (SN) merupakan teknik pengujian yang sangat sensitif dan paling memungkinkan untuk mengukur titer antibodi IBD dan merupakan gold standar pengujian. Sepuluh ekor ayam berumur 4 hari divaksinasi 1 dosis vaksin secara oral, setelah 3 minggu darah dikoleksi dan diambil serumnya lalu serum tersebut diuji menggunakan metode SN. Serum diencerkan kemudian ditambahkan 50 µl virus sejumlah 100 TCID<sub>50</sub> kemudian disimpan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dan diamati perubahannya selama 3-5 hari. Uji ELISA prinsipnya adalah mengukur jumlah antibodi di dalam serum dengan indikator warna yang terlihat, warna kuning yang terlihat menunjukkan adanya ikatan anti-IBD antibodi dan intensitas warnanya berhubungan dengan jumlah anti-IBD yang ada di dalam sampel. ELISA kit yang digunakan adalah ELISA kit komersial merek Biocheck. Titer antibodi ayam pasca vaksinasi IBD yang diambil darahnya pada minggu ke-3 dan ke-4 ternyata saling berkorelasi positif jika diuji menggunakan SNT dan ELISA kit komersial merek Biocheck. Nilai ELISA berkorelasi positif dengan nilai SNT. Hal ini dibuktikan dengan nilai ELISA yang setara dengan nilai SN baik pada minggu ke-3 maupun minggu ke-4 pengambilan darah. Dengan demikian, ELISA dapat dijadikan sebagai uji pendukung dari uji SNT untuk memperkuat hasil apabila dari hasil uji SNT tidak diperoleh hasil yang memenuhi syarat pengujian mutu.

**Kata kunci:** Vaksin IBD, Penyakit IBD, Metode ELISA, Uji SN

### ABSTRACT

*Infectious Bursal Disease* (IBD) or Gumboro is a disease caused by a virus of the genus *Avibirnavirus* *Birnaviridae* family. The animals susceptible to this disease are turkeys, ducks, guinea fowl, ostrich and chicken. IBD may lead to immunosuppressive in chickens infected making it more vulnerable to disease. IBD virus is composed of two types of serotype, the serotype 1 and 2. *Serum neutralization* (SN) is a technique that is highly sensitive to measure the antibody titer of IBD and the gold standard of assay. Ten of 4-day-old chickens vaccinated orally one dose of vaccine, after 3 weeks blood is collected and serum is taken then all serum is tested using SN method. Diluted serum then added 50 mL virus containing 100TCID<sub>50</sub>, then stored in 5% CO<sub>2</sub> incubator and observed during 3-5 days. ELISA test in principle is to measure the amount of antibodies in the serum which color that visible as the indicator. The visible yellow color indicates the presence of anti-IBD binding antibody and the intensity of the color is related to the amount of anti-IBD in the sample. ELISA kit used was a commercial ELISA kit Biocheck brands. Chicken antibody titer post-vaccination blood IBD taken at week 3 and 4 was positively correlated when tested using SNT and ELISA kits Biocheck commercial brands. There are positive correlation between SNT value and ELISA, which mean there are no significant difference among them.

**Keywords:** IBD Vaccine, IBD, ELISA Method, SN Test

## PENDAHULUAN

*Infectious Bursal Disease* (IBD) atau gumboro adalah penyakit yang disebabkan oleh virus dari genus *Avibirnavirus* family *Birnaviridae*. Hewan yang rentan terhadap penyakit ini adalah kalkun, bebek, *guinea fowl*, burung unta, dan ayam. Pada ayam, selain rentan juga menunjukkan gejala klinis. Penyakit ini menyerang ayam dan mortalitasnya tinggi pada umur 3-6 minggu, sedangkan pada ayam berumur 0-3 minggu hanya bersifat akut dan subklinis. Gumboro juga mengakibatkan immunosupresi pada ayam yang terinfeksi <sup>(1)</sup> IBD terdiri dari 2 jenis serotype, yaitu, serotype 1 dan 2 <sup>(6)</sup>.

Infectious Bursal Disease (IBD) merupakan salah satu penyakit unggas yang utama di banyak negara <sup>(9)</sup> dan endemik di seluruh dunia <sup>(7)</sup>. Virus ini sangat tahan terhadap kondisi lingkungan dan tahan hidup di luar tubuh ayam selama 4 bulan. Apabila suatu peternakan sudah tertular virus IBD, maka untuk selanjutnya penyakit tersebut akan selalu berjangkit, karena virus IBD sangat sulit untuk dibebaskan dari peternakan <sup>(8)</sup>.

Pemberian vaksinasi IBD melalui air minum merupakan metode yang umum digunakan, dan efikasinya tergantung dari beberapa faktor, salah satunya adalah waktu pemberiannya <sup>(3)</sup>. Waktu pemberian vaksinasi yang tepat dapat terlihat dari tes yang rutin dilakukan. *Serum Neutralization* (SN) merupakan teknik yang sangat sensitif dan spesifik serta paling memungkinkan untuk mengukur titer antibodi IBD. Titer antibodi dari SN dapat memberikan informasi apakah ayam tersebut tahan (*susceptible*) terhadap vaksinasi <sup>(4)</sup>. Meskipun SN membutuhkan waktu dan biaya ujinya mahal, tetapi dapat dilakukan secara rutin, jika dibandingkan dengan ELISA yang biaya ujinya lebih murah dan cepat. Lebih jauh lagi, menurut titer hasil uji ELISA berhubungan erat dengan titer hasil uji SN <sup>(4)</sup>. Uji yang dilakukan di Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) menggunakan metode SN karena lebih sensitif dalam mendeteksi adanya antibodi dan merupakan *gold standard*.

## MATERI DAN METODA

### Materi

Bahan yang digunakan dalam uji potensi ini adalah : vaksin IBD Aktif dengan kode A, ayam SPF umur 4 hari, Telur SPF umur 9 hari, syringe 1 ml dan 3 ml, *pipette tips*, ELISA kit (Biocheck®) 1 set. Peralatan yang digunakan dalam uji potensi ini adalah isolator (Kokhensa, Jepang), *tissue culture* set, pipet 1 ml, 5 ml, sentrifuse set, penangas air, mikropipet single dan multichannel, microplate Nunc 96 well, dan ELISA reader (Dynex technologies, USA).

### Metode

Metode pengujian vaksin IBD aktif berdasarkan Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid 1 Edisi 4 Tahun 2013.

### Uji potensi

Metode pengujian ini menggunakan 1 dosis vaksin yang diberikan secara oral kepada 20 ekor ayam umur 4 hari, dimana 10 ekor mendapatkan perlakuan vaksinasi, sedangkan 10 ekor sebagai kontrol tidak divaksinasi. Setelah minggu ke-3 dan ke-4, masing-masing darah ayam vaksinasi dan kontrol dikoleksi dan diambil serumnya. Kemudian serum diuji menggunakan metode SN. Serum yang diambil pada minggu ke-3 dan ke-4 setelah vaksinasi selanjutnya disebut serum postvaksinasi.

### Prosedur pembuatan *Chicken Embryo Fibroblast* (CEF)

Telur ayam SPF berumur 8-10 hari diambil embrionya, kemudian dipisahkan bagian kepala, ekor, sayap dan kakinya. Dibersihkan dengan larutan Phosphat Buffer Saline (PBS) dengan pH 7.3 sebanyak 3 kali, pada pencucian terakhir, embrio tersebut diputar di atas mixer lalu dipisahkan antara supernatan dan endapannya. Trypsin 2,5% sebanyak 1 bagian dicampur dengan PBS dan Penicillin, Streptomycin, Kanamycin (PSK) 1% sebanyak 9 bagian dihangatkan pada penangas air dengan suhu 36° C, dituangkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi endapan embrio dan kemudian diaduk

selama 5 menit. Setelah 5 menit kemudian, sisa trypsin 2,5% dan PBS + PSK 1% ditambahkan kembali ke dalam erlenmeyer dan diaduk selama 15 menit. Setelah 15 menit, cairan kemudian disaring dan disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan kemudian dibuang dan ditambahkan *growth medium* (GM), lalu disentrifus kembali dengan waktu dan kecepatan yang sama. Supernatan kemudian dibuang dan ditambahkan *growth medium* (GM) dan dihomogenkan. Diambil kurang lebih 50  $\mu$ l dan dimasukkan ke dalam kamar hitung. Jumlah sel yang terbaca di kamar hitung kemudian dikonversikan sehingga diperoleh jumlah GM yang harus ditambahkan.

#### Uji Serum Netralisasi (SN)

Serum sebanyak 25  $\mu$ l diencerkan dimulai dari pengenceran 8 sampai 1024 di dalam microplate 96 well yang telah berisi *Maintenance Media* (MM) sebanyak 175  $\mu$ l. Virus kemudian diencerkan dengan dosis 100 TCID<sub>50</sub>, kemudian ditambahkan ke dalam microplate 96 well yang telah berisi campuran serum dan media, dan diencerkan kembali. *Back titration* dilakukan sebagai validasi pengenceran virus. Microplate kemudian disimpan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dan diamati perubahannya selama 3-5 hari.

#### Uji ELISA

Uji ELISA dilakukan dengan menggunakan ELISA kit untuk IBD (Biocheck). Microplate yang telah di *coating* dengan antigen IBD yang sudah diinaktivasi kemudian ditambahkan serum yang telah diencerkan dengan diluent dimana anti-IBD antibodi yang ada akan berikatan sehingga terbentuk ikatan kompleks antigen-antibodi. Antibodi nonspesifik dan protein serum yang lain kemudian dicuci dengan *washing buffer*. *Anti-Chicken IgG* yang telah dilabel dengan enzim *alkaline phosphatase* kemudian ditambahkan ke dalam well yang akan mengikat anti-IBD antibodi yang telah berikatan dengan antigen. Konjugat yang tidak bereaksi kemudian di cuci dan ditambahkan substrat untuk membentuk pNPP (para NitroPhenylPhospat) *chromogen*. Warna kuning terlihat jika ada ikatan anti-IBD antibodi, dan intensitas warnanya

berhubungan dengan jumlah anti-IBD yang ada di dalam sampel.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Serum pascavaksinasi IBD ayam SPF, 3 dan 4 minggu yang diambil kemudian diuji titer antibodinya menggunakan uji SN dengan cara diencerkan dengan *Maintenance Medium* (MM) mulai dari pengenceran 8 sampai 1024. Hasil titer antibodi dari serum yang diuji tersebut ternyata kurang dari 8 (Tabel 1).

Tabel 1. Titer antibodi vaksin IBD aktif A, 3 dan 4 minggu pascavaksinasi dengan metode uji SN

Kode serum	Titer antibodi
S1	<8
S2	<8
S3	<8
S4	<8
S5	<8
S6	<8
S7	<8
S8	<8
S9	<8
S10	<8
GMT	<8

Menurut FOHI jilid 1 edisi 4 titer antibodi minimal dari uji potensi secara serologi adalah 512, sedangkan dari tabel di atas dapat dilihat bahwa titer antibodi serum individual dan rata-rata titer antibodi secara keseluruhan kurang dari 8, sehingga harus dilakukan uji banding dengan menggunakan metode lain untuk membuktikan bahwa titer antibodi serum pascavaksinasi adalah benar kurang dari 8 jika menggunakan uji serologis lain. ELISA digunakan sebagai pembandingan uji karena dianggap lebih cepat, praktis dan akurat.

Uji ELISA sebagai pembandingan metode pengujian yang dilakukan menggunakan ELISA Kit komersial merk Biocheck® (*Biocheck Poultry Immunoassay*). Kit IBD ELISA pada prinsipnya adalah mengukur jumlah antibodi dari serum

ayam yang diuji. Mikroplate yang digunakan telah dilapisi dengan antigen IBD. Sampel serum ayam diencerkan dengan *diluent* dan ditambahkan ke dalam mikroplat sehingga terbentuk ikatan antigen-antibodi, antibodi non spesifik dan serum protein lain dicuci dengan *washing buffer*, kemudian ditambahkan *Anti-chicken IgG* yang telah dilabel dengan enzim *alkaline phosphatase*, penambahan ini akan membentuk ikatan anti-IBD-antibody-antigen. Pencucian kemudian dilakukan kembali agar konjugat yang tidak bereaksi hilang, setelah itu ditambahkan substrat. Apabila ikatan anti IBD antibodi terbentuk maka warna kuning akan terlihat, warna kuning ini ada hubungannya dengan kadar anti-IBD yang ada di sampel serum. Berikut adalah tabel hasil pengujian ELISA serum ayam postvaksinasi 3 dan 4 minggu dari sampel uji berkode A dengan pembandingan kontrol positif antibodi dari sampel yang lulus uji potensi.

(VN) dan ELISA. Menurut OIE,2012 dengan menggunakan metode VN ada kemungkinan titer antibodi dapat terdeteksi apabila dengan metode lain tidak dapat dideteksi titer antibodinya. Dari segi hasil uji, ada korelasi positif pada metode uji VN, sedangkan pada metode uji ELISA dan VN hasilnya dapat bervariasi tergantung dari reagen ELISA yang digunakan. Menurut de witt *et al* (1998.) Titer antibodi yang dihasilkan melalui uji ELISA mempunyai korelasi positif dengan titer antibodi yang dihasilkan melalui uji VN.

Tabel 2 menunjukkan bahwa hasil uji ELISA pada ayam 3-4 minggu pascavaksinasi yang diambil darahnya bervariasi mulai dari 64-12608, sedangkan pada kontrol positif mulai dari 7307-27658. Hasil ini menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara hasil uji ayam pascavaksinasi dengan Kode A dibandingkan dengan kontrol positif antibodi IBD.

Tabel 2. Hasil uji ELISA serum pascavaksinasi vaksin IBD aktif berkode A, 3 dan 4 minggu

Kode Serum	Umur ayam pascavaksinasi					
	ELISA 3 minggu	Ket	ELISA 4 minggu	Ket	ELISA kontrol positif	Ket
1	0	Negatif	0	Negatif	15674	positif
2	475	Positif	176	Negatif	26211	positif
3	12608	Positif	53	Negatif	8364	positif
4	0	negatif	150	Negatif	15063	positif
5	1418	Positif	64	Negatif	7307	positif
6	808	Positif	647	Positif	27658	positif
7	661	Positif	0	Negatif	24528	positif
8	405	Suspect	0	Negatif	12589	positif
9	377	Suspect	0	Negatif	15780	positif
10	241	Negatif	0	Negatif	-	

Tabel 3. Analogi antara nilai S/P, rentang titer dan status antibodi pada hasil uji menggunakan kit ELISA dari serum uji Vaksin IBD aktif berkode A

No	Nilai S/P	Rentang titer ELISA	Status antibodi
1	0.149 atau kurang	284 atau kurang	Negatif
2	0.150-0.199	285-390	Suspect
3	0.200 atau lebih	391 atau lebih	Positif

Sebagai gambaran agar memudahkan pembacaan, berikut ditampilkan tabel perbandingan antara uji SN dan ELISA vaksin IBD aktif dengan kode A.

Menurut OIE, 2012 uji-uji serologis yang dapat mendeteksi antibodi IBD spesifik di dalam serum adalah sebagai berikut : Virus Netralisasi

Titer antibodi pada uji SN dengan kode A dengan hasil kurang dari 8 menunjukkan adanya korelasi positif antara hasil uji ELISA dengan uji SN. Pada tabel 4 dapat dilihat serum no 1 dan 2 dari ayam pasca vaksinasi 3 minggu hasil uji ELISA tidak terdeteksi (0), pada uji SNT serum tersebut

Tabel 4. Perbandingan hasil uji antara SNT dan ELISA vaksin IBD aktif dengan kode A pada pengambilan darah pascavaksinasi 3 minggu dan 4 minggu

Kode serum	Umur ayam pasca vaksinasi								
	ELISA					SNT			
	3 mgg	Ket	4 mgg	Ket	kontrol positif	Ket	3 mgg Pengenceran 8	4 mgg Pengenceran 2	Kontrol Positif
1	0	Negatif	0	Negatif	15674	positif	<8	<8	1024
2	475	Positif	176	Negatif	26211	positif	<8	<8	1024
3	12608	Positif	53	Negatif	8364	positif	<8	<8	1024
4	0	negatif	150	Negatif	15063	positif	<8	<8	1024
5	1418	Positif	64	Negatif	7307	positif	<8	<8	512
6	808	Positif	647	Positif	27658	positif	<8	<8	1024
7	661	Positif	0	Negatif	24528	positif	<8	<8	1024
8	405	Suspect	0	Negatif	12589	positif	<8	<8	512
9	377	Suspect	0	Negatif	15780	positif	<8	<8	1024
10	241	negatif	-	-	-				

juga menghasilkan nilai titer kurang dari 8. Serum no. 10 dari ayam post vaksinasi 3 minggu hasil uji ELISA bernilai 241, pada uji SNT serum tersebut juga menghasilkan nilai titer kurang dari 8. Hal ini sejalan dengan interpretasi yang diberikan dari ELISA kit (tabel 3) bahwa dengan rentang titer 284 atau kurang, maka status antibodinya negatif. Pernyataan ini sesuai dengan El-Mahdy *et al* (2013), bahwa ada korelasi antara hasil uji ELISA dan hasil uji SNT yang digunakan untuk mengukur titer antibodi dalam penelitiannya. Pada serum no. 5 dan no. 8 hasil ELISA pada 3 minggu post vaksinasi diperoleh hasil 1418 (positif) dan 405 (*suspect*), namun setelah dilakukan SNT dapat dilihat bahwa titer antibodi tetap kurang dari 8, sebagai perbandingan, serum kontrol positif antibodi IBD no. 5 dengan hasil ELISA 7307, diperoleh titer SNT 512, dan serum no. 3 dengan titer ELISA 8364, diperoleh titer SNT 1024 yang artinya setelah rentang 8000 ke atas dari titer antibodi ELISA barulah dapat diperoleh titer antibodi SNT lebih dari 512. Menurut De Herdt *et al* (2005) bahwa ada hubungan yang linear antara titer ELISA dan titer SNT, sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa hasil uji serum pasca vaksinasi dengan kode A menggunakan metode ELISA dan SNT adalah sejalan.

### KESIMPULAN

Titer antibodi ayam post vaksinasi IBD yang diambil darahnya pada minggu ke-3 dan ke-4 dan kemudian diuji dengan menggunakan ELISA kit komersil merk Biocheck ternyata berkorelasi

positif dengan titer antibodi ayam post vaksinasi IBD yang diambil darahnya pada minggu ke-3 dan ke-4 dan kemudian diuji dengan SN. Hal ini dibuktikan dengan nilai ELISA yang setara dengan nilai SN baik pada minggu ke-3 maupun minggu ke-4 pengambilan darah. Dengan demikian maka untuk memperkuat hasil uji potensi vaksin IBD *live* dapat dilakukan dengan metode ELISA apabila diperlukan.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Babiker. M.A.A, & Tawfeeg.E. 2008. *Role of Administration Routes of Anti-Infectious Bursal Disease Virus (Gumboro) Vaccine on Immunization of Chicken*. International Journal of Poultry Science 7(3) : 279-282.
2. De Herdt.P, Jagt. E, Paul. G, Van colen. S, Renard. R, Destrooper. C, & Van den bosch. G. 2005. *Evaluation of The enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bursal disease virus (IBDV) and the estimation of the optimal age for IBDV vaccination in broilers*. Avian Pathology, pp : 501-504.
3. De Wit, J.J., Fabri T.H.F, & Heijmans J.F. 2001a. *Reasons for vaccination failure. Annual report and proceedings of COST Action 839 : immunosuppressive viral diseases in poultry* (pp. 168-170). European Commission Directorate General for research.
4. De Wit J.J, & Van Loon A.A.W.M. 1998. *Gumboro Vaccination*. Tijdschrift voor Diergeneeskunde. 115,207,211.

5. **El-Mahdy Susan S, Hayam Farouk, El-Wanis N.A, & M.M Hamoud.** 2013. *Comparative studies between different commercial types of live infectious bursal disease (IBD) vaccine strains in Egypt.* American Journal of Research Communication Vol 1(10) pp : 113-129
6. **Office International des epizooties Terrestrial Manual** 2008. 2012. *Infectious Bursal Disease.* Chapter 2.3.12.
7. **Sharma, J.M., I.J. Kim, S. Rautenschlein & H.Y Yeh.** 2000. *Infectious Bursal Disease Virus of Chickens pathogenesis and immunosuppression* Dev. Comp. Immunol., 24 : 223-235.
8. **Soejodono, D.** 1996. Pengaruh Beberapa Subtipe Virus *Infectious Bursal Disease* Terhadap Keberhasilan Vaksinasi. Disertasi.
9. **Zaheer, Ahmed & Akhter S.** 2003. *Comparative Immune Response Pattern of Commercial Inter. Infectious Bursal Disease Vaccine against field isolates in Pakistan.* Int. J. Poult. Sci. 2 : 449-453.