

**LAPORAN PENELITIAN**  
**HIBAH KOMPETITIF KERJASAMA INTERNASIONAL**  
**DALAM RANGKAH PUBLIKASI INTERNASIONAL**

**BATCH III**



**KARAKTERISASI MOLEKUL DETERMINAN PADA PROSES**  
**APOPTOSIS SEBAGAI DASAR PENGENALAN POLA**  
**PATOGENESIS PENYAKIT GUMBORO**

**Ketua Peneliti :**

**Dr. Hani Plumeriastuti, drh, Mkes.**

**Djoko Legowo, drh, Mkes**

**Arimbi, Mkes., drh**

**Prof. Nam-Yong Park, DVM, Ph.D**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**Desember 2009**

**Lembar Pengesahan**

**1. Judul Penelitian :**

KARAKTERISASI MOLEKUL DETERMINAN PADA PROSES APOPTOSIS SEBAGAI DASAR PENGENALAN POLA PATOGENESIS PENYAKIT GUMBORO

**2. Ketua Peneliti**

- a. Nama Lengkap : Dr. Hani Plumeriastuti, drh, Mkes
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. NIP : 131653458
- d. Jabatan Struktural : Kepala Departemen Patologi Veteriner
- e. Jabatan Fungsional : Lektor / IIIc
- f. Fakultas /Jurusan/ : Kedokteran Hewan/Patologi veteriner
- g. Puslit : Universitas Airlangga
- h. Alamat : Kampus C Mulyorejo Surabaya
- i. Telpn /Fax : (031)5992785/ (031) 5993015
- j. Alamat Rumah : Jl.Taman Indah VI/20 Surabaya
- k.Telpon/Fax/E-Mail : (031)78040444/ plumeriastuti@yahoo.co.id

**3. Mitra Kerja Sama Internasional**

- Nama : Collage of Veterinary Medecine, Soul National University, Korea
- Institusi : Departement of Veterinary Pathology

**4. Jangka Waktu Penelitian : 2 (dua) tahun**

**5. Pembiayaan :**

- Jumlah Biaya yang dibutuhkan : Rp 82.500.000,00,-
- Jumlah Biaya yang disediakan oleh Mitra : -
- Biaya yang diajukan ke DIKTI : Rp 82.500.000,00,-

Surabaya, 28 DEC 2009  
Ketua Peneliti

Mengetahui,

a.n Dekan  
Wakil Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga

DR. Anwar Ma'ruf, Mkes, drh  
NIP. 132 049 017

Dr. Hani Plumeriastuti, Mkes., drh  
NIP 131 653 458



Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian  
Universitas Airlangga

Prof. Dr. Bambang Sektiari L, DEA, drh  
NIP. 131 837004

## Sistematika Usul Penelitian

### Identitas Penelitian

1. **Judul Usulan :**  
KARAKTERISASI MOLEKUL DETERMINAN PADA PROSES APOPTOSIS SEBAGAI DASAR PENGENALAN POLA PATOGENESIS PENYAKIT GUMBORO

#### 2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Dr. Hani Plumeriastuti, drh, Mkes  
b. Bidang Keahlian : Patobiologi Veteriner  
c. Jabatan Struktural : Kepala Departemen Patologi Veteriner  
d. Jabatan Fungsional : Lektor / Ilc  
e. Unit Kerja : Departemen Patologi Veteriner FKH Unair  
f. Alamat Surat : Kampus C Mulyorejo Surabaya  
g. Telpon /Fax : (031)5992785/ (031) 5993015  
h. E-mail : plumeriastuti@yahoo.com

#### 3. Anggota Peneliti

##### Tim Peneliti Indonesia

No	Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Instansi	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1.	Djoko Legowo, MKes., drh	Patologi Veteriner	FKH Unair	15 jam/minggu
2.	Arimbi, MKes., drh	Patologi Veteriner	FKH Unair	15 jam/minggu

##### Tim Peneliti Luar Negeri

No	Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Instansi	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1.	Prof. Nam Yong Park, DVM, PHD.	Patologi Molekuler	Soul Nat. Univ	10 jam/minggu

#### 4. Objek Penelitian

Molekul-molekul penting yang berperan dalam proses apoptosis sel bursa Fabricius ayam dan terekspresikan pasca infeksi virus Gumboro. Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif

#### 5. Masa pelaksanaan penelitian :

Mulai : November 2009  
Akhir : Desember 2010

#### 6. Pembiayaan

Jumlah Biaya yang dibutuhkan : Rp 82.500.000,00,-  
Jumlah Biaya yang disediakan oleh Mitra : -  
Biaya yang diajukan ke DIKTI : Rp 82.00.000,00,-

#### 7. Lokasi Penelitian

Fakultas Kedokteran Hewan Unair Indonesia dan Fakultas Perobatan Veteriner University Putra Malaysia

#### 8. Hasil yang ditargetkan

Diketahui Patogenesis proses apoptosis sel bursa Fabricius ayam pasca infeksi virus Gumboro

**9. Institusi Lain yang Terlibat :** Balai Penelitian Veteriner (BALIVET) Bogor



**COOPERATIVE AGREEMENT**

**Between**

**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,  
AIRLANGGA UNIVERSITY, INDONESIA**

**And**

**COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE,  
SEOUL NATIONAL UNIVERSITY, KOREA**



Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University, Indonesia and College of Veterinary Medicine Seoul National University, Korea, hereby enter into an agreement for cooperation to conduct scientific and academic exchange and collaboration.

Both colleges shall cooperate as follows:

1. Exchange of scientific and instructional information;
2. Exchange of faculty for research, teaching and other collaborative activities;
3. Exchange of faculty to participate in conferences, symposium, workshops and seminars;
4. Exchange of undergraduate and/or graduate students for specific periods of study through an organized study abroad agreement;
5. Establishment of joint research projects on subjects of mutual interest.

Cooperative activities and exchange of research, teaching and extension information and publications will be developed when appropriate to the interests of both colleges under permissible financial circumstances.

This agreement will only be in English

This agreement, upon the signing by representatives of both colleges shall be valid for a period of five years and be subjected to any amendments at anytime by mutual consent. The said agreement shall be extended for an five years at the expiration date unless either party gives written notice to terminate the agreement at least three months prior to the expiration date.

EXECUTED by the Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University and College of Veterinary Medicine, Seoul National University.

Prof. Yong Ho Park, D.V.M., Ph.D.

Dean

**College of Veterinary Medicine  
National Seoul University**

Date: January 05, 2009



Prof. Hj. Romziah Sidik, D.V.M., Ph.D

Dean

**Faculty of Veterinary Medicine,  
Airlangga University**

Date: January 05, 2009

## UCAPAN TERIMA KASIH

Hanya seizin Allah Yang Maha Kuasa dan karena pertolonganNya maka penelitian dan penulisan disertasi ini dapat terselesaikan. Oleh karen itu, hanya kepadaNya lah sembah, sujud, dan segala bentuk kesyukuran saya haturkan.

Selanjutnya saya ucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

Pemerintah Negara Kesatuan Republik Indonesia, melalui Menteri Pendidikan Nasional dan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi yang telah memberikan kesempatan untuk memperoleh dana penelitian , kami ucapkan terima kasih kepada Prof. DR. Bambang Sektiari, drh., DEA.

Rektor Universitas Airlangga Surabaya, Prof Dr H Fasich Lisan Apt, Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, Prof. Hj. Dr.Romziah Sidik, PhD. yang telah memberikan ijin dan kesempatan untuk menjalankan penelitian ini.

Teman-teman sejawat di Bagian Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, atas kerjasamanya.

Kepala Balai Penelitian Veteriner Bogor dan Kepala Bagian Virologi Balai Penelitian Veteriner Bogor yang telah memberikan izin penggunaan salah satu koleksi virusnya untuk pelaksanaan penelitian ini.

Terima kasih pada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah memotivasi, mendukung dan membantu hingga penelitian ini selesai.

## RINGKASAN

**Ekspresi Fas, Granzyme, Dan Caspase 3 pada Apoptosis Sel Bursa Fabricius Ayam pada Infeksi Virus Gumboro**

Mekanisme apoptosis bursa ayam yang terinfeksi virus Gumboro belum diketahui dengan jelas. Diperkirakan mekanisme apoptosis melalui jalur ikatan Fas-Fas ligan yang dapat diketahui dengan peningkatan ekspresi Fas dan caspase 3, dan dapat juga melalui jalur pervalin granzyme yang dapat dilihat dengan peningkatan ekspresi granzyme dan caspase 3.

Ayam SPF sebanyak 44 ekor yang diperoleh dengan cara menetas telur ayam SPF, setelah menetas, *day old chick* (DOC) tersebut dimasukkan pada kandang yang dilengkapi lampu pemanas bercungkup (*brooder*) sebagai hewan coba pada penelitian tahap I. Pada umur 10 hari, 44 ekor DOC tersebut secara random dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan diinfeksi virus Gumboro Tasik '98 dengan dosis 1000 TCID<sub>50</sub> secara tetes mata, peroral, dan perkloaka. Sedangkan pada kelompok kontrol diberikan placebo berupa NaCl fisiologis. Selanjutnya, dari masing-masing kelompok, secara random ayam dikorbankan 2 ekor untuk dipanen bursanya dengan interval waktu : 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 48, 72, 96, 120 jam setelah infeksi. Hasil pemanenan bursa diproses menjadi preparat mikroskopik dan diwarnai dengan menggunakan teknik imunohistokimia untuk penghitungan ekspresi Fas, Granzyme, Caspase 3, dan jumlah sel apoptotik untuk penentuan jangka waktu pengorbanan hewan coba yang diterapkan pada penelitian tahap II, yaitu ditentukan berdasarkan pada pencapaian ekspresi sebesar minimal 25 % untuk tiap variable. Selanjutnya, ayam SPF umur 10 hari sebanyak 16 ekor secara random dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan dan kelompok kontrol sebagai hewan coba pada penelitian tahap II. Untuk mendapatkan infeksi virus Gumboro, kelompok perlakuan diinokulasi dengan virus Gumboro Tasik '98 secara tetes mata, peroral, dan perkloaka dengan dosis 1000 TCID<sub>50</sub>. Sedangkan kelompok kontrol diberikan placebo berupa NaCl fisiologis. Kemudian pada hari ke 2 setelah infeksi, yaitu pada saat ekspresi keempat variable menunjukkan peningkatan sebesar minimal 25 % berdasarkan penelitian tahap I, ayam dikorbankan dengan *euthanasia* dengan cara dekapitasi yang terlebih dahulu dilakukan anestesi dengan CO<sub>2</sub>. Ayam yang telah dikorbankan diamati perubahan patologis anatomisnya dan bursa Fabricius diambil kemudian masing-masing dibagi menjadi dua bagian, yang pertama dipersiapkan untuk pembuatan sediaan mikroskopik (*histopatologik*) dan bagian yang lain untuk karakterisasi protein. Pemeriksaan preparat mikroskopik dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel apoptotik pada folikel bursa Fabricius pada sediaan yang diproses dengan S7101 Apopteg Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, dan penilaian ekspresi Fas, granzyme, dan caspase 3 pada folikel bursa Fabricius pada sediaan yang diwarnai dengan pengecatan imunohistokimia di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Sel apoptotik dikenali dengan penyerapan warna dari S7101 Apopteg Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (coklat kehitaman). Tiap sediaan dihitung dengan bantuan *grateculae* pada lima area hitung yang berbeda. Sedangkan ekspresi Fas, granzyme, dan caspase 3 dikenali dengan reaksi warna yang timbul pada pengecatan imunohistokimia (coklat kekuningan). Hasil penghitungan sel apoptotik dan penilaian ekspresi

Fas, granzyme, dan caspase 3 disajikan pada tabel kemudian diambil nilai rerata dan dianalisis. Data dianalisis dengan MANOVA, hotelling's T dan analisis jalur.

Hasil penelitian tahap I menunjukkan bahwa ketentuan nilai positif di atas 25 % dibandingkan kontrol untuk semua variabel (ekspresi Fas, granzyme, caspase 3, dan jumlah sel apoptotik) tercapai pada 48 jam setelah infeksi. Pada hasil penelitian tahap II tampak bahwa terdapat perbedaan bermakna pada ekspresi Fas, granzyme, dan caspase 3 dan jumlah sel apoptotik bursa antara kelompok yang diinfeksi virus Gumboro dan tidak diinfeksi ( $p \leq 0,05$ ). Ekspresi Fas menunjukkan peningkatan dari  $4.70 \pm 1.68$  pada kelompok yang tidak diinfeksi virus Gumboro menjadi  $51.81 \pm 9.53$  pada kelompok yang diinfeksi. Ekspresi granzyme menunjukkan peningkatan dari  $2.00 \pm 0.34$  pada kelompok yang tidak diinfeksi virus Gumboro menjadi  $31.38 \pm 5.33$  pada kelompok yang diinfeksi. Ekspresi caspase 3 menunjukkan peningkatan dari  $1.25 \pm 1.05$  pada kelompok yang tidak diinfeksi virus Gumboro menjadi  $29.94 \pm 2.01$  pada kelompok yang diinfeksi. Sedangkan jumlah sel apoptotik juga meningkat dari  $5.90 \pm 2.01$  menjadi  $54.05 \pm 11.32$  pada kelompok yang diinfeksi. Hasil analisis jalur menunjukkan bahwa Fas berpengaruh pada peningkatan ekspresi caspase 3 dan caspase 3 berpengaruh pada peningkatan jumlah sel apoptotik bursa pada infeksi virus Gumboro.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mekanisme apoptosis bursa pada infeksi virus Gumboro melalui jalur Fas-Fas ligan.



## SUMMARY

**The Expression of Fas, Granzyme, and Caspase 3 in The Chicken Bursa Cell Apoptosis in Infectious Bursal Disease Virus Infection**

The mechanism of bursal apoptosis in infectious bursal disease virus infected chicken still has not been fully understood. It was thought that the mechanism through the Fas-Fas ligand pathway that could be explained with increasing of Fas and caspase 3 expressions, or perforin-granzyme pathway that could be explained with increasing of granzyme and caspase 3 expressions.

Forty-four chickens on the first step of experiment are divided into 2 groups. Chickens in Group I were infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of Tasik '98 isolate infectious bursal disease virus through intraocular, peroral, and intracloacal routes. Chickens in group II were treated with physiological NaCl through intraocular, peroral, and intracloacal routes as placebo. Randomly, each two chicken from 2 groups, were sacrificed on 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 48, 72, 96, 120 day post infection. The bursa was collected for observation of Fas, granzyme, caspase 3 expressions and the number of apoptotic cells. Tunell Assay with *Apoptotic kit Apoptag* was used to observe bursal apoptosis and immunohistochemistry was used to observe the expression of Fas, granzyme, and caspase 3.

The result showed that the 25 % increasing of Fas, granzyme, and caspase 3 expressions and apoptotic cells number were found on 48 hours post infection. It used for determination for sacrificing chicken in the second step of experiment.

Sixteen chickens on the second experiment, are divided into 2 groups. Chickens in Group I were infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of Tasik '98 isolate infectious bursal disease virus through intraocular, peroral, and intracloacal routes. Chickens in group II were treated with physiological NaCl through intraocular, peroral, and intracloacal routes as placebo. Forty-eight hours post infection, all of the chicken were sacrificed. The method used were quite the same with those in the first step of experiment. The data were analysed by MANOVA, hotelling's T, and path analysis.

The result showed that the expression of Fas, granzyme, and caspase 3, and the number of apoptotic cells in bursa were significant difference ( $p < 0.05$ ) between infected chicken and non-infected chicken. Fas expression increased from  $4.70 \pm 1.69$  in the non infected chickens became  $51.81 \pm 9.53$  in the infected chickens. Granzyme expression increased from  $2.00 \pm 0.34$  in the non infected chickens became  $31.38 \pm 5.33$  in the infected chickens. Expression of caspase 3 increased from  $1.25 \pm 1.05$  in the non infected chickens became  $29.94 \pm 2.01$  in the infected chickens. The number of apoptotic cells also increased from  $5.90 \pm 2.01$  in the non infected chickens became  $54.05 \pm 11.32$  in the infected chickens. The path analyse showed that Fas contributed to increased apoptosis in bursa in the infection of infectious bursal disease virus. This study suggested that mechanism of bursa apoptosis in infection of infectious bursal disease virus is through Fas-Fas ligand pathway.

## ABSTRACT

### The Expression of Fas, Granzyme, and Caspase 3 in The Chicken Bursa Cell Apoptosis in Infectious Bursal Disease Virus Infection

The main purpose of this study was to discover the mechanism of chicken bursa apoptosis increasing in infectious bursal disease virus infection.

Forty-four chickens on the first step of experiment are divided into 2 groups. Chickens in Group I were infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of Tasik '98 isolate infectious bursal disease virus through intraocular, peroral, and intracloacal routes. Chickens in group II were treated with physiological NaCl through intraocular, peroral, and intracloacal routes as placebo. Randomly, each two chicken from 2 groups, were sacrificed on 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 48, 72, 96, 120 day post infection. The bursa was collected for observation of Fas, granzyme, caspase 3 expressions and the number of apoptotic cells. Tunell Assay with *Apoptotic kit Apoptag* was used to observe bursal apoptosis and immunohistochemistry was used to observe the expression of Fas, granzyme, and caspase 3.

The result showed that the 25 % increasing of Fas, granzyme, and caspase 3 expressions and apoptotic cells number were found on 48 hours post infection. It used for determination for sacrificing chicken in the second step of experiment.

Sixteen chickens on the second step of experiment are divided into 2 groups. Chickens in Group I were infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of Tasik '98 isolate infectious bursal disease virus through intraocular, peroral, and intracloacal routes. Chickens in group II were treated with physiological NaCl by intraocular, peroral, and intracloacal routes as placebo. Fourty-eight hours post infection, all of the chicken were sacrificed. The bursa was collected for observation in Fas, granzyme, caspase 3 expressions and the number of apoptotic cells. Tunell Assay with *Apoptotic kit Apoptag* was used to observe bursal apoptosis and immunohistochemistry was used to observe the expression of Fas, granzyme, and caspase 3. The data were analysed by hotelling's T and path analysis.

The result showed that the expression of Fas, granzyme, and caspase 3, and the number of apoptotic cells in bursa were significant difference ( $p < 0.05$ ) between infected chicken and non-infected chicken. All variables (Fas, granzyme, and caspase 3 expression and apoptotic cells number) were increasing in infected chickens. The path analyse showed that there was positive correlation between Fas expression and apoptotic bursa cells number in infected chickens.

This study suggested that mechanism of bursa apoptosis in infection of infectious bursal disease virus through Fas-Fas ligand pathway.

Keywords : Apoptosis, Fas, granzyme, caspase, and infectious bursal disease virus

## DAFTAR ISI

HALAMAN DEPAN	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
UCAPAN TERIMA KASIH .....	iii
RINGKASAN .....	iv
SUMMARY .....	vii
ABSTRACT .....	x
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xvi
DAFTAR TABEL .....	xxviii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang Masalah .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	6
1.3. Tujuan .....	6
1.4. Manfaat Penelitian .....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	8
2.1. Penyakit Gumboro .....	8
2.1.1. Virus Gumboro .....	9
2.1.2. Patogenesis Penyakit Gumboro.....	11
2.1.3. Diagnosis Penyakit Gumboro .....	15
2.1.4. Isolasi dan Identifikasi Virus Gumboro .....	18
2.2. Respons Imun Terhadap Virus .....	18
2.3. Respons Imun terhadap Virus Gumboro	19
2.4. Apoptosis .....	21
2.4.1. Apoptosis dan Nekrosis .....	22
2.4.11. Kematian Sel Apoptotik .....	23
2.4.12. Kematian Sel Nekrotik .....	24
2.4.2. Dasar Mekanisme Anontosis	28
2.4.21. Peran Caspase .....	28
2.4.22. Peran Fas (CD95) dan Fas Ligan (CD95L)pada Apoptosis ...	30
2.4.23. Peran Perforin dan Granzyme pada Apoptosis .....	32
2.4.3. Tahapan Proses Apopto: xvii .....	33
2.4.3.1. Pensinyalan .....	33

2.4.3.2	Kontrol dan Integrasi .....	34
2.4.3.3	Eksekusi .....	34
2.4.3.4	Pembersihan Sel yang Mati .....	35
2.4.4	Deteksi Sel Apoptosis dengan Teknik <i>Tunel Assay</i> .....	37
2.4.5	Deteksi Perangkat Apoptotik dengan Teknik Imunohistokimia .....	38
2.5	Struktur Bursa Fabricius .....	42
2.6	Gambaran Histopatologik Bursa Akibat Infeksi Virus Gumboro .....	44
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....		45
3.1.	Kerangka Konseptual .....	45
3.2.	Hipotesis Penelitian .....	47
BAB 4. MATERI DAN METODE PENELITIAN .....		48
4.1.	Rancangan Penelitian .....	48
4.2	Populasi, Sampel, dan Besar Sampel .....	50
4.3.	Variable Penelitian .....	51
4.4.	Bahan Penelitian .....	52
4.4.1	Hewan Coba .....	52
4.4.2	Unit Analisis .....	52
4.4.3	Virus Gumboro .....	53
4.4.4	Bahan pembuatan pembuatan sediaan imunohistokimia .....	53
4.4.5	Bahan karakterisasi protein .....	54
4.5	Prosedur Penelitian .....	54
4.5.1	Perlakuan terhadap Hewan Coba .....	54
4.5.2	Pembuatan Sediaan Mikroskopik .....	56
4.5.2.1	Pemrosesan Sediaan dengan S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ .....	56
4.5.2.2	Pengecatan Imunohistokimia .....	58
4.5.3	Karakterisasi Protein .....	59
4.5.3.1	Sonikasi Sampel .....	59
4.5.3.2	Analisis Protein dengan SDS-PAGE .....	59
4.5.3.3	Analisis Protein Aktiva <sup>tion</sup> dengan Straving Blot .....	63
4.6	Metode Pengumpulan <sup>xviii</sup> .....	64
4.7.	Cara Analisis Data .....	65

KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN .....	66
BAB 5. HASIL PENELITIAN .....	68
5.1 Hasil Penelitian Tahap I : Penentuan Waktu Optimal Pemeriksaan Ekspresi Fas, Granzyme, Caspase 3 dan Jumlah Sel Apoptotik pada Bursa Fabricius Ayam Setelah Infeksi Virus Gumboro .....	68
5.11 Pemeriksaan Ekspresi Fas .....	70
5.12 Pemeriksaan Ekspresi Granzyme .....	71
5.13 Pemeriksaan Ekspresi Caspase 3 .....	72
5.14 Pemeriksaan Apoptosis .....	73
5.2 Hasil Penelitian Tahap II .....	75
5.2.1 Pemeriksaan Virus dalam Sel .....	75
5.2.2 Pemeriksaan Ekspresi Fas, Granzyme, Caspase 3, dan Jumlah Sel Apoptotik pada Bursa Fabricius Ayam yang Terinfeksi Virus Gumboro .....	77
5.2.2.1 Ekspresi Fas .....	78
5.2.2.2 Ekspresi Granzyme .....	79
5.2.2.3 Ekspresi Caspase 3 .....	79
5.2.2.4 Sel Apoptotik .....	80
5.2.3 Hasil Analisis Jalur Pengaruh Fas dan Granzyme terhadap Caspase 3, serta Pengaruh Fas, Granzyme, dan Caspase 3 terhadap Jumlah Sel Apoptotik pada Bursa Fabricius Ayam yang Terinfeksi Virus Gumboro .....	85
5.2.4 Analisis Ekspresi Protein Fas, Granzyme, dan Caspase 3	86
BAB 6. PEMBAHASAN .....	90
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian Tahap I : Penentuan Waktu Optimal Pemeriksaan Ekspresi Fas, Granzyme, Caspase-3, dan Apoptosis pada Bursa Fabricius Ayam Setelah Terinfeksi Virus Gumboro .....	90
6.2 Pembahasan Hasil Penelitian Tahap II .....	91
6.2.1 Pemeriksaan Virus pada Bursa Fabricius Ayam .....	91

6.22	Pengaruh Infeksi Virus Gumboro terhadap Ekspresi Fas, Granzyme, dan Caspase 3 serta Apoptosis Sel Bursa Fabricius .....	91
6.221	Pengaruh Infeksi IBDV terhadap Peningkatan Ekspresi Fas pada Bursa Fabricius .....	92
6.222	Pengaruh Infeksi IBDV terhadap Peningkatan Ekspresi Granzyme pada Bursa Fabricius .....	93
6.223	Pengaruh Infeksi IBDV terhadap Peningkatan Ekspresi Caspase 3 pada Bursa Fabricius .....	95
6.224	Pengaruh Infeksi IBDV terhadap Peningkatan Jumlah Sel Apoptotik pada Bursa Fabricius .....	98
6.23	Analisis Ekspresi Protein Fas, Granzyme, dan Caspase 3 pada Bursa Fabricius Ayam yang Terinfeksi IBDV .....	99
6.24	Mekanisme Apoptosis Sel Bursa Fabricius akibat Infeksi IBDV .....	100
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....		105
7.1. KESIMPULAN .....		105
7.2. SARAN .....		105
DAFTAR PUSTAKA .....		107

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit Gumboro atau *infectious bursal disease (IBD)* merupakan penyakit viral pada unggas yang disebabkan oleh Avibirnavirus. Penyakit ini bersifat akut, sangat menular dan menekan respons imun (imunosupresif), sehingga angka morbiditasnya mencapai 100% dan angka mortalitas 0-2% yang dapat meningkat bila diikuti dengan infeksi sekunder. Permasalahan penyakit Gumboro sangat berarti bagi industri perunggasan, terutama karena sifat imunosupresif yang menyebabkan peningkatan kepekaan terhadap infeksi oportunistik dan kegagalan vaksinasi. Kegagalan vaksinasi pada industri perunggasan ini menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup besar. Organ target virus Gumboro adalah bursa Fabricius yang merupakan sumber spesifik limfosit B pada unggas (Hiraga *et al* , 1994). Infeksi virus ini dapat menimbulkan pengosongan limfosit bursa Fabricius akibat nekrosis dan apoptosis. Seperti diketahui bahwa limfosit B adalah sel penghasil antibodi, sehingga apabila sel tersebut mengalami nekrosis atau apoptosis, maka antibodi tidak terbentuk, hal ini mengakibatkan gangguan respons imun, yaitu berupa immunosupresi. Menurut Tanimura dan Sharma (1998), pengosongan limfosit bursa Fabricius karena nekrosis dan apoptosis ini dapat bersifat permanen, sehingga walaupun terjadi penyembuhan namun inang tetap mengalami immunosupresi. Sampai saat ini mekanisme apoptosis sel bursa pada infeksi virus Gumboro belum jelas.

Kerugian ekonomi yang ditimbulkan karena kegagalan vaksinasi pada penyakit Gumboro dapat dirasakan, baik pada peternakan ayam pedaging maupun petelur. Pengaruh immunosupresif virus ditunjukkan dengan peningkatan prevalensi infeksi respirasi, peningkatan kematian akibat radang kantung udara dan koliseptikemia pada peternakan ayam yang terserang penyakit Gumboro serta tidak dapat timbul respons terhadap vaksinasi *Newcastle disease* dan *infectious bronchitis* (Lasher and Shane, 1994). Berbagai isolat baru muncul menimbulkan

perubahan patologis yang bervariasi yang berbeda dengan perubahan yang ditimbulkan oleh virus klasik. Kasus Gumboro masih tinggi di berbagai negara di dunia dan penyakit ini memiliki kepentingan sosio ekonomi pada tingkat internasional. Keadaan ini didukung oleh Eteradossi (1995) yang menyatakan bahwa penyakit Gumboro tersebar di 95% negara di dunia dan 80% dari negara tersebut melaporkan kasus klinik yang akut. Di Indonesia penyakit ini pernah melumpuhkan dunia perunggasan karena terjadi wabah pada tahun 1991-1992 (Paredo, 1994). Berdasarkan laporan Direktorat Jendral Peternakan, Indonesia pada tahun 1998 penyakit Gumboro berada pada urutan ke 13 dari penyakit infeksi penting yang ada dan pada tahun 2000, kasus penyakit yang tinggi masih dijumpai di Lampung, Jawa Barat, Yogyakarta, dan Sulawesi Selatan (Dirjen. Peternakan, 2000).

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mendasari penanggulangan penyakit Gumboro. Sejak kemunculan isolat baru pada tahun 1986-1987 yang memiliki sifat berbeda dengan virus klasik, yaitu bersifat sangat virulen, perhatian para peneliti sebagian besar lebih terpacu pada struktur virus, padahal, untuk kontrol penyakit dibutuhkan juga pemahaman yang lebih baik terhadap mekanisme patogenesis di samping pemahaman terhadap struktur virus tersebut. Penelitian tentang patogenesis penyakit Gumboro telah banyak dilakukan, tetapi mekanisme apoptosis yang terjadi belum pernah diungkap dengan jelas. Hasil penelitian tentang patogenesis penyakit Gumboro dengan menggunakan teknik imunofluoresen yang dilakukan oleh Muller *et al* (1979) menunjukkan bahwa, setelah infeksi oral atau inhalasi, virus Gumboro bereplikasi pertama kali dalam limfosit dan makrofag *gut-associated tissues*, kemudian beredar melalui aliran darah menuju bursa Fabricius dan terjadi replikasi. Sebagian besar folikel bursa Fabricius positif terinfeksi virus setelah 13 jam paska inokulasi. Sedangkan penelitian Tanimura dan Sharma (1998) dan Jungmann *et al* (2001) yang menggunakan teknik imunohistokimia membuktikan bahwa pengosongan limfosit bursa pada infeksi virus Gumboro adalah akibat nekrosis dan apoptosis. Laporan Nieper *et al* (1999) juga menggunakan teknik imunohistokimia untuk membuktikan terdapat hubungan antara apoptosis dengan replikasi virus di sel bursa Fabricius. Namun demikian, pada beberapa penelitian tersebut belum diungkap mekanisme apoptosis sel bursa yang ditimbulkan oleh infeksi virus Gumboro. Pemahaman mekanisme apoptosis sel bursa pada infeksi virus Gumboro sangat diperlukan untuk memperoleh dasar



molekuler penanganan penyakit Gumboro maupun pencegahan terhadap infeksi oportunistik. Hal ini penting, karena dengan memahami mekanisme apoptosis tersebut, akan diketahui berbagai molekul *signaling* yang berperan, sehingga dapat diketahui molekul anti tertentu yang dapat digunakan untuk memotong rantai proses apoptosis. Apabila apoptosis dapat dicegah, maka pada infeksi virus Gumboro masih ada sel bursa yang masih hidup sehingga dapat memberikan respons imun yang baik dan masalah kegagalan vaksinasi akibat infeksi virus Gumboro dapat diatasi.

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 (Thomson, 1995). Infeksi virus merupakan salah satu pemicu apoptosis patologik. Berdasarkan paradigma imunopatobiologi molekuler, diharapkan dapat mengungkap mekanisme apoptosis sel bursa pada infeksi virus Gumboro. Menurut Burkhardt dan Muller (1987), keturunan monosit-makrofag dapat terinfeksi dan berperan penting pada penyebaran virus Gumboro, sedangkan Sharma *et al* (1999) menjelaskan bahwa sel target virus Gumboro adalah limfosit B yang mengekspresikan imunoglobulin M, yaitu bakal limfosit B yang banyak dijumpai di bursa. Menurut Kim *et al* (1998), pada infeksi virus Gumboro, setelah menangkap virus, makrofag membebaskan TNF. Tanimura dan Sharma (1997) menjelaskan bahwa, *T helper* (Th) juga berperan pada patofisiologi infeksi virus Gumboro tersebut. Adapun menurut Goldsby *et al* (2000), makrofag yang teraktivasi akan membebaskan berbagai sitokin, antara lain IL-12 dan TNF- $\alpha$ . Respons imun alami terhadap infeksi virus pertama kali melalui induksi interferon tipe I (IFN- $\alpha$  dan IFN- $\beta$ ) dan aktivasi sel NK. Ikatan IFN- $\alpha$  dan IFN- $\beta$  dengan sel NK dapat menginduksi aktivitas lisis sehingga efektif dalam pembunuhan sel yang terinfeksi virus. Aktivitas sel NK ini diperkuat oleh IL-12. Sel NK dapat menimbulkan lisis pada sel target melalui pelepasan granula enzim yang disebut perforin dan granzyme. Perforin mampu membentuk celah pada membran sel target sehingga granzyme dapat menerobos masuk sitoplasma sel selanjutnya menginduksi apoptosis sel target tersebut. Adapun mekanisme anti viral berperantara sel secara umum melibatkan

beberapa komponen yang meliputi Limfosit T sitotoksik (*Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL) dan sel T *helper* 1 (Th1). Sel Th 1 yang teraktivasi menghasilkan sejumlah sitokin yang meliputi IL-2, IFN- $\gamma$ , dan TNF yang berfungsi menahan virus baik secara langsung maupun secara tidak langsung. IL-2 dan IFN- $\gamma$  mengaktifkan sel NK yang berperan penting dalam pertahanan tubuh selama beberapa hari sampai terbentuk respons CTL spesifik. IL-2 dan IFN- $\gamma$  juga menimbulkan aktivasi CTL. Destruksi sel target oleh CTL dapat melalui 2 mekanisme kematian sel, yang pertama melalui ikatan Fas dan Fas Ligan. Sel yang mengandung virus mengekspresikan protein permukaan CD 95 atau disebut Fas. Kemudian terjadi ikatan antara Fas dan Fas ligan (FasL atau CD95L CTL, dari ikatan ini timbul faktor transduktor yang disebut *Fas associated death domain* (FADD) yang dapat mengaktifkan caspase sehingga memicu apoptosis sel target ( Goldby, *et al*, 2000). FADD akan mengikat caspase-8 sehingga caspase-8 menjadi aktif. Caspase-8 akan mengaktifkan caspase 9 kemudian mengaktifkan caspase-3 sehingga terjadi apoptosis tersebut. Mekanisme kematian sel yang kedua adalah melalui pelepasan perforin dan granzyme dengan mekanisme kerja seperti pada sel NK yang selanjutnya menginduksi apoptosis melalui aktivasi caspase 3 (Atkinson *et al*, 1998).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah yang dapat diajukan adalah :

- 1 Apakah pada infeksi virus Gumboro, terjadi peningkatan ekspresi Fas, granzyme, caspase 3, dan jumlah sel apoptotik di bursa Fabricius ?
- 2 Apakah pada infeksi virus Gumboro, Fas dan granzyme memicu peningkatan ekspresi caspase 3 di bursa Fabricius ?
- 3 Apakah pada infeksi virus Gumboro, Fas, granzyme, dan caspase 3 menginduksi apoptosis sel bursa Fabricius ?

### 1.3 Tujuan

#### 1.3.1 Tujuan umum

Tujuan umum penelitian ini adalah mengungkap mekanisme apoptosis sel bursa pada infeksi virus Gumboro.

#### 1.3.2 Tujuan khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah ;

1. Mengetahui apakah pada infeksi virus Gumboro terdapat peningkatan ekspresi Fas, granzyme, caspase 3, dan jumlah sel apoptotik di bursa Fabricius.
2. Mengetahui apakah pada infeksi virus Gumboro, Fas dan granzyme memicu peningkatan ekspresi caspase 3 di bursa Fabricius.
3. Mengetahui apakah pada infeksi virus Gumboro, Fas, granzyme, dan caspase 3 menginduksi apoptosis sel bursa Fabricius.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat teoritis

Hasil penelitian ini dapat mengungkap mekanisme apoptosis sel bursa Fabricius pada infeksi virus Gumboro sehingga merupakan sumbangan bagi kemajuan ilmu, utamanya ilmu di bidang Kesehatan Hewan

#### 1.4.2 Manfaat praktis

Penelitian ini diharapkan bermanfaat sebagai dasar molekuler penanggulangan infeksi virus Gumboro, dan pencegahan infeksi oportunistik melalui penggunaan *blocking agent*. *Blocking agent* yang digunakan adalah protein yang dapat memotong jalur yang paling berperan pada proses apoptosis sel bursa Fabricius.

## 1.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah;

- 1 Pada infeksi virus Gumboro, terjadi peningkatan ekspresi Fas, granzyme, caspase 3, dan jumlah sel apoptotik di bursa Fabricius.
- 2 Pada infeksi virus Gumboro, peningkatan Fas dan granzyme memicu peningkatan ekspresi caspase 3 di bursa Fabricius.
- 3 Pada infeksi virus Gumboro, Fas, granzyme, dan caspase 3 menginduksi apoptosis sel bursa Fabricius.

## BAB 2

### 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).

Penyakit ini pertama kali dilaporkan oleh Cosgrove pada tahun 1962 di daerah Gumboro, Delaware, Amerika Serikat. Awalnya penyakit ini disebut sebagai *avian nephrosis* pada ayam karena terdapat perubahan patologik terutama pada ginjal berupa lesi, walaupun sebenarnya juga terdapat perubahan patologik pada bursa Fabricius (bursa). Pada saat itu agen penyebab penyakit masih dikacaukan dengan penyakit *infectious bronchitis* yang juga menimbulkan perubahan pada ginjal yang mencolok yang disebut virus Gray. Kemudian dilakukan penelitian dengan hasil menunjukkan bahwa ayam yang diimunisasi dengan virus Gray ternyata masih dapat diinfeksi dengan agen IBD dan dapat timbul perubahan patologik pada bursa Fabricius yang spesifik untuk penyakit IBD tersebut. Agen penyebab penyakit ini diisolasi pertama kali oleh Winterfield, *et al*, dari telur berembrio yang kemudian dinamakan *infectious bursal agent* dan diidentifikasi benar-benar sebagai penyebab IBD. Adapun virus Gray diidentifikasi sebagai isolat dari IBV dengan tendensi nefrotrofik. Hitchner selanjutnya mengusulkan nama *infectious bursal disease* sebagai nama penyakit yang menyebabkan lesi patognomonik spesifik pada bursa kloaka (Lukert and Saif, 1997).

### 2.1.1 Virus Gumboro

Virus penyebab penyakit Gumboro tergolong dalam genus Avibirnavirus dan famili Birnaviridae (Hiral and Shimakura, 1974; Kibenge, *et al*, 1988; Murphy, *et al*, 1995). 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, 1997). Beberapa strain serotipe 1 patogen pada ayam dan memiliki virulensi yang bervariasi. Serotipe 1 ini dapat dibagi lagi ke dalam empat kelompok strain yaitu meliputi strain virulen klasik, strain varian antigenik, strain atenuasi, dan strain *very virulent*. Strain virulen klasik menyebabkan peradangan bursa dan nekrosis limfoid yang berat pada ayam. Strain ini juga menimbulkan imunodefisiensi dan mortalitas sebesar 20 - 30% ayam SPF (*specific-pathogen-free*). Sedangkan strain varian antigenik dikenal dengan kemampuannya lolos dari netralisasi silang dengan antiserum terhadap strain klasik serta menyebabkan atrofi bursa yang berat tetapi tanpa disertai inflamasi seperti yang terjadi pada infeksi strain klasik. Strain Atenuasi berasal dari strain klasik dan varian yang diadaptasikan pada sel CEF (*chicken embryo fibroblast*) atau kultur sel yang lain melalui pasase serial. Strain ini tidak menyebabkan penyakit pada ayam oleh karena itu biasanya digunakan sebagai vaksin hidup. Adapun strain *very virulent* adalah strain yang muncul pada tahun 1980 akhir dan menimbulkan wabah sehingga menyebabkan kerugian ekonomi yang besar pada industri perunggasan di Eropa, Jepang, dan Cina. Strain *very virulent* ini dapat menembus antibodi maternal dan menimbulkan kematian sebesar 60 sampai 100% pada ayam SPF. Lesi yang ditimbulkan oleh strain ini khas penyakit Gumboro dan secara antigenik sama dengan strain klasik (Scanavini *et al*, 2004).

Analisis isolat lapang Indonesia menunjukkan bahwa vvIBDV telah muncul sejak tahun 1991. Berdasar pada analisis urutan asam amino dari VP2 HVR, isolat vvIBDV Indonesia dapat dibagi menjadi tiga kelompok isolat, yaitu isolat yang identik dengan vvIBDV dari berbagai daerah lain di dunia, isolat kedua adalah kelompok isolat dengan satu substitusi asam amino pada posisi 222 (Ala→Ser), dan kelompok isolat yang mempunyai dua substitusi asam amino pada posisi 272 (Ile →Thr) dan 279 (Asp→Asn) (Paredo, *et al.*, 2003)..

Virion virus Gumboro tidak beramplop, ikosahedral dengan diameter 60-65 nm. Genom virus tersusun oleh 2 segmen RNA utas ganda (Tsukamoto *et al*, 1999). Segmen A (3,2 kb ) berisi *open reading frames* (ORFs), A1 dan A2. ORF A1 mengkode poliprotein 108 k Da yang setelah proses proteolitik menghasilkan tiga polipeptida matur yaitu VP2 (37-40 kDa), VP3 (30-32kDa), dan VP4 (22kDa). VP2 dan VP3 membentuk kapsid virus, dan VP4 berperan pada pemecahan poliprotein. ORF A2 mengkode 16 kDa protein yang fungsinya belum diketahui. Segmen B (2,7 kb) mengkode VP1 (90 kDa), suatu protein dengan aktivitas *RNA-dependent RNA polymerase* yang terbungkus berikatan dengan ujung kedua fragmen RNA (Müller and Nitschke. 1987; Mundt *et al*, 1995).

### 2.1.2 Patogenesis Penyakit Gumboro

Inang pilihan virus Gumboro adalah ayam muda. Pada ayam muda ini terjadi penyakit secara klinik, sedangkan infeksi pada unggas lebih tua biasanya menimbulkan penyakit subklinik (Mc Ferran, 1993). Menurut Lukert dan Saif (1991), periode kepekaan ayam terinfeksi virus Gumboro secara alami adalah antara 3 sampai 6 minggu. Bila infeksi terjadi pada umur kurang dari 3 minggu, maka tidak menunjukkan gejala klinik, tetapi mempunyai arti ekonomi yang penting karena akibat yang ditimbulkan dapat memperberat immunosupresi. Selain ayam, kalkun juga dilaporkan dapat terinfeksi secara alami, tetapi perubahan yang ditimbulkan tidak separah pada ayam (Jackwood, *et al*, 1985). Sedangkan menurut Mc Ferran (1993), inokulasi yang dilakukan pada species unggas selain ayam tidak dapat menimbulkan penyakit.

Tanda klinik penyakit ini tampak dalam 2-3 hari, yaitu mula-mula ada kecenderungan ayam dalam *flock* membuka mulut. Bulu di sekitar hidung kotor, ayam mengalami diare putih dan berair, anoreksia, depresi, bulu tampak lunglai (Gambar 2.1), badan gemetar dan lemah. Unggas yang terinfeksi virus ini menjadi dehidrasi dan pada stadium akhir penyakit, temperatur menjadi subnormal, kadang-kadang ayam dapat mati (Gordon and Jordan, 1980; Lukert and Saif, 1991). Selanjutnya Lukert dan Saif (1991) menjelaskan bahwa mortalitas penyakit ini relatif rendah, bahkan kadang-kadang 0%, tetapi dapat pula sebesar 20-30%. Sedangkan morbiditas penyakit ini sangat tinggi, yaitu mendekati 100%.

Menurut Lukert dan Saif (1997), perubahan makroskopik yang ditimbulkan penyakit Gumboro berupa perubahan warna otot dada menjadi gelap. Seringkali disertai perdarahan otot paha dan dada (Gambar 2.2). Pada usus terjadi peningkatan cairan mukus. Perubahan paling menyolok adalah pada bursa Fabricius. Hasil penelitian Chevile (1967) menunjukkan bahwa perubahan makroskopik bursa Fabricius karena infeksi virus Gumboro diawali dengan timbulnya transudat kuning seperti gelatin melapisi permukaan serosa, volume dan berat bursa meningkat sehingga pada hari keempat setelah inokulasi mencapai 2 kali berat normal, selanjutnya ukuran bursa mulai menurun, sehingga pada hari kedelapan setelah inokulasi berat bursa tinggal sepertiga berat normal. Namun demikian, isolat varian virus Gumboro dilaporkan tidak menunjukkan respons peradangan, sehingga pembesaran awal bursa serta transudat seperti gelatin tidak dapat diamati (Rosenberger and Cloud, 1986 in Lukert and Saif, 1997 ). Penelitian Nakamura *et al* (1992) dan Higashihara *et al* (1991) menunjukkan bahwa virus Gumboro yang tergolong bervirulensi tinggi menimbulkan imunosupresi yang lebih kuat dan perubahan patologik yang berbeda dengan virus klasik, terutama pada bursa tidak tampak respons peradangan tetapi kerusakan yang terjadi lebih parah.

Organ sasaran virus Gumboro adalah bursa Fabricius pada perkembangan maksimum. Bursa Fabricius merupakan sumber spesifik limfosit B pada unggas (Sharma *et al*, 1999). Hasil penelitian Kaufer dan Weiss (1980) menunjukkan bahwa ayam SPF yang diberi perlakuan bursektomi terlebih dahulu sebelum diinfeksi dengan virus Gumboro virulen, tidak menampilkan penyakit klinis. Bila dibandingkan dengan ayam SPF tanpa bursektomi, maka perubahan histopatologis berbagai organ pada ayam SPF yang mengalami bursektomi jauh lebih ringan. Hasil penelitian Ley *et al* (1983) menunjukkan bahwa, perubahan histologik yang mula-mula timbul pada penyakit Gumboro, yaitu pada hari ke 3 setelah infeksi, folikel limfoid bursa berisi sel limfoid dewasa dalam jumlah rendah, tetapi banyak berisi makrofag. Lapisan sel epitelial antara korteks dan medula tampak sangat jelas. Ada beberapa heterofil di folikel limfoid, tetapi sebagian besar terletak pada celah interfolikel yang edematus bersama-sama dengan makrofag. Kadang-kadang dijumpai daerah nekrosis koagulasi di folikel limfoid yang membentuk daerah kistik berisi bahan homogen eosinofilik yang terang. Pada hari ke 7 setelah infeksi, terlihat peningkatan jaringan penyangga, sel plasma, dan makrofag. Heterofil di folikel



limfoid dan interfolikel tidak menonjol. Namun demikian menurut Lukert dan Saif (1991) isolat baru virus Gumboro menimbulkan lesi histologik yang berbeda, yaitu respons peradangan yang ditimbulkan kurang nyata, tetapi selanjutnya lesi tampak lebih luas. Sedangkan Coy, *et al.* (1992) menambahkan bahwa dengan pengecatan imunohistokimia dapat diamati, bahwa makin virulen strain virus Gumboro, menimbulkan lesi makin parah pada bursa .

Pada penelitian *in vivo* dan *in vitro* ditunjukkan bahwa sel target adalah limfosit B yang mengandung IgM (Sharma *et al.*, 1999). 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 di sel bursa. 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 and Sharma (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 positif antara apoptosis dengan replikasi virus di sel bursa Fabricius. Adapun selanjutnya menurut Tanimura dan Sharma (1998) pengosongan limfosit bursa Fabricius ini dapat permanen, akibatnya, walaupun terjadi penyembuhan, hospes tetap mengalami imunosupresi.

Proses infeksi virus pada sel target diawali dengan pelekatan virus melalui reseptor spesifik suatu sel yang diatur oleh genom sel hospes tersebut (Olsen, 1985), oleh karena itu virus tertentu memiliki sel target tertentu. Sel target virus Gumboro adalah *precursor* limfosit B di bursa Fabricius melalui ikatan protein pada permukaan sel. Hasil penelitian yang menggunakan *virus overlay protein binding assay* (VOPBA) menunjukkan bahwa virus Gumboro mengikat protein dengan

massa molekuler 70, 82, dan 110 kDa pada *chicken B lymphoblastoid cell lines*, LSCC-BK3 (Setiyono, 2000).

Pada penelitian yang mengamati peran sel T pada imunopatogenesis dan penyembuhan jaringan pada infeksi IBDV, Rautenschlein, *et al.* (2002) mengungkapkan bahwa sel T fungsional dibutuhkan untuk mengatur muatan antigen IBDV pada fase akut, yaitu 5 hari setelah infeksi. Bursa Fabricius ayam dengan Tx-CsA (perlakuan timektomi dan pemberian *cyclosporin-A*) memiliki beban yang secara signifikan lebih tinggi dari pada ayam dengan sel T yang utuh. Tx-CsA menghilangkan respons inflamasi yang diinduksi IBDV dan secara signifikan mengurangi kejadian apoptosis sel bursa dan ekspresi sitokin seperti interleukin 2 (IL-2) dan interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) jika dibandingkan dengan ayam yang memiliki sel T utuh. Sel T yang membebaskan IL-2 and IFN- $\gamma$  dapat memperantarai induksi inflamasi dan kematian sel pada ayam dengan sel T utuh. Pengaturan yang memadai dari ekspresi *tumor necrosis like-factor* (TNF) yang ditimbulkan oleh IBDV dapat dibandingkan antara ayam dengan sel T utuh dan ayam dengan Tx-CsA. Ayam dengan Tx-CsA menunjukkan resolusi lesi bursa akibat IBDV yang secara signifikan lebih cepat daripada ayam dengan sel T utuh.

### 2.1.3 Diagnosis Penyakit Gumboro

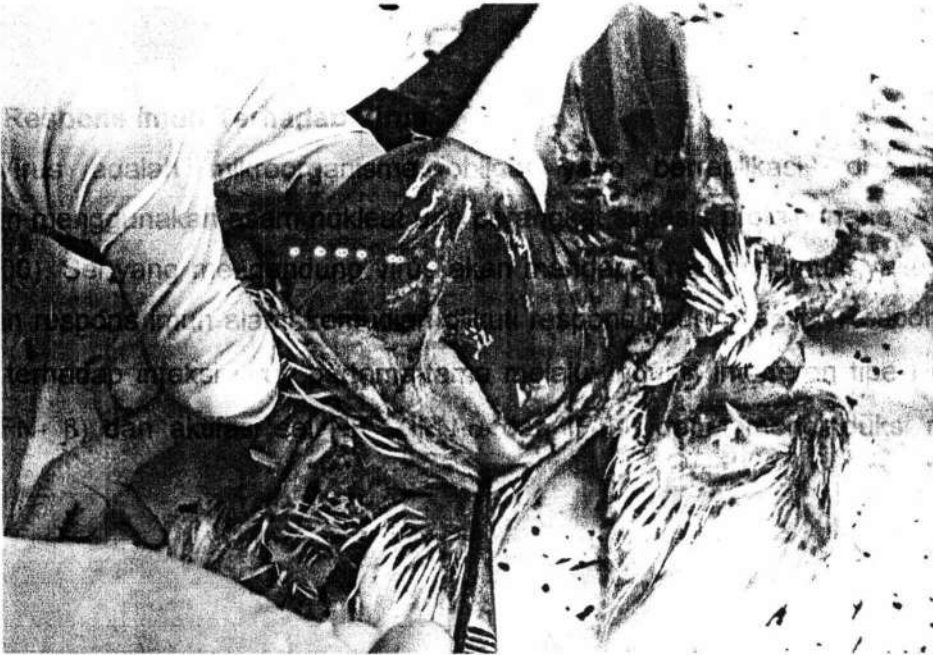
Diagnosis penyakit Gumboro dapat dilakukan berdasarkan riwayat kasus, gejala klinik, dan perubahan patologik. Penyakit Gumboro bentuk akut lebih mudah dikenali karena gambaran penyakit yang khas, yaitu proses penyakit berjalan cepat, morbiditas tinggi, kurva mortalitas yang tajam, dan proses kesembuhan yang cepat, yaitu 5-7 hari. Perubahan makroskopik yang khas pada otot dada, otot paha (Gambar 2.1), dan bursa diperkuat dengan perubahan mikroskopik dapat dijadikan dasar diagnosis penyakit ini. Perlu diingat bahwa terdapat perubahan yang jelas dalam ukuran, warna dari bursa selama perjalanan penyakit, sebagai contoh pembesaran yang disebabkan proses peradangan diikuti oleh atrofi.

Infeksi yang terjadi pada ayam yang sangat muda atau anak ayam yang masih memiliki antibodi maternal biasanya subklinik dan dapat didiagnosis retrospeksi pada nekropsis dengan observasi dari atrofi bursa secara

makroskopik dan histologik. Infeksi pada ayam segala umur dengan virus Gumboro strain varian, hanya akan dapat dideteksi melalui pengamatan histopatologi dari bursa atau dengan isolasi virus (Lukert, 1997).



Gambar 2.1. Tanda klinik penyakit Gumboro ganas berupa kelemahan, depresi, bulu suram dan sayap terkulai (komunikasi personal, Karo karo, 2006).



Gambar 2.2. Perdarahan otot paha pada ayam yang terinfeksi virus Gumboro ganas (komunikasi personal, Parede, 2006).

#### 2.1.4 Isolasi dan Identifikasi Virus Gumboro

Bursa dan limpa merupakan organ pilihan untuk isolasi virus Gumboro, tetapi bursa paling umum digunakan. Beberapa organ lain juga mengandung virus, tetapi dalam konsentrasi yang rendah atau mungkin hanya disebabkan oleh viremia. Jaringan dimaserasi dengan *antibiotic-treated broth* atau salin dan disentrifus untuk membuang partikel jaringan yang lebih besar. Cairan supernatan kemudian digunakan untuk inokulasi pada telur berembrio atau kultur sel.

## 2.2 Respons Imun Terhadap Virus

Virus adalah mikroorganisme obligat yang berreplikasi di dalam sel dengan menggunakan asam nukleat dan perangkat sintesis protein inang (Abbas *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 2000).

### 2.3 Respons Imun terhadap Virus Gumboro

Virus Gumboro menyebabkan lisis pada limfosit B yang mengandung IgM yang terinfeksi.. Walaupun perusakan limfosit B paling menonjol pada bursa, tetapi fakta menunjukkan bahwa replikasi virus dan perusakan sel yang bersangkutan dapat juga diketemukan pada organ limfoid sekunder seperti cecal tonsil dan limpa (Rodenberger, 1994; Okeyo, 1990). Efek sitotoksik dari virus Gumboro terhadap limfosit B menimbulkan penurunan yang tajam pada sel B yang menandung IgM sirkulasi (Hirai, 1981; Rodenberger, 1994; Kim, 1999). Ayam yang terpapar virus Gumboro menghasilkan antibodi terhadap sejumlah antigen baik infeksius maupun noninfeksius pada *level* suboptimal (Kim, 1999). Penelitian Sharma (1999) pada ayam yang diinfeksi virus Gumboro intermediate pada umur 3 minggu menunjukkan bahwa defisiensi humoral bersifat reversibel.

Hasil penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa, proliferasi mitogenik sel T dari ayam terinfeksi virus Gumboro terdapat penekanan yang parah (Giambone, 1977).

Sel T pada limpa sama dengan pada sirkulasi perifer juga terpengaruh (Kim, 1998). Penghambatan mitogenik terjadi pada awal infeksi, yaitu sejak 3-5 hari setelah infeksi. Kemudian respons mitogenik dari sel T kembali pada *level* normal. Selama periode penghambatan mitogenik, sel T ayam yang terinfeksi virus Gumboro juga gagal menghasilkan IL-2 pada stimulasi *in vitro* dengan mitogen (Kim, 1998; Faragher, 1974). Penelitian fraksinasi sel sebelumnya dan beberapa penelitian mutakhir tentang pengayaan populasi limfosit T menunjukkan bahwa penghambatan mitogenik pada suspensi sel limpa diperantarai oleh sel pendukung, yaitu kemungkinan besar adalah makrofag. *Pan-purified T cells* dari limpa ayam yang diinfeksi virus Gumboro responsif terhadap sel T mitogen; penambahan sel pendukung dari limpa ayam yang terinfeksi virus tetapi bukan yang berasal dari ayam yang bebas virus, menghambat mitogenesis sel T pilihan. Relevansi penghambatan sel T mitogenik *in vitro* terhadap peran sel T pada patogenesis virus Gumboro pada ayam *in vivo* belum diketahui.

Pada imunitas alami, secara *in vitro* virus Gumboro memodulasi fungsi makrofag, yaitu dapat terjadi penekanan aktivitas fagositik (Lam, 1998). Sebagaimana telah dibahas di atas, makrofag yang berasal dari ayam yang terinfeksi virus Gumboro mengatur ekspresi gen sitokin dan menghasilkan NO dengan *level* yang meningkat (Kim, 1998). Makrofag merupakan sel yang sangat penting pada sistem imun dan gangguan fungsi dari sel ini dapat mempengaruhi responsifitas imun normal pada unggas (Sharma, 1983).

## 2.4 Apoptosis

Apoptosis adalah suatu proses kematian sel yang terprogram yang bertujuan untuk menghilangkan sel yang rusak atau tidak diperlukan. Program kematian sel ini memainkan peran penting pada berbagai proses fisiologik selama perkembangan fetus dan homeostasis pada jaringan dewasa. Apabila sistem pengaturan apoptosis tidak berfungsi, akan terjadi berbagai penyakit seperti kanker, penyakit neurodegeneratif, dan autoimun (Stephen and Shi, 2001). Menurut Thomson (1995), 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.

Sel yang mengalami apoptosis secara cepat akan mengecil dan kehilangan kontak normalnya dengan jaringan interseluler, kemudian menunjukkan kondensasi kromatin, fragmentasi inti, *cytoplasmic blebbing*, dan fragmentasi sel menjadi *apoptotic bodies* kecil. *Apoptotic bodies* ini secara cepat difagositosis dan dicerna oleh makrofag atau sel di sekitarnya, oleh karena itu pada proses apoptosis tidak terjadi pengeluaran isi sitoplasma pada media interseluler, sehingga inflamasi tidak terpicu. Sedangkan sel yang mengalami kematian melalui nekrosis, gambaran yang tampak adalah pembengkakan. Organel dalam sel terutama mitokondria dan sel secara keseluruhan mengembang kemudian lisis. Keadaan ini terjadi karena jejas menghalangi kontrol terhadap keseimbangan cairan dan ion; air dan partikel (khususnya ion sodium dan kalsium), yang pada keadaan normal dipompakan keluar, namun dalam hal ini mengalir ke dalam sel. Setelah sel lisis, isi sitoplasma dan inti keluar ke media interseluler dan memicu inflamasi (Duke *et al*, 1996).

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.

#### 2.4.1 Apoptosis dan Nekrosis

Apoptosis dan nekrosis adalah dua bentuk kematian sel yang berbeda jelas. Caspase sangat diperlukan sebagai inisiator dan efektor kematian sel apoptotik dan terlibat dalam gambaran morfologik dan biokimiawi apoptosis. Perubahan utama pada keutuhan membran mitokondria dan pelepasan faktor apoptotik seperti sitokrom c dari celah intermembran mitokondria memainkan sensor penting dan memperkuat peran dalam kematian sel apoptotik. Penelitian invitro tentang kematian sel pada *cell line* menampakkan bahwa penghambatan jalur apoptosis bergantung caspase yang klasik membawa beberapa kasus kearah kematian sel nekrotik (Gambar 2.3). Sehingga stimulus kematian sel yang sama dapat mengakibatkan salah satu diantara dua kematian sel tersebut, yaitu apoptotik atau nekrotik, tergantung pada tersedianya caspase yang teraktifasi. Meski demikian,

reseptor *death domain* dapat menggerakkan jalur pensinyalan nekrotik bergantung caspase aktif. Pada tinjauan ini digambarkan apa yang diketahui tentang jalur kematian sel apoptotik dan nekrotik. Elemen pokok pada nekrosis meliputi fosforilasi oksidatif mitokondria, produksi oksigen reaktif, dan kaskade proteolitik non caspase yang tergantung serin protease yaitu *calpain* atau *cathepsin*.

#### 2.4.1.1 Kematian Sel Apoptotik

Pada saat tahap awal apoptosis, membran plasma sel yang mati masih utuh, hal ini untuk mencegah pelepasan bahan pemicu peradangan dari isi sel ke jaringan sekitar. Proses apoptotik ini telah lama dianggap sebagai ketenangan imunologik. Beberapa mekanisme yang menunjukkan hal tersebut antara lain; produksi sitokin immunosupresif IL-10 dan TGF- $\beta$ , dan juga penelanan sel apoptotik yang segera melalui cara bergantung *phosphatidylserine*. Akan tetapi, peptida dari *apoptotic bodies* yang difagosit dapat dipresentasikan oleh sel dendritik dan mendatangkan respons imun. Kadangkala dalam beberapa keadaan, sitokin proinflamasi seperti IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-18 diproses dan dibebaskan selama apoptosis yang berat sehingga memicu respons inflamasi. Pelepasan protein intraseluler yang termodifikasi dapat juga ikut berperan dalam proses inflamasi yang berhubungan dengan apoptosis. EMAP-11, yang merupakan fragmen proteolitik *tRNA multisynthetase complex*, dapat dideteksi selama *renal ischemic reperfusion*. Untuk menghindari inflamasi, sel memberikan isyarat akan status apoptotiknya pada stadium awal pada lingkungannya dimana dia dikenal dan ditelan oleh fagosit. Penampakan fosfatidilserin pada permukaan, yang reseptornya saat ini telah diidentifikasi, merupakan salah satu dari beberapa sinyal atau isyarat tersebut. Untuk kemudahan penelanan, sel apoptotik mengurangi volumenya dengan memompa keluar ion yang ada (K, Cl, osmolit organik) dan mengontraksikan sitoskeleton yang terorganisasi. Lebih jauh membran plasma sel mulai menggelembung

Apoptosis bisa meliputi sel tunggal atau sel yang berkelompok yang secara morfologik dapat diamati dengan pengecatan hematoksin eosin berupa masa oval atau bundar dengan sitoplasma eosinofilik kuat seperti pada Gambar 2. 6. Khromatin inti mengalami kondensasi dan mengumpul ke bagian tepi di bawah



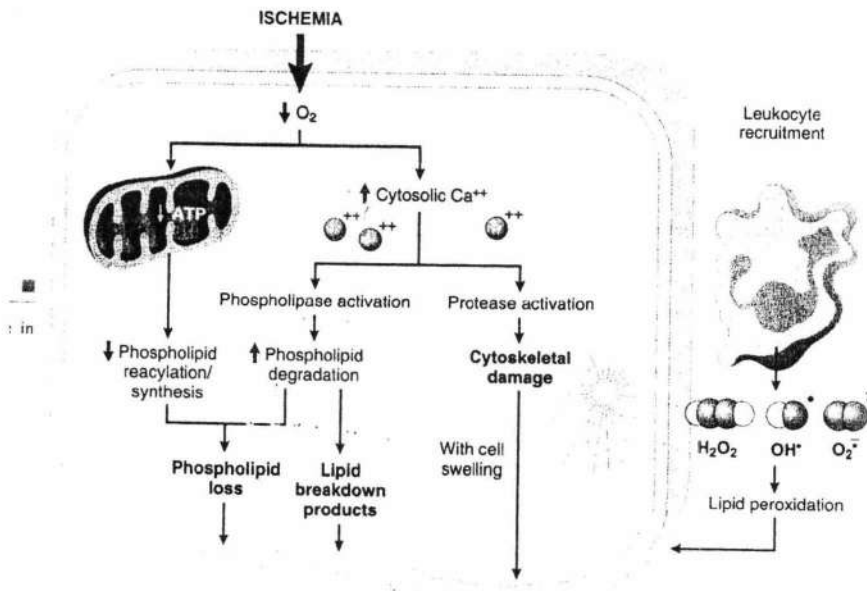
membran inti, menjadi masa berbatas jelas dengan berbagai bentuk dan ukuran. Akhirnya terjadi karyoreksis, pada level molekuler tampak sebagai fragmentasi DNA ke dalam lembaran berukuran nukleosom yang kemungkinan melalui aktivasi endonuklease. Sel tersebut segera mengkerut dan membentuk tonjolan sitoplasma kemudian terpecah-pecah menjadi apoptotik bodi yang tersusun atas vesikel yang dibatasi oleh membran yang berisi sitosol dan organel seperti pada Gambar 2.5; Gambar 2.7 (Kumar, *et al.*, 2003).

#### 2.4.1.2 Kematian Sel Nekrotik

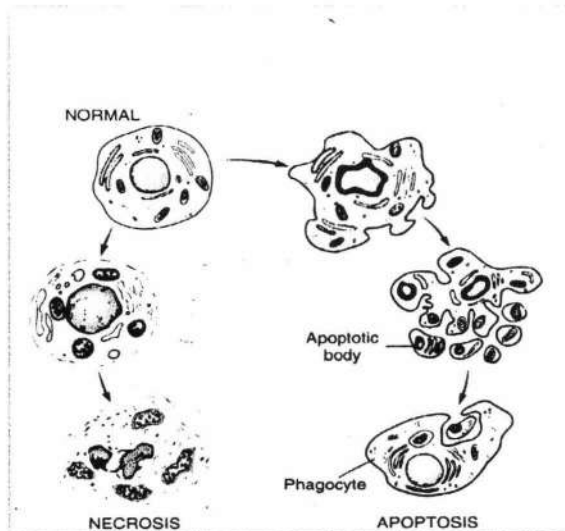
Nekrosis secara klasik digambarkan sebagai kelainan dari kematian sel, yang terjadi pada kasus jejas berat dan akut (misalnya anoksia yang mendadak dan tajam dan kekurangan nutrisi yang mendadak) atau jejas karena faktor fisikokimia yang ekstrim (misalnya panas, deterjen, basa kuat, dan radiasi). Tetapi penelitian mutakhir mere-evaluasi kematian sel nekrotik ini dan menunjukkan bahwa kematian nekrotik juga terjadi pada masa perkembangan dan fisiologi sel normal. Khususnya pada beberapa kondisi patologik (misal iskemia otak) atau kerusakan jantung yang disebabkan oleh sitokin dan toksin, kematian sel dapat terjadi kedua-duanya melalui nekrosis dan apoptosis.

Secara morfologik, nekrosis ditandai dengan kebengkakan seluler. Hal ini menyebabkan membran plasma pecah yang berakibat pada pelepasan isi sitoplasma ke jaringan sekitarnya yang menyebabkan respons inflamasi. Secara diagramatik dapat dijelaskan seperti pada Gambar 2.4. Pembangkitan respons imun yang sesuai pada waktu kerusakan jaringan nekrotik mungkin secara kritis melaksanakan respons anti tumor atau antiviral. Pada keadaan ini organel juga bengkak dan pecah, sedangkan inti masih utuh meskipun dalam keadaan membengkak, terjadi penggumpalan kromatin, degradasi DNA yang terlambat, dan juga bisa terjadi piknosis. Degradasi DNA fragmen besar pada waktu nekrosis lebih mengandalkan serin protease daripada caspase untuk menginduksi aktifitas endonuklease. Lebih jauh faktor kondensasi kromatin tidak bergantung caspase AIF ini bisa berperan juga di sini, seperti merelokalisasi inti selama nekrosis. Keberadaan jalur kematian sel seperti nekrosis ini diatur oleh program kematian intrinsik yang khusus yang berbeda dengan apoptosis yang sudah lanjut. Identifikasi mekanisme molekulernya termasuk pada kematian sel nekrotik semula banyak

hambatan, tetapi akhir-akhir ini telah tersedia model in vitro kematian sel yang tidak bergantung pada caspase dengan morfologi seperti nekrotik .



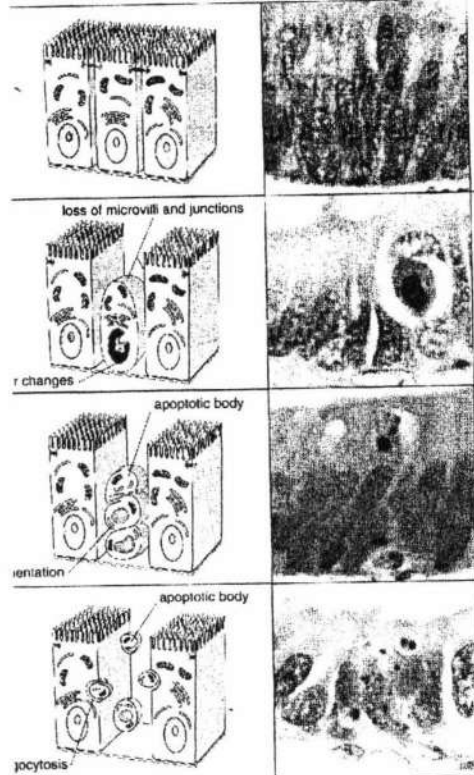
Gambar 2.3 Respons sel terhadap iskemia. Apoptosis atau nekrosis (Stevens and Lowe, 2000).



Gambar 2.5 Diagramatik perubahan ultra struktur nekrosis dan apoptosis (Kumar, et al., 2003).



Gambar 2.6 Apoptosis keratinosit pada kulit (Kumar, *et al.*, 2003).



Gambar 2.7 Tahap apoptosis (Stevens and Lowe, 2000).

### 2.4.2 Dasar Mekanisme Apoptosis

Beberapa faktor yang berperan mengaktifkan program apoptosis selama kehidupan berlangsung antara lain adalah faktor kimia, toksin, radiasi ionik, *reactive oxygen species* (ROS), penuaan, atau iskemia. Pada keadaan normal, apoptosis diinduksi atau dihambat oleh beberapa sinyal eksternal melalui interaksi antar sel, dan oleh mekanisme biologik intraseluler. Apoptosis banyak dijumpai pada keadaan defisiensi imun atau degenerasi. Faktor lain yang ikut memicu apoptosis meliputi adanya reseptor membran sel terhadap faktor pertumbuhan, interleukin, hormon steroid, dan lemak dalam sitoplasma. Apabila ditinjau dari bidang molekuler, pada dasarnya apoptosis diatur oleh suatu gen yang bertindak sebagai pengatur positif terhadap apoptosis dan sebagai penghambat apoptosis (Ashkenazi, 1998).

#### 2.4.2.1 Peran Caspase

Proses apoptosis pertama kali dipelajari pada nematoda *Caenorhabditis elegans* melalui gen yang disebut gen CED (*Caenorhabditis elegans death 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 and Corry, 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). Caspase 3 merupakan caspase efektor utama dengan berat molekul 32 kD, yang teraktivasi hampir pada seluruh proses apoptosis. Aktivasi caspase 3 secara langsung maupun tidak langsung bertanggung jawab pada pemecahan protein target, menuju pemecahan DNA yang spesifik dan perubahan morfologi yang spesifik pula dari sel apoptotik. Pada saat caspase 3 sudah aktif, sel tersebut benar-benar *committed to death* dan apoptosis sudah dapat dikatakan menuju pada kondisi yang tidak dapat kembali lagi (*the point of no return*). Ekspresi bentuk aktif dari caspase 3 di dalam sel terjadi pada awal proses apoptosis dan mendahului perubahan gambaran morfologi kematian sel yang klasik sehingga deteksi peningkatan ekspresi caspase 3 di dalam sel melalui pemeriksaan imunohistokimia dapat dijadikan dasar untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis (Pizem and Cor, 2003; Sanchez-Torres, 2003)

#### 2.4.2.2 Peran Fas ( CD95) dan Fas Ligan ( CD95 L ) pada Apoptosis

Fas adalah protein yang diekspresikan pada sel tertentu misalnya sel yang mengandung virus. Adapun FasL adalah reseptor protein yang terdapat pada permukaan CTL yang dapat berikatan dengan Fas.

Limfosit T sitotoksik (CTL) yang teraktivasi mengekspresikan Fas ligan dan dapat menimbulkan apoptosis pada sel target yang mengekspresikan Fas. Limfosit sendiri juga dapat terbunuh dengan cara ini., yaitu diduga hal ini sebagai mekanisme untuk membatasi intensitas respons imun (Cotran *et al*, 1999). Fas dan Fas ligan atau CD95 dan CD95L merupakan komponen yang sangat berperan terutama pada 3 type fisiologi apoptosis yaitu : delesi perifer dari sel T yang telah matang pada akhir dari suatu proses respons imun, pembunuhan sel target seperti sel yang telah terinfeksi virus atau sel kanker, sel NK, dan sel yang mengalami inflamasi .

Bukti peran CD95 dapat dijumpai pada tikus strain tertentu dan pasien yang mengalami kerusakan pada gen penghasil CD95 dan CD95L. Mutasi yang terjadi pada gen ini menyebabkan akumulasi pada sel limfoid perifer dan terjadi sindroma autoimun yang fatal yang ditandai dengan pembengkakan kelenjar limfe. CD95 dan CD95L juga berimplikasi pada supresi *imunosurveillance* yang disebut eliminasi sel imun yang reaktif terhadap tumor (*tumor-reactive immune cells*) oleh tumor tertentu. Dalam hal ini CD95L diekspresikan terus menerus secara konstitutif. CD95L adalah molekul homotrimerik yaitu tersusun oleh tiga molekul yang sama. Tiap CD95L

mengikat 3 molekul CD95. Karena *death domain* (DD) memiliki kecenderungan untuk bergabung satu sama lain, maka ligasi CD95 akibat terikatnya ligand CD95L menyebabkan reseptor DD terkelompokkan. Setelah terjadi pengelompokan, suatu protein adaptor yang disebut *Fas-associated death domain* (FADD) akan mengikat reseptor DD yang telah terkelompokkan melalui bagian DD nya sendiri. Seperti diketahui bahwa FADD terdiri dari DD dan DED. DED ini yang akan terikat pada suatu analog domain *repeat tandem* dalam bentuk zymogen dari enzim caspase-8. DED adalah contoh spesifik dari interaksi homofilik yang lebih global dari domain yang disebut *caspase recruitment domain* (CARD). CARD ini dapat dijumpai pada beberapa caspase yang memiliki prodomain besar seperti caspase 2, caspase 8, caspase 9 dan caspase 10. Pada saat terjadi *recruitment* oleh FADD, oligomerisasi caspase 8 akan memicu dirinya sendiri untuk terjadi pemecahan. Setelah itu caspase 8 akan mengaktifkan efektor caspase berikutnya, seperti caspase 9, yaitu enzim pada mamalia yang secara fungsional homolog dengan CED-3 dan memicu sel agar terjadi apoptosis (Ashkenazi and Dixit, 1998).

#### 2.4.2.3 Peran Perforin dan Granzyme Pada Apoptosis

Setelah sel terinfeksi 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 konjugasi 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* mengaktifasi CTL-P menjadi CTL efektor aktif. CTL efektor aktif tersebut mengaktifasi badan golgi dan *storage granule center* untuk memproduksi granul enzim yang berisi monomer 32-65 kDa yang disebut perforin 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 (Gambar 2.8).

### 2.4.3 Tahapan Proses Apoptosis

Menurut Kumar (2003), mekanisme apoptosis merupakan titik akhir dari proses molekuler, yaitu berupa *energy-dependent cascade* yang dipicu oleh beberapa rangsangan tertentu. Proses dasar tersebut dapat dijelaskan sebagai empat tahapan yang terpisah tetapi dengan komponen yang saling tumpang-tindih seperti digambarkan secara skematis pada Gambar 2. 9:

#### 2.4.3.1 Pensinyalan

Apoptosis dapat dipicu oleh berbagai sinyal yang meliputi kejadian yang terprogram secara intrinsik misalnya pada saat pertumbuhan, kekurangan faktor pertumbuhan, interaksi ligan reseptor yang spesifik, pengeluaran granzyme dari sel T sitotoksik, atau agen penyebab jejas tertentu seperti radiasi. Sinyal transmembran dapat juga menekan program kematian yang ada atau memicu *death cascade*. Hal yang paling penting pada kelompok terakhir tersebut adalah yang termasuk superfamili TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) molekul membrane plasma diantaranya adalah molekul permukaan Fas. Reseptor membran plasma ini bersama-sama dengan ikatan protein *death domain* intraseluler yang ketika oligomerisasi menyebabkan aktivasi caspase inisiator dan *cascade* aktivasi enzim yang memuncak pada kematian sel.

#### 2.4.3.2 Kontrol dan Integrasi

Pada tahap ini disempurnakan oleh protein spesifik yang berhubungan dengan sinyal kematian asal menuju program eksekusi final. Protein-protein ini sangat penting karena aktivitasnya mengakibatkan masing-masing komitmen atau kegagalan sinyal kematian yang potensial. Secara garis besar terdapat dua jalur pada tahap ini yaitu transmisi langsung sinyal kematian melalui protein adaptor spesifik menuju mekanisme eksekusi dan pengaturan permeabilitas mitokondria melalui protein anggota famili BCL2.

### 2.4.3.3 Eksekusi

Jalur final yang ditandai dengan konstelasi tertentu dari beberapa peristiwa biokimia yang dihasilkan dari sintesis dan / atau aktivasi dari sejumlah enzim katabolik sitosolik. Hal ini mencapai puncak dalam perubahan-perubahan morfologis seperti telah dipelajari sebelumnya. Walaupun terdapat variasi di bawahnya, jalur eksekusi final ini akan menunjukkan pola umum yang secara umum dapat diaplikasikan terhadap semua bentuk apoptosis.

Tahapan ini merupakan jalur final apoptosis yang ditandai dengan aktivasi caspase yang melibatkan berbagai enzim protease.

Pembelahan protein oleh 1 kelas protease yang baru dikenal yang disebut caspase. Disebut demikian karena memiliki sisi aktif sistein yang memecah setelah residu aspartat. Pada sistem eksperimental, peningkatan ekspresi dari setiap bentuk caspase akan menghasilkan apoptosis seluler sehingga menimbulkan dugaan bahwa dalam kondisi yang normal mereka harus dikontrol secara ketat. Aktivasi dari 1 atau lebih enzim caspase akan menghasilkan suatu cascade aktivasi dari protease lain. Bisa dikatakan bisa memicu bunuh diri sel. Sebagai contoh, aktivasi endonuklease *down-stream* berakibat pada fragmentasi DNA yang karakteristik, sementara volume sel dan beberapa perubahan bentuk bisa sebagian dihasilkan dari pembelahan sitoskeleton.

*Extensive protein cross-linking* melalui aktivasi transglutaminase akan mengkonversikan protein sitoplasma terlarut dan beberapa protein sitoskeleton khusus menjadi cangkang yang terkondensasi secara kovalen yang telah berfragmentasi menjadi badan apoptotik.

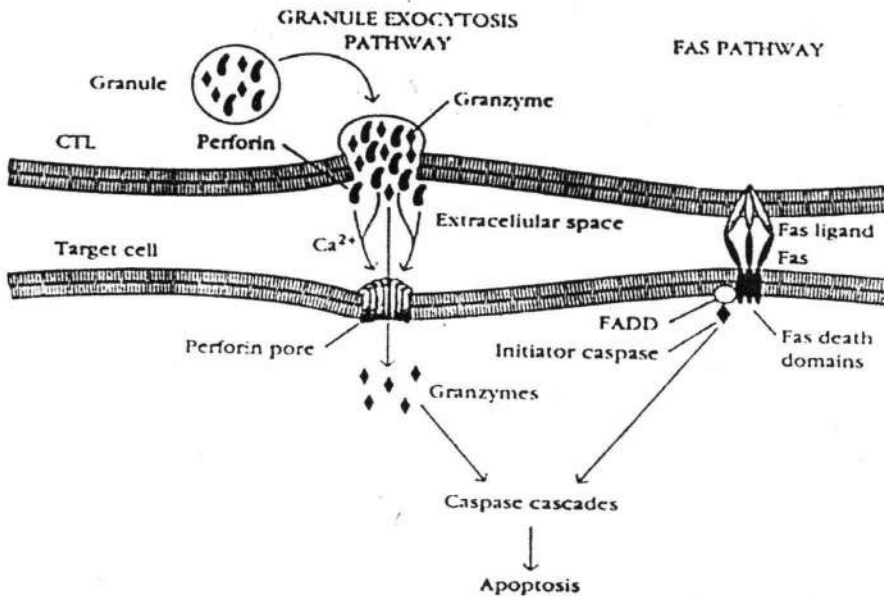
Pemutusan DNA ke dalam fragmen 180-200 bp (jarak antar nukleosom) terjadi melalui kerja dari endonuklease bergantung  $Ca^{++}$  dan  $Mg^{++}$ .

### 2.4.3.4 Pembersihan Sel yang Mati

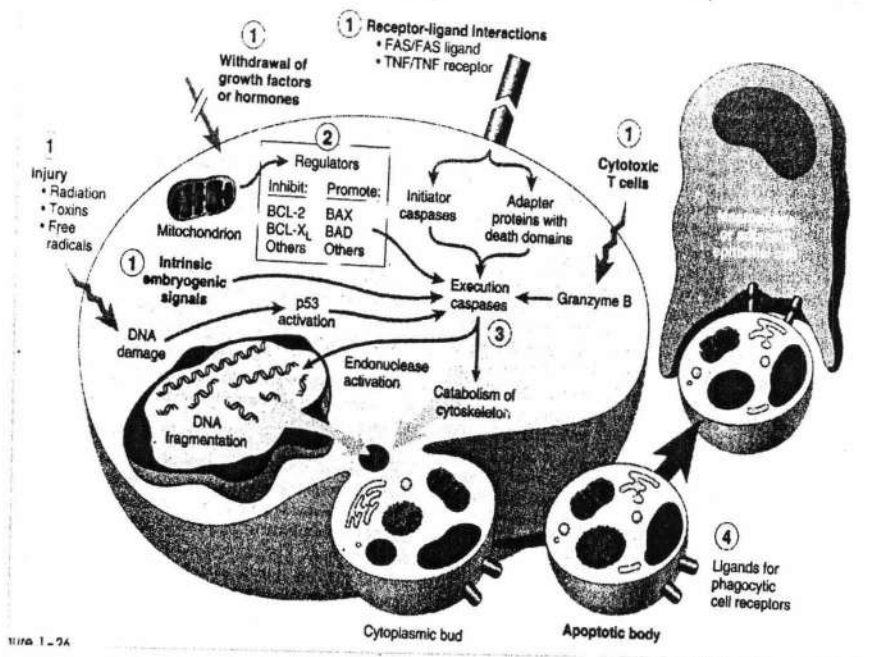
Sel apoptotik dan fragmen sel tersebut memiliki molekul penanda pada permukaannya yang dapat memudahkan sel di sekitarnya atau sel fagosit untuk menyerap dan membersihkannya. Hal ini terjadi dengan cara *flipping* dari fosfatidil serin dari permukaan sitoplasma sebelah dalam sel apoptotik ke permukaan ekstra sel. Perubahan ini dan yang lainnya memungkinkan sel apoptotik dikenali secara dini dan difagositosis tanpa pembebasan mediator inflamasi. Proses ini begitu efisien



sehingga sel yang mati akan hilang tanpa meninggalkan jejak dan tidak terjadi inflamasi.



Gambar 2.8 : Apoptosis sel terinfeksi virus melalui stimulasi CTL ( Goldsby *et al*, 2000 )



Gambar 2.9 : Gambaran skematis peristiwa dalam apoptosis (Kumar, *et al.*, 2003)

#### 2.4.4 Deteksi Sel Apoptosis dengan Teknik *Tunel Assay*

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 *et al*, 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 enzimatis dari ujung 3' OH 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).

#### 2.4.5 Deteksi Perangkat Apoptotik dengan Teknik Imunohistokimia

Secara umum bahan aktif yang diproduksi oleh tubuh dapat dideteksi dengan menggunakan metode imunohistokimia. Bahan aktif tersebut dapat berupa protein, karbohidrat, asam nukleat atau lemak. Namun demikian ada persyaratan bagi bahan aktif untuk dapat dideteksi, yaitu bahan aktif tersebut harus dapat membentuk antibodi spesifik bila disuntikkan pada inang kedua yang berbeda dengan inang pertama penghasil bahan aktif tersebut. Jumlah bahan aktif yang terakumulasi dalam sel atau jaringan harus cukup sehingga dapat diikat oleh antibodi spesifik dan dapat divisualisasikan. Fas, granzyme dan caspase merupakan bahan aktif berupa protein yang dapat menimbulkan pembentukan antibodi bila disuntikkan pada inang yang berbeda, sehingga keberadaan perangkat apoptotik tersebut dalam sel atau jaringan dapat dideteksi menggunakan teknik

imunohistokimia. Sejalan dengan peningkatan pengetahuan tentang mekanisme molekuler dari apoptosis, deteksi sel apoptotik berdasarkan morfologi dan deteksi fragmentasi DNA sekarang berkembang ke arah metode yang lebih spesifik. Protein yang teraktivasi secara selektif, atau fragmen protein yang dihasilkan selama proses apoptosis, telah dapat diidentifikasi, dan antibodi yang spesifik untuk protein tersebut dapat didesain untuk mendeteksi sel apoptotik dan membedakannya dengan sel nekrotik (Pizem and Cor, 2003).

Imunohistokimia merupakan teknik pewarnaan yang melibatkan histologi atau sitologi dan imunologi. Teknik ini menggunakan prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan antigen dan antibodi. Bahan aktif yang dideteksi dikategorikan sebagai antigen, sedangkan anti bahan aktif tersebut dikategorikan sebagai antibodi. Hasil reaksi antigen dan antibodi dapat diidentifikasi pada sel atau jaringan karena antibodi diikat oleh suatu penanda yang dapat divisualisasikan sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif tersebut. Pengamatan dengan mikroskop optik pada teknik ini dapat mengamati keberadaan antigen dalam sel, baik dalam sitoplasma maupun dalam inti, demikian pula antigen yang berada di jaringan ekstra seluler (Beesley, 1995).

Jenis preparat yang digunakan pada imunohistokimia ada 2 macam yaitu preparat segar dan preparat fiksasi (Polak and Noorden, 1986). Preparat segar pada umumnya digunakan untuk keperluan diagnostik cepat atau untuk deteksi bahan aktif yang dapat berubah atau hilang atau rusak jika dilakukan fiksasi atau karena proses selanjutnya misalnya infiltrasi atau *blocking* dengan parafin. Sedangkan preparat fiksasi merupakan preparat yang memerlukan proses panjang, yaitu pemrosesan jaringan seperti pada preparat histologis antara lain dehidrasi, *clearing*, *embedding*, dan *blocking*, sehingga jarang digunakan untuk diagnostik. Penggunaan preparat ini sangat sesuai bila tujuannya melihat bahan aktif disertai gambaran histologis.

Berdasarkan cara ikatan antigen dan antibodi serta penanda, terdapat berbagai metode yang digunakan pada teknik imunohistokimia ini. Adapun metode yang biasa digunakan menurut Beesley (1995) antara lain adalah;

### 1. Metode langsung

Prinsip dari metode langsung adalah pengikatan antigen dan antibodi yang telah diikat dengan substansi penanda, sehingga apabila terjadi ikatan antara antigen dan antibodi maka ikatan tersebut dapat divisualisasikan dengan kromogen. Prinsip metode langsung ini mendasari pewarnaan imunohistokimia yang kini telah berkembang menjadi berbagai metode. Metode langsung masih sering digunakan untuk mendeteksi bahan aktif pada sediaan segar dengan visualisasi menggunakan bahan *fluorescence*, tetapi telah jarang digunakan untuk pewarnaan imunohistokimia menggunakan kromogen karena kurang sensitif apabila bahan aktif yang akan dideteksi terakumulasi dalam jumlah yang kurang.

### 2. Metode tidak langsung dua tahap

Prinsip yang digunakan pada metode tidak langsung dua tahap ini adalah pengikatan antigen dan antibodi primer secara langsung, tetapi antibodi primer tidak langsung berikatan dengan substansi penanda. Salah satu tangan dari antibodi primer berikatan dengan satu tangan dari antibodi sekunder yang telah diikat dengan substansi penanda, sehingga pada metode ini terdapat tiga lapis ikatan, yaitu berupa antigen, antibodi primer, dan antibodi sekunder. Apabila dibandingkan dengan metode langsung, metode tidak langsung dua tahap ini lebih sensitif karena satu tangan antibodi primer dapat berikatan langsung dengan beberapa antibodi sekunder yang telah berpenanda. Keunggulan lain dari metode ini adalah, bahwa antibodi sekunder ini dapat digunakan untuk mendeteksi bahan aktif lain yang berasal dari spesies yang sama, dengan teknik imunohistokimia.

### 3. Metode protein A

Metode protein A ini menggunakan prinsip yang mirip dengan metode tidak langsung, yaitu antibodi primer tidak langsung berikatan dengan substansi penanda, tetapi berikatan secara langsung dengan protein A yang telah diikat dengan substansi penanda. Protein A adalah protein yang diekstraksi dari dinding bakteri *Staphylococcus aureus* yang mempunyai kemampuan berikatan dengan Fc dari molekul IgG dari sebagian mamalia. Metode ini memiliki sensitivitas yang sangat

tinggi, tetapi spesifisitasnya agak rendah, karena semua antibodi yang ada pada sayatan akan diikat oleh protein A dan kemudian divisualisasikan.

#### 4. Metode antibodi tanpa label

Metode antibodi tanpa label prinsipnya seperti metode tidak langsung dengan modifikasi berupa ikatan kompleks imun enzim-antienzim pada ikatan terakhirnya, sehingga dengan metode ini terdapat empat lapisan ikatan antibodi. Semakin banyak tahapan ikatan antibodi, maka semakin banyak kemungkinan ikatan antibodi yang berikatan dengan substansi penanda, sehingga teknik ini merupakan teknik imunohistokimia yang sensitif dan memberikan hasil yang baik untuk sediaan fiksasi, sediaan segar, maupun sediaan ulas. Terdapat dua macam enzim yang biasa digunakan pada metode antibodi tanpa label ini, yaitu *peroxidase* dan *alkaline phosphatase*, sehingga metode ini sering disebut dengan metode *peroxidase-antiperoxidase* (PAP) atau metode *alkaline phosphatase-anti alkaline phosphatase* (APAAP). Penamaan ini berdasarkan ikatan antara kedua enzim dan anti enzim pada ikatan lapis akhir dari kompleks tersebut.

#### 5. Metode avidin-biotin

Metode avidin-biotin yang umumnya disebut sebagai metode ABC (*Avidin Biotin Complex*) ini juga merupakan modifikasi dari metode tidak langsung. Pada teknik ini, antigen diikat oleh antibodi dengan dua tahap. Antigen langsung berikatan dengan antibodi primer, selanjutnya antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yang telah mengalami biotinilisasi. Adapun kompleks ABC adalah merupakan ikatan antara biotin dengan peroksidase dan molekul avidin. Avidin adalah glikoprotein yang memiliki afinitas tinggi untuk berikatan dengan biotin yang merupakan anggota kelompok vitamin B. Pada teknik ini, setiap ujung tangan antibodi sekunder telah terkonyugasi dengan biotin sehingga dapat mengikat kompleks avidin biotin melalui molekul avidin.

### 2.5 Struktur Bursa Fabricius

Bursa Fabricius atau biasa disebut dengan bursa, merupakan organ limfoid primer pada unggas yang berbentuk bulat menyerupai kantong, terletak di sebelah dorsal dari kloaka bagian distal.

Secara histologis, dinding bursa terdiri dari tunika mukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa. Tunika mukosa membentuk plika dengan kepanjangan dan ketebalan yang berbeda-beda yang memanjang ke arah lumen. Jumlah plika dalam 1 bursa berkisar antara 11-13 buah. Plika pada bursa ini berisi beberapa folikel limfoid yang masing-masing folikel limfoid dibatasi oleh jaringan penyangga dimana bentuk dan ukuran tiap folikel berbeda satu sama lain. Permukaan plika dikelilingi oleh epitel (Gulmez, 1999), sehingga struktur bursa tampak sebagai kumpulan folikel limfoid yang terbalut dalam jaringan epitelial dan jaringan epitelial ini membatasi kantong berongga yang dihubungkan dengan kloaka oleh suatu saluran (Tizard, 1981). Pengamatan Gulmez (1999) menunjukkan bahwa epitel yang mengelilingi plika tersebut tergolong epitel *pseudosratified* yang memiliki inti berbentuk oval terletak di bawah garis pertengahan sel dan memiliki lebih dari 1 nukleolus.

Menurut Tizard (1981) dan Gulmez (1999), setiap folikel limfoid terbagi atas medula yang tampak pucat, terletak di bagian dalam dan korteks yang tampak lebih gelap terletak di bagian luar. Pada pertemuan kortikomedula terdapat membran basal dan jaringan kapiler yang di dalamnya terdapat sel epitelial. Sel epitelial medula ini sering menunjukkan mitosis mengarah ke tengah medula, dan medula tampak digantikan oleh sel limfoblas dan limfosit, sehingga bagian medula ini sebagian besar dipenuhi dengan limfosit yang di antaranya terdapat makrofag dan sel dendritik. Lebih jauh Gulmez (1999) mengamati bahwa ada beberapa folikel yang berhubungan langsung dengan epitel sementara folikel yang lain secara penuh dikelilingi oleh jaringan ikat. Sel epitel yang terletak pada dasar epitelium permukaan tampak masuk ke dalam folikel bersama-sama dengan membrana basalis yang mengelilinginya dan memisahkan medula dari korteks medula. Menurut Pink *et al* (1997), pada bursa juga terdapat limfosit T yang terletak pada daerah belakang saluran bursa sehingga menjadi *special T – depending area* yang juga mengandung APC. Namun proporsi kedua macam sel tersebut sangat kecil dibandingkan dengan jumlah limfosit B yang mendominasi bursa sebagaimana ditunjukkan pada hasil penelitian Khan (1994), bahwa folikel bursa berisi 85-95% limfosit B sedangkan sisanya adalah limfosit T sebesar kurang dari 4% dan sel lainnya.

Menurut Pink *et al* (1997), jumlah folikel limfoid dalam bursa ayam sekitar 10.000, jumlah ini terbukti tetap selama embriogenesis dan kehidupan

selanjutnya, sedangkan ukuran folikel akan bertambah mengikuti pertumbuhan volume bursa. Adapun jumlah sel prekursor tiap folikel limfoid maksimal 10 buah, yang menurut Eerola *et al* (1987), kemudian berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel B, yaitu terjadi pada hari ke 8 setelah menetas dan selanjutnya dilengkapi dengan reseptor.

## **2.6 Gambaran Histopatologik Bursa Akibat Infeksi Virus Gumboro**

Gambaran histopatologik akibat penyakit Gumboro pada bursa biasanya hari pertama setelah infeksi sudah dapat diamati, yaitu berupa degenerasi dan nekrosis limfosit di daerah medula. Limfosit akan segera diganti oleh heterofil, hancuran sel retikuloendotelial yang mengalami hiperplasia. Seringkali diketemukan perdarahan walaupun bukan merupakan gambaran yang konsisten. Pada hari ke 3 atau ke 4 setelah infeksi, semua folikel bursa bisa mengalami perubahan. Peningkatan berat bursa pada periode ini dapat dihubungkan dengan edema, hiperemia, dan akumulasi heterofil. Setelah reaksi peradangan menurun, maka dapat ditemukan bentukan menyerupai kista di bagian medula folikel, nekrosis, fagositosis heterofil oleh makrofag dan infiltrasi sel plasma. Proliferasi fibroblas terjadi di antara jaringan ikat interfolikular (Tabbu, 2000).

### BAB 3

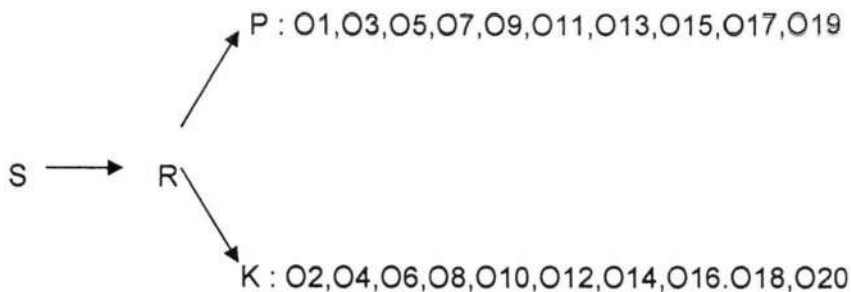
## METODE PENELITIAN

Penelitian ini terdiri dari dua tahap yaitu Tahap I yang merupakan penelitian pendahuluan dan Tahap II yang merupakan penelitian sesungguhnya. Penelitian Tahap I dilakukan dengan tujuan menentukan jangka waktu optimal pemanenan bursa setelah infeksi virus. Waktu optimal tersebut ditentukan berdasarkan pengamatan mikroskopik untuk mengetahui waktu terjadi peningkatan ekspresi Fas, Granzyme, Caspase 3, dan apoptosis pada bursa setelah dilakukan infeksi dengan virus Gumboro

### 3.1 Rancangan Penelitian

#### Penelitian Tahap I

Rancangan yang digunakan pada penelitian Tahap I ini adalah rancangan *Control Group Time Series Design* ( Leedy, 1989 )



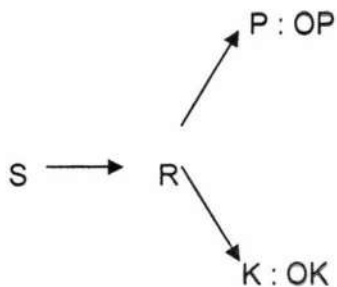
#### Keterangan :

- |                |  |
|----------------|--|
| S              | : Sampel ayam  |
| R              | : Randomisasi  |
| P              | : Kelompok yang diinfeksi virus Gumboro ( perlakuan )  |
| K              | : Kelompok yang tidak diinfeksi virus Gumboro ( kontrol )  |
| O1,O2,O3, .... | : Observasi dalam kelompok. Pengamatan ditujukan pada Jumlah sel apoptotik, ekspresi fas, granzyme, dan caspase 3. |



## Penelitian Tahap II

Penelitian Tahap II ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *The post test only Control Group Design* ( Leedy, 1989 ).



### Keterangan :

- S : Sampel ayam
- R : Randomisasi
- P : Kelompok yang diinfeksi virus Gumboro ( perlakuan )
- K : Kelompok yang tidak diinfeksi virus Gumboro ( kontrol )
- OP, OK : Observasi dalam kelompok. Pengamatan ditujukan pada jumlah sel apoptotik , ekspresi Fas , granzyme, dan caspase 3.

## 3.2 Populasi, Sampel, dan Besar Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah ayam specific pathogenic free ( SPF ). besar sampel pada penelitian tahap I adalah 44 ekor. Adapun sampel yang digunakan adalah ayam SPF umur 10 hari . Besar sampel untuk penelitian Tahap II ditentukan berdasarkan penelitian Tahap I dengan penghitungan jumlah sel apoptotik bursa yang diinfeksi dengan virus Gumboro.

## 3.3 Variabel Penelitian

Klasifikasi variabel pada penelitian ini adalah sebagai berikut ;

Variabel bebas : Infeksi virus Gumboro

Variabel kendali : Dosis dan cara infeksi virus, jenis dan umur ayam, waktu pengamatan.

Variabel tergantung : Ekspresi Fas, granzyme, caspase 3, dan jumlah sel apoptotik

Definisi operasional variabel pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Infeksi virus Gumboro dalam penelitian ini adalah infeksi buatan pada hewan coba. Ayam umur 10 hari diinfeksi virus Gumboro Tasik '98 dengan dosis 1000 TCID 50 secara tetes mata, peroral, dan perkloaka. Pada saat dikorbankan, dilakukan pemeriksaan patologi anatomi ayam menunjukkan perubahan sesuai dengan ciri khas penyakit Gumboro.
2. Ekspresi Fas, granzyme, dan caspase-3 pada bursa adalah angka yang diperoleh dengan penghitungan persentase sel bursa yang mengekspresikan Fas, granzyme, dan caspase-3 berdasarkan warna kuning kecoklatan yang terlihat pada pengecatan imunohistokimia di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali.
3. Jumlah sel apoptotik pada bursa adalah penghitungan persentase sel bursa yang dapat mengikat warna coklat kehitaman dari kit deteksi apoptosis *Apoptag* pada bursa, yang dapat diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali.

### 3.4 Bahan Penelitian

#### 3.4.1 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian tahap I adalah ayam niaga umur 21 hari sedangkan pada penelitian tahap II adalah ayam SPF umur 10 hari yang diperoleh dengan cara menetas telur ayam SPF umur 0 hari yang diperoleh dari Biofarma Bandung (cara penetasan pada lampiran 2). Perbedaan umur ayam yang digunakan sebagai hewan coba pada penelitian tahap I dan penelitian tahap II, yaitu 21 hari untuk penelitian tahap I dan 10 hari untuk penelitian tahap II adalah karena ayam niaga yang digunakan pada penelitian tahap I diperkirakan masih mengandung antibodi maternal hingga umur 21 hari. Antibodi maternal yang terkandung dalam serum dapat mengganggu hasil pemeriksaan.

### 3.4.2 Unit Analisis

Unit analisis pada penelitian ini adalah bursa Fabricius ayam.

### 4.4.3 Virus Gumboro

Untuk mendapatkan infeksi Virus Gumboro, digunakan virus isolat Tasik '98 yang diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner Bogor, yaitu merupakan salah satu isolat koleksi pada saat wabah di Indonesia pada tahun 1991 (Parede, 1994). Sedangkan untuk deteksi virus Gumboro dengan teknik imunohistokimia digunakan antibodi monoklonal terhadap virus Gumboro yang diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner Bogor.

### 3.4.4 Bahan pembuatan sediaan imunohistokimia

Bahan yang diperlukan untuk pembuatan sediaan histologik adalah; formalin 40%, PBS, gelas obyek, gelas penutup, alkohol absolut, alkohol 95%, alkohol 80%, alkohol 70%, *xylol*, parafin, *aquabidest*. Adapun untuk pengecatan imunohistokimia, diperlukan antibodi primer meliputi; antibodi monoklonal mouse anti Fas dari Research Diagnostics, Inc dengan kode RDI-FAS95abm-1, *granzyme B epitope specific rabbit antibody* dari LabVision Corporation dengan kode RB-9015-P, dan rabbit caspase 3 antibody dari LabVision Corporation. Adapun kelengkapan lain yang diperlukan pada pengecatan imunohistokimia ini antara lain; proteinase K dari DakoCytomation dengan kode S3020, kit asesoris dari DakoCytomation dengan kode K0679 yang berisi antibodi universal *biotinylated link*, DAB dan substrat *buffer*, DAB dan khromogen, blok peroksidase, dan streptavidin. Bahan yang digunakan untuk *counter stain*, meliputi ; hematoksilin dan ammonia air. Sedangkan pengecatan sel apoptotik pada sediaan histologik digunakan kit deteksi apoptosis ApopTag Plus Peroxidase In Situ dari Chemicon International dengan kode S7101 yang terdiri dari *equilibration buffer*, reaction buffer, enzim TdT, wash buffer, anti *digoxigenin peroxidase*, *buffer pengencer DAB*, dan substrat *DAB peroxidase*. Untuk pelekatan irisan jaringan pada gelas obyek dibutuhkan *polylysin* dari Daco.

### 3.4.5 Bahan karakterisasi protein

Bahan yang digunakan untuk karakterisasi protein meliputi; bahan untuk pembuatan *separating gel* dan *stacking gel* terdiri dari: acrylamid, Tris HCl pH 8,8, Tris HCl 6,8%, SDS 0,5 %, *aquadest*, TEMED, APS, Bisacrylamid 0,8%. dan butanol 5%. Bahan lain yang digunakan pada karakterisasi protein adalah *laemml buffer*, *elektroforesis buffer*, metanol, glutaraldehid, kertas *Whatmann*.

## 3.5 Prosedur Penelitian

### 3.5.1 Perlakuan terhadap Hewan Coba

#### Penelitian Tahap I

Sampel hewan coba berupa *day old chick* (DOC) ayam niaga sebanyak 44 ekor dipelihara dengan cara dimasukkan pada kandang yang dilengkapi lampu pemanas bercungkup (*brooder*). Makanan yang diberikan adalah berupa pakan jadi 511 dan diberikan air minum *ad libitum*.

Pada umur 21 hari, secara random 44 ekor ayam tersebut dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan dan kontrol. Kemudian kelompok perlakuan diinfeksi virus Gumboro Tasik '98 dengan dosis 1000 TCID<sub>50</sub> secara tetes mata, peroral, dan perkloaka, sedangkan kelompok kontrol diberikan placebo. Setelah itu, dari tiap kelompok, secara random ayam dikorbankan 2 ekor untuk dipanen bursanya dengan interval waktu : 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 48, 72, 96, 120 jam setelah infeksi. Hasil pemanenan bursa difiksasi ke dalam formalin buffer 10 % selama 24 jam untuk persiapan pembuatan preparat mikroskopik dan penghitungan ekspresi Fas, Granzyme, Caspase 3, dan jumlah sel apoptotik untuk penentuan jangka waktu pengorbanan hewan coba yang diterapkan pada penelitian tahap II, yaitu ditentukan berdasarkan pada pencapaian ekspresi sebesar minimal 25 % untuk tiap variabel.

#### Penelitian Tahap II

Sampel hewan coba berupa ayam SPF yang diperoleh dengan cara menetas telur ayam SPF, setelah menetas, *day old chick* (DOC) tersebut dimasukkan pada kandang yang dilengkapi lampu pemanas bercungkup (*broader*). Makanan yang diberikan adalah berupa pakan jadi 511 yang terlebih dahulu

peroxidase, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PBS diteteskan biarkan selama 5 menit pada suhu kamar, lalu dicuci 2 kali dengan PBS masing-masing 2 menit dalam *coplin jar*.

Selanjutnya cairan di sekitar jaringan disingkirkan dengan kertas pengering kemudian jaringan ditetesi 75  $\mu$ l equilibration buffer dan diinkubasi 10 menit pada suhu kamar. Setelah itu kembali cairan di sekitar jaringan disingkirkan dengan kertas pengering kemudian jaringan ditetesi 55  $\mu$ l / 5cm<sup>2</sup> *working strength TdT enzyme*, lalu diinkubasi pada 37°C dalam wadah yang lembab selama 1 jam.

Langkah berikutnya, sediaan diletakkan dalam *coplin jar* yang berisi *working strength stop/wash buffer*, diguncangkan selama 15 detik kemudian diinkubasi 10 menit pada suhu kamar. Setelah itu sediaan dicuci 4 kali dengan PBS dalam *copling jar* masing-masing 2 menit pada suhu kamar. Cairan di sekitar potongan jaringan dikeringkan dengan kertas pengering kemudian diteteskan anti-digoxigenin conjugate (yang telah dikeluarkan dari tempat penyimpanan dan dihangatkan sampai pada suhu kamar sebelumnya) pada permukaan jaringan kira-kira 65  $\mu$ l / 5cm<sup>2</sup>, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dalam tempat yang lembab. Setelah itu sediaan dicuci 4 kali dengan PBS dalam *copling jar* masing-masing 2 menit pada suhu kamar.

Langkah selanjutnya adalah; cairan di sekitar potongan jaringan dikeringkan dengan kertas pengering kemudian dilakukan pemberian warna, yaitu dengan meneteskan peroxidase substrat 75  $\mu$ l / 5cm<sup>2</sup> pada permukaan jaringan dan dibiarkan 10 menit pada suhu kamar. Setelah itu sediaan dicuci 3 kali dengan dH<sub>2</sub>O dalam *copling jar* masing-masing 1 menit, lalu diinkubasi dengan dH<sub>2</sub>O dalam *copling jar* 5 menit pada suhu kamar.

Selanjutnya untuk counterstain, dioleskan methyl green 30 detik pada suhu kamar kemudian dicuci 3 kali dengan dH<sub>2</sub>O dalam *coplin jar* masing-masing 1 menit. Kemudian sediaan diberikan xylene lalu cairan di sekitar potongan jaringan dikeringkan dengan kertas pengering.

### 3.5.2.2 Pengecatan Imunohistokimia

Mula-mula dilakukan clearing dan rehidrasi secara bertingkat lalu dicuci 3 kali dengan destilata water (DW) masing-masing 5 menit kemudian cairan di sekitar jaringan dikeringkan. Setelah itu bagian potongan jaringan dilingkari dengan pen lalu direndam dalam 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam DW 15 menit pada suhu kamar. Kemudian sediaan dibilas 3 kali dengan DW dan 3 kali dengan PBS masing-masing 5 menit.

Langkah selanjutnya sediaan diinkubasikan dengan 10% *normal goat serum* 30 menit pada suhu kamar kemudian dibilas 3 kali dengan PBS masing-masing 5 menit. Kemudian sediaan diinkubasikan dengan antibodi primer lalu dibilas 3 kali dengan PBS masing-masing 5 menit, setelah itu diinkubasikan dengan antibodi sekunder selama 30 menit pada suhu kamar. Pada waktu yang sama, 10 $\mu$ l avidin dan 10 $\mu$ l biotin diinkubasi dalam 1 ml PBS. Selanjutnya sediaan dibilas 3 kali dengan PBS masing-masing 5 menit kemudian diinkubasikan dengan campuran avidin dan biotin 30 menit pada suhu kamar lalu dibilas 3 kali dengan PBS masing-masing 5 menit dan diinkubasikan dengan larutan DAB. Langkah selanjutnya dilakukan counterstaining dengan *hematoxylin selama 2 menit* kemudian dehidrasi, selanjutnya sediaan ditutup dengan *cover glass*.

### 3.5.3 Karakterisasi Protein

Karakterisasi protein dilakukan terhadap variabel yang menunjukkan ekspresi paling menonjol, yaitu protein yang merupakan aktivator apoptosis. Adapun prosedurnya adalah sebagai berikut;

#### 3.5.3.1 Sonikasi Sampel

Jaringan bursa dari kelompok yang terinfeksi diambil sebanyak kurang lebih 1 gr kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah diisi PBS sebanyak 2 ml kemudian disonikasi menggunakan sonikator selama dua menit dan istirahat satu menit sebanyak lima kali, saat disonikasi tabung reaksi direndam dalam gelas berisi es batu dan garam, hal ini dimaksudkan untuk meredam panas yang timbul saat

disonikasi, setelah selesai sampel dipindahkan dalam tabung-tabung *ependorf* dan kemudian siap dipakai, jika tidak segera dipakai dapat disimpan dalam *freezer*.

### 3.5.3.2 Analisis protein dengan SDS-PAGE 12,5%

#### Prosedur SDS-PAGE 12,5% :

##### Pencetakan Separating Gel 12,5 %

Pembuatan Separating gel yaitu dengan cara mencampurkan Acrylamid 2,5 ml, Tris HCl pH 8,8 1,2 ml, SDS 0,5 % 1,2 ml, aquadest 1,1 ml, TEMED 5 $\mu$ l dan APS 30 $\mu$ l. Campuran harus homogen dan dimasukkan kedalam *glass plate* model biometra dan ditambahkan butanol 5% di atas separating gel untuk meratakan bagian atas separating gel, kemudian diinkubasi dalam suhu kamar selama dua puluh lima menit. Langkah selanjutnya adalah butanol 5% dibuang dan *separating gel* dicuci dengan menggunakan elektroforesis buffer yang telah diencerkan sepuluh kali, separating gel yang sudah jadi dalam *glass plate* dikeringkan dan dibersihkan atasnya dengan kertas Whatmann.

##### Pencetakan Stacking Gel 12.5%

Membuat *Stacking Gel* adalah dengan mencampurkan bahan-bahan stacking gel sampai homogen yaitu *Acrylamid* 30%, *Bisacrylamid* 0,8% 0,33 ml, 0,625 M Tris HCl pH 6,8 sebanyak 0,4 ml, SDS 0,5% 0,4 ml, *Aquadest* 0,87 ml, TEMED 2 $\mu$ l, APS 10% 10 $\mu$ l, segera dimasukkan dalam *plate* yang telah berisi separating gel yang telah jadi dan segera comb dimasukkan kemudian diinkubasi selama dua puluh lima menit pada suhu kamar sampai gel memadat. *Comb* dilepaskan dan dibersihkan dengan *elektroforesis buffer* agar sisa-sisa *separating gel* tidak ada yang tertinggal.

##### Penyiapan Sampel

Sampel yang digunakan dengan perbandingan satu banding satu. Sampel sebanyak 10  $\mu$ l dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* kemudian ditambahkan *laemmli buffer* sebanyak 10 $\mu$ l. Yang akan dimasukkan kedalam gel sebanyak 15 $\mu$ l. Tutup tabung *ependorf* dilubangi dengan jarum, kemudian dipanaskan dengan pemanasan 100°C selama kurang lebih lima menit untuk proses denaturasi.

### Elektroforesis

Gelas *plate* yang telah berisi gel dimasukkan ke dalam *chamber* Bio-metra dan dituangi elektroforesis buffer sebanyak kurang lebih 400 ml, dan *marker* dimasukkan ke dalam sumuran yang telah terbentuk pada gel. Kemudian dilakukan *running* dengan menggunakan listrik 125 Volt dan 40 mA sampai *marker* dan sampel turun (kurang lebih selama 2 jam). Setelah sampel turun listrik dimatikan, gel dilepas perlahan dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang sudah berisi larutan pencucian.

### Pencucian

Pencucian dilakukan sebanyak empat tahap dengan larutan yang berbeda. Selama pencucian cawan petri yang telah berisi gel selalu diletakkan di atas *shaker* dengan kecepatan 80 rpm. Pencucian pertama dengan menggunakan larutan 50% Metanol 7,5% asam cuka selama 30 menit atau semalam (1 gel butuh kurang lebih 200 ml), selanjutnya dicuci dengan larutan Metanol 5% asam cuka 7,5% selama 30 menit. Kemudian dengan menggunakan larutan Glutaraldehyd 5% gel dicuci selama 30 menit, cuci lagi dengan aquades selama 2 jam atau semalam (jika larutan pertama semalam, dicuci sebanyak 3X30 menit).

### Pewarnaan

*Silvernitrate* ditimbang sebanyak 0,8 gram dan dicampur dengan 4 ml *aquadest*. Kemudian campuran tersebut dimasukkan ke dalam larutan yang terdiri dari NaOH 0,36% 21ml, NH<sub>3</sub> 1,4 ml, dan aquades 73,5 ml. Larutan *silvernitrate* disaring saat dituangkan ke dalam larutan amoniak dan dilakukan diatas *stirer* agar tercampur homogen. Larutan dimasukkan ke dalam cawan petri berisi gel yang telah dicuci, diatas *shaker* selama 15 menit. Kemudian gel di cuci dengan *aquadest* 2X2 menit tetap diatas *shaker*. Gel dipindahkan ke petri baru yang telah dimasukkan larutan pengembang yang terdiri dari 200 µl *Zitronensaure* 5%, 100 µl *Formaldehyd* 37%, dan ditambahkan *aquadest* sebanyak 200 ml. Ditunggu sampai pita pada gel mulai nampak kurang lebih selama 15 menit, setelah pita tampak segera dituangkan asam cuka 10%. Untuk diawetkan, diganti larutan dengan Gliserol 10% agar gel tidak rusak.

Hasil SDS-PAGE berupa *band* (pita) diukur untuk menghitung berat molekul sampel. Menurut Rybick dan Maud (1996), berat molekul (BM) atau massa molekul



relatif ( $M_r$ ) ditentukan berdasarkan log BM atau log  $M_r$  dari protein standar dan nilai Rf (Retardation factor). Nilai Rf merupakan perbandingan antara jarak migrasi molekul protein dengan jarak migrasi zat warna. Kemudian mencari persamaan dengan menentukan kurva standar dari Rf dan log BM atau log  $M_r$ . Sampel yang diketahui dibaca sebagai log  $M_r$ . Dari sampel setelah Rf menghitung Rf pada agar yang sama.

Menurut Mayer dan Walker (1987), untuk menghitung nilai  $M_r$  dari protein yang belum diketahui, mula-mula log 10  $M_r$ . Dari protein standar dihitung. Kemudian menghitung mobilitas relatif yaitu perbandingan jarak perpindahan protein dengan jarak perpindahan warna.

Menurut Rantam (2003), untuk menentukan BM antigen atau antibodi dilakukan dengan menghitung nilai Rf dari masing-masing band dengan rumus sebagai berikut :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan zat warna dari tempat awal}}$$

Massa molekul relatif ditentukan dengan cara mengkonversi data nilai Rf dan massa molekul relatif dari protein standar. Nilai Rf disimbolkan dengan X, sedangkan Y adalah logaritma massa molekul relatif (log  $M_r$ ) protein standar.

Nilai Rf dinyatakan sebagai nilai X (variabel bebas) dan nilai log BM atau log marker dalam satuan Dalton (Da) dinyatakan sebagai nilai Y (variabel terikat). Kemudian mencari persamaan regresi yang sesuai. Setelah persamaan regresi didapat, Nilai X (Rf) sampel dimasukkan ke dalam persamaan untuk mendapatkan nilai BM protein sampel.

### 3.5.3.3 Analisis Protein Aktivator dengan *straving blot*

Pada *straving blot*, pita di gel pada SDS-PAGE ditransfer pada membrane nitroselulose dan direaksikan dengan antibodi spesifik dari masing-masing variabel .

Membran nitroselulose dan kertas Whatmann yang akan digunakan direndam dalam *transfer buffer*. Kertas Whatmann yang sudah dibasahi dengan *transfer buffer* diletakkan pada *blotter* sebanyak lima lapis kemudian membran nitroselulose diletakkan di atas lapisan terakhir dan dihindarkan adanya rongga

udara, gel agarose hasil elektroforesis diletakkan tepat diatas membran nitroselulose dan dihindarkan adanya rongga udara. Membran nitroselulose ditutup dengan 5 lapis kertas Whatman yang telah dibasahi dengan *transfer buffer*. Seluruh lapisan dibasahi sehingga kelihatan basah. *Blotter* ditutup kuat-kuat dan dilakukan *running* dengan 100 Volt dan 40 mA selama satu jam. Membran nitroselulose diambil perlahan dan dimasukkan ke dalam TBS, membran nitroselulose dicuci satu kali dengan TBS kemudian dipindahkan ke cawan petri baru. Membran nitroselulose dibloking dengan creamer dalam TBS Tween 0,5%. Diinkubasi pada suhu kamar selama satu jam atau semalam pada 4°C. Kemudian membran nitroselulose dicuci dengan TBS tween 0.05% sebanyak lima kali, masing-masing selama sepuluh menit dengan *shaker*. Antibodi sekunder (*conjugate*) ditambahkan dalam *buffer* inkubasi (PBS I). Diinkubasi pada suhu ruang dengan *shaker* selama satu jam. Membran nitroselulose dicuci dengan TBS Tween 0,05% sebanyak lima kali, masing-masing selama sepuluh menit dengan *shaker*. Ditambahkan substrat dan diinkubasi pada suhu kamar di ruang gelap dengan penggoyangan sampai terlihat warna (hasil). Reaksi dihentikan dengan memindahkan membrane nitroselulose ke dalam aquadest non deionized. Membrane nitroselulose dikeringkan pada suhu ruang dan hasil siap dianalisis.

### 3.6. Metode Pengumpulan Data

Data dikumpulkan dengan cara menghitung jumlah sel apoptotik pada folikel bursa Fabricius pada sediaan yang diproses dengan *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*, dan jumlah sel yang mengekspresikan Fas, granzyme, dan caspase 3 pada folikel bursa Fabricius pada sediaan yang diwarnai dengan pengecatan imunohistokimia di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Sel apoptotik dikenali dengan penyerapan warna dari *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* (coklat kehitaman). Sedangkan ekspresi Fas, granzyme, dan caspase 3 dikenali dengan reaksi warna yang timbul pada pengecatan imunohistokimia (coklat kekuningan).

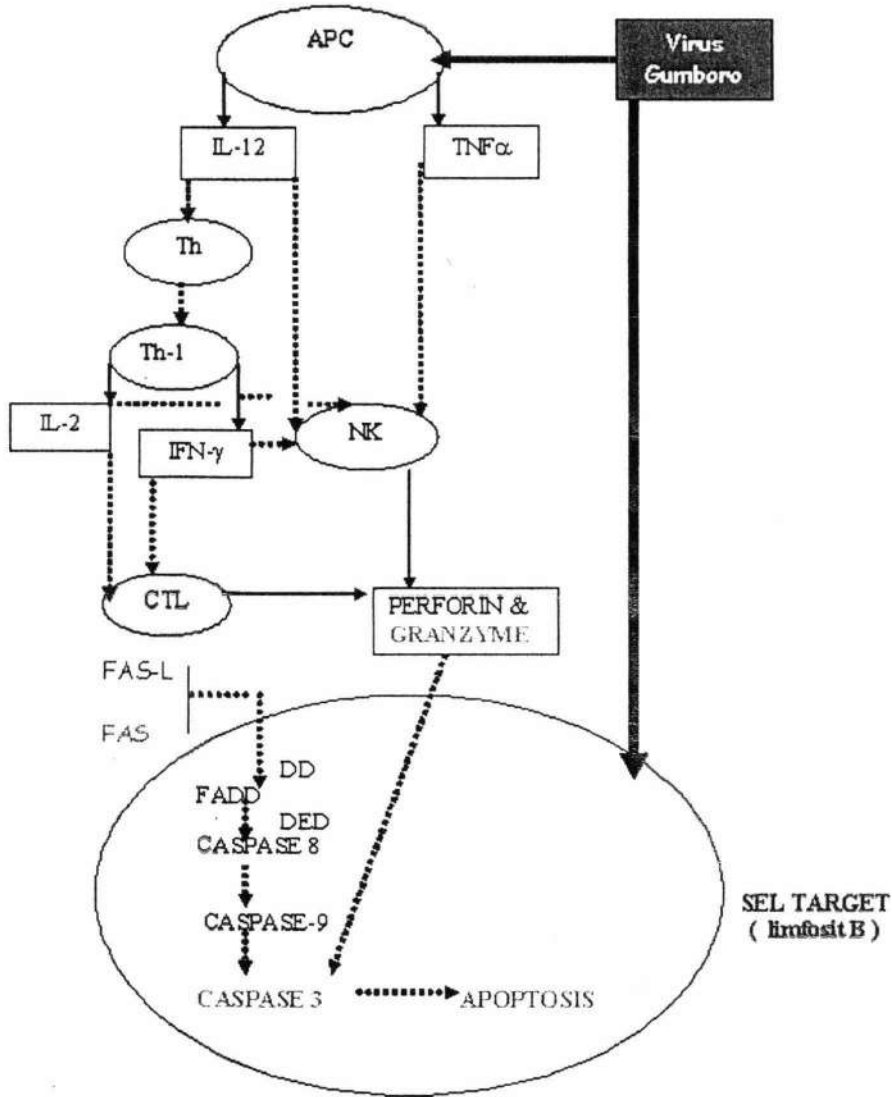
Tiap sediaan dihitung dengan bantuan *grateculae* pada lima area hitung yang berbeda. Adapun yang dimaksud dengan 1 area hitung pada penelitian ini adalah berupa 1 irisan folikel. Pembacaan sediaan di atas, selain dilakukan oleh peneliti, dilakukan juga oleh *second observer* untuk menghindari kesalahan bias.

Hasil penghitungan sel apoptotik dan penilaian ekspresi Fas, granzyme, dan caspase 3 disajikan pada tabel kemudian diambil nilai rata-rata dan dianalisis.

### 3.7 Cara Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan uji multivariat dengan Hotelling t untuk mengetahui perbedaan jumlah sel apoptotik dan ekspresi Fas, granzyme, dan caspase 3 pada bursa Fabricius antara kelompok kontrol dan perlakuan secara bersama-sama, serta analisis jalur untuk mengetahui bahwa pada infeksi virus Gumboro, Fas dan granzyme memicu caspase 3 serta Fas, granzyme, dan caspase 3 menginduksi peningkatan apoptosis.

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN



Gambar 3.1. Bagan Kerangka Konseptual

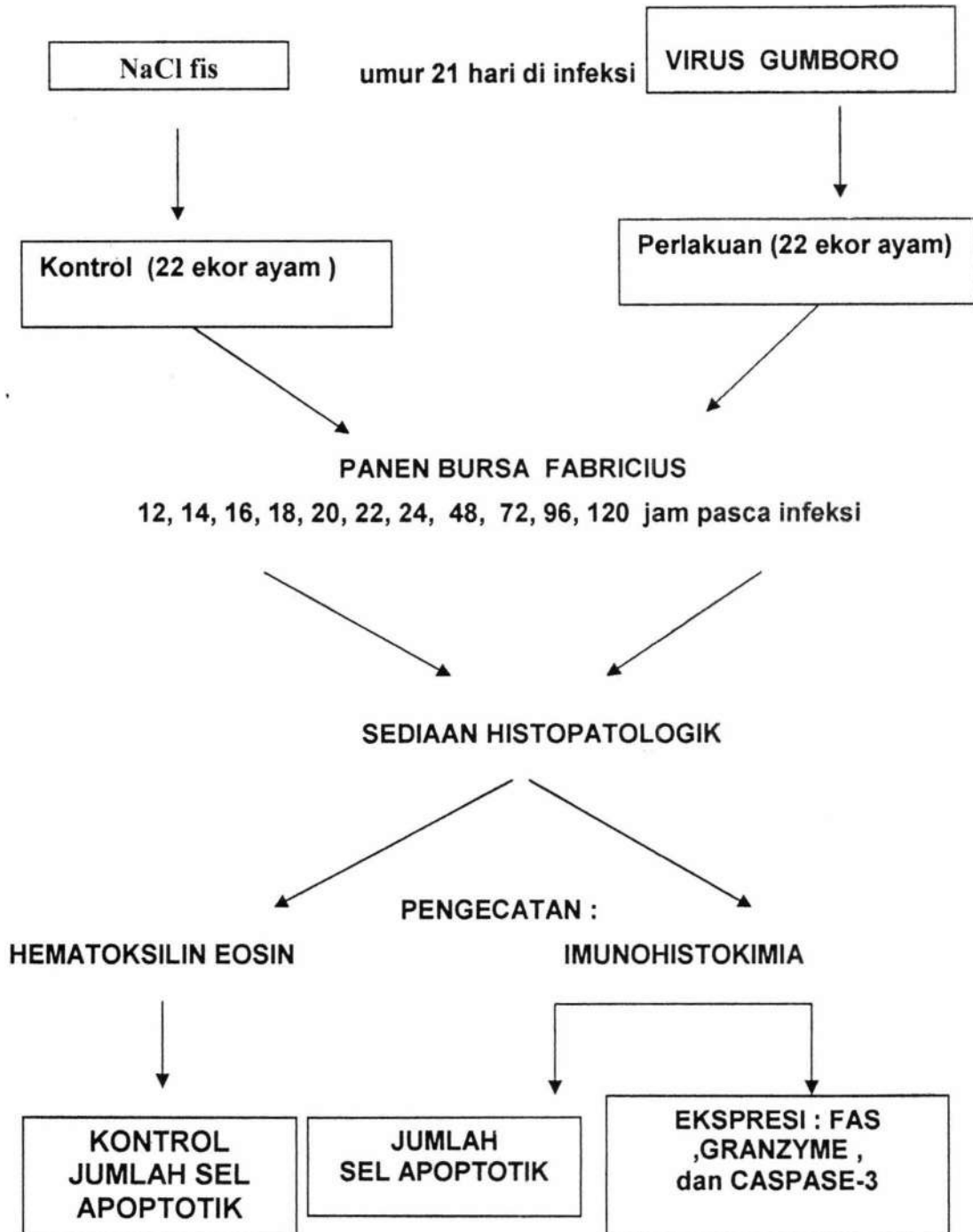
- > menghasilkan
- .....> menginduksi
- > menginsersi

Virus Gumboro masuk tubuh kemudian ditangkap oleh makrofag atau limfosit sebagai APC (Muller *et al*, 1979). Makrofag yang teraktifasi membebaskan IL-12 dan TNF- $\alpha$ . IL-12 memicu Th untuk berdiferensiasi menjadi Th1. Th1 memproduksi IL-2 dan IFN- $\gamma$ . IL-12 bersama-sama dengan TNF- $\alpha$  juga memperkuat aktifitas sel NK dalam respons imun alami terhadap infeksi virus, sehingga efektif dalam pembunuhan sel yang terinfeksi virus tersebut (Kim *et al*, 1998 ; Goldsby *et al*, 2000). IL-2 dan IFN- $\gamma$  yang diproduksi oleh Th-1 memicu aktifasi CTL (Abbas *et al*, 2000). IL-2 beraktifitas secara langsung dengan membantu penarikan CTL *precursor* ke dalam populasi efektor. CTL dan sel NK dapat menimbulkan lisis pada sel target melalui pengeluaran perforin dan granzyme. Perforin membentuk celah pada membran sel target, kemudian granzyme dapat menerobos masuk untuk melisis sel tersebut melalui aktivasi caspase-3 (Atkinson *et al*, 1998; Goldsby *et al*, 2000).

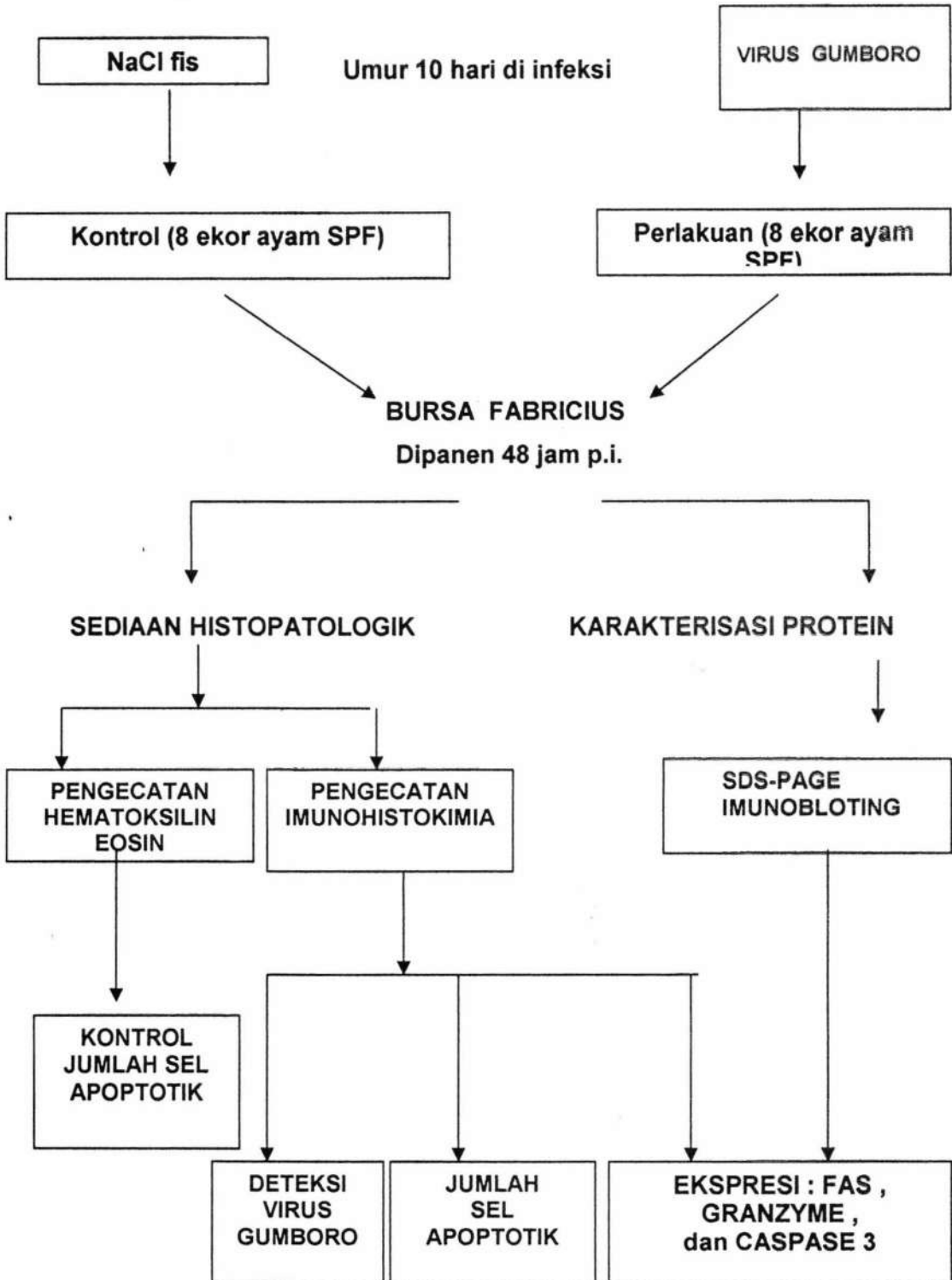
CTL yang teraktifasi mengekspresikan Fas ligan dan dapat menimbulkan apoptosis pada sel target yang mengekspresikan Fas. *Death domain* memiliki kecenderungan untuk bergabung satu sama lain, sehingga ligasi Fas-L dan Fas menyebabkan *death domain* dari reseptor berkelompok. Setelah terjadi pengelompokan, FADD yang merupakan protein adaptor mengikat DD dari reseptor yang telah berkelompok melalui bagian *death domainnya* sendiri. FADD selain mempunyai DD juga memiliki DED. DED ini yang akan terikat pada suatu analog domain *repeat tandem* dalam bentuk zymogen dari enzim caspase-8. Caspase-8 mengaktifkan caspase-9, caspase-9 mengaktifkan caspase-3 yang kemudian memicu apoptosis (Ashkenazi and Dixit, 1998). Secara skematis, konsep tersebut dapat digambarkan seperti Gambar 3.1.

KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN

Penelitian Tahap I



Penelitian Tahap II



**BAB 4****HASIL DAN PEMBAHASAN PENELITIAN****4.1 Hasil Penelitian Tahap I : Penentuan Waktu Optimal Pemeriksaan Ekspresi Fas, Granzyme, Caspase 3, dan Jumlah Sel Apoptotik pada Bursa Fabricius Ayam Setelah Infeksi Virus Gumboro**

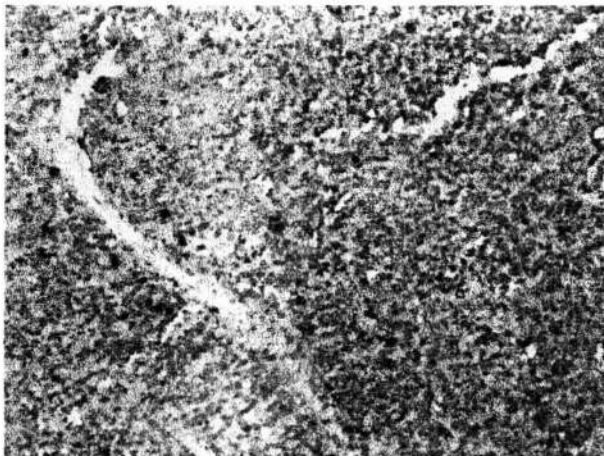
Penentuan waktu optimal pemeriksaan ekspresi Fas, granzyme, caspase 3, dan jumlah sel apoptotik pada bursa Fabricius ayam setelah diinfeksi virus Gumboro dilakukan pada penelitian tahap I. Pemeriksaan ekspresi Fas, granzyme dan caspase 3 serta jumlah sel apoptotik pada bursa Fabricius berturut-turut dilakukan pada 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 48, 72, 96, dan 120 jam setelah infeksi. Waktu pemeriksaan dinyatakan optimal apabila ekspresi Fas, granzyme dan caspase 3 serta jumlah sel apoptotik pada bursa Fabricius pada kelompok perlakuan telah mencapai peningkatan sebesar minimal 25 %. Sebagai contoh peningkatan tersebut, dapat dilihat pada Gambar 5.1 peningkatan jumlah sel apoptotik pada bursa setelah diinfeksi virus Gumboro.:

Pemeriksaan ekspresi Fas, granzyme dan caspase 3 serta apoptosis pada sel bursa ayam yang terinfeksi virus Gumboro tersebut dilakukan pada sediaan mikroskopik dengan teknik pengecatan imunohistokimia. Penghitungan sel dilakukan pada lima folikel limfoid bursa untuk tiap ulangan kemudian dihitung nilai rata-ratanya. Nilai rata-rata tersebut dapat dilihat adalah seperti pada Tabel 5.1 berikut.



**Tabel 4.1: Nilai rerata sel yang mengekspresikan Fas, Granzyme, Caspase-3, dan sel apoptotik (dalam %).**

Jam	Kelompok Perlakuan				Kelompok Kontrol			
	Fas	Granz	Casp 3	Apopt	Fas	Granz	Casp 3	Apopt
12	15,34	2,24	3,85	5,87	3,28	2,42	1,81	4,88
14	19,46	2,54	3,65	6,87	3,06	1,34	2,35	4,68
16	18,99	12,48	5,28	19,65	2,34	1,40	1,42	3,01
18	19,34	14,65	18,47	21,55	4,35	1,79	2,45	5,01
20	19,77	18,90	21,30	23,43	5,01	2,00	2,49	5,73
22	20,15	18,57	21,39	23,63	6,04	0,86	2,57	6,59
24	25,58	20,56	25,56	27,86	2,36	2,04	1,32	3,78
48	54,43	27,99	30,88	69,79	4,67	2,41	2,53	5,47
72	64,67	32,62	43,45	79,87	3,06	1,80	2,55	5,19
96	79,57	42,28	51,35	82,76	4,02	1,51	2,42	5,32
120	85,46	45,63	64,79	87,87	2,00	1,47	2,03	4,69



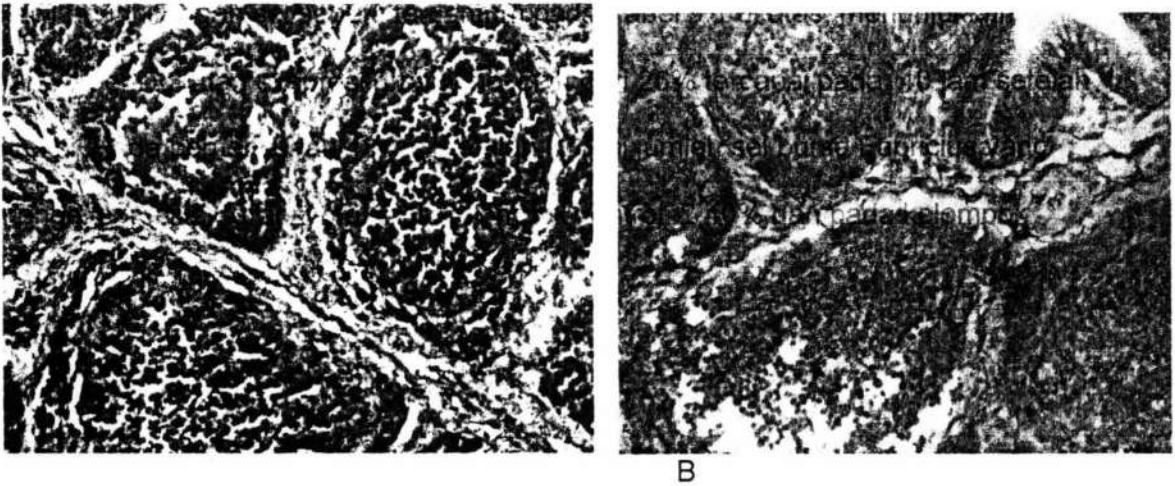
Gambar 4.1. Peningkatan Jumlah Sel Apoptotik pada Bursa Fabricius Ayam yang Terinfeksi Virus Gumboro. A: Peningkatan kurang dari 25% B: Peningkatan di atas 25%. Perbesaran 100 x

Dari tabel 4.1 terlihat bahwa peningkatan ekspresi Fas, ekspresi caspase 3 dan jumlah sel apoptosis di atas 25% terdapat pada pengamatan 24 jam setelah infeksi, sedangkan peningkatan granzyme di atas 25% baru tercapai pada pengamatan 48 jam setelah infeksi. Peningkatan secara rinci adalah sebagai berikut.

#### 4.1.1 Pemeriksaan Ekspresi Fas

Pemeriksaan ekspresi Fas dilakukan dengan menggunakan teknik imunohistokimia yaitu dengan mereaksikan Fas sebagai antigen dan antibodi kelinci *anti-Fas* sebagai antibodi primer dengan antibodi sekunder yang dilabel dengan peroksidase. Sel yang positif adalah sel yang mengekspresikan warna kuning kecoklatan pada permukaan dengan khromogen DAB seperti yang tampak pada gambar 5.2.

Hasil penghitungan sel seperti tercantum pada tabel 5.1 di atas, menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi Fas lebih dari 25% tercapai pada 24 jam setelah infeksi. Pada pemeriksaan 24 jam setelah infeksi jumlah sel bursa Fabricius yang mengekspresikan Fas pada kelompok kontrol 2,36% dan pada kelompok perlakuan 25,58%

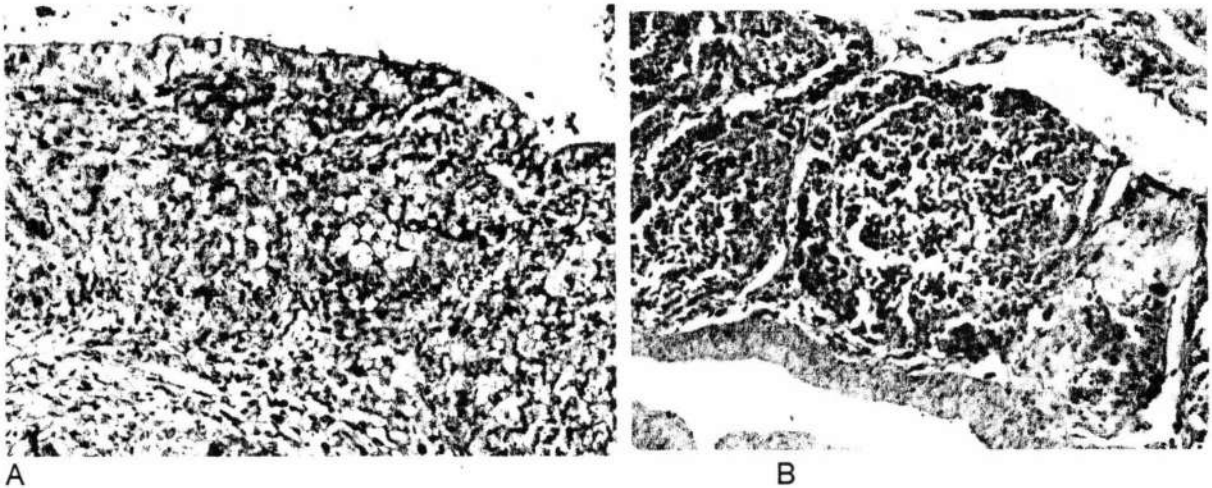


Gambar 4.2 . A, Peningkatan Ekspresi Fas Sebesar 25,58 % pada Bursa Fabricius 24 Jam setelah diinfeksi virus Gumboro. B, Bursa Fabricius tanpa infeksi virus. Perbesaran 100x

#### 4.1.2 Pemeriksaan Ekspresi Granzyme

Pemeriksaan ekspresi granzyme dilakukan dengan menggunakan teknik imunohistokimia yaitu dengan mereaksikan granzyme sebagai antigen dan antibodi kelinci *anti-granzyme* sebagai antibodi primer dengan antibodi sekunder yang dilabel dengan peroksidase. Sel yang positif adalah sel yang mengekspresikan warna kuning kecoklatan dengan kromogen DAB seperti yang tampak pada Gambar 4.3.

Hasil penghitungan sel seperti tercantum pada Tabel 5.1 di atas, menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi granzyme lebih dari 25% tercapai pada 48 jam setelah infeksi. Pada pemeriksaan 48 jam setelah infeksi jumlah sel bursa Fabricius yang mengekspresikan granzyme pada kelompok kontrol 2,40% dan pada kelompok perlakuan 27,98%

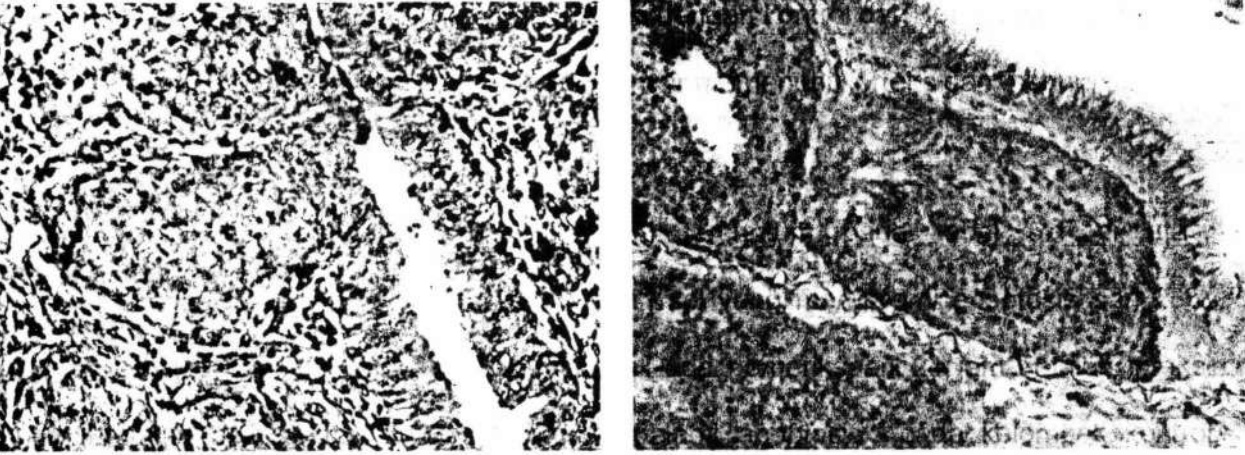


Gambar 5.3. A, Peningkatan Ekspresi Granzyme sebesar 27,99 % pada Bursa Fabricius 48 jam setelah diinfeksi virus Gumboro. B, Bursa Fabricius tanpa infeksi virus. Perbesaran 100x

#### 4.1.3 Pemeriksaan Ekspresi Caspase 3

Pemeriksaan ekspresi caspase 3 dilakukan dengan menggunakan teknik imunohistokimia yaitu dengan mereaksikan caspase sebagai antigen dan antibodi kelinci *anti-caspase 3* sebagai antibodi primer dengan antibodi sekunder yang dilabel dengan peroksidase. Sel yang positif adalah sel yang mengekspresikan warna kuning kecoklatan pada sitoplasma dengan kromogen DAB seperti yang tampak pada Gambar 4.4

Hasil penghitungan sel seperti tercantum pada Tabel 5.1 di atas, menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi caspase 3 lebih dari 25% tercapai pada 48 jam setelah infeksi. Pada pemeriksaan 24 jam setelah infeksi jumlah sel bursa Fabricius yang mengekspresikan caspase 3 pada kelompok kontrol 1,32% dan pada kelompok perlakuan 25,56%

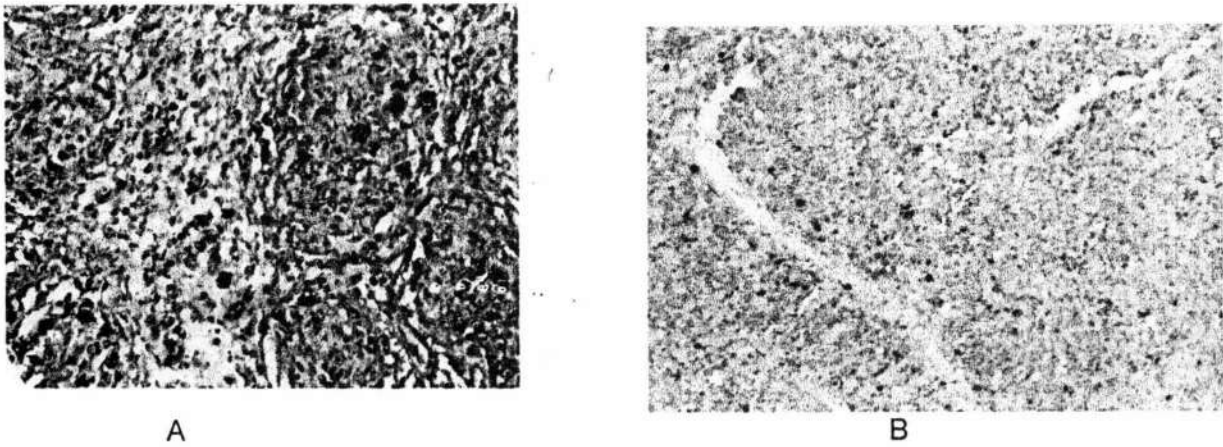


Gambar 5.4. A, Peningkatan Ekspresi Caspase-3 Sebesar 25,56 % pada Bursa Fabrecius 24 jam setelah diinfeksi virus Gumboro. B, Bursa Fabricius tanpa infeksi virus. Perbesaran 100x

#### 4.1.4 Pemeriksaan Apoptosis

Pada pemeriksaan terhadap sel apoptotik dengan menggunakan kit deteksi apoptosis Apoptag, mulai 12 jam setelah infeksi virus Gumboro, ternyata baik pada bursa yang terinfeksi maupun tidak, terdapat sel positif apoptosis. Sel apoptotik yang ditandai dengan inti berwarna coklat kehitaman sebagian besar tampak di daerah antara korteks dan medula. Pada 24 jam setelah infeksi terjadi peningkatan sel apoptotik sebesar 25 % bila dibandingkan dengan kontrol dan terus meningkat sehingga pada 48 jam setelah infeksi hampir memenuhi korteks dan medula folikel limfoid bursa.

Hasil penghitungan sel seperti tercantum pada tabel 5.1 di atas, menunjukkan bahwa peningkatan jumlah sel yang mengalami apoptosis dari 25% tercapai pada 24 jam setelah infeksi. Pada pemeriksaan 24 jam setelah infeksi jumlah sel bursa Fabricius yang mengalami apoptosis pada kelompok kontrol 3,78% dan pada kelompok perlakuan 27,86%

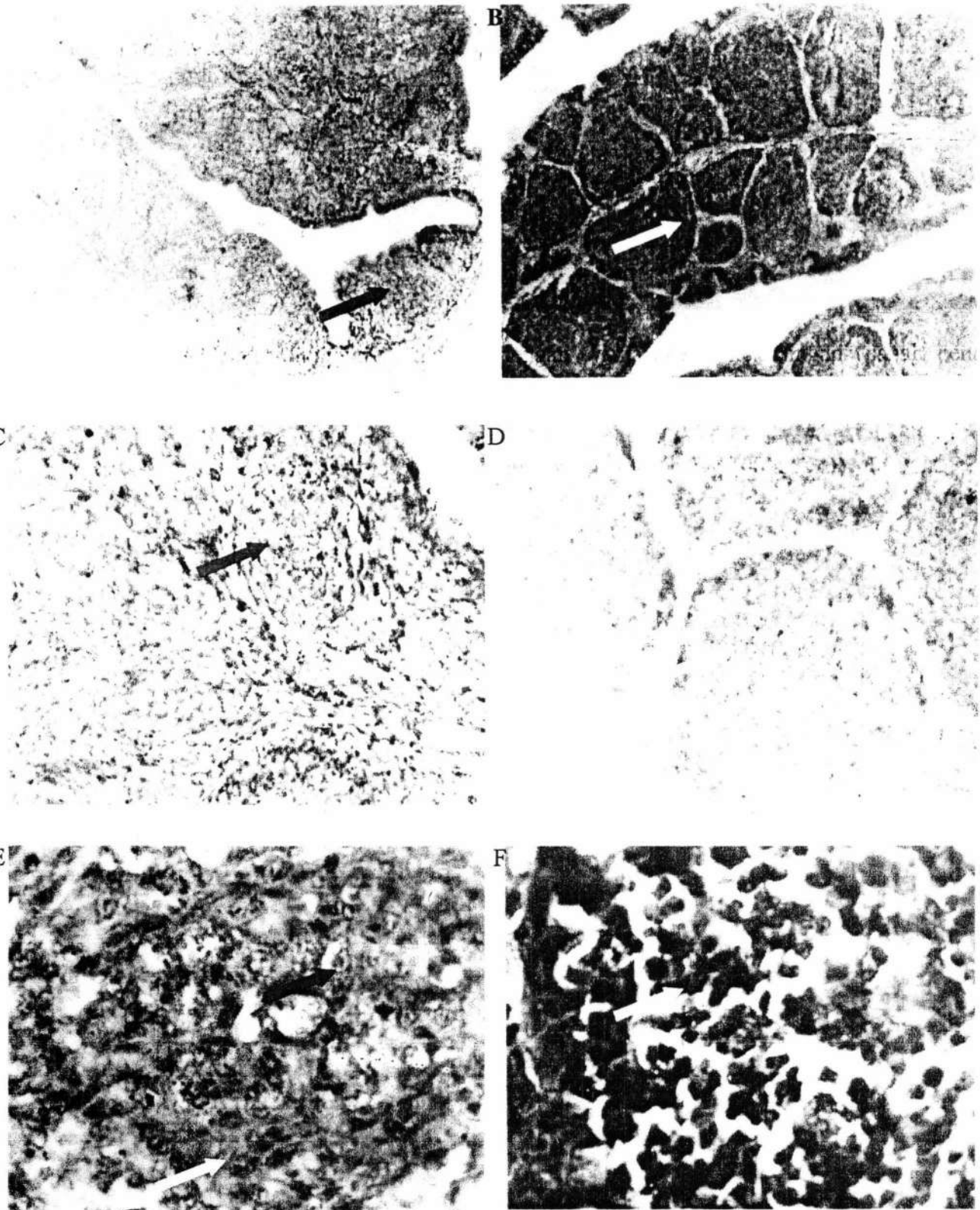


Gambar 4.5 . A. Peningkatan jumlah sel apoptotik 27,86 % pada bursa 24 jam setelah diinfeksi virus Gumboro. B, Bursa tanpa infeksi virus. Perbesaran 100x

## 4.2. Hasil Penelitian Tahap II

### 5.2.1. Pemeriksaan Virus Gumboro dalam Sel

Untuk mengetahui bahwa ayam perlakuan terinfeksi virus dilakukan dengan pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi primer anti-virus Gumboro Tasik '98. Sel yang mengandung virus menunjukkan warna kuning kecoklatan pada sitoplasma sel, sedang sitoplasma sel yang yang tidak mengandung virus berwarna biru. Hasil pemeriksaan virus terlihat pada Gambar 5.6.



bar 5.6. Sel yang mengandung virus ditandai dengan warna coklat kekuningan (panah penunjuk berwarna merah), pada kelompok perlakuan (A,C,E). Sel yang tidak mengandung virus tampak biru (panah penunjuk warna kuning). Pada kelompok kontrol (B,D,F) tampak semua sel normal, tidak mengandung virus (Pengecatan imunohistokimia, menggunakan antibodi primer antibodi virus Gumboro strain Tasik '98, perbesaran 40X (A,B); 100X (C,D); 400 X(E,F) .

### 5.3 Pemeriksaan Ekspresi Fas, Granzyme, Caspase 3, dan Jumlah Sel Apoptotik pada Bursa Fabricius Ayam yang Terinfeksi Virus Gumboro

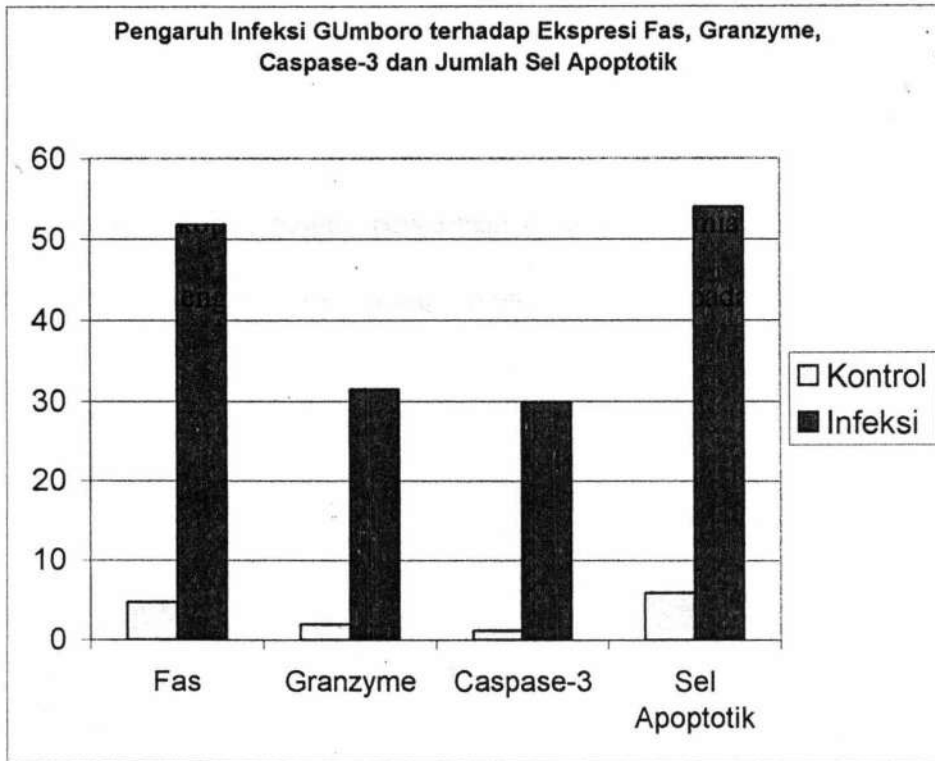
Pemeriksaan ekspresi fas, granzyme, caspase 3, dan sel apoptotik pada sel bursa Fabricius ayam yang terinfeksi virus Gumboro dilakukan pada sediaan mikroskopik dengan teknik pengecatan imunohistokimia. Apabila dibandingkan dengan kontrol, maka kelompok ayam yang diinfeksi dengan virus Gumboro menunjukkan peningkatan ekspresi fas, granzyme, caspase 3, dan peningkatan jumlah sel apoptotik pada bursa Fabricius. Hal ini diketahui dari hasil penghitungan persentase jumlah sel bursa yang mengekspresikan fas, granzyme, caspase 3 dan sel apoptotik yang kemudian dianalisis statistik dengan uji beda dengan MANOVA diperoleh nilai Hotelling's T 65,362 dengan signifikansi  $p = 0,00$  (Lampiran 3). Peningkatan setiap variabel pengamatan sebagaimana ditampilkan pada Tabel 5.2 dan Gambar 5.7.

Tabel 5. 2 : Rerata dan Simpangan Baku Persentasi Jumlah Sel yang Mengekspresikan Fas, Granzyme, Caspase-3, dan Sel Apoptotik pada Bursa Ayam yang Terinfeksi Virus Gumboro.

Variabel	Perlakuan		F	Signifikansi
	Kontrol	Infeksi		
Fas	4,70 ± 1,68	51,81 ± 9,53	185,1570	0,000
Granzyme	2,00 ± 0,34	31,38 ± 5,33	218,482	0,000
Caspase 3	1,25 ± 1,05	29,94 ± 2,01	138,697	0,000
Sel apoptotik	5,90 ± 2,01	54,05 ± 11,32	204,413	0,000

Hotelling's T 65,362 signifikansi 0,00





Gambar 5.7 Rerata persentase jumlah sel bursa yang mengekspresikan Fas, Granzyme, Caspase 3 serta sel apoptotik .

### 5.2.1 Ekspresi Fas

Ekspresi Fas pada bursa Fabricius ayam kelompok kontrol berbeda sangat nyata dengan kelompok ayam terinfeksi virus Gumboro ( $p < 0,01$ ). Pada kelompok ayam terinfeksi terjadi peningkatan ekspresi yang sangat signifikan (51,81%) dibanding pada kelompok kontrol (4,70%). Fas merupakan protein yang diekspresikan pada permukaan membran sel terinfeksi virus atau sel normal tertentu. Pada sediaan mikroskopik dengan pewarnaan imunohistokimia, Fas terekspresikan pada permukaan sel dengan warna kuning kecoklatan seperti pada Gambar 5.8.

### 5.2.2 Ekspresi Granzyme

Ekspresi granzyme pada bursa Fabricius ayam kelompok kontrol berbeda sangat nyata dengan kelompok ayam terinfeksi virus Gumboro ( $p < 0,01$ ). Pada kelompok ayam terinfeksi terjadi peningkatan ekspresi granzyme yang sangat signifikan (31,38%) dibanding pada kelompok kontrol (2,00%). Granzyme adalah suatu protease yang terdapat dalam granul ensim terletak dalam sitoplasma limfosit T sitotoksik dan sel NK. Pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi anti granzyme memberikan warna kuning kecoklatan pada sel yang mengekspresikan granzyme seperti tampak pada Gambar 5.9

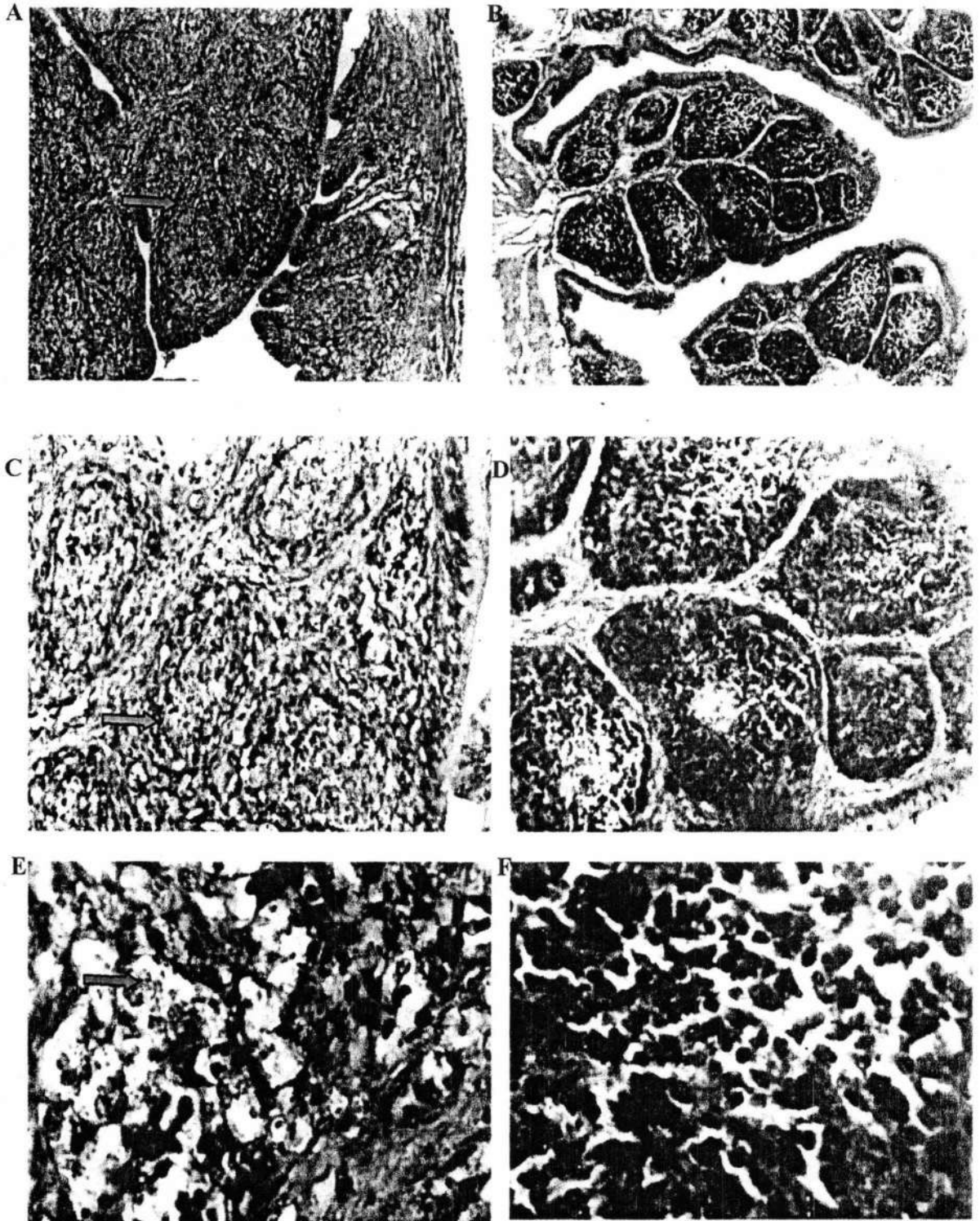
### 5.2.3 Ekspresi Caspase 3

Ekspresi caspase 3 pada bursa Fabricius ayam kelompok kontrol berbeda sangat nyata dengan kelompok ayam terinfeksi virus Gumboro ( $p < 0,01$ ). Pada kelompok ayam terinfeksi terjadi peningkatan ekspresi caspase 3 yang sangat signifikan (29,94%) dibanding pada kelompok kontrol (1,25%). Caspase 3 merupakan protease yang terletak di dalam sitoplasma sel. Apabila teraktivasi, Caspase 3 ini akan terekspresikan lebih jelas dan dengan pengecatan imunohistokimia menunjukkan warna kuning kecoklatan pada sitoplasma sel seperti tampak pada Gambar 5.10

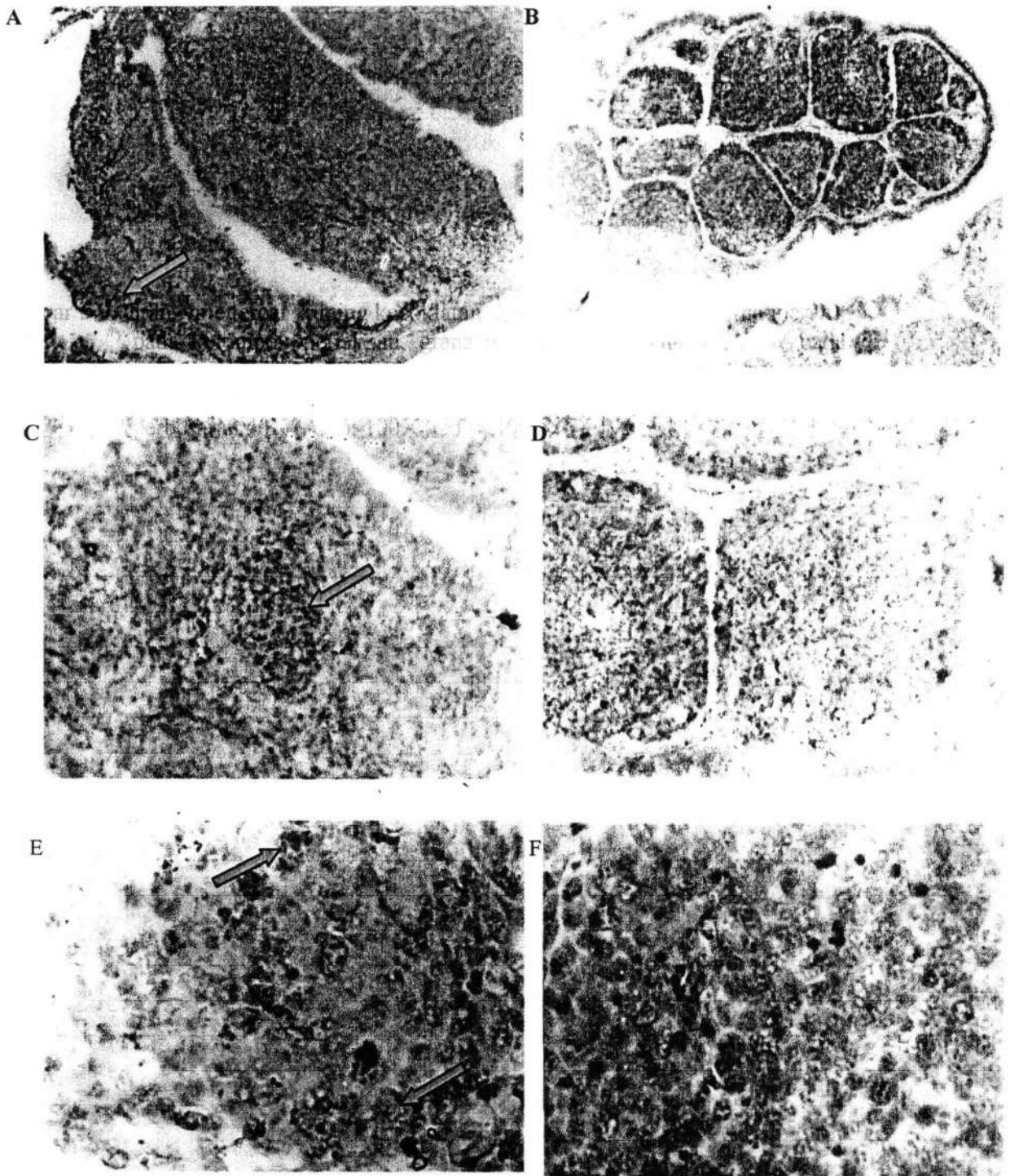
### 5.2.4 Sel Apoptotik

Jumlah sel apoptotik pada bursa Fabricius ayam kelompok kontrol berbeda sangat nyata dengan kelompok ayam terinfeksi virus Gumboro ( $p < 0,01$ ). Pada

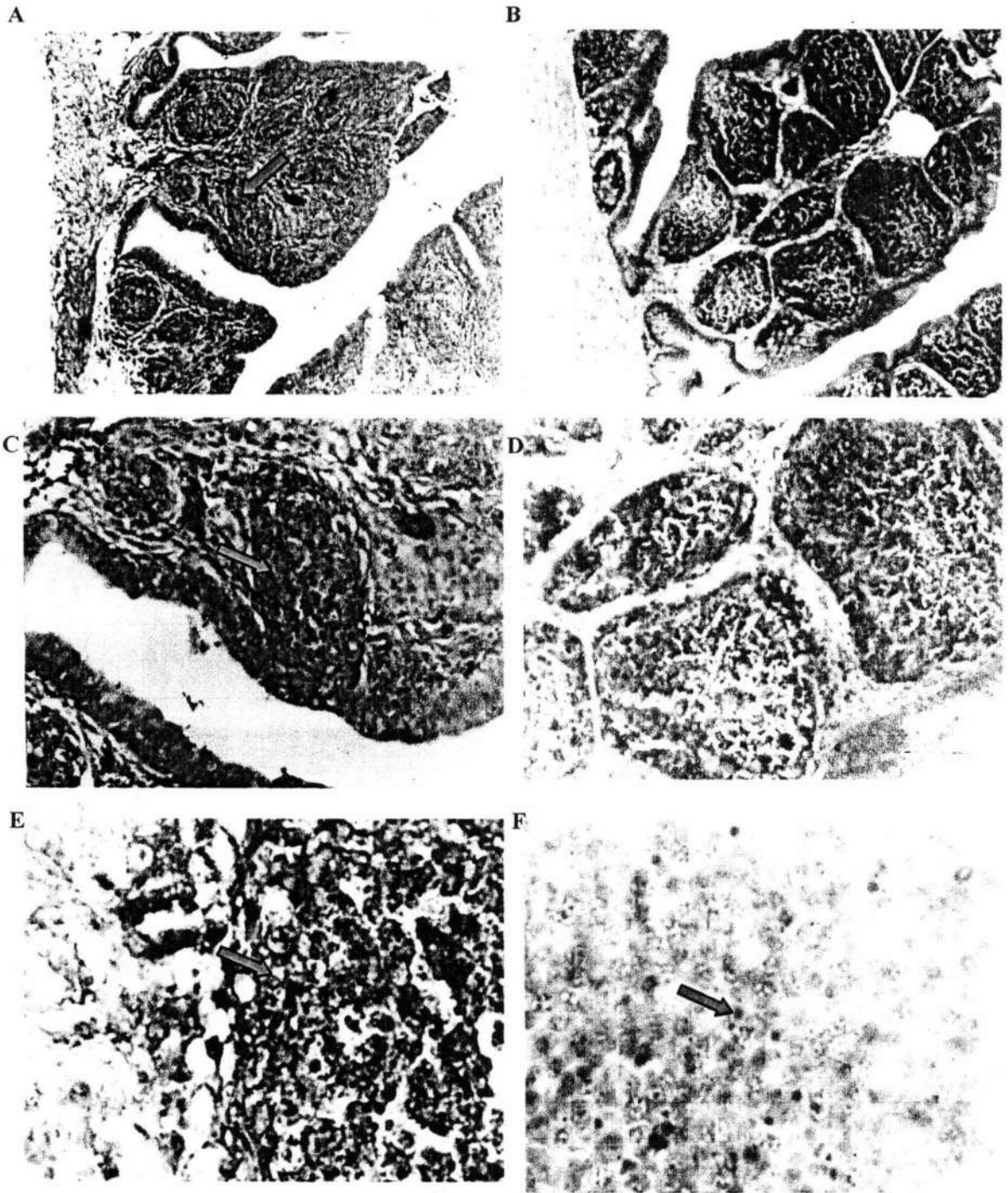
kelompok ayam terinfeksi terjadi jumlah sel yang mengalami apoptosis meningkat sangat signifikan (54,05%) dibanding pada kelompok kontrol (5,90%). Sel yang mengalami apoptosis, tampak sebagai sel dengan bercak coklat kehitaman pada inti. Bercak tersebut adalah fragmen DNA yang terwarnai oleh DAB pada pengecatan menggunakan kit deteksi apoptosis, Apoptag, Apabila dibandingkan dengan sel normal, maka pada sel normal tidak terdapat bercak coklat kehitaman. Gambar 5.11 di bawah ini menunjukkan beberapa sel normal dan sel yang mengalami apoptosis.



Gambar 5.8. Fas tercat kuning kecoklatan (panah penunjuk berwarna merah), pada kelompok perlakuan Fas terekspresi kuat (A,C,E), pada kelompok kontrol (B,D,F) Fas terekspresi lemah. (Pengecatan munohistokimia, menggunakan antibodi primer anti Fas, perbesaran 40X (A,B); 100X (C,D); 400 X(E,F)) .



Gambar 5.9. Granzyme tercat kuning kecoklatan (panah penunjuk berwarna merah), pada kelompok perlakuan, granzyme terekspresi kuat (A,C,E), pada kelompok kontrol (B,D,F) granzyme terekspresi lemah. (Pengecatan imunohistokimia, menggunakan antibodi primer antigranzyme B, perbesaran 40X (A,B); 100X (C,D); 400 X(E,F)).



Gambar 5.10. Caspase 3 tercat kuning kecoklatan (panah penunjuk berwarna merah), pada kelompok perlakuan caspase 3 terekspresi kuat (A,C,E), pada kelompok kontrol (B,D,F) caspase 3 terekspresi lemah. Pengecatan imunohistokimia, menggunakan antibodi primer anti caspase 3, perbesaran 40X (A,B); 100X (C,D); 400 X(E,F)

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 KESIMPULAN

1. Kesimpulan dari keseluruhan hasil penelitian ini adalah bahwa infeksi virus Gumboro (IBDV) meningkatkan ekspresi perangkat apoptotik (Fas, granzyme dan caspase 3) dan jumlah sel apoptotik pada bursa Fabricius. Peningkatan ekspresi Fas pada bursa ayam terinfeksi virus Gumboro berpengaruh langsung terhadap peningkatan ekspresi caspase 3 dan jumlah sel apoptotik bursa, sedangkan peningkatan ekspresi caspase 3 juga berpengaruh langsung terhadap jumlah sel apoptotik bursa.
2. Mekanisme apoptosis bursa akibat infeksi virus Gumboro melalui peningkatan ekspresi Fas dan caspase 3.

#### 5.2 SARAN

1. Peningkatan apoptosis bursa merupakan keadaan patologis yang mengakibatkan penekanan respons imun. Pada infeksi virus Gumboro, peningkatan apoptosis bursa yang diinduksi oleh Fas perlu dikendalikan dengan pemberian anti-Fas atau molekul inhibitor apoptosis pada jalur Fas-FasL sebagai *blocking agent*.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menetapkan waktu pemberian, aplikasi dan dosis pemberian *blocking agent* untuk pengendali apoptosis.
3. Untuk mengetahui apakah pengaruh IFN- $\gamma$  terhadap kepekaan apoptosis melalui Fas pada infeksi virus Gumboro maka perlu diadakan penelitian lanjutan

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abbas, KA, Lichtman, AH, Pober, JS, 2000. Cellular and molecular 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.
- Aschkenazi, S., Straszewski, S., Verwer, KMA, Foellmer, H, Rutherford, T. and Mor, G. 2002. Differential Regulation and Function of the Fas/Fas Ligand System in Human Trophoblast Cells. *Biol. Reprod.* 66, 1853-1861
- Ashkenazi, A, and Dixit, V. M. ( 1998 ). Death Receptors : Signaling and Modulation. *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.
- Azmijah, A, Arimbi, Darsono, R, dan Plumeriastuti, H, 2004. Ekspresi caspase 10 pada bursa ayam yang diinfeksi virus Gumboro sebagai dasar penentuan bahan pengendali apoptosis. *Media Kedokteran Hewan*
- Balkundi, D.R., Ziegler, JA, Watchko, JF, Craven, C dan Trucco, M. 2003. Regulation of FasL/Fas in Human Trophoblasts: Possible Implications for Chorioamnioniti. *Biol. Reprod.* 69: 718-724
- Becht, H, and Müller, H. (1991). Infectious bursal disease- a B cell dependent immunodeficiency syndrome in chickens. *Bhering Institut Mitteilungen* 89: 217 - 225.
- Beesley, JE (eds), 1995. Immunocytochemistry. IRL Press New York.
- Browne, K., Blink, E, Sutton VR, Froelich, Jc, Jans, DA and Trapani, LA, 1999. Cytosolic delivery of Granzyme B by bacterial toxins : Evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Mol and Cell Biol*, Dec : 8604-8615.
- Burkhardt E. and Müller, H. (1987). Susceptibility of chicken blood lymphoblast and monocytes to infection with infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch. Virol.* 94: 297-305.



- 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).
- Cohen, JJ. 1993. Apoptosis. *Immunology Today*, 14 (3): 126-130
- Cotran R S, Kumar V and Collins T, 1999: Apoptosis : In *Pathologic basis of Disease. Sixth Edition*, W.B. Saunders Company Philadelphia London Toronto Sydney Tokyo.:18-28.
- Coy, J.S.C, Giambrone, J.J, and Hoerr, F.J, 1993. Immunohistochemical detection of infectious bursal disease virus in formalin-fixed, paraffin embedded chicken tissues using monoclonal antibody. *Avian Diseases* 37 : 577-581.
- Duke, C. R., Ojcius, D. M., Young, J. D. E. 1996. Cell Suicide in Health and disease. *Scientific American* 48-55
- Deneckert, G, Vercammen, D, Declereq, W, and Vandenabeele, P, 20001. Apoptotic and necrotic cell death by death domain receptors. *CMLS Cell Mol. Life Sci. Vol 58* 356-370.
- Eerola, E, Veromaa, T, and Toivanen, P. 1987. Special feature in the structural Organization of the avian lymphoid system. In *Avian Immunology: Basis and Practice. Vol I* : 195-212. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Etterradosi N, 1995. Progress in Diagnosis and Prophylaxis of Infectious Bursal Disease in Poultry Comprehensive report on technical item presented to the International Committee or to regional Commission: (pp 75-82) Paris OIE.
- Goldsby, AR, Kindt, TJ, and Osborne, BA, 2000. *Kuby Immunology*. WH Feeman and Company New York.
- Gulmez, N and Aslan, S, 1999. Histological and histometrical investigation on bursa of Fabricius and thymus of native geese. *Tr J of Veterinary and Animal Sciences* 23, 163-171.
- Gupta, S. 2003. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Intern. J. Oncol.* 22: 15-20
- 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.
- Higashihara, M, Saijo, K, Fujisaki, Y, dan Matumoto, M. 1991. Immunosuppressive effect of infectious bursal disease virus strains of variable virulennce for chickens. *Veterinary Microbiology*. 26:241-248.
- Higgins JE, Kleinbaum AP, Miller P, 1985. Introduction to randomized clinical trial with an emphasis on contraseptive research. North Carolina: Family Health International Research Triangle Park.
- 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.

- Hirai, K., and Shimakura, S. 1974. Structure of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 14:957-964.
- Hudson, P.J, McKern, NM, Power, BE and Azad, AA. 1986. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res.* 14:5001-5012.
- Huppertz, B, Frank, HG, and Kaufmann, P. 1999. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 200: 1-18.
- Jackwood ,DJ and Saif YM (1987). Antigenic diversity of Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian Disease*, 31, 766-770.
- Jacobs, BL, and Langland, JO. 1996. When two strands are better than one : the mediators and modulators of the cellular responses to double- stranded RNA. *Virology* 219, 339-349.
- 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.
- Kibenge, FSB, Dillon, AS, and Russel, RG. 1988. Biochemistry and immunology of IBDV. *Journal of General Virology.* 69 : 1757-1775.
- Kim, IJ, Karaka, K, Pertile, TL, Erickson, SA, and Sharma, JM. 1998. Enhanced expression of cytokin genes in spleen macrophages during acute infection with infectious bursal disease virus in chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61 : 331-341.
- Kumar, V, Cotran, RS, Robbin, SL, 2003. Robbins Basic Pathology. Seventh edition. Saunders. Philadelphia : 3-31.
- Lasher, HN and Shane, SM, 1994. Infectious Bursal Disease. *World's Poultry Science Journal*, 50, 133-166.
- Lay, D,H, Yamamoto, R, and Bickford, 1983. The patogenesis of infectious bursal disease : serologic, histopathologic, and clinical chemical observation. *Avian Diseases.* 27 (4) : 1060-1085.
- Lee, R, Gillet, G, Burnside, Thomas, S.J, and Neiman, P. 1999. Role of Nr 13 in regulation of program cell death in the bursa of Fabricius. <http://www.genesdev.org/cgi/content/full/13/6/718>. Diakses 8 -1-2006
- Leedy, PD, 1989. Practical Research Planning Design. Ed 4. London Collier Mac Milland Publisher 220-227.

- Lukert, PD, and Saif, YM, 1997. Infectious bursal disease. In Calnek, BW, Barnes, HJ, Bread, CW, Mc Dougald, LR., and Saif, YM., editors. 1997. Diseases of Poultry. Ed 10<sup>th</sup>. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA.
- Mc Ferran, JB. 1993. Infectious bursal disease. In JB Mc Ferran and Mc Nulty (Eds). Virus infections of birds 213-228.
- Muller, R, Kaufer, I, Reinacher, M, and Weiss, E. 1979. Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus. Zentralblad Veterinarmedizin (B). 26 :345-352.
- Müller, H., and Nitschke, R. 1987. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. Virology **159**:174–177.
- 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.
- Murphy, FA, Fauquet, C.M, Bishop, DHL, Ghabrial, SA, Jarvis, AW, Martielli, GP, Mayo, MO and Summers, MD. 1995. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer-Verlag, Vienna, Austria. p. 240–244
- Nakamura, T, Otaki, Y, and Nunoya, T. 1992. Immunosuppressive effect of a highly virulent infectious bursal disease virus isolated in Japan. Avian Diseases. 36: 891- 896.
- 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.
- Olsen, GR, 1985. Comparative Pathobiology of Viral Disease Vol I. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Parede, L, Ronohardjo, P, Indriani, R, dan Hamid, H. 1994. Pemantauan isolat dan titer antibodi Gumboro dari berbagai daerah wabah di Indonesia. Penyakit Hewan Vol XXVI No 48.

- Parede, HL, Sapats, S, Gould, G, Rudd, M, Lowther, S, and Ignjatovic, J, 2003. Characterisation of infectious bursal disease virus isolates from Indonesia indicates of existence of very virulent strains with unique genetics changes. *Avian Pathology* (32)(5), 511-518.
- Pink, JRL, Lassila, O, and Vainlio, O. 1987. B-lymphocyte and their self-renewal. In *Avian Immunology : Basis and Practice*. Vol I : 195-212. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Pizem, J. and Cor, A. 2003. Detection of apoptotic Cells in Tumour Paraffin Section. *Radiol. Oncol.* 37 (4): 225-232.
- 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
- Rodenberg, J., Sharma, J.M., Belzer, S.W., Nordgren, R.M., and Naqi, S., 1994. Flowcytometric analysis of B cell and T cell subpopulation in specific pathogen free chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Disease* 38: 16-21.
- Sanchez-Torres LE. 2003. Apoptosis: the phenomenon and its determination. *Tec. Pecu. Mex.* 41(1): 49-62
- Scanavini NH; Ito NMK; Miyaji CI; Lima E de A; Okabayashi S, Corrêa ARA, Eleutério GC, Zuanaze MA. (2004). Infectious bursal disease virus: case report and experimental studies in vaccinated and unvaccinated SPF chickens and commercial broiler chicks *Rev. Bras. Cienc. Avic.* vol.6 no.1 Campinas
- Setiyono, A, Hayashi, T, Yamaguchi, T, Fukushi, H, & Hirai, K, 2001. Detection of cell membrane protein that interact with virulent Infectious Bursal Disease Virus. *J Vet Med Sci* 63(2): 219-221.
- Sharma, MJ, In- Kim, J, Rautenschlein, S, Yueh Yeh, H, 1999. Infectious bursal disease virus of chickens : pathogenesis and immunosuppression. Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St Paul, MN 55108, USA.
- Soini, Y, Paakko, P and Lehto, VP. 1998. Histological Evaluation of Apoptosis in Cancer. *Am,er.J.Pathol.* 153:1041-1053
- Steel, RGD, Torrie, H. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik. Edisi kedua, Jakarta PT Gramedia Pustaka Utama.

- Stephen, WF and Shi, Y. 2001. Controlling the caspasee. *Science* vol 294 : 1477-1478.
- Steven, A and Lowe, J., 2000. *Pathology*. Second edition. Mosby Toronto : 7-33.
- Tanimura, N, and Sharma, JM. 1998. In-situ apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Journal of Comparative Pathology*, 118 : 15-27.
- Thomberry AN and Lazebnik Y, 1998. Caspase: Enemy Within ,*Science* 281:1312-16.
- Thompson C B,1995 : Apoptosis in the Patogenesis and Treatment of Disease. *Science* vol 267 :1445-1448.
- Tsukamoto K, Kojima C, Komori Y, Tanimura N, Mase M, Yamaguchi S.,1999. Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2. *Virology* ;257:352 - 362.
- Tizard, Ian, R, 1981. *An introduction to veterinary immunology*. 2<sup>nd</sup>.ed. WB saunders Company, Philadelphia. Diterjemahkan oleh Soehardjo Hardjosworo dan Masduki Partadireja. Airlangga University Press.
- van den Berg, T.P.2000. Acute infectious bursal diasease in poultry: a review.*Avian Pathology*, 29: 175-194.
- 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.

# เวชศาสตร์สัตวแพทย์



Proceeding of the 4<sup>th</sup> Asian Society of Veterinary Pathologists (ASVP) Conference and  
Annual Meeting of The Thai Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (TAVLD)

# The Thai Journal of Veterinary Medicine



# The Expression of Caspase 3 in the Chicken Bursa Cell in Tasik'98 Infectious Bursal Disease Virus Infection

H. Plumeriastuti

Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University

**Keywords:** apoptosis, chicken, infectious bursal disease

## Introduction

Infectious bursal disease (IBDV) is a highly contagious viral infection of chickens that is seen worldwide. The bursa of Fabricius is the primary target organ of IBDV (1). The virus replicates in immature bursa-derived lymphocytes (B-lymphocytes). The bacteria which survives the disease are permanently immunosuppressed. Therefore they are more susceptible to other disease causing agents and don't respond adequately to vaccinations which are an essential part of poultry management systems (2). Airdense of field farms of the virus varies considerably. Very virulent strains of the virus that causes high mortality and morbidity were detected first in Europe. These spread throughout the Old World in the first decade and in 1927 were in South America. Infection by this virus due to depletion of lymphocytes in the bursa of Fabricius because of necrosis and apoptosis (3). In Tasik'98 some of 65 IBDV field strain from Indonesia, which can cause an acute clinical disease characterized by devastating mortality and the severe depletion of bursa of Fabricius.

The main purpose of this study was to proof the increasing of bursa cells apoptosis by detection of Caspase 3 expression in bursa of Fabricius. The Caspase 3 is a main effector caspase in apoptosis process. Direct or indirect activation of caspase 3 are responsible for targeted cleavage due to a specific DNA and also in prokaryotic morphologic changes of apoptotic cells (1). When caspase 3 has activated, the cell committed to death and apoptosis may called due to the point of no return (4). The expression of activated caspase 3 in the cell occurred at the early apoptosis process before appears dramatic morphologic changes of cell death, so detection of the increasing of caspase 3 expression in the cell by immunohistochemistry can be used as the base for detection of apoptotic cell.

The study consists of two parts. First part, Tasik'98 isolate IBDV. Annual trial in this study were specific pathogen free day old chick. Virus that used for infection was immunohistochemistry. Primary antibody was monoslonal rabbit anti caspase 3 antibody (AbVision Corp). Caspase 3 expression was evaluated by counting the number of positive cells in percent. The time when caspase 3 expression increases for 25% will be determination of a time for sacrificing chicken in the second step of experiment.

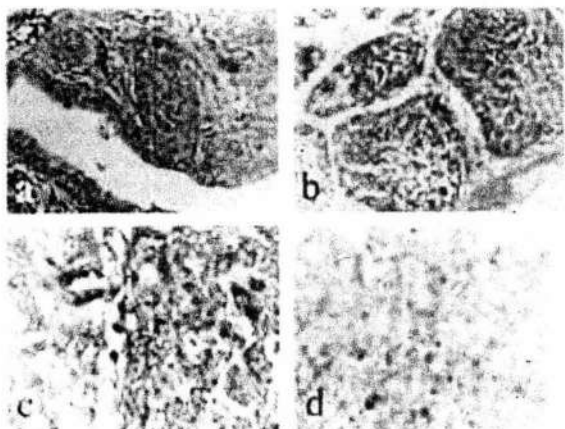
Sixteen chickens on the second step of experiment are divided into 2 groups. Chickens in group 1 were infected with 1000 TCID<sub>50</sub> of Tasik'98 isolate IBDV through intracocular, peroral and intracelsoal routes. Chickens in group 2 were treated with NaCl by intracelsoal, peroral and intracelsoal routes. In the time that was determined in first step of experiment, all of the chickens were sacrificed. The bursa were collected for histology and were evaluated on Caspase 3 expression used the method like the one that was done in

the first step of experiment above. The data were analysed by student t test.

**Results and Discussion**

The result of first step experiment showed that the 25% increase of caspase-3 expression were found on 48 hours post infection. It was used for determination for sacrificing chicken in the second step of experiment.

The result of the second experiment showed that the expression of caspase-3 in bursa were significant difference ( $p < 0.001$ ) between infected chicken and non-infected chicken. Expression of caspase-3 increased from 1.25 (0.05%) in the non-infected chickens became 29.94 (7.01%) in the infected chicken. This showed in Fig 1.



**Fig 1** Caspase 3 was strongly expressed in infected chicken bursa (a, c) and there is almost negative in uninfected chicken bursa (b, d).

There are three apoptosis mechanisms that involve caspase activation. The first, granzyme performin mediated pathway. The second is dead receptor mediated pathway. Fas is one of the dead receptor, it was expressed in the cell membrane surface when the cell has been infected by a virus. The third, cytotoxic released from mitochondria bind Apaf-1 can induce the activation of caspase-9 (caspase initiator). Caspase-9 will activate the effector caspase due to apoptosis (1, 4).

The mechanism of natural apoptosis without bursa disease virus infected chicken still has not been fully understood. It was thought that the mechanism through the Fas-Fas ligand pathway that could be explained with increasing of Fas and caspase-3 expression or cytokine signaling pathway that could be explained by increasing of granzyme and perforin expression.

The result of this study showed that there will be increasing of caspase-3 expression in BVDV infected chicken bursa. It means that there will be mechanism of apoptosis in chicken bursa. The increase of caspase-3 expression could be described that bursa cell contained virus express Fas-Fas will bind Fas ligand of cytotoxic T lymphocyte. This binding will activate Fas as external of domain and then activate caspase activation. The other way, activated cytotoxic T lymphocyte will releases perforin and granzyme. Perforin makes a pore in the virus infected cell membrane and then the granzyme enter the cell through the pore. Granzyme can activate caspase cascade.

**References**

1. Aschkenazi et al. 2002. *Biol. Repr.* 66: 1553-1561
2. Balkundi et al. 2005. *Biol. Repr.* 69: 318-324
3. Denecker et al. 2001. *Cell Mol. Life Sci.* 38: 356-370
4. Gupta. 2003. *Intern. J. Oncol.* 22: 18-20
5. Jungmann et al. 2001. *J. Gen. Virol.* 72: 110-115
6. Kim et al. 1998. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62: 331-341
7. Nakamura et al. 1992. *Veter. Dis.* 86: 891-896
8. Tamura and Sharma. 1998. *J. Comp. Path.* 118: 15-27

Asian J. Anim. Med. & Vet. Clin. 2009

Asian J. Anim. Med. & Vet. Clin. 2009

Asian J. Anim. Med. & Vet. Clin. 2009

Asian J. Anim. Med. & Vet. Clin. 2009

Asian J. Anim. Med. & Vet. Clin. 2009