

Perbandingan Antigenisitas Virus *Infectious Bronchitis* Strain Lokal dan Massachusetts dengan *Indirect ELISA*

Comparison of Antigenicity Between Local and Massachusetts Strains of Infectious Bronchitis Virus using Indirect ELISA Test

Jola Rahmahani^{1*}, Daniswara Irwanza Akbar², Suwarno¹

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

*Corresponding author: jola_rahmahani@yahoo.co.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan antigenisitas antara antigen *whole* virus dan antigen protein S dari strain local I-147 dengan strain Massachusetts virus *Infectious bronchitis* (IB) menggunakan uji *indirect ELISA*. Pada penelitian ini digunakan 10 serum positif virus IB yang didapatkan dari hasil vaksinasi ayam dengan vaksin IB aktif dan inaktif. Kesepuluh serum positif direaksikan dengan antigen yang dibagi menjadi empat kelompok yaitu: P1) antigen protein S (*spike glycoprotein*) dari strain local virus IB; P2) antigen protein S (*spike glycoprotein*) dari strain Massachusetts virus IB; P3) antigen *whole* virus dari strain local virus IB; P4) antigen *whole* virus dari strain Massachusetts virus IB. 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%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antigenisitas ($p < 0,05$) antara antigen *whole* virus dan antigen protein S pada kedua strain virus IB. Nilai OD antigen *whole* virus pada kedua strain memiliki perbedaan yang nyata dengan nilai OD antigen protein S pada kedua strain. Secara spesifik antigen *whole* virus dari strain Massachusetts memiliki nilai OD tertinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya.

Kata kunci: antigenisitas, *Infectious bronchitis*, strain local I-147, strain Massachusetts

Abstract

The aim of this study was to compare the antigenicity between the whole virus and protein S of both local strain I-147 and Massachusetts strain of *Infectious bronchitis* virus with indirect ELISA. We used 10 positive serums from post vaccinated chickens for further reaction with four groups of antigens in this study that are: P1) S protein (*spike glycoprotein*) antigen of local strain IB virus; P2) S protein (*spike glycoprotein*) antigen of Massachusetts strain IB virus; P3) whole virus antigen of local strain IB virus; P4) whole virus antigen of Massachusetts strain IB 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%. The results show that there are differences between the antigenicity of the whole virus and S protein in both local strain and Massachusetts strain of IB virus. The whole virus antigen of both strains has a significant difference ($p < 0.05$) with the S protein antigen in both strains. Specifically, the whole virus antigen of Massachusetts strain has the highest OD among the other groups.

Keywords: antigenicity, *Infectious bronchitis*, local strain I-147, Massachusetts strain

Received: 26 Desember 2021

Revised: 29 Februari 2022

Accepted: 13 April 2022

PENDAHULUAN

Kebutuhan protein hewani di Indonesia saat ini sangat tinggi, seiring dengan meningkatnya jumlah penduduk serta kesadaran masyarakat bahwa protein hewani diperlukan dalam

memenuhi kebutuhan gizi (Bahri dkk., 2005). Unggas merupakan salah satu sumber protein hewani baik berupa telur maupun daging untuk menunjang kebutuhan protein masyarakat Indonesia. Peternakan unggas, terutama ayam sangat berperan dan perlu ditingkatkan

kinerjanya, agar berproduksi secara optimal. Salah satu faktor yang perlu mendapat perhatian adalah kesehatan ternak, karena produksi yang optimal hanya akan dapat dicapai apabila keadaan ternak sehat. Namun demikian, untuk mencapai tujuan tersebut tidaklah mudah, karena masih terdapat kendala berupa penyakit, di antaranya adalah penyakit yang disebabkan oleh virus seperti penyakit *Infectious Bronchitis* (IB) (Indriani dan Darminto, 2000a).

Penyakit IB menyebabkan kerugian ekonomi yang signifikan yaitu menyebabkan gangguan saluran pernafasan atas pada ayam muda dan ayam petelur fase produksi. Gangguan saluran pernafasan atas pada ayam petelur fase produksi menyebabkan turunnya produksi ayam petelur dan kualitas dari cangkang telur. Pada beberapa strain virus juga dapat mengakibatkan kerusakan ginjal dan kematian (Cavanagh dan Naqi, 2003). Virus IB termasuk genus *coronavirus* famili *Coronaviridae* (De Groot, 2012). IBV memiliki genom virus RNA *single-stranded* yang positif (27,6 kb) yang mengkodekan empat protein struktural: *spike* glikoprotein (S), matriks (M), protein amplop dan protein nukleokapsid (N) (Indriani dan Darminto, 2000a).

Spike glikoprotein terletak pada permukaan virion dan terdapat dalam dua subunit, yaitu S1 dan S2. Protein S1 berbentuk bulat pada bagian luar peplomer, mempunyai peran dalam induksi respon antibodi humoral dan menetralkan virus IB, sementara protein S2 berbentuk tangkai dan berlabuh pada membran virus sebagai pembawa epitop-epitop reaksi silang antibodi diantara serotipe virus IB (Indriani dan Dharmayanti, 2013). Protein S1 juga merupakan bagian dari virus IB yang menentukan strain. Strain baru virus IB terbentuk karena perubahan komposisi asam amino pada protein *spike* namun sebagian besar genom virus tidak berubah (Cavanagh and Gelb, 2008). Protein S1, S2, M, dan N merupakan protein yang dapat menimbulkan respon antibodi pada tubuh ayam yang terinfeksi virus IB (Indriani dan Darminto 2000a).

Kejadian IB pertama kali di Indonesia pada tahun 1977. Frekuensi kejadian IB di Indonesia lebih sering terjadi pada *layer* dibanding *broiler*. IBV telah menyebar di Pulau Jawa dengan tingkat

prevalensi sekitar 40-60% (Darminto, 1995). Pencegahan penyakit IB dalam peternakan ayam dengan melakukan program vaksinasi IB untuk mengurangi penurunan produksi. Vaksin virus *infectios bronchitis* terdiri dari 2 macam yakni, vaksin aktif dan in aktif. (Cavanagh dan Naqi, 2003; Cook *et al.*, 2012).

Vaksinasi IB secara alami akan mengakibatkan respon tanggap kebal terhadap serangan strain virus IB yang bersifat homologus, akan tetapi ketahanan terhadap strain virus IB yang bersifat heterologus sangat bervariasi (Indriani dan Darminto, 2000b). Vaksin IB umumnya mengandung virus IB strain Massachusetts (Mass) dan beberapa di antaranya mengandung strain Connecticut (Conn) (Darminto, 1992). Strain Massachusetts memiliki kemampuan melindungi strain IB yang berbeda secara antigenik (Tabbu, 2000). Strain Massachusetts kurang cukup memiliki proteksi silang yang maksimal melawan virus IB galur lapangan (Darminto, 1999).

Berdasarkan latarbelakang tersebut penelitian ini dimaksudkan untuk melihat perbedaan antigenisitas protein S dan *whole virus* dari virus IB strain lokal I-147 dengan strain Massachusetts menggunakan teknik *Indirect ELISA*.

METODE PENELITIAN

Antibodi Terhadap Virus IB

10 ekor ayam petelur divaksin menggunakan vaksin aktif dan inaktif produksi PT. Sanbe yang mengandung virus IB strain I-269. Pemeliharaan ayam dilaksanakan di peternakan ayam petelur dan pengujian anibodi dilaksanakan di Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

Antigen Sampel

Penelitian ini menggunakan 4 jenis antigen, yaitu: (1) Antigen Protein S (*Spike Glycoprotein*) virus IB strain lokal (I-147), (2) Antigen *whole virus* IB strain lokal (I-147), (3) Antigen Protein S (*Spike Glycoprotein*) virus IB strain Massachusetts, dan (4) antigen *whole virus* IB strain Massachusetts.

Kelompok Perlakuan

Perlakuan menggunakan uji *indirect* ELISA yang mereaksikan 10 sampel serum darah ayam yang telah divaksinasi oleh vaksin aktif dan inaktif virus IB yang direaksikan dengan antigen *whole virus* dan protein S virus IB strain lokal (I-147) dan strain Massachusetts pada masing-masing perlakuan. Pada setiap perlakuan terdapat satu kontrol positif dan kontrol negatif. Perlakuan yang diberikan adalah sebagai berikut: (P1) Kelompok serum ayam yang direaksikan dengan antigen protein S (*Spike Glycoprotein*) virus IB strain lokal (I-147), (P2) Kelompok serum ayam yang direaksikan dengan antigen protein S (*Spike Glycoprotein*) virus IB strain Massachusetts, (P3) Kelompok serum ayam yang direaksikan dengan antigen *whole virus* IB strain lokal (I-147), (P4) Kelompok serum ayam yang direaksikan dengan antigen *whole virus* IB strain Massachusetts.

Uji *Indirect* ELISA

Pemeriksaan antigenisitas dilakukan dengan mengujikan 4 sampel antigen yang direaksikan dengan 10 antibodi positif IB. Prosedur *indirect* ELISA diawali dengan *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 kurang lebih 18 jam. Mikroplate dicuci dengan *washing buffer* (NaCl fisiologis dan triton 0,5 ml) 200 µl/sumuran sebanyak 3 x 1 menit. Mikroplate kemudian di blok dengan *milk blocking* 4% sebanyak 100 µl/ sumuran dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 jam. Selanjutnya mikroplate dicuci dengan *washing buffer* (NaCl fisiologis dan triton 0,5 ml) 200 µl/sumuran sebanyak 3 x 1 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* (NaCl fisiologis dan triton 0,5 ml) 200 µl/sumuran sebanyak 3 x 1 menit kemudian diikuti dengan penambahan konjugat (*Anti Chicken Ig G* yang dilabel dengan enzim *alkalin fosfatase*) yang diencerkan dengan *blocking buffer* dengan

pengenceran 1: 10000 sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasi selama satu jam pada suhu 37° C. Berikutnya mikroplate dicuci kembali dengan *washing buffer* (NaCl fisiologis dan triton 0,5 ml) 200 µl/sumuran sebanyak 3 x 1 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. Nilai *Optical Density* (OD) diamati sebagai hasil pada penelitian ini.

Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh berupa nilai OD yang dianalisis dengan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan uji *Duncan Multiple Range Test* 5% yang membandingkan nilai OD hasil pengujian antibodi ayam terhadap virus IB strain Massachusetts dan lokal I-147. *Software* yang digunakan adalah *Statistic Product and Service Solution* 21 (SPSS 21).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil rerata uji ELISA pada masing-masing perlakuan disajikan pada Tabel 1. Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa Kelompok P4 yaitu kelompok yang mereaksikan serum yang mengandung antibodi IB dengan *whole virus* Massachusetts memiliki nilai rata-rata OD tertinggi yang diikuti selanjutnya secara berurutan yaitu Kelompok P3 dengan mereaksikan *whole virus* strain lokal (I-147), Kelompok P2 protein S strain Massachusetts dan Kelompok P1 protein S strain lokal (I-147).

Perlakuan dengan *whole virus* virus IB strain Massachusetts (P4) memiliki perbedaan yang nyata dengan perlakuan dengan protein S virus IB strain Massachusetts (P2) dan perlakuan dengan *whole virus* virus IB strain lokal I-147 (P3) yang memiliki perbedaan yang nyata dengan perlakuan dengan protein S virus IB strain lokal I-147 (P1) ($p < 0,05$). Pendapat yang sama disampaikan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan Indriani dan Darminto (2000) yang menyatakan bahwa

tidak hanya antigen protein S saja yang bereaksi dengan antibodi pada tubuh ayam yang terinfeksi virus IB tetapi juga antigen protein S1, S2, M, dan N dapat bereaksi dengan antibodi pada tubuh ayam yang terpapar virus IB (Indriani dan Darminto, 2000).

Tabel 1. Rata-rata dan simpangan baku nilai OD

Perlakuan	Rata-rata ± Simpangan Baku
P1	0,15930 ^a ± 0,02
P2	0,16250 ^a ± 0,02
P3	0,21300 ^b ± 0,04
P4	0,24760 ^b ± 0,06

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

Perbedaan nilai OD pada perlakuan dengan *whole virus* dan protein S virus IB strain lokal I-147 dan strain Massachusetts kemungkinan terjadi karena antibodi spesifik pada serum pasca vaksinasi cocok dengan epitop antigen *whole virus* dibandingkan protein S virus IB strain lokal I-147 dan strain Massachusetts. Ikatan antara antibodi spesifik dan antigen membentuk sel-sel imun memori. Sel-sel memori akan menghasilkan antibodi yang cepat dengan titer tinggi pada paparan selanjutnya yang menyebabkan perbedaan nilai OD pada perlakuan dengan *whole virus* dan protein S virus IB strain lokal I-147 dan strain Massachusetts (Tizard, 2009).

Perlakuan dengan *whole virus* virus IB strain Massachusetts (P4) tidak memiliki perbedaan yang nyata dengan perlakuan dengan *whole virus* virus IB strain lokal I-147 (P3). Hasil yang sama juga didapat pada perlakuan dengan Protein S virus IB strain lokal I-147 (P1) yang juga tidak memiliki perbedaan yang nyata dengan protein S virus IB strain Massachusetts (P2) ($p < 0,05$). Hal ini sependapat dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan Dharmayanti dkk., (2005) yang menyatakan bahwa hal tersebut disebabkan oleh persamaan tingkat homologi kedekatan genetik.

Respon tanggap kebal dapat dilakukan dengan pemberian antigen dari agen suatu penyakit tertentu atau yang disebut vaksinasi. Antigen adalah senyawa yang mampu bereaksi terhadap antibodi atau produk respon imun.

Antigenisitas adalah sifat antigen untuk mengikat secara spesifik dengan produk-produk respon imun. Antigen yang dapat menginduksi terbentuknya respons imun disebut sebagai imunogen atau antigen imunogenik (Rantam, 2003). Antigen yang masuk pada tubuh akan ditangkap oleh makrofag yang berfungsi sebagai *antigen presenting cell* (APC). Sebagian kecil antigen akan diekspresikan pada permukaan sel melalui MHC dan mengaktifkan sel T helper. Sel T helper yang teraktivasi akan mengaktifkan T sitotoksik dan limfosit B, selanjutnya limfosit B yang teraktivasi akan berdeferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan antibodi yang spesifik. Semua sel limfosit baik T maupun B yang teraktivasi akan berproliferasi menjadi salah satunya sel memori dan menghasilkan sitokin (Rahmawati dkk., 2018). Sitokin yang dihasilkan akan memberikan perlindungan dan memungkinkan sel memori untuk hidup lebih lama, Sel memori bersifat memberikan respon yang cepat dan segera pada paparan berikutnya dengan antigen yang sama sehingga antibodi yang dihasilkan bersifat tinggi dan cepat (Tizard, 2009).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai OD pada perlakuan dengan *whole virus* Massachusetts lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya dapat dilihat pada Tabel 1. Nilai OD lebih tinggi pada *whole virus* Massachusetts disebabkan adanya ikatan antigen dan antibodi yang paling kuat dan dapat disimpulkan bahwa perlakuan dengan *whole virus* Massachusetts memiliki sifat antigenik paling tinggi dibanding perlakuan lainnya. Penyebab hal ini dapat terjadi karena urutan nukleotida pada daerah hipervariabel virus IB (Cavanagh *et al.*, 1992). Perubahan kecil pada epitop S1 kemungkinan akan menghasilkan perubahan dan terbentuknya serotipe baru. Perubahan pada sekuens epitop mengakibatkan perubahan antibodi dalam mengenal virus (Cavanagh dan Naqi, 1997).

KESIMPULAN

Uji antigenisitas dengan menggunakan ELISA menunjukkan bahwa penggunaan antigen

whole virus IB memiliki antigenesitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan antigen protein S pada kedua strain baik local I-147 maupun Massachusetts.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan pada pihak terkait yang telah berkontribusi pada penelitian ini diantaranya 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. Deptan RI. Hal: 4.
- 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., & Gelb, J. (2008). "Infectious Bronchitis," in *Diseases of Poultry*. Wiley-Blackwell, 12th edition. Pp: 117–135.
- 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.
- Cavanagh, D., & Naqi, S. (1997). Infectious bronchitis. In B.W. Calnek (Ed.). *Diseases of Poultry*, 10th ed. Iowa State University, Ames, IA. Pp: 511-526.
- Cook, J. K. A., Jackwood, M., & Jones, R. C. (2012). The Long View: 40 Years of Infectious Research. *Avian Pathology*, 41, 239-50
- Darminto. (1992). Serotyping of Infectious Bronchitis Viral Isolates. *Penyakit Hewan*, 24(44), 76-81.
- Darminto. (1995). Diagnosis Epidemiologi and Control of Two Mayor Avian Viral Respiratory Disease in Indonesia: Infectious Bronchitis and Newcastle Diseases. Thesis (Ph.D). JCU Univ.
- 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 Kekebalan Virus Infectious Bronchitis Isolat Lapang Indonesia. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*, 10(1), 15-23.
- Indriani, R., & Darminto. (2000a). Penyakit *Infectious Bronchitis* pada Ayam dan Cara Mengendalikannya. *Wartazoa*, 5(2), 65-72.
- Indriani, R., & Darminto. (2000b). Variasi Serotipe Isolat-Isolat Virus *Infectious 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. *JBV*, 9(2).
- Rahmawati, A., Wijaya, N. S., Purnama, M. T. E., Rahmahani, J., Yudhana, A., & Yunita, M. N. (2018). Pengaruh Ekstrak Kulit dan Jus Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*) Terhadap Titer Antibodi Ayam Kampung Super yang Divaksin Newcastle Disease. *Jurnal Medik Veteriner*, 1(3), 68-73.

Rantam, F. A. (2003). Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya. Hal: 79-81.

Tabbu, C. R. (2000). Penyakit Ayam dan Penangulangannya. Penyakit Bakterial,

Mikal dan Viral. Volume 1. Penerbit Kanisus, Yogyakarta. Hal: 32.

Tizard, I. R. (2009). Veterinary Immunology: An Introduction (Eight Edition). Departement of Veterinary Pathobiology. Texas. Viruses: a WHO Memorandum. Pp: 52.
