

PENGEMBANGAN VAKSIN *INFECTIOUS BRONCHITIS* INAKTIF ISOLAT LOKAL

DARMINTO

*Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia*

(Diterima dewan redaksi 12 Pebruari 1999)

ABSTRACT

DARMINTO. 1999. Development of inactivated-local isolate vaccine for infectious bronchitis. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4(2): 113-120.

Infectious bronchitis (IB) is an acute highly contagious viral respiratory disease of poultry caused by coronavirus. The disease causes high mortality in young chicks, reduce body weight gain in broilers and remarkable drop in egg production. IB can only be controlled by vaccination, but due to the antigenic variation among serotypes of IB viruses, the effective IB vaccine should be prepared from local isolates. The aim of this research is to develop inactivated IB vaccine derived from local IB isolates. Local isolates of IB viruses designated as I-37, I-269 and PTS-III were propagated respectively in specific pathogen free (SPF) chicken eggs, the viruses then were inactivated by formaline at final concentration of 1:1,000. Subsequently, the inactivated viruses were mixed and emulsified in oil emulsion adjuvant with sorbitant mono-oleic as an emulsifier. The vaccine then was tested for its safety, potency and efficacy in broiler chickens. Birds inoculated twice with a two-week interval by inactivated vaccine did not show any adverse reaction, either systemic or local reaction. The inoculated birds developed antibody responses with high titre, while antibody of the control birds remain negative. In addition, efficacy test which was conducted in broilers demonstrated that birds vaccinated by live-commercial vaccine and boosted three weeks later by Balitvet inactivated vaccine showed high level of antibody production which provided high level of protection against challenged virus (76% against I-37, 92% against I-269 and 68% against PTS-III challenge viruses). From this study, it can be concluded that inactivated local IB vaccine is considered to be safe, potent and efficacious. The vaccine stimulates high titre of antibody responses, which provide high level of protection against challenged viruses.

Key words: Infectious bronchitis, virus, broiler chicken, antibody, inactivated vaccine

ABSTRAK

DARMINTO. 1999. Pengembangan vaksin *infectious bronchitis* inaktif isolat lokal. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4(2): 113-120.

Infectious bronchitis (IB) adalah penyakit pernafasan yang bersifat akut dan sangat menular pada ayam yang disebabkan oleh coronavirus. Penyakit ini menyebabkan kematian tinggi pada anak-anak ayam, menghambat pertambahan bobot badan pada ayam pedaging dan menyebabkan penurunan produksi telur dengan tajam pada ayam petelur. Pengendalian terhadap penyakit ini hanya dapat dilakukan dengan vaksinasi, namun adanya variasi antigen di antara serotipe-serotipe virus IB, maka vaksin IB hanya akan efektif jika dipersiapkan dari isolat lokal. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan vaksin IB inaktif isolat lokal. Tiga isolat lokal yang terdiri atas I-37, I-269 dan PTS-III masing-masing ditumbuhkan pada telur ayam berembrio yang bebas dari patogen tertentu (*specific pathogen free*, SPF). Virus-virus tersebut kemudian diinaktifkan dengan formalin pada konsentrasi akhir 1:1.000. Virus yang telah diinaktifkan kemudian diemulsikan dengan ajuvan minyak menggunakan sorbitan mono-oleat sebagai pengemulsi. Uji keamanan, potensi dan efikasi dari vaksin tersebut dilakukan pada ayam pedaging. Kelompok ayam yang diinokulasi dengan vaksin inaktif tersebut sebanyak dua kali dengan interval dua minggu tidak memperlihatkan reaksi negatif apapun baik sistemik maupun lokal, bahkan ayam yang diinokulasi tersebut memproduksi antibodi dengan titer tinggi. Sementara itu, kelompok ayam kontrol tidak memproduksi antibodi. Hasil uji efikasi menunjukkan bahwa kelompok ayam yang mendapat vaksinasi dengan vaksin hidup komersial dan tiga minggu kemudian dibooster dengan vaksin inaktif Balitvet mampu menghasilkan antibodi dengan titer tinggi dan memberi perlindungan dengan tingkat proteksi sebesar masing-masing 76% , 92% dan 68% terhadap virus penantang I-37, I-269 dan PTS-III. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa vaksin IB inaktif yang terdiri atas isolat lokal tersebut terbukti aman, memiliki potensi tinggi dan efektif melindungi ayam dari infeksi virus penantang dengan tingkat proteksi tinggi.

Kata kunci: *Infectious bronchitis*, virus, ayam pedaging, antibodi, vaksin inaktif

PENDAHULUAN

Infectious bronchitis (IB) merupakan penyakit pernafasan ayam yang bersifat akut, sangat menular dan disebabkan oleh coronavirus. Serangan penyakit ini sangat merugikan, karena dapat menyebabkan kematian dengan tingkat mortalitas sekitar 30% pada anak-anak ayam umur kurang dari 3 minggu (HOFSTAD, 1984) yang ditandai dengan gejala pernafasan parah seperti sesak nafas, bersin-bersin dan ngorok. Pada anak ayam umur di atas 6 minggu, serangan IB dapat menghambat pertumbuhan bobot badan (DAVELAAR *et al.*, 1986), sehingga banyak merugikan pada peternakan ayam pedaging. Pada ayam petelur dewasa, serangan IB tidak menyebabkan gangguan pernafasan, tetapi menyebabkan penurunan produksi telur yang sangat drastis hingga mencapai 60%. Penurunan produksi ini berlangsung lama, sekitar 6-7 minggu dan selalu disertai dengan penurunan mutu telur berupa bentuk telur tidak teratur, kerabang telur lembek dan albumin telur cair (HOFSTAD, 1984; DAVELAAR *et al.*, 1986; MUNEER *et al.*, 1986; CHUBB, 1988), sehingga sangat merugikan peternakan ayam petelur. Pencegahan terhadap IB hanya dapat dilakukan dengan program vaksinasi yang efektif disertai dengan tersedianya sarana diagnosis cepat dan akurat.

Di Indonesia IB tersebar di Pulau Jawa dengan tingkat prevalensi mencapai 40-60% (DARMINTO *et al.*, 1988). Antibodi terhadap IB dapat dideteksi baik pada ayam ras maupun ayam buras (DARMINTO, 1988). Data-data di lapangan menunjukkan bahwa kasus IB masih sering terjadi pada peternakan ayam yang telah rutin melaksanakan program vaksinasi. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin yang ada saat ini masih belum efektif dalam mengatasi serangan IB di lapangan. Tidak efektifnya vaksin IB yang ada tersebut disebabkan oleh perbedaan serotipe antara virus dalam vaksin dan virus IB penyebab wabah di lapangan (DARMINTO, 1995). Penyakit IB disebabkan oleh virus yang termasuk dalam famili *Coronaviridae* (MURPHY dan KINGSBURY, 1990). Virus IB memiliki banyak serotipe yang satu sama lainnya memiliki tingkat proteksi silang yang rendah (HOFSTAD, 1984; ENDO-MUNOZ dan FARAGHER, 1989). Oleh sebab itu, untuk melakukan pencegahan terhadap serangan IB harus dikembangkan vaksin IB yang berisi virus IB yang serotipenya sama dengan virus IB penyebab wabah di lapangan. Dengan kata lain, vaksin IB yang efektif adalah vaksin IB yang dipersiapkan dari virus IB isolat lokal.

Vaksin IB yang sekarang beredar di pasaran pada umumnya berisi virus IB serotipe Massachusetts (Mass) dan sebagian kecil berisi serotipe Connecticut (Conn), dan hanya ada satu vaksin IB asal Australia yang dipasarkan di Indonesia dan berisi galur Vic S (ANON, 1985). Sementara itu, hasil penelitian terdahulu

(DARMINTO, 1995) menunjukkan bahwa di samping serotipe Mass dan Conn, di Indonesia masih ditemukan lagi serotipe virus IB lain di luar kedua serotipe virus vaksin tersebut. Oleh sebab itu, kegiatan penelitian ini diarahkan untuk mengembangkan vaksin IB inaktif isolat lokal, terutama dari serotipe yang saat ini belum ada vaksinnya.

Dari hasil penelitian terdahulu (DARMINTO, 1995) telah diperoleh enam isolat lokal virus IB dari daerah Jawa Barat. Keenam isolat tersebut adalah: isolat I-37 yang termasuk dalam serotipe Conn, isolat I-269, I-624, TTS-II yang termasuk dalam serotipe Mass dan Isolat PTS-III serta I-625. Kedua isolat terakhir ini tidak memiliki antigenisitas yang dekat, baik dengan serotipe Conn maupun Mass, tetapi lebih dekat hubungan antigenisitasnya dengan serotipe virus IB yang ada di Australia.

Sejauh ini vaksin IB yang beredar di pasaran Indonesia terdiri dari serotipe Mass dan Conn, tetapi tidak ada vaksin IB yang berisi selain dari kedua serotipe tersebut. Karena di lapangan sudah terdapat serotipe virus IB di luar Mass dan Conn, maka vaksin yang mengandung IB varian tersebut selayaknya juga disediakan agar pengendalian IB di lapangan lebih efektif. Untuk memenuhi kebutuhan tersebut perlu dikembangkan vaksin IB inaktif yang berisi isolat-isolat lokal virus IB yang mewakili serotipe-serotipe virus IB yang diketahui ada di lapangan (polivalen).

Publikasi ini melaporkan hasil penelitian tentang pengembangan vaksin IB inaktif isolat lokal yang berisi isolat I-37 (Conn), I-269 (Mass), dan PTS-III (IB varian).

MATERI DAN METODE

Ayam percobaan

Anak ayam pedaging umur satu hari yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh secara komersial dari peternakan pembibitan ayam di Kabupaten Bogor. Anak ayam ini kemudian dipelihara dalam kandang tertutup di Balitvet dengan pemberian pakan dan air minum secara *ad libitum* sampai digunakan dalam penelitian.

Telur ayam berembrio

Telur ayam berembrio umur 9 hari yang bebas dari patogen tertentu (*specific pathogen free*, SPF) diperoleh secara komersial dari PT. Vaksindo Satwa Nusantara, sedangkan telur ayam berembrio umur 9 hari bukan SPF diperoleh secara komersial dari peternakan pembibitan ayam di Kabupaten Bogor.

Virus

Virus IB isolat lokal yang terdiri atas isolat-isolat I-37, I-269 dan PTS-III dipergunakan sebagai biang vaksin dalam pengembangan vaksin IB inaktif dalam penelitian ini. Sementara itu virus IB serotipe Massachusetts-41 (M-41) asal dari *American Type Culture Collection* (VR-21) dipergunakan dalam pembuatan antigen hemaglutinasi untuk uji hemaglutinasi inhibisi.

Pembuatan antigen hemaglutinasi

Antigen hemaglutinasi yang akan digunakan dalam uji hemaglutinasi inhibisi dipersiapkan menurut metode LASHGARI dan NEWMAN (1981). Ringkasnya, Virus IB serotipe M-41 ditumbuhkan pada telur ayam SPF umur 9 hari. Setelah dipanen, cairan alantois yang mengandung virus tadi dijernihkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 2.000 xg selama 30 menit. Cairan alantois tersebut selanjutnya dipelet dengan ultrasentrifugasi pada 30.000 xg. Pellet yang terbentuk dilarutkan menjadi 1% dari volume awal dalam larutan penyangga 0,01 M Tris-hydrochloride pH 6,5 yang mengandung 5 unit enzim fosfolipase C type-1 (Sigma Chem. Co.) per ml dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2 jam. Titer antigen kemudian dititrasi dan disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan.

Uji hemaglutinasi inhibisi

Uji hemaglutinasi inhibisi (HI) untuk mendeteksi antibodi dalam penelitian ini menggunakan prosedur yang telah diuraikan oleh ALEXANDER *et al.* (1983). Uji dilakukan pada lempeng mikrotiter yang memiliki 96 lubang dengan bentuk huruf V dan diisi dengan volume tetap sebanyak 0,025 ml.

Sebelum pengujian semua reagensia disimpan pada suhu 4°C. Dibuat pengenceran seri berkelipatan dua dari serum yang akan diuji, serum kontrol positif dan serum kontrol negatif dalam larutan *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,2 pada lempeng mikrotiter. Sebanyak 0,025 ml larutan antigen yang mengandung virus dengan titer 4 hemaglutinasi unit (HAU) per 0,025 ml ditambahkan kepada setiap enceran serum. Setelah diinkubasi selama 15 menit pada suhu 4°C, sebanyak 0,025 ml larutan sel-sel darah merah pada konsentrasi 1% ditambahkan kepada setiap lubang lempeng. Lempeng kemudian diinkubasikan pada suhu 4°C selama 30 menit dan hasilnya dibaca. Titer HI dinyatakan sebagai pengenceran serum tertinggi yang masih memiliki daya hemaglutinasi dan dinyatakan dalam bilangan Log₂.

Pembuatan vaksin IB inaktif

Virus IB isolat lokal yang terdiri atas I-37, I-269 dan PTS-III masing-masing ditumbuhkan pada telur ayam SPF umur 9 hari. Setelah dipanen, titer masing-masing virus diukur berdasarkan metode REED dan MUENCH (1938) dengan menggunakan telur ayam non-SPF. Hanya larutan virus yang mempunyai titer serendah-rendahnya 10⁶EID₅₀ per 0,1 ml yang dapat diproses lebih lanjut sebagai vaksin IB inaktif.

Masing-masing virus kemudian diinaktifkan dengan formalin pada konsentrasi akhir 1:1.000. Setelah inaktivasi, dilakukan pengujian daya hidup (viabilitas) virus untuk mendeteksi kemungkinan adanya virus yang tidak mati. Dalam uji viabilitas ini, larutan virus dititrasi pada telur SPF dan juga diinokulasikan pada telur SPF sebanyak dua kali pasase. Setelah dipanen dari pasase yang terakhir, larutan virus ini dititrasi lagi pada telur ayam SPF. Jika inaktivasi terbukti efektif yang ditandai dengan titer virus menjadi negatif dan tidak ada pertumbuhan virus setelah dipasase pada telur SPF, maka proses pembuatan vaksin dilanjutkan ke tahap emulsifikasi.

Larutan virus yang telah inaktif kemudian diemulsikan dengan ajuvan minyak yang terdiri atas minyak mineral (parafin cair) dan emulgator sorbitan mono-oleat dengan bahan pengawet thiomersal. Vaksin inaktif yang telah jadi ini kemudian disimpan pada suhu lemari es sampai saatnya digunakan.

Uji keamanan

Uji keamanan vaksin IB inaktif dalam penelitian ini mengikuti prosedur pengujian dalam Farmakope Obat Hewan Indonesia, Jilid I: Bahan Biologik (ANON, 1998), yang kemudian didaftarkan sebagai Standar Nasional Indonesia (RSNI No. 70-TAN/1998), dengan jumlah ayam per kelompok diperbanyak.

Sebanyak 50 ekor ayam pedaging umur 35 hari diambil darahnya untuk diperiksa adanya antibodi terhadap virus IB. Selanjutnya dibagi menjadi dua kelompok masing-masing 25 ekor. Kelompok pertama disuntik dengan vaksin IB isolat lokal dengan dosis 0,5 ml, kemudian penyuntikan diulang pada umur 49 hari (2 minggu setelah penyuntikan pertama), sedangkan kelompok kontrol tidak disuntik, tetapi diamati bersamaan dengan kelompok vaksinasi.

Pengamatan dilakukan selama 28 hari sejak penyuntikan vaksin yang pertama untuk mendeteksi terjadinya reaksi negatif baik berupa reaksi sistemik maupun reaksi lokal. Vaksin dinyatakan memenuhi persyaratan keamanan jika selama pengamatan semua ayam yang divaksinasi tidak memperlihatkan gejala abnormal dan dibandingkan dengan kontrol.

Uji potensi

Uji potensi vaksin IB inaktif dalam penelitian ini mengikuti prosedur pengujian dalam Formakope Obat Hewan Indonesia, Jilid I: Bahan Biologik (ANON, 1998), yang kemudian didaftarkan sebagai Standar Nasional Indonesia (RSNI No. 70-TAN/1998), dengan jumlah ayam per kelompok diperbanyak.

Sebanyak 50 ekor ayam pedaging umur 35 hari diambil darahnya untuk diperiksa titer antibodinya terhadap virus IB. Selanjutnya ayam dibagi menjadi dua kelompok masing-masing 25 ekor. Kelompok pertama disuntik dengan vaksin IB isolat lokal dengan dosis 0,5 ml, kemudian penyuntikan diulang pada umur 49 hari (2 minggu setelah penyuntikan pertama). Sampel serum darah untuk pemeriksaan antibodi terhadap virus IB diambil pada dua minggu setelah penyuntikan pertama dan tiga minggu setelah penyuntikan kedua. Sementara itu, kelompok kontrol tidak disuntik, tetapi juga diambil sampel darahnya untuk diperiksa terhadap adanya antibodi IB. Antibodi terhadap virus IB diperiksa dengan uji HI.

Pada minggu ketiga setelah penyuntikan vaksin yang kedua, serum dari masing-masing kelompok dicampur dengan perbandingan yang sama (pool). Dengan demikian diperoleh dua macam pool serum, yakni pool serum vaksinasi dan pool serum kontrol. Kedua pool serum tersebut kemudian diperiksa titer antibodinya terhadap virus IB. Vaksin dinyatakan memiliki potensi baik jika titer antibodi pool serum vaksinasi minimum 4 kali lebih tinggi daripada titer antibodi pool serum kontrol.

Uji efikasi

Dalam uji efikasi ini digunakan 150 ekor ayam pedaging. Ayam-ayam tersebut dibagi menjadi dua kelompok yang masing-masing berisi 75 ekor. Kelompok I divaksinasi dengan vaksin IB hidup komersial galur H-120 pada umur 2 minggu, kemudian divaksinasi ulang (*booster*) pada umur 5 minggu dengan vaksin inaktif produksi Balitvet. Kelompok II tidak divaksinasi dan diperlakukan sebagai kontrol.

Sampel serum darah dari semua kelompok diambil setiap minggu mulai dari umur satu hari hingga umur 8 minggu. Serum darah tersebut kemudian diperiksa titer antibodinya terhadap virus IB dengan uji HI.

Pada umur 8 minggu (tiga minggu setelah vaksinasi kedua), tiap kelompok dibagi lagi menjadi 3 sub kelompok yang masing-masing ditantang dengan virus IB hidup isolat I-37, I-269 dan PTS-III. Kriteria kekebalan ditentukan berdasarkan jumlah ayam yang tidak lagi mengekskresikan virus penantang (GELB *et al.*, 1981).

HASIL

Keefektifan inaktivasi virus

Setelah dilakukan inaktivasi dengan formalin, terhadap masing-masing isolat dilakukan uji viabilitas untuk mendeteksi kemungkinan adanya virus yang masih hidup. Hasil pengujian tersebut disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Uji daya hidup (viabilitas) tiga isolat virus *infectious bronchitis* setelah diinaktivasi dengan formalin pada konsentrasi akhir 1:1.000

Isolat virus	Titer virus sebelum inaktivasi (EID ₅₀) ^a	Titer virus setelah inaktivasi (EID ₅₀)	Inokulasi pada telur SPF dua kali pasase
I-37	10 ^{6,2}	0	0/5 ^b
I-269	10 ^{6,4}	0	0/5
PTS-III	10 ^{6,1}	0	0/5

Keterangan :

a =EID₅₀ : 50% *embryo infected dose*

b =Jumlah telur yang terinfeksi virus/total telur yang diinokulasi

Sebelum inaktivasi, semua isolat memiliki titer virus sekitar 10⁶ EID₅₀ (50% *embryo infective dose*), namun setelah inaktivasi titer tidak terdeteksi (titer=0). Cairan virus bertiter 0 ini kemudian masing-masing dipasase 2 kali dalam telur ayam SPF umur 9 hari dan ternyata pertumbuhan virus juga tidak terdeteksi. Karena semua virus telah menjadi inaktif, maka proses inaktivasi dinyatakan sempurna (efektif).

Uji keamanan

Dua puluh lima ekor ayam yang disuntik vaksin IB inaktif dua kali dengan interval 2 minggu, setelah diamati selama 28 sejak waktu penyuntikan pertama, ternyata tidak memperlihatkan gejala abnormalitas pada semua ayam, baik abnormalitas yang bersifat sistemik maupun reaksi lokal. Semua ayam dalam keadaan normal seperti yang terlihat pada kelompok ayam kontrol.

Uji potensi

Titer antibodi sebelum penyuntikan vaksin yang pertama tidak terlihat pada semua kelompok ayam, baik kontrol maupun vaksinasi (Tabel 2). Dua minggu setelah vaksinasi yang pertama, pada kelompok vaksinasi titer antibodi terhadap virus IB mulai terdeteksi, namun titernya masih rendah, yakni rata-rata 2,1±1,3 (HI-Log₂), sedangkan pada kelompok kontrol antibodi tidak terdeteksi (Tabel 2). Rata-rata titer antibodi kelompok vaksinasi bertambah tinggi setelah

penyuntikan vaksin yang kedua. Pada tiga minggu setelah vaksinasi kedua, rata-rata titer antibodinya mencapai $6,2 \pm 0,7$ (HI-Log₂), sedangkan titer antibodi kelompok kontrol masih negatif (Tabel 2).

Pada tiga minggu setelah vaksinasi kedua, dilakukan pool serum. Dari masing-masing kelompok (vaksinasi dan kontrol) dibuat masing-masing tiga pool serum dan selanjutnya titer antibodi pool serum tersebut diuji. Ternyata hasil ketiga pool serum dari kelompok vaksinasi sama, yakni masing-masing 6 (HI-Log₂), sedangkan ketiga pool serum dari kelompok kontrol masih negatif (Tabel 2).

Uji efikasi

Dalam uji efikasi, perkembangan titer antibodi setelah vaksinasi disajikan pada Gambar 1 dan hasil

penantangan kelompok ayam yang telah divaksinasi dan kelompok kontrol dengan virus IB hidup disajikan pada Tabel 3.

Pada saat anak-anak ayam umur satu hari titer antibodinya cukup tinggi, masih di atas titer 5,5 (HI-Log₂), yang kemudian menurun dan mencapai titer sekitar 1 (HI-Log₂) pada saat ayam berumur dua minggu. Vaksinasi yang diberikan dengan vaksin hidup komersial galur H-120 dapat menggertak pembentukan titer antibodi, sehingga titernya meningkat dan mencapai titer sekitar 6 (HI-Log₂) pada umur 5 minggu. Booster yang diberikan pada umur 5 minggu dengan vaksin inaktif produksi Balitvet semakin memacu titer antibodi dan bertahan tinggi sampai akhir pengamatan (Gambar 1).

Tabel 2. Hasil uji potensi vaksin *infectious bronchitis* inaktif isolat lokal pada ayam pedaging

Kelompok ayam	Σ ayam (n)	Titer antibodi (HI) sebelum vaksinasi (Log ₂)	Rata-rata titer antibodi (HI) ^a 2 minggu setelah vaksinasi I (Log ₂)	Rata-rata titer antibodi (HI) 3 minggu setelah vaksinasi II (Log ₂)	Rata-rata titer antibodi (HI) dari pool serum 3 minggu setelah vaksinasi II (Log ₂)
Vaksinasi	25	0	$2,1 \pm 1,3^b$	$6,2 \pm 0,7$	6
Kontrol	25	0	0	0	0

Keterangan :

- a =HI: hemaglutinasi inhibisi
- b =Rata-rata ± standar deviasi

Tabel 3. Hasil uji tantang dari kelompok ayam yang memperoleh vaksinasi dua kali dengan vaksin *infectious bronchitis* aktif dan inaktif isolat lokal kemudian ditantang dengan tiga isolat lokal bahan vaksin

Virus penantang	Kelompok ayam	Σ ayam (n)	Titer antibodi (HI) ^a sebelum ditantang (Log ₂)	Reisolasi virus penantang	Tingkat proteksi
I-37	Vaksinasi	25	$7,6 \pm 0,8^b$	6/25 ^c	19/25 ^d (76%)
	Kontrol	25	0	25/25	0/25 (0%)
I-269	Vaksinasi	25	$7,6 \pm 0,4$	2/25	23/25 (92%)
	Kontrol	25	0	25/25	0/25 (0%)
PTS-III	Vaksinasi	25	$7,5 \pm 0,6$	8/25	17/25 (68%)
	Kontrol	25	0	25/25	0/25 (0%)

Keterangan :

- a=HI: hemaglutinasi inhibisi
- b=Rata-rata titer ± standar deviasi
- c=Jumlah ayam yang mengekresikan virus (terinfeksi)/total ayam yang ditantang
- d=Jumlah ayam yang terlindung dari tantangan/total ayam yang ditantang

Gambar 1. Perkembangan titer antibodi terhadap virus *infectious bronchitis* pada ayam pedaging yang memperoleh vaksinasi dengan vaksin hidup (H-120) dan vaksin inaktif (Balitvet) dengan interval tiga minggu

Hasil penantangan terhadap kelompok ayam yang divaksinasi dan yang tidak divaksinasi bervariasi, bergantung pada virus penantang (Tabel 3). Namun demikian, semua ayam kontrol yang ditantang dengan ketiga isolat virus IB mengekskresikan virus penantang, sehingga tidak memiliki kekebalan (Tabel 3). Sebaliknya, kelompok ayam yang divaksinasi hanya sedikit yang mengekskresikan virus penantang. Kelompok vaksinasi yang ditantang dengan virus IB isolat I-269 memiliki tingkat proteksi tertinggi (92%), diikuti dengan kelompok vaksinasi yang ditantang dengan isolat I-37 (76%) dan isolat PTS-III (68%) (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Infectious bronchitis (IB) di Indonesia diketahui telah menyebar di berbagai daerah yang banyak memiliki industri perunggasan, dengan tingkat prevalensi sekitar 40-60% (DARMINTO *et al.*, 1988). Karena IB disebabkan oleh virus, sehingga tidak ada obatnya, maka pengendalian IB hanya mengandalkan pada pencegahan melalui program vaksinasi. Adanya variasi antigen di antara serotipe-serotipe virus IB cukup menyulitkan pelaksanaan vaksinasi di lapangan, karena serotipe virus IB memiliki tingkat proteksi silang yang sangat rendah satu sama lain (HOFSTAD, 1984; ENDO-MUNOZ dan FARAGHER, 1989). Akibatnya, vaksin IB yang mengandung serotipe tertentu hanya efektif untuk mencegah serangan IB dari serotipe yang sama atau virus IB yang sangat dekat hubungan antigenitasnya. Oleh sebab itu, vaksin IB yang ideal adalah yang dipersiapkan dari isolat lokal.

Sejauh ini di Indonesia diketahui terdapat lebih dari satu serotipe virus IB. Dari hasil studi antigenisitas beberapa isolat lokal virus IB di Indonesia, DARMINTO (1995) mengidentifikasi tiga serotipe virus IB, yakni serotipe Massachusetts, Connecticut dan virus IB varian yang tidak termasuk ke dalam salah satu dari kedua serotipe yang disebutkan terhadulu. Isolat virus IB yang terakhir ini lebih dekat hubungan antigenisitasnya dengan virus IB dari Australia. Karena baru diketahui tiga serotipe, maka masih cukup ideal untuk mengembangkan vaksin IB inaktif yang berisi tiga isolat lokal virus IB untuk memperluas spektrum imunitasnya.

Vaksin IB inaktif isolat lokal yang dikembangkan dalam penelitian ini berisi virus IB isolat I-37 (termasuk serotipe Conn), I-269 (serotipe Mass) dan PTS-III yang merupakan IB varian. Dalam proses pembuatannya ketiga virus tersebut masing-masing ditumbuhkan pada telur SPF, kemudian dipanen dan dinaktifkan dengan formalin. Proses inaktivasi berjalan dengan efektif, sehingga melalui uji viabilitas dapat dipastikan bahwa semua virus IB telah inaktif. Tidak terdeteksinya virus IB setelah proses inaktivasi ditunjukkan oleh titer virus negatif setelah inaktivasi dan tidak ada pertumbuhan virus pada telur SPF meskipun telah dipasase dua kali (Tabel 1).

Setelah inaktivasi sempurna, virus dipersiapkan sebagai vaksin dengan diemulsikan dengan ajuvan minyak. Terhadap vaksin yang sudah jadi kemudian dilakukan uji keamanan dan potensi sesuai dengan prosedur standar yang tertuang dalam Farmakope Obat Hewan Indonesia (ANON., 1998) dan berlaku bagi industri obat hewan di seluruh Indonesia.

Dalam uji keamanan diketahui bahwa vaksin IB yang diproduksi dengan prosedur di atas ternyata telah memenuhi persyaratan keamanan suatu vaksin, karena dalam uji keamanan kelompok ayam yang mendapat vaksinasi dua kali dengan interval 2 minggu tidak memperlihatkan reaksi negatif, baik yang bersifat sistemik maupun lokal. Kondisi ayam yang disuntik vaksin inaktif sama sehatnya dengan kondisi ayam kontrol yang tidak divaksinasi.

Di samping keamanan memenuhi persyaratan, vaksin inaktif ini ternyata juga memenuhi standar potensi vaksin untuk vaksin IB inaktif. Dalam uji potensi, kelompok ayam yang divaksinasi memperlihatkan terjadinya kekebalan, yang dibuktikan dengan terbentuknya antibodi yang mula-mula rendah (setelah vaksinasi pertama) kemudian meningkat pada pemeriksaan setelah vaksinasi kedua, sedangkan kelompok ayam kontrol tetap tidak memproduksi antibodi sampai akhir pengamatan (Tabel 2). Pada akhir percobaan, titer antibodi dari kelompok vaksinasi jauh lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, bahkan perbedaannya melebihi empat kali lipat. Hasil pengujian ini menunjukkan bahwa vaksin IB inaktif yang terdiri atas tiga isolat lokal tersebut memiliki potensi yang baik.

Setelah vaksin tersebut diketahui aman dan poten, maka perlu dilakukan pengujian praktis untuk mengetahui tingkat proteksi yang dihasilkan. Hasil uji efikasi semakin meneguhkan keefektifan vaksin inaktif tersebut dalam melindungi ayam terhadap serangan virus IB.

Dalam uji efikasi, ayam-ayam percobaan memiliki titer antibodi yang tinggi pada saat mereka berumur 1 hari (Gambar 1). Titer antibodi ini kemudian menurun terus hingga mencapai titer sekitar 1 (HI-Log₂) pada

umur 2 minggu. Antibodi yang terdeteksi pada anak-anak ayam muda ini adalah antibodi maternal yang diturunkan dari induk kepada anaknya sebagaimana juga pernah diamati dalam penelitian terdahulu (DARMINTO, 1995).

Kelompok ayam yang divaksinasi dengan vaksin IB aktif galur H-120 pada umur 2 minggu kemudian dibooster dengan vaksin IB inaktif produk Balitvet memperlihatkan pembentukan antibodi dengan titer tinggi yang mampu melindungi ayam dari tantangan virus IB aktif galur lapangan. Namun demikian, data menunjukkan bahwa tingkat proteksi yang dapat dicapai oleh vaksin inaktif ini agak bervariasi, yakni vaksin ini memberikan tingkat proteksi paling tinggi (92%) terhadap isolat I-269 yang termasuk serotipe Massachusetts, kemudian disusul isolat I-37 (76%) yang masuk dalam serotipe Connecticut dan PTS-III (68%) yang merupakan virus IB varian.

Dalam uji efikasi ini kriteria kekebalan masih didasarkan pada tidak adanya reekresi virus penantang pada ayam yang mendapat vaksinasi. Meskipun kriteria ini mendukung analisis, namun sebenarnya akan lebih tajam bila kriteria kekebalan ini didasarkan pada pengaruhnya terhadap produksi, terutama produksi telur. Oleh sebab itu, pada penelitian tahap selanjutnya perlu dilakukan uji efikasi pada ayam petelur.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa: (1) vaksin IB inaktif isolat lokal yang dikembangkan oleh Balitvet memenuhi persyaratan keamanan dan potensi sebagai vaksin IB inaktif; dan (2) pemakaian vaksin IB inaktif pada ayam pedaging sebagai vaksinasi ulangan (*booster*) dapat merangsang pembentukan antibodi tinggi yang mampu memberi perlindungan terhadap virus IB penantang dengan tingkat proteksi tinggi.

Karena virus IB berperan besar dalam menyebabkan penurunan produksi telur, maka disarankan untuk melakukan uji efikasi pada ayam petelur dengan menggunakan produksi telur sebagai parameter kekebalan.

DAFTAR PUSTAKA

ALEXANDER, D.J., W.H. ALLAN, P.M. BIGGS, C.D. BRACEWELL, J.H. DARBYSHIRE, P.S. DAWSON, A.H. HARRIS, F.T.W. JORDAN, I. MACPERSON, J.B. MCFERRAN, C.J. RANDAL, J.C. STUART, O. SWARBRICK, and G.P. WILDING. 1983. A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.* 113: 64.

ANONIMOUS. 1998. Famakope Obat Hewan Indonesia. Jilid I: Bahan Biologik.

ANONIMOUS. 1985. *Index Obat Hewan Indonesia*. Edisi I. Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian, Jakarta. pp. 110-133.

CHUBB, R.C. 1988 The strategic defense of the bird against infectious bronchitis nephritis. In : *Poultry Disease*. Proceedings No. 112, Second Asian/Pacific Poultry Health Conference, Surfers Paradise, Australia. pp. 337-348.

DARMINTO, P. YOUNG, P. RONOARDJO, and P.W. DANIELS. 1988. Studies on avian infectious bronchitis in Indonesia. Isolation of the virus and serological investigation. In : *Poultry Diseases*. Proceeding No. 112 Second Asian/Pacific Poultry Health Conference, Surfers Paradise, Australia. pp. 581-591.

DARMINTO. 1988. Avian infectious bronchitis in kampung chickens: A preliminary investigation in the district of Bogor by means of serological survey. *Penyakit Hewan* 35: 16-19.

DARMINTO. 1995. Diagnosis, Epidemiology and Control of Two Major Avian Viral Respiratory Diseases in Indonesia: Infectious Bronchitis and Newcastle Disease. PhD Thesis. Department of Biomedical and Tropical Veterinary Science, James Cook University of North Queensland, Townsville, Australia.

DAVELAAR, F.G., B. KOUWENHOVEN, and A.G. BURGER. 1986. The diagnosis and control of infectious bronchitis variant infection. In: *Acute Virus Infection of Poultry* (eds J. B. MCFERRAN and M. S. McNULTY). Martinus Nijhoff Publishers, Lancaster. pp. 103-121.

ENDO-MUNOZ, L.B. and J.T. FARAGHER. 1989. Avian infectious bronchitis: Cross-protection studies using different Australian subtypes. *Aust. Vet. J.* 66: 345-348.

GELB, J.JR., B.E. PERKINS, J.K. ROSENBERGER, and P.H. ALLEN. 1981. Serologic and cross-potection studies with several infectious bronchitis virus isolates from Delmarva-reared broiler chickens. *Avian Dis.* 25:655-666.

HOFSTAD, M.S. 1984. Avian infectious bronchitis. In : *Diseases of Poultry*, 8th edition, (eds. M.S. HOFSTAD, H.J. BARNES, B.W. CALNEK, W.M. REID, and H.W.Jr. YODER). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp. 429-443.

LASHGARI, M.S. and J.A. NEWMAN. 1981. Preparing hemagglutinating antigen from isolates of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 26: 508-519.

MUNEER, M.A., D.A. HALVORSON, V. SIVANANDAN, J.A. NEWMAN, and C.N. COON. 1986. Effect of infectious bronchitis virus (Arkansas strain) on laying chickens. *Avian Dis.* 30(4):644-647.

- MURPHY, F.A. and D.W. KINGSBURY. 1990. Virus taxonomy. *In* : *Fields Virology*, 2nd ed., Vol. 1 (eds. B.N. FIELDS, D.M. KNIPE, R.B. CHANOCK, M.S. HIRSCH, J.L. MELNICK, T.P. MONATH, B. ROIZMAN). Raven Press, New York. pp. 9-35.
- REED, V.L. and H. MUENCH. 1938. A simple methods of estimating fifty percent endpoint. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.

