

# Seroprevalensi Penyakit Infeksius Bronkitis dengan Metode Indirect-ELISA pada Itik (*Anas platyrhynchos domesticus*) dan Ayam Buras (*Gallus gallus domesticus*) yang Dijual di Pasar Mojosari Mojokerto

*Seroprevalence of Infectious Bronchitis Using Indirect-ELISA on Duck (Anas platyrhynchos domesticus) and Native Chicken (Gallus gallus domesticus) Sold in Mojosari Traditional Market, Mojokerto*

Jola Rahmahani<sup>1\*</sup>, Nanik Sianita Wijaya<sup>1</sup>, Suwarno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Virologi dan Imunologi, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya, 60115

\*Corresponding author: [jola\\_rahmahani@yahoo.co.id](mailto:jola_rahmahani@yahoo.co.id)

## Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seroprevalensi kejadian Infeksius Bronkitis (IB) pada itik dan ayam buras berdasarkan pengujian antibodi. Itik dan ayam buras yang mengandung antibodi dipastikan pernah tertular virus IB karena tidak ada program vaksinasi. Sampling dilakukan di Pasar Mojosari Kabupaten Mojokerto, masing-masing sebesar 120 ekor, yang diambil selama kali empat kali, masing-masing sebanyak 30 ekor. Pengujian antibodi dilakukan dengan teknik *indirect-ELISA* menggunakan *strain Massachusetts* sebagai antigen. Hasil penelitian menunjukkan kasus seroprevalensi IB pada itik menunjukkan jumlah yang positif sebesar 30 ekor (25%) dari 120 ekor sampel yang diperiksa. Pada ayam buras dari sejumlah 120 ekor yang diperiksa, 87 ekor (72.5%) diantaranya menunjukkan hasil positif. Reaktivitas antibodi terdeteksi ditunjukkan dengan kisaran titer antibodi antara 4.157-12.217 pada itik dan antara 4.173-170.795 pada ayam buras.

Kata kunci: Infeksius Bronkitis, seroprevalensi, itik, ayam buras, *strain Massachusetts*

## Abstract

The aim of this study was to know the seroprevalence case of Infectious Bronchitis (IB) on ducks and native chickens based on serology assay. Positive samples which contain antibody are confirmed to be infected by IB virus due to no vaccination program. In this study, sampling was done at Mojosari market in Mojokerto district, and the number of samples were 120 for each ducks and native chickens, which were taken four times, each as many as 30 samples. Antibody assay is conducted by applying *indirect-ELISA* technique using *Massachusetts strain* as antigen. The result showed that the seroprevalence case of IB in ducks had positive number, as many as 30 (40%) of 120 samples. In native chickens, 87 (72.5%) of 120 of samples showed positive results. The reactivity of antibody were showed by titer antibody around 4.157-12.217 in ducks and around 4.173-170.795 in native chickens.

Keywords: Infectious Bronchitis, seroprevalence, ducks, native chickens, *Massachusetts strain*

Received: 15 Juli 2020

Revised: 30 Juli 2020

Accepted: 30 Agustus 2020

## PENDAHULUAN

Infeksius Bronkitis (IB) merupakan penyakit viral pada unggas, bersifat akut dan sangat menular, ditandai dengan gejala pernafasan, kelainan urogenital, penurunan kuantitas dan kualitas telur. Penyakit disebabkan *coronavirus* famili *coronaviridae*. Bentuk virus pleomorfik

tetapi umunya adalah *rounded*. Virus IB memiliki amplop dengan diameter 120 nm dan pada amplop virus terdapat *spike* yang panjangnya sekitar 20 nm (Cavanagh dan Naqi, 1997).

Virus IB dikenal gampang mengalami mutasi, sehingga banyak timbul *serotype* dan varian baru yang secara terus menerus terbentuk

akibat mutasi titik, insersi, delesi dan rekombinasi (Dharmayanti dkk., 2003).

Virus IB yang ditemukan pertama kali pada tahun 1930-an, sekarang telah tersebar luas di dunia. Virus IB menyerang ayam pada segala umur dan menyebabkan kerugian ekonomi bagi industri perunggasan. Hewan rentan terhadap penyakit IB hanyalah ayam, baik *broiler* ataupun *layer*, tetapi pernah dilaporkan kejadian pada itik dan burung liar. Virus IB menyebar melalui rute pernapasan (*droplet*) yang dikeluarkan selama batuk atau bersin dan juga diekskresi lewat feses. Penyebaran penyakit melalui kawanan unggas dalam satu *flock* sangat cepat. Masa inkubasi relatif pendek antara 18–36 jam. Transmisi pada kluster peternakan dihubungkan dengan mobilitas orang, peralatan, bahan organik, air minum dan kendaraan yang terkontaminasi. Penularan secara vertikal belum terbukti, tetapi telur yang terkontaminasi virus IB yang menempel pada kerabang telur dapat menjadi sumber penularan di *hatchery*, karena setelah infeksi, ayam dapat bertindak sebagai *carrier* dan mengeluarkan virus selama beberapa minggu (Jones, 2010).

Penyebaran virus IB antar negara terjadi melalui perdagangan unggas, burung migrasi atau penggunaan vaksin aktif atenuasi (Liu *et al.*, 2006). Menurut Woo *et al.*, (2009), kelelawar yang terinfeksi coronavirus dapat dianggap sebagai *ancestor* karena ada lompatan penularan dari kelelawar ke burung liar atau sebaliknya, antar spesies kelelawar, antara kelelawar dengan spesies lainnya, termasuk manusia, antara spesies unggas atau antara unggas dengan mamalia. Montassier (2010) menyatakan, bahwa adanya mutasi dan rekombinasi di antara coronavirus akan menghasilkan variasi *genetic* dan fenotipik, sehingga memunculkan varian baru.

Menurut Dharmayanti dkk. (2005) perbedaan *antigenic* di antara *serotype* virus IB berkaitan dengan variasi struktural dari protein S (*spike*) yang terdapat pada amplop virus. Tingkat homologi virus IB di Indonesia berkisar antara 46 – 48% bila dibandingkan dengan virus IB dari *Genebank*. De Wit (2000) menyatakan, adanya perbedaan susunan nukleotida atau asam amino

pada epitope protein virus IB varian menyebabkan perbedaan reaksi antara virus dengan antibodi. Perbedaan reaktivitas antigen antibodi akan menghasilkan titer antibodi yang berbeda pula. Antibodi yang timbul akibat vaksinasi atau infeksi akan bereaksi spesifik terhadap antigen IB pada kit diagnostik, jika terdapat kesamaan genetik atau struktur antigenik.

Penelitian ini bertujuan mengetahui prevalensi kejadian IB pada itik dan ayam buras berdasarkan pengujian antibodi. Itik dan ayam buras yang mengandung antibodi dipastikan pernah tertular virus IB karena tidak ada program vaksinasi pada kedua jenis unggas tersebut. Reaktivitas antara antigen dan antibodi dapat menunjukkan kemiripan *antigenic* antara virus IB yang menginfeksi dengan antigen IB yang digunakan sebagai alat uji.

## METODE PENELITIAN

### Pengambilan Sampel

Sampling dilakukan di Pasar Mojosari Kabupaten Mojokerto, di mana pada tempat ini banyak penjual itik dan ayam buras yang berasal dari beberapa daerah sekitar. Tujuan pengambilan sampel adalah untuk mendeteksi adanya suatu penyakit dalam suatu populasi dan untuk menentukan prevalensi penyakit pada target populasi. Populasi itik dan ayam buras yang dipotong di Pasar Mojosari masing-masing sekitar 6.000 ekor per bulan, maka jika digunakan acuan 2%, berarti sampel yang diteliti ada sekitar 120 ekor (Thrusfield, 2005).

### Lokasi dan Waktu Penelitian

Sampel diambil dari Pasar Mojosari Kabupaten Mojokerto, sedangkan lokasi penelitian untuk pengujian serologis berada di Departemen Mikrobiologi Veteriner FKH Unair. Pengambilan sampel dilakukan sebanyak empat kali, masing-masing sebanyak 30 ekor, sehingga total masing-masing sampel adalah 120 ekor.

### Alat dan Bahan Penelitian

Antigen virus IB *strain Massachusetts*, serum itik dan ayam buras yang diambil dari Pasar

Mojosari, Mojokerto, serum kontrol positif, serum kontrol negatif, konjugat *anti-duck* dan *anti-chicken* berlabel alkalin fosfatase, creamer, bufer karbonat, bufer bloking, bufer washing, bufer substrat, p-NPP, larutan NaOH, larutan PZ, akuades.

Plate ELISA, mikroplate, ELISA reader, sentrifus, erlenmeyer, becker glass, magnetic stirrer, magnetic bar, gelas ukur, pipet hisap, pipet mono dan multichannel, yellow tip, blue tip, white tip, tabung venoject, microtube, inkubator.

### Prosedur Penelitian

Sampel berupa darah itik dan ayam buras yang diambil dari Pasar Mojosari Kabupaten Mojokerto masing-masing sebanyak 120 ekor. Serum kemudian dipisahkan dengan jalan disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit, selanjutnya serum dipindah pada microtube dan disimpan pada -20°C sampai digunakan. Sebagai standard digunakan serum itik dan ayam buras kontrol positif dan negatif yang diperoleh dari Departemen Mikrobiologi FKH Unair. Semua sampel diuji dengan indirect-ELISA. Hasil kemudian dibandingkan untuk penentuan prevalensi penyakit IB.

### Indirect-ELISA

Antigen virus IB strain *Massachusetts* dengan kadar 1/100 diencerkan dengan bufer karbonat dan dilekatkan pada mikroplate ELISA sebanyak 100 µl/sumuran. Mikroplate kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam, selanjutnya mikroplate dicuci dengan washing bufer sebanyak tiga kali (@200 µl/sumuran). Sumuran kemudian diblok dengan menggunakan creamer 5%, masing-masing sebanyak 200 µl/sumuran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Mikroplate kembali dicuci dengan cara yang sama untuk selanjutnya ditambahkan dengan serum yang diuji. Serum itik dan ayam buras Pasar Mojosari Kabupaten Mojokerto yang diduga mengandung antibodi terhadap IB diencerkan 1:500 dengan bufer assay dan ditambahkan ke dalam sumuran mikroplate 100 µl/sumuran. Sebagai kontrol digunakan serum kontrol positif dan kontrol

negatif diencerkan pada pengenceran 1/100, masing-masing dimasukkan ke dalam mikroplate sebanyak 100 µl/sumuran. Mikroplate diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama satu jam dan dicuci dengan cara yang sama. Berikutnya ditambahkan konjugat anti-duck dan anti-chicken yang berlabel alkalin fosfatase pada pengenceran 1:2500 sebanyak 100µl/sumuran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Mikroplate dicuci dengan cara yang sama untuk selanjutnya ditambahkan substrat p-NPP dengan kadar 1 mg/ml, masing-masing sebanyak 100 µl/sumuran, dan diinkubasi pada suhu ruang di ruang gelap selama 15–30 menit. Reaksi kemudian dihentikan dengan pemberian larutan stopping NaOH 1 N sebanyak 50 µl/sumuran dan dibaca pada ELISA reader dengan panjang gelombang 450 nm.

### Interpretasi Hasil

Serum standard kontrol positif dan negatif digunakan sebagai acuan untuk penentuan besaran titer antibodi. Nilai OD sampel kemudian disetarakan dengan nilai S/P untuk kemudian dihitung berdasarkan rumus Titer Antibodi = antilog 1,755 (S/P log) + 3,612. Sampel dikatakan positif jika memiliki nilai OD sampel = 1,5 x rata-rata kontrol negatif atau nilai S/P ≥ 1,0 atau titer antibodi 4.092 (Suwarno dkk., 2011). Persentase prevalensi dihitung berdasarkan hasil analisis sampel.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil seroprevalensi kasus kejadian IB pada itik dan ayam buras yang dipotong di Pasar Mojosari Kabupaten Mojokerto memperlihatkan hasil pengujian antibodi IB menggunakan antigen strain *Massachusetts* pada itik dan ayam buras yang dipotong di Pasar Mojosari Kabupaten Mojokerto. Seroprevalensi kasus kejadian pada itik menunjukkan jumlah yang positif sebesar 30 ekor (25%) dari 120 ekor sampel, sedangkan kejadian IB pada ayam buras yang diperiksa sebesar 87 ekor (72,5%) dari sekitar 120 ekor sampel (Tabel 1). Sampai saat ini, tidak ada data yang menyatakan adanya vaksinasi IB pada itik atau ayam buras baik yang

**Tabel 1.** Seroprevalensi penyakit IB pada itik dan ayam buras

Spesies	Kasus/Jumlah Sampel	Persentase %	Kisaran Titer Antibodi
Itik	30/120	25	4.157-12.217
Ayam Buras	87/120	72.5	4.173-170.795

dilakukan oleh Dinas Peternakan setempat atau secara pribadi oleh para peternak. Hasil ini menunjukkan bahwa antibodi yang terdeteksi merupakan antibodi yang berasal dari infeksi.

Virus IB yang tergolong coronavirus dapat menginfeksi ayam ras dan *native*, itik, entok, unggas air lainnya dan burung liar (Tabbu, 2000). Kasus IB pada ayam buras, memang tidak sehebat ayam ras, karena kepekaan unggas tersebut berbeda-beda terhadap infeksi virus IB. Semua umur, tipe dan *breed* ayam dapat terinfeksi oleh virus IB Ayam ras merupakan unggas yang paling peka dengan menimbulkan gejala klinis yang bervariasi, mulai gangguan pernafasan, kelainan bentuk telur dan kerabang telur, kualitas dan kuantitas telur, gangguan ginjal dan timbulnya ascites. (OIE, 2008; de Wit *et al.*, 2011).

Hughes dkk. (2009) berhasil mengidentifikasi virus IB pada beberapa unggas air, seperti angsa dan itik, menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan kasus positif sebesar 1,6%, sementara itu Tamagda *et al.* (2011) mendapatkan kasus kejadian IB pada unggas domestik dan burung liar sebesar 3,9%. Faslah (2011) melakukan studi seroprevalensi IB pada ayam buras di Kabupaten Subang mendapatkan kasus kejadian sebesar 91%.

Pada Tabel 1 terlihat kisaran titer antibodi yang terdeteksi pada itik berkisar antara 4.157-12.217, sedangkan pada ayam buras titer antibodi yang terdeteksi berkisar antara 4.173-170.795. Data pada Tabe 2 menunjukkan reaktivitas antibodi asal itik dan ayam terhadap virus antigen IB. Itik menunjukkan reaksi yang kurang reaktif dibanding dengan ayam, terbukti dengan kisaran antibodi yang terdeteksi pada itik berkisar antara 4.157-12.217 dan pada ayam buras berkisar antara 4.173-170.795. Hasil ini menunjukkan, bahwa infeksi virus IB *strain Massachusetts* banyak didominasi pada ayam dan merupakan strain yang banyak mewabah di Indonesia. Dharmayanti dkk. (2005) menyebutkan, bahwa virus IB yang beredar di

Indonesia terdiri dari *strain Massachusetts*, Connecticut, Australian T dan varian-varian yang timbul karena rekombinasi genetik antara strain vaksin dan strain lapang. Menurut Suwarno (2013), titer antibodi yang terbentuk akibat infeksi tidak selalu disertai dengan timbulnya gejala klinis, tetapi kadang disertai adanya penurunan produksi telur. Reaktivitas reaksi antara serum uji dengan antigen sangat dipengaruhi oleh antigen IB yang digunakan untuk mendeteksi antibodi, Semakin tinggi kesamaan antigenik antara virus vaksin atau virus lapang yang menginfeksi dengan antigen dalam kit, akan semakin menunjukkan tingginya titer antibodi yang terdeteksi.

## KESIMPULAN

Seroprevalensi kasus kejadian IB pada itik dan ayam buras masing-masing sebesar 25% dan 72.5%. Reaktivitas hasil pengujian serum itik dan ayam buras terhadap antigen virus IB *strain Massachusetts* masing-masing sebesar 4.157-12.217 untuk itik dan 4.173-170.795 untuk ayam buras.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi, Universitas Airlangga, dan Fakultas Kedokteran Hewan atas kontribusi yang diberikan selama proses penelitian dan penulisan paper.

## DAFTAR PUSTAKA

- Caron, L.F. 2010. Etiology and Immunology of Infectious Bronchitis Virus. Universdade Federal do Rarana, Brazil.
- Cavanagh, D., Naqi, S.A. 1997. Infectious Bronchitis. In B.W Calnek (Ed). Diseases of Poultry. 10<sup>th</sup> Ed. Iowa States University, Ames, IA. pp: 511-526.

- De Wit, J.J., Cook, J.K.A., van der Heijden, H.M.J.F. 2011. Infectious Bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.*, 40(3), 223-235.
- De Wit, J.J. 2000. Detection of Infectious Bronchitis Virus. *Lohmann Information*, 23, 21-28.
- Dharmayanti, N.L.P.I., Indriani, R., Darminto. 2003. Perbandingan Sekuen daerah hipervariabel (HVR) Subunit Gen S-1 Virus infectious Bronchitis isolate lapang I-37 dengan Serotipe Connecticut 46. Balai Penelitian Veteriner, Bogor.
- Dharmayanti, N.L.P.I., Asmara, W., Artama, W.T., Indriani, R., Darminto. 2005. Hubungan Kekerabatan Virus Infectious Bronchitis Isolat lapang Indonesia. *Jurnal Bioteknologi Peternakan*, 10(1), 15-23.
- Faslah, R. 2011. Studi seroprevalensi Infectious bronchitis pada ayam kampung di Kecamatan Cipunegara, Kabupaten Subang. [Skripsi] Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Hughes, L.A., Savage, C., Naylor, C., Bennett, M., Chantrey, J., Jones, R. 2009. Genetically diverse coronavirus in wild bird populations of Northern England. *Emerg. Infect. Dis.*, 15(7), 1091-1094.
- Jones, R.C. 2010. Europe: History, Current Situation and Control Measures for Infectious Bronchitis. *Rev. Bras. Avic.* 12(2).
- Liu, S., Han, Z., Chen, J., Liu, X., Shao Y., Kong, X., Tong, G., Rong, J. 2007. S1 gene sequence heterogeneity of a pathogenic infectious bronchitis virus strain and its embryo passaged, attenuated derivatives. *Avian Pathol.*, 36(3), 231-234.
- Montassier, H.J. 2010. Molecular Epidemiology and Evolution of Avian Infectious Bronchitis Virus. *Rev. Bras. Avic.*, 12(2).
- OIE. 2008. Avian infectious Bronchitis. OIE Terrestrial Manual. pp: 443-455.
- Suwarno, Dewi, M.K., Rantam, F.A., Prijandani, Y. 2011. Perbedaan Nilai Optical Density Antibodi pada Ayam layer yang Divaksin Infectious Bronchitis Aktif Monovalen dengan Vaksin infectious bronchitis Aktif Bivalen (IB-ND) Menggunakan *Indirect* ELISA. *Veterinaria Medika*, 4(3), 197-202.
- Suwarno. 2013. Keunikan Genetik Virus Infectious bronchitis dalam Memicu Timbulnya Antibodi Protektif. Seminar Perunggasan PDHI Jatim II. Blitar, 3 Juli.
- Tabbu, C.R. 2000. Penyakit ayam dan Penanggulangnya. Penyakit Bakterial, Mikal dan Viral. Volume 1. Penerbit kanisius, Yogyakarta.
- Tamagda, Z., Yougbare, I., Kam, A., Tahita, M.C., Oudraogo, J.B. 2011. Prevalence of infectious bronchitis and Newcastle disease virus among domestic and wild birds in H5N1 outbreaks areas. *J. Infect. Dev. Ctries.*, 5(8), 565-570.
- Thrustfield, M. 2005. *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Scientific. Publishing Professional, Ames, Iowa, USA.
- Woo, P.C., Lau, S.K.P., Lam, C.S.F., Lai, K.K.Y., Huang, Y., Lee, P., Luk, G.S.M., Dyrting, K.C., Chan, K.H., Yuen, K.Y. 2009. Comparative Analysis of Complete Genome Sequences of Three Avian Coronaviruses Reveals a Novel Group 3c Coronavirus. *J. Virol.*, 83(2), 908-917.

\*\*\*