

## Deteksi Virus *Avian Influenza* Subtipe H5N1 pada Organ Ayam yang Terserang Flu Burung Sangat Patogenik di Jawa Timur dan Jawa Barat dengan Teknik Imunohistokimia

R. DAMAYANTI, N.L.P. I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO dan DARMINTO

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 16 Agustus 2004)

### ABSTRACT

DAMAYANTI, R., N.L.P. I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, A. WIYONO and DARMINTO. 2004. Detection of avian influenza virus H5N1 subtype in organs of chicken affected by highly pathogenic avian influenza in East and West Java by using immunohistochemical technique. *JITV* 9(3): 197-203.

The study was conducted to detect antigen H5N1 of highly pathogenic Avian Influenza (HPAI) virus in various farms in East and West Java. The immunohistochemical technique was applied due to Hematoxylin-eosin (H&E) staining was impossible to visualize the antigen in tissue. Immunohistochemical staining was applied for some visceral organs collected from the areas where the outbreaks occurred in September-October 2003. The specimens were processed as histopathological paraffin blocks using standard method. The blocks that were suspected to have antigen H5N1 were cut and rabbit antisera to H5N1 produced from the local isolate was applied as the primary antibody. Biotinylated secondary antibody and avidin biotin peroxidase from a commercial kit were administered. The antigen present in the tissues were visualized by adding a substrate called Amino Ethyl Carbazole (AEC) resulting in reddish brown colour. This immunostaining proved to be accurate and reliably quick method to detect H5N1 antigen present in the avian tissues. In conclusion, the outbreak of bird flu was caused by H5N1 strain and the antigen could be found in wattles, combs, brain, trachea, lungs, heart, proventriculus, liver, spleen, kidney and ovary.

**Key words:** Highly pathogenic Avian Influenza (HPAI), chicken, H5N1, outbreak, immunohistochemistry

### ABSTRAK

DAMAYANTI, R., N.L.P. I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, 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* 9(3): 197-203.

Penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi antigen virus H5N1 yang menyebabkan wabah flu burung sangat patogenik (HPAI) pada sejumlah peternakan ayam di Jawa Timur dan Jawa Barat. Metode ini dipakai karena dengan pewarnaan histopatologi konvensional, yakni hematoxylin-eosin (H&E), antigen tersebut tidak dapat dideteksi pada jaringan organ. Teknik pewarnaan imunohistokimia ini diaplikasikan terhadap sejumlah organ ayam yang dikoleksi dari peternakan di Jawa Timur dan Jawa Barat, pada saat terjadi wabah flu burung sangat patogenik pada bulan September–Oktober 2003. Sejumlah spesimen organ ayam diproses sebagai preparat histopatologi dan jaringan organ yang diduga mengandung virus flu burung direaksikan dengan antisera kelinci anti H5N1 dan avidin biotin kompleks peroksidase. Antigen yang terdapat pada jaringan organ ayam dapat divisualisasikan dengan penambahan pewarna/substrat *Amino Ethyl Carbazole* (AEC) yang menghasilkan warna coklat kemerahan. Teknik pewarnaan ini terbukti sangat cepat dan akurat untuk mengkonfirmasi diagnosis pada preparat histopatologi dan membuktikan bahwa hewan terinfeksi oleh virus flu burung galur H5N1. Dari kedua lokasi wabah di Jawa Barat maupun Jawa Timur, antigen H5N1 dapat dideteksi dengan sangat jelas pada kulit pial, jengger dan kaki, otak, trakhea, paru-paru, jantung, proventrikulus, hati, limpa, ginjal dan ovarium.

**Kata kunci:** Flu burung sangat patogenik (HPAI), ayam, H5N1, wabah, imunohistokimia

### PENDAHULUAN

Penyakit flu burung (*Avian Influenza* atau AI) dibagi menjadi dua kelompok, flu burung yang sangat patogenik (*Highly Pathogenic Avian Influenza* atau HPAI atau *fowl plaque*) dan flu burung yang kurang patogenik atau *Low Pathogenic Avian Influenza* atau LPAI. Kedua bentuk flu burung tersebut disebabkan oleh virus yang tergolong ke dalam famili

*Orthomyxoviridae* tipe A (EASTERDAY *et al.*, 1991). Menurut MURPHY dan WEBSTER (1996), subtipe virus digolongkan berdasarkan antigenisitasnya yang hingga saat itu terdapat 15 subtipe hemagglutinin (H) dan 9 subtipe neuraminidase (N). Sejauh ini subtipe yang menimbulkan HPAI hanya H5 dan H7 (OIE, 2000; ACVP, 2004). Infeksi virus HPAI pada ayam sangat fatal dan menular, biasanya disertai dengan gejala klinis pada saluran pernafasan, gastro-intestinal dan atau

syaraf. Unggas yang hidup di air merupakan reservoir yang utama. Penyakit HPAI ini terdaftar sebagai penyakit list A pada *Office International des Epizooties (OIE) Manual* (OIE, 2000). Penyakit ini pertama kali ditemukan di Italia sekitar tahun 1878, sedangkan di Amerika dikenal pada tahun 1924-1925.

Pada tahun 1997 dunia dikejutkan oleh wabah HPAI di Hongkong yang disebabkan oleh virus influenza yang sangat patogen, H5N1, dan menular pada manusia yang mengakibatkan 6 orang meninggal dunia (SUAREZ *et al.*, 1998). Pada bulan September–Oktober 2003, di Indonesia terjadi wabah penyakit unggas yang fatal dan menimbulkan kerugian ekonomi sangat besar. Pada bulan Januari 2004, pemerintah Indonesia akhirnya menyatakan bahwa wabah tersebut disebabkan oleh flu burung HPAI yang disebabkan oleh subtipe H5N1. Meskipun kejadian HPAI di Indonesia belum pernah dilaporkan terjadi pada manusia, namun sudah sepantasnya apabila penyakit berbahaya ini diwaspadai.

Meskipun pewarnaan H&E lebih mudah, cepat, dan dapat menggambarkan jenis dan distribusi lesi, tetapi tidak dapat mendeteksi antigen virus karena ukurannya yang sangat kecil. Hal ini berlainan dengan pewarnaan imunohistokimia yang berdasarkan pada reaksi antigen antibodi kompleks sehingga apabila pada jaringan organ mengandung antigen (virus H5N1) direaksikan dengan antisera anti H5N1 maka antigen tersebut dapat dideteksi dan divisualisasikan dengan substrat tertentu, misalnya AEC (VAN NOORDEN, 1986).

Jika isolasi dan identifikasi virus penyebab HPAI memerlukan waktu beberapa hari, teknik pewarnaan imunohistokimia ini hanya memerlukan waktu 5 jam untuk mendeteksi antigen. Keunggulan lain dari metode ini yaitu reaksi warna yang terjadi, sebagai hasil ikatan antigen-antibodi kompleks, tergolong cukup permanen sehingga tidak perlu dilihat dengan mikroskop fluoresens. Selain visualisasi antigen, jaringan organ yang terinfeksi dan derajat keparahan lesi dapat terlihat dengan jelas (BROWN *et al.*, 1992; DAMAYANTI dan DARMINTO, 2001). Aplikasi teknik imunohistokimia ini sudah terbukti akurat untuk mendeteksi antigen pada jaringan organ ayam yang terinfeksi *Lymphoid Leucosis* (LL), *New Castle Disease* (ND), *Infectious Bursal Disease* (IBD), *Infectious Laryngotracheitis* (ILT), *Fowl Pox*, *Infectious Bronchitis* (IB) (OWEN *et al.*, 1991) dan HPAI (BROWN *et al.*, 1992; HOOPER *et al.*, 1995).

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan virus H5N1 pada unggas yang diduga terserang HPAI, khususnya pada kasus wabah di Jawa Timur dan Jawa Barat pada tahun 2003. Deteksi antigen ini dilakukan dengan pewarnaan imunohistokimia dengan teknik avidin biotin peroksidase kompleks (ABC) pada jaringan organ ayam (HSU *et al.*, 1981).

## MATERI DAN METODE

### Sampel organ ayam

Sampel organ yang dipakai berasal dari sejumlah peternakan di Jawa Timur dan Jawa Barat, saat terjadi wabah flu burung pada bulan September–Oktober 2003 (DAMAYANTI *et al.*, 2004). Enam buah peternakan di Kabupaten Surabaya, Malang dan Blitar telah dikunjungi, terdiri dari ayam petelur (*breeder* dan komersial) dan pedaging *breeder*, dengan populasi berkisar antara 14.000-80.000, umur 17-70 minggu. Sementara itu, untuk Jawa Barat sampel berasal dari 5 peternakan di Bekasi, Bogor dan sekitarnya, dengan jenis petelur komersial dan pedaging *breeder*, dengan jumlah populasi 3.000-16.000, umur 11-53 minggu.

Sampel organ ayam diambil secara acak pada setiap flock, yaitu yang berasal dari 3 ekor bangkai ayam yang baru saja mati dan 3 ekor ayam sakit/sekarat dengan gejala klinis mengarah pada flu burung. Jenis organ yang dikoleksi yaitu kulit pial dan jengger, otak, trakhea, jantung, paru-paru, proventrikulus, hati, limpa, ginjal dan ovarium. Organ-organ tersebut dipotong 1 cm x 1 cm x 0,5 cm dan difiksasi dalam larutan formalin 10% yang sudah dibufer selama minimal 24 jam. Organ tersebut kemudian diproses menjadi blok parafin sesuai dengan metode standar.

Kontrol positif dipakai blok parafin yang mengandung organ ayam yang diinfeksi AI (92/224.8) dan untuk kontrol negatif dipakai blok parafin yang tidak mengandung virus AI (94/230.17, merupakan organ ayam yang diinfeksi virus *Newcastle Disease*/ND). Blok-blok tersebut diperoleh dari AAHL-CSIRO, Geelong, Australia.

### Antisera virus flu burung galur H5N1

Serum virus flu burung galur H5N1 ini diproduksi pada kelinci dewasa sesuai dengan metode yang digunakan oleh YAGYU dan OHTA (1987) dengan cara menyuntikkan isolat lokal H5N1 asal Jawa Timur (WIYONO *et al.*, 2004; DHARMAYANTI *et al.*, 2004). Isolat AI subtipe H5N1 diisolasi dari proventrikulus, kemudian diinaktivasi dengan 0,1% formalin sebelum disuntikkan secara intra muskular pada kelinci dengan dosis  $5 \times 2^8/0,5$  ml. Penyuntikan diulang sebanyak 4 kali secara intra vena dengan selang waktu 2 minggu. Selanjutnya imunisasi diulang setiap minggu dengan isolat tersebut dan kandungan antibodinya dimonitor dengan uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI) sesuai prosedur standar. Titer antibodi dinyatakan positif pada  $2^4$  namun pada penelitian ini antisera yang dipakai yaitu yang mempunyai titer  $2^6$  atau lebih.

Sebagai kontrol pembanding dipakai kontrol positif antisera terhadap AI (Mab AI, ID No. 8904-26-1500) dan kontrol negatif dipakai antisera terhadap non AI (Mab NDV, ID No. Q 24-1) yang diperoleh dari laboratorium AAHL-CSIRO, Geelong, Australia.

#### **Pewarnaan imunohistokimia dengan metode avidin biotin peroksidase**

Pewarnaan imunohistokimia pada penelitian ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh HSU *et al.* (1981), dengan menggunakan metode *avidin biotin peroxidase complex* (ABC). Dalam penelitian ini dipakai kit komersial (LSAB-2 *System peroxidase universal kit*, DAKO, No. K 0672, Denmark). Blok parafin yang berisi jaringan organ ayam yang diduga mengandung virus flu burung galur H5N1 mula-mula dipotong 3-4 $\mu$ m dan dilekatkan pada kaca obyek yang sudah diberi *Poly-L-lysine* 0,05% sebagai perekat. Kaca objek dideparafinisasi sesuai metode standar dan siap untuk diwarnai. Kaca obyek direndam dalam larutan tripsin 0,1% dalam larutan kalsium khlorid 0,1% selama 20 menit pada suhu 37°C dan dibilas dengan larutan *Posphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,4. Konsentrasi antisera yang dipakai sebelumnya sudah distandarisasi melalui *checkerboard titration*. Antisera H5N1 diaplikasikan dengan konsentrasi 1:1600 sampai 1:3200 dalam larutan PBS yang berisi serbuk susu skim 0,1%, kemudian diinkubasikan selama 60 menit. Untuk organ trakhea dan kulit dipakai konsentrasi 1:3200 sedangkan organ selain trakhea dan kulit dipakai 1:1600. Setelah dibilas dengan PBS, peroksidase endogen diblok dengan hidrogen peroksidase 3% dalam aquades selama 20 menit kemudian dibilas dengan PBS.

Selanjutnya, kaca obyek diberi antibodi sekunder yang sudah dilabel dengan biotin/*biotylated secondary antibody* (DAKO, Denmark) dan diinkubasikan selama 30 menit lalu dibilas dengan PBS. Setelah itu streptavidin peroksidase (DAKO, Denmark) diaplikasikan selama 30 menit dan kaca obyek dibilas PBS. Untuk memvisualisasikan antigen yang terdapat pada kaca obyek, ditambahkan substrat *Amino Ethyl Carbazole/AEC*, Sigma Chem. Co, USA) dengan cara menambahkan 2 mg AEC dalam 200  $\mu$ l larutan *dimethyl formamide* (DMF) dalam larutan *buffer* asetat pH 5,0 dan 5  $\mu$ l hidrogen peroksidase. Hasil dinyatakan positif (+) apabila terdapat warna merah kecoklatan dan negatif jika warna tersebut tidak dapat dideteksi.

#### **Pemeriksaan mikroskopis**

Pemeriksaan mikroskopis dilakukan untuk menentukan lokasi dan distribusi antigen pada organ ayam yang terinfeksi virus AI subtipe H5N1. Derajat antigen ditentukan pada perbesaran 10 x 20, berdasarkan jumlah sel yang mengandung antigen per

satu lapang pandangan per organ, dengan memberikan skor sebagai berikut: + (untuk 1-5 sel berantigen/satu lapang pandangan), ++ (untuk 6-10 sel berantigen/satu lapang pandangan) dan +++ (untuk lebih dari 10 sel berantigen/satu lapang pandangan). Karena substrat yang dipakai AEC berwarna merah kecoklatan maka antigen yang dideteksi pada jaringan organ juga berwarna demikian, sangat kontras bedanya dengan latar belakang jaringan yang berwarna biru, yang menandakan bahwa area tersebut tidak mengandung antigen.

### **HASIL**

Tabel 1 memperlihatkan jenis organ, distribusi lesi dan derajat antigen yang dinyatakan sebagai jumlah sel berantigen per satu lapang pandangan mikroskop per organ. Secara umum, antigen H5N1 tersebar baik secara individual maupun berkelompok membentuk suatu gugus atau menyerupai rantai dengan kadar antigen rendah (+) sampai tinggi (+++). Antigen tersebut menempati lokasi baik secara intranuklear maupun intrasitoplasmik pada hampir semua organ ayam yang dikoleksi sehingga seluruh bagian sel berwarna merah kecoklatan dengan pewarnaan imunohistokimia ini. Selain itu antigen H5N1 ini juga dideteksi pada daerah vaskular pada kulit jengger dan pial, paru paru, hati, limpa dan ovarium. Gambar 1A memperlihatkan antigen yang terdapat pada sel-sel neuron otak dalam jumlah besar (+++) yang membentuk suatu gugusan yang khas. Antigen AI juga ditemukan pada kulit jengger yaitu pada lapisan dermis (Gambar 1B) dimana antigen tersebar secara tidak beraturan, baik secara individual maupun berkelompok dengan derajat antigen tergolong tinggi (+++). Gambar 1C menunjukkan antigen pada paru-paru dimana antigen ditemukan pada epitel alveoli dan juga bergerombol menutup lapisan endotel pembuluh darah (+++). Pada jantung antigen tersebar dalam jumlah besar, pada lapisan epikardium (+++) dan miokardium (+, ++) yaitu pada daerah interstitium, seperti tampak pada Gambar 1D.

Gambar 2A menunjukkan lokasi dan distribusi antigen virus H5N1 pada sel-sel epitel yang terdapat pada lapisan mukosa proventrikulus (+++). Gambar 2B menunjukkan sebaran antigen pada sel-sel hati (+++) yang mengitari area yang mengalami nekrosis. Gambar 2C memperlihatkan antigen yang menempati seluruh area sel-sel tubulus ginjal, baik di dalam inti maupun sitoplasma dengan derajat antigen tinggi (+++). Antigen juga ditemukan pada organ limpa dalam jumlah besar (+++) yang tersebar di dalam sel-sel yang terdapat di sekitar pulpa merah yang mengalami nekrosis, dalam sebaran antigen yang soliter maupun berkelompok (Gambar 2D).

**Tabel 1.** Derajat antigen pada organ ayam yang terserang HPAI di beberapa peternakan di Jawa Timur dan Barat

No Flok	Lokasi	PIAL	JGR	OTK	TRA	PARU	JTG	PRV	HATI	LMP	GJL	OVA
1	Jatim	+++	+++	+++	+	+	+++	-	+++	++	++	+++
2	Jatim	+++	+++	+++	+	+	+++	+	+++	++	++	+++
3	Jabar	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	TA
4	Jabar	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5	Jabar	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	TA
6	Jabar	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++
7	Jabar	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++

Jumlah sampel ayam 6 ekor per flok

JGR : Jengger

TA : Tidak ada sampel (ayam jantan)

OTK : Otak

- : Tidak ada antigen

TRA : Trakhea

+ : 1-5 sel berantigen/lapangan pandangan (perbesaran 20x10)

JTG : Jantung

++ : 6-10 sel berantigen/lapangan pandangan (perbesaran 20x10)

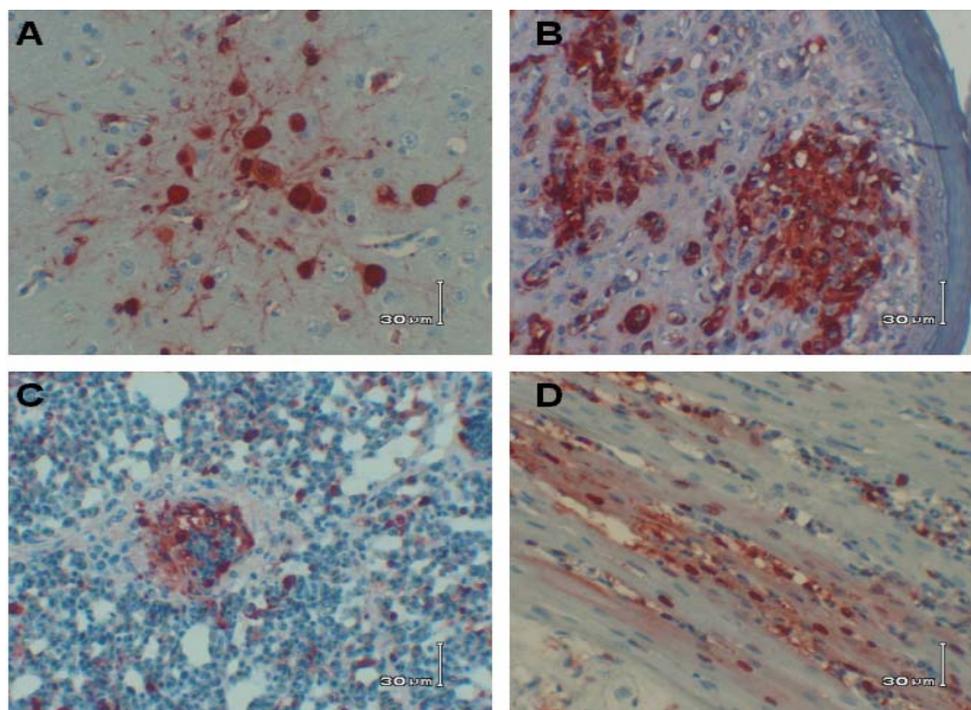
PRV : Proventrikulus

+++ : lebih dari 10 sel berantigen/lapangan pandangan (perbesaran 20x10)

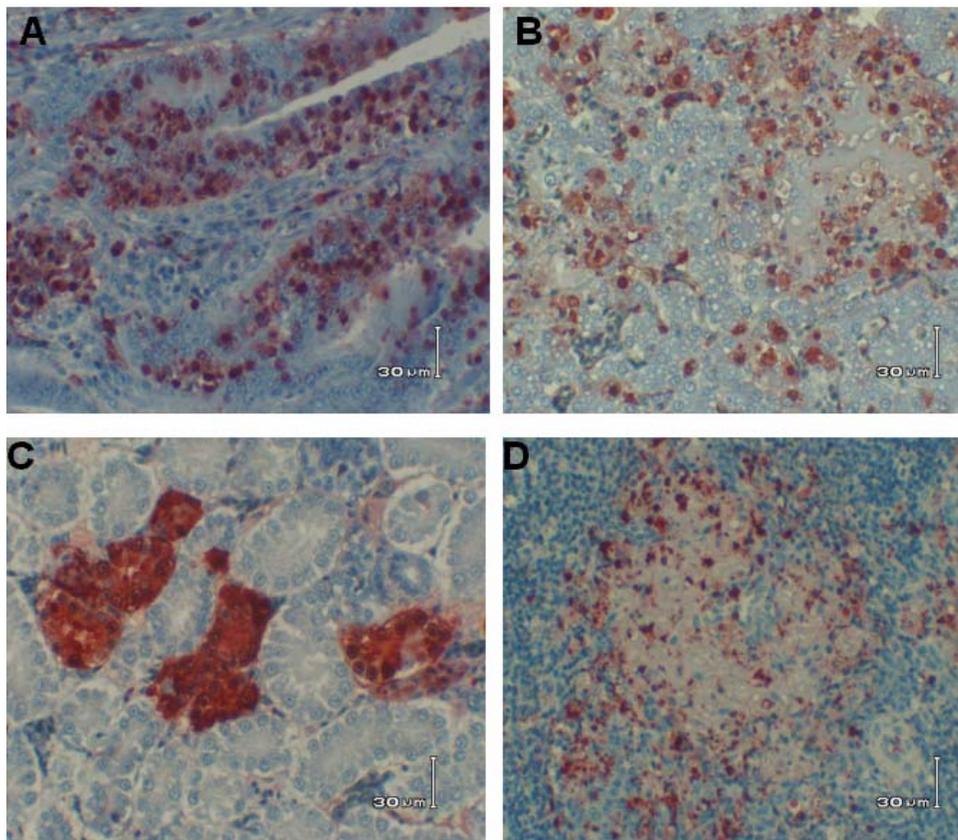
LMP : Limpa

GJL : Ginjal

OVA : Ovarium



**Gambar 1.** A menunjukkan antigen pada sel-sel neuron otak, B menunjukkan antigen pada sel-sel yang terdapat pada lapisan dermis jengger, C menunjukkan antigen pada sel-sel endotelium pembuluh darah dan alveoli paru paru, D menunjukkan antigen pada myosit pada lapisan myokardium jantung. Pewarnaan imunohistokimia, teknik ABC



**Gambar 2.** A menunjukkan antigen H5N1 pada sel-sel epitel lapisan mukosa proventrikulus, B menunjukkan antigen pada sel-sel hati yang terdapat di sekitar area yang nekrotik, C menunjukkan antigen pada sel-sel epitel tubulus ginjal, D menunjukkan antigen pada sel-sel pulpa merah pada limpa, pewarnaan imunohistokimia, teknik ABC

Selain yang dijelaskan pada Gambar 1 dan 2 tersebut maka antigen H5N1 juga dapat dideteksi pada lapisan dermis dan endodermis kulit pial dan telapak kaki, mukosa trakhea, daerah interstitium otot dada dan paha, sel Kupfer pada sinusoid hati, di daerah korteks dan medula ovarium serta di lapisan luar folikel maupun di dalam *ooct* dalam jumlah sedang (++)

Semua organ ayam yang berasal dari blok parafin kontrol negatif antigen tidak ditemukan pada preparat ini, demikian halnya jika preparat yang mengandung virus HPAI direaksikan dengan antisera non HPAI (dalam hal ini antisera terhadap ND). Preparat yang berasal dari ayam kasus wabah, antigen dapat dideteksi dengan jelas pada kulit pial dan jengger, otak, trakhea, jantung, paru-paru, proventrikulus, hati, limpa, ginjal dan ovarium. Antigen tersebut terdapat pada organ-organ tersebut di atas dengan lokasi dan distribusi spesifik, sebagian berkumpul atau soliter. Karena substrat yang dipakai AEC yang berwarna coklat kemerahan maka antigen yang dideteksi pada jaringan organ juga berwarna demikian, sangat kontras bedanya dengan latar belakang jaringan yang berwarna biru,

yang menandakan bahwa area tersebut tidak mengandung antigen.

## PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian di atas dapat terlihat dengan sangat jelas dan akurat antigen H5N1 pada jaringan organ ayam yang berasal dari wabah flu burung di Jawa Timur dan Jawa Barat pada tahun 2003. Antigen dengan jelas ditemukan pada kulit jengger, pial dan telapak kaki, otak, trakhea, jantung, paru-paru, proventrikulus, hati, limpa, ginjal dan ovarium. Distribusi, lokasi dan jumlah antigen H5N1 yang terdapat pada organ dipengaruhi oleh spesies dan umur unggas, strain virus, konsentrasi virus, rute infeksi (HOOPER *et al.*, 1995; SUAREZ *et al.*, 1998).

Sebaran antigen yang dideteksi pada organ ayam yang terserang HPAI pada kasus wabah di sini sangat sesuai dengan yang dilaporkan BROWN *et al.* (1992), bahwa antigen HPAI dapat dideteksi pada organ otak, jantung, ginjal, terutama menempati area vaskular yaitu

pada epitel endotel pembuluh darah. HOOPER *et al.* (1995) juga menunjukkan bahwa virus HPAI dapat divisualisasikan pada kulit jengger, otak, jantung, paru paru, otot skeletal, ginjal, limpa dan ovarium. Menurut mereka, kerusakan yang terjadi terlihat sangat menonjol pada daerah vaskular pada semua pembuluh darah organ tersebut di atas dan hal ini berkorelasi positif dengan antigen yang dideteksi pada area tersebut. Lebih lanjut PERKINS dan SWAYNE (2003) melaporkan bahwa antigen HPAI dapat dijumpai pada otak, pankreas, limpa, kelenjar adrenal dan ovarium.

KOBAYASHI *et al.* (1996) dan MO *et al.* (1997) membandingkan lesi akibat HPAI dan menyokong pendapat di atas bahwa peran sistem kardiovaskular sangat besar dalam perjalanan penyakit AI. Antigen yang berlokasi di area vaskular tersebut menimbulkan kondisi iskemia yang berlanjut pada infark vaskular yang secara klinis dapat dijumpai pada ayam yang mengalami *cyanosis* pada jengger dan pial serta gangguan sirkulasi lainnya (SWAYNE dan SUAREZ, 2000). Menurut MO *et al.* (1997), antigen dapat dideteksi pada otak, jantung, paru-paru, pankreas dan ginjal dan diduga kuat virus HPAI menyerang saluran pernafasan untuk kemudian bereplikasi di sini dan menyebar ke semua organ viseral.

SUAREZ *et al.* (1998) yang mempelajari lesi HPAI secara elektron mikroskopis membuktikan bahwa kapiler pembuluh darah mengalami pembengkakan (*hipertropi*), terkoyak dan berisi suatu masa protein serta sel radang. Fenomena inilah yang menimbulkan hambatan pada suplai oksigen sehingga jaringan mengalami hipoksia yang berakibat nekrosis. Semua kerusakan vaskular tersebut di atas pada HPAI mengindikasikan bahwa penyakit berlangsung sangat akut dan menimbulkan ketidak seimbangan sistem biokimia tubuh yang berdampak pada kegagalan fungsi sebagian besar organ viseral (PERKINS dan SWAYNE, 2001).

Pada penelitian ini antigen dapat dideteksi dengan lokasi intra nuklear dan intra sitoplasmik, seperti halnya dilaporkan oleh HOOPER *et al.* (1995) dan CAUTHEN *et al.* (2000). Antigen dalam jumlah tinggi terlihat mengelilingi area yang mengalami nekrosis, tetapi relatif sangat sedikit yang berada di pusat nekrosis (MO *et al.*, 1997). Selain itu antigen yang dideteksi tidak selamanya berkaitan dengan area nekrosis. HOOPER *et al.* (1995) juga mengemukakan bahwa walaupun bursa fabrisius mengalami nekrosis namun antigen tidak dapat dideteksi. Hal ini menandakan bahwa tidak ada aksi virus secara langsung pada organ limfoid sehingga nekrosis jaringan diduga kuat merupakan akibat stres karena jaringan kekurangan oksigen.

Menurut MOMOTANI (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 fluoresens, 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 penelitian ini menunjukkan bahwa antigen H5N1 berhasil dideteksi pada jaringan organ ayam dengan pewarnaan imunohistokimia dengan metode *Avidin Biotin Peroxidase Complex* (ABC). Antigen dapat dideteksi pada kulit jengger dan pial, otak, mukosa trakhea, paru paru, jantung, proventrikulus, hati, ginjal, limpa dan ovarium, dengan derajat bervariasi dari rendah (+) sampai tinggi (+++). Jika dibandingkan dengan pewarnaan konvensional H&E maka teknik ABC ini jauh lebih akurat karena pada pewarnaan H&E hanya dapat untuk mendeskripsikan lesi tapi tidak dapat untuk mendeteksi antigen.

## DAFTAR PUSTAKA

- ACVP. 2004. Avian influenza factsheet. [www.acvp.org/news/factavianflu](http://www.acvp.org/news/factavianflu). [31 Maret 2004].
- BROWN, C.C., H.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: 341-348
- CAUTHEN, A.N., D.E. SWAYNE, S.S. CHERRY, M.L. PURDUE and D.L. SUAREZ. 2000. Continued circulation in China of HPAI viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and human. *J. Virol.* 74: 6592-6599.
- DAMAYANTI, 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.
- DAMAYANTI, R, NLP. I. DHARMAYANTI, R. INDRANI, A. WIYONO dan DARMINTO. 2004. Gambaran klinis dan patologis pada ayam yang terserang flu burung sangat patogenik (HPAI) di beberapa peternakan di Jawa Timur dan Jawa Barat. *JITV* 9: 128-135.
- DHARMAYANTI, NLP. I., R. DAMAYANTI, A. WIYONO, R. INDRANI dan DARMINTO. 2004. Identifikasi virus avian influenza isolat Indonesia dengan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). *JITV* 9: 136-143.
- 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.

- HOOPER, P.T., G.W. RUSSELL, P.W. SELLECK and W.L. STANISLAWEK. 1995. Observation on the relationship in chickens between the virulence of some avian influenza viruses and their pathogenicity for various organs. *Avian Dis.* 39: 458-464.
- HSU, S.M., L. RAINE and H. FANGER. 1981. The use of avidin-biotin peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am. J. Clin. Pathol.* 75: 816-821.
- KOBAYASHI, Y, T. HORIMOTO, Y. KAWAOKA, D.J. ALEXANDER and C. ITAKURA. 1996. Pathological studies of chickens experimentally infected with two highly pathogenic avian influenza virus. *Avian Pathol.* 25: 285-304.
- MO, I.P., M. BRUGH, O.J. FLETCHER, G.N. ROWLAND and D.E. SWAYNE. 1997. Comparative pathology of chicken experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. *Avian Dis.* 41: 125-136
- MOMOTANI, E. 1994. Principles of immunohistochemistry techniques and their application. National Institute of Animal Health Biodefence Research Division, Laboratory of Immunopathology. Tsukuba, Japan. pp. 1-21.
- MURPHY, B.R. and R.G. WEBSTER. 1996. Orthomyxoviruses. *In: Fields Virology 3<sup>rd</sup> ed.* B.N. FIELDS, D.M. KNIPE and P.M. HOWLEY (Eds.). Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia. pp. 1397-1445.
- OIE. 2000. Highly Pathogenic Avian influenza. Manual of standard diagnostic tests and vaccine. [www.oie.int](http://www.oie.int). pp. 1-16. [28 Agustus 2003].
- OWEN, R.L., B.S. COWEN, A.L. HATTEL, S.A. NAQL and R.A. WILSON. 1991. Detection of viral antigen following exposure of one day old chicken to the Holland 52 strain of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 20: 663-673.
- PERKINS, L.E. and D.E. SWAYNE. 2001. Pathobiology of A/chicken/Hongkong/220/97 (H5N1) Avian Influenza virus in seven *Gallinaceous species*. *Vet Pathol.* 38: 149-164.
- PERKINS, L.E. and D.E. SWAYNE. 2003. Pathogenicity of a Hongkong-origin H5N1 avian influenza virus in four Passerine species and budgerigars. *Vet. Pathol.* 40: 14-24.
- SUAREZ, D.L., M.L. PURDUE, N. COX, T. ROWE, C. BENDER, J. HUANG and D.E. SWAYNE. 1998. Comparison of highly virulent H5N1 influenza a viruses isolated from humans and chicken from Hongkong. *J. Virol.* 72: 1-19.
- SWAYNE, D.E. and D.L. SUAREZ. 2000. Highly pathogenic influenza. *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.* 19: 463-482.
- VAN NOORDEN, S. 1986. Tissue preparation and immunostaining techniques for light microscopy. *In: Immunocytochemistry-Modern Methods and Application.* 2<sup>nd</sup> ed. J.M. POLAK and S. VAN NOORDEN (Eds). Wright. Bristol.
- WIYONO, A., NLP. I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, R. DAMAYANTI dan DARMINTO. 2004. Isolasi dan karakterisasi virus *highly pathogenic avian influenza* subtype H5 dari ayam asal wabah di Indonesia. *JITV* 9: 61-71.
- YAGYU, K and S. OHTA. 1987. Enzyme-linked immuno sorbent assay for the detection of infectious bronchitis virus antigen. *Japan. J. Vet. Sci.* 49: 757-763.