

Imunogenisitas Virus *Infectious Bronchitis* Strain Lokal dan Massachusetts

Immunogenicity of Local and Massachusetts Strains Infectious Bronchitis Virus

Jola Rahmahani^{1*}, R Zaksara Fero Ali Mutaqin Wudhu², Suwarno¹,
Martia Rani Tacharina¹

¹Laboratorium Virologi dan Imunologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia, ²Pendidikan Profesi Dokter Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

*Corresponding author: jola_rahmahani@yahoo.co.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan potensi imunogenisitas antara antigen *whole virus* dan antigen protein S dari strain lokal I-147 dengan strain Massachusetts virus *Infectious bronchitis* menggunakan uji *indirect ELISA*. Pada penelitian ini digunakan 24 mencit yang dibagi menjadi empat kelompok perlakuan yaitu: P1) kelompok mencit yang divaksin menggunakan protein S (*spike glycoprotein*) dari strain lokal virus *Infectious bronchitis*; P2) kelompok mencit yang divaksin menggunakan protein S (*spike glycoprotein*) dari strain Massachusetts virus *Infectious bronchitis*; P3) kelompok mencit yang divaksin menggunakan *whole virus* dari strain lokal virus *Infectious bronchitis*; P4) kelompok mencit yang divaksin menggunakan *whole virus* dari strain Massachusetts virus *Infectious bronchitis*. Darah mencit diambil pada minggu ke-2 dan ke-4 pasca vaksinasi untuk diperiksa seumnya menggunakan uji *indirect ELISA*. Hasil yang didapatkan pada penelitian ini berupa nilai *Optical Density* (OD) pada masing-masing perlakuan, yang selanjutnya dianalisa menggunakan One Way ANOVA dan dilanjutkan dengan Duncan *Multiple Range Test* 5% dan uji T. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan titer antibodi antara kelompok mencit yang divaksin menggunakan *whole virus* dan protein S pada kedua strain virus *Infectious bronchitis*. Nilai OD *whole virus* pada kedua strain memiliki perbedaan yang nyata dengan nilai OD antigen protein S pada kedua strain baik pada serum yang diambil pada minggu ke-2 maupun minggu ke-4 pasca vaksin.

Kata kunci: penyakit unggas, *Infectious Bronchitis*, *S Protein*, *whole virus*, imunogenisitas

Abstract

This study aimed to compare the immunogenicity between the *whole virus* and protein S of both local strain I-147 and Massachusetts strain of *Infectious bronchitis virus* with *indirect ELISA*. 24 healthy mice are divided into four groups with six mice in each group that are: P1) a group of mice that are vaccinated with S protein (*spike glycoprotein*) of local strain *Infectious Bronchitis virus*; P2) a group of mice that are vaccinated with S protein (*spike glycoprotein*) of Massachusetts strain *Infectious Bronchitis virus*; P3) a group of mice that are vaccinated with the *whole virus* of local strain *Infectious Bronchitis virus*; P4) a group of mice that are vaccinated with the *whole virus* of Massachusetts strain *Infectious Bronchitis virus*. The results of this research are *Optical Density* (OD) values of each treatment, then to be analyzed using One Way ANOVA and followed by Duncan *Multiple Range Test* 5% and T-test. The results show that there are differences in immunogenicity between the *whole virus* and S protein in both the local strain and Massachusetts strain of *Infectious bronchitis virus*. The OD value of the *whole virus* in the two strains has a significant difference from OD value of the protein S antigen in both strains, both in the serum taken at week 2 and week 4 post-vaccination.

Keywords: poultry disease, *Infectious Bronchitis*, *S Protein*, *whole virus*, immunogenicity

Received: 19 Januari 2022

Revised: 2 Maret 2022

Accepted: 13 April 2022

PENDAHULUAN

Infectious bronchitis adalah penyakit pernapasan yang kontagius pada ayam yang

disebabkan oleh virus *infectious bronchitis* (IB) yang bersifat akut (Cavanagh dan Naqi, 2003). Penyakit IB selama ini menjadi masalah besar yang sering dihadapi oleh peternak ayam karena



virus IB menginfeksi ayam dari segala umur. Penyakit ini menimbulkan penyakit pernafasan, menurunkan kualitas dan produksi telur serta mengakibatkan kematian sehingga sangat berpengaruh dalam kerugian ekonomi akibat gejala yang di timbulkan menyebabkan keuntungan peternak menurun drastis (Tabbu, 2000). Gejala yang terlihat yaitu keluarnya eksudat dari lubang hidung, kepala membengkak, sering bersin, sesak napas. Pada ayam yang sedang produksi, infeksi penyakit ini menyebabkan bentuk telur tidak normal, kerabang kasar, dan produksi menurun (Cavanagh *et al.*, 1992).

Penyakit yang pertama kali ditemukan di Amerika pada tahun 1930 ini tersebar di berbagai negara dunia termasuk Indonesia. Di Indonesia penyakit IB sudah lama diduga ada, akan tetapi pembuktiannya secara virologi dengan mengisolasi virus baru dilakukan pada tahun 1977 oleh Purnomo Roonohardjo. Penyakit IB saat ini menjadi kebingungan kalangan praktisi karena gejala yang ditimbulkan tidak spesifik (Tabbu, 2000).

Penularan virus IB dapat terjadi secara langsung yaitu melalui kontak antara ayam sakit dengan ayam yang sehat sedangkan secara tidak langsung yaitu melalui peralatan kandang, bahan pakan, air, kotoran ayam, anak kandang dan alat transportasi. Namun penularan secara vertikal (melalui telur), dari induk ke anak sampai saat ini masih belum ada laporan. Penyakit ini biasanya bersifat endemik pada suatu peternakan tertentu, terutama jika faktor sanitasi atau desinfeksi kurang di perhatikan (Tabbu, 2000).

Jenis unggas yang paling peka adalah ayam dan terjadi pada semua umur, tetapi kasus IB paling banyak terjadi pada anak ayam serta diikuti kematian. Kasus kematian sering terjadi pada ayam yang berumur kurang dari enam minggu (Cavanagh, 2003). Tingkat mortalitas pada anak ayam sangat tinggi (100%). Anak ayam di bawah umur tiga minggu yang terinfeksi penyakit IB memperlihatkan gejala, kesulitan bernafas, ngorok, batuk-batuk, bersin dan mata berair (Cavanagh *et al.*, 1992), Infeksi IBV pada DOC bisa menimbulkan kerusakan permanen pada

oviduk sehingga menurunkan produksi dan kualitas telur (Bahri dkk., 2005).

Secara umum, strain virus yang berbeda tidak saling melindungi. Beberapa strain virus cukup efektif untuk mendorong perlindungan silang terhadap serotipe lain dan disebut sebagai prototipe. Banyak serotipe atau genotipe yang berbeda dari virus IB yang dikenali (Cook *et al.*, 2012). Menurut Indriani dan Darminto (2000), serotipe virus IB lapangan di Jawa Isolat I. 9 termasuk dalam serotipe *Mass-41*, sedangkan isolat 1.2, 1.3, dan 1.7 termasuk dalam serotipe *Conn-46*. Isolat 1.5, 1.14, 1.24, dan 1.25 secara serologik berbeda dengan serotipe *Mass-41*, *Conn-46* atau serotipe virus IB isolat lokal yang sudah diperoleh dalam penelitian sebelumnya.

Spike glycoprotein atau protein S IBV terlibat dalam induksi kekebalan protektif, netralisasi dan perlekatan pada sel inang. Komponen imunogenik yang menimbulkan respon antibodi dari IBV meliputi protein S (*Spike*) dan N (*Nukleoprotein*) (Li *et al.*, 2010), sedangkan protein M IBV dikenali sebagai protein imunogenik (Feng *et al.*, 2015).

Protein S diketahui menimbulkan respon antibodi tertinggi dibandingkan protein lain, oleh karena itu protein S dipilih sebagai target primer untuk pengembangan vaksin (Jackwood, 2012), protein *Spike* dipilih sebagai target penting untuk mendeteksi terhadap coronavirus dan pengembangan anti virus (Luo *et al.*, 2012). Berdasarkan pembahasan diatas dapat dilakukan penelitian untuk melihat perbedaan imunogenitas dari pemberian protein S dan *whole virus* IBV dua serotipe virus lokal I-147 dan *Massachusset* yang diinjeksikan pada mencit sehingga menginduksi pembentukan antibodi dan dilihat nilai *Optical Density* (OD) dengan menggunakan uji *indirect ELISA*.

METODE PENELITIAN

Vaksinasi Mencit dan Pengambilan Serum

24 ekor mencit dibagi menjadi empat kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari enam ekor mencit sebagai berikut: (P1) Kelompok mencit yang divaksin dengan antigen protein S (*Spike Glycoprotein*)

virus IB strain lokal (I-147), (P2) Kelompok mencit yang divaksin dengan antigen protein S (*Spike Glycoprotein*) virus IB strain Massachusetts, (P3) Kelompok mencit yang divaksin dengan antigen *whole* virus IB strain lokal (I-147), dan (P4) Kelompok mencit yang divaksin dengan antigen *whole* virus IB strain Massachusetts.

Darah mencit diambil pada minggu kedua dan minggu keempat pasca vaksinasi tanpa menggunakan antikoagulan untuk memperoleh serum. Darah yang ditampung pada tabung tanpa antikoagulan di pindahkan ke tabung sentrifus untuk dibisingkan pada kecepatan 900rpm selama 10 menit. Setelah proses sentrifus akan didapatkan serum yang berupa cairan berwarna kuning jernih pada bagian supernatan. Serum dipisahkan dan disimpan sementara pada lemari pendingin 4°C sampai digunakan.

Uji Indirect ELISA

Prosedur *indirect* ELISA adalah sebagai berikut, *coating antigen* virus IB dengan konsentrasi 2 µg/ml dan dilapisi sebanyak 100 µl/sumuran mikroplate yang sudah diencerkan dengan pengenceran 1/100 menggunakan *coating buffer* dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 18 jam. Selanjutnya mikroplate dicuci dengan *washing buffer* (PZ dan triton 0,5 ml) 200 µl/sumuran sebanyak 3x1 menit. Mikroplate kemudian diblok dengan *milk blocking* 4% sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya mikroplate dicuci dengan *washing buffer* (PZ dan triton 0,5 ml) 200 µl/sumuran sebanyak 3x1 menit. Antibodi hasil vaksinasi virus IB diencerkan 1/500 dengan *blocking buffer*, selanjutnya dimasukkan sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C, setelah itu mikroplate dicuci dengan *washing buffer* (PZ dan triton 0,5 ml) 200 µl/sumuran sebanyak 3x1 menit kemudian diikuti dengan penambahan konjugat (*Anti Mencit Ig G* yang dilabel dengan enzim *alkalin fosfatase*) yang diencerkan dengan *blocking buffer* dengan pengenceran 1: 2500 sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C.

Berikutnya mikroplate dicuci kembali dengan *washing buffer* (PZ dan triton 0,5 ml) 200 µl/sumuran sebanyak 3x1 menit, kemudian ditambahkan substrat p-NPP sebanyak 100 µl pada semua sumuran, ditutup dengan *aluminium foil* kemudian didiamkan selama 30 menit di ruang gelap, segera ditambahkan NaOH 3N sebanyak 50 µl pada tiap sumuran untuk menghentikan reaksi. Hasilnya kemudian dibaca dengan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 405 nm. Pembacaan titer antibodi dilakukan dengan *ELISA Reader*, hasil yang didapat berupa nilai absorbansi.

Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh berupa nilai OD yang dianalisis dengan uji ANOVA dan dilanjutkan *Duncan Multiple Range Test* 5% yang membandingkan nilai OD dan uji T-test untuk melihat perbandingan di setiap minggunya. Software yang digunakan adalah SPSS v.16.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil ELISA dapat diketahui bahwa pada minggu ke-2 pasca vaksinasi Kelompok P3 yaitu kelompok mencit yang divaksin dengan dengan *whole* virus IB strain lokal I-147 memiliki nilai rata-rata OD tertinggi yang diikuti selanjutnya secara berurutan yaitu Kelompok P4 yang divaksin dengan *whole virus* strain Massachusetts, Kelompok P2 protein S strain Massachusetts dan Kelompok P1 protein S strain lokal (I-147) (Tabel 1).

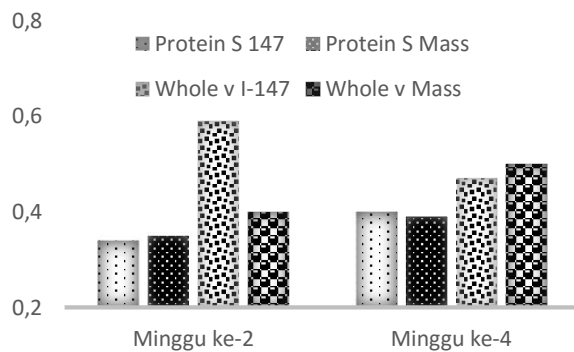
Tabel 1. Rata-rata dan simpangan baku nilai OD pada kelompok perlakuan

	OD	OD
	Minggu ke-2	Minggu ke-4
P1	0,3395 ^a ± 0,03	0,4041 ^a ± 0,06
P2	0,3480 ^a ± 0,08	0,3950 ^a ± 0,04
P3	0,5962 ^b ± 0,13	0,4701 ^b ± 0,03
P4	0,3597 ^a ± 0,05	0,5073 ^b ± 0,09

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan signifikan (p<0,05).

Hasil yang berbeda ditunjukkan pada minggu ke-4 pasca vaksinasi dengan Kelompok

P4 yang divaksin dengan *whole virus* strain Massachusetts memiliki nilai OD tertinggi yang diikuti oleh Kelompok P3 yang divaksin dengan dengan *whole virus* IB strain lokal I-147, Kelompok P1 protein S strain lokal (I-147) dan Kelompok P2 protein S strain Massachusetts.



Gambar 1. Hasil pengujian antibodi mencit dari Protein S dan *whole virus* di Minggu ke-2 dan Minggu ke-4.

Rata-rata dan simpangan baku di minggu ke 2 nilai OD pada perlakuan *whole virus* IB strain lokal (I-147) menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) dengan perlakuan *whole virus* strain Massachusetts, protein S strain lokal (I 147) dan *whole virus* strain Massachusetts. Dan di minggu ke 4 rata-rata dan simpangan baku nilai OD pada perlakuan *Whole virus* IB strain lokal (I-147) dan *whole virus* IB strain Massachusetts menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) dengan perlakuan protein S strain Massachusetts dan protein S strain lokal (I 147).

Hasil analisis statistik menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan uji *Duncan Multiple Range Test* 5% dengan menganalisis nilai *optical density* (OD) terhadap setiap perlakuan di setiap minggunya, dapat dilihat pada Gambar 1 menunjukkan perbedaan yang signifikan. Pada minggu ke 2 perlakuan dengan *whole virus* virus IB strain lokal (I-147) (P3) mempunyai rata-rata dan simpangan baku tertinggi. dan minggu ke 4 perlakuan dengan *whole virus* virus IB strain lokal (I-147) (P3) dan dengan *whole virus* virus IB strain Massachusetts (P4) mempunyai rata-rata dan simpangan baku tertinggi. Hal ini sependapat dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa respon imunogenik dari protein S1, S2, M, dan N yang dapat memicu terbentuknya antibodi

pada tubuh ayam yang terinfeksi (Dharmayanti *et al.*, 2005).

Hasil analisis statistik menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan uji *Duncan Multiple Range Test* 5% dan uji T-test menunjukkan perbedaan yang signifikan. Perlakuan dengan *whole virus* virus strain lokal (I-147) mempunyai rata-rata dan simpangan baku tertinggi di minggu ke 2 dan ke 4. Hal ini sependapat dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa terbentuknya respon imun dari protein S, M, dan N yang pada tubuh ayam yang sudah terinfeksi virus IB (Bahri dkk., 2005). Imunogen merupakan substansi yang menginduksi respon imun spesifik, humoral, seluler, atau keduanya, setelah diolah oleh Antigen Presenting Cell (APC), maka imunogen akan bereaksi dengan produk respon imun spesifik. Respon imun yang ditimbulkan dari IBV meliputi protein S (*Spike*) yang terdiri dari S1 dan S2, Protein M (Bijlenga *et al.*, 2004).

Hasil analisis statistik menggunakan uji T-test Independent dengan menganalisis nilai OD antara minggu ke dua dan minggu ke empat, dapat dilihat pada Gambar 1 menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang sangat signifikan. Hal ini diakibatkan adanya faktor immunosupresi, faktor immunosupresi juga bisa ikut memperparah reaksi setelah vaksinasi, faktor ini bisa disebabkan karena infeksius atau faktor noninfeksius seperti akibat hewan mengalami stres baik internal maupun eksternal lingkungan (De Groot, 2012).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai OD pada perlakuan dengan *whole virus* strain lokal I-147 lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Komponen imunogenik yang menimbulkan respon antibodi dari IBV meliputi protein S (*Spike*) dan N (*Nukleoprotein*) (Cook *et al.*, 2012), sedangkan protein M IBV dikenali sebagai protein imunogenik (Feng *et al.*, 2015). Protein S diketahui menimbulkan respon antibodi tertinggi dibandingkan protein lain, oleh karena itu protein S dipilih sebagai target primer untuk pengembangan vaksin (Jackwood, 2012).

Enzyme linked immunoassay (ELISA) merupakan salah satu uji serologi dalam mendeteksi adanya antibodi dalam serum mencit

ELISA adalah salah satu metode yang sensitif untuk mendeteksi antibodi, antigen dan hormon maupun bahan toksik. Metode ini merupakan pengembangan dari sistem deteksi dengan *imunofluoresens* atau radioaktif (Rantam., 2003). Konfigurasi *indirect* ELISA selain banyak di manfaatkan untuk deteksi antibodi, penentuan titer maupun kadar antibodi, juga dapat digunakan untuk penentu kelas immunoglobulin pada penyakit infeksi, penyakit auto imun atau faktor penentu faktor *rheumatoid* (Indriani dan Dharmayanti, 2013).

KESIMPULAN

Uji imunogenisitas dengan menggunakan ELISA menunjukkan bahwa penggunaan *whole* virus IB menghasilkan titer yang lebih tinggi dibandingkan dengan antigen protein S pada kedua strain baik lokal I-147 maupun Massachusetts.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Peternakan Ayam di Jawa Timur dan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

DAFTAR PUSTAKA

- Bahri, S., Masbulan, E., & Kusumaningsih, A. (2005). Proses Praproduksi sebagai Faktor Penting dalam Menghasilkan Produk Ternak yang Aman untuk Manusia. Hal: 18.
- Cavanagh, D., Davis, P. J., Cook, J. K., Li, D., Kant, A., & Koch. (1992). Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases*, 21, 33-43.
- Cavanagh, D., & Naqi S. (2003). Infectious Bronchitis. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson
- JR, et al., eds. Diseases of Poultry. 11th ed. Ames, IA: Iowa State University Press. Pp: 101-119.
- Cook, J. K. A., Jackwood, M., & Jones, R. C. (2012). The Long View: 40 Years of Infectious Research. *Avian Pathology*, 41, 239-50
- De Groot, R. (2012). Family Coronaviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), Virus Taxonomy, the 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San, Diego. Pp: 806-828.
- Dharmayanti, N. L. P. I., Indriani, R., & Darminto. (2005). Hubungan Kekerabatan Virus Infectious Bronchitis Isolat Lapang Indonesia. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*, 10(1), 15-23.
- Indriani, R., & Darminto. (2000). Variasi Serotipe Isolat-Isolat Virus *Infectiuos Bronchitis* yang Berasal dari Beberapa Daerah di Pulau Jawa. *Jurnal Ilmu Ternak Veteriner*, 5(4), 234-240.
- Indriani, R., & Dharmayanti, N. L. P. (2013). Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of Infectious Bronchitis Antibody in Chicken Using Local Isolate Virus. *JB*, 9(2).
- Rantam, F. A. (2003). Metode Immunologi. Airlangga University Press. Surabaya. Hal: 79-81.
- Tabbu, C. R. (2000). Penyakit Ayam dan Penangulungannya. Penyakit Bakterial, Mikal dan Viral. Volume 1. Penerbit Kanisus, Yogyakarta. Hal: 32.
