

PAMERAN**SELESAI**LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2002**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ANTIBODI POLIKLONAL
SEBAGAI BAHAN PENDETEKSI EKSPRESI PROTEIN S DARI
VIRUS INFECTIOUS BRONCHITIS ISOLASI LOKAL**

Peneliti:

CHAIRUL A. NIDOM, MS., Drh
MUFASIRIN, MSI., Drh.
KADEK RACHMAWATI, M.Kes., Drh.**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia

DIP Nomor : 003/XXIII/1/--/2002 Tanggal 1 Januari 2002

Kontrak Nomor : 023/LIT/BPPK-SDM/IV/2002

Ditjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 50

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

September, 2002

3000210033141

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2002

KKC

KK

636.089 692 5

112

P

INFECTIOUS BRONCHITIS IN POULTRY

**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ANTIBODI POLIKLONAL
SEBAGAI BAHAN PENDETEKSI EKSPRESI PROTEIN S DARI
VIRUS INFECTIOUS BRONCHITIS ISOLASI LOKAL**

Peneliti:

CHAIRUL A. NIDOM, MS., Drh
MUFASIRIN, MSI., Drh.
KADEK RACHMAWATI, M.Kes., Drh.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

3000210033141

SELESAI

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia
DIP Nomor : 003/XXIII/1/--/2002 Tanggal 1 Januari 2002
Kontrak Nomor : 023/LIT/BPPK-SDM/IV/2002
Ditjen Dikti, Depdiknas
- Nomor Urut : 50

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

September, 2002



UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | 10. Puslit Kesehatan Reproduksi |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Puslit Olah Raga | |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066
E-mail : lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA**

- 1a. Judul Penelitian : **PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ANTIBODI POLIKLONAL SEBAGAI BAHAN PENDETEKSI EKSPRESI PROTEIN S DARI VIRUS *INFECTIOUS BRONCHITIS* ISOLASI LOKAL**
- b. Macam Penelitian : I / II / III *
2. Kepala Proyek Penelitian
- a. Nama Lengkap dan Gelar : Chairul A. Nidom, MS., drh.
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. Pangkat/Golongan dan NIP : Penata / IIIc / 131 406 056
- d. Jabatan Fungsional : Lektor
- e. Fakultas/Puslit/jurusan : Kedokteran Hewan / Biokimia
- f. Univ./Ins./Akademi/ST : Universitas Airlangga
- g. Bidang Ilmu yang diteliti : Ilmu-ilmu Pertanian
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Bersama FKH – Unair
5. Bila Penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama kelembagaan sebutkan:
- a. Nama Instansi : -
- b. Alamat : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 6 bulan
7. Biaya yang diperlukan : Rp 6.000.000,-
(Enam Juta Rupiah)

Surabaya, 20 Desember 2002

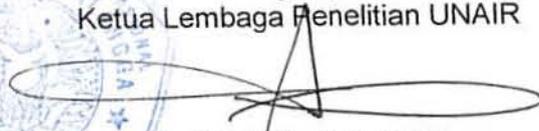
Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Ketua Peneliti,


Dr. Ismudiono, MS., drh.
NIP. 130687297


Chairul A. Nidom, MS., drh.
NIP. 131406056

Menyetujui :
Ketua Lembaga Penelitian UNAIR


Prof. Dr. H. Sarmanu, MS.
NIP. 130701125

RINGKASAN

PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ANTIBODI POLIKLONAL SEBAGAI BAHAN PENDETEKSI EKSPRESI PROTEIN S DARI VIRUS *INFECTIOUS BRONCHITIS* ISOLASI LOKAL (Chairul A. Nidom, Mufasirin, Kadek Rahmawati, 2002, 22 halaman)

Penyakit *Infectious Bronchitis* merupakan penyakit yang sangat menular dapat dapat menimbulkan kerugian besar bagi peternakan ayam petelur maupun pedaging. Penyakit ini menimbulkan gangguan pernafasan dan gangguan ginjal. Penyakit ini disebabkan oleh virus *Infectious Bronchitis*, yaitu virus RNA yang mempunyai tiga macam regio gen yaitu regio gen M, E dan S. Pencegahan penyakit *Infectious Bronchitis* ini dengan vaksinasi baik vaksin inaktif maupun vaksin aktif. Penggunaan vaksin aktif, secara tidak langsung dapat menimbulkan varian baru di lapangan. Hal ini disebabkan oleh adanya mutasi asam amino dari protein gen S (spike). Akibatnya vaksinasi berikutnya menjadi tidak efektif lagi. Untuk itu perlu dilakukan penelitian virus *Infectious Bronchitis* di lapangan dengan pendekatan biologi molekuler, khususnya mutasi asam amino pada gen S. Salah satu bahan yang diperlukan untuk penelitian molekuler virus *Infectious Bronchitis* tersebut adalah antibodi poliklonal, baik dari virus *Infectious Bronchitis* isolasi Lokal (belum diketahui serotipenya) dan virus *Infectious Bronchitis* yang sudah diidentifikasi serotipenya (stok laboratorium).

Sebanyak empat ekor kelinci disuntik dengan protein Virus *Infectious Bronchitis*, setelah dua minggu dilakukan penyuntikan booster yang dicampur dengan ajuvan komplit. Selang dua minggu berikutnya dilakukan penyuntikan booster dengan menggunakan ajuvan tidak komplit. Sedangkan penyuntikan booster ke tiga dilakukan dengan cara penyuntikan selama lima hari berturut-turut. Kemudian diuji dengan metode ELISA dan setelah itu dilakukan pemanenan antibodi poliklonal.



Hasil penelitian yang diperoleh, bahwa titer tertinggi terjadi pada booster ke dua dan ketiga. Hasil yang diperoleh ini sama tingginya dengan titer yang berasal dari virus IB stok laboratorium yang sudah diketahui strainnya. Setelah itu dilakukan pemanenan dengan cara mengambil darah kelinci secara maksimal untuk memperoleh serum sebanyak-banyaknya. Serum yang diperoleh dalam penelitian ini sebanyak 35 ml.

Setelah diperolehnya serum darah kelinci yang berisi antibodi poliklonal terhadap virus IB, dapat segera dilanjutkan untuk mengkaji secara biologi molekuler dari virus IB lokal yang menginfeksi ayam petelur dan pedaging. Dengan harapan ditemukan strain spesifik Indonesia sehingga memudahkan dalam pencegahan penyakit IB melalui vaksinasi.

(L.P. Universitas Airlangga. Kontrak Nomor 023/LT/BPPK-SDM/IV/2002).

SUMMARY

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF POLYCLONAL ANTIBODY AS A S PROTEIN EXPRESSION DETECTION OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS LOCAL ISOLATE .

(Chairul A. Nidom, Mufasirin, Kadek Rahmawati, 2002, 22 pages)

Infectious Bronchitis is a highly contagious respiratory disease occurring in chickens of all ages. It affects the respiratory, renal (kidney) and reproductive systems causing severe economic loss in the broiler and in the egg layer industry. The disease is caused by Infectious Bronchitis Virus, a single stranded RNA virus. Three virus specific gene that protein expression, have been identified; M, E and S gene that express membrane or matrix (M) glycoprotein, Envelope (E) protein and spike (S) protein. Prevention of Infectious Bronchitis is vaccinated both inactivated vaccines and/ or activated vaccines to provide vaccination. However, activated vaccines could be a new variant in the area, because could a mutation of amino acid on S protein. To determine amino acid of S gene mutation is needed polyclonal antibody from Infectious Bronchitis Virus Local isolate and Laboratory isolate.

Four samples of rabbit were injected with Infectious Bronchitis Virus protein. The samples were injected again after two weeks with Completed Adjuvant and two week more were injected with Uncompleted Adjuvant. Finally, the sample were injected consecutive five days. The polyclonal antibody were confirmed by ELISA.

The result of study showed that highest titer on 2nd and 3rd booster. The local isolate titer as high as laboratory isolate. From this study, we have found 35 ml serum that content polyclonal antibody of Infectious Bronchitis Virus.

(L.P. Universitas Airlangga. Kontrak Nomor : 023/LT/BPPK-SDM/IV/2002)

KATA PENGANTAR

Penyakit *Infectious Bronchitis* sangat merugikan peternakan ayam petelur maupun pedaging. Penyakit ini disebabkan oleh Virus IB yang merupakan famili Coronaviridae. Merupakan masalah kesehatan unggas diseluruh dunia.

Selama ini yang dilakukan untuk mengatasi penyakit ini adalah dengan pemberian vaksin, dan penata-laksanaan peternakan. Namun vaksinasi masih meninggalkan masalah yang belum teratasi. Salah satu penyebabnya adanya sifat virus ini yang sering merubah struktur antigennya. Untuk itu sangat menarik diteliti pada protein lainnya dari Virus ini, dari pendekatan biologi molekuler. Untuk itu diperlukan bahan-bahan salah satunya antibodi poliklonal.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pimpinan Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan/DP3M Ditjen Dikti Depdiknas, Rektor Universitas Airlangga, Dekan Fakultas Kedokteran Hewan dan Ketua Lembaga Penelitian-Unair.

Akhirnya, semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Surabaya, Desember 2002

Penulis.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR / ILUSTRASI	vii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	13
BAB IV. METODE PENELITIAN	14
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	20
DAFTAR PUSTAKA	21

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1. Hasil Uji ELISA Antibodi Poliklonal Virus <i>Infectious Bronchitis</i>	17
---	----

DAFTAR GAMBAR / ILUSTRASI

	Halaman
Gambar 2.1. Struktur Protein Virus <i>Infectious Bronchitis</i>	7
Gambar 5.2. Corona Virus <i>Infectious Bronchitis</i>	8

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Infectious Bronchitis merupakan penyakit yang banyak terjadi pada ayam baik ayam petelur maupun ayam pedaging pada semua umur. Penyakit ini sangat merugikan secara ekonomi, karena dapat menimbulkan gangguan utama pada saluran pernafasan. Sifatnya akut dan kronis serta sangat menular pada ayam. Diawali penemuannya pada tahun 1931 di Amerika Serikat, saat ini sudah menyebar hampir diseluruh dunia, serta dapat menyerang ayam dalam segala umur dan segala ras (Csermelyi *et al.* 1988).

Di samping mengganggu pernafasan, penyakit ini dapat menimbulkan nefritis dan urolitiasis. Angka kematiannya sangat tinggi (King *et al.* 1991).

Penyakit *Infectious Bronchitis* ini disebabkan oleh virus yang dikenal dengan nama *Avian Infectious Bronchitis Virus* (IBV). Virus ini merupakan virus RNA berantai tunggal positif yang merupakan anggota genus *Coronavirus* dan anggota famili *Coronaviridae* (Corse *et al.* 2000).

Pencegahan yang selama ini dilakukan dengan cara memberikan vaksinasi. Vaksin yang diberikan dapat berupa vaksin inaktif atau vaksin hidup. Walaupun demikian masih belum dapat menuntaskan infeksi penyakit *Infectious Bronchitis* ini. Banyaknya serotipe dari virus *Infectious Bronchitis* ini dan beberapa serotipe tidak dapat dikendalikan oleh vaksin dari serotipe-serotipe yang heterogen (Song *et al.*, 1998; Lambrechts *et al.* 1993).



Pengkajian secara molekuler terhadap virus ini dapat lebih diharapkan hasilnya, karena banyaknya serotipe yang timbul dapat dilihat secara mendalam dari peristiwa molekuler dari virus ini. Sebagaimana telah diketahui bahwa virus *Infectious Bronchitis* ini mempunyai tiga macam protein membran yaitu protein S (spike) merupakan glikoprotein yang berfungsi mengenali dan melakukan fusi dengan sel target; Protein M (matrix) merupakan glikoprotein dengan tiga macam domain transmembran; dan terakhir adalah protein E (envelope) ukurannya kecil sehingga tidak mudah untuk dikarakterisasi. Namun demikian protein E ini selalu dihubungkan dengan envelope virion (Corse & Machamer, 2000).

Timbulnya infeksi IB ini setelah vaksinasi (*post vaccination outbreaks*) banyak disebabkan oleh adanya perbedaan serotipe dan akibatnya terjadi pada perbedaan antigenisitasnya serta adanya varian-varian baru yang timbul dari lapangan. Timbulnya varian genetik disebabkan oleh adanya mutasi beberapa asam amino dalam glikoprotein S virus IB ini (Song *et al.*1998; Cavanagh *et al.*1992; Kant *et al.*1992). Jadi penggunaan vaksin hidup yang sudah tersebar dimana-mana merupakan salah satu penyebab penting dalam meningkatkan dan menyebarkan beberapa varian genetik yang baru tersebut. (Wang *et al.*1993). Untuk menghindari timbulnya varian-varian baru, beberapa negara mengeluarkan kebijakan bahwa virus yang digunakan untuk vaksin hidup hanya virus dengan serotipe tertentu, misalnya hanya serotipe Massachusetts (Picault *et al.*1986).

Di Indonesia belum ada kebijakan yang menyeragamkan penggunaan serotipe virus yang digunakan untuk vaksin hidup. Keadaan ini memungkinkan

timbulnya banyak varian-varian baru virus *Infectious Bronchitis* ini. Akibatnya dapat menyebabkan ketidak-efektifan penggunaan vaksin hidup di lapangan.

✓ Memperhatikan hal-hal di atas, maka perlu dikaji lebih mendalam lagi virus *Infectious Bronchitis* dengan menggunakan pendekatan biologi molekuler. Khususnya dalam pengkajian domain gen S virus ini dari berbagai tipe dan sub tipe yang ditemukan di Indonesia. Dengan demikian dapat diketahui secara pasti karakter protein dari virus *Infectious Bronchitis* yang ada di lapangan untuk memudahkan dalam melaksanakan pencegahan melalui vaksinasi.

✓ Salah satu bahan yang diperlukan untuk penelitian di atas adalah adanya antibodi yang dapat digunakan untuk pendeteksi (*screening*) protein yang diekspresikan oleh gen S virus *Infectious Bronchitis* tersebut. Antibodi poliklonal dapat digunakan sebagai pendeteksi awal dari suatu protein dari ekspresi suatu gen dengan menggunakan teknik *Western Blotting*. (Liu et al 1994).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan antibodi monoklonal dari antigen virus *Infectious Bronchitis* yang akan dijadikan salah satu bahan penelitian berikutnya untuk mendeteksi ekspresi protein gen S dari Virus *Infectious Bronchitis*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang produksi dan karakterisasi antibodi poliklonal untuk mendeteksi protein virus *Infectious Bronchitis* yang diisolasi dari lapangan. Penelitian ini diharapkan merupakan penelitian awal dari serangkaian penelitian molekuler tentang virus *Infectious Bronchitis* di Indonesia.



1.2 Perumusan Masalah

Penyakit *Infectious Bronchitis* merupakan penyakit yang sangat menular dapat dapat menimbulkan kerugian besar bagi peternakan ayam petelur maupun pedaging. Penyakit menimbulkan gangguan pernafasan dan gangguan ginjal. Penyakit ini disebabkan oleh virus *Infectious Bronchitis*, merupakan virus RNA yang mempunyai tiga macam regio gen yaitu regio gen M, E dan S. Pencegahan penyakit *Infectious Bronchitis* ini dengan vaksinasi dengan vaksin inaktif dan vaksin aktif. Penggunaan vaksin aktif, secara tidak langsung dapat menimbulkan varian baru di lapangan. Hal ini disebabkan oleh adanya mutasi asam amino dari protein gen S (spike). Akibatnya vaksinasi berikutnya menjadi tidak efektif lagi. Untuk itu perlu dilakukan penelitian virus *Infectious Bronchitis* di lapangan dengan pendekatan biologi molekuler, khususnya mutasi asam amino pada gen S. Salah satu bahan yang diperlukan untuk penelitian molekuler virus *Infectious Bronchitis* ini adalah antibodi poliklonal, baik dari virus *Infectious Bronchitis* isolasi Lokal (belum diketahui serotipenya) dan virus *Infectious Bronchitis* yang sudah diidentifikasi serotipenya (stok laboratorium). Dari uraian tersebut dapat ditarik permasalahan :

1. Apakah antigen virus *Infectious Bronchitis* isolasi lokal dapat memproduksi poliklonal antibodi.?
2. Apakah ada perbedaan antibodi poliklonal dari antigen virus *Infectious Bronchitis* isolasi lokal dengan antigen virus *Infectious Bronchitis* stok laboratorium ?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit *Infectious Bronchitis* Pada Ayam

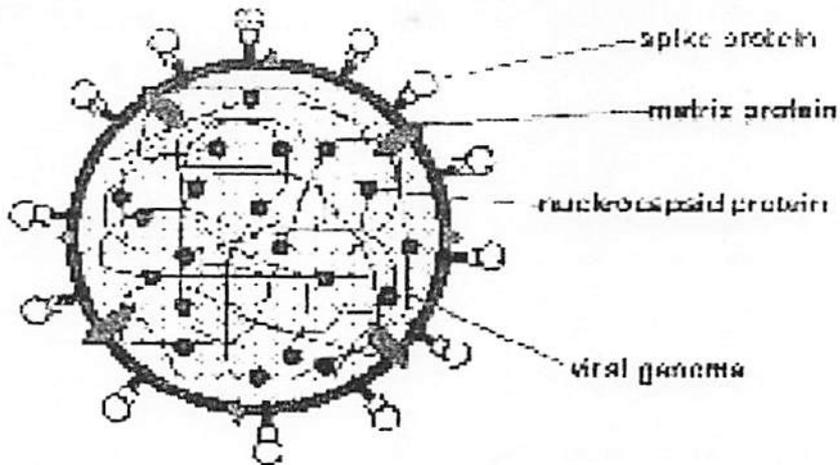
Penyakit *Infectious Bronchitis* merupakan penyakit pada ayam baik ayam petelur maupun pedaging apad semua umur. Kejadian penyakit ini sudah menyebar di seluruh dunia. Penyakit ini sifatnya akut dan sangat menular yang ditandai dengan terganggunya pernafasan. Tanda lain yang menyertai yaitu terjadinya infeksi pada ginjal (nefritis). Infeksi ini mengakibatkan performans ayam tidak baik, produksi telur menurun dan kualitas telur, khususnya kerabang, jelek. Akibat yang terjadi bisa lebih parah jika disertai infeksi kuman patogen lainnya pada saluran pernafasan (King *et al.* 1991).

2.2 Molekular Virus *Infectious Bronchitis*

Penyakit *Infectious Bronchitis* ini disebabkan oleh Virus *Infectious Bronchitis* yang dapat diisolasi pada mukosa trakhea selama periode akut. Virus ini juga dapat diisolasi dari feses atau tonsil caecum. Virus ini termasuk pada genus *coronaviridae*.

Virus Infectious Bronchitis, merupakan virus RNA utas tunggal, mempunyai sebuah envelope. Ukuran genomnya diperkirakan sebesar 27,6 kilobase. Virus ini telah diidentifikasi memiliki tiga macam protein spesifik yaitu glikoprotein S (spike); Glikoprotein M (membran atau matriks) dan protein N (nukleokapsid).

Gambaran protein tersebut sebagaimana gambar di bawah ini. (Wang *et al.* 1999; Corese *et al.* 2000)



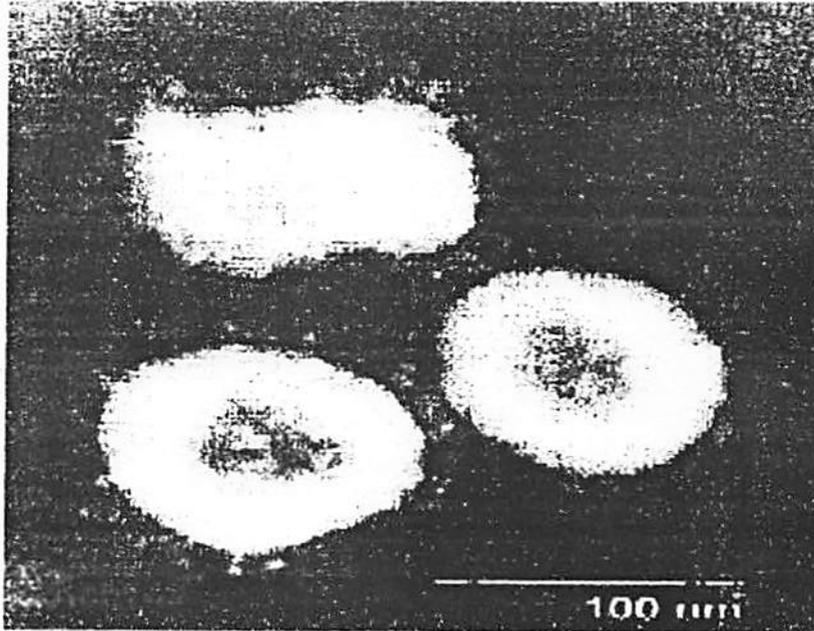
Gambar 1. Struktur Protein Virus *Infectious Bronchitis*

Glikoprotein S memiliki dua macam glikopolipeptida yaitu S1 dan S2. Peplomer ini kalau dilihat menggunakan mikroskop elektron terlihat pada permukaan virus sebagai "corona". Gambar corona virus *Infectious Bronchitis* dapat dilihat di bawah ini.

Proses Haemagglutination inhibition dan kebanyakan neutralisasi antibodi biasanya ditujukan pada protein S1. Suatu urutan asam amino yang spesifik yang biasa disebut dengan epitop, pada glikoprotein ini biasanya digunakan untuk membedakan serotipe (Song *et al.* 1998; lambrechts *et al.* 1993).

Virus *Infectious Bronchitis* ini mempunyai kemampuan untuk melakukan mutasi. Beberapa serotipe telah diidentifikasi yang mempunyai implikasi pada

efikasi dari program vaksinasi. Beberapa serotipe yang selama ini dikenal antara lain Massachusetts, Connecticut dan Arkansas.



Gambar 2. Corona Virus *Infectious Bronchitis*.

2.3 Penyebaran Penyakit

Virus Infectious Bronchitis secara cepat dapat menyebar di antara ayam dalam kandang. Biasanya penyebarannya melalui udara yang disebabkan oleh adanya virus yang jatuh pada saat batuk atau bersin. Sedangkan penyebaran dari kandang ke kandang disebabkan oleh pergerakan orang yang terkontaminasi. Demikian juga peralatan dan kendaraan yang terkontaminasi. *Virus Infectious Bronchitis* tidak disebarkan secara vertikal dan ayam yang pernah terinfeksi dapat bertindak sebagai karier (pembawa).

2.4 Tanda-Tanda Penyakit

Tanda-tanda penyakit meliputi batuk, bersin dan adanya cairan dalam hidung. Juga dapat disertai adanya eksudat pada mata. Masa inkubasi 18 jam sampai 36 jam sangat tergantung pada dosis waktu masuknya virus *Infectious Bronchitis* dan kepekaan ayam terhadap virus *Infectious Bronchitis*. Pada anak ayam biasanya nafasnya terdengar. Beberapa kejadian dapat terlihat mata yang berair serta pembengkakan sinus.

Anak ayam akan depresi, letargik dan biasanya bergerombol dengan lainnya. Konsumsi pakan, air minum dan pertambahan berat menurun. Tetapi bukan hal ini yang menjadi perhatian, tetapi timbulnya infeksi ikutan seperti oleh *E.coli*, di mana dapat menyebabkan meningkatkan timbulnya penyakit CRD (Chronic Respiratory Disease) dan airsacculitis

Pada ayam petelur dewasa, produksi telur menurun mengikuti timbulnya simtom batuk dan ngorok. Seringkali penurunan produksi tanpa diikuti oleh menurunnya kualitas kerabang.

Infeksi oleh virus *Infectious Bronchitis* ini ada tiga bentuk yaitu bentuk pernafasan (Respiratory form), bentuk renal (Renal form) dan bentuk reproduksi (Reproductive form) (Ignjatovic, *et al.* 2000; Csermelyi *et al.* 1998).

2.5 Diagnosis

2.5.1 Uji Serologis

Sebagaimana gambaran umum bahwa ayam akan memproduksi antibodi spesifik jika mengalami infeksi oleh virus *Infectious Bronchitis Infectious Bronchitis*. Antibodi yang diinduksi oleh virus IB ada tiga macam kelas antibodi yang berbeda yaitu IgM, IgG, dan IgA di samping kelas IgG. Titer tertinggi biasanya dicapai pada hari ke tujuh sampai delapan setelah infeksi kemudian menurun secara gradual.

Biasanya antibodi ini periodenya pendek, sehingga memerlukan pengujian yang segera. Sedangkan Ig G dapat diukur dengan menggunakan teknik ELISA paling cepat pada hari ke tujuh setelah infeksi. sebab titer tertinggi terjadi pada hari ke 10 – 14 setelah infeksi.

Untuk keperluan evaluasi lapangan, diperlukan keterangan tambahan tentang waktu vaksinasi dan infeksi ikutan lainnya. Profil serologis harus dievaluasi berdasarkan pada kandang bukan pada individu, sehingga minimum sampel yang diperiksa diperlukan, yaitu minimal 20 ekor. Pengujian serologis ini sangat baik untuk peternakan yang sering terinfeksi oleh virus *Infectious Bronchitis* dengan mengadakan uji serologis secara teratur, misalnya setiap 10 minggu sekali. Biasanya titer akan meningkat secara nyata pada saat terinfeksi dibandingkan setelah vaksinasi (Ignjatovic *et al.*2000;)

2.5.2 Isolasi *Virus Infectious Bronchitis*

Virus Infectious Bronchitis dapat diisolasi secara langsung dari ayam yang sedang sakit. Pengambilan sampel ini harus dilakukan sesegera mungkin pada saat ayam masih menunjukkan tanda-tanda klinis yang jelas. Sampel dapat diambil dari trachea atau jaringan lain seperti paru, ginjal, oviduct dan tonsil caecum.

2.5.3 Serotyping *Virus Infectious Bronchitis*

Virus Infectious Bronchitis di alam mempunyai banyak serotipe. Biasanya di suatu area memiliki lebih dari satu macam serotipe. Serotipe – serotipe ini tidak mempunyai reaksi imunitas silang antar serotipe, sehingga sebetulnya diperlukan vaksin baru untuk digunakan di suatu area. Namun kenyataannya hal tersebut sering tidak terjadi, sehingga diperlukan uji serotyping untuk mengetahui *virus Infectious Bronchitis* yang menginfeksi ayam. Pengujian serotyping ini di antaranya dilakukan dengan cara reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT – PCR). Di samping itu juga dapat digunakan pengujian Neutralisasi dengan menggunakan antisera *virus Infectious Bronchitis* yang spesifik. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) juga dapat digunakan untuk menguji serotipe *Virus Infectious Bronchitis* .(Wang et al.1999).

2.5.4. Identifikasi Genotipe

Untuk mengetahui variasi antigenik secara molekuler dapat dilakukan dengan cara melakukan sekuensing urutan nukleotida dari gen S (spike).

Bahkan dapat dilakukan sekuensing lebih spesifik lagi yaitu pada gen subunit S1, di mana banyak ditemukan epitop yang mengikat antibodi pada saat neutralisasi.

Dengan mempunyai urutan nukleotida dari gen S1 dan ditambah serotyping serta Virus Neutralisasi, dapat digunakan untuk melakukan pemilihan vaksin dengan data urutan nukleotida tersebut (Kingham *et al.*2000; Kant, *et al.* 1992).

2.6 Pencegahan

Pencegahan infeksi virus *Infectious Bronchitis* ini dapat dilakukan dalam dua langkah yaitu pengaturan manajemen pemeliharaan yang baik dan penggunaan program vaksinasi.

Untuk mengefektifkan program vaksinasi ini sebaiknya telah diketahui prevalensi serotipe virus *Infectious Bronchitis* yang menginfeksi di daerah peternakan tersebut. Pada ayam pedaging digunakan vaksin hidup yang dimodifikasi. Sedangkan vaksinasi terhadap ayam petelur biasanya dilakukan berseri, sesuai dengan lamanya waktu pemeliharaan. Pada pembibitan, sebelum ayam menginjak umur bertelur biasanya di vaksin dengan in aktif untuk menstimulasi produksi antibodi, karena vaksin inaktif akan memproduksi lebih tinggi dari pada vaksin hidup. Vaksin hidup yang termodifikasi akan menghasilkan stimulai yang lebih baik sel T dan mendapatkan Ig A yang baik sebagai respon terhadap infeksi mukosa lokal sehingga mempunyai nilai yang lebih dibanding dengan penggunaan vaksin in aktif dalam melakukan pencegahan pada ayam petelur (Ignjatovic *et al.*2000).



BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Untuk mendapatkan antibodi poliklonal dari antigen virus *Infectious Bronchitis* isolasi lapangan yang akan dijadikan salah satu bahan penelitian berikutnya untuk mendeteksi ekspresi protein gen S dari virus *Infectious Bronchitis*.

3.2 Manfaat penelitian

Memberi informasi tentang produksi dan karakterisasi antibodi poliklonal untuk mendeteksi protein virus *Infectious Bronchitis* yang diisolasi dari lapangan (isolat lokal). Hasilnya dapat dibandingkan dengan antibodi poliklonal dari virus *Infectious Bronchitis* yang sudah diketahui serotipenya. Disamping itu antibodi poliklonal yang diperoleh dari penelitian ini akan digunakan pada penelitian berikutnya tentang ekspresi protein S virus *Infectious Bronchitis* ini.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Materi Penelitian

Materi penelitian terdiri dari kelinci dewasa sebanyak empat ekor, sehat dan *specific pathogen free (SPF)*. Antigen yang digunakan adalah virus *Infectious Bronchitis* yang diisolasi dari lapangan (serotipe lokal) dan virus yang telah diidentifikasi serotipenya.

4.2. Immunisasi Antigen pada Kelinci.

Kelinci betina dewasa yang sehat tersebut diinjeksi dengan antigen sebanyak 50-100 ug yang sudah ditambah ajuvant di empat bagian tubuh yang mempunyai kulit longgar. Injeksi dilakukan secara sub kutan atau di bawah kulit yang longgar. Perbandingan pengenceran antara antigen dalam PBS dengan ajuvant komplit adalah 1:1. Injeksi diulang setelah tiga minggu setelah injeksi pertama dengan dosis yang sama tetapi menggunakan ajuvant tidak komplit. Injeksi selanjutnya diulang apabila pada pemeriksaan dengan ELISA belum mencapai tingkat antibodi yang maksimal. Pengulangan injeksi (booster) dilakukan tiap dua minggu setelah injeksi sebelumnya. Untuk meningkatkan respon imun seperti yang diharapkan maka pada booster ke tiga dilakukan pada minggu ke tiga setelah penyuntikan booster ke dua dengan cara menyuntikkan booster melalui intra muskular selama lima hari berturut-turut. Pengambilan darah untuk tujuan pengecekan titer antibodi diambil melalui vena auricularis.

4.2.1 Uji ELISA

Uji ELISA ini menggunakan microplate bentuk U. Setiap lubang (sumuran) diisi dengan antigen dengan menggunakan konsentrasi 10 ug/ml sebanyak 100 ul. Pengenceran antigen dilakukan dengan menggunakan *coating buffer*. Inkubasi dilakukan pada penangas air pada suhu 37° C selama semalam dan dilakukan pencucian. Pencucian ini dilakukan sebanyak tiga kali dengan menggunakan bufer pencucian (*washing buffer*) dan setiap pencucian sebanyak 200 ul untuk tiap lubang.

Kontrol positif digunakan antibodi poliklonal dari *Virus Infectious Bronchitis* strain Massachusset.

Blocking dilakukan dengan menambahkan larutan BSA 1% sebanyak 200 ul tiap lubang dan diinkubasi selama satu jam pada suhu 37° C. Pencucian dilakukan dengan cara seperti cara sebelumnya sebanyak tiga kali. Penambahan antibodi yang akan diuji dilakukan dengan beberapa pengenceran (1x, 10x, 20x, 40x, 80x, 160x, 320x, dan 640x). Masing-masing lubang diisi dengan 100 ul. Setelah diinkubasi selama satu jam pada suhu 37° C, kemudian dilakukan pencucian dengan cara yang sama dengan cara sebelumnya tetapi dilakukan sebanyak empat kali.

Konjugat anti kelinci ditambahkan sebanyak 150 ul tiap lubang dengan konsentrasi pengenceran 1:4000. Dan dilakukan inkubasi selama satu jam pada suhu 37° C. Pencucian dilakukan sebanyak lima kali dengan cara yang sama.

Substrat yaitu 4-nitrophenil sulphate ditambahkan sebanyak 150 ul dengan konsentrasi 1mg/ml. Inkubasi dilakukan pada suhu 37° C selama 15

menit sampai dengan 30 menit. Pembacaan hasil ELISA dilakukan dengan menggunakan *ELISA rider*, dengan panjang gelombang 450 nm.

4.2.2 Pemanenan antibodi poliklonal.

Pada pengecekan dengan metode ELISA, apabila sudah didapatkan titer yang tinggi pada pengenceran 1:100 maka kelinci sudah dapat dipanen. Kelinci dilakukan pembiusan dan dilakukan pembedahan pada daerah thorax dengan membuka rongga dada. Pemutusan vena porta yang menuju ke jantung dilakukan sehingga darah keluar dan memenuhi rongga dada. Darah kemudian segera diambil dengan menggunakan spuit tanpa jarum dan dikumpulkan ke dalam tabung sentrifus. Darah kemudian disimpan dalam es selama 15 sampai dengan 30 menit dan dilakukan pemutaran dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu 4° C selama 10 menit. Serum darah yang sudah mengandung antibodi terhadap virus Infectious Bronchitis diambil dan ditampung. Selama menunggu untuk digunakan dalam pendeteksian ekspresi protein virus *Infectious Bronchitis*, serum tersebut disimpan dalam lemari es dengan suhu -20° C.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari empat ekor kelinci yang digunakan terjadi kematian sebanyak dua ekor. Sedangkan dari dua ekor tersebut hanya satu ekor yang dapat menimbulkan respon imun yang baik setelah penyuntikan booster ketiga.

Dari satu ekor yang menghasilkan respon imun yang baik setelah dilakukan uji ELISA di mana serum diambil setelah penyuntikan booster II dan III. Hasil uji ELISA setelah booster II dan III dapat dilihat padaa tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil Uji ELISA antibodi poliklonal Virus *Infectious Bronchitis*

Pengenceran	Booster II	Booster III	Kontrol (+)	Kontrol (-)
10 x	1.299	1.386	1.139	0.583
20 x	1.246	1.270	1.030	0.566
40 x	1.213	1.246	0.948	0.523
80 x	1.198	1.240	0.927	0.446
160 x	1.127	1.123	0.897	0.411
320 x	1.087	1.096	0,770	0.443
640 x	1.004	1.056	0.671	0.380

Antibodi poliklonal yang terbentuk setelah dilakukan booster ke dua dan ketiga sudah cukup tinggi. Demikian juga jika dibanding dengan hasil ELISA yang berasal dari kontrol positif, hasil penyuntikan booster ke dua dan ketiga relatif lebih tinggi.

Hasil yang tinggi ini disebabkan karena sel plasma pembentuk antibodi sudah tersensitisasi dengan antigen (protein) sehingga setelah booster ke dua dan ke tiga didapatkan titer antibodi poliklonal dalam serum darah kelinci tinggi.

Hasil panen serum darah yang mengandung antibodi poliklonal dari kelinci diperoleh serum darah sebanyak 35 ml yang saat ini disimpan pada suhu -20°

C. Persentase antibodi poliklonal terhadap antigen protein Virus Infectious Bronchitis sekitar 1% dari total serum darah (0,25%).

Sebagaimana telah diketahui dari hasil penelitian terdahulu, bahwa genom virus *Infectious Bronchitis* memiliki tiga macam gene yang dapat mengekspresikan tiga macam protein yaitu protein S, N dan M. Untuk protein S terdiri dari dua subunit yaitu protein S1 dan S2.

Dari ketiga antigen tersebut secara multipel dalam proses imunisasi diperlukan untuk menginduksi respon antibodi (Ignjatovic *et al.* 1994).

Hasil penelitian ini berupa antibodi poliklonal terhadap protein virus Infectious Bronchitis sangat penting sebagai salah satu bahan penelitian lanjutan. Antara lain penelitian molekuler terhadap virus Infectious Bronchitis atau digunakan untuk penelitian serologis. Dalam penelitian molekuler diantaranya digunakan untuk uji immunoblotting sebagaimana pada penelitian terdahulu (Corse *et al.* 2000; Lim *et al.* 2000; Liu *et al.* 1994)..

Dalam penelitian ini digunakan ajuvan dalam memproduksi antibodi poliklonal dengan tujuan untuk meningkatkan respon imun terhadap penyuntikan protein S Virus Infectious Bronchitis. Ajuvan juga mempunyai kapabilitas dalam

mempengaruhi titer antibodi, lamanya respon, isotipe dan beberapa yang berpengaruh dalam "cell-mediated immunity".

Mekanisme kerja ajuvan minimal ada tiga macam. Pertama, berfungsi sebagai depo protein, dengan cara melepas perlahan protein yang disuntikkan, sehingga respon imun akan berlangsung lama. Kedua berinteraksi dengan sel-sel imun, dan ketiga, ajuvan berfungsi sebagai mediator non spesifik dari fungsi sel imun dengan cara menstimulasi atau modulasi sel imun (Hanly *et al.*1995; Jennings, 1995).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Antibodi poliklonal dari protein *Virus Infectious Bronchitis* pada serum darah kelinci yang diperoleh mempunyai titer yang tinggi sama dengan titer dari *Virus Infectious Bronchitis* isolat laboratorium.
2. Jumlah serum darah Kelinci yang mengandung antibodi poliklonal terhadap *Virus Infectious Bronchitis* diperoleh sebanyak 35 ml.

6.2 Saran

Dengan telah diperolehnya antibodi poliklonal terhadap virus *Infectious Bronchitis*, hendaknya penelitian terhadap virus ini dilanjutkan, khususnya dalam kajian biologi molekuler, sehingga dapat segera diketahui strain-strain dari virus *Infectious Bronchitis* ini di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Cavanagh, D., Davis, P.J., Cook, J.K.A., Li, D., Kant, A. and Koch, G. 1992. Location of The amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* 21:33-43.
- Corse, E., Machamer, C.E. 2000. Infectious Bronchitis Virus E protein Is Targeted to the Golgi Complex and Directs Release of Virus-like Particles. *J. Virol.* 74:4319-4326.
- Csermelyi M., Thijssen R., Orthel F., Burger A.G., Kouwenhoven B. and Luticken D. 1988. Serological classification of recent infectious bronchitis virus isolates by the neutralization of immunofluorescent foci. *Avian Pathol.*, 17, 139-148.
- Hanly W.C., Artwohl, J.E. and Bennett, B.T. 1995. Review of Polyclonal Antibody Production in Mammals and Poultry. *ILAR Journal.* 37(3) : 93-118.
- Ignjatovic, J. and Sapats, S. 2000. Avian Infectious Bronchitis Virus. *Rev. Sci. Tech.* 19 : 493 -508.
- Ignjatovic, J. and Galli L. 1994 The S1 glycoprotein but Not the N or M Proteins of Avian Infectious Bronchitis Virus Induces Protection in Vaccinated Chickens. *Arch. Virol.* 138 : 117-134.
- Jennings, V.M. 1995. Review of selected Adjuvants Used In Antibody Production. *ILAR Journal.* 37 (3): 119-125.
- Kant, A., Koch, G., van Roozelaar, D.J., Kusters, J.G., Poelwijk, F.A.J. & van der Zeijst, A.M. 1992. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *J. Gen. Virol.* 73:591-596.
- King, D.J., Cavanagh, D. 1991. Infectious bronchitis. In *Diseases of Poultry*, 9th ed. Iowa State University Press.
- Kingham, B.E., Keeler C.L., Nix, W.A., Ladman, B.S. and Gelb, J. 2000. Identification of Avian Infectious Bronchitis Virus By Direct Automated Cycle Sequencing of the S-1 Gene. *Avian Dis.* 44 (2) : 325-335.
- Lambrecht, C., Pensaert, M. & Ducatelle, R. 1993. Challenge experiments to evaluate cross-protection induced at the trachea and kidney level by vaccine strains and Belgian nephropathogenic isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* 22:577-590.

- Lim.K.P.,Lisa, F.P.,and Liu, D.X., 2000.Identification of Novel Cleavage Activity of the First Papain-Like Proteinase Domain Encoded By Open Reading Frame 1a of The Corona Virus Avian Infectious Bronchitis Virus and Characterization of the Cleavage Products. *J.Virol.*74 (4) : 1674 – 1685.
- Liu, F.T.,Shenhav A.,Bhat,B., Leonard, N.J. 1994. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies specific for covalently linked DNA/RNA cross sections. *Hybridoma* 13 : 499-507.
- Picault J.,P.,Drouin P.,Guittet M.,Bennejean G.,Protais J., L'Hospitaller R.,Gillet J.P., Lamande J. and Lebachelier. 1986.Isolation,characterization and preliminary cross-protection studies with a new pathogenic avian infectious bronchitis virus (strain PL-84084).*Avian Pathol.*15, 367-383.
- Song ,C.S.,Lee,Y.J., Lee,C.W., Sung,H.W., Kim,J.H., Mo,I.P., Izumiya,Y., Jang,H.K., and Mikami, T.1998.Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus. *J.Gen.Virol.* 79 : 719-723.
- Wang, L. Junker,D. & Collisson,E.W.1993.Evidence of Natural Recombination within the S1 gene of Infectious Bronchitis Virus. *Virology* 192:710-716.
- Wang X and Khan M.I.1999. A Multiplex PCR for Massachusetts and Arkansas Serotypes of Infectious Bronchitis Virus. *Mol.Cell.Probes.* 13 : 1- 7.

PAMERAN

- 1 JUL 2004

