

**LAPORAN  
PENELITIAN HIBAH PROYEK DUE-LIKE  
Tahun Anggaran 2003**



**EKSPRESI *CASPASE* 10  
PADA BURSA AYAM YANG DIINFEKSI VIRUS  
GUMBORO  
SEBAGAI DASAR PENENTUAN BAHAN  
PENGENDALI APOPTOSIS**

**Ketua Peneliti**

**Ajik Azmijah, drh, SU**

**Fakultas Kedokteran Hewan**

**Universitas Airlangga**

**Desember, 2003**

## HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN HIBAH PROYEK DUE-LIKE

---

JUDUL : EKSPRESI CASPASE 10 PADA BURSA  
AYAM YANG DIINFEKSI VIRUS  
GUMBORO SEBAGAI DASAR  
PENENTUAN BAHAN PENGENDALI  
APOPTOSIS

Ketua Peneliti

Nama : Ajik Azmijah, drh, SU  
Jenis Kelamin : Perempuan  
Pangkat / Golongan : Pembina/ IV A  
NIP : 130 697 556  
Jabatan : Lektor Kepala  
Fakultas / Jurusan / Puslit : Kedokteran Hewan

Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Jangka Waktu Penelitian : 6 bulan

Biaya yang diajukan : Rp 30.000.000,-


Surabaya, 29 Desember 2003

Ketua Peneliti,




Ajik Azmijah, drh, SU  
NIP. 130 697 556

Mengetahui  
Dekan FK H-Unair,

  
Prof. Dr. Ismudiono, drh, MS  
NIP. 130 687 297

Menyetujui,  
Direktur Eksekutif LPIU Unair

  
Tjitjik Sri Tjahjandari PhD  
NIP 131801601

## SUMMARY

Caspase-10 expression research in chicken bursae infected by Gumboro virus as a basic to decide apoptotic blocking agent was done at Laboratory of Veterinary Pathology and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University, Tropical Disease Center, Airlangga University and Pusvetma since June 2003 till December 2003.

The purpose of this research was to prove that in Gumboro virus infection, caspase-10 able to induce apoptosis of bursae cells and to describe the apoptotic protein initiator character of bursae. First step of this research was examination of the increasing of apoptotic cell number and caspase-10 expression of chicken bursae infected by Gumboro virus at 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days post infection. Staining method for examined apoptotic cells was peroxidase used Apoptag kit and for examined the caspase -10 expression was immunohistochemistry. Next step, describe the apoptotic protein initiator character of bursae by analyse used SDS-PAGE method and immunoblotting.

Our results show that after infection with Gumboro virus, the number of apoptotic bursae cells and the level of caspase -10 expression in the bursae increase, and the caspase-10 proved to induce apoptosis. In immunoblotting both of treatment and control samples show positive reaction with antichickens caspase 10 antibody polyclonal and create the band.

## RINGKASAN

Penelitian Ekspresi *Caspase* 10 pada Bursa Ayam yang Diinfeksi Virus Gumboro Sebagai Dasar Penentuan Bahan Pengendali Apoptosis, telah dilakukan di Laboratorium Patologi Veteriner dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Tropical Disease Center Universitas Airlangga, dan Pusat Veterinaria Farma, mulai bulan Juni 2003 dan berakhir pada bulan Desember 2003 .

Pemelitian ini bertujuan membuktikan bahwa pada infeksi virus Gumboro, *Caspase* 10 dapat menginduksi apoptosis sel bursa dan mengetahui karakter protein inisiator apoptosis pada bursa tersebut. Adapun tahap penelitian yang dilakukan adalah pemeriksaan peningkatan jumlah sel apoptotik dan ekspresi *caspace* 10 pada bursa ayam yang diinfeksi virus Gumboro, yaitu pada hari ke 2, 4, 6, 8, dan 10 setelah infeksi. Metode pewarnaan yang digunakan adalah imunohistokimia untuk pemeriksaan ekspresi *caspace* 10 dan peroksidase dengan menggunakan kit Apoptag untuk pemeriksaan sel apoptotik. Tahap berikutnya adalah karakterisasi protein inisiator apoptosis pada bursa dengan cara analisis menggunakan SDS-PAGE dilanjutkan dengan imunobloting.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa, terdapat peningkatan jumlah sel apoptotik dan sel yang mengekspresikan *caspace* 10 pada bursa ayam yang diinfeksi virus Gumboro, serta terbukti bahwa *caspace* 10 dapat menginduksi apoptosis. Pada imunobloting, sampel dari perlakuan maupun kontrol bereaksi positif dengan antibodipoliklonal anti chicken *caspace* 10, dan membentuk *band*.

## **Kata Pengantar**

Puji syukur kehadirat Allah, karena dengan rahmatNya lah , akhirnya kami dapat menyelesaikan penulisan Laporan Penelitian Hibah Proyek Due-Like ini. Kami mengucapkan terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Ketua Tim Hibah Proyek Due- Like yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk mengembangkan ilmu khususnya di bidang Patologi Molekuler melalui penelitian berbasis Immunopatologi dan Biologi Molekuler.

Adapun sebagai obyek penelitian kami tertarik pada penyakit Gumboro yang , sampai saat ini masih merupakan masalah bagi industri perunggasan. Penyakit Gumboro merupakan salah satu penyakit viral pada unggas yang bersifat immunosupresif sehingga menimbulkan kegagalan vaksinasi dan kematian akibat infeksi sekunder. Harapan kami, dengan pelaksanaan penelitian ini, akan memperluas wawasan dan menambah gairah kerja, belajar, serta memperdalam ilmu bagi dosen maupun mahasiswa. Selain itu, hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam upaya penanggulangan penyakit Gumboro.

Pada kesempatan ini kami juga mengucapkan terima kasih kepada Novia Yuli Astuti, Yudi Prasetya, dan Laili, mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan yang terlibat secara aktif dalam pelaksanaan penelitian ini.

Kami menyadari sepenuhnya akan suatu keterbatasan, maka saran dan kritik sangat kami harapkan demi kesempurnaan penulisan laporan penelitian ini.

Surabaya, 29 Desember 2003

Penulis

## DAFTAR ISI



BAB

	Halaman
SUMMARY .....	iii
RINGKASAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR LAMPIRAN .....	x
I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	3
1.3 Manfaat Penelitian .....	3
II TINJAUAN PUSTAKA .....	4
2.1 Penyakit Gumboro .....	4
2.2 Respons Imun terhadap Virus .....	6
2.3 Apoptosis dan Deteksi Sel Apoptotik .....	7
2.4 Caspase dan Peran Caspase 10 pada Apoptosis .....	10
III METODE PENELITIAN .....	13
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	13
3.2 Bahan Penelitian .....	13
3.3 Prosedur Penelitian .....	14
IV HASIL PENELITIAN .....	16
4.1 Jumlah Sel Bursa yang Mengekspresikan <i>Caspase</i> 10 .....	16

4.2 Jumlah Sel Apoptotik .....	17
4.3 Pengaruh <i>Caspase</i> 10 Terhadap Apoptosis .....	19
4.4 Karakterisasi <i>Caspase</i> Inisiator Apoptosis Sel Bursa .....	20
V PEMBAHASAN .....	23
5.1 Jumlah Sel Bursa yang Mengekspresikan <i>Caspase</i> 10 .....	23
5.2 Jumlah Sel Apoptotik .....	24
5.3 Pengaruh <i>Caspase</i> 10 Terhadap Apoptosis .....	25
5.4 Karakterisasi <i>Caspase</i> Inisiator Apoptosis Sel Bursa .....	25
VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	27
6.1 Kesimpulan .....	27
6.2 Saran .....	27
DAFTAR PUSTAKA .....	28
LAMPIRAN .....	31
Lampiran 1 : Gambar hasil foto pengamatan mikroskopik .....	31
Lampiran 2 : Cara Kerja SDS-PAGE .....	36
Lampiran 3 : Cara Kerja Immunobloting .....	39
Lampiran 4 : Cara Kerja Pengecatan Imunohistokimia .....	40
Lampiran 5 : Cara Kerja Pengecatan Dengan Kit Apoptag .....	42
Lampiran 6 : Analisis statistik .....	44

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 : Apoptosis sel terinfeksi virus melalui stimulasi CTL.....	12
Gambar 4.1-4.2: Foto hasil elektroforesis protein bursa pada infeksi virus Gumboro.....	20
Gambar 4.3 : Hasil pengujian caspase 10 bursa dengan antibodi poliklonal pada pemeriksaan Western-Imunobloting ( Sampel hari : II, IV, VI ).....	21
Gambar 4.5 : Hasil pengujian caspase 10 bursa dengan antibodi poliklonal pada Pemeriksaan Western-Imunobloting ( Sampel hari : VI, VIII, X ).....	22



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1: Hasil analisis statistik jumlah sel bursa ayam yang mengekspresikan <i>caspase</i> 10 pada hari ke 2,4,6,8, dan 10 setelah infeksi virus Gumboro ..	16
Tabel 4.2: Hasil analisis statistik jumlah sel bursa ayam yang mengekspresikan <i>caspase</i> 10 pada perlakuan infeksi virus Gumboro dan kontrol.....	16
Tabel 4.3: Hasil analisis statistik jumlah sel bursa yang mengekspresikan <i>caspase</i> 10 pada infeksi virus Gumboro dengan kombinasi hari dan perlakuan. ...	17
Tabel 4.4 : Hasil analisis statistik jumlah sel bursa yang mengalami apoptosis pada hari ke 2,4,6,8, dan 10 setelah infeksi virus Gumboro. ....	18
Tabel 4.5: Hasil analisis statistik jumlah sel bursa ayam yang mengalami apoptosis pada perlakuan infeksi virus Gumboro dan kontrol. ....	18
Tabel 4.6: Hasil analisis statistik jumlah sel bursa yang mengalami apoptosis pada infeksi virus Gumboro dengan kombinasi hari dan perlakuan. ...	19

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Gambar hasil foto pengamatan mikroskopik .....	31
Gambar 1: Sel bursa dengan kandungan caspase 10 dalam sitoplasma pada kelompok kontrol .....	31
Gambar 2: Ekspresi caspase 10 yang berlebihan pada bursa pada kelompok perlakuan hari keempat setelah infeksi virus Gumboro .....	32
Gambar 3: Ekspresi caspase 10 pada bursa kelompok perlakuan hari kesepuluh setelah infeksi virus Gumboro .....	32
Gambar 4: Bursa pada kelompok kontrol dengan folikel limfoid yang masih penuh	32
Gambar 5: Inti sel apoptotik tercatat coklat gelap .....	33
Gambar 6: Peningkatan apoptosis sel bursa pada kelompok perlakuan hari keempat setelah infeksi virus Gumboro .....	34
Gambar 7: Penurunan apoptosis sel bursa pada kelompok perlakuan pada hari kesepuluh setelah infeksi virus Gumboro .....	34
Gambar 8: Apoptosis sel bursa pada kelompok kontrol .....	35
Lampiran 2 : Cara Kerja SDS-PAGE .....	36
Lampiran 3 : Cara Kerja Immunoblotting .....	39
Lampiran 4 : Cara Kerja Pengecatan Imunohistokimia .....	40
Lampiran 5 : Cara Kerja Pengecatan Dengan Kit Apoptag .....	42
Lampiran 6 : Analisis statistik .....	44

## BAB I

### PENDAHULUAN



#### 1.1 Latar Belakang

Penyakit Gumboro merupakan penyakit viral pada unggas yang disebabkan oleh Avibirnavirus. Penyakit ini bersifat akut, sangat menular dan immunosupresif, sehingga angka morbiditasnya mencapai 100% dan angka mortalitas 0-2% yang dapat meningkat bila diikuti dengan infeksi sekunder. Penyakit ini merupakan masalah bagi industri perunggasan sejak lama, terutama karena sifat immunosupresif yang menyebabkan peningkatan kepekaan terhadap infeksi oportunistik, dan kegagalan vaksinasi (Becht and Muller, 1991 ; Kibenge *et al*, 1988), selain itu setelah muncul virus Gumboro yang bersifat ganas sejak tahun 1986 di berbagai negara Eropa dan Asia (Nunoya *et al.*, 1992) termasuk di Indonesia, masalah jadi semakin kompleks. Wabah yang terjadi di Indonesia pada tahun 1991 menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar karena penyakit ini dapat menimbulkan gejala klinik dan menyebabkan kematian sampai 60% pada ayam petelur dara terutama bila diikuti dengan infeksi sekunder (Parede, 1993).

Organ sasaran virus Gumboro adalah bursa Fabricius pada perkembangan maksimum. Bursa Fabricius merupakan sumber spesifik limfosit B pada unggas. Menurut van den Berg *et al* (1991) dan Nunoya *et al* (1992), keparahan penyakit berhubungan langsung dengan jumlah sel peka yang ada di bursa Fabricius, oleh karena itu umur kepekaan paling tinggi adalah antara tiga sampai enam minggu ketika bursa Fabricius pada perkembangan maksimum. Tanimura *et al* (1998) dan Jungmann *et al* (2001) menjelaskan bahwa setelah virus sampai di bursa Fabricius kemudian diikuti pengosongan limfosit bursa akibat nekrosis dan apoptosis.

Menurut Nieper *et al* (1999), terdapat hubungan antara apoptosis dengan replikasi virus di sel bursa Fabricius. Adapun selanjutnya menurut Tanimura and Sharma (1998) pengosongan limfosit bursa Fabricius ini dapat permanen, akibatnya, walaupun terjadi penyembuhan, inang tetap mengalami immunosupresi.

Masalah utama pada infeksi virus Gumboro yang perlu mendapatkan perhatian adalah immunosupresi yang timbul. Beberapa hasil penelitian membuktikan bahwa kontribusi terbesar terjadinya immunosupresi adalah dari pengosongan sel limfoid pada bursa akibat infeksi yang berupa apoptosis dan nekrosis. Rautenschlein, *et al* (2002) mengungkapkan bahwa untuk destruksi sel bursa dibutuhkan peran limfosit T. Sedangkan menurut Goldsby *et al.*, (2000), limfosit T sitotoksik dan sel NK dapat menimbulkan lisis pada sel target melalui pengeluaran perforin dan *granzyme*. Perforin merupakan enzim yang mampu membentuk celah pada membran sel target sehingga kemudian *granzyme* dapat menerobos masuk untuk melisis sel tersebut (Abbas, 2000). Setelah masuk sitoplasma sel target, *granzyme* akan dapat langsung mengaktifasi *caspase* 3 atau mengaktifasi *caspase* 10 kemudian aktifasi kaskade *caspase* yang selanjutnya memicu apoptosis.

Penanggulangan penyakit Gumboro di Indonesia selama ini adalah dengan pemberian vaksinasi yang teratur, terutama pada induk ayam bibit komersial dengan tujuan anak ayam memperoleh kekebalan yang cukup. Namun demikian, sampai sekarang belum ditemukan vaksin yang sesuai dengan strain yang ada (Dirjen Prod. Ternak, 2002), oleh karena itu masih sering dilaporkan kasus penyakit Gumboro di lapangan, terutama dampak immunosupresinya sehingga menimbulkan kematian yang tinggi akibat rentan terhadap penyakit lain.

Untuk menanggulangi dampak immunosupresi tersebut, maka diperlukan bahan aktif yang bersifat mengeblok apoptosis patologik. Dengan pembuktian induksi *caspase* 10 terhadap apoptosis ini, maka dapat ditentukan *blocking agent* terhadap apoptosis melalui penghambatan aktivasi *granzyme* pada *caspase* 10.

## 1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan membuktikan bahwa pada infeksi virus Gumboro, *Caspase* 10 dapat menginduksi apoptosis sel bursa Fabricius dan mengetahui karakter protein inisiator apoptosis dari bursa Fabricius tersebut.

Adapun tujuan khusus penelitian ini adalah :

1. Membuktikan bahwa pada infeksi virus Gumboro terdapat peningkatan ekspresi *caspase* 10 di bursa.
2. Membuktikan bahwa pada infeksi virus Gumboro, terdapat peningkatan jumlah sel apoptotik di bursa.
3. Karakterisasi *caspase* dari bursa Fabricius ayam yang diinfeksi dengan virus Gumboro.

## 1.3 Manfaat

Penelitian ini diharapkan bermanfaat sebagai dasar molekuler penanggulangan infeksi virus Gumboro, dan pencegahan infeksi oportunistik melalui penggunaan *blocking agent*. Karakterisasi dan pembuktian induksi *caspase* 10 terhadap apoptosis sel bursa pada infeksi virus Gumboro dapat digunakan sebagai dasar penentuan protein penghambat apoptosis melalui penghambatan aktivasi *granzyme* terhadap *caspase* 10.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Penyakit Gumboro

Penyakit Gumboro atau *infectious bursal disease (IBD)* adalah penyakit viral yang sangat infeksius pada ayam muda, menyerang jaringan limfoid dengan predileksi khusus yaitu bursa Fabricius. Penyakit ini merupakan masalah bagi industri perunggasan sejak lama, terutama karena sifat immunosupresif yang menyebabkan peningkatan kepekaan terhadap infeksi oportunistik, dan kegagalan vaksinasi (Becht and Muller, 1991 ; Kibenge *et al*, 1988). Masalah ini diperberat dengan kemunculan isolat baru yang memiliki perbedaan sifat dengan virus klasik, seperti yang muncul di beberapa negara di Eropa dan Asia termasuk Indonesia, yang bersifat ganas, dan di Amerika yang bersifat subklinis (Van den Berg, 2000).

Virus penyebab penyakit Gumboro tergolong dalam genus Avibirnavirus dan famili Birnaviridae. Sampai saat ini diketahui ada dua serotipe virus Gumboro, yaitu serotipe 1 yang menyerang ayam dan serotipe 2 menyerang kalkun. Serotipe 2 tidak menimbulkan masalah bagi peternakan karena tidak menimbulkan gangguan klinik yang berarti (Lukert and Saif, 1991).

Inang pilihan virus Gumboro adalah ayam muda. Pada ayam muda ini terjadi penyakit secara klinik, sedangkan infeksi pada unggas lebih tua biasanya menimbulkan penyakit subklinis. Inokulasi yang dilakukan pada spesies unggas lain tidak dapat menimbulkan penyakit (Mc Ferran, 1993).

Organ sasaran virus Gumboro adalah bursa Fabricius pada perkembangan maksimum. Bursa Fabricius merupakan sumber spesifik limfosit B pada unggas. Infeksi dengan virus virulen yang dilakukan terhadap ayam yang telah mengalami bursektomi tidak dapat menimbulkan penyakit (Hiraga *et al* , 1994). Menurut van den Berg *et al* (1991) dan Nunoya *et al* (1992), keparahan penyakit berhubungan langsung dengan jumlah sel peka yang ada di bursa Fabricius, oleh karena itu umur kepekaan paling tinggi adalah antara tiga sampai enam minggu ketika bursa Fabricius pada perkembangan maksimum.

Setelah infeksi oral atau inhalasi, virus bereplikasi pertama kali dalam limfosit dan makrofag *gut-associated tissues*, kemudian beredar melalui aliran darah menuju bursa Fabricius dan terjadi replikasi. Kira-kira 13 jam setelah inokulasi, sebagian besar folikel bursa Fabricius positif virus, 16 jam setelah inokulasi, terjadi viremia yang kedua dan berat disertai replikasi sekunder pada beberapa organ lain sehingga menimbulkan penyakit dan kematian (Muller *et al*, 1979). Lebih jauh Tanimura *et al* (1998) dan Jungmann *et al* (2001) menjelaskan bahwa setelah virus sampai di bursa Fabricius kemudian diikuti pengosongan limfosit bursa akibat nekrosis dan apoptosis. Menurut Nieper *et al* (1999), terdapat hubungan antara apoptosis dengan replikasi virus di sel bursa Fabricius. Adapun selanjutnya menurut Tanimura and Sharma (1998) pengosongan limfosit bursa Fabricius ini dapat permanen, akibatnya, walaupun terjadi penyembuhan, hos tetap mengalami immunosupresi.

Pada penelitian yang mengamati peran sel T pada imunopatogenesis dan penyembuhan jaringan pada infeksi virus Gumboro , Rautenschlein, *et al* (2002) mengungkapkan bahwa sel T fungsional dibutuhkan untuk mengatur muatan

antigen virus Gumboro pada fase akut , yaitu 5 hari setelah infeksi . Bursa Fabricius ayam dengan Tx-CsA (tritmen timektomi dan pemberian cyclosporinA) memiliki beban yang secara signifikan lebih tinggi dari pada ayam dengan sel T yang utuh . Tx-CsA menghilangkan respons inflamasi yang diinduksi virus Gumboro dan secara signifikan mengurangi kejadian apoptosis sel bursa jika dibandingkan dengan ayam yang memiliki sel T utuh Ayam dengan Tx-CsA menunjukkan resolusi lesi bursa akibat virus Gumboro yang secara signifikan lebih cepat daripada ayam dengan sel T utuh .

## 2.2 Respons Imun Terhadap Virus

Virus adalah mikroorganisme obligat yang berreplikasi di dalam sel dengan menggunakan asam nukleat dan perangkat sintesis protein hos (Abbas, 2000). Sel yang mengandung virus akan mendapat respons imun, yaitu diawali dengan respons imun alami kemudian diikuti respons imun adaptif. Respons imun alami terhadap infeksi virus pertama-tama melalui induksi interferon tipe I (IFN  $\alpha$  dan IFN  $\beta$ ) dan aktivasi sel NK. IFN  $\alpha$  dan IFN  $\beta$  dapat menginduksi respons antiviral atau menahan replikasi virus melalui ikatan terhadap reseptor IFN  $\alpha$  dan IFN  $\beta$ . Ikatan IFN  $\alpha$  dan IFN  $\beta$  dengan sel NK ini dapat menginduksi aktivitas lisis sehingga efektif dalam pembunuhan sel yang terinfeksi virus. Aktivitas sel NK ini diperkuat oleh IL-12. yaitu merupakan sitokin yang paling awal dalam respons terhadap infeksi viral (Goldsby, 2000). Adapun mekanisme anti viral berperantara sel secara umum melibatkan beberapa komponen yang meliputi ; CD8+ *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL) dan CD4+ sel *T helper* 1 (Th1). Sel Th 1 yang teraktifasi menghasilkan sejumlah sitokin yang meliputi IL-2, IFN- $\gamma$ , dan



TNF yang berfungsi menahan virus baik secara langsung maupun secara tidak langsung. IFN- $\gamma$  secara langsung menginduksi keadaan antiviral di dalam sel. IL-2 beraktifitas secara langsung dengan membantu penarikan *CTL precursor* ke dalam populasi efektor. IL-2 dan IFN- $\gamma$  mengaktifkan sel NK yang berperan penting dalam pertahanan tubuh selama beberapa hari sampai terbentuk respons CTL spesifik (Goldsby, 2000). CTL dan sel NK dapat menimbulkan lisis pada sel target melalui pengeluaran perforin dan *granzyme*. Perforin merupakan enzim yang mampu membentuk celah pada membran sel target sehingga kemudian *granzyme* dapat menerobos masuk untuk melisis sel tersebut (Abbas, 2000).

### 2.3 Apoptosis dan Deteksi Sel Apoptotik

Apoptosis merupakan program kematian sel melalui mekanisme genetik yang dapat terjadi secara fisiologik maupun patologik. Aktifitas enzim telomerase diketahui sangat berperan pada apoptosis fisiologik, sedangkan apoptosis patologik terjadi karena terdapat gangguan keseimbangan sistem genetik yang dipicu oleh faktor lingkungan, misalnya infeksi virus (Thomson, 1995). Apoptosis terjadi karena keterlibatan berbagai perangkat seluler yang disebut perangkat apoptotik. Komponen sentral dari perangkat apoptotik ini adalah suatu kelompok protease sistein yang disebut *caspase* (*Cystein Aspartyl-Specific Protease*). Sedangkan perangkat lainnya berupa beberapa molekul protein yaitu protein adaptor dan protein regulator yang bekerja sebagai pro atau antiapoptotik.

Proses apoptosis pertama kali dipelajari pada nematoda *Caenorhabditis elegans* melalui gen yang disebut gen CED (*Caenorhabditis elegans gene*). Mekanisme apoptosis dipicu oleh beberapa produk gen. Terdapat 3 gen esensial

yang berperan dalam proses apoptosis yaitu CED-3, CED-4 dan CED-9. CED-3 dan CED-4 mendorong terjadi apoptosis, sedangkan CED-9 berfungsi menghambat apoptosis. CED-3 merupakan suatu *caspase* yaitu suatu protease sistein yang dapat memecah protein pada posisi spesifik setelah residu asam aspartat pada rangkaian asam amino yang menyusun protein. Proses apoptosis dimulai dari CED-4 yang mengikat CED-3. Ikatan CED-4 pada CED-3 akan menyebabkan CED-3 teraktivasi sehingga proses apoptosis dimulai. CED-9 dapat mencegah apoptosis karena CED-9 dapat membentuk kompleks dengan CED-4 dan CED-3, sehingga CED-4 tidak dapat mengaktivasi CED-3, akibatnya apoptosis dapat dihambat (Adams *et al*, 1998). Menurut Ashkenazi and Dixit (1998), pada *caspase* mamalia juga dikenal CED-3. *Apaf-1* pada mamalia setara dengan CED-4, sedangkan *Bcl-2* identik dengan CED-9. *Caspase* merupakan enzim inaktif (proenzim) dengan berat molekul 30-50 kDa, dan berada di sitoplasma semua sel hewan. *Caspase* mempunyai daerah prodomain terminal NH<sub>2</sub>, sub unit besar (~20kd) dan subunit (~10 kd) (Reed, 2000). Pada manusia dan mencit terdapat 14 *caspase* yang telah berhasil diidentifikasi, yang dikelompokkan menurut sekuen asam amino yang sama atau spesifikasi proteasenya. Berdasarkan fungsinya *caspase* dibagi dua, yaitu *caspase* inisiator (*upstream* atau *inisiator caspase*) dan *caspase* efektor (*downstream* atau *effector caspase*). Peran *caspase* pada apoptosis belum sepenuhnya diketahui karena banyak sekali ditemukan substrat *caspase*, dan beberapa substrat tersebut diantaranya mengalami pemrosesan selama apoptosis. Substrat dari *caspase* efektor merupakan protein kinase. Sebagian besar *caspase* diperkirakan terlibat secara langsung dalam kematian sel, tetapi tidak semua *caspase* terlibat dalam

apoptosis. *Caspase* yang terlibat dalam apoptosis antara lain *caspase* 2, 8, 9, 10 yang tergolong *caspase* inisiator, dan *caspase* 3, 6, 7 yang tergolong *caspase* eksekutor. Sedangkan *caspase* 1, 4, 5 merupakan *caspase* yang terlibat dalam proses inflamasi (Reed, 2000).

Sel yang mengalami apoptosis dengan pengecatan hematoksilin eosin akan tampak sebagai masa yang oval atau bulat dengan sitoplasma eosinofilik, kromatin yang padat dan terfragmentasi ( Cotran, 1999 ). Perubahan morfologik sel yang mengalami apoptosis sangat sulit ditemukan dengan perubahan yang tampak hanya berlangsung kurang dari satu jam sebelum sel tersebut didegradasi. Kematian sel karena apoptosis, terjadi pada satu sel secara individual atau kelompok kecil. Berbeda dengan nekrosis yang merupakan kematian sebagian jaringan. Selain itu apoptosis tidak memicu inflamasi seperti nekrosis.

Pada jaringan yang mengalami regenerasi sebanyak 25 % tiap hari, hanya dapat ditemukan sel apoptosis sebanyak 2-3 % (Burch *et al* , 1990). Pengembangan metode pemeriksaan apoptosis melalui fragmentasi DNA telah dilakukan untuk mengatasi kesulitan deteksi apoptosis. Salah satu metode tersebut adalah dengan menggunakan *Tunel assay (terminal deoxyuridine nucleotide and labelling assay)*. Fragmen DNA dideteksi dengan pelabelan secara enzimatik dari ujung 3' OH dengan nukleotida. Ujung fragmen DNA ini banyak ditemukan pada inti sel yang mengalami apoptosis dan pada *apoptotic bodies*. Tunel assay dapat mendeteksi stadium awal dari apoptosis karena fragmentasi DNA terjadi sebelum perubahan morfologik tampak pada sediaan histologik (Hetts, 1998).

## 2.4 *Caspase* dan Peran *Caspase* 10 pada Apoptosis

*Caspase* merupakan enzim inaktif (proenzim) dengan berat molekul 30-50 kDa, dan berada di sitoplasma semua sel hewan. *Caspase* mempunyai daerah prodomain terminal NH<sub>2</sub>, sub unit besar (~20kd) dan subunit (~10 kd) (Reed, 2000).

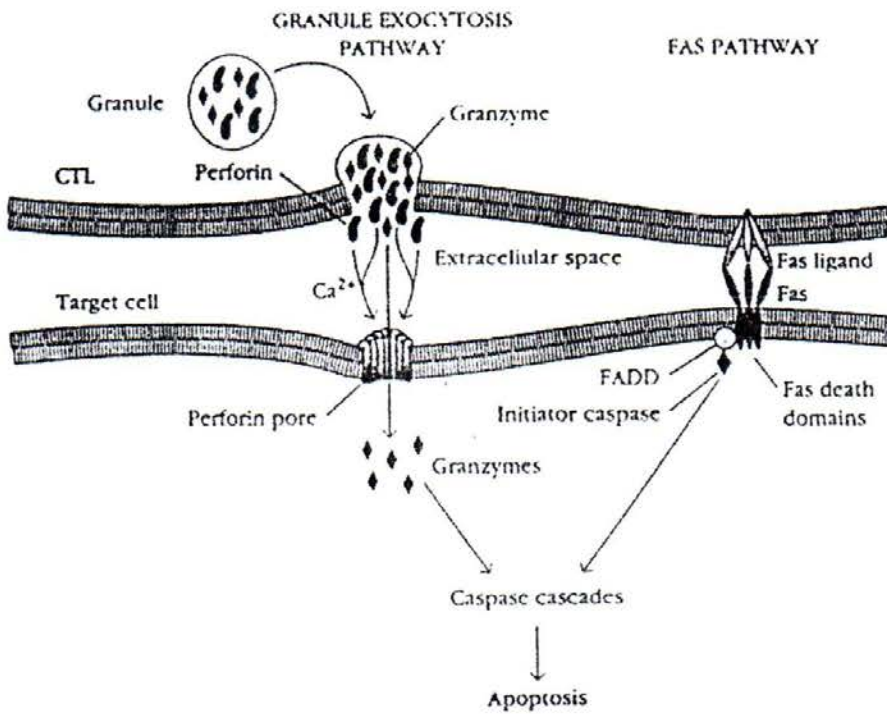
Pada manusia dan mencit terdapat 14 *caspase* yang telah berhasil diidentifikasi, yang dikelompokkan menurut sekuen asam amino yang sama atau spesifikasi proteasenya. Berdasarkan fungsinya *caspase* dibagi dua, yaitu *caspase* inisiator (*upstream* atau *inisiator caspase*) dan *caspase* efektor (*downstream* atau *effector caspase*).

Peran *caspase* pada apoptosis belum sepenuhnya diketahui karena banyak sekali ditemukan substrat *caspase*, dan beberapa substrat tersebut diantaranya mengalami pemrosesan selama apoptosis. Substrat dari *caspase* efektor merupakan protein kinase. Sebagian besar *caspase* diperkirakan terlibat secara langsung dalam kematian sel, tetapi tidak semua *caspase* terlibat dalam apoptosis. *Caspase* yang terlibat dalam apoptosis antara lain *caspase* 2, 8, 9, 10 yang tergolong *caspase* inisiator, dan *caspase* 3, 6, 7 yang tergolong *caspase* eksekutor. Sedangkan *caspase* 1, 4, 5 merupakan *caspase* yang terlibat dalam proses inflamasi (Reed, 2000).

Peran *Caspase* 10 pada apoptosis terkait erat dengan aktivasi *granzyme*. Apabila sel terinfeksi virus, maka virus dikenali oleh APC kemudian dipresentasikan bersama molekul MHC I. Reseptor pada CTL mengenali molekul MHC I kemudian terjadi proses kematian sel yang melalui 2 mekanisme, yang pertama CTL membentuk ikatan dengan sel target melalui ikatan Fas ligan pada

CTL dengan Fas sel target. Adapun mekanisme yang kedua, CTL melepas protein eksositotoksin yang didahului konyugasi antara integrin reseptor LFA-1 pada membran CTL dengan *intercellular cell adhesion molecule* ( ICAMS ) pada membran sel target. Sementara itu *Co-stimulatory Signal B 7* mengaktivasi CTL-P menjadi CTL efektor aktif. CTL efektor aktif tersebut mengaktivasi badan golgi dan *storage granule center* untuk memproduksi granul enzim yang berisi monomer 32-65 k DA yang disebut perovrin dan beberapa *cytotoxic serine protease* yang disebut *granzyme* atau *fragmentin* segera menuju *junction* kedua sel tersebut. Selain pada CTL, granul enzim ini juga terdapat pada sel NK. Granul enzim yang dihasilkan CTL dan sel tersebut bekerja sinergis, perforin membentuk lubang pada membran sel target yang merupakan pintu masuk *granzyme* ke dalam sel target. Setelah *granzyme* masuk ke dalam sitoplasma sel target, *granzyme* menjalankan fungsi *lethal effects* dengan mengaktifkan *proapoptotic cystein protease* ( *caspase* ) ( Browne, 1999 ). Menurut Atkinson (1998), di dalam sitoplasma sel target, *granzyme* B dapat mengalami pembelahan dan mengaktifkan *caspase* 3 secara langsung atau melalui *caspase* 10. Kemudian melalui kaskade *caspase* akhirnya memicu fragmentasi DNA inti dan terjadi apoptosis.

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA



Gambar 2.1: Apoptosis sel terinfeksi virus melalui stimulasi CTL ( Goldsby, 2000 ).

### **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Periode pelaksanaan penelitian mulai bulan Juni 2003, berakhir bulan Desember 2003 di laboratorium Patologi dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Tropical Disease Center Universitas Airlangga, dan Pusat Veterinaria Farma.

#### **3.2 Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Hewan Coba**

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah ayam broiler umur 21 hari yang diperoleh dari PT Reza Perkasa Breeding Farm.

##### **3.2.2 Unit Analisis**

Unit analisis pada penelitian ini adalah bursa Fabricius ayam .

##### **3.2.3 Virus Gumboro**

Untuk mendapatkan infeksi Virus Gumboro, digunakan isolat Tasik yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma.

### 3.2.4 Alat Penelitian

Preparasi bursa diperlukan alat-alat nekropsi, selanjutnya untuk pemrosesan jaringan dan pembuatan sediaan dan pemeriksaan mikroskopik diperlukan mikrotom, dehidrasi otomatis, staining jar, oven, mikroskop, dan foto mikroskop. Untuk karakterisasi *caspase* inisiator apoptosis diperlukan; sonikator, sentrifus, ultrasentrifus, aparatus elektroforesis, blotter, spektrofotometer, freezer, dan kolom kromatografi.

### 3.2.5 Bahan Habis

Bahan habis yang digunakan untuk sediaan mikroskopik adalah sebagai berikut; Formalin buffer, alkohol absolut, xylol, parafin histosec, parafin blok, akuabides, dako asesoris, antibodi poliklonal chicken anti *caspase* 10, DAB, proteinase K, dan dako kit apoptag. Untuk karakterisasi dibutuhkan PBS, Tris amonium khlorit , protease inhibitor, bis akrilamid, akrilamid, SDS, twen, bufer substrat, dan bahan untuk kolom kromatografi.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Ayam umur 21 hari sebanyak 50 ekor secara random dibagi menjadi 10 kelompok yang terdiri dari 5 kelompok perlakuan dan 5 kelompok kontrol. Untuk mendapatkan infeksi virus Gumboro, 5 kelompok perlakuan diinokulasi dengan virus Gumboro isolat lapang secara intraocular, intracloacal, dan per oral dengan dosis 1000 EID 50/ml. Kemudian secara bertahap tiap-tiap kelompok dari



kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dikorbankan, yaitu berturut-turut 2, 4, 6, 8, dan 10 hari setelah inokulasi.

Setelah ayam dikorbankan, bursa Fabricius diambil dibelah menjadi dua bagian kemudian dipersiapkan untuk pembuatan sediaan mikroskopik dan karakterisasi *caspase* inisiator apoptosis. Untuk sediaan mikroskopik, bursa difiksasi dengan formalin buffer, sedangkan untuk karakterisasi protein, bursa disonikasi kemudian dicentrifuge, selanjutnya supernatan dipersiapkan untuk SDS-PAGE dan imunobloting . Sediaan mikroskopik kemudian diproses dengan teknik pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi poliklonal anti *caspase* 10, untuk pemeriksaan terhadap ekspresi *caspase* 10 (Lampiran 4 , hal. 40). Sedangkan untuk sel apoptotik digunakan metode peroksidase dengan kit apoptag dari Dako (Lampiran 5, hal 42). Selanjutnya dilakukan karakterisasi *caspase* dengan kolom kromatografi (Lampiran 2, hal. 36 dan Lampiran 3, hal. 39).

Pengamatan peningkatan jumlah sel apoptotik dan ekspresi *caspase* 10 dengan cara penghitungan sel di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 X pada 5 lapangan pandang. Sel apoptotik tampak sebagai sel dengan inti berwarna coklat gelap ( Lampiran 1, Gambar 5, hal. 33), sedangkan ekspresi *caspase* 10 dapat diukur dengan penghitungan sel dengan sitoplasma coklat kekuningan (Lampiran 1, Gambar 1, hal. 31).

Hasil penghitungan sel apoptotik dan ekspresi *caspase* 10 diolah dengan analisis statistik univariat dan untuk melihat pengaruh *caspase* 10 terhadap apoptosis dilakukan uji regresi (lampiran 6, hal. 44).

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

#### 4.1 Jumlah Sel Bursa yang Mengekspresikan *Caspase* 10

Hasil pemeriksaan sel bursa yang mengekspresikan *caspase* 10 pada sediaan mikroskopik dengan pengecatan imunohistokimia pada infeksi virus Gumboro adalah sebagai berikut;

Tabel 4.1: Hasil analisis statistik jumlah sel bursa ayam yang mengekspresikan *caspase* 10 pada hari ke 2,4,6,8, dan 10 setelah infeksi virus Gumboro.

Waktu (hari)	Rataan $\pm$ Standar Deviasi
II	44,70 <sup>c</sup> $\pm$ 38,286
IV	42,80 <sup>c</sup> $\pm$ 36,563
VI	41,90 <sup>c</sup> $\pm$ 38,777
VIII	28,60 <sup>b</sup> $\pm$ 22,046
X	13,30 <sup>a</sup> $\pm$ 10,177

a,b,c.

superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ).

Tabel 4.2: Hasil analisis statistik jumlah sel bursa ayam yang mengekspresikan *caspase* 10 pada perlakuan infeksi virus Gumboro dan kontrol.

Perlakuan	Rataan $\pm$ Standar Deviasi
Kontrol	7,12 <sup>a</sup> $\pm$ 1,468
Perlakuan	61,40 <sup>b</sup> $\pm$ 24,206

a,b.

superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ).

Tabel 4.3: Hasil analisis statistik jumlah sel bursa yang mengekspresikan *caspase* 10 pada infeksi virus Gumboro dengan kombinasi hari dan perlakuan.

Kombinasi	Rata-rata ± Standar Deviasi
Hari ke II- Kontrol	9,00 <sup>a</sup> ± 2,646
Perlakuan	80,40 <sup>d</sup> ± 10,237
Hari ke IV- Kontrol	8,60 <sup>a</sup> ± 4,393
Perlakuan	77,00 <sup>d</sup> ± 8,31
Hari ke VI- Kontrol	5,60 <sup>a</sup> ± 1.817
Perlakuan	78,20 <sup>d</sup> ± 9,257
Hari ke VIII-Kontrol	8,20 <sup>a</sup> ± 3,271
Perlakuan	49,00 <sup>c</sup> ± 6,519
Hari ke X- Kontrol	4,20 <sup>a</sup> ± 3,114
Perlakuan	22,40 <sup>b</sup> ± 4,037

a,b,c,d.

superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ).

#### 4.2 Jumlah Sel Bursa yang Mengalami Apoptosis

Hasil pemeriksaan sel bursa yang mengalami apoptosis pada sediaan mikroskopik dengan pengecatan menggunakan kit Apoptag pada infeksi virus Gumboro adalah sebagai berikut;

Tabel 4.4 : Hasil analisis statistik jumlah sel bursa yang mengalami apoptosis pada hari ke 2,4,6,8, dan 10 setelah infeksi virus Gumboro.

Waktu (hari)	Rataan $\pm$ Standar Deviasi
II	35,70 <sup>a</sup> $\pm$ 9,673,286
IV	80,30 <sup>c</sup> $\pm$ 41,644
VI	72,70 <sup>c</sup> $\pm$ 27,199
VIII	50,60 <sup>b</sup> $\pm$ 3,596
X	43,70 <sup>ab</sup> $\pm$ 8,577

a,b,c,d.

superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ).

Tabel 4.5: Hasil analisis statistik jumlah sel bursa ayam yang mengalami apoptosis pada perlakuan infeksi virus Gumboro dan kontrol.

Perlakuan	Rataan $\pm$ Standar Deviasi
Kontrol	43,36 <sup>a</sup> $\pm$ 9,673
Perlakuan	69,84 <sup>b</sup> $\pm$ 34,229

a,b.

superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ).

Tabel 4.6: Hasil analisis statistik jumlah sel bursa yang mengalami apoptosis pada infeksi virus Gumboro dengan kombinasi hari dan perlakuan.

Kombinasi	Rata-rata ± Standar Deviasi
Hari ke II- Kontrol	30,20 <sup>a</sup> ± 4,207
Perlakuan	41,20 <sup>a</sup> ± 10,826
Hari ke IV- Kontrol	42,80 <sup>ab</sup> ± 5,357
Perlakuan	117,80 <sup>d</sup> ± 18,913
Hari ke VI- Kontrol	49,40 <sup>ab</sup> ± 1,949
Perlakuan	96,00 <sup>c</sup> ± 17,421
Hari ke VIII-Kontrol	49,20 <sup>ab</sup> ± 3,493
Perlakuan	52,00 <sup>b</sup> ± 3,464
Hari ke X- Kontrol	45,20 <sup>ab</sup> ± 5,404
Perlakuan	42,20 <sup>ab</sup> ± 11,432

a,b,c.

superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ).

### 4.3 Pengaruh *Caspase 10* Terhadap Apoptosis

Berdasarkan hasil statistik uji regresi linier, didapatkan :

$$a = b_0 = 39,021$$

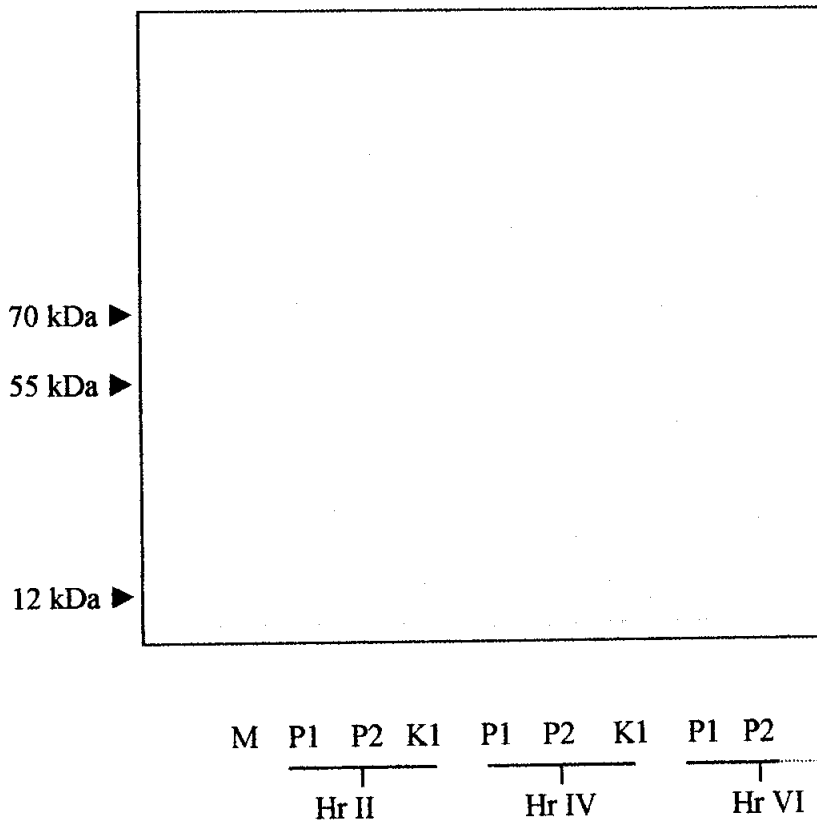
$$b = b_1 = 0,531, \text{ sehingga didapatkan persamaan garis : } y = a + bx$$

$$y = 39,021 + 0,513x$$

dengan nilai  $r = + 0,592$ , berarti terdapat hubungan kurang erat antara ekspresi *caspase 10* dengan sel apoptotik.



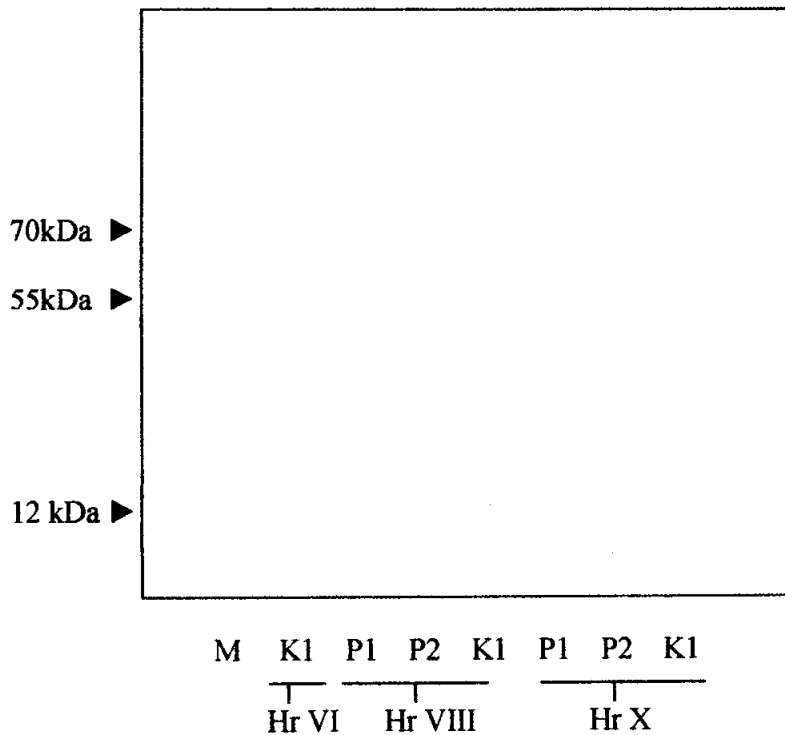
#### 4.4.2 Immunobloting



Gambar 4.3: Hasil pengujian *caspase* 10 bursa dengan antibodi poliklonal pada pemeriksaan Western-Imunobloting ( M : marker, P : perlakuan, K : kontrol, Hr : hari ).

#### Keterangan :

Pada kelompok hari kedua setelah infeksi, P1 tidak membentuk band, P2 dan K1 bereaksi positif dengan PoAb dan membentuk band. Pada kelompok hari keempat setelah infeksi, P1 dan P2 tidak membentuk band, K1 bereaksi positif dengan PoAb dan membentuk band. Pada kelompok keenam setelah infeksi, P1 dan P2 tidak membentuk band.



Gambar 4.4: Hasil pengujian *caspase* 10 bursa dengan antibodi poliklonal pada pemeriksaan Western-Imunoblotting.

**Keterangan:**

Pada kelompok hari keenam setelah infeksi, K1 menunjukkan reaksi positif dengan PoAb dan membentuk band. Pada kelompok hari kedelapan setelah infeksi, P1 dan P2 tidak membentuk band, K1 bereaksi positif dengan PoAb dan membentuk band. Pada kelompok hari kesepuluh, P1 dan P2 tidak membentuk band, K1 bereaksi positif dengan PoAb dan membentuk band.



**BAB V**  
**PEMBAHASAN**



**5.1 Jumlah Sel Bursa yang Mengekspresikan *Caspase* 10**

*Caspase* 10 merupakan *caspase* inisiator apoptosis. Seperti *caspase* yang lain, *caspase* 10 tersimpan di sitoplasma sel dalam bentuk zymogen yang inaktif. Apabila terjadi aktivasi oleh suatu protein aktivator atau oleh *granzyme* maka *caspase* 10 dapat mengalami peningkatan. *Granzym* dapat mengaktifkan *caspase* 10 misalnya pada infeksi virus.

Hasil pemeriksaan ekspresi *caspase* 10 pada penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi terjadi pada hari ke 2, 4, dan 6 setelah infeksi virus Gumboro, yang berbeda sangat nyata dengan hari ke 8, dan 10. Ekspresi *caspase* 10 ini tampak menurun pada hari ke 8 dan paling rendah pada hari ke 10 setelah infeksi. ( Tabel 4.1). Menurut Rautenschlein, *et al* (2002), pada hari kelima setelah infeksi virus Gumboro, terjadi peningkatan jumlah limfosit T untuk regulasi antigen virus Gumboro pada fase akut. Limfosit yang aktif ini akan membebaskan *granzim* yang dapat memicu peningkatan ekspresi *caspase* 10. Ekspresi *caspase* 10 bisa dijumpai baik pada kelompok perlakuan maupun kontrol, hal ini terjadi karena antibodi antichicken *caspase* 10 yang digunakan pada pewarnaan imunohistokimia mengikat *caspase* 10 baik dalam bentuk aktif maupun inaktif, sehingga pada kelompok kontrol *caspase* 10 juga terekspresikan pada sel bursa. Menurut Huppertz *et al* ( 1999 ), sampai saat ini teknik imunohistokimia belum dapat digunakan untuk mendeteksi *caspase* yang dalam keadaan aktif karena tidak ada antibodi yang khusus hanya mengenali enzim aktif

heterodimer saja. Namun demikian, bila dibandingkan antara kelompok perlakuan dan kontrol, maka hasil analisis statistik menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( Tabel 4.2 ).

## 5.2 Jumlah Sel Apoptotik

Penelitian yang dilakukan oleh Rautenschlein, *et al* (2002) dengan perlakuan timektomi pada infeksi virus Gumboro (Tx-CsA) menghilangkan respons inflamasi yang diinduksi virus Gumboro dan secara signifikan mengurangi kejadian apoptosis sel bursa jika dibandingkan dengan ayam yang memiliki sel T utuh , sehingga resolusi lesi bursa akibat virus Gumboro secara signifikan lebih cepat daripada ayam dengan sel T utuh . Hal ini memberikan pemahaman bahwa pada infeksi virus Gumboro limfosit T berperan besar pada proses apoptosis dan penyembuhan.

Hasil analisis statistik terhadap jumlah sel apoptotik sel bursa pada infeksi virus Gumboro pada penelitian ini menunjukkan bahwa hari ke 4 dan ke 6 paling tinggi dan berbeda sangat nyata dengan hari ke 2, 8, dan 10. Hari ke 2 belum terjadi peningkatan sel apoptotik, kemudian meningkat pada hari ke 4 dan 6 dan tampak mengalami penurunan pada hari ke 8 dan 10 ( Tabel 4.4 ). Gambaran ini serasi dengan hasil ekspresi *caspase* 10 di atas, bahwa pada fase akut yaitu sekitar hari ke 5 setelah infeksi terjadi peningkatan jumlah limfosit T yang berperan besar pada mekanisme apoptosis melalui pengaktifan *caspase* 10 oleh granzim.

Sel apoptotik pada bursa juga dijumpai pada kontrol, hal ini dapat dijelaskan dengan pemahaman bahwa apoptosis dapat terjadi baik patologik maupun fisiologik. Apoptosis fisiologik merupakan program kematian sel melalui

mekanisme genetik yang melibatkan aktifitas enzim telomerase. Namun demikian bila dibandingkan antara kelompok kontrol dan perlakuan, berdasarkan analisis statistik menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( Tabel 4.5 ).

### 5.3 Pengaruh *caspase* 10 Terhadap Apoptosis

Hasil analisis statistik dengan uji regresi menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kurang erat antara *caspase* 10 dengan apoptosis (Lampiran 6, hal 52). Hal ini terjadi karena *caspase* 10 bukan satu satunya bahan yang dapat menginduksi apoptosis pada infeksi virus. Seperti telah diketahui, apoptosis pada infeksi virus dapat melalui jalur *perforin-granzyme* dan jalur Fas-Fas ligan. Pada jalur *perforin-granzyme*, *caspase* yang dapat teraktivasi adalah *caspase* 3 dan *caspase* 10, sedangkan pada jalur Fas-Fas ligan *caspase* yang dapat teraktivasi adalah *caspase* 8, *caspase* 3, dan *caspase* 9. Namun demikian hasil penelitian ini membuktikan bahwa pada infeksi virus Gumboro, *caspase* 10 dapat menginduksi apoptosis sel bursa.

### 5.4 Karakterisasi *Caspase* Inisiator Apoptosis Sel Bursa

Hasil SDS-PAGE menunjukkan band terbentuk pada berat molekul 70, 55, dan 12 ( Gambar 4.1 dan 4.2 ). Berat molekul *caspase* 10 menurut Wolf and Green (1999) dalam bentuk zymogen adalah 55 kDa dan subunit aktif 17/12.

Kemudian analisis dilanjutkan dengan imunobloting dan proses dihentikan ketika terbentuk band pada 12 kDa. Hasil pengujian *caspase* dengan antibodi poliklonal antichicken *caspase* 10 ini menunjukkan bahwa pada kelompok hari kedua setelah infeksi, P2 dan K1 bereaksi positif dengan PoAb dan membentuk

band. Pada kelompok hari keempat, keenam, kedelapan, dan kesepuluh setelah infeksi, hanya K1 bereaksi positif dengan PoAb dan membentuk band (Gambar 4.3 dan 4.4). Seperti telah diketahui bahwa pada sel bursa normal terdapat *caspase* 10 dalam sitoplasmanya., sehingga kelompok kontrol dapat menunjukkan reaksi positif. Tetapi beberapa sampel dari kelompok perlakuan justru tidak timbul band ini merupakan pertanyaan Hal ini terjadi kemungkinan karena bursa pada kelompok perlakuan seluruhnya atrofi sehingga konsentrasi *caspase* 10 yang terkandung kurang pekat, hal ini berakibat pada reaksi yang kurang sempurna. Kemungkinan kedua, PoAb akan bereaksi sempurna dengan *caspase* 10 dalam bentuk zymogen yang memiliki berat molekul 55, sedangkan proses telah berhenti pada BM 12 kDa.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut ;

- 1 Pada infeksi virus Gumboro, terjadi peningkatan ekspresi *caspase* 10 pada bursa .
- 2 Pada infeksi virus Gumboro, terjadi peningkatan apoptosis sel bursa.
- 3 Pada infeksi virus Gumboro, *caspase* 10 dapat menginduksi apoptosis sel bursa.
- 4 *Caspase* inisiator apoptosis pada bursa, yaitu *caspase* 10 dapat dikarakterisasi sehingga dapat digunakan sebagai penentu bahan pengendali apoptosis.

#### 6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dibutuhkan suatu penelitian lanjutan sehingga dapat diwujudkan bahan pengendali apoptosis untuk penanggulangan penyakit Gumboro. Untuk mencapai hal ini perlu dilakukan purifikasi *caspase* 10 pada bursa dengan cara elusi, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan antibodi monoklonal anti *caspase* 10 tersebut.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abbas, KA, Lichtman, AH, Pober, JS, 2000. Cellular and mollecular immunology 4<sup>th</sup> ed. WB Saunders Company A Harcourt Health Sciences Company Philadelphia London New York St Louis Sydney Toronto.
- Adams J M. and Cory S., 1998. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival Science, 281:1322-1326.
- Ashkenazi, A, Dixit, V. M. ( 1998 ). Death Receptors : Signaling and Modilation. Science 281, 1305-1308
- Atkinson, EA, Barry, M, Darmon, AJ, Shostak, I, Turner, PC, Moyer, RW, Bleackley, RC, 1998. Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. *Caspase 3* activation is primarily result of the direct action of *granzyme B*. Journal Biol. Chem. 273 : 21261-21266.
- Becht, H, and Müller, H. (1991) Infectious bursal disease- a B cell dependent immunodeficiency syndrome in chickens. Bhering Institut Mitteilungen 89: 217-225.
- Bursch W, Kline L, Tenniswood M, 1990. Determination of length of the histological stage of apoptosis in normal liver and altered hepatic foci of rats, Carcinogenesis (London) .
- Burkhardt E. and Müller, H. (1987): Susceptibility of chicken blood lymphoblast and monocytes toinfection bursal disease virus (IBDV). Arch. Virol. 94: 297- 305.
- Cotran R S, Kumar V and Collins T, 1999: Apoptosis : In Pathologic basis of Disease. Sixth Eddition, W.B. Saunders Company Philadelphia London Toronto Sydney Tokyo.:18-28.
- De Herdt, P.; Ducatelle, R.; Uyttebroeck, E.; Sneepe, A. and Torbeyns, R. (2000): Significance of infectious bursal disease serology in an integrated quality control program under European epidemiologic conditions. Avian Diseases, 44:611-617.
- Direktor Jenderal Produksi Ternak (2002). Keterpaduan Kebijakan Pembangunan sector Peternakan dan Perikanan. Seminar Nasional Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

Goldsby, AR, Kindt, TJ, and Osborne, BA, 2000. *Kuby Immunology*. WH Feeman and Company New York.

Hetts SW, 1998. To die or not to die, an Overview of apoptosis and it's Role in disease. *JAMA*, Jan, 28;279(4):300-7.

Hiraga, M, Nunoya T, Otaki Y, Tajima M, Saito T, Nakamura T, 1994. Pathogenesis highly virulent infectious bursal disease virus infection in intact and bursectomized chickens. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56, 1057-1063.

Huppertz, B, Frank, HC, and Kaufmann, P, 1999. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 200:1-18.

Jungmann, A, Nieper, H, and Muller, H. 2001. Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. *Journal of General Virology*. 2: 1107- 1115.

Mc Ferran, JB. 1993. Infectious bursal disease. In JB Mc Ferran and Mc Nulty (Eds). *Virus infections of birds* 213-228.

Mundt, E, Beyer, J, and Muller, H. 1995. Identification of a novel viral protein in IBDV-infected cell. *Journal of General Virology*. 76 : 437-443.

Nieper, H, Teifke, JP, Jungmann, A, Lhor, CV, and Muller, H. 1999. Infected and apoptotic cells in the IBDV infected bursa of Fabricius, studied by double-labelling techniques. *Avian Pathology*. 28 : 279-285.

Nunoya, T, Otaki, Y, Tajima, M, Hiraga, M, and Saito, T. 1992. Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in SPF chickens. *Avian Disease*. 36 : 597-609.

Parede, L, 1993. Laporan Proyek Hasil Penelitian Virus dan Penyakit Gumboro. Kerja sama Balitvet dan P4N Badan Litbang Pertanian.

Rautenschlein S, Yeh HY, Njenga MK, Sharma JM, 2002. Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery. *Arch Virol* 2002;147(2):285-304

Reed, CJ 2000. Mechanisms of Apoptosis. *American Journal of Pathology* vol 157 5, 1415-1430

Stephen, WF and Shi, Y. 2001. Controlling the *caspase e*. Science vol 294 : 1477-1478.

Tanimura, N, and Sharma, JM. 1998. In-situ apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus. Journal of Comparative Pathology, 118 : 15-27.

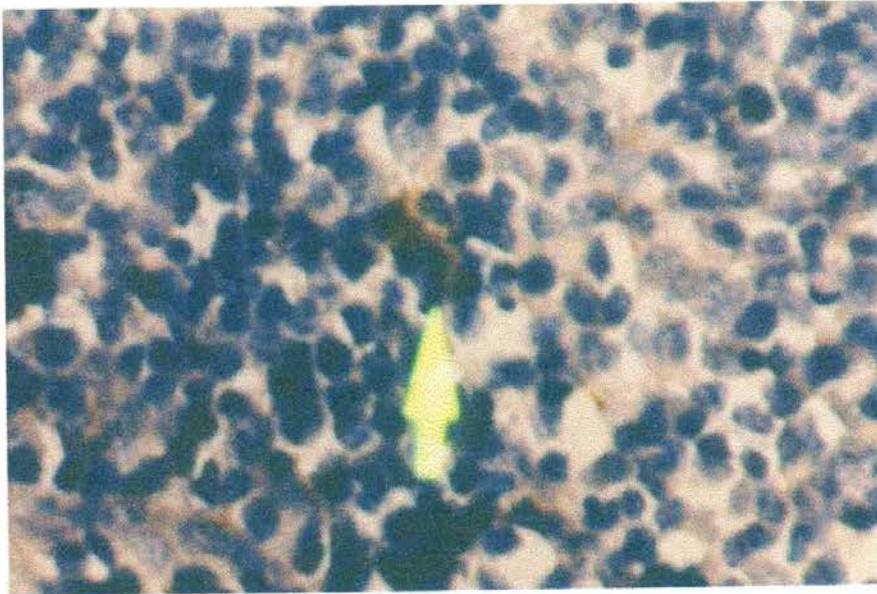
Thompson C B, 1995 : Apoptosis in the Patogenesis and Treatment of Disease. Science vol 267 : 1445-1448.

Van den Berg TP, Gonze M, and Meulemans G, 1991. Acute infectious bursal disease in poultry : isolation and characterisation of a highly virulent strain. Avian Pathology, 20 : 133-134.

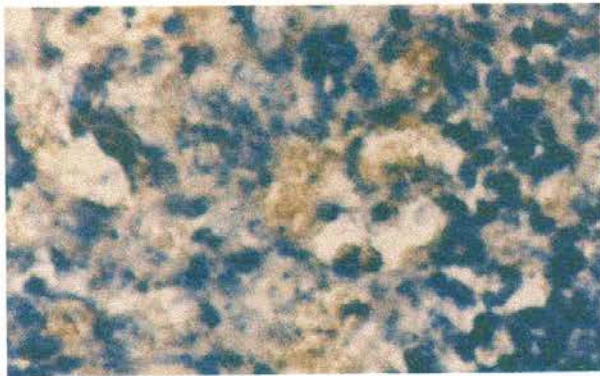
Wolf, BB and Green, DR, 1999. Suicidal Tendencies : Apoptotic Cell Death by *Caspase* Family Proteinases. The Journal of Biological Chemistry Vol 274 No 29: 20049-20052.



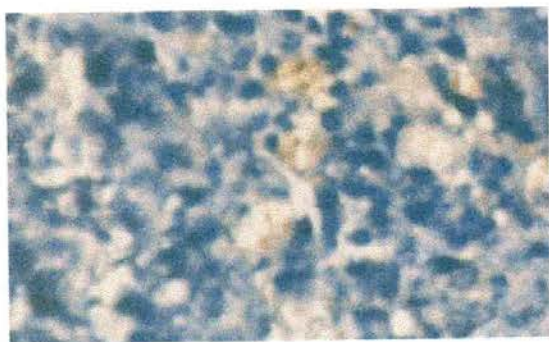
Lampiran 1 : Gambar hasil foto pengamatan mikroskopik



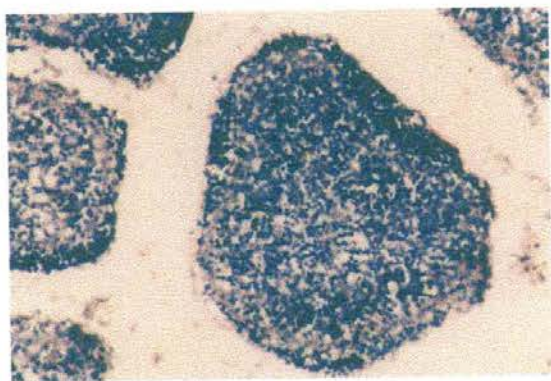
Gambar 1: Sel bursa dengan kandungan *caspase* 10 dalam sitoplasma pada kelompok kontrol ( perbesaran 400 X ,pewarnaan imunohistokimia).



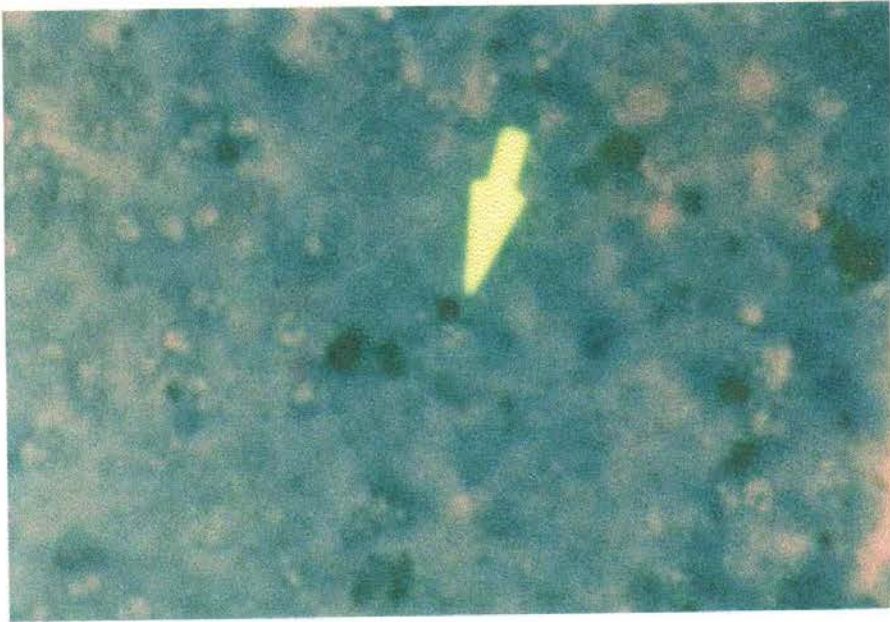
Gambar 2: Ekspresi *caspase* 10 yang berlebihan pada bursa pada kelompok perlakuan hari keempat setelah infeksi virus Gumboro ( perbesaran 400 X, pewarnaan imunohistokimia).



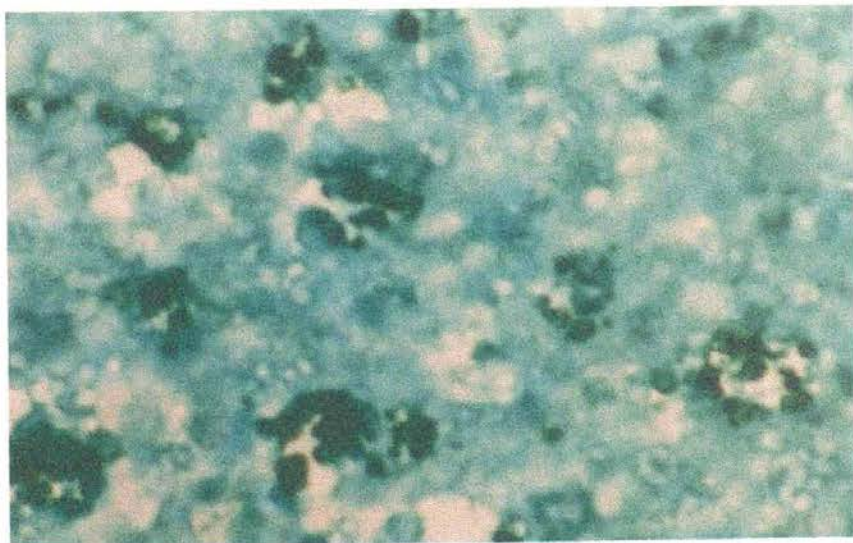
Gambar 3: Ekspresi *caspase* 10 pada bursa kelompok perlakuan hari kesepuluh setelah infeksi virus Gumboro ( perbesaran 400 X pewarnaan imunohistokimia ).



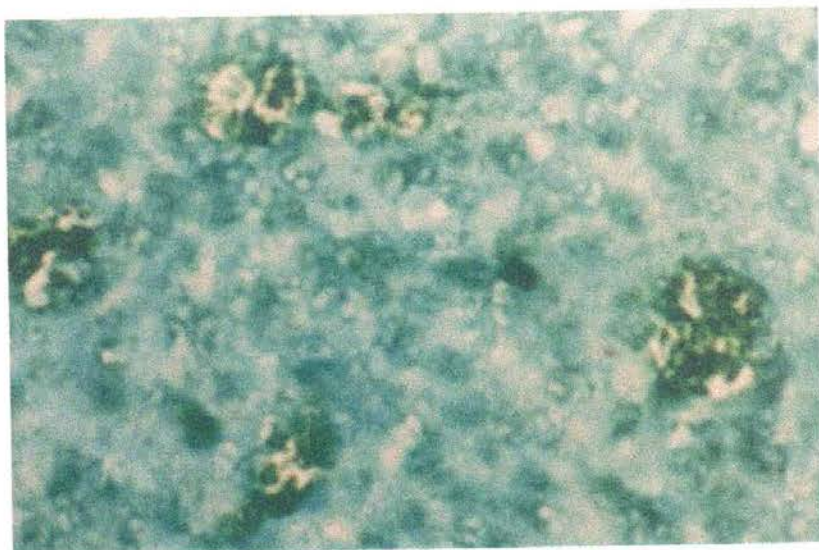
Gambar 4: Bursa pada kelompok kontrol dengan folikel limfoid yang masih penuh ( perbesaran 100 X , pewarnaan imunohistokimia).



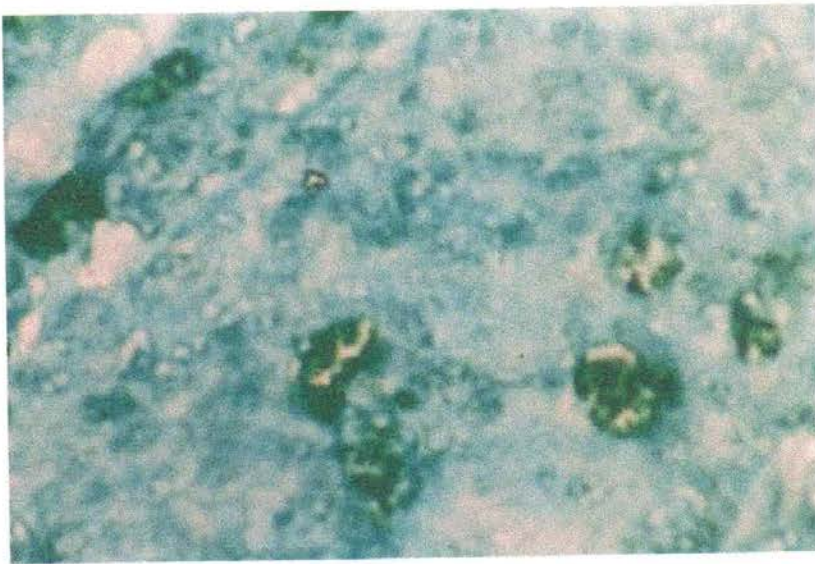
Gambar 5: Inti sel apoptotik tercat coklat gelap. ( perbesaran 100 X, pewarnaan dengan kit Apoptag ).



Gambar 6: Peningkatan apoptosis sel bursa pada kelompok perlakuan hari keempat setelah infeksi virus Gumboro ( perbesaran 400 X, pewarnaan dengan kit Apoptag ).



Gambar 7: Penurunan apoptosis sel bursa pada kelompok perlakuan pada hari kesepuluh setelah infeksi virus Gumboro ( perbesaran 400 X, pewarnaan dengan kit Apoptag ).



Gambar 8: Apoptosis sel bursa pada kelompok kontrol ( perbesaran 400 X, pewarnaan dengan kit Apoptag ).

Lampiran 2 : Cara Kerja SDS-PAGE

**SDS PAGE 12%**

**1. Siapkan semua bahan yang diperlukan**

- Acrilamide
- Tris HCL pH 8,8
- Tris HCL pH 6,8
- SDS 0,5%
- Aquadest
- Temed
- Aps 10 % , 4 °C
- E Buffer
- Methanol 50%
- Methanol 5%
- Acetic acid/As. Asetat 7,5 %
- Glutaraldehyde 10%
- NaOH 0,36%
- NH<sub>3</sub>
- AgNO<sub>3</sub>
- Formaldehyde
- Zitronensaure 5%
- Butanol

**2. Membuat Running Gel 12%**

**Bahan :**

- |                   |        |
|-------------------|--------|
| - Acrilamid       | 25 ml  |
| - Tris HCL pH 8,8 | 1,2 ml |
| - SDS 0,5 %       | 1,2 ml |
| - Aquadest        | 1,1 ml |
| - Temed           | 5,0 µl |
| - APS 10 %        | 30 µl  |

**3. Masukkan lewat dinding kaca sampai 1 cm dari atas**

4. Tambahkan butanol, diatasnya sampai penuh.

5. Membuat stacking

Bahan :

- Acrilamid	0,66 ml
- Tris HCL pH 6,8	0,8 ml
- SDS 0,5 %	0,8 ml
- Aquadest	0,8 ml
- Temed	4,0 µl
- APS 10 %	20 µl

6. Masukkan ke atas cetakan Running gel sampai penuh, kemudian masukan comb ke stacking gel dan inkubasi selama 25 menit.

7. Siapkan sample (Laemli Buffer + sampel) masukan ke dalam ependorf dan tutup ependorf ditusuk dengan jarum ½ tusuk, langsung direbus dengan 100°C selama 5 menit.

8. Setelah inkubasi selesai lepaskan comb dan dengan E buffer 1x.

9. Masukkan cetakan tadi ke Bio rad.

10. Tuangi dengan E. Buffer 1x ( kira-kira 800ml ).

11. Masukkan sample ke dalam lubang comb tadi dan hilangkan gelembung tadi dengan jarum.

12. Pasang listrik dengan 125 V dan 40 mA.

13. Tunggu sampai sample turun seluruhnya.

14. Matikan listrik and lepas agarnya pelan-pelan.

15. Masukkan ke petridish yang sudah ada larutan pencucian.

16. Tahap Pencucian.

• Pencucian I

Bahan : - Methanol	25 ml
- Asam asetat	3,75 ml
- Aquadest	71,25 ml

Goyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit.

- Pencucian II

Bahan : - Methanol 2,5 ml  
 - Asam asetat 3,75 ml  
 - Aquadest 93,75 ml

Goyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit

- Pencucian III , Glutaraldehyde 10 %

Bahan : - Glutaraldehyde 10 ml  
 - Aquadest 90 ml

- Pencucian IV

- Pencucian dengan aquadest @ 100 ml 3 x selama 30 menit.

17. Tahap pewarnaan

Timbang  $\text{AgNO}_3$  0,8 g + 4 ml DW, campur dan masukkan ke dalam larutan yang terdiri dari :

- NaOH 0,36 % 21 ml  
 -  $\text{NH}_3$  14 ml  
 - Aquadest 73,5 ml

Masukan ke dalam petridish dan goyang dengan kecepatan 42 selama 15 menit, kemudian buang.

18. Cuci dengan Aquadest @ 100 ml 2x selama 2 menit.

19. Masukkan pengembang warna yang terdiri dari

- Formaldehyde 3,7 % 50  $\mu\text{l}$   
 - Zitronensaure 5% 100  $\mu\text{l}$   
 - Aquadest 100 ml

Tunggu 15 menit sambil goyang terus.

20. Masukkan stop reaksi dengan asetic acid 10 %.

21. Cuci dengan aquadest @ 100 ml 2 x selama 2 menit.

22. Beri Glicerol 10 ml

- Glicerol 10 ml.  
 - Aquadest 90 ml.



**TEKNIK WESTERN BLOT**

**(SEMI DRY)**

1. Siapkan membran nitroselulose yang akan digunakan dan rendam dalam transfer buffer.
2. Letakkan kertas Watman yang sudah dibasahi dengan transfer buffer pada blotter sebanyak 4-5 lapis.
3. Letakkan membran nitroselulose di atas lapisan terakhir dan hindarkan adanya rongga udara.
4. Letakkan gel agarose hasil elektroforesis tepat di atas membran nitroselulose dan hindarkan adanya rongga udara.
5. Tutup membran nitroselulose dengan 4-5 lapis kertas Watman yang sudah dibasahi dengan transfer buffer.
6. Basahi seluruh lapisan sehingga kelihatan basah.
7. Tutup blotter kuat-kuat dan lakukan running dengan 100 volt, 40 mA selama 1-2 jam
8. Ambil membran nitroselulose pelan-pelan dan masukkan ke dalam TBS.
9. Cuci membran nitroselulose satu kali dengan TBS dan pindahkan ke cawan petri baru.
10. Bloking membran nitroselulose dengan 1 % BSA dalam TBS Tween 0,5 %.
11. Inkubasi pada suhu kamar 2 jam, suhu ruang semalam pada 4°C.
12. Cuci membran nitroselulose dengan TBS Tween 0,05 % lima kali, masing-masing selama 10 menit dengan shaker.
13. Tambahkan antibodi primer dalam buffer inkubasi (sesuai dengan pengenceran antibodi terbaik).
14. Inkubasi pada suhu ruang dengan shaker selama 1 jam.
15. Cuci membran nitroselulose dengan TBS Tween 0,05 % lima kali, masing-masing 10 menit dengan shaker.
16. Tambahkan antibodi sekunder (conjugate) dalam buffer inkubasi.
17. Inkubasi pada suhu ruang dengan shaker 1 jam.
18. Cuci membran nitroselulose dengan TBS Tween 0,05 % lima kali, masing-masing selama 10 menit dengan shaker.
19. Tambahkan substrat dan inkubasi suhu kamar di ruang gelap dengan penggoncangan sampai terlihat warna (hasil).
20. Stop reaksi dengan memindahkan membran nitroselulose ke dalam aquabidest non deionized.
21. Keringkan membran nitroselulose pada suhu ruang dan hasil siap dianalisis.

Lampiran 4 : Cara Kerja Pengecatan Imunohistokimia

1. Deparanisasi

Xylol I

Xylol II

Xylol III

Masing-masing selama 10 menit, kemudian

Alkohol absolut I

Alkohol absolut II

Masing-masing selama 3 menit

Alkohol 96 % I

Alkohol 96 % II

Masing-masing selama 3 menit

Alkohol 80 %

Alkohol 70 %

Masing-masing selama 3 menit

Dicuci dengan air mengalir selama  $\pm 1$  menit

2. Tripsin 0,025% selama 15 menit dengan suhu 37° Celcius.

Kemudian cuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 5 menit

3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % selama 10 menit.

Kemudian cuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 5 menit

4. AB Prime : Caspase 10 selama 45 menit-1 jam.

Kemudian cuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 5 menit

5. AB Sekunder / Link AB selama 30 menit.

Kemudian cuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 5 menit

6. Streptavidin selama 30 menit.

Kemudian cuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 5 menit

7. DAB-Chrmogen selama 6-10 menit.
8. Kemudian cuci dengan PBS , Aquadestilata, air mengalir masing-masing selama 5 menit
9. Counterstain : Meyer's Haematoxylin selama  $\pm$  15 menit
10. Bilas dalam air mengalir sampai biru
11. Dikeringkan di udara
12. Mounting

Keterangan :

PBS pH 7,2-7,4

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % = 1 bagian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % : 9 Bagian Aquadestilata

## Lampiran 5 : Cara Kerja Pengecatan Dengan Kit Apoptag

### Deparafinisasi jaringan :

- mencuci tiga kali dengan Xylene masin-masing 5 menit
- dicuci 2 kali dengan etanol absolut masing-masing 5 menit
- mencuci 1 kali dengan etanol 95% dan 1 kali dengan etanol 70% masingmasing 3 menit, kemudian dengan PBS selama 5 menit.

### Langkah berikutnya :

- jaringan ditetesi proteinase K 15 menit
- dicuci 2 kali dengan H<sub>2</sub>O dalam coplin jar masing-masing 2 menit
- untuk menghilangkan endogenous peroxidase, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PBS ditetaskan biarkan selama 5 menit pada suhu kamar, lalu dicuci 2 kali dengan PBS masing-masing 2 menit dalam coplin jar.
- cairan di sekitar jaringan disingkirkan dengan kertas pengering
- jaringan ditetesi 75µl equilibration buffer lalu diinkubasi 10 menit pada suhu kamar.
- kembali cairan di sekitar jaringan disingkirkan dengan kertas pengering
- jaringan ditetesi 55 µl / 5cm<sup>2</sup> *working strength* TdT enzyme, lalu diinkubasi pada 37°C dalam wadah yang lembab selama 1 jam.
- sediaan diletakkan dalam coplin jar yang berisi *working strength stop/wash buffer* , diguncangkan selama 15 detik kemudian diinkubasi 10 menit pada suhu kamar.

- sediaan dicuci 4 kali dengan PBS dalam copping jar masing-masing 2 menit pada suhu kamar.
- cairan di sekitar potongan jaringan dikeringkan dengan kertas pengering kemudian ditetaskan anti-digoxigenin conjugate (yang telah dikeluarkan dari tempat penyimpanan dan dihangatkan sampai pada suhu kamar sebelumnya) pada permukaan jaringan kira-kira  $65\mu\text{l} / 5\text{cm}^2$ , lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dalam tempat yang lembab.
- sediaan dicuci 4 kali dengan PBS dalam copping jar masing-masing 2 menit pada suhu kamar.
- cairan di sekitar potongan jaringan dikeringkan dengan kertas pengering kemudian dilakukan pemberian warna, yaitu dengan meneteskan peroxidase substrat  $75\mu\text{l} / 5\text{cm}^2$  pada permukaan jaringan dan dibiarkan 10 menit pada suhu kamar.
- sediaan dicuci 3 kali dengan dH<sub>2</sub>O dalam copping jar masing-masing 1 menit, lalu diinkubasi dengan dH<sub>2</sub>O dalam copping jar 5 menit pada suhu kamar.
- untuk counterstain, dioleskan hematoxylin 30 detik pada suhu kamar
- dicuci 3 kali dengan dH<sub>2</sub>O dalam copping jar masing-masing 1 menit.
- sediaan diberikan xylene lalu cairan di sekitar potongan jaringan dikeringkan dengan kertas pengering.

## Case Summaries

			LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	Caspase 10	
Hari II	Kontrol	1	0	3	1	2	0	6	
		2	2	0	1	4	1	8	
		3	5	4	3	0	1	13	
		4	2	1	2	0	5	10	
		5	0	0	5	2	1	8	
		Total	Sum	9	8	12	8	8	45
		Mean	1.80	1.60	2.40	1.60	1.60	9.00	
		SD	2.049	1.817	1.673	1.673	1.949	2.646	
	Perlakuan	1	16	10	26	9	14	75	
		2	15	9	14	12	18	68	
		3	13	11	21	18	16	79	
		4	25	13	14	21	12	85	
		5	15	17	18	21	24	95	
		Total	Sum	84	60	93	81	84	402
		Mean	16.80	12.00	18.60	16.20	16.80	80.40	
		SD	4.712	3.162	5.079	5.450	4.604	10.237	
	Total	Sum	93	68	105	89	92	447	
		Mean	9.30	6.80	10.50	8.90	9.20	44.70	
		SD	8.616	5.996	9.253	8.582	8.677	38.286	
	Hari IV	Kontrol	1	4	0	1	2	2	9
			2	4	0	0	3	0	7
3			1	0	2	2	0	5	
4			6	0	0	0	0	6	
5			4	2	5	3	2	16	
Total			Sum	19	2	8	10	4	43
		Mean	3.80	.40	1.60	2.00	.80	8.60	
		SD	1.789	.894	2.074	1.225	1.095	4.393	
Perlakuan		1	13	18	18	13	15	77	
		2	17	20	16	22	15	90	
		3	15	16	12	14	15	72	
		4	15	14	13	11	16	69	
		5	17	12	17	16	15	77	
		Total	Sum	77	80	76	76	76	385
		Mean	15.40	16.00	15.20	15.20	15.20	77.00	
	SD	1.673	3.162	2.588	4.207	.447	8.031		
Total	Sum	96	82	84	86	80	428		
	Mean	9.60	8.20	8.40	8.60	8.00	42.80		
	SD	6.328	8.509	7.501	7.545	7.630	36.563		
Hari VI	Kontrol	1	0	1	1	1	1	4	
		2	3	1	1	3	0	8	
		3	1	4	2	0	0	7	
		4	1	0	2	0	1	4	
		5	0	0	4	1	0	5	
		Total	Sum	5	6	10	5	2	28
	Mean	1.00	1.20	2.00	1.00	.40	5.60		
	SD	1.225	1.643	1.225	1.225	.548	1.817		

			LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	Caspase 10
Hari VI	Perlakuan	1	14	20	18	13	14	79
		2	20	12	12	14	16	74
		3	15	10	14	15	14	68
		4	18	13	15	16	15	77
		5	21	15	18	19	20	93
		Total	Sum	88	70	77	77	79
		Mean	17.60	14.00	15.40	15.40	15.80	78.20
		SD	3.050	3.808	2.608	2.302	2.490	9.257
	Total	Sum	93	76	87	82	81	419
		Mean	9.30	7.60	8.70	8.20	8.10	41.90
		SD	9.019	7.291	7.319	7.786	8.293	38.777
	Hari VIII	Kontrol	1	2	1	0	3	3
2			5	0	1	2	0	8
3			1	0	2	4	0	7
4			0	3	0	0	1	4
5			6	1	5	0	1	13
Total			Sum	14	5	8	9	5
		Mean	2.80	1.00	1.60	1.80	1.00	8.20
		SD	2.588	1.225	2.074	1.789	1.225	3.271
Perlakuan		1	10	10	9	7	13	49
		2	7	11	14	10	15	57
		3	7	8	12	11	15	53
		4	10	6	5	12	13	46
		5	9	6	7	9	9	40
		Total	Sum	43	41	47	49	65
		Mean	8.60	8.20	9.40	9.80	13.00	49.00
		SD	1.517	2.280	3.647	1.924	2.449	6.519
Total		Sum	57	46	55	58	70	286
		Mean	5.70	4.60	5.50	5.80	7.00	28.60
	SD	3.653	4.169	4.972	4.566	6.583	22.046	
Hari X	Kontrol	1	0	0	1	0	0	1
		2	6	1	0	0	0	7
		3	0	2	0	0	0	2
		4	3	1	0	4	0	8
		5	3	0	0	0	0	3
		Total	Sum	12	4	1	4	0
		Mean	2.40	.80	.20	.80	.00	4.20
		SD	2.510	.837	.447	1.789	.000	3.114
	Perlakuan	1	5	3	3	6	7	24
		2	5	4	4	3	7	23
		3	3	3	5	2	3	16
		4	2	3	6	6	5	22
		5	7	5	8	4	3	27
		Total	Sum	22	18	26	21	25
		Mean	4.40	3.60	5.20	4.20	5.00	22.40
		SD	1.949	.894	1.924	1.789	2.000	4.037
	Total	Sum	34	22	27	25	25	133
		Mean	3.40	2.20	2.70	2.50	2.50	13.30
SD		2.366	1.687	2.946	2.461	2.953	10.177	

## Descriptive Statistics

Dependent Variable: Caspase 10

Waktu (Hari)	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Hari II	Kontrol	9.00	2.646	5
	Perlakuan	80.40	10.237	5
	Total	44.70	38.286	10
Hari IV	Kontrol	8.60	4.393	5
	Perlakuan	77.00	8.031	5
	Total	42.80	36.563	10
Hari VI	Kontrol	5.60	1.817	5
	Perlakuan	78.20	9.257	5
	Total	41.90	38.777	10
Hari VIII	Kontrol	8.20	3.271	5
	Perlakuan	49.00	6.519	5
	Total	28.60	22.046	10
Hari X	Kontrol	4.20	3.114	5
	Perlakuan	22.40	4.037	5
	Total	13.30	10.177	10
Total	Kontrol	7.12	3.468	25
	Perlakuan	61.40	24.206	25
	Total	34.26	32.318	50

## Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Caspase 10

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	49724.420 <sup>a</sup>	9	5524.936	151.867	.000
Intercept	58687.380	1	58687.380	1613.177	.000
HARI	7116.520	4	1779.130	48.904	.000
TRIAL	36828.980	1	36828.980	1012.341	.000
HARI * TRIAL	5778.920	4	1444.730	39.712	.000
Error	1455.200	40	36.380		
Total	109867.000	50			
Corrected Total	51179.620	49			

a. R Squared = .972 (Adjusted R Squared = .965)



Waktu (Hari)

**Caspase 10**

Duncan<sup>a,b</sup>

Waktu (Hari)	N	Subset		
		1	2	3
Hari X	10	13.30		
Hari VIII	10		28.60	
Hari VI	10			41.90
Hari IV	10			42.80
Hari II	10			44.70
Sig.		1.000	1.000	.335

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 36.380.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

b. Alpha = .05.

**Perlakuan Kombinasi Hari\*Perlakuan**

**Caspase 10**

Duncan<sup>a</sup>

Duncan's (1%)	N	Subset for alpha = .01			
		1	2	3	4
Hari X~Kontrol	5	4.20			
Hari VI~Kontrol	5	5.60			
Hari VIII~Kontrol	5	8.20			
Hari IV~Kontrol	5	8.60			
Hari II~Kontrol	5	9.00			
Hari X~Perlakuan	5		22.40		
Hari VIII~Perlakuan	5			49.00	
Hari IV~Perlakuan	5				77.00
Hari VI~Perlakuan	5				78.20
Hari II~Perlakuan	5				80.40
Sig.		.271	1.000	1.000	.407

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

## Case Summaries

			LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	Apoptosis	
Hari II	Kontrol	1	6	10	8	4	7	35	
		2	6	9	8	6	5	34	
		3	4	6	8	5	5	28	
		4	5	6	3	5	6	25	
		5	3	9	6	6	5	29	
		Total	Sum	24	40	33	26	28	151
		Mean	4.80	8.00	6.60	5.20	5.60	30.20	
		SD	1.304	1.871	2.191	.837	.894	4.207	
	Perlakuan	1	7	10	10	10	12	49	
		2	10	8	7	7	8	40	
		3	10	9	8	10	8	45	
		4	10	7	10	12	10	49	
		5	7	8	3	3	2	23	
		Total	Sum	44	42	38	42	40	206
		Mean	8.80	8.40	7.60	8.40	8.00	41.20	
		SD	1.643	1.140	2.881	3.507	3.742	10.826	
	Total	Sum	68	82	71	68	68	357	
		Mean	6.80	8.20	7.10	6.80	6.80	35.70	
		SD	2.530	1.476	2.470	2.936	2.860	9.673	
	Hari IV	Kontrol	1	12	12	7	6	9	46
			2	9	9	7	9	12	46
3			3	8	7	6	13	37	
4			10	9	11	10	8	48	
5			7	7	7	7	9	37	
Total			Sum	41	45	39	38	51	214
		Mean	8.20	9.00	7.80	7.60	10.20	42.80	
		SD	3.421	1.871	1.789	1.817	2.168	5.357	
Perlakuan		1	25	20	25	15	20	105	
		2	20	18	15	20	18	91	
		3	25	25	25	30	30	135	
		4	30	20	25	25	30	130	
		5	27	31	27	23	20	128	
		Total	Sum	127	114	117	113	118	589
		Mean	25.40	22.80	23.40	22.60	23.60	117.80	
	SD	3.647	5.263	4.775	5.595	5.899	18.913		
Total	Sum	168	159	156	151	169	803		
	Mean	16.80	15.90	15.60	15.10	16.90	80.30		
	SD	9.659	8.171	8.897	8.825	8.212	41.644		
Hari VI	Kontrol	1	12	9	11	8	10	50	
		2	10	11	9	9	11	50	
		3	12	10	11	9	10	52	
		4	6	12	9	10	10	47	
		5	9	10	8	11	10	48	
		Total	Sum	49	52	48	47	51	247
		Mean	9.80	10.40	9.60	9.40	10.20	49.40	
		SD	2.490	1.140	1.342	1.140	.447	1.949	

			LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	Apoptosis
Hari VI	Perlakuan	1	20	13	19	15	14	81
		2	19	18	19	12	21	89
		3	33	24	27	15	27	126
		4	23	17	22	16	16	94
		5	16	18	17	21	18	90
	Total	Sum	111	90	104	79	96	480
		Mean	22.20	18.00	20.80	15.80	19.20	96.00
		SD	6.535	3.937	3.899	3.271	5.070	17.421
	Total	Sum	160	142	152	126	147	727
		Mean	16.00	14.20	15.20	12.60	14.70	72.70
SD		8.028	4.849	6.512	4.088	5.832	27.199	
Hari VIII	Kontrol	1	11	9	9	12	12	53
		2	13	10	10	9	11	53
		3	11	7	10	8	11	47
		4	11	8	6	10	12	47
		5	10	10	10	9	7	46
	Total	Sum	56	44	45	48	53	246
		Mean	11.20	8.80	9.00	9.60	10.60	49.20
		SD	1.095	1.304	1.732	1.517	2.074	3.493
	Perlakuan	1	8	14	12	9	8	51
		2	9	11	12	7	12	51
		3	10	10	10	11	10	51
		4	10	11	10	8	10	49
		5	14	11	13	8	12	58
	Total	Sum	51	57	57	43	52	260
Mean		10.20	11.40	11.40	8.60	10.40	52.00	
SD		2.280	1.517	1.342	1.517	1.673	3.464	
Total	Sum	107	101	102	91	105	506	
	Mean	10.70	10.10	10.20	9.10	10.50	50.60	
	SD	1.767	1.912	1.932	1.524	1.780	3.596	
Hari X	Kontrol	1	12	8	10	10	8	48
		2	10	10	8	8	11	47
		3	9	10	11	8	13	51
		4	3	7	11	11	11	43
		5	1	10	11	4	11	37
	Total	Sum	35	45	51	41	54	226
		Mean	7.00	9.00	10.20	8.20	10.80	45.20
		SD	4.743	1.414	1.304	2.683	1.789	5.404
	Perlakuan	1	12	12	12	10	15	61
		2	5	5	10	4	8	32
		3	8	4	8	8	7	35
		4	10	11	9	8	6	44
		5	8	7	7	8	9	39
	Total	Sum	43	39	46	38	45	211
Mean		8.60	7.80	9.20	7.60	9.00	42.20	
SD		2.608	3.564	1.924	2.191	3.536	11.432	
Total	Sum	78	84	97	79	99	437	
	Mean	7.80	8.40	9.70	7.90	9.90	43.70	
	SD	3.706	2.633	1.636	2.331	2.807	8.577	

## Descriptive Statistics

Dependent Variable: Apoptosis

Waktu (Hari)	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Hari II	Kontrol	30.20	4.207	5
	Perlakuan	41.20	10.826	5
	Total	35.70	9.673	10
Hari IV	Kontrol	42.80	5.357	5
	Perlakuan	117.80	18.913	5
	Total	80.30	41.644	10
Hari VI	Kontrol	49.40	1.949	5
	Perlakuan	96.00	17.421	5
	Total	72.70	27.199	10
Hari VIII	Kontrol	49.20	3.493	5
	Perlakuan	52.00	3.464	5
	Total	50.60	3.596	10
Hari X	Kontrol	45.20	5.404	5
	Perlakuan	42.20	11.432	5
	Total	43.70	8.577	10
Total	Kontrol	43.36	8.175	25
	Perlakuan	69.84	34.229	25
	Total	56.60	28.026	50

## Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Apoptosis

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	34437.200 <sup>a</sup>	9	3826.356	37.784	.000
Intercept	160178.000	1	160178.000	1581.693	.000
HARI	14601.200	4	3650.300	36.045	.000
TRIAL	8764.880	1	8764.880	86.550	.000
HARI * TRIAL	11071.120	4	2767.780	27.331	.000
Error	4050.800	40	101.270		
Total	198666.000	50			
Corrected Total	38488.000	49			

a. R Squared = .895 (Adjusted R Squared = .871)

Waktu (Hari)

Apoptosis

Duncan<sup>ab</sup>

Waktu (Hari)	N	Subset		
		1	2	3
Hari II	10	35.70		
Hari X	10	43.70	43.70	
Hari VIII	10		50.60	
Hari VI	10			72.70
Hari IV	10			80.30
Sig.		.083	.133	.099

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 101.270.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

b. Alpha = .05.

Perlakuan Kombinasi Hari\*Perlakuan

Apoptosis

Duncan<sup>a</sup>

Duncan's (1%)	N	Subset for alpha = .01			
		1	2	3	4
Hari II~Kontrol	5	30.20			
Hari II~Perlakuan	5	41.20	41.20		
Hari X~Perlakuan	5	42.20	42.20		
Hari IV~Kontrol	5	42.80	42.80		
Hari X~Kontrol	5	45.20	45.20		
Hari VIII~Kontrol	5	49.20	49.20		
Hari VI~Kontrol	5	49.40	49.40		
Hari VIII~Perlakuan	5		52.00		
Hari VI~Perlakuan	5			96.00	
Hari IV~Perlakuan	5				117.80
Sig.		.011	.150	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

**Variables Entered/Removed<sup>b</sup>**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Caspase 10 <sup>a</sup>	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Apoptosis

**Model Summary**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.592 <sup>a</sup>	.350	.337	22.828

a. Predictors: (Constant), Caspase 10

**ANOVA<sup>b</sup>**

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	13475.103	1	13475.103	25.859	.000 <sup>a</sup>
	Residual	25012.897	48	521.102		
	Total	38488.000	49			

a. Predictors: (Constant), Caspase 10

b. Dependent Variable: Apoptosis

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	39.021	4.730		8.250	.000
	Caspase 10	.513	.101	.592	5.085	.000

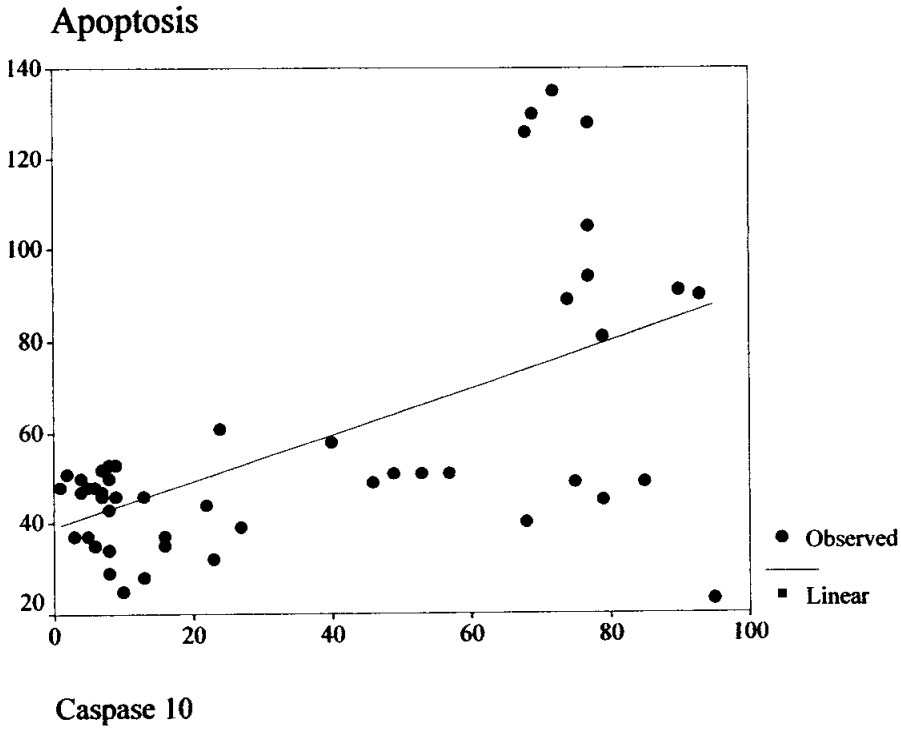
a. Dependent Variable: Apoptosis

Curve Fit

MODEL: MOD\_1.

Independent: CASPASE

Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
APOPTOSI	LIN	.350	48	25.86	.000	39.0206	.5131

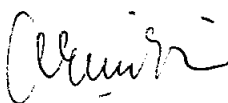


**PENINGKATAN EKSPRESI CASPASE - 10 PADA  
BURSA FABRISIUS AYAM SETELAH DIINFEKSI  
VIRUS GUMBORO**

**Skripsi sebagai salah satu syarat untuk  
Memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan  
Pada  
Fakultas Kedokteran Hewan - Universitas Airlangga**

Oleh  
**Yudi Prasetyo**  
069812527

**Menyetujui  
Komisi Pembimbing**



**Arimbi, M.Kes., drh.**  
Pembimbing I



**Roesno Darsono, drh**  
Pembimbing II



**PENINGKATAN EKSPRESI *CASPASE 10* PADA BURSA FABRISIUS  
AYAM BURAS PEDAGING SETELAH  
DIINFEKSI VIRUS GUMBORO**

**YUDI PRASETYO**

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa setelah infeksi virus Gumboro, terdapat peningkatan ekspresi *caspase 10* di bursa fabrisius ayam buras pedaging.

Hewan coba ayam buras pedaging sebanyak 50 ekor dengan umur 3 minggu. Untuk perlakuan dengan infeksi virus gumboro digunakan 25 ekor ayam dan 25 ekor lainnya untuk kontrol. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Percobaan Faktorial atau *Univariate Analysa of Variance*. Semua perlakuan diinfeksi dengan virus gumboro melalui peroral, intraokuler dan intrakloaka dengan dosis 1000 EID 50/ml, sedangkan kontrol negatif tanpa diberikan perlakuan apapun.

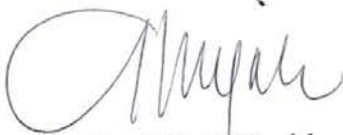
Hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ) dari hasil analisis statistik jumlah sel bursa ayam yang mengekspresikan *caspase 10* pada perlakuan dan kontrol. Untuk perlakuan dengan rata-rata  $61,40 \pm 24,206$ , sedangkan kontrol  $7,12 \pm 1,468$ . Untuk ekspresi *caspase 10* menurut hari, tidak ada perbedaan yang nyata antara hari ke-2, 4, 6 yaitu  $44,70 \pm 38,286$ ,  $42,80 \pm 36,563$ ,  $41,90 \pm 38,777$ . Tetapi berbeda sangat nyata ( $p < 0,01$ ) antara hari ke-2, 4, 6 dengan hari ke 8 dan 10 yaitu  $28,60 \pm 22,046$  dan  $13,30 \pm 10,177$ . Untuk 10 perlakuan kombinasi atau perlakuan faktorial terjadi interaksi yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ). Dapat disimpulkan bahwa *Caspase 10* yang merupakan *caspase* inisiator terjadinya apoptosis, mengalami peningkatan ekspresi pada bursa fabrisius ayam pedaging yang dilihat dari pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan imunohistokimia. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui peran *caspase* inisiator lainnya dalam proses apoptosis.

**KARAKTERISASI PROTEIN INISIATOR  
APOPTOSIS PADA BURSA FABRISIUS AYAM  
SETELAH DIINFEKSI VIRUS GUMBORO**

**Skripsi sebagai salah satu syarat untuk  
Memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan  
Pada  
Fakultas Kedokteran Hewan – Universitas Airlangga**

Oleh  
**Novia Yuli Astutik**  
069912673

Menyetujui  
Komisi Pembimbing



**Ajik Azmijah, S.U., drh.**  
Pembimbing I



**Nunuk Dyah Retno L., M.S., drh.**  
Pembimbing II

## KARAKTERISASI PROTEIN INISIATOR APOPTOSIS PADA BURSA FABRICIUS AYAM SETELAH DIINFEKSI VIRUS GUMBORO

Novia Yuli Astutik

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter protein inisiator apoptosis sel bursa Fabricius ayam setelah diinfeksi virus Gumboro. Peningkatan apoptosis sel yang terinfeksi virus, dapat terjadi melalui pengaktifan *caspase 10* oleh *granzyme* yang dikeluarkan oleh limfosit T sitotoksik atau sel NK.

Pada penelitian ini digunakan 50 ekor ayam pedaging umur 21 hari yang terdiri dari 25 ekor kelompok perlakuan dan 25 ekor kelompok kontrol. Kelompok perlakuan diinfeksi virus Gumboro isolat Tasik melalui tetes mata, oral, dan kloaka, kemudian secara random, dari kedua kelompok tersebut dikorbankan pada hari ke 2,4,6,8, dan 10 setelah infeksi masing-masing 5 ekor. Bursa Fabricius secara random diambil masing-masing 2 (P1 dan P2) dari kelompok perlakuan dan 1(K) dari kelompok kontrol sebagai unit analisis. Kemudian berturut-turut dilakukan sonikasi untuk mengeluarkan protein dari sel dan disentrifugasi untuk memisahkan supernatan. Tahap berikutnya supernatan dianalisis SDS-PAGE 12% dengan pewarnaan silver untuk menentukan protein inisiator apoptosis berdasarkan berat molekulnya, yaitu 12 kDa. Analisis selanjutnya adalah imunoblotting menggunakan teknik Western-blot, proses dihentikan ketika terbentuk band pada 12 kDa..


Hasil analisis imunoblotting dengan pengujian protein inisiator apoptosis terhadap antibodi poliklonal *antichicken caspase 10* (PoAb) menunjukkan bahwa pada kelompok hari kedua setelah infeksi, P2 dan K bereaksi positif dengan PoAb dan membentuk band. Pada kelompok hari keempat, keenam, kedelapan, dan kesepuluh setelah infeksi, hanya K bereaksi positif dengan PoAb dan membentuk band.


**PENINGKATAN JUMLAH SEL APOPTOSIS PADA  
BURSA FABRISIUS AYAM SETELAH DIINFEKSI  
VIRUS GUMBORO**

**Skripsi sebagai salah satu syarat untuk  
Memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan  
Pada  
Fakultas Kedokteran Hewan – Universitas Airlangga**

Oleh  
**Laili Anismah Ernawati**  
069912709

**Menyetujui  
Komisi Pembimbing**

  
**Retno Bijanti, M.S., drh.**  
Pembimbing I

  
**Ajik Azmijah, S.U., drh.**  
Pembimbing II

# PENINGKATAN JUMLAH SEL APOPTOTIK PADA BURSA FABRISIUS AYAM DIINFEKSI VIRUS GUMBORO

Laili Anizmah Ernawati

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan terjadinya peningkatan jumlah sel apoptotik pada bursa fabrisius ayam yang diinfeksi virus gumboro.

Ayam Broiler umur 21 hari sebanyak 50 ekor secara random dibagi menjadi sepuluh kelompok yang terdiri dari lima kelompok kontrol dan lima kelompok perlakuan. Untuk mendapatkan infeksi virus gumboro, lima kelompok perlakuan diinokulasi dengan virus gumboro isolat Tasik secara intraokuler, intrakloakal, dan per oral dengan dosis 1000 EID 50/ml. Kemudian secara bertahap tiap-tiap kelompok dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dikorbankan, yaitu berturut-turut pada hari kedua, empat, enam, delapan, dan sepuluh hari setelah infeksi. Bursa fabrisius diambil dan pemeriksaan mikroskopis bursa dilakukan setelah diproses dengan menggunakan S177101 Apopteg Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit. Data dianalisis menggunakan rancangan penelitian Factorial yang dilanjutkan dengan uji Duncan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada hari keempat dan enam setelah infeksi jumlah sel apoptotik jaringan bursa fabrisius pada kelompok perlakuan meningkat tajam dan berbeda sangat nyata dengan kelompok kontrol.

Hal ini mungkin berhubungan dengan terjadinya peningkatan jumlah limfosit T pada fase akut infeksi virusgumboro, yaitu sekitar hari kelima setelah infeksi, peningkatan ekspresi beberapa caspase pada bursa fabrisius. Dapat juga dihubungkan dengan proses replikasi virus gumboro, serta keberadaan interferon setelah infeksi virus gumboro.

