SKRIPSI

ANTIGENISITAS BEBERAPA ISOLAT VIRUS *INFECTIOUS BURSAL DISEASE* (IBD) UNTUK PENGUJIAN ANTIBODI HASIL VAKSINASI DENGAN TEKNIK *INDIRECT ELISA*

Oleh :

DEWINITA YULIANI

NIM. 060213001

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

2006

ANTIGENISITAS BEBERAPA ISOLAT VIRUS *INFECTIOUS BURSAL DISEASE* (IBD) UNTUK PENGUJIAN ANTIBODI HASIL VAKSINASI DENGAN TEKNIK *INDIRECT ELISA*

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk menempuh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

Dewinita Yuliani
NIM. 060213001

Menyetujui

Komisi Pembimbing,

Jola Rahmahani, M.Kes., drh.
Pembimbing Pertama.

Prof. Mas'ud Hariadi, M.Phil. Ph.D., drh
Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Menyetujui

Panitia Penguji,

Dr. Angela Mariana.L, M.Si., drh.

Ketua

Dr. Suwarno, M.Si., drh.

Sekretaris

Nanik Sianita, S.U.,drh.

Anggota

Jola Rahmahani, M.Kes., drh.

Anggota

Prof. Mas'ud Hariadi,M.Phil., Ph.D., drh.

Anggota

Surabaya,

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL UNIVERSITAS AIRLANGGA FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh.

NIP. 130687297

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

Antigenisitas Beberapa Isolat *Infectious Bursal Disease* (IBD) untuk Pengujian Antibodi Hasil Vaksinasi dengan Teknik *Indirect ELISA*

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar sarjana di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, Agustus 2006

Dewinita Yuliani
NIM. 060213001

ANTIGENICITIES VIRUS ISOLATE INFECTIOUS BURSAL DISEASE (IBD) FOR EXAMINATION OF ANTIBODY OF VACCINATION RESULT WITH ELISA INDIRECT TECHNIQUE

DEWINITA YULIANI

ABSTRACT

The purpose of this research was to know the differences of several antigenicity Infectious Bursal Disease (IBD) virus. Examination of antibodies from Chickens were carried out by using ELISA indirect. The Chickens were vaccinated at 14 days of age, blood sample were taken at 33 days of age. The serum of sample were reacted with antigen of isolates L1, L2, S vaccine, B vaccine and M vaccine, the control consist of antigens without antibodies. The absorbent were determined by ELISA reader at 405 nm. Data were analyzed by Analyzed Of Variant (Anova), if there was any differences the analyzed will be continued by Duncan test. The result showed there were significant differences Optical Density (OD) amoung several IBD isolates virus antigenicity.

Key Word : Antigenicity, Infectious Bursal Disease, Antibody against IBD virus

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas limpahan karunia, berkat, rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul "**ANTIGENISITAS BEBERAPA ISOLAT VIRUS *INFECTIOUS BURSAL DISEASE* (IBD) UNTUK PENGUJIAN ANTIBODI HASIL VAKSINASI DENGAN TEKNIK *INDIRECT ELISA*".**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr, Ismudiono, M.S., drh atas kesempatan yang diberikan untuk menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Jola Rahmahani, M.Kes., drh selaku pembimbing pertama dan Prof. Mas'ud Hariadi, M.Phil., Ph.D., drh. selaku pembimbing kedua atas bimbingan dan sarannya sampai dengan selesainya skripsi ini

Dr. Angela Mariana Lusiastuti, M.Si., drh. selaku ketua penguji skripsi, Dr. Suwarno, M.Si., drh. selaku sekretaris penguji skripsi, Nanik Sianita , S.U., drh., Jola Rahmahani, M.Kes., drh dan Prof. Mas'ud Hariadi, M.Phil., Ph.D., drh selaku angota penguji skripsi.

Dr. Bambang Poernomo S., M.S., drh sebagai dosen wali dan seluruh staf pengajar serta karyawan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas bekal ilmu yang sangat bermanfaat..

Ayahanda Suwarso, Ibunda Sri Harjanti, mbak Ika, Sari, Uzan, mbak Iput, mas Endi, mbak Rin dan eyang Putri tercinta yang telah memberikan dorongan moral dan semangat selama penulis menempuh studi.

Asih, mas Nadif, mas Indra, mbak Esti dan mbak hendar atas bantuan dan kerjasamanya selama ini.

Sahabat-sahabatku (Binti, Mbak Pit, Anggi, Suli, Hela, Al, Agung, Witna, Hendrawan, Ponco, Tyas dan Nafiah) atas dukungan dan kebersamaan kita selama ini.

Semua teman-teman FKH angkatan '02 dan keluarga besar kos-kosan Mulyorejo Utara 175 atas dukungan, saran dan kritiknya.

Semua pihak yang secara tidak langsung turut membantu dalam kegiatan penelitian ini dari awal hingga terselesainya penelitian ini.

Surabaya, Agustus 2006

Penulis

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

CEF	: *Chicken Embryo Fibroblast*
CPE	: *Cytho Pathogenic Effect*
ELISA	: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
IBD	: *Infectious Bursal Disease*
Ig	: *Immunoglobulin*
Kda	: *Kilo Dalton*
OD	: *Optical Density*
PBS	: *Phosphat Buffer Saline*
RNA	: *Ribo Nucleid Acid*

BAB I

PENDAHULUAN

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Pada awal tahun 1990, industri peternakan ayam di Indonesia dihebohkan oleh adanya serangan satu penyakit hebat, yang dalam kurun waktu singkat penyakit tersebut dapat menular dengan cepat dan mengakibatkan terjadi penurunan produktivitas, baik telur maupun daging ayam. Penyakit tersebut adalah penyakit Gumboro atau *Infectious Bursal Disease* (IBD), yang mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat besar (Soehadji yang dikutip Anizmah, 2004). Sejak pertama kali mewabah di Indonesia sampai saat ini penyakit yang diidentifikasikan dengan nama IBD tersebut belum berhasil dihilangkan dari daftar penyakit ayam yang ~~ada di~~ Indonesia (Wiryawan, 2003). Wabah IBD yang terjadi pada umumnya menyerang peternakan ayam ras, baik tipe padaging maupun tipe petelur dan belum pernah dilaporkan adanya kasus yang sama menyerang atau mewabah pada ayam buras (Darjono, 1992).

Infectious Bursal Disease merupakan penyakit pada unggas yang disebabkan oleh *Birnavirus* (Leong et al., 2000). Virus penyebab IBD bersifat akut dan sangat menular, menyerang ayam muda terutama umur 4-6 minggu (Tabbu, 2000). Virus ini terutama menyerang bursa Fabricius serta kelenjar pertahanan tubuh yang lain, seperti timus dan sekal tonsil. Kelenjar-kelenjar tersebut berperan dalam membentuk kekebalan tubuh ayam terhadap penyakit (Partadiredja, 1991). Aktivitas virus IBD akan menurunkan daya tahan tubuh atau

menyebabkan efek imunosupresif dan angka kematian pada ayam akan lebih tinggi bila terjadi infeksi sekunder (Rumawas, 1992).

Infectious Bursal Disease merupakan salah satu penyakit yang menimbulkan masalah bagi industri perunggasan sejak lama di seluruh dunia, terutama karena adanya penurunan respon imun terhadap vaksinasi dan peningkatan kepekaan terhadap infeksi sekunder (Butcher and Milles, 2002). Upaya yang dilakukan untuk mengatasi dan menanggulangi IBD hanya dengan pencegahan melalui vaksinasi, karena sampai saat ini belum ditemukan pengobatan yang efektif. Vaksinasi yang banyak dilakukan oleh peternak merupakan salah satu cara untuk mencegah keganasan infeksi virus IBD yang masuk dalam tubuh ayam (Wiryawan, 2003).

Virus IBD mudah mengalami modifikasi genetik menjadi varian baru. Varian tesebut biasanya mempunyai tingkat homologi (kesamaan struktur antigenik) yang lebih rendah terhadap virus vaksin yang umumnya di lapangan (Tabbu, 2003). Mutasi genetik dari virus IBD juga menyebabkan timbulnya perbedaan antigenik antara vaksin dan virus di lapangan (Rahardjo dan Suwarno, 2005). Timbulnya varian IBD yang *very virulent* menyebabkan vaksinasi tidak 100% protektif terhadap tantangan virus IBD di lapangan (Tabbu, 2000). Vaksinasi yang dilakukan pada ayam hanya dapat mengatasi penyakit untuk beberapa saat saja, karena masih banyak kasus kematian ayam yang disebabkan oleh adanya serangan IBD walaupun sudah dilakukan vaksinasi (Ernawati, 2004).

Berdasarkan latar belakang inilah yang mendorong peneliti untuk melakukan penelitian dengan mereaksikan antibodi ayam hasil vaksinasi dengan

antigen yang identik sehingga dapat diketahui vaksin yang tepat untuk mengatasi serangan virus IBD di lapangan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah terdapat perbedaan antigenisitas dari beberapa isolat virus IBD untuk pengujian antibodi hasil vaksinasi dengan teknik *Indirect ELISA* ?

1.3 Landasan Teori

Antigenisitas ditentukan oleh faktor limitasi fisikokimiawi dan keasingan. Protein mempunyai antigenisitas tinggi karena struktur molekulnya yang rumit, dan mempunyai sifat kimiawi yang kompleks. Virus IBD mempunyai sifat antigenik yang diekpresikan oleh rangkaian asam amino dari protein pada bagian virion dari virus tersebut. Protein tersebut yaitu protein VP1, VP2, VP3 dan VP4. Protein-protein tersebut mempunyai determinan antigen atau epitop yang dapat memacu terbentuknya antibodi (Tizard, 1988). Crissman *et al.*, pada tahun 1996 mengemukakan bahwa pengenalan terhadap virus tergantung dari epitop yang terdapat pada protein. Jika epitop yang mewakili masing-masing strain berbeda maka profil antibodi dari strain virus IBD yang berbeda tersebut akan berbeda pula (yang dikutip dari Jackwood *et al.*, 1996). Perbedaan sekuen nukleotida pada protein virus IBD sangat erat hubungannya dengan virulensi antigenisitas virus (Jackwood, *et al.*, 1997; Dormotorio, *et al.*, 1997; Pitcovski, *et al.*, 1996)

ELISA digunakan untuk membandingkan titer antibodi pada serum sehingga dapat diketahui ada tidaknya hubungan antigenisitas antara strain virus IBD (Jackwood *et al.*, 1996). *Indirect ELISA* dapat digunakan untuk mendeteksi banyaknya antibodi dari antigen yang spesifik. Pada *Indirect ELISA* produksi warna mengindikasikan jumlah antibodi dari antigen spesifik tetapi bila S*andiwch ELISA* produksi warnanya mengindikasikan jumlah kadar antigen (Freeman, *et al.*, 2000).

1.4 Tujuan Penelitian

Adapun penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan antigenisitas dari beberapa isolat virus IBD untuk pengujian antibodi dengan teknik *Indirect ELISA.*

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat melengkapi temuan ilmiah bahwa dengan mengetahui perbedaan antigenisitas dari beberapa isolat virus IBD melalui pengujian antibodi hasil vaksinasi dapat membawa perkembangan dalam strategi pembuatan vaksin yang lebih aman dan protektif.

1.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah terdapat perbedaan antigenisitas beberapa isolat virus IBD untuk pengujian antibodi hasil vaksinasi dengan teknik *Indirect ELISA.*

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sejarah Penyebaran dan Penyebab Penyakit

Infectious Bursal Disease adalah suatu penyakit viral yang bersifat akut dan sangat mudah menular, yang menyerang ayam muda, terutama umur 4 – 6 minggu. Penyakit ini merusak organ limfoid, terutama bursa Fabricius sehingga ayam yang terserang lebih peka terhadap berbagai penyakit (Hitchner, 1970). *Infectious Bursal Disease* pertama kali dilaporkan oleh Cosgrove pada tahun 1962 di daerah Gumboro Delaware, USA. Sehubungan dengan kasus pertama IBD yang ditemukan di daerah Gumboro maka penyakit ini disebut juga penyakit Gumboro (Tabbu, 2000). Sekarang IBD telah tersebar luas di dunia (Darminto dkk., 1985), tapi penyakit ini tidak ditemukan di New Zealand (Tabbu, 2000). Sejak pertengahan tahun 1991, penyakit ini telah mewabah di berbagai daerah di Indonesia, terutama daerah yang mempunyai populasi peternakan ayam tinggi serta skala usaha besar (Tabbu, 2000). Masalah ini diperberat dengan munculnya isolat baru yang memiliki perbedaan sifat dengan isolat klasik, seperti yang muncul di beberapa negara di Eropa dan Asia termasuk Indonesia yang bersifat ganas dan Amerika yang bersifat subklinis (Van den Berg *et al*., 2000).

Infectious Bursal Disease mempunyai nilai ekonomis yang penting dalam industri perunggasan sehubungan dengan adanya mortalitas yang dapat mencapai 20% atau lebih pada ayam muda dan efek imunosupresif yang berkepanjangan jika ayam terinfeksi pada usia awal. Efek imunosupresif yang ditimbulkan oleh

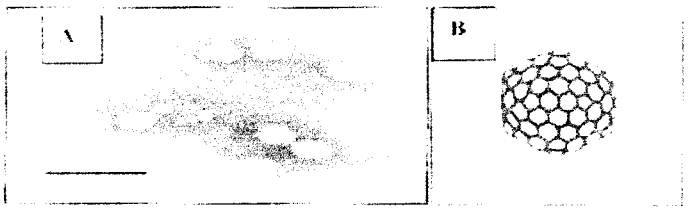
IBD dapat mengakibatkan ayam lebih peka terhadap berbagai penyakit misalnya *Chronic Respiratory Disease* (CRD), *Colibacillosis*, *New Castle Disease* (ND), *Coccidiosis*, *Marek's Disease* (MD), *Infectious Bronchitis* (IB), *Infectious Laryngotracheitis* (ILT), *Salmonellosis*, *Infectious Coryza* (snot), *Dermatitis Gangrenosa*, *Inclusion Body Hepatitis* (IBH). Disamping itu, IBD juga akan menyebabkan respon imun yang suboptimal terhadap berbagai program vaksinasi, misalnya vaksinasi terhadap ND, IB, MD (Murtidjo, 1992).

2.2 Etiologi

2.2.1 Morfologi

Virus penyebab IBD merupakan virus *double – stranded ribonucleid acid* (ds-RNA), tidak beramplop tergolong genus *Birnavirus* dari famili *Birnaviridae*, dengan berat molekul 2,5 X 10 kDa, kapsid virus berbentuk simetri ikosahedral yang disusun oleh 780 sub unit protein VP2 dan 600 kopi protein VP3, dengan diameter sekitar 60 nm (Gambar 2.1A dan 2.1B). Virus IBD merupakan prototipe dari virus *Pancreatic Necrosis* pada ikan (Leong *et al.*, 2000).

Virus penyebab IBD ini mempunyai diameter antara 55-65 nm, virion tidak beramplop dan berbentuk ikosahedral (Tabbu, 2000). Fenner *et al.* (1995) menyatakan bahwa genom dari virus IBD terdiri dari segmen ds-RNA, yaitu segmen A mempunyai panjang 3,1 kbp dan segmen B 2,9 kbp. Boot *et al.* (2000) secara lebih tepat menyebutkan bahwa segmen A (3260 bp) dan segmen B (2827 bp).



Gambar 2.1 : (A) Virion dari virus IBD
(B) Bentukan ikosahedral dari virus famili *Birnaviridae*
(Sumber: Leong *et al.*, 2000).

2.2.2 Klasifikasi

Klasifikasi virus IBD hingga saat ini masih belum jelas (Suwarno, 1987). Virus ini diklasifikasikan kedalam famili *Reoviridae* oleh Petek dan Mandeli pada tahun 1968 (Hofstad *et al.*,1984). Hal ini sama dengan pendapat Hirai *et al.* (1974) yang menyatakan adanya kemiripan antara virus IBD dengan virus *Blue tongue*.

Dobos pada tahun 1995 mengusulkan IBD ke dalam famili *Birnaviridae*, genus *abirnavirus* (Diyanti dkk., 1998). Sedangkan beberapa peneliti memasukannya kedalam genus *birnavirus* (Boot *et al.*, 2000; Leong *et al.*, 2000; Tabbu, 2000).

2.2.3 Serotipe

Ada dua serotipe virus IBD yang telah diketahui yaitu serotipe 1 yang berasal dari ayam dan serotipe 2 yang berasal dari kalkun dengan patogenisitas pada masing-masing induk semang asalnya (Jackwood and Saif, 1983; Chin *et al.*, 1984; Cheetle *et al.*, 1985). Kedua serotipe tersebut tidak menunjukkan adanya reaksi silang (*Cross-antigenicity*) maupun kekebalan silang *(Cross-protection)* karena ayam-ayam yang diinfeksi dengan serotipe 1 tidak menghasilkan antibodi terhadap serotipe 2. Demikian sebaliknya, ayam-ayam yang diinfeksi serotipe 2 tidak menampakkan gejala klinis, perubahan patologi anatomi, perubahan

histopatologi atau kematian tetapi setelah diinfeksi dengan serotipe 1 semua perubahan terlihat nyata (Jackwood *et al.*, 1985).

Vaksinasi terhadap virus IBD serotipe 2 tidak memberikan perlindungan terhadap infeksi serotipe 1. Uji silang terhadap serotipe 2 menggunakan vaksin IBD serotipe 1 tidak dapat dilakukan oleh karena tidak ada isolat virus serotipe 2 yang bersifat virulent pada ayam. Virus IBD serotipe 1 diisolasi dari ayam yang mempunyai virulensi bervariasi dari yang rendah sampai patogenik, dan dapat menyebabkan mortalitas 50% jika menginfeksi ayam yang peka. Virus IBD serotipe 2 dapat diisolasi dari ayam dan kalkun tapi sejauh ini tidak menimbulkan penyakit pada kedua jenis unggas tersebut (Tabbu, 2000).

2.3 Sifat Virus *Infectious Bursal Disease*

Virus IBD memiliki beberapa sifat tertentu yang karakteristik, diantaranya adalah sifat fisik, kimia dan biakan (Beberapa peneliti yang dikutip Santoso, 1993).

2.3.1 Sifat fisik

Virus IBD sangat stabil dan tahan terhadap pengaruh lingkungan (Beberapa peneliti yang dikutip Santoso, 1993). Menurut Tabbu (2000) virus IBD masih tetap aktif pada temperatur 56°C selama lebih dari 5 jam dan tetap hidup pada temperatur 60°C selama 30 menit, tetapi akan mati pada temperatur 70°C dalam waktu 30 menit. Temperatur 25°C virus IBD tahan selama 21 hari, dan dalam penyimpanan temperatur -20°C tahan selama 3 tahun.

2.3.2 Sifat kimia

Menurut Tabbu (2000) virus ini relatif tahan terhadap ether, khloroform dan dapat diinaktivasi pada kisaran pH 12 tapi tidak diketahui pada pH rendah yaitu pH 2. Virus IBD tahan terhadap pelarut organik tetapi peka terhadap formalin dan kelompok iodofor. Virus IBD dapat diinaktivasi dengan larutan 0,5% khloramin selama 10 menit, virus ini tahan terhadap larutan 0,5% fenol dan 0,125% timersal pada temperatur 30°C selama 1 jam. Pemberian berbagai konsentrasi larutan kompleks yodium turunan fenolik dan campuran amonium kuartener selama dua menit pada temperatur 23°C menunjukkan bahwa hanya komplek yodium yang dapat membunuh virus IBD pada perlakuan tersebut.

2.3.3 Sifat biakan

Virus IBD dapat dibiakkan pada telur ayam berembrio (TAB) umur 9-11 hari. Virus IBD galur varian dapat menyebabkan perubahan pada embrio meliputi splenomegali dan nekrosis hati, yang disertai oleh tingkat mortalitas yang rendah (Tabbu, 2000). Virus IBD dapat juga dibiakan pada media *tissue culture* (kultur jaringan), yang terdiri atas limfosit B dan *chicken embryo fibroblast* (CEF). Perubahan yang terjadi pada sel terinfeksi adalah terlihat adanya *Cytho Pathogenik Effect* (CPE) setelah 24 jam infeksi selama 3 sampai 4 hari (Srivasta *et al.*, 2001; Tabbu, 2000).

2.4 Penularan

Virus IBD bersifat kontagious dan persisten di dalam lingkungan kandang ayam. Sisa pakan, air minum dan kotoran yang berasal dari kandang yang

ditempati oleh ayam terserang IBD masih bersifat infeksius selama 52 hari. Virus juga dapat ditemukan dalam kotoran ayam yang terinfeksi, maka penularannya dapat terjadi secara langsung melalui kontak antara ayam yang sakit dengan ayam peka. Penularan dapat terjadi secara tidak langsung melalui pakan, kandang, peralatan peternakan, alat transportasi atau pekerja yang tercemar penyakit ini. Penularan dapat melalui udara tercemar oleh debu yang mengandung virus IBD di dalam kandang ayam (Diyanti dkk., 1998).

Virus IBD tidak ditularkan melalui telur dan ayam yang sudah sembuh dari penyakit tidak bertindak sebagai pembawa virus. Daya tahan virus IBD terhadap panas, lingkungan dan desinfektan memungkinkan virus tetap hidup dalam lingkungan peternakan (Hofstad *et al.*,1984).

2.5 Patogenesis

Muller *et al.* (1979), menggunakan teknik imunoflouresensi menjelaskan setelah virus masuk secara per oral ke dalam tubuh ayam dalam waktu empat jam pertama virus dapat ditemukan pada sel makrofag dan sel limfosit caecum dan satu jam berikutnya ditemukan pada sel-sel yang sama pada duodenum dan jejenum. Selanjutnya, virus menuju kehati, difagositosis oleh sel-sel kupffer, mengikuti aliran darah besar menuju ke alat tubuh yang lain termasuk bursa Fabricius (Fenner *et al.*, 1995). bursa Fabricius merupakan target organ dari virus (Hirai *et al.*, 1979). Adanya infeksi menyebabkan terjadi pemblokiran diferensiasi *stem cell* dalam pembentukan *B cell* dan *B cell precursor*. Jumlah *B cell* mengalami penurunan yang sangat hebat demikian pula *T cell*. *B cell* dan *T cell*

merupakan sistem sel imunologik dari ayam. Bila sistem sel imunologik ini terserang oleh virus maka respon terhadap vaksinasi menjadi sangat buruk (Sivanan and Maheswaren, 1980).

2.6 Gejala Klinis

Infectious Bursal Disease mempunyai dua bentuk gejala klinis yaitu bentuk klasik (bentuk klinis) dan bentuk subklinis (bentuk dini). Gejala klinis yang membantu diagnosa meliputi ginjal bengkak dan pucat, diare putih, kelemahan ,dehidrasi, gemetar, kematian tiba-tiba, bursa Fabricius bengkak, setelah diseksi tampak adanya perdarahan pada otot dada dan paha. Angka kematian biasanya bervariasi tergantung virulensi virus, infeksi sekunder dan umur ayam saat terserang, tapi bila terjadi infeksi sekunder, maka yang terlihat adalah gejala dari penyakit sekunder tersebut. Pada infeksi subklinis, gejala klinis tidak terlihat tetapi bisa dicurigai dari pertumbuhan, produktivitas dan angka kematian ayam selalu ada dan cenderung meningkat selama pemeliharaan (Diyanti dkk., 1998)

Pada ayam umur satu hari sampai dua minggu kurang peka terhadap IBD karena adanya antibodi maternal. Ayam yang umurnya lebih dari enam minggu gejala klinisnya tampak jelas walaupun dalam tubuh ayam telah mengandung antibodi. Setelah masa inkubasi dua sampai tiga hari ayam yang terinfeksi virus IBD menunjukan tanda-tanda stres, depresi, anoreksia, diare, gemetar, bulu pucat dan dehidrasi (Murphy, 1999 yang dikutip Nadif, 2005).

Tabbu (2000) menyatakan kasus IBD juga sering ditemukan pada ayam yang berumur lebih dari 10 minggu (16 minggu) selama bursa Fabricius masih berfungsi. Jika virus ini menyerang ayam yang berumur satu hari sampai 3 minggu akan timbul IBD bentuk subklinis yang mempunyai efek sangat imunosupresif (menekan kekebalan) dan menyebabkan kegagalan berbagai program vaksinasi.

Jika virus IBD menyerang ayam umur 3 minggu ke atas biasanya akan timbul IBD bentuk klinis. Bentuk imunosupresif yang bersifat sementara , infeksi kantong udara kegagalan vaksinasi dan penurunan daya tahan tubuh. Kelompok ayam yang peka, maka penyakit tersebut biasanya muncul secara tiba-tiba dan morbiditasnya tinggi (100%). Mortalitas mulai terjadi pada hari ketiga pasca infeksi dan meningkat serta mencapai puncaknya dalam waktu 2-3 hari, selanjutnya mortalitas cepat turun sehingga seluruh proses penyakit membutuhkan waktu sekitar 7-8 hari. Mortalitas akibat IBD sangat bervariasi, pada kasus yang tidak diikuti oleh infeksi sekunder, mortalitas mungkin 0%, tapi dapat juga mencapai 20-30%. Pada kasus yang mengalami komplikasi, mortalitas dapat mencapai 40% atau lebih tergantung jenis penyakit yang mengikutinya. Disamping itu, mortalitas juga dipengaruhi oleh praktik manajemen dan program pemberantasan penyakit, khususnya vaksinasi IBD (Tabbu, 2000).

2.7 Diagnosis

Diagnosis sangkaan dapat didasarkan atas riwayat kasus termasuk umur ayam, gejala klinik, cepatnya penyebaran, perubahan patologik dan temuan pasca

mati terutama pada bursa Fabricius. Ayam yang terserang IBD bursanya bengkak melebihi normal, bentuk membulat dan permukaannya kekuning-kuningan. *Infectious Bursal Disease* bentuk akut lebih mudah dikenal sehubungan dengan adanya proses penyakit yang cepat, morbiditas tinggi, kurva mortalitas meningkat tajam dan proses kesembuhan yang cepat (sekitar 5-7 hari). Perubahan makroskopik yang spesifik pada bursa Fabricius yang diperkuat oleh pemeriksaan mikroskopis dapat dijadikan dasar diagnosa penyakit. Infeksi virus IBD pada anak ayam yang mempunyai antibodi asal induk, biasanya bersifat subklinis dan dapat didiagnosa berdasarkan pemeriksaan makroskopis ataupun mikroskopis pada bursa Fabricius yang mengalami atrofi. Infeksi pada ayam dengan virus IBD galur varian dideteksi dengan pemeriksaan histopatologi pada bursa, isolasi dan identifikasi pada virus dan uji serologik (Tabbu, 2000).

Pemeriksaan laboratorium dilakukan isolasi dan identifikasi virus, dengan menginokulasikan bahan pemeriksaan yang diduga mengandung virus IBD. Bahan yang digunakan adalah timus, limpa, paru-paru dan bursa Fabricius. Inokulasi dapat dilakukan pada telur ayam bertunas umur 9-11 hari. Telur ayam berembrio (TAB) yang digunakan harus bebas dari kekebalan induk. Kematian embrio akan terjadi pada hari ke tiga sampai hari ke lima setelah inokulasi. Virus IBD dengan konsentrasi tinggi dapat diisolasi dari bursa Fabricius (Beberapa peneliti yang dikutip Suwarno, 1987). Virus IBD galur varian dapat menyebabkan perubahan pada embrio, meliputi splenomegali dan nekrosis pada hati yang disertai oleh tingkat mortalitas yang rendah. Virus IBD dapat juga diisolasi pada

kultur jaringan yang terdiri atas limfosit B dan *Chicken Embrio Fibroblast* (CEF). (Srivasta *et al.*, 2001; Tabbu, 2000).

Pemeriksaan antibodi terhadap virus IBD dapat dilakukan dengan uji serologik yaitu uji *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Uji ELISA merupakan metode yang paling banyak dilakukan di lapangan untuk mendeteksi antibodi terhadap virus terhadap virus tersebut. Uji tersebut dapat dipakai untuk mengevaluasi antibodi pada *parent stock* untuk mendapatkan informasi tentang tingkat kekebalan pada suatu kelompok dan sebagai bahan pertimbangan untuk menyusun program vaksinasi ayam (Shiv and Gaurav, 2004).

2.8 Diagnosis Banding

Penyakit yang mirip dengan IBD adalah *New Castle Disease* (ND) dan keracunan campuran sulfa. Perdarahan pada perbatasan proventrikulus dan ventrikulus mirip dengan ND, namun perubahan pada bursa akan membedakan kedua penyakit tersebut. Perdarahan otot pada paha atau dada dapat dikelirukan keracunan campuran sulfa. Pemeriksaan patologi pada bursa Fabricius akan membedakan kedua penyakit tersebut (Tabbu 2000). *Infectious Bronchitis* (IB) dapat dikelirukan dengan IBD yakni adanya kerusakkan ginjal tetapi dijumpai lesi pada laring dan trachea (Goryo *et al.*, 1984). *Inclusion Body Hepatitis* (IBH), bursa Fabricius ayam yang terserang mengalami pengecilan dan terlihat mengkerut. Hati terdapat bercak-bercak putih yang merupakan sarang nekrosa. Selain itu terdapat perdarahan pada otot dada dan paha (Gordon and Jordon, 1982).

2.9 Pencegahan dan Pengobatan

Ayam yang terserang IBD tidak dapat diobati dengan antibiotik/ antibakteri tertentu. Pengobatan yang dilakukan pada ayam yang terserang virus IBD hanya ditujukan untuk mengatasi infeksi sekunder oleh karena adanya imunosupresif dari penyakit tersebut. Pengobatan suportif pada ayam yang terserang IBD sangat diperlukan , misalnya dengan pemberian multivitamin dan elektrolit oleh karena ayam yang terserang penyakit tersebut akan mengalami penurunan/kehilangan nafsu makan/minum, diare, dan dehidrasi. Kualitas pakan harus dipertahankan atau diperbaiki agar gangguan pertumbuhan akibat penurunan nafsu makan dapat diperbaiki. Sanitasi/desinfeksi perlu ditingkatkan untuk mencegah meluasnya infeksi pada kandang. Vaksinasi terhadap penyakit-penyakit lain juga diperketat sehubungan respon kekebalan yang suboptimal akibat efek imunosupresif IBD (Tabbu, 2000). Tindakan pencegahan dan kontrol yang efektif harus meliputi program vaksinasi dan *bioseccurity* lingkungan kandang. Walaupun pada ayam muda mempunyai antibodi maternal dari induk tetapi bila antibodi tersebut tidak mampu menghadapi serangan virus IBD yang bersifat subklinis maka program vaksinasi perlu dilakukan dengan memperhatikan waktu pemberian. Tindakan *biosecurity* adalah dengan sanitasi, disinfeksi,dan *control traffic* (manusia, alat, dan kendaraan) (Butcher and Milles, 2002).

2.10 Program Vaksinasi

Vaksinasi adalah pemberian antigen (vaksin) pada hewan dengan maksud untuk merangsang tanggap kebal protektif. Vaksin adalah bibit penyakit berupa

virus, bakteri yang telah dilemahkan kedalam tubuh penerima (ayam), sehingga terjadilah peningkatan kekebalan terhadap serangan bibit penyakit dari vaksin yang dimasukkan tersebut. Bibit penyakit tersebut dimasukkan kedalam tubuh hewan melalui tetes mata, tetes mulut, semprot dan suntikan (Wayan, 2003). Hitchner (1997) mengemukakan bahwa strategi pemberian vaksin dapat mengontrol timbulnya penyakit dalam industri peternakan, dan sebaiknya diberikan pada saat ayam berumur 14 hari karena kandungan antibodi maternal akan habis pada ayam yang berumur 15-20 hari. Bila vaksin diberikan pada umur tersebut maka vaksin akan dapat beradaptasi terhadap sistem imun dan dapat memberikan respon sebelum tingkat antibodi menurun untuk memberikan perlindungan. Dalam memberikan vaksin harus diketahui terlebih dahulu waktu yang tepat untuk melaksanakannya apabila terlampau cepat diberikan maka vaksin akan dinetralisir oleh antibodi maternal, sedangkan jika terlambat maka ada kemungkinan kandang telah terinfeksi virus IBD (Kouwenhouven, 1995). Vaksinasi massal yang diberikan tanpa mengetahui efek terhadap sistem imun menyebabkan tidak hanya kerugian ekonomi tetapi ayam juga akan menjadi stres, sehingga akan menjadi lebih peka terhadap serangan penyakit. (Shrestha *et al.*, 2003). Vaksinasi dapat dilakukan dengan galur virus vaksin yang tergolong *mild* dan *intermediate* atau *intermediate plus* atau vaksin aktif (*live vaccine*) dan vaksin inaktif *(killed vaccine*) (Tabbu, 2003).

Menurut OIE (2005) vaksin pada virus IBD ada dua yaitu:

Vaksin aktif : menggunakan strain virus IBD yang dilemahkan. Vaksin ini ada yang bersifat *mild, intermediate* atau *intermediate plus*. Pemakaian vaksin ini

tidak menimbulkan kerusakkan pada bursa tetapi menimbulkan kematian yang tinggi pada ayam, terutama bila muncul serangan varian baru virus lapangan. Vaksin aktif dipakai dengan menyuntikkan secara intra muskular, disemprotkan atau dicampurkan dalam air minum (OIE, 2005).

Vaksin inaktif : digunakan untuk menstimulasi agar tingkat antibodi pada induk menjadi tinggi dan seragam yang dapat diturunkan pada anaknya sehingga keturunannya mempunyai tingkat antibodi maternal yang tinggi dan seragam pula. Pemberian vaksin inaktif harus dicampur dengan adjuvan dan diberikan dengan cara penyuntikan (OIE, 2005).

Efektifnya, Pendekatan secara komplit dengan memberikan perlindungan pasif pada ayam melalui pemberian vaksin kombinasi aktif dan inaktif pada induk merupakan cara yang efektif program vaksinasi dalam peternakan (OIE, 2005).

2.11 Antibodi

Antibodi adalah molekul protein yang dihasilkan oleh sel plasma sebagai akibat interaksi antara limfosit B peka-antigen dan antigen virus. Antibodi memiliki kemampuan berikatan khusus dengan antigen serta mempercepat penghancuran dan penyingkirannya. Antibodi terdapat di dalam cairan tubuh dengan konsentrasi tinggi dan paling mudah diperoleh dalam jumlah yang banyak untuk analisis serum darah. Antibodi dapat membedakan antara determinan antigen yang hanya sedikit berbeda dalam konfigurasi strukturalnya. Adanya sejumlah besar antigen yang berbeda menyebabkan antibodi yang dibutuhkan untuk bereaksi dengan antigen juga harus besar (Tizard. 1988). Menurut Bellanti

(1993) sisi pengikat antigen atau sisi antibodi aktif yaitu molekul immunoglobulin adalah daerah yang bergabung dengan antigen spesifik. Pada daerah ini, spesifitas antibodi ditentukan oleh rangkaian asam amino yang memungkinkan berkombinasi dengan antigen yang sesuai.

2.12 Sistem Kekebalan Ayam

Ayam mempunyai sistem kekebalan tubuh yang sedikit berbeda dengan sistem kekebalan tubuh pada mamalia, walaupun keduanya sama-sama termasuk makluk hidup yang struktur hidupnya kompleks. Perbedaan tersebut terletak pada kelengkapan alat-alat tubuhnya yang berperan dalam mekanisme imunologik, yaitu ayam mempunyai bursa Fabricius yang tidak terdapat pada mamalia (Tizard, 1988). Sebagai respon imun atas infeksi virus, vertebrae membentuk sistem pertahanan yang sangat cermat yang secara keseluruhan disebut sistem imun. Selama pertemuan awal dengan virus, sistem imun inang mengalami makromolekul virus tertentu sebagai benda asing yang disebut antigen, yang menimbulkan berbagai bentuk respon untuk menghilangkan virus dan mencegah infeksi ulang (Fenner *et al.*, 1995).

Ayam mempunyai suatu sistem kekebalan tubuh yang dapat melindungi tubuhnya dari kerusakan yang disebabkan oleh infeksi demi kelangsungan hidupnya. Secara garis besar dalam tubuh ayam ada dua macam sistem kekebalan spesifik yaitu: 1). Sistem kekebalan seluler, 2). Sistem kekebalan humoral

Sistem imun spesifik humoral melibatkan limfosit B atau sel B. Pada unggas sel yang disebut *bursal cell* atau sel B akan bermigrasi dan berdiferensiasi

menjadi sel B yang matang dalam alat yang disebut bursa Fabricius. Bila sel B dirangsang oleh benda asing maka sel tersebut akan berproliferasi dan berkembang menjadi sel plasma yang dapat membentuk antibodi. Sistem imun spesifik lainnya yaitu sistem imun spesifik seluler, yang berperan dalam sistem imun ini adalah limfosit T atau sel T (Baratawidjaya, 2000).

Populasi sel limfosit ada dua macam yaitu limfosit T yang dalam perkembangannya dipengaruhi oleh kelenjar timus dan limfosit B yang dalam perkembangannya dipengaruhi oleh kelenjar bursa Fabricius (Purwantono, 1997).

2.13 Bursa Fabricius

Bursa Fabricius adalah organ limfo-epitelial yang terdapat pada unggas yang berasal dari pertemuan ekto-endodermal sebagai struktur berbentuk bulat di bagian dorsal kloaka. Struktur bursa Fabricius seperti halnya timus, terdiri dari sel limfoid yang terbalut dalam jaringan epitel yang membatasi suatu saluran (Tizard, 1988).

Berat bursa Fabricius mencapai maksimal pada umur kurang lebih empat minggu yaitu kira-kira 1/400 dari berat tubuh. Fungsi bursa Fabricius adalah sebagai organ limfoid primer dan sekunder. Sebagai organ limfoid primer berfungsi sebagai tempat pendewasaan dan diferensiasi bagi sel dari pembentuk antibodi, oleh karena itu sel ini disebut sel B. Bursa Fabrisius juga berfungsi sebagai organ limfoid sekunder yaitu sebagai penangkap antigen dan pembentuk antibodi (Tizard, 1988). Bursa Fabricius adalah target organ dari virus IBD,

sehingga dapat menyebabkan penekanan pada kekebalan tubuh (Faragher *et al.*, 1974).

2.14 Protein *Infectious Bursal Disease*

Birnavirus memiliki setidaknya 4 struktur protein yaitu (viral protein) VP1, VP2, VP3 dan VP4 (Jackwood *et al.*, 1996). Protein VP2 sebagai antigen netralisasi dan memasukkan protein VP3 ke dalam kelompok antigen spesifik, sedangkan VP4 dimasukkan ke dalam kelompok enzim protease yang berperan dalam pembentukan protein VP1 dari prekursor poliprotein dan protein VP1 berperan sebagai RNA polimerase (transkiptase) (Pereira *et al.*, 1998 yang dikutip Nadif, 2005).

2.15 Antigenisitas

Antigenisitas adalah sifat zat (antigen) yang memungkinkan zat tersebut bereaksi dengan produk-produk dari respon imun, misalnya antibodi atau limfosit T yang tersensitisasi spesifik. Imunogenisitas adalah sifat suatu zat (imunogen) yang memberikan zat tersebut kemampuan membangkitkan respon imun spesifik. Kemampuan ini terdiri dari pembentukan antibodi, pengembangan imunitas seluler (*cell-mediated*) atau kedua-duanya. Zat yang imunogenik selalu antigenik, tetapi antigen tidak selalu imunogenik (Bellanti, 1993).

Menurut Tizard (1988) antigenisitas sama dengan imunogenisitas yang dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu :

1. Limitasi fisikokimiawi

Suatu zat dapat bersifat antigenik bila mempunyai berat molekul besar dan kimiawi kompleks, walaupun molekul kecil dapat berlaku sebagai antigen tetapi molekul besar jauh lebih baik. Pembatasan fisikokimiawi satu lagi tentang antigenisitas adalah keteruraian, karena merupakan proses yang didorong oleh antigen. Jika molekul mengalami katabolisme dengan amat cepat dapat menyebabkan terjadinya kekurangan jumlah yang diperlukan untuk merangsang sel peka antigen. Protein merupakan antigen yang baik karena ukuran dan kerumitan strukturnya. Beberapa protein virus merupakan protein struktural yaitu merupakan bagian dari virion. Hampir semua protein yang mempunyai berat molekul lebih besar dari 10.000 Dalton adalah antigenik.

2. Keasingan

Persyaratan pokok yang kedua adalah keasingan, dan sel peka antigen tidak bereaksi dengan bahan yang tidak begitu dikenalnya. Sifat diskriminasi ini belum seluruhnya jelas, tapi kiranya disebabkan oleh pemadaman atau penyingkiran sel yang dapat bereaksi dengan antigen diri sendiri. Dalam skala yang lebih kecil satu molekul protein saja pada permukaan makromolekul terdapat tempat-tempat diarahkannya reaksi kebal dimana antibodi mengadakan ikatan. Tempat ini disebut determinan antigen atau epitop. Protein determinan antigen ini terdiri dari sekitar 4-6 asam amino dan ditemukan pada tempat yang terbuka atau menonjol dari

permukaan molekul. Pada umumnya jumlah determinan antigen pada sebuah molekul berbanding lurus dengan besarnya molekul.

2.16 ELISA (*Enzyme – Linked Immunobsorbent Assay*).

Enzyme-Linked Immunobsorbent Assay merupakan salah satu uji serologis yang saat ini banyak dimanfaatkan untuk berbagai tujuan. Dalam diagnosis penyakit infeksi, ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antigen (virus, parasit, bakteri, jamur) atau terhadap antibodinya. Pada penyakit non-infeksi, ELISA dapat digunakan untuk evaluasi program vaksinasi, monitor hormon, obat-obatan, antibiotika,toksin, pestisida, komponen serum, protein onkofetal, sitokin, atau penyakit autoimun (Suwarno dkk., 2003).

Sejak diperkenalkan pada tahun 1971, ELISA telah mengalami perkembangan sesuai dengan tujuannya. Pada dasarnya ELISA dapat dibagi menjadi 3 jenis menurut komponen yang dilabel enzim, yaitu: pelabelan pada antibodi (Ab), pelabelan pada antigen (Ag), dan pelabelan pada anti immunoglobulin (Suwarno dkk., 2003).

Dua macam antibodi yang digunakan pada ELISA, antibodi pertama *(primary antibody)* mengikat pada antigen dan antibodi kedua *(secondary antibody)* atau antibodi anti-globulin mengikat pada antibodi pertama. Anti-globulin ini dilabel dengan enzim untuk mempermudah memonitor dengan adanya perubahan warna. Dengan adanya reaksi dari enzim secara kuantitatif antibodi pertama dapat dianalisis. Enzim yang biasa digunakan dalam ELISA adalah *horseradish peroxidase (HRP), alkaline phosphatase (AP), urease beta galaktose*

dan glukosa oksidase. Pemilihan enzim berdasarkan atas; homogen, murah, spesifik dan stabil (Rantam, 2003).

Enzim yang dipakai untuk melabel antigen atau antibodi harus memenuhi beberapa persyaratan, diantaranya tidak boleh mengurangi sifat immunologik antigen atau antibodi, harus dapat diperoleh dalam keadaan murni serta stabil untuk dapat disimpan selama jangka waktu tertentu (Kresno, 1996). ELISA digunakan untuk mendeteksi antibodi daripada test asai yang lain, karena ELISA lebih ekonomis dan kerja cepat untuk melakukan tes terhadap sampel. ELISA dapat mendeteksi antibodi dari serotipe 1 dan 2. Peran antibodi dalam ELISA sangat penting untuk mengukur tingkat kekebalan dalam tubuh sampai titernya cukup, yang dapat digunakan untuk membandingkan antibodi netralisasi dan penangkap antigen sehingga virus dapat dideteksi (Jackwood *et al.*, 1996).

Interpretasi ELISA dapat dilakukan secara kualitatif (visual) ataupun secara kuantitatif (dengan spektrofotometer). Secara kualitatif ELISA dibaca dengan melihat perubahan warna antara kelompok yang diperiksa dengan kelompok kontrol (positif dan negatif). Secara semi kuantitatif atau kuantitatif, ELISA dibaca dengan spektrofotometer (*ELISA reader*) yang berdasarkan pada nilai titer atau absorban atau kerapatan optik (*Optical Density*/OD) (Suwarno dkk., 2003).

2.17 Teknik *Indirect* ELISA

Teknik *Indirect ELISA* dipakai untuk menentukan antibodi. Serum dengan antibodi yang akan ditentukan direaksikan dengan antigen yang telah diikatkan

pada fase padat (polistiren dari *microplate*), selanjutnya dilakukan penambahan konjugat (Anti-immunoglobulin yang berlabel) dan akhirnya penambahan substrat. Aktivitas dari enzim yang terikat berbanding lurus dengan kadar antibodi dalam sampel. Aplikasi dari teknik ini sebagai penentu antibodi dari *Salmonella, Mycobacterium, Candida, Gumboro, Toxoplasma, dan Schistosoma.* Penentuan antibodi dapat dilakukan dengan pelabelan pada Ig-nya yaitu dengan menggunakan metode *Indirect ELISA* (Suwarno dkk., 2003).

BAB III

MATERI METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental murni (*True-experimental*) karena dilakukan perlakuan pada sampel dan adanya kelompok sampel kontrol sebagai pembanding.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bagian Virologi dan Immunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya dan *Tropical Disease Center (TDC),* Universitas Airlangga Surabaya, mulai tanggal 7 Februari 2006 sampai 9 Februari 2006.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *ELISA reader*, *microplate* bentuk datar, inkubator, aluminium foil, becker glass, erlenmeyer, timbangan mikro, pipet pasture, vortex, pH meter, eppendorf varipipette.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah antigen dari virus IBD isolat L1, L2, vaksin virus Bursal Disease (bursal B), vaksin virus Bursal Disease (bursal S) dan vaksin virus Bursal Disease (bursal M) yang sudah disediakan oleh

Laboratorium Bagian Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, *phosphate buffer saline* (PBS) yang terdiri dari *phosphate buffer*, pH 7,4, 150 Mm NaCL, dan 0,1 % sodium acide. *coating buffer, washing buffer, blocking buffer, Anti-Chicken Ig G alkaline phosphatase conjugated (secondary antibody),* Antibodi ayam yang sudah divaksinas (antibodi hasil vaksinasi) diencerkan dengan *blocking buffer* pada pengenceran 1/100, larutan stopper NaOH 3N dan substrat p-NPP.

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Pembuatan dan pemanenan antibodi virus hasil vaksinasi

Enam belas ekor ayam di peternakkan Bapak Supi'in di Desa Pucung, Kecamatan Balong panggang, Kabupaten Gresik disuntik vaksin virus IBD pada umur 14 hari yaitu pada tanggal 3 Desember 2004. Kemudian setelah ayam tersebut berumur 33 hari yaitu tanggal 22 Desember 2004 dilakukan pemanenan darah.

3.4.2 Pengambilan sampel

Darah yang diambil dari ayam yang sudah divaksin didiamkan selama 10 menit sampai keluar serumnya , disentrifus 3000 rpm selama 10 menit kemudian diambil serumnya. Serum ini dapat digunakan sebagai sampel tes untuk mendeteksi antibodi hasil vaksinasi dengan teknik *Indirect ELISA*.

3.4.3 Pengujian antibodi hasil vaksinasi dengan teknik *indirect ELISA*

Coating Ag virus IBD konsentrasi 2μg/ml dengan melapiskan sebanyak 100μl/sumuran *microplate* yang sudah diencerkan dengan pengenceran 1/100

suhu 4^0C semalam. Selanjutnya *microplate* dicuci dengan *washing buffer* (PBS Tween 20) 200μl/sumuran sebanyak 3 x 1 menit. *Microplate* kemudian diblok dengan *milk blocking* 4% sebanyak 100μl/sumuran dan diinkubasi pada suhu 37^0C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci dengan *washing buffer* (PBS Tween 20) 200μl/sumuran sebanyak 3 x 1 menit. Antibodi hasil vaksinasi virus IBD diencerkan 1/100 dengan *blocking buffer,* selanjutnya dimasukkan sebanyak 100μl/sumuran dan diinkubasi suhu 37^0C selama 1 jam, setelah itu dicuci dengan *washing buffer* (PBS Tween) 200μl/sumuran sebanyak 3 x 1 menit, kemudian diikuti dengan penambahan konjugat (*Anti-Chicken* Ig G yang dilabel dengan ensim *alkaline phosphatase*) yang diencerkan dengan *blocking buffer* dengan pengenceran 1:2500 sebanyak 100μl/sumuran dan diinkubasi suhu 37^0C selama 1 jam. Berikutnya *microplate* dicuci kembali dengan *washing buffer* (PBS Tween) 200μl/sumuran sebanyak 3 x 1 menit, kemudian ditambahkan substrat p-NPP sebanyak 100μl/sumuran dan disimpan dalam ruangan gelap selama 1 jam, segera tambahkan larutan *stopper* Na0H 3N sebanyak 50μl/sumuran untuk menghentikan reaksi. Absorban kemudian dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm.

3.5 Pengamatan

Pengamatan terhadap isolat virus dilakukan dengan menggunakan *ELISA reader* untuk melihat nilai *Optical Density* yang menunjukan bahwa antara antigen dan antibodi terjadi reaksi atau ikatan.

3.6 Parameter

Variabel bebas	: Nilai *Optical Density* dan reaksi perubahan warna yang terjadi pada beberapa isolat virus IBD.
Variabel tergantung	: Perbedaan antigenisitas dari beberapa isolat virus IBD.

3.7 Rancangan penelitian dan analisis statistik data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah RAL (Rancangan Acak Lengkap) yaitu data dari nilai *Optical Density* antibodi hasil vaksinasi dianalisis dengan uji *Analysis of Variant* (Anova) dan apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji jarak berganda (Duncan taraf signifikan 5%) untuk mendapatkan perlakuan mana yang memberikan hasil yang terbaik (Kusriningrum, 1989). Semua data dianalisis dengan program SPSS *(Statistical Program for Social Scientific).*

BAB IV

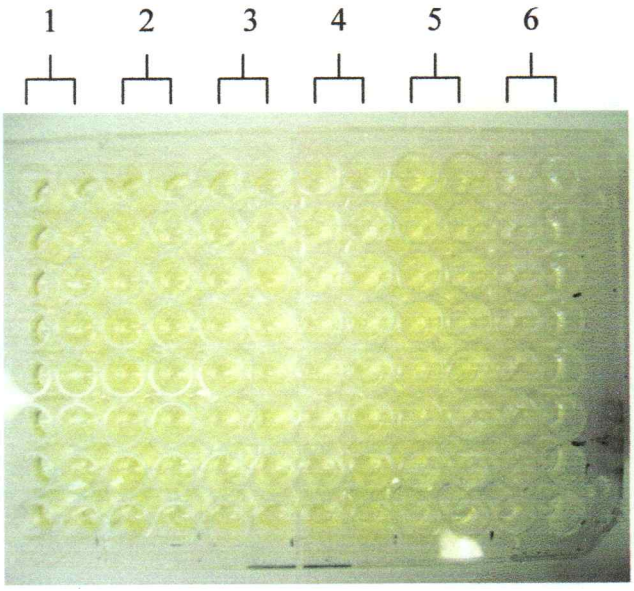
HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1 Hasil Uji *Indirect ELISA*

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan suatu molekul (antigen) untuk bereaksi dengan produk imun (antibodi). Kerja antibodi dalam menetralisir antigen melalui ikatan antara antigen dan antibodi (anti virus IBD). Pengamatan secara visual telah dilakukan untuk melihat adanya reaksi perubahan warna, yang menunjukan adanya reaksi atau ikatan antara antigen dan antibodi anti virus IBD. Pada gambar 4.1 tampak bahwa isolat virus vaksin M mengalami perubahan warna lebih cepat dibandingkan dengan isolat L1, L2, vaksin S, vaksin B dan kontrol.



Gambar 4.1: Perubahan warna beberapa isolat virus IBD yang berikatan dengan antibodi anti virus IBD pada ayam

Keterangan:

1: Isolat L1
2: Isolat L2
3: Isolat vaksin S
4: Isolat vaksin B
5: Isolat vaksin M
6: Kontrol PBS

4.2 Pengujian Antibodi Hasil Vaksinasi Pada Ayam

Hasil penelitian berdasarkan teknik *Indirect ELISA* (tabel 4.1) menunjukkan bahwa pengikatan antigen terhadap antibodi ayam hasil vaksinasi paling tinggi terjadi pada isolat vaksin M, karena nilai *Optical Density* antibodi pada isolat tersebut paling tinggi dibanding pada isolat lain.

Tabel 4.1: *Optical Density* Antibodi Ayam Hasil Vaksinasi pada Absorbansi 405 nm Menggunakan Teknik *Indirect ELISA*.

Ulangan	Nilai *Optical Density*					
	1	2	3	4	5	6
1	0,139	0,255	0,104	0,154	0,482	0.046
2	0,281	0,255	0,211	0,167	0,478	0.039
3	0,129	0,344	0,146	0,133	0,421	0,046
4	0,116	0,199	0,145	0,151	0,504	0,037
5	0,149	0,373	0,195	0,180	0,518	0.027
6	0,155	0,381	0,222	0,131	0,394	0.005
7	0,208	0,283	0,225	0,153	0,493	0.098
8	0,164	0,491	0,196	0,164	0,489	0,121
9	0,134	0,331	0,121	0,125	0,344	0.051
10	0,155	0,090	0,150	0,120	0,348	0.043
11	0,235	0,110	0,316	0,251	0,522	0.044
12	0,311	0,234	0,164	0,180	0,461	0.040
13	0,250	0,176	0,179	0,255	1,364	0.039
14	0,224	0, 248	0,311	0,262	0,475	0.013
15	0,367	0, 251	0,292	0,287	0,638	0.092
16	0,206	0, 162	0,195	0,330	0,469	0.082
Jumlah	3,216	4,176	3,168	3,04	8,4	0,816
Rataan ±SD	0,201± 0,073	0,261± 0,105	0,198± 0,064	0,190± 0,065	0,525± 0,235	0,051± 0,031

Keterangan :

Optical Density 1: Isolat L1
Optical Density 2: Isolat L2
Optical Density 3: Isolat vaksin S
Optical Density 4: Isolat vaksin B
Optical Density 5: Isolat vaksin M
Optical Density 6: Kontrol PBS

Berdasarkan uji statistik dengan Anova menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$) antara beberapa isolat virus IBD (tabel 4.2), maka selanjutnya

diperlukan uji Duncan 5% (lampiran 3) untuk menentukan isolat virus IBD yang berikatan paling kuat dengan antibodi ayam hasil vaksinasi.

Tabel 4.2: Tabel Rangkuman Analisis Variansi Terhadap *Optical Density* Antibodi Ayam Hasil Vaksinasi

Sumber keragaman	db	JK	KT	F	Sig
Perlakuan	5	1,967	0,393	29,312	0,000
Galat	90	1,208	0,0134		
Total	95	3,174			

Hasil analisis statistik dengan uji Duncan (5%) terhadap nilai *Optical Density* dari antibodi vaksinasi virus IBD menunjukkan bahwa nilai *Optical Density* tertinggi terlihat pada isolat vaksin M yang menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$) dengan isolat L1, L2, vaksin S, vaksin B dan kontrol. Nilai *Optical Density* isolat L2 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p>0,05$) dengan isolat L1, vaksin S dan vaksin B tetapi berbeda nyata ($p<0,05$) dengan isolat vaksin M dan kontrol. Nilai *Optical Density* L1 tidak menunjukan perbedaan yang nyata ($p>0,05$) dengan isolat L2, vaksin S dan vaksin B, tetapi berbeda nyata ($p<0,05$) dengan isolat vaksin M dan kontrol. Nilai *Optical Density* isolat vaksin S tidak menunjukan perbedaan yang nyata ($p>0,05$) dengan isolat L1, L2 dan vaksin B, tetapi berbeda nyata ($p<0,05$) dengan isolat vaksin M dan kontrol. B. Nilai *Optical Density* isolat vaksin B tidak menunjukan perbedaan yang nyata ($p>0,05$) dengan isolat L1, L2 dan vaksin S, tetapi berbeda nyata ($p<0,05$) dengan isolat vaksin M dan kontrol. Nilai *Optical Density* terendah pada kontrol yang menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$) dengan isolat M, L1, L2, vaksin S dan vaksin B yang disajikan pada tabel 4.3.

Tabel 4.3: Hasil Analisis Statistik Nilai *Optical Density* Antibodi Hasil Vaksinasi yang Diuji dengan Teknik *Indirect ELISA.*

Perlakuan	Rataan ±SD *Optical Density*
Vaksin M	$0{,}525^{a} \pm 0{,}235$
L 2	$0{,}261^{b} \pm 0{,}105$
L 1	$0{,}201^{b} \pm 0{,}073$
Vaksin S	$0{,}198^{b} \pm 0{,}064$
Vaksin B	$0{,}190^{b} \pm 0{,}065$
Kontrol PBS	$0{,}051^{c} \pm 0{,}031$

a,b,c
Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0{,}05$).

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

Infectious Bursal Disease (IBD) merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus yang hingga kini belum ditemukan pengobatan yang efektif untuk penanggulangannya. Penanggulangan IBD di Indonesia selama ini adalah dengan pemberian vaksin 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 Pronak, 2002). Usaha pengembangan vaksin aktif maupun vaksin inaktif ternyata gagal menunjukkan efektifitasnya sebagai komponen preventif terhadap kasus IBD di Indonesia. Beberapa vaksin aktif menunjukkan reaksi *post vaccine* berupa pembengkakan dan pendarahan bursa Fabricius ayam, bahkan kadang-kadang disertai adanya penekanan sistem imun dan juga angka kematian. Sementara penggunaan vaksin inaktif tidak mampu menghasilkan antibodi protektif dan kekebalan hanya bertahan dalam beberapa minggu (Rahardjo dan Suwarno, 2005).

Penelitian ini menggunakan bahan uji antigen dari beberapa isolat virus IBD yaitu isolat L1, L2, vaksin S, vaksin B. dan vaksin M. Antigen dari beberapa isolat tersebut direaksikan dengan antibodi ayam (antivirus IBD). Antigen adalah suatu bahan yang dapat menyebabkan timbulnya tanggap kebal. Antigen mempunyai bagian yang khusus berikatan dengan antibodi dan dapat diikat dengan spesifik oleh bagian dari antibodi atau reseptor pada limfosit. Bagian ini

disebut determinan antigen atau epitop. Jumlah epitop tergantung dari ukuran dan kerumitan struktur molekul virus tersebut (Tizard, 1988).

Antibodi yang digunakan pada penelitian ini adalah antibodi yang diproduksi pada ayam yang divaksinasi, karena ayam merupakan induk semang utama virus IBD sehingga sesuai dengan sifat penyakit secara alamiah. Antibodi adalah protein yang dikenal sebagai imunoglobulin. Antibodi yang terbentuk adalah sebagai respon imun terhadap suatu antigen dan bereaksi spesifik dengan antigen pembentuknya (Rantam, 2003).

Hasil analisis statistik terhadap nilai *Optical Density* antibodi hasil vaksinasi dalam penelitian ini, pada Tabel 4.1 dan Tabel 4.2 menunjukkan hasil yang signifikan/berbeda nyata ($p<0,05$) antara beberapa isolat virus IBD. Pada Tabel 4.3 tampak isolat vaksin M mempunyai nilai tertinggi (0,525±0,235) yang berbeda nyata ($p<0,05$) dengan isolat L1, L2, vaksin S, vaksin B dan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa masih terdapatnya antibodi "pengingat" keterpaparan antigen pada ayam yang kemungkinan sudah disuntik dengan vaksin M, sehingga ikatan antibodi tersebut terhadap antigen virus isolat vaksin M paling tinggi karena antibodi tersebut sudah beradaptasi. Nilai *Optical Density* pada isolat L2 (0,261±0,105) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p>0,05$) dengan isolat L1, vaksin S dan vaksin B. Nilai *Optical Density* L1 (0,201±0,073) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p>0,05$) dengan isolat L2, vaksin S dan vaksin B, tetapi menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$) dengan isolat vaksin M dan kontrol. Nilai *Optical Density* isolat vaksin S (0,198±0,064) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p>0,05$) dengan isolat L1, L2 dan vaksin B,

tetapi menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$) dengan isolat vaksin M dan kontrol. Nilai *Optical Density* isolat vaksin B (0,190±0,065) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p>0,05$) dengan isolat L1, L2 dan vaksin S, tetapi menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$) dengan isolat vaksin M dan kontrol. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya kedekatan kekerabatan yang mungkin disebabkan oleh lalu lintas perdagangan atau sebaliknya yang membawa konsekuensi penyebaran virus yang sama. Nilai *Optical Density* terendah pada kontrol (0,051±0,031) yang menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$) dengan isolat vaksin M, L2, L1, vaksin S dan vaksin B. Hal ini disebabkan kontrol berisi antigen tanpa adanya antibodi anti virus IBD sehingga tidak terjadi ikatan antara antigen dan antibodi.

Rahardjo dan Suwarno (2005) menyatakan bahwa kedudukkan nilai *Optical Density* untuk masing-masing isolat bisa berbeda-beda, yang kemungkinan disebabkan karena virus IBD dari beberapa isolat tersebut mempunyai tingkat homologi (kesamaan struktur antigenik) yang lebih rendah dan berbeda-beda terhadap virus vaksin yang digunakan di lapangan.

Kekebalan terhadap bibit penyakit dapat ditimbulkan dengan vaksinasi. Zat yang menyebabkan kekebalan dapat ditemukan dalam serum darah yaitu antibodi. Antigen (virus) yang dimasukkan dalam tubuh pertama-tama diikat sebagai benda asing, akan dikenali dengan dikirimkan ke sel pembentuk antibodi atau sistem kekebalan tubuh. Sistem ini akan menanggapi dengan membentuk antibodi yang hanya berikatan khusus dengan antigen yang merangsang pembentukannya. Bila serum yang mengandung antibodi ayam hasil vaksinasi ini

direaksikan dengan antigen yang sama dengan virus yang disuntikan maka reaksi yang terjadi lebih cepat dan antibodi mencapai tingkat yang jauh lebih tinggi dibanding dengan isolat yang lain. Sistem kekebalan atau pembentuk antibodi mempunyai kemampuan untuk "mengingat" keterpaparan dengan antigen sebelumnya (Tizard, 1988).

Hasil penelitian pada uji *Indirect ELISA* tampak adanya reaksi perubahan warna dari masing-masing isolat virus IBD. Perubahan warna yang nyata terlihat dan cepat mengalami perubahan warna adalah isolat virus vaksin M seperti pada Gambar 4.1 dibandingkan dengan beberapa isolat lain yaitu isolat L1, L2, vaksin S, vaksin B dan kontrol. Perubahan warna ini menunjukkan adanya ikatan antara antigen virus vaksin M dengan antibodi anti virus IBD paling kuat, karena antibodi ini lebih banyak mengenal epitop yang merupakan bagian dari antigen dari isolat virus vaksin M, Sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat vaksin virus M mempunyai sifat antigenik yang paling tinggi dibandingkan dengan isolat lain. Reaksi perubahan warna antara beberapa isolat virus IBD berbeda-beda. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya perubahan susunan asam amino pada daerah hipervariabel genom penyandi protein virus IBD sehingga menyebabkan timbulnya varian baru. Adanya perbedaan tersebut dapat memicu timbulnya virulensi dan antigenik varian (Schinitzer *et al.*, 1993; Cao *et al.*, 1998). Adanya perbedaan sekuens nukleotida akan menyebabkan kemungkinan perubahan sekuens epitop yang mengakibatkan adanya perubahan pengenalan antibodi terhadap virus (Ernawati, 2004).

Hasil pelaksanaan uji ELISA tergantung pada ketelitian dalam mengoptimalisasi kondisi dari tes. Menurut Handojo (1996) pendekatan untuk optimalisasi asai dapat dimulai dari pelapisan (*coating)* antigen, penambahan sampel, penambahan detektor untuk melacak terjadinya ikatan antigen dan antibodi yang meliputi penambahan konjugat, penambahan substrat serta pembacaan hasil asai. Untuk menciptakan kondisi yang optimal pada uji ELISA perlu diperhatikan pula kadar antibodi, antigen dan pengenceran konjugat.

Hasil uji *Indirect ELISA* untuk diagnosis antigen maupun antibodi lebih spesifik dibandingkan dengan *direct ELISA* (Rantam, 2003). Antibodi primer (antibodi antivirus IBD) yang berasal dari hasil vaksinasi pada ayam berikatan dengan antibodi sekunder yaitu konjugat Ig *Anti-Chicken* berlabel enzim. Akhirnya tampak adanya reaksi perubahan warna. Antibodi sekunder ini sangat penting dalam uji *Indirect ELISA* karena mempunyai aktivitas spesifik yang tinggi (Piercenet, 2002).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan antigenisitas antara beberapa isolat virus *Infectious Bursal Disease* (IBD) untuk pengujian antibodi hasil vaksinasi dengan teknik *Indirect ELISA.*

6.2 Saran

Saran dari hasil penelitian ini adalah perlunya penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan beberapa isolat virus IBD dalam membentuk antibodi untuk meningkatkan program vaksinasi yang lebih aman dan protektif.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

Anizmah, L.E. 2004. *Peningkatan Jumlah Sel Apoptotik pada Bursa Fabricius Ayam Diinfeksi Virus Gumboro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Unair. Surabaya.

Baratawidjaya, K.G. 2000. *Imunologi Dasar*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran. UI. Jakarta. 3-15.

Bellanti, J.A. 1993. *Imunologi III*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

Boot, H.J., A.A.H.M.ter Huurns., J.W.Hoekman., B.P.H.Peeters, and Gielkens. 2000. *Rescue of Very Virulent and Mosaic Infectious Bursal Disease Virus from Cloned cDNA: VP2 is not the Sole Determinant of the Very Virulent Phenotype*. J Virol. 74: 6701-6711.

Butcher, G.D and R.D. Miles. 2002. *Infectious Bursal Disease (Gumboro) in Commercial Broiller*. American Association of Avian Pathol. http://edis.ifas.ufl.edu/VM024 (25 April 2006).

Cao, Y.S., W.S. Yeung., M. Lauw., Y.Z. Bi., F.C. Leuhng, and B.L. Lim. 1998. *Molecular Characterization of Severe Chines Isolates of Infectious Bursal Disease Virus, Clasical, Very Virulent and Variant Strain*. Avian Dis. 42: 340-351.

Cheetle, N.J., R.K. Eddy, and P.J. Wyeth. 1985. *Comparison of Virus Neutralizing and Precipiting Antibodies Infectious Bursal Disease and their effect on Susceptibility to Chalenge*. Br Vet J. 141 (2) : 146-150.

Chin, R.P., R. Yamamoto., W. Cin., K.M Lam, and B. Farver. 1984. *Serological Survey of Infectious Bursal Disease Virus Serotype 1 and 2 in California Turkey*. Avian Dis. 28 (4) : 1026-1036.

Darjono, 1992. *Kasus Gumboro di lapangan*. Poultry Indonesia. Februari. 144: 25-27.

Darminto., P. Ronohardjo, dan L. Pardide. 1985. *Studi Penyakit Gumboro di Indonesia : Isolasi dan Identifikasi Agen Penyakit*. Penyakit Hewan. 7 (29): 285-288.

Direktorat Jenderal Produksi Ternak. 2002. *Keterpaduan Kebijakan Pembangunan Sektor Peternakan dan Perikanan*. Seminar Nasional Fakultas Kedokteran Hewan. Unair. Surabaya.

Diyanti, R.F., J. Yahya, dan T. Suryani. 1998. *Penyakit-penyakit Penting Pada Ayam.* Edisi IV. Medion. Bandung.

Dormotorio, T.V., J.J. Giambrone, and L.W. Duck. 1997. *Sequence Comparisons of The Variable VP2 Region of Eight Infectious Bursal Disease Virus Isolates.* Avian Dis. 41: 36-44.

Ernawati, R. 2004. *Karakteristik molekular dan immunogenitas protein kapsid virus infectious bursal isolat lokal.* Disertasi Program Pasca Sarjana.Unair. Surabaya.

Faragher, J.T., W.H. Allan, and P.J. Wyeth. 1974. *Immunosupresiv Effect of Infectious Bursal Disease Agent on Vaccination Against New Castle Disease.* Veterinary Record 95 Br Vet Assoc. 385-388.

Fenner, F.J., P.J. Gibbs., F.A. Murphy., R. Root., M.J. Studert, and White. 1995. *Veterinary Virology.* Edisi Kedua. IKIP Semarang Press. Semarang. 143-147.

Freeman , W.H., Jeremy, M. Berg., John, L. Tynoczko and Lubert Stryer. 2000 *Indirect ELISA and Sandwich ELISA.* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid+stryer.figgrp.515. (3 februari 2006)

Gordon, R.F. and F.T.W. Jordon. 1982. Poultry Disease 3. English of Language Book Society. *Due to Infectious Bronchitis Virus and Infectious Bursal Disease in Broiller Chickens.* Avian Pathol 13: 191-200.

Goryo, M.,T. Umemura, and C. Itakura. 1984. *Concurance of Nephrosis-Nephritis Due to Infectious Bronchitis Virus and Infectious Bursal Disease in Broiller Chicken.* Avian Pathol 13:191-200.

Handojo, I. 1996. *Imunoasai III.* Fakultas Kedokteran. Unair. Surabaya.

Hirai, K., S. Shikamura, and E. Kawamoto. 1974. *Electron Microscope Characterization of Infectious Bursal Disease Virus.* Avian Dis. 18:467-471.

Hitchner, S.B. 1970. *Infectifity of Infectious Bursal Disease Virus for Embryonating Egg.* Poultry Scien. 49: 511-576.

Hofstad, M.S., H.J. Barner., B.W. Calnek. and H.W. Yoder Jr. 1984. *Infectious Bursal Disease of Poultry.* 8th. Ed. Iowa University Press. Ames. Iowa: 566-576.

Jackwood, D.J and Y.M Saif. 1983. *Prevalence of Antibodies to Infectious Bursal Disease Virus Serotype 1 and 2 in 75 Ohio Flocks.* Avian Dis. 27(3): 850-854.

Jackwood, D.J., Y.M. Saif, and P.D. Moorhead. 1985. *Immunogenicity and Antigenicity of Infectious Bursal Disease Virus Serotype 1 and 2 in Chicken.* Avian Dis. 29 (4): 1184-1194.

Jackwood, D.J., K.S. Henderson, and R.J. Jackwood. 1996. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based Detection of Antibodies to Antigenic Subtype of Infectious Bursal Disease Viruses of Chickens.* Ohio State University. Ohio. 3 (4): 456-462.

Jackwood, D.J and R.J. Jackwood. 1997. *Molecullar Indentification of Infectious Bursal Disease Strain.* Avian Dis. 4: 97-104.

Kouwenhouven. 1995. *Vaksinasi Virus Gumboro.* Poultry Indonesia. Oktober 188: 8-9.

Kresno, S.B. 1996. *Immunologi Diagnosis dan Procedure Laboratorium.* Edisi III. Fakultas Kedokteran. UI. Hal. 314-315.

Kusriningrum, R. 1989. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap.* Fakultas Kedokteran Hewan. Unair. Surabaya.

Leong, J.C.D., D. Brown., P. Dobos., F.S.B. Kibenge., J.E. Ludest., H. Miller., E. Mundt, and B. Nicholson. 2000. *Family Birnaviridae*, P.481-490. In MH. V. Van Regenmortel, C. M fauquet, DHL Bishop, e. B. Castens, MK Esks, SM Lemon, D. J McGcoch, J. Maniloff, M. A. Mayo, C. R. Pringle, Commites on the Taxonomy of Virus. Academy Press, Inc, San Diego, California.

Muller, R., I. Kaufer., M. Reinacher. and E. Weiss. 1979. *Immunofluorescent Studies of Early Virus Propagation After Oral Infection with Infectious Bursal Disease Virus.* Zentlab Vet Reihe. 26:345-352.

Murtidjo, B.A. 1992. *Pengendalian Penyakit Hama dan Program Pencegahan Penyakit Ayam.* Kanisius. Yogyakarta.

Nadif, A. 2005. *Identifikasi Protein VP2 Virus Infectious Bursal Disease Isolat Lamongan dan Kediri Sebagai Antigen Diagnostik.* Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Unair. Surabaya.

OIE. 2005. *Infectious Bursal Disease.* http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en chapitre 3.1.1. htm. (2 Juli 2006).

Partadiredja, M. 1991. *Infectious Bursal Disease atau Penyakit Gumboro.* Farmazoa 1: 1-11.

Piercenet. 2002. *Proteomics ELISA.* http://www.piercenet.com/proteomics /browse.cfm?fldID=188ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403. (20 Juli 2006).

Pitcovski, J., Di Castro., J. Shaaltiel., A. Azriel., B. Gutter., E. Yarkoni., A. Michael., S. Kriatel, and B.Z. Levi. 1996. *Insect Cell Derived VP2 of Infectious Bursal Disease Virus Convers Protection Against The Disease in Chicken.* Avian Dis. 40: 1303-1322.

Purwantono, K. 1997. *Pengaruh Vaksin IBD dan ND Pada Gambaran Histopatologi Bursa Fabrisius Pada Ayam Bukan Ras (Gallus domesticus).* Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Unair. Surabaya.

Rantam, F.A. 2003. *Metode Immunologi.* Airlangga University Press. Surabaya.

Rahardjo. A.P dan Suwarno. 2005. *Imunogenisitas Protein VP2 Virus Infectious Bursal Disease Isolat Lokal sebagai Dasar Pengembangan Vaksin Sub Unit.* Media Kedokteran Hewan. 21(1): 1-6.

Rumawas, W. 1992. *Infectious Bursal Disease.* Poultry Indonesia. Februari 144:28-29.

Santoso, T.I. 1993. *Isolasi dan Identifikasi Virus Gumboro Pada Ayam Buras Tersangka Penyakit Gumboro di beberapa Kecamatan, Kabupaten Blitar.* Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Unair. Surabaya.

Schinitzier D., F. Bernstein., H. Miller, and H. Becht. 1993. *The Genetic Basic for The Antigenecity of The VP2 Protein of The Infectious Bursal Disease.* J Gen Virol 74: 109-113.

Shiv, C and G. Gaurav. 2004. *Infectious Bursal Disease Limitation with Respect to Development of Efficient Vaccine.* CCS Haryana Agriculture University.

Shrestha, M.M., K.M.D Ahasan., M.M. Islam., M.E. Billah., S. Mitra, and M.R Islam. 2003. *Sero-Prevalence of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Specific Antibody in Chicken.* Pakistan J Bio Scien. 6 (14): 1234-1240.

Sivanan and S.K. Maheswaren. 1980 *Immune Provile of IBD II. Effect of IBD Virus on Poke Weed Mitogen Stimulated.* Avian Dis. 24 ; 734-741.

Srivasta, R.N., D. Sibartie., M.R. Jaumally., R. Ramjee, and A. Arlandoo. 2001. *Isolation and Identification of Infectious Bursal Disease Virus in Cell Culture from Clinical Case.* Ministry of Agriculture, Food Technology and Natural Resources. 195-201.

Suwarno. 1987. *Isolasi Virus Gumboro dan Deteksi Antibodi Presipitasi dengan Uji AGP Pada Ayam Pedaging di Kabupaten Sidoarjo.* Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Unair. Surabaya.

Suwarno., E. Rahaju., A.P. Rahardjo., N. Sianita., J. Rahmahani., F.A. Rantam. 2003. *Prinsip Dasar Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji Elisa.* Fakultas Kedokteran Hewan. Unair. Surabaya.

Tabbu, C.R. 2000. *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya.* Penyakit Bakterial, Mikal, Viral. Volume 1. Penerbit Kanisius.Yogyakarta.

Tabbu, C.R. 2003. *Mutasi Genetik Kenapa Tidak?.* Infovet September 101:19-20.

Tizard, I. 1988. *Pengantar Imunologi Veteriner.* Edisi 2. Airlangga University Press. Surabaya.

Van den Berg, T.P., M. Gozne, and G. Meulemans. 2000. *Acute Infectious Bursal Disease in Poultry. Isolation and Characteristic of highly Virulent Strain.* Avian Pathol. 20:1333-134.

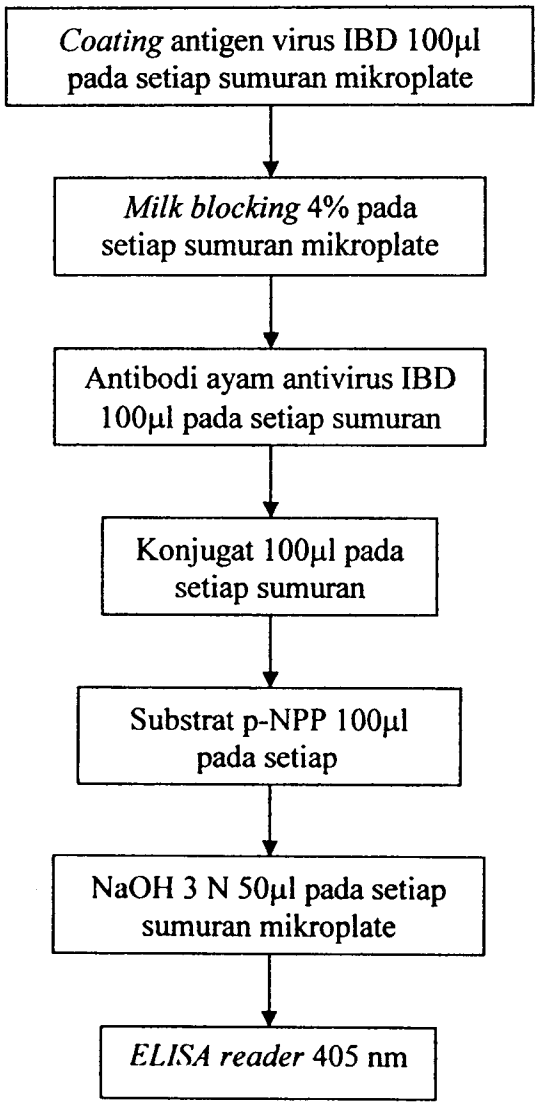
Wayan, I.W.B. 2003. *Bugar dan Sehat Lebih dari Seampul Vaksin.* Infovet September 101: 17-18.

Wiryawan, W. 2003. *Gumboro dan Faktor Penyebab Kegagalan Vaksinasinya.* Infovet Januari 102:38-40.

LAMPIRAN

LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan Alur Penelitian dengan uji *Indirect ELISA*



Lampiran 2. Bahan –bahan yang digunakan untuk uji *Indirect ELISA*

1. **PBS (*Posphate Buffer Saline*)**

PH : 7,4

Konsentrasi : fosfat : 10 mmol/l

NaCL : 140 mmol/i

Timbang : NaCL : 8 g

KCL : 0,2 g

KH_2PO_4 : 0.2 g

$Na_2HPO_412H_2O$: 2,89 g

Aquades ad : 1liter

Simpan pada 4° C

PBS-Triton x

Triton x : 0,5 ml

NaN_3 : 200 mg

PBS ad : 1liter

2. **Bufer Carbonat (Bufer untuk *coating* Ag)**

PH : 9,6

Konsentrasi : 50 mmol/l

Timbang :

Na_2CO_3 : 1,59 g

$NaHCO_3$: 2,93 g

Aquades ad : 1 liter

Simpan pada suhu 4° C tidak lebih dari 2 minggu.

Katalog :

Na_2CO_3 (Natrium Carbonat Wasserfrei) 500.323 A763692 Art 6392. Merck

$NaHCO_3$ (Natrium Hidrogen Carbonat) Art 6329

3. **Bufer Washing (Bufer untuk pencuci)**

a. NaCL-Tween PH : 8,6

Konsentrasi : NaCL : 154 MMOL/L

Tween-20: 1ml

Timbang :

NaCL : 9 g

Tween-20 : 1 ml

Aquades ad 1 liter

Buat PH : 8,6 dengan NaOH

b. NaCL-Triton X

Konsentrasi : NaCL : 0,154 M/l

Triton X 100 : 0,05%

NaN_3 : 0,02%

Timbang :

NaCL : 0.9 g

Triton X 100 : 0,05%

NaN3 : 20 mg

Aquades ad 100 ml

c. PBS-Tween

Timbang : Tween-20 : 1ml

PBS ad 1 liter

Katalog:

- NaCL (lihat Blocking Buffer)
- Tween-20 (lihat Blocking Buffer)
- Triton X-100 (lihat Blocking Buffer)
- NaN_3 (Lihat substrat Buffer)

4. **Bufer Blocking (Bufer untuk pengencer/blocking)**

a. PBS-Tween- BSA : PH : 7,4

Konsentrasi : Fosfat : 10 mmol/l

NaCL : 140 mmol/l

Tween-20 : 1 ml

BSA : 5 g

Timbang :

BSA : 0,5 g

PBS-Tween ad 100 ml

b. PBS-Triton X-BSA

PH : 7,0

Timbang :

BSA : 0,5 g

PBS-Triton X ad 100 ml

Katalog :

- Bovine Albumin Fraction V. Albumin : 95% 25 mg cat. No. 11018-017. Lot. No.1018736 GIBCO BRL
- Tween-20. 500 ml cat. 20605 cas : 9005-64-5 Lot. 107989. USB
- NaCL (Sodium Chloride Analytical Reagent). 1 kg. 31434 Riedel-de-haen.
- Triton X-100. 1 liter. Lot 103 H 0421 SIGMA

5. **Bufer Substrat**

Konsentrasi : Diethanolamine (DEA) 1 mol/l PH : 9,8

Timbang :

$MgCl_2$:10 mg

Diethanolamine: 9,7 ml

NaN_3 : 20 mg

Aqua :80 mg

HCL pekat sampai PH :9,8

Aquades ad 100 ml

Disimpan pada suhu kamar

DEA 1 M

$MgCl_2$ 0,5 M

PH ; 9,8

Katalog :

- $MgCl_2$: 1 kg 405 A 852233. Art. 5833 Merck
- Diethanolamine : 500 g O-8885 Lot 45 H 0950 SIGMA
- NaN_3 : 100 g 405 B 32014880 Art 6688 Merck

6. Conjugate

Alkaline phosphatase-Anti Chicken Ig G Conjugate

Encerkan dengan bufer blocking 1:1000 – 1:3000

Lampiran 3 : Analisis data

Oneway

Descriptives

optikal density antibodi hasil vaksinasi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K	16	5,14E-02	3,1254E-02	7,81E-03	3,4784E-02	6,8091E-02	,005	,121
L1	16	,20144	7,2691E-02	1,82E-02	,16270	,24017	,116	,367
L2	16	,26119	,10447	2,61E-02	,20552	,31686	,098	,491
Vaksin S	16	,19825	6,3835E-02	1,60E-02	,16423	,23227	,104	,316
Vaksin B	16	,19019	6,5107E-02	1,63E-02	,15549	,22488	,120	,330
Vaksin M	16	,52500	,23457	5,86E-02	,40000	,65000	,344	1,364
Total	96	,23792	,18280	1,87E-02	,20088	,27495	,005	1,364

Test of Homogeneity of Variances

optikal density antibodi hasil vaksinasi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,078	5	90	,075

ANOVA

optikal density antibodi hasil vaksinasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,967	5	,393	29,312	,000
Within Groups	1,208	90	1,342E-02		
Total	3,174	95			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Optikal Density Antibodi Hasil Vaksinasi

Duncan[a]

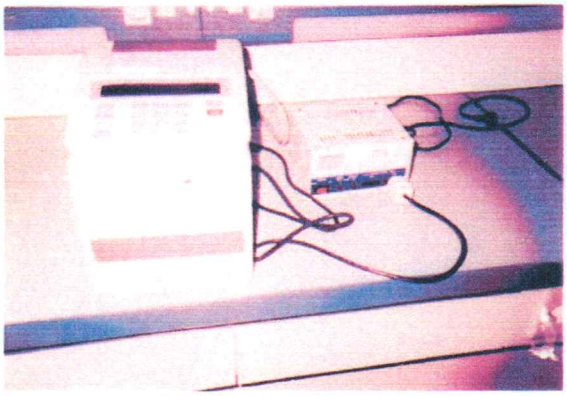
PERLKUAN	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
K	16			5,14E-02
Vaksin B	16		,19019	
Vaksin S	16		,19825	
L1	16		,20144	
L2	16		,26119	
Vaksin M	16	,52500		
Sig.		1,000	,117	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

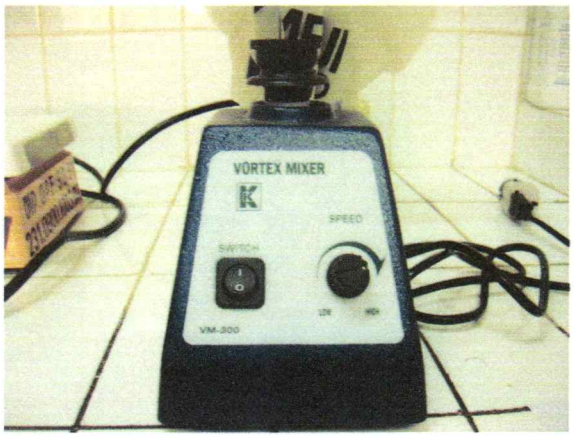
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 16,000.

Lampiran 4. Alat – alat yang digunakan dalam penelitian

Keterangan: Alat – alat penelitian



keterangan : *ELISA reader*



keterangan : *Vortex mixer*