DETEKSI ANTIGEN VIRUS AVIAN INFLUENZA PADA AYAM DENGAN METODE *HEMAGGLUTINATION ASSAY* (HA)

Fionna Aurellia Mulyoko (1)., Inggarsetya Syah Audini (2)

1. Mahasiswa Vokasi Universitas Gadjah Mada Jurusan Kesehatan Hewan
2. Balai Besar Perakitan dan Modernisasi Veteriner

PENDAHULUAN

Avian Influenza (AI) atau flu burung adalah salah satu penyakit yang diwaspadai oleh peternak. *Avian Influenza* yang dapat menginfeksi berbagai jenis unggas, seperti ayam, bebek, itik, kalkun dan burung. *Avian Influenza* ditularkan oleh virus *Influenza* tipe A dan termasuk ke dalam keluarga *Orthomyxoviridae*. Virus ini bersifat zoonosis atau dapat menular ke manusia. Tanda klinis yang muncul pada unggas dapat bervariasi, tergantung pada inang, strain virus, sistem kekebalan tubuh inang, dan faktor lingkungan. Beberapa gejala klinis yang dapat muncul pada unggas antara lain adalah penurunan konsumsi pakan, penurunan produksi telur, gangguan pernapasan, ataupun kematian mendadak tanpa gejala awal.

Virus ini dapat didiagnosis dengan mengisolasi virus ataupun dengan deteksi dan karakterisasi fragmen genomnya. Virus dapat dideteksi menggunakan sampel virus AI dari unggas terjangkit. Sampel dapat berupa organ, swab kloaka, swab organ nasal dan feses. Virus AI memiliki nukleoprotein dan protein matriks yang berkaitan secara antigenik yang diklasifikasikan kembali menjadi beberapa subtipe berdasarkan antigen hemaglutinin (H) dan neuraminidase (N). Menurut WHO, terdapat 16 subtipe H (H1-H16) dan 9 subtipeN (N1-N9). Virus AI yang populeradalah H5N1 karenaia bersifat zoonosis dan bahkan telah menyebabkan kematian. Berdasarkan patogenesisnya, virus AI dibagi menjadi dua tipe lagi, yaitu *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Virus AI H5N1 termasuk tipe virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI).

Salah satu pengujian serologis untuk mendeteksi keberadaan virus AI adalah uji *hemagglution assay* (HA). Uji HA adalah salah satu metode klasik yang masih digunakan hingga saat ini untuk mendeteksi virus AI yang cara kerjanya didasari oleh reaksi aglutinasi atau penggumpalan partikel berupa sel darah merah dengan antigen virus. Uji HA bertujuan untuk mengetahui konsentrasi antigen virus *Avian Influenza* (AI) yang dapat mengaglutinasi sel darah merah dalam bentuk titer hemaglutinasi berdasarkan sumuran terakhir yang menunjukkan tanda hemaglutinasi positif. Semakin kuat dan cepat reaksi aglutinasi yang terjadi, maka titer virus semakin tinggi.

Uji HA umumnya digunakan untuk deteksi cepat keberadaan antigen virus yang dapat mengaglutinasi sel darah merah dengan mencampurkan satu tetes suspensi antigen dan satu tetes sel darah merah. Uji HA juga dilakukan untuk mendapatkan nilai titer virus .

METODE

Pembuatan *Phosphate Buffer Saline* (PBS)

Larutan PBS dibuat dengan mencampurkan NaCl 8 gram, KCl 0,2 gram, Na2HPO41,15 gram, KH2PO4 0,2 gram ke dalam 1L akuades steril. Bahan-bahan tersebut dihomogenkan dan diukur nilai pHnya. Nilai pH dari larutan PBS adalah 7,2 – 7,4. Bila pH belum sesuai dapat ditambahkan HCl atau KOH, tergantung dengan nilai pH yang terukur RBC 1%.

Pertama, buat antikoagulan dengan alseiver untuk mencegah pembekuan darah. Larutan alsever dibuat dengan mencampurkan dextrose 10,25 gram, *sodium citrate* 4 gram, *citric acid* 0,275 gram dan *natrium chloride* 2,10 gram dalam 500 ml akuades steril. Darah ayam *Spesific Pathogen Free* (SPF) yang telah dikoleksi dicampurkan dengan larutan alsever menggunakan perbandingan volume yang sama. Campuran disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, lalu endapan dicuci dengan ditambahkan PBS dan disentrifus 1500 rpm selama 10 menit. Pencucian diulangi selama tiga kali. Endapan setelah pencucian terakhir adalah sel darah merah murni atau RBC 100%. RBC 100% selanjutnya dilakukan pengenceran menggunakan PBS menjadi RBC 10%, kemudian diencerkan kembali menjadi RBC 1%.

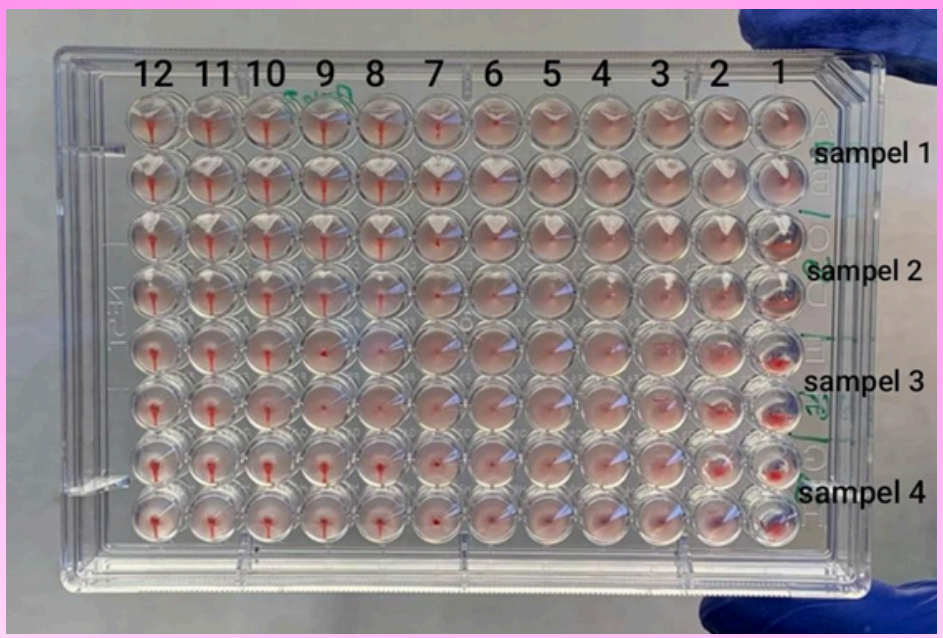
Uji *Hemagglutination Assay* (HA)

Microplate V bottom sumur ke 1-12 seluruhnya diisi dengan 25 µl PBS tiap sumurnya. Sumur pertama ditambahkan 25 µl antigen virus yang akan diuji dan dihomogenkan. Sebanyak 25 µl cairan dari sumur pertama diambil, lalu dipindahkan ke dalam sumur kedua dan dihomogenkan. 25 µl cairan dari sumur kedua diambil, lalu dipindahkan ke dalam sumuranketiga dan dihomogenkan. Langkah tersebut diulangihingga sumur 11. Sebanyak 25 µl cairan dari sumur 11 diambil dan dibuang. PBS sebanyak 25 µl ditambahkan ke dalam seluruh sumur dari 1 sampai 12. RBC 1% selanjutnya ditambahkan ke dalam seluruh sumur sebanyak 25 µl. Mikroplate digoyangkan secara perlahan, lalu diinkubasi dalam suhu ruang selama 30 menit. Plate ditegakkan setelah 30 menit diinkubasi untuk melihat dan membaca hasil dengan memperhatikan *teardrop* (*redpoint* yang menetes).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji HA dapat dilakukan untuk mendeteksi kemampuan antigen virus *Avian Influenza* (AI) dalam mengaglutinasi sel darah merah (*red blood cell*/RBC). Hasil pengamatan uji HA menunjukkan titer virus terhadap sel darah merah. Titer virus dilihat berdasarkan sumur terakhir yang masih menunjukkan aglutinasi, semakin tinggi titer virus, maka semakin tinggi jumlah virusnya. Hasil positif dari pengujian HA ditandai dengan teraglutinasinya sel darah merah atau terbentuk *smear*, sedangkan hasil negatif ditandai dengan terbentuknya titik merah atau *redpoint* yang ketika ditegakkan akan terbentuk *teardrop* akibat sel darah merah mengalir turun. Titer hemaglutinasi ditentukan sebesar 2^n dengan adalah nomor sumur terakhir terjadinya aglutinasi.

Pada mikroplate dilakukan pengujian terhadap 4 sampel yang berbeda dan masing-masingnya dilakukan pengujian duplo. Pengujian dilakukan secara duplo untuk memastikan keakuratan hasil dan meminimalisir kesalahan teknis. Menurut Abharina dkk. (2023), sampel pengujian HA dikatakan positif bila sel darah merah pada sumur sampel mengalami aglutinasi dan titer HA dapat dihitung melaluipengenceran tertinggi yang mampu mengaglutinasi sel darah merah. Berdasarkan hasil pengamatan pada mikroplate, empat sampel yang diuji positif antigen virus, dengan titer antigen virus sampel 1 mencapai 2^6, sampel 2 mencapai 2^6, sampel 3 mencapai 2^8 dan sampel 4 mencapai 2^7. Uji HA mudah dilakukan dan cepat untuk mendeteksi keberadaan antigen virus. Namun, untuk menentukan virus dan subtipe virus dapat dilanjutkan dengan uji *Hemagglutination Inhibition* (HI).



Gambar 1. Hasil Uji Hemalutinasi (HA)

DAFTAR PUSTAKA

Abharina, N. W., Kencana,G. A. Y., dan Wandia,I. N. 2023. Karakterisasi virusAvian Influenza H5N1 asal peternakan ayam petelur Kecamatan Legok, Kabupaten Serang, Banten. *Buletin Veteriner Udayana*, 15(5), 888–897.

Indarto, R. R. dan Humaidah,N. 2023. Kajian potensi tanamanherbal sebagai antiviral penyakit pernafasan ayam berdasarkan uji HA dan HI (*Literature Review*). *Jurnal Dinamika Rekasatwa*, 6(1), 65-73.

Kurniawan, F. R., Arsana, I. N., dan Adiputra, I. G. K. 2022. Titer hemaglutinasi dan kematian embrio pada telur *Spesific Antibody Negative* (SAN) dengan usia yang berbeda saat inokulasi virus Avian Influenza. *Jurnal Peternakan*, 19(1), 49–54.

WOAH. 2021.Terestrial manual: Chapter3.3.4. : *Avian Influenza (Including Infection With High Pathogenicity Avian Influenza Viruses*).