

Isolasi dan Identifikasi Protein Spike (Protein-S) pada Isolat Lapangan *Infectious Bronchitis Virus*

Isolation and Identification of Protein Spike (Protein-S) in Field Isolates of Infectious Bronchitis Virus

Jola Rahmahani¹, Dewanggi Kristi Sasmi Pradhita², Nanik Sianita Widjaja¹, Suwarno¹

¹Laboratorium Virologi dan Immunologi, Divisi Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia 60115, ²Pendidikan Dokter Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia 60115,

*Corresponding author: jola_rahmahani@yahoo.co.id

Abstrak

Penyakit Infeksius Bronkitis adalah penyakit yang menyebabkan kerugian ekonomi besar di banyak negara. protein *Spike* (Protein-S) adalah salah satu protein struktural milik *Infectious Bronchitis Virus* (IBV) yang terletak pada amplop virus. Karakterisasi molecular dapat dilakukan dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk mengetahui berat molekul protein. Sebagai konfirmasi dari Teknik ini, digunakan Teknik *Immuno-blotting*, untuk mengkonfirmasi bahwa protein yang diisolasi merupakan protein-S. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui berat molekul protein *Spike* dari IBV isolat lapangan yang dibandingkan dengan virus vaksin, untuk mengetahui apakah terjadi perubahan massa protein dengan IBV isolat lapangan. Hasil dari penelitian ini mengindikasikan bahwa berat protein dari isolat lapangan (I-147/11) adalah 168.21 kDa, yang masih sama dengan berat protein-S dari virus vaksin Massachusset.

Kata kunci: *Infectious Bronchitis Virus*, vaksin, isolat lapangan, *Spike Glycoprotein*

Abstract

Infectious Bronchitis (IB) is disease causes great economic impact across nations. Spike protein (protein-S) is one of structural protein of Infectious Bronchitis Virus (IBV) located on enveloped of the virion. Molecular characterization of IBV could be conducted use Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) to reveal the protein weight then confirmed through Immuno-Blotting assay. These methods were conducted to know the molecule weight of field isolate compared to seed vaccine. The results of this study indicate the weight of protein-S of field isolate I-147/11 were 168.21 kDa which was same to protein-S of seed vaccine Massachusset.

Keywords: *Infectious Bronchitis Virus*, vaccine, field isolate, *Spike Glycoprotein*

Received: 1 Januari 2021

Revised: 25 Januari 2021

Accepted: 26 Februari 2021

PENDAHULUAN

Infectious Bronchitis Virus (IBV) adalah salah satu penyebab penyakit pernapasan pada unggas. IBV merupakan anggota dari Coronaviridae, genus Coronavirus. IBV merupakan virus RNA berantai tunggal positif unsegmented yang terdiri atas 27-32 bp genome, protein Nucleocapsid (N), protein Amplop (E), protein Membran (M), dan protein Spike (protein-S). Penyakit ini menurunkan produktivitas kandang dan menyebabkan infeksi

permanen pada unggas (MacLachlan dan Dubovi, 2011). Dua puluh serotipe (Casais *et al.*, 2003) dan berbagai macam varian antigenik yang ditemukan, sebagai hasil mutasi genom virus (MacLachlan dan Dubovi, 2011).

Penyakit ini pertama kali diidentifikasi di Amerika Serikat sekitar tahun 1930 (Cook *et al.*, 2012). IBV pertama kali diisolasi pada tahun 1977 dan 1985 oleh Ronohardjo dan Darminto. IBV yang diisolasi di Indonesia terdiri dari beberapa serotipe. Mereka memiliki kemiripan dengan serotipe Massachusete, Connecticut, dan



IBV dari Australia. Massachusetta, H120 dan Connecticut bersirkulasi di Indonesia karena merupakan strain vaksin. Belum ada vaksin IBV yang berasal dari serotipe lapangan (Darminto, 1999; Dharmayanti dan Risa, 2016).

Metode diagnostik untuk mengkonfirmasi penyakit yang menginfeksi berbagai jenis hewan sangat penting. Metode diagnostik ini bisa dilakukan menggunakan pendekatan serologi, virologi dan molekuler. Salah satu metode untuk diagnosa IBV adalah melalui metode molekuler. Metode molekuler juga mampu menggambarkan karakteristik virus baik genetiknya maupun berat protein nya. *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) adalah salah satu metode untuk mengkarakterisasi isolat melalui pendekatan molekuler. Metode ini memisahkan protein infeksius berdasarkan berat molekuler (Cavanagh *et al.*, 1983). Hasil nya bisa dikonfirmasi dengan metode *immune-blotting assay*. Isolat lapangan IBV bisa dikarakterisasi menggunakan metode ini. Karakterisasi ini dilakukan pada protein-S karena protein-S digunakan sebagai karakterisasi genotip dan serotipe (Shi *et al.*, 2011).

Perbandingan antara protein-S dari isolat dan vaksin dapat menunjukkan kemungkinan perubahan berat molekul dari isolat lapangan akibat rapid mutation. Metode SDS-PAGE memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya yang divisualisasikan dalam bentuk band (Garfin, 2009; Kong *et al.*, 2010; BioRad, 2014). Kemurnian protein yang diisolasi dikonfirmasi dengan metode Dot-Blot (Rantam, 2003).

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Sampel lapangan dari IBV dikoleksi oleh Laboratorium Virologi dan Immunologi, Divisi Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Isolat diperoleh dengan menginokulasikan sampel yang diambil dari ayam yang diduga terinfeksi IBV pada telur berembryo Specific Pathogenic Free (SPF) (MacLachlan dan Dubovi, 2011).

Sampel di label sebagai 147/11. Sebelum SDS-PAGE dilakukan, sampel di campur dengan Laemmli buffer (Laemli) untuk mengubah muatan positif protein menjadi muatan negatif sehingga protein bisa dipisahkan menggunakan *acrylamide gel* (Roy dan Kumar, 2014).

Uji SDS-PAGE

Metode ini diawali dengan mencetak gel yang terdiri dari *Stacking gel* 4% dan *Sparating gel* 12%. Kemudian memasukkan ke dalam alat elektroforesis berisi Buffer. Elektrophoresis ini dijalankan dengan pengaturan; 120 Volt, 400 Ma 100 menit. Gel dicuci sebanyak empat tahap dengan larutan yang berbeda. Pencucian pertama menggunakan campuran dari methanol 25 ml, *acetic acid* 3,75 ml, aquadestilata 71,25 ml.

Cawan petri yang berisi gel dan larutan pencuci diletakkan pada *shaker* dengan kecepatan 42 rpm selama 30 menit. Larutan pencuci dibuang dan diganti dengan larutan pencuci kedua yaitu campuran methanol 2,5 ml; *acetic acid* 3,75 ml; dan aquadestilata 93,75 ml; kemudian gel digoyang dengan kecepatan 42 rpm selama 30 menit, pencucian ketiga dengan larutan Glutaradehid dengan 90 ml aquadestilata kemudian digoyang dengan kecepatan 42 rpm selama 30 menit.

Pencucian terakhir dengan aquadestilata 100 ml selama 30 menit. Pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali. Lalu dilakukan pewarnaan gel (pewarna terdiri dari campuran *Commassie blue* 0,05 gr, *Acetid Acid absolute* 40 ml, *Methanol absolut* 10 ml dan *Aquades* 50 ml) ke dalam cawan petri dan di goyang dengan kecepatan 42 rpm selama 15 menit. Pewarna dibuang dan gel dicuci dengan 100 ml aquadestilata selama 2 menit sebanyak 2 kali diatas *shaker*.

Kemudian developer warna yang terdiri dari formaldehid 3,7 % sebanyak 50 µl zitroneasaur 5 % sebanyak 100 µl dan 100 ml aquadestilata ditambahkan ke dalam cawan petri yang berisi gel. Cawan patri di goyang selama 5 menit dengan kecepatan 42 rpm. *Stopper* ditambahkan bersamaan dengan *acetic acid* 10 %, setelah itu dicuci dengan 100 ml aquadestilata selama 2 menit sebanyak 2 kali, kemudian membuang dan menambahkan oleh larutan yang terdiri dari atas

Gliserol 10 ml dan aquadestilata 90 ml agar tidak rusak.

Uji Dot-Blot

Metode identifikasi Dot-Blot diawali dengan merendam membran nitroselulose ke dalam TBS, kemudian dikeringkan selama 12 jam. Antigen berupa *whole* virus dan protein-S (10-100 pg/2 ml selama 5 menit) diteteskan pada membran nitroselulosa pada suhu ruang. *Buffer blocking* yang mengandung 1% skim ditambahkan. *Blocking* ini dilakukan selama 30-60 menit. Membran nitroselulosa dicuci sebanyak tiga kali menggunakan TBS-T setelah itu dikeringkan.

Antibodi primer yang berlabel *Massachussets* (1:100-1:5000) sebanyak 50 µl/ 5 µl BB dalam TBS-T yang mengandung 1% skim milk, ditambahkan kemudian shaking dilakukan diatas shaker selama 1-2 jam. Kemudian membran nitroselulosa dicuci menggunakan TBS-T sebanyak tiga kali. Antibodi sekunder (1:1000) sebanyak 5 µl/5ml bb, yang dilarutkan dalam TBS-T yang mengandung 1% skim milk, ditambahkan. Kemudian membrane diinkubasi selama satu sampai dua jam. Membrane nitroselulosa dicuci sebanyak tiga kali menggunakan TBS tanpa Tween. Kemudian 25 µl substrat ditambahkan. Membrane nitroselulosa diinkubasi selama 30-60 menit. Setelah itu, membrane dibilas dengan air untuk *Stop reaction*. Uji Dot-Blot hasilnya dapat dianalisa berdasarkan pengukuran intensitas warna menggunakan ImageJ.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil SDS-PAGE

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari SDS-PAGE, dapat diamati terdapat beberapa *band* dari isolat I-147/11. Ada tiga band yang diduga merupakan protein-S, S1, dan S2 (Gambar 1) yang sesuai dengan marker protein 62-198 kDa. Konfirmasi dilakukan dengan penghitungan nilai *Retardation factor* (Garfin, 2009; Kong et al., 2010; BioRad, 2014).

Berdasarkan penghitungan nilai Rf, ketiga band memiliki berat molekul 168.21 kDa, 150.44

kDa, dan 135.26 kDa (Tabel 1). Penemuan ini sesuai dengan berat molekul dari protein-S, S1, dan S2 yang sesuai dengan berat molekul protein yang sama yang dimiliki oleh Massachusate (kontrol). Elektroporesis menggunakan SDS sering digunakan untuk proses pemisahan protein dan asam nukleat. Metode PAGE adalah metode standard untuk mengujur berat molekul protein, struktur subunit, dan kemurnian protein (Cavanagh et al., 1983).

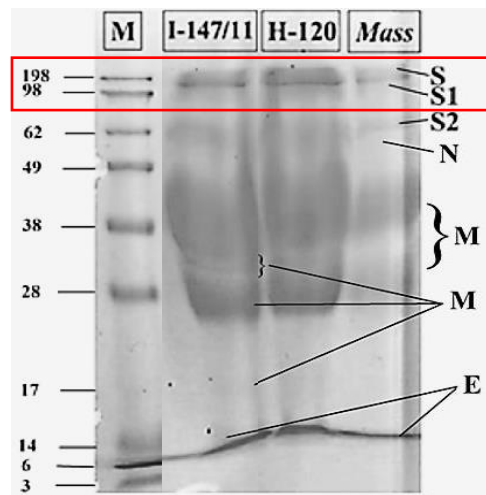
Penggunaan 12% polyacrylamide untuk karakterisasi protein berdasarkan berat molekul, bisa digunakan untuk mengkarakterisasi protein-S dari IBV (Cavanagh et al., 1983). Protein yang dimasukkan ke dalam gel akan dipecah menjadi polipeptida bermuatan negatif yang akan dipisah-pisahkan berdasarkan berat molekul saat elektroporesis berlangsung gel (Roy dan Kumar, 2014).

Band yang dihasilkan akan terpisah pisah berdasarkan berat molekul proteinnnya. Konsentrasi acrylamide mempengaruhi pori-pori gel. Apabila konsentrasi akrilamida terlalu rendah, maka akan menyebabkan protein bergerak terlalu cepat pada pori-pori gel sehingga pemisahan protein tidak berjalan maksimal gel (Roy dan Kumar, 2014). Berdasarkan hasil SDS-PAGE, protein-S (Spike Glycoprotein) dari IBV berada pada band tertinggi dengan hasil penghitungan Rf value senilai dengan 168.21 kDa. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa berat molekul S protein adalah 150-200 kDa (Bande et al., 2015) atau sekitar 130-170 kDa (Kong, 2010).

Berat molekul protein IBV isolat I-147/11 sebesar 168,21; 135,26; 111; 60,49; 32,93; 31,80; 29; 17,6; dan 8,30 kDa. Diperkirakan protein-S mempunyai berat molekul (168,21) kDa dan (135,26) kDa, Berat molekul protein IBV isolat Massachusset sebesar 168,21; 135,26; 111; 60,49; 54,12; 32,68; 31,95; 30,24 dan 7,5 kDa. Protein-S diperkirakan memiliki berat molekul sebesar (168,21) kDa dan (135,26) kDa (Gambar 1).

Hasil Dot-Blot

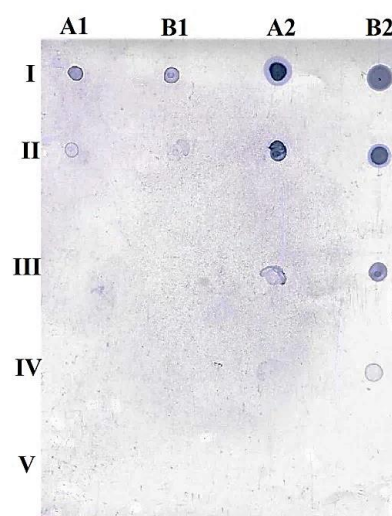
Immuno-blotting assay menunjukkan hasil positif ditandai dengan warna ungu pada blot.



Gambar 1. Hasil SDS-PAGE. Berdasarkan penghitungan Rf value, berat protein-S = 168,21 kDa sedangkan protein-S1 diduga terhubung protein-S2 memiliki berat molekul 111 kDa.

Tabel 1. Penghitungan hasil SDS-PAGE

| Jarak migrasi (cm) | Berat molekul (Log) | Berat molekul (kDa) | Rf | Protein |
|--------------------|---------------------|---------------------|------|---|
| 0,03 | 2,23 | 168,22 | 0,05 | S |
| 0,15 | 2,13 | 135,26 | 0,15 | S |
| 0,25 | 2,05 | 110,99 | 0,25 | SI |
| 0,65 | 1,78 | 60,49 | 0,65 | S2 Ovotransferin, Ovalbumin |
| 1,70 | 1,52 | 32,94 | 1,70 | M Ovotransferin, Ovalbumin |
| 2,00 | 1,50 | 31,81 | 2,00 | M Ovotransferin, Ovalbumin |
| 2,20 | 1,49 | 31,29 | 2,20 | M Ovotransferin, Ovalbumin |
| 2,70 | 1,46 | 29,01 | 2,70 | M, Ovomuroid, Ovotransferin, Ovalbumin |
| 3,50 | 1,25 | 17,59 | 3,50 | M, Lysozyme C, Ovotransferin, Ovalbumin |
| 4,00 | 0,92 | 8,29 | 4,00 | E |



Gambar 2. Hasil Dot-Blot atau *Immuno-blotting assay*. (A1) Protein-S dari Massachusset yang sudah diencerkan; (B1) protein-S dari I- 147/11 yang sudah diencerkan; (A2) *Whole molecule* dari Massachusset; (B2) *Whole molecule* dari I-147/11; (I) pengenceran 1000 pg; (II) pengenceran 100 pg; (III) pengenceran 10 pg; (IV) pengenceran 1 pg; (V) control negatif.

Berdasarkan konsentrasi protein-S, keempat pengenceran masih menunjukkan hasil positif, yang ditunjukkan dengan warna ungu pada pengenceran IV, III, dan II (10 g, 100 pq, 1000 pq) (Gambar 2).

Dot-Blot adalah *semi-quantitative* metode yang digunakan untuk mendeteksi antigen, menggunakan pendekatan serologi. Bagaimanapun Teknik ini masih kurang akurat untuk menghitung estimasi konsentrasi antigen secara tepat, tapi bisa digunakan untuk *screening test* (Rantam, 2003). Protein-S yang berikatan dengan anti-rabbit antibody, yang dapat diamati berwarna ungu keabu-abuan pada *membrane* nitroselulosa. Berdasarkan hasil assai dapat di lihat bahwa protein-S murni dan Protein-S yang terdapat pada *whole* virus merupakan protein yang sensitif terhadap reaksi serologi (Gambar 2).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa berat molekul protein-S IBV vaksin Massachusset dan isolat lokal I-147/11 adalah 168.21 kDa dan 135.26 kDa. Hal ini menandakan bahwa tidak terjadi perubahan berat molekul dari protein-S yang diisolasi dari isolat lokal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan atas pendanaan Hibah Penelitian dari Universitas Airlangga. Penulis mengucapkan terimakasih sebanyak-banyaknya atas dukungan yang diberikan oleh Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah menyediakan fasilitas penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Bande, F., Arshad, S. S., Bejo, M. H., Moeini, H., & Omar A. R. (2015). Progress and challenges toward the Development of Vaccines against Avian Infectious Bronchitis. *Hindawi*.

BioRad. (2014). Blotting Troubleshooter. *Bulletin*, 1529.

Casais, R., Dove, B., Cavanagh, D., & Britton, P. (2003). Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *Journal of Virology*, 77, 9084-9089.

Cavanagh, D. (1983). Coronavirus IBV: Structural Characterization of the spike glycoprotein. *Journal of General Virology*, 65, 2577-2583.

Cook, J. K. A., Jackwood, M., & Jones, R. C. (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathology*, 41(3), 239-250.

Darminto. (1999). Developing inactivated vaccine for Infectious Bronchitis using local isolate (Pengembangan Vaksin Infektious Bronchitis Inaktif Isolat Lokal. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 4(2), 113-121.

Dharmayanti, N. L. I., & Risa, I. (2016). Identification and characterization of Infectious Bronchitis Virus (IBV) in Indonesia (Identifikasi dan Karakterisasi Virus Infectious Bronchitis (IBV) di Indonesia). *Jurnal Biologi Indonesia*, 13(1), 53-59.

Garfin, D. E. (2009). One dimensional gel electrophoresis, *Methods Enzymology*, 463, 497-513.

Kong, Q., Ren, X., Zhang, C., Li, L., Shu, D., Bi, Y., & Cao, Y. (2010). Proteomic analysis of purified coronavirus infectious bronchitis virus particles. *Proteome Science*, 8(29).

Laemmlli Sample Buffer, Cat No. 161-0737. BioRad.

MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (2011). *Fenner's Veterinary Virology*. Elsevier Inc.

- 32 Jamestown Road, London NW1 7BY, UK.
- Rantam, F. A. (2003). *Method in Immunology (Method in Immunology)*. 1st edition Airlangga University Press. Surabaya.
- Roy, S., & Kumar, V. (2014) A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *IJSR*, 3(8), 2319-7064.
- Shi, X. M., Zhao, Y., & Gao, H. B. (2011). Evaluation of recombinant fowlpox virus expressing infectious bronchitis virus S1 gene and chicken interferon-7 gene for immune protection against heterologous strains. *Journal Vaccine*, 29, 1576- 1582.
