

## Penentuan Secara Imunopatologi Organ Target Virus Flu Burung Menggunakan Streptavidin Biotin

(DETERMINATION OF TARGET ORGANS OF AVIAN INFLUENZA VIRUS USING  
IMMUNOPATHOLOGICAL IMMUNOHISTOCHEMISTRY STREPTAVIDIN-BIOTIN)

Niken Yunita<sup>1,2</sup>, Ocie Harum Wulan<sup>2</sup>,  
Hastari Wuryastuty<sup>3</sup>, Raden Wasito<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Karantina Pertanian Tanjung Priok,  
Badan Karantina Pertanian, Kementerian Pertanian  
Jl. Enggano, No. 17, Tanjung Priok,  
Jakarta Utara, Indonesia, 14310

<sup>2</sup>Mahasiswa Pascasarjana Magister Sain Veteriner

<sup>3</sup>Bagian Ilmu Penyakit Dalam, <sup>4</sup>Bagian Patologi Veteriner,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada  
Jln Fauna No 2, Karang Malang, Yogyakarta, Indonesia  
Telp/Fax: 0274 9061104; \*Email: [prof\\_wst@yahoo.com](mailto:prof_wst@yahoo.com)

### ABSTRAK

Flu burung merupakan penyakit viral pada unggas yang disebabkan oleh virus flu burung atau virus *avian influenza* subtype H5N1 dengan gejala klinis bervariasi yang seringkali serupa dengan gejala klinis infeksi virus lain, misal virus Newcastle *disease* (VND). Mekanisme patogenesis penyakit hingga menimbulkan gejala klinis terkait erat penentuan organ target dilihat dari distribusi antigen virus avian influenza (VAI) pada organ, yaitu saluran pernapasan, otak, dan saluran pencernaan. Imunopatologis imunohistokimia *streptavidin-biotin* (IHK SB) adalah suatu metode yang sensitif dan akurat dalam mendeteksi antigen VAI pada jaringan. Pada penelitian ini ditentukan apakah pada ayam petelur dengan gejala klinis *torticollis* dan *curled toe paralysis* dan lesi patologi anatomi *petechial hemorrhages* dan *foci necrotic hemorrhages* dan diuji dengan imunopatologis IHK SB adalah terinfeksi positif virus AI H5N1. Hasil penelitian IHK SB menunjukkan, bahwa virus AI H5N1 ditemukan di jaringan paru-paru, otak, duodenum, dan proventrikulus. Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa IHK SB adalah suatu metode yang sangat sensitif dan akurat dalam mendeteksi distribusi antigen virus AI H5N1.

Kata-kata kunci: imunopatologi; *streptavidin-biotin*; organ target; virus AI H5N1

### ABSTRACT

Avian influenza is a viral disease in poultry caused by avian influenza virus (AIV) subtype H5N1 with varying clinical signs are often similar to the clinical signs of other viral infections, such as Newcastle disease virus (NDV). The mechanism of disease pathogenesis to express clinical signs tightly correlated to the determination of the target organ seen from AIV H5N1 antigens distribution in organs, such as respiratory tract, brain and gastrointestinal tract. Immunopathological immunohistochemistry streptavidin-biotin (IHC SB) is a method for sensitive and accurate in detecting antigens of AIV on the tissues. In the present study, it was determined whether in laying hens with clinical signs of torticollis and curled toe paralysis, and pathologic anatomic lesions in the form of petechial and foci necrotic hemorrhages tested with immunopathological IHC SB is positive AIV H5N1 infection. IHC SB study results showed that the AIV H5N1 antigen were found in tissues of the lung, brain, duodenum and proventriculus. Based on these results, we can conclude that the IHC SB is a method that is highly sensitive and accurate to detect H5N1 antigens and its distribution in the host.

Keywords: immunopathologic; streptavidin-biotin; target organ; AIV H5N1

## PENDAHULUAN

Penyakit flu burung atau *avian influenza* (AI) merupakan penyakit viral yang disebabkan oleh virus flu burung atau virus avian influenza (VAI) subtipe H5N1, yaitu *influenza* tipe A yang termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae* (OIE, 2015) yang pada unggas bersifat akut dengan tingkat morbiditas dan mortalitas tinggi. Pada unggas, VAI menyebabkan gejala klinis yang berbeda-beda, tergantung dari tingkat keparahan penyakit. Hal tersebut disebabkan oleh adanya klasifikasi VAI dalam dua kelompok, yaitu *low pathogenic avian influenza* (LPAI) dan *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) (Swayne dan Pantin-Jackwood, 2008). Pada unggas, virus LPAI hanya menyebabkan sedikit atau tanpa manifestasi gejala klinis, sedangkan gejala klinis yang pada umumnya dijumpai adalah akibat infeksi HPAI, yaitu edema, pendarahan dan kegagalan fungsi pada berbagai macam organ (Swayne, 2007). Pada unggas penderita AI, perubahan awal yang teramati berupa edema kepala dan sinus, sianosis, kongestif dan hemoragi pada pial, jengger, dan kaki (Nili dan Asasi, 2002). Gangguan sistem respirasi meliputi lakrimasi, ngorok, batuk, dan bersin, sedangkan gangguan sistem pencernaan berupa diare. Unggas yang dapat bertahan beberapa hari terhadap infeksi HPAI menunjukkan gejala saraf, seperti tremor kepala dan leher, *torticollis*, *curled toe paralysis*, paresis, ketidakmampuan berdiri, kelainan posisi kepala dan alat gerak, dan kelainan perilaku (Perkins dan Swayne, 2001). Mekanisme timbulnya *torticollis* dan *curled toe paralysis* akibat penempelan VAI pada reseptor sel inang pada unggas.

Dilaporkan, bahwa infeksi HPAI pada unggas menyebabkan lesi patologi pada sistem pencernaan dan sistem pernapasan, dan terutama pada sistem saraf pusat (CNS) (Swayne, 2007; Swayne dan Pantin-Jackwood, 2008; Wibawa *et al.*, 2013). Lesi pada sistem pencernaan dapat berupa splenomegali, kongesti dan hemoragis jaringan limfoid usus, perdarahan berbintik pada pankreas, proventrikulus, ventrikulus, usus kecil dan permukaan serosa saluran pencernaan (Kwon *et al.*, 2005). Lesi pada sistem pernapasan berupa edema, kongesti, hemoragis pada paru-paru (Cauthen *et al.*, 2000; Perkins dan Swayne, 2001), sedangkan lesi pada sistem saraf dapat berupa edema dan hemoragis pada otak (Klenk, 2005; Muramoto *et al.*, 2006). Diduga, jalur VAI

mencapai CNS adalah via sistem saraf perifer (Tanaka *et al.*, 2003; Matsuda *et al.*, 2005), saraf olfaktorius (Park *et al.*, 2002), atau sirkulasi darah (Mori dan Kimura, 2001; Feldmann *et al.*, 2000; Chaves *et al.*, 2011). Wabah AI dengan gejala klinis *torticollis* dan *curled toe paralysis*, serta lesi patologi anatomi *petechial hemorrhages* dan *foci necrotic hemorrhages* paru-paru terjadi di Indonesia pada tahun 2013. Dilaporkan oleh Wasito *et al.* (2015) bahwa sampel pada uji serologi dan molekuler *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) terbukti positif flu burung subtipe H5N1.

Pada unggas, jonjot gen hemaglutinin (HA) VAI berikatan dengan reseptor asam sialat (SA) yang ada pada permukaan sel inang. Reseptor tersebut merupakan oligosakarida yang mengandung *N-acetylneuraminic acid á-2,3-galactose* (SA á-2,3- Gal) dan *N-acetylneuraminic acid á-2,6-galactose* (SA á-2,6- Gal). Kedua reseptor tersebut terdapat pada saluran pernapasan dan pencernaan, dan otak pada ayam (Chaves *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012).

Imunohistokimia (IHK) merupakan cara pendekatan bioteknologi berbasis antibodi yang banyak digunakan di bidang imunopatologi dalam penentuan VAI dan organ target. Prinsip IHK didasarkan pada reaksi kompleks antigen antibodi. Antigen pada jaringan unggas yang positif terinfeksi VAI dapat dideteksi dan divisualisasikan dengan substrat tertentu. Antigen yang terdeteksi penting dalam penentuan pemahaman patogenesis VAI melalui distribusi VAI pada beberapa organ target. Imunopatologis imunohistokimia *streptavidin-biotin* (IHK SB) adalah metode IHK yang banyak digunakan dalam bidang imunopatologi karena mempunyai kelebihan jika dibandingkan dengan metode lain. *Streptavidin* pada metode IHK SB mempunyai kemampuan mengikat *biotin* yang sangat kuat, sehingga dapat dihindari kemungkinan terjadinya reaksi positif palsu (Wasito dan Wuryastuty, 2014).

Penelitian ini ditujukan untuk menentukan ada atau tidaknya antigen (VAI) pada ayam petelur dengan gejala klinis *torticollis* dan *curled toe paralysis*, dan lesi patologi anatomi *petechial hemorrhages* dan *foci necrotic hemorrhages* pada paru-paru, saluran pencernaan, dan otak dengan pendekatan uji imunopatologis IHK SB. Diharapkan, uji IHK SB dapat dimanfaatkan dalam penentuan organ target VAI yang berguna dalam pemahaman patogenesis untuk menjelaskan mekanisme masuknya VAI ke

sistem saraf pusat sehingga berpengaruh terhadap timbulnya manifestasi gejala klinis *neurotropism* berupa *torticollis* dan *curled toe paralysis* pada ayam petelur. Selain itu penentuan organ target juga bermanfaat untuk membantu peneguhan diagnosis terkait dengan topografi anatomi distribusi VAI, sehingga dapat dibedakan antara infeksi flu burung dengan infeksi virus lain yang menimbulkan gejala klinis serupa, misalnya Newcastle disease virus (NDV).

## METODE PENELITIAN

### Preparasi Sampel

Pada penelitian ini, digunakan 20 ekor ayam petelur dengan gejala klinis *torticollis* dan *curled toe paralysis* dari kasus lapangan di peternakan ayam petelur komersial. Paru-paru, duodenum, proventrikulus, dan otak difiksasi dengan *neutral buffered formalin* 10%, dibuat sediaan histopatologi blok parafin, dan kemudian diwarnai imunopatologis imunohistokimia *streptavidin biotin*. Sampel tersebut sebelum digunakan sebagai sampel untuk uji IHK SB, sampel telah diuji dengan pemeriksaan patologi anatomi dan pemeriksaan histopatologi. Perubahan patologi pada pemeriksaan patologi anatomi, antara lain, paru-paru mengalami pembengkakan, berwarna merah muda, pucat tidak transparan, dan adanya hemoragi berbintik dan linier. Pada pemeriksaan histopatologi, berupa kongesti berat pada pembuluh darah paru-paru, sel-sel epitelial dan otot polos beberapa parabronki dan bronki sekunder mengalami hemoragi.

### Pewarnaan Imunopatologi Imunohistokimia *Streptavidin Biotin*

Pewarnaan imunopatologi imunohistokimia *streptavidin-biotin* (IHK SB) (kit imunohistokimia Histostain® SP, Invitrogen Corporation) meliputi deparafinisasi, rehidrasi dan pewarnaan imunokimia. Pada tahap deparafinisasi, sediaan jaringan direndam larutan xilen tiga kali masing-masing selama dua menit. Selanjutnya, dilakukan rehidrasi dengan cara sediaan jaringan direndam secara berturut-turut ke dalam larutan etanol absolut dua kali, masing-masing selama dua menit, etanol 95% satu kali, selama dua menit, etanol 50% satu kali, selama dua menit, aquades dua kali masing-masing selama dua menit. Setelah deparafinisasi dan rehidrasi, sediaan jaringan dicuci larutan

*phosphate buffer saline* (PBS) 0,01 M pH 7,1 5 menit. Pada tahap pewarnaan imunokimia, pada awalnya sediaan jaringan ditandai dengan *pap pen* untuk menghindari tumpahnya reagensia IHK SB pada saat proses pewarnaan. Kemudian, sediaan jaringan direndam larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dalam methanol absolut 10 menit untuk menginaktivasi peroksidase endogen, lalu dicuci dengan larutan PBS 10 menit. Kemudian, sediaan jaringan diletakkan pada *staining chamber* dan diinkubasi dalam larutan *blocking serum* (10% *non-immune serum*, Histostain® SP, Invitrogen Corporation) selama 10 menit yang berfungsi untuk mengikat antigen non spesifik pada sediaan jaringan. Setelah diinkubasi, sisa larutan *blocking serum* yang masih tertinggal pada sediaan jaringan dibersihkan dengan kertas penghisap. Sediaan jaringan diinkubasi dengan antibodi poliklonal anti nukleoprotein VAI (antibodi primer, *rabbit polyclonal to avian influenza nucleoprotein*, Abcam # ab22285, 10 µg/mL, digunakan dengan perbandingan antibodi: akuades steril= 1:100) pada suhu kamar, selama 45 menit. Kemudian, sediaan jaringan dicuci PBS 10 menit. Sediaan jaringan diinkubasi dengan larutan antibodi sekunder anti antibodi primer yang dilabel biotin selama 10 menit. Kemudian, dicuci dengan larutan PBS selama 10 menit. Sediaan jaringan diinkubasi dengan konjugat *streptavidin*-peroksidase selama lima menit. Kemudian, dicuci PBS selama 10 menit. Sediaan jaringan diinkubasi dengan larutan campuran substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-kromogen (3,3'-*diaminobenzidine* atau DAB) pada suhu kamar selama 15 menit, dan kemudian sediaan jaringan dicuci dengan aquades selama 10 menit. Selanjutnya, sediaan jaringan ditetesi dengan larutan hematoksilin sebagai pewarna dasar dan diinkubasi selama tiga menit, kemudian dicuci aquades, diberi medium perekat gliserol dan ditutup dengan gelas penutup. Sediaan jaringan yang sudah diwarnai IHK SB diamati dengan mikroskop, citranya didokumentasi menggunakan kamera digital, dan selanjutnya dianalisis secara deskriptif kualitatif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian terbukti, bahwa ayam dengan gejala klinis *torticollis* dan *curled toe paralysis* dengan uji imunohistokimia *streptavidin-biotin* (IHK SB) terinfeksi VAI. Pada hasil IHK SB negatif, tidak ditemukan

adanya warna coklat kemerahan (kontrol negatif) pada jaringan (Gambar 1), sedangkan IHK SB positif pada paru-paru (Gambar 2), otak (Gambar 3), dan saluran pencernaan, yaitu proventrikulus (Gambar 4) dan duodenum (Gambar 5). Antigen VAI dapat dideteksi pada paru-paru (5/20), saluran pencernaan (9/20), dan otak (8/20). Pada pengamatan dengan mikroskop, antigen IHK SB positif VAI yang bereaksi dengan antibodi anti VAI tampak berupa bintik-bintik coklat kemerahan yang mengelompok di suatu area atau menyebar di seluruh lokasi jaringan. *Horseradish peroxidase* (HRP) sebagai enzim pada ikatan antigen-antibodi kompleks menyebabkan terjadinya perubahan warna saat diberikan substrat-kromogen. Substrat yang digunakan adalah hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan kromogennya adalah *diamino-benzidine* (DAB), sehingga sel-sel atau jaringan, yaitu paru-paru, saluran pencernaan, dan otak yang positif terinfeksi VAI, teramati berwarna coklat kemerahan.

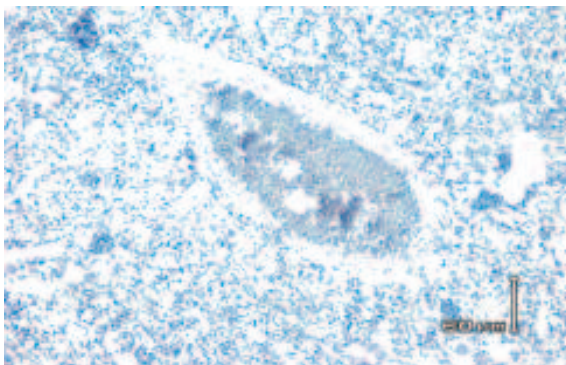
Secara alami, VAI mampu menginfeksi dan berkembang biak pada semua sel, jaringan atau organ pada ayam (Wakamatsu *et al.*, 2006). Antigen VAI yang terdeteksi pada paru-paru ditemukan pada sel-sel epitel yang mengalami nekrosis dan infiltrasi limfosit. Virus AI memiliki kecenderungan berkembang biak pada sel-sel epitel bersilia pada saluran pernapasan. Infeksi VAI, terutama secara *intranasal* dapat menyebabkan penyebaran virus pada sel-sel epitel saluran pernapasan yang peka terhadap infeksi VAI. Reseptor VAI adalah penentu *tropism*, dan *hemagglutinin* VAI diperlukan untuk ikatan ke galaktosa yang mengikat asam sialat pada permukaan sel inang (Matrosovich, 2004; Nicholls *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012). Pada infeksi VAI, virus yang masuk melalui inhalasi, menembus membran mukosa saluran pernapasan dan melekat pada reseptor galaktosa (SA  $\alpha$ -2,3-Gal dan SA  $\alpha$ -2,6-Gal) yang dilanjutkan dengan proses endositosis dan fusi VAI ke dalam sel inang. Pada saat proses fusi, genom VAI dilepaskan ke dalam sitoplasma sel inang yang terinfeksi, selanjutnya genom bermigrasi ke dalam nukleus. Di dalam nukleus terjadi transkripsi dan replikasi virus (Cross *et al.*, 2001). Berdasarkan hasil IHK SB pada penelitian ini, juga teramati adanya antigen (VAI) di saluran pencernaan. Menurut Horimoto dan Kawaoka (2001), VAI cenderung ber-replikasi pada saluran pencernaan, sehingga pada ayam penderita VAI, virus dapat dijumpai

dalam tinja. Kombinasi antara reseptor sel inang terhadap antigen VAI dan banyaknya enzim proteolitik pada saluran pencernaan, memungkinkan replikasi VAI pada saluran pencernaan menjadi lebih efisien (Gambaryan *et al.*, 2006; Capua dan Alexander, 2009).

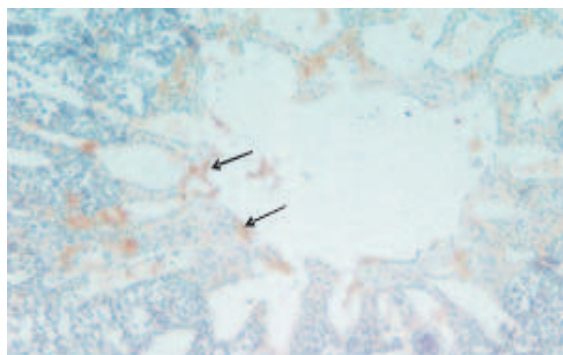
Menurut Perkins dan Swayne (2003), Neufeld *et al.* (2009) dan Post *et al.* (2013), VAI yang telah bereplikasi masuk ke dalam sirkulasi darah dan akhirnya sampai pada sel-sel atau organ target, sehingga virus AI tidak hanya ditemukan pada saluran pernapasan maupun pencernaan, tetapi juga ditemukan pada organ lain, seperti pada otak. Lesi patologi VAI pada otak dapat menimbulkan gejala saraf, yaitu tortikolis dan tremor (Pantin-Jackwood dan Swayne, 2009; Wibawa *et al.*, 2012). Lesi patologi VAI terlihat sangat signifikan di bagian vaskuler organ dan hal tersebut berkorelasi positif dengan keberadaan VAI yang terdeteksi pada organ terkait. Hasil penelitian Neufeld *et al.* (2009) juga membuktikan, bahwa viremia pada kasus VAI dan adanya VAI pada sel-sel endotel menimbulkan iskemia, dan jika melanjut dapat menyebabkan infark (Swayne dan Suarez, 2000; Perkins dan Swayne, 2001).

Laporan-laporan penelitian lain tentang distribusi VAI, selain pada otak, paru-paru, dan saluran pencernaan, VAI dengan metode IHK pada ayam juga terdeteksi pada jengger, jantung, otot skeletal, ginjal, limpa, ovarium, pankreas, kelenjar adrenal, hati, ventrikulus, oviduk, trakea, usus besar, usus kecil, rektum, *bursa fabricius*, peritoneum, *thymus*, dan esofagus (Perkins dan Swayne, 2001; Damayanti *et al.*, 2004; Nakatani *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2006; Antarasena *et al.*, 2008; Tjahjowati, 2010; Setyawati *et al.*, 2010; Chamnanpood *et al.*, 2011). Organ sasaran VAI mempunyai banyak kesamaan dengan organ sasaran virus Newcastle disease (ND), yaitu limpa, saluran pernapasan, saluran pencernaan, sumsum tulang, ginjal, hati, jantung, dan terutama di dalam kelopak mata, organ limfoid dan agregat limfoid yang berasosiasi dengan mukosa dalam berbagai organ ayam yang terinfeksi NDV (Susta *et al.*, 2011). Teknik IHK SB dapat membedakan kedua virus tersebut. Teknik imunopatologi imunohistokimia *streptavidin-biotin* (IHK SB) mempunyai banyak keunggulan dalam mendeteksi antigen pada jaringan. Sediaan jaringan IHK SB dapat diperiksa dengan mikroskop cahaya. Hasil pewarnaan IHK SB dapat tahan dalam waktu yang relatif lama, pengerjaan yang lebih singkat dan akurat

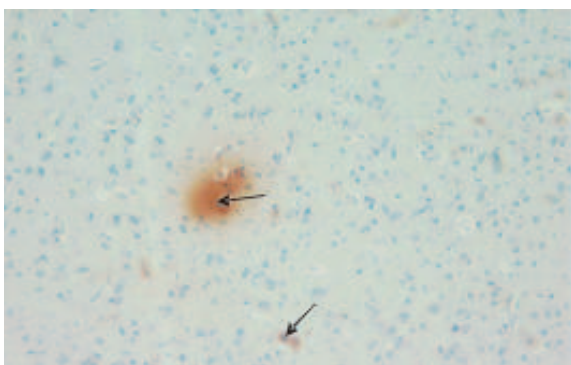




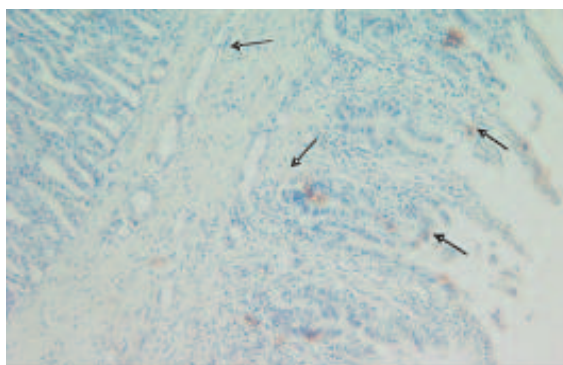
Gambar 1. Paru-paru ayam petelur lesi *petechial hemorrhages* dan *foci necrotic hemorrhages* saluran pencernaan sebagai kontrol negatif (diberi serum normal), tidak terlihat adanya warna coklat kemerahan (*Streptavidin biotin*, 500 kali).



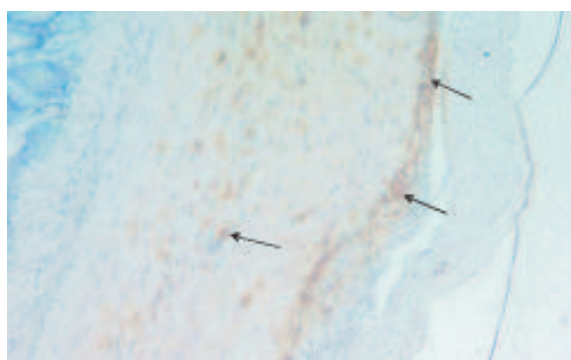
Gambar 2. Paru-paru ayam petelur lesi *petechial hemorrhages* dan *foci necrotic hemorrhages* pada saluran pencernaan yang positif terinfeksi VAI, terlihat berwarna coklat kemerahan (↑) pada sel epitelia parabronkus (*Streptavidin biotin*, 500 kali).



Gambar 3. Sediaan imunopatologis imunohistokimia *streptavidin biotin* otak ayam petelur lesi *petechial hemorrhages* dan *foci necrotic hemorrhages* saluran pencernaan positif terinfeksi VAI, teramati berwarna coklat kemerahan (↑) pada parenkim otak (*Streptavidin biotin*, 500 kali).



Gambar 4. Sediaan imunopatologis imunohistokimia *streptavidin biotin* proven-trikulus ayam petelur lesi *petechial hemorrhages* dan *foci necrotic hemorrhages* pada saluran pencernaan positif terinfeksi VAI, teramati berwarna coklat kemerahan (↑) pada sel epitel proventrikulus (*Streptavidin biotin*, 500 kali).



Gambar 5. Sediaan imunopatologi imunohistokimia *streptavidin biotin* duodenum ayam petelur lesi *petechial hemorrhages* dan *foci necrotic hemorrhages* saluran pencernaan positif terinfeksi VAI, teramati berwarna coklat kemerahan (↑) (*Streptavidin biotin*, 500 kali).

(Wasito dan Wuryastuty, 2014). Pada tahapan awal IHK SB, dilakukan deparafinisasi yang berfungsi untuk menghilangkan parafin pada sediaan jaringan. Pemberian *peroxidase quenching solution* dimaksudkan untuk memblok enzim endogen peroksidase dengan pemberian hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ).

Peroksidase adalah enzim yang umum terdapat pada berbagai jenis sel atau jaringan, terutama sel darah merah dan sel darah putih. Jika peroksidase endogen tidak diblok dengan  $H_2O_2$  terlebih dahulu, maka substrat-kromogen yang diberikan dapat bereaksi dengan peroksidase di dalam sel atau jaringan, sehingga dapat menghasilkan pewarnaan IHK SB positif palsu. Bloking hidrogen peroksidase mengakibatkan substrat-kromogen hanya

bereaksi dengan peroksidase yang terikat pada antibodi poliklonal anti-nukleoprotein VAI (antibodi primer). Sebelum sediaan jaringan direaksikan dengan antibodi primer, maka sediaan jaringan diberi *blocking serum* yang berfungsi untuk mengikat antigen non-spesifik pada sel atau jaringan inang. Prosedur bloking serum tersebut untuk mencegah adanya ikatan non-spesifik antara molekul yang ada pada sediaan jaringan dengan antibodi primer. Bloking tersebut dapat mencegah terjadinya pewarnaan non-spesifik, yaitu hasil positif yang diperoleh akibat reaksi ikatan non-spesifik antigen pada sediaan jaringan dengan antibodi primer anti VAI atau hasil positif palsu (Fatchiyah *et al.*, 2011). Pemberian antibodi primer berfungsi secara spesifik mendeteksi keberadaan VAI pada sediaan jaringan yang diteliti. Antibodi poliklonal dapat mengenali banyak epitop VAI, hasil deteksi lebih kuat, dan lebih toleran dalam mengenali antigen yang mengalami sedikit perubahan di alam (Ekaningtias, 2015). Pemberian antibodi sekunder dilabel biotin dapat mengakibatkan timbulnya ikatan pada saat penambahan *streptavidin-horseradish peroxidase* (HRP) konjugat pada sediaan jaringan. Penambahan substrat ( $H_2O_2$ ) dapat bereaksi dengan HRP, kemudian akan melepaskan ion hidrogen. Setelah pemberian kromogen (*diaminobenzidine* atau DAB), ion hidrogen tersebut berikatan dengan DAB membentuk presipitat, dan jika jaringan diwarnai, ada antigen sasaran (VAI), dapat terbentuk warna coklat kemerahan (Munson, 2007) yang dapat diamati di bawah mikroskop cahaya (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Uji IHK SB dapat melacak distribusi VAI pada berbagai macam sel, jaringan atau organ, sehingga dapat digunakan untuk mengetahui dan menentukan patogenesis infeksi VAI pada inang. Teknik IHK SB aman, mengurangi kontaminasi lingkungan karena jaringan difiksasi formalin (VAI inaktif), sehingga penularan pada inang yang peka dapat dihindari (Kimbal, 2008). Penggunaan metode IHK SB dapat meningkatkan sensitivitas uji karena dalam satu molekul *streptavidin* terdapat empat sisi pengikatan terhadap *biotin*, sehingga sensitivitasnya empat kali lebih tinggi jika dibandingkan dengan metode IHK lain (Howarth *et al.*, 2006).

## SIMPULAN

Imunopatologi imunohistokimia *streptavidin-biotin* adalah metode yang sangat sensitif dan akurat untuk deteksi dan penentuan distribusi antigen VAI pada sel, jaringan atau organ, yaitu saluran pernapasan, otak dan saluran pencernaan unggas petelur dengan gejala klinis *torticolis* dan *curled toe paralysis*. Penentuan organ target VAI berkaitan erat dengan patogenisitas VAI pada inang sehingga mengakibatkan timbulnya gejala klinis dan membedakannya dengan gejala klinis serupa oleh virus yang lain, seperti Newcastle disease virus (VND).

## SARAN

Penelitian ini sebaiknya diaplikasikan dalam program rutin nasional pencegahan dan pemberantasan penyakit flu burung di Indonesia dengan menggunakan organ target berupa paru-paru, otak, dan saluran pencernaan untuk deteksi VAI dengan metode imunopatologis imunohistokimia *streptavidin-biotin*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan yang telah memberi dana penelitian melalui Universitas Gadjah Mada.

## DAFTAR PUSTAKA

- Antarasena C, Sirimujalin R, Prommuang P, Blacksell SD, Promkuntod N, Prommuang P. 2008. Tissue tropism of a Thailand strain of highly pathogenicity avian influenza virus (H5N1) in tissues of naturally infected native chickens (*Gallus gallus*), japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and ducks (*Anas spp.*). *Avian Pathol* 35: 250-253.
- Capua I, Alexander DJ. 2009. Ecology, epidemiology and human health, implications of avian influenza virus infections, avian influenza and Newcastle disease. London: @ Springer-Verlag Italia.

- Cauthen AN, Swayne DE, Schutz-Cherry S, Perdue ML, Suarez DL. 2000. Continued circulation on China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans. *J Virol* 74: 6592-6599.
- Chamnanpood C, Sanguansermisri D, Pongcharoen S, Sanguansermisri P. 2011. Detection of distribution of avian influenza H5N1 virus by immunohistochemistry, chromogenic in situ hybridization and real-time PCR techniques in experimentally infected chickens. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 42: 303-310.
- Chaves AJ, Busquets N, Valle R, Rivas R, Vergara-Alert J, Dolz R, Ramis A, Darji A, Majo N. 2011. Neuropathogenesis of a highly pathogenic avian influenza virus (H7N1) in experimentally infected chickens. *Vet Res* 42:106.
- Costa T, Chaves AJ, Valle R, Darji A, Van Riel D, Kuiken T, Majó N, Ramis A. 2012. Distribution patterns of influenza virus receptors and viral attachment patterns in the respiratory and intestinal tracts of seven avian species. *Vet Res* 43:28-40.
- Cross KJ, Wharton SA, Shekel JJ, Wiley DC, Steinhauer DA. 2001. Studies on influenza hemagglutinin fusion peptide mutants generated by reverse genetics. *EMBO J* 20: 4432-4442.
- Damayanti R, Dharmayanti NLPI, Indriaani R, Wiyono A, 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. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 9: 197-203.
- Ekaningtias M. 2015. Pendekatan diagnosis imunopatologis dan molekuler avian influenza virus dan Newcastle disease virus pada kasus lapangan. (Tesis). Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada.
- Fatchiyah, Laras E, Widyarti S, Rahayu S. 2011. *Biologi Molekuler, Prinsip Dasar Analitis*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Feldmann A, Schafer MKH, Garten W, Klenk HD. 2000. Targeted infection of endothelial cells by avian influenza virus A/FPV/Rostock/34 (H7N1) in chicken embryos. *J Virol* 74: 8018-8027.
- Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish A, Klimov A. 2006. Evolution of receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology* 344: 432-438.
- Horimoto T, Kawaoka J. 2001. Pandemic threat exposes by AI viruses. *Clin Microbiol* 14: 129-149.
- Howarth M, Chinnapen DJF, Gerrow K, Dorrestein PC, Grandy MR, Kelleher NL, Husseini E, Ting A, Alice Y. 2006. A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nat Methods* 4: 267-73.
- Kimbal W. 2008. Monoclonal Antibody. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/biologypages/m/monoclonal.html> (Diakses tanggal 10 Februari 2015).
- Klenk HD. 2005. Infection of the endothelium by influenza viruses. *Thromb Haemost* 94: 262-265.
- Kwon YK, Sung HW, Joh SJ, Lee MC, Choi JG, Lee EK, Wee SH, Kim JH. 2005. An outbreak of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 in broiler breeders. *Korea J Vet Med Sci* 67: 1193-1196.
- Matsuda K, Shibata T, Sakoda Y, Kida H, Kimura T, Ochiai K, Umemura T. 2005. In vitro demonstration of neural transmission of avian influenza A virus. *J Gen Virol* 86: 1131-1139.
- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H. 2004. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci* 101: 4620-4624.
- Mori I, Kimura Y. 2001. Neuropathogenesis of influenza virus infection in mice. *Microbes Infect* 3: 475-479.
- Munson P. 2007. Immunohistochemistry. In Patel HRH, Arya M, Shergill IS. (Ed) *Basic science techniques in clinical practice*. London: Springer-Verlag. Hlm. 19-30.
- Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park CH, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H. 2006. Highly



- pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. *Microbiol Immunol* 50: 73-81.
- Nakatani H, Nakamura K, Yamamoto Y, Yamada M, Yamamoto Y. 2005. Case report—epidemiology, pathology, and immunohistochemistry of layer hens naturally affected with H5N1 highly pathogenic avian influenza in Japan. *Avian Dis* 49: 436-441.
- Neufeld JL, Embury-Hyatt C, Berhane Y, Manning L, Ganske S, Pasick J. 2009. Pathology of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) infection in Canada geese (*Branta canadensis*): preliminary studies. *Vet Pathol* 46: 966-970.
- Nicholls JM, Chan RW, Russell RJ, Air GM, Peiris JS. 2008. Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol* 16: 149-157.
- Nili H, Asasi K. 2002. Natural cases and experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathol* 31: 247-252.
- [OIE] Office International Des Epizooties. 2015. OIE terrestrial manual. Avian influenza (infection with avian influenza viruses). Chapter 2.3.4. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf) (28 Oktober 2016).
- Pantin-Jackwood MJ, Swayne DE. 2009. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. *Rev Sci Tech* 28: 113-136.
- Park C-H, Ishinaka M, Takada A, Kida H, Kimura T, Ochiai K, Umemura T. 2002. The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice. *Arch Virol* 147: 1425-1436.
- Perkins EL, Swayne DE. 2001. Pathobiology of A/Chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet. Pathol* 38: 149-164.
- Perkins LE, Swayne DE. 2003. Pathogenicity of a Hongkong-origin H5N1 avian influenza virus in four Passerine species and budgerigars. *Vet Pathol* 40: 14-24.
- Post J, de Geus DG, Vervelde L, Cornelissen JBWJ, Rebel JMJ. 2013. Systemic distribution of different low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses in chicken. *Virologia* 10: 23.
- Setyawati S, Soejoedono RD, Handharyani E, Sumiarto B. 2010. Deteksi virus avian influenza H5N1 pada anak ayam umur satu hari dengan teknik imunohistokimia. *J Veteriner* 11: 203-209.
- Susta L, Miller P, Afonso C, Brown C. 2011. Clinico pathological characterization in poultry of three strains of newcastle disease virus isolated from recent outbreaks. *Vet Pathol* 48: 349-360.
- Swayne DE, Suarez DL. 2000. Highly pathogenic influenza. *Rev Sci Tech Int Epiz* 19: 463-482.
- Swayne DE. 2007. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis* 51: 242-249.
- Swayne DE, Patin-Jackwood M. 2008. Pathobiology of avian influenza virus infections in birds and mammals. In Swayne DE. (Ed) *Avian influenza*. 1<sup>st</sup> ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. Hlm. 87-122.
- Tanaka H, Park C-H, Ninomiya A, Ozaki H, Takada A, Umemura T, Kida H. 2003. Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice. *Vet Microbiol* 95: 1-13.
- Tjahyowati G. 2010. Imunohistokimia Flu Burung H5N1 pada Unggas. *Disertasi*. Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada.
- Wakamatsu N, King DJ, Kapczynski DR, Seal BS, Brown CC. 2006. Experimental pathogenesis for chickens, turkeys, and pigeons of exotic Newcastle disease virus from an outbreak in California during 2002–2003. *Vet Pathol* 43: 925-933.
- Wasito R, Wuryastuty H. 2014. *Antibodi dan Imunohistokimia*. Yogyakarta. Penerbit Andi.
- Wasito R, Wuryastuty H, Tjahyowati G, Irianingsih SH, Tyasasmaya T. 2015. *Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction* untuk deteksi cepat virus flu burung H5N1. *J Veteriner* 1: 25-30.



- Wibawa H, Prijono WB, Dharmayanti NLPI, Irianingsih SH, Miswati Y, Rohmah A, Andesyha E, Romlah, Daulay RSD, Safitria K. 2012. Disease outbreak investigation in ducks in Central Java, Jogjakarta and East Java: identification of a new clade of avian influenza a (H5N1) virus in Indonesian. *Bull Lab Vet* 12: 1-8.
- Wibawa H, Bingham J, Nuradji H, Lowther S, Payne J, Harper J, Wong F, Lunt R, Junaidi A, Middleton D, Meers J. 2013. The pathobiology of two Indonesian H5N1 avian influenza viruses representing different clade 2.1 sublineages in chickens and ducks. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36: 175-191.
- Wilson A, Beckwith N, Senne D, Richt J, Janke B, Cavanaugh D. 2006. Demonstration of H5N1 highly pathogenic avian influenza viral antigen in formalin-fixed avian tissues specimens by an avidin-biotin immunohistochemistry procedure. *Am Assoc Vet Lab Diagn* 41.