

SKRIPSI

KARAKTERISASI *CASPASE 10* SEBAGAI PROTEIN INISIATOR APOPTOSIS PADA BURSA FABRISIUS AYAM PEDAGING SETELAH DIINFEKSI VIRUS GUMBORO



Oleh :

NOVIA YULI ASTUTIK
SIDOARJO – JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

**KARAKTERISASI *CASPASE 10* SEBAGAI PROTEIN INISIATOR
APOPTOSIS PADA BURSA FABRISIUS AYAM
PEDAGING SETELAH DIINFEKSI
VIRUS GUMBORO**

**Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
SARJANA KEDOKTERAN HEWAN**

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

**NOVIA YULI ASTUTIK
NIM. 069912673**

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



(Ajik Azmijah, SU., Drh.)

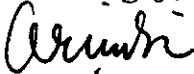
Pembimbing Pertama



(Nunuk Dyah R. L., MS., Drh.)

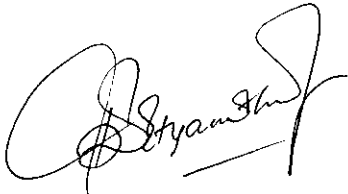
Pembimbing Kedua

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

Menyetujui
Panitia Penguji,


Arimbi, M. Kes., Drh.

Ketua



Setiawati Sigit, MS., Drh.

Sekretaris



Jola Rahmahani, M. Kes., Drh.

Anggota



Ajik Azmijah, SU., Drh.

Anggota



Nunuk Dyah R. L., MS., Drh.

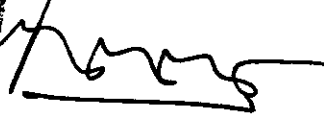
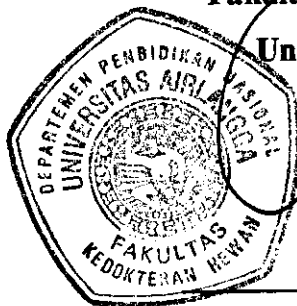
Anggota

Surabaya, 26 Agustus 2004

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh.

NIP 130 687 297

**KARAKTERISASI *CASPASE 10* SEBAGAI PROTEIN INISIATOR
APOPTOSIS PADA BURSA FABRISIUS AYAM
PEDAGING SETELAH DIINFEKSI
VIRUS GUMBORO**

Novia Yuli Astutik

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi karakter *caspase 10* protein inisiator apoptosis pada bursa fabrisius ayam pedaging setelah diinfeksi virus gumboro. Dengan diketahuinya protein inisiator terhadap apoptosis tersebut dapat dikembangkan untuk membuat bahan pengeblok (*blocking agent*) terhadap apoptosis.

Hewan coba ayam pedaging sebanyak 50 ekor dengan umur 21 hari. Perlakuan dengan infeksi virus gumboro digunakan 25 ekor ayam dan 25 ekor ayam lainnya untuk kontrol. Semua ayam perlakuan diinfeksi dengan virus gumboro secara peroral, intraokuler, intrakloaka dengan dosis 1000 EID₅₀, sedangkan kontrol negatif tanpa diberikan perlakuan apapun. Setelah dilakukan pemanenan bursa, dipilih secara random masing-masing 2 untuk perlakuan dan 1 untuk kontrol dari tiap-tiap interval hari pengambilan. Selanjutnya dilakukan sonikasi dan diuji dengan metode SDS-PAGE 12 % dengan pewarnaan perak nitrat untuk mengetahui protein inisiator apoptosis dan protein spesifik lainnya. Kemudian dilanjutkan dengan metode *Western Blot* untuk mengetahui jenis protein inisiator apoptosis.

Hasil penelitian menunjukkan beberapa protein yang terekspresi pada kelompok perlakuan terdapat beberapa protein spesifik yaitu : *caspase 10* sebagai protein inisiator apoptosis dengan berat molekul (BM) 17 kDa, VP 1 (viral protein 1) dengan berat molekul 91 kDa, VP 2 dengan berat molekul 42 kDa, VP 3 dengan berat molekul 33 kDa, VP 4 dengan berat molekul 29 kDa, serta protein non spesifik lainnya dengan berat molekul 60 kDa dan 70 kDa. Pada kelompok kontrol terdapat protein inisiator (17 kDa) dan protein non spesifik dengan berat molekul 60 kDa dan 70 kDa. Hasil imunobloting menunjukkan salah satu protein inisiator apoptosis tersebut adalah *caspase 10* yang terekspresi dengan berat molekul 17 kDa.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang dengan segala kebesarannya telah berkenan memberikan segala taufik serta hidayahnya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tulisan ini yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Kedokteran Hewan pada Universitas Airlangga.

Dalam penulisan berjudul “Karakterisasi *Caspase 10* Sebagai Protein Inisiator Apoptosis Pada Bursa Fabricius Ayam Pedaging Setelah Diinfeksi Virus Gumboro” penulis mencoba mengidentifikasi karakter *caspase 10* sebagai protein inisiator apoptosis bursa fabricius ayam setelah diinfeksi dengan virus gumboro, berdasarkan berat molekul dengan menggunakan metode SDS-PAGE 12 % dan adanya reaksi positif terhadap antibodi poliklonal anti *caspase 10* dengan menggunakan metode *Western Blot*. Upaya mengetahui jenis protein inisiator apoptosis pada bursa fabricius setelah diinfeksi virus gumboro ini merupakan langkah awal untuk menentukan protein apoptosis yang nantinya berguna dalam upaya pembuatan *Blocking Agent* terhadap apoptosis.

Dalam penulisan ini penulis banyak menerima bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

1. Bapak Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh selaku Dekan fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga beserta staf pimpinan atas kesempatan yang diberikan.

2. Ibu Ajik Azmijah SU., Drh, selaku ketua peneliti dari Research Grand proyek Due-Like serta selaku pembimbing pertama yang telah memberikan kesempatan pada penulis untuk mengikuti penelitian.
3. Ibu Nunuk Dyah Retno Lestari MS., Drh, selaku pembimbing kedua yang telah banyak memberikan saran dan bantuannya.
4. Ibu Jola Rahmahani, M. Kes., Drh., Ibu Arimbi, M. Kes., Drh., serta Ibu Setiawati Sigit, MS., Drh., selaku dosen penguji.
5. Bapak Bambang Suprayogi Drh, selaku konsultan dari Pusvetma Surabaya, atas segala saran, bantuan pikiran serta tenaganya.
6. Ibu Hani Plumeriastuti, M. Kes., Drh, atas saran kritik dan bantuannya.
7. Dr. Fedik A. Rantam, Drh, selaku koordinator Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga beserta Bapak Iwan Syahrial H, Msi., Drh dan Bapak Mufasirin, Msi., Drh, yang telah mengizinkan dan membantu penulis untuk melakukan penelitian di laboratorium tersebut.
8. Ibunda Sumenik, Alm. Bapak Basir Al Sudjait, serta seluruh keluargaku atas segala dorongan semangat serta bantuan moral dan material yang tak ternilai dengan apapun juga.
9. Laili A.E, Yudi Prasetyo, Kristina, Bobby, yudha, Novi A.S, serta seluruh rekan-rekan di FKH UNAIR angkatan 99 yang telah banyak memberikan saran kritik serta bantuannya.

10. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penyempurnaan tulisan ini.

Meskipun penulis telah berusaha sebaik mungkin dalam mewujudkan penulisan tugas ini sempurna mungkin, namun penulis menyadari bahwa penulisan ini jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulisa mengharap dan menerima segala bentuk kritik, saran yang sangat berguna sebagai penyempurnaan lebih lanjut, agar kelak tulisan ini dapat dimanfaatkan oleh pihak – pihak yang membutuhkan.

Surabaya, Juni 2004

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Landasan Teori.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Gambaran Umum Gumboro.....	6
2.1.1 Etiologi.....	6
2.1.2 Patogenesis.....	6
2.1.3 Imunosupresi.....	8
2.1.4 Respon Imun terhadap Virus.....	9

2.2 Apoptosis.....	10
2.3 <i>Caspase</i>	12
2.4 <i>Caspase 10</i>	13
2.5 Peran <i>Caspase</i> Terhadap Apoptosis.....	14
2.6 Jalur Perforin Granzim.....	16
BAB III. MATERI DAN METODE	
3.1 Waktu dan tempat Penelitian.....	18
3.2 Materi Penelitian	18
3.1.1 Hewan Coba.....	18
3.2.2 Virus Gumboro.....	18
3.2.3 Bahan Penelitian	18
3.2.4 Alat Penelitian.....	19
3.3 Metode Penelitian	19
3.3.1 Perbanyak Virus.....	19
3.3.2 Perlakuan, Infeksi, Dan Pemanenan Bursa.....	20
3.3.3 Sonikasi Bursa.....	21
3.3.4 SDS – PAGE 12 %.....	21
a. mencetak running gel 12 %.....	22
b. mencetak stacking gel.....	22
c. menyiapkan sampel.....	22
d. elektroforesis.....	23
e. pembacaan hasil SDS – PAGE.....	24
3.3.7 Western Blot.....	24

a. semi dry electrophoresis.....	25
b. immunobloting.....	25
BAB IV. HASIL PENELITIAN.....	27
BAB V. PEMBAHASAN.....	31
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	35
RINGKASAN.....	36
DAFTAR PUSTAKA.....	38
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Jenis, Struktur, dan Fungsi <i>Caspase</i>	13
Gambar 2.2 Apoptosis Sel Terinfeksi Virus melalui Stimulasi CTL.....	16
Gambar 4.1 Hasil SDS – PAGE 12 % Bursa Ayam yang diinfeksi Virus Gumboro pada Hari Pengambilan ke-2,-4, dan ke-6.....	28
Gambar 4.2 Hasil SDS – PAGE 12 % Bursa Ayam yang diinfeksi Virus Gumboro pada Hari Pengambilan ke-6,-8, dan ke-10.....	28
Gambar 4.3 Hasil Immunoblotting Bursa Ayam yang diinfeksi virus Gumboro pada Hari Pengambilan ke-2,-4, dan ke-6.....	29
Gambar 4.4 Hasil Immunoblotting Bursa Ayam yang diinfeksi Virus Gumboro pada hari Pengambilan ke-6,ke-8,dan ke-10.....	30

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Tabel Karakteristik <i>Caspase</i>	14
2. Tabel berat Molekul Hasil SDS-PAGE 12 % Pada Gel I.....	27
3. Tabel Berat Molekul Hasil SDS-PAGE 12 % Pada Gel II.....	27

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Lampiran Penentuan Berat Molekul <i>Caspase 10</i>	42

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit Gumboro disebut juga *infectious avian nephrosis*, *infectious bursal disease* (IBD), yang merupakan penyakit infeksi pada unggas yang ditemukan di seluruh dunia dan disebabkan oleh virus (Retno dkk., 1998). Penyakit ini bersifat akut, menular dan immunosupresif. Angka morbiditasnya mencapai 100% sedang angka mortalitasnya berkisar 5-60%. Angka kematian dapat mengalami peningkatan bila disertai dengan infeksi sekunder (Becht and Muller, 1991; Kibenge *et.al.*,1998; Retno dkk, 1998).

Ayam merupakan salah satu spesies yang rentan terhadap virus gumboro, dengan memperlihatkan gejala klinis dan perubahan patologi yang khas (Partadireja, 1992). Menurut penelitian, ayam ras dari strain *White Leghorn* paling peka terhadap virus gumboro dengan gejala klinis yang lebih hebat (Weisman & S.B. Hitchner, 1985). Wabah penyakit Gumboro yang terjadi umumnya menyerang peternakan ayam ras baik tipe petelur maupun tipe pedaging dan belum pernah dilaporkan adanya kasus yang sama menyerang atau mewabah pada ayam buras (Darminto, 1985).

Penyakit Gumboro merupakan penyakit viral pada unggas yang disebabkan oleh genus *Avibirnavirus*, dari familia *Birnaviridae* penyakit ini bersifat immunosupresif pada ayam muda (antara usia 3 – 6 minggu), yang ditandai dengan adanya pengrusakan pada prekursor pembentuk antibodi sel B yang berada dalam

sel bursa fabrisius. Kerusakan pada bursa menyebabkan imunodefisiensi yang pada akhirnya dapat mengakibatkan terjadinya peningkatan kepekaan terhadap infeksi oportunistik (Kibenge *et al.*, 1988). Di Indonesia pernah terjadi wabah pada tahun 1991 menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar karena penyakit ini dapat menyebabkan kematian sampai 60% pada ayam terutama bila diikuti dengan infeksi sekunder (Parede, 1993).

Virus gumboro mempunyai dua serotipe yang berbeda yaitu I dan II. Strain virus yang patogen adalah serotipe I, sedangkan serotipe II dapat menginfeksi ayam dan kalkun, tetapi tidak mampu menunjukkan manifestasi klinik yang berarti (Becht and Muller, 1999). Target organ seluler dari virus gumboro adalah organ limfoid, terutama bursa fabrisius. Ayam yang terinfeksi dengan virus gumboro menderita imunodefisiensi yang disebabkan pengosongan limfosit B. Keadaan ini dapat meningkatkan kepekaan ayam terhadap infeksi sekunder dan kegagalan vaksinasi (Becht and Muller, 1999 ; Kibenge *et al.*, 1988).

Selain dapat menyebabkan nekrosis, infeksi terhadap virus gumboro juga dapat menyebabkan atropi dari bursa fabrisius (Rosenberger, 1985). Hal ini dapat diduga adanya keterlibatan dari proses apoptosis sebagai patogenesis dari infeksi virus gumboro dari ayam yang peka menghasilkan induksi apoptosis pada sel bursa (Vaconelos & Lam, 1995 ; Lam, 1997 ; Ojeda *et al.*, 1997; Tanimura & Sharma, 1998 ; Nieper *et al.*, 1999), seperti halnya pada organ timus (Inoue *et al.*, 1994 ; Tanimura & Sharma, 1998).

Imunosupresi merupakan salah satu masalah yang perlu mendapat perhatian pada infeksi virus gumboro. Beberapa hasil penelitian membuktikan bahwa

kontribusi terbesar terjadinya immunosupresi adalah dari pengosongan sel limfoid pada bursa akibat infeksi yang berupa apoptosis dan nekrosis. Terjadi proses apoptosis diperlukan suatu enzim yang disebut *caspase* (*Cystein Aspartyl Specific Protease*) yang dalam hal ini bertindak sebagai inisiator dan efektor. Selain itu *caspase* juga diperlukan dalam proses biokimia pada berbagai bentuk kematian sel secara terprogram yang dikenal dengan apoptosis (Schweichel and Meker, 1973).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dalam penelitian ini peneliti mencoba mengidentifikasi karakterisasi *caspase 10* sebagai protein inisiator apoptosis dengan menggunakan metode SDS-PAGE dan immunoblotting. Diharapkan dari penelitian tersebut dapat membantu dalam penemuan *blocking agent* terhadap apoptosis yang nantinya akan menekan dampak immunosupresif yang timbul.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah *caspase 10* bisa dikarakterisasi dari bursa fabrisius ayam pedaging yang diinfeksi virus gumboro.

1.3 Landasan Teori

Caspase merupakan enzim dari kelompok Sistein Protease yang dikenal sebagai Cystein Aspartyl Specific Protease (Alnemri *et al.*, 1996). Pada manusia dan mencit terdapat 14 *caspase* yang telah berhasil diidentifikasi yang dikelompokkan menurut sekuen asam amino yang sama atau spesifik proteasenya.

Berdasarkan fungsinya *caspase* dibagi dua yaitu *caspase* inisiator (upstream atau inisiator *caspase*) dan *caspase* efektor (downstream atau efektor *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* 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 atau efektor. *Caspase 1, 4, 5* merupakan *caspase* yang terlibat dalam proses inflamasi (Reed, 2000).

Limfosit T Sitotoksik dan sel NK dapat menimbulkan lisis pada sel target melalui pengeluaran perforin dan granzim (Goldsby *et al.*,2000). Perforin merupakan enzim yang mampu membentuk celah pada membran sel target sehingga kemudian granzim dapat menerobos masuk untuk melisis sel tersebut (Abbas, 2000). Granzim dapat mengaktivasi *caspase* melalui proses reduksi oleh aspartat reduktase, menjadi dua fragmen kecil dan dua fragmen besar. Dalam keadaan teraktivasi ini *caspase* dapat mengaktifkan DNAase. DNAase yang aktif ini akan mendigest DNA sehingga DNA menjadi rusak dan terjadilah apoptosis (Emari, 1998).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi karakter *caspase 10* sebagai protein yang bertindak sebagai inisiator apoptosis pada bursa fabrisius ayam dengan infeksi virus gumboro, kemudian dianalisa dengan Western blot yang nantinya dapat digunakan sebagai bahan dasar pembentukan blocking agent terhadap apoptosis.

1.5 Manfaat Hasil Penelitian

Melalui karakterisasi *caspase 10* sebagai protein inisiator apoptosis dapat dibuat antibodi yang nantinya bisa digunakan untuk mencegah terjadinya apoptosis. Manfaat jangka panjangnya adalah sebagai dasar molekuler penanggulangan penyakit Gumboro dan pencegahan terhadap apoptosis patologik melalui penggunaan *blocking agent*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Gambaran Umum Gumboro

2.1.1. Etiologi.

Virus gumboro (*Virus Infectious Bursal Disease*) adalah suatu virus yang termasuk dalam genus *Avibirnavirus* serta familia dari *Birnaviridae*. Virus IBD merupakan virus RNA untai ganda, dengan bentuk *capsid icosahedrai*, dengan diameter 60 – 65 nm, serta tidak mempunyai amplop, sifat dari penyakit ini adalah akut, sangat menular, dan immunosupresif (Muller *et al.*, 1979 ; kibenge *et al.*, 1988). Penularan penyakit Gumboro dapat terjadi secara mekanis yaitu antara lain melalui peralatan peternakan, kendaraan, pakan, air, dan kotoran. Gejala klinis dari penyakit ini berupa diare, anoreksia, ayam gemetar, penurunan produktivitas dan pertumbuhan (Resang, 1984).

2.1.2. Patogenesis

Ayam merupakan spesies yang dapat terinfeksi secara alami oleh virus gumboro, dengan periode kepekaan antara umur 3 – 6 minggu. Apabila infeksi terjadi pada umur kurang dari 3 minggu, tidak menunjukkan adanya tanda-tanda klinik. Kejadian ini mempunyai arti ekonomi yang penting dari akibat yang ditimbulkan, yaitu menyebabkan terjadinya immunosupresi (Lukert and Saif, 1991). Selain ayam, kalkun juga dilaporkan dapat terinfeksi virus ini secara alami, akan tetapi penyakit yang ditimbulkan tidak separah pada ayam (Jackwood *et al.*,

1985). Oleh karena itu infeksi virus ini pada kalkun bukan merupakan masalah bagi peternakan.

Waktu inkubasi penyakit ini sangat singkat, dan tanda klinik tampak 2 – 3 hari. Virus gumboro menyerang jaringan limfoid dan menyebabkan kerusakan limfosit asal bursa fabrisius dan juga pada timus, limpa, dan caecal tonsil. Sedangkan limfosit asal timus relatif tidak terkena (Gordon and Jordan, 1980). Muller *et al*, (1978), mempelajari patogenesis penyakit Gumboro dengan menggunakan teknik imunoflouresence, dengan hasil pengamatan menunjukkan bahwa multiplikasi virus pertama kali terjadi di makrofag dan sel limfoid usus 4 -- 5 jam setelah infeksi peroral. Satu jam kemudian, virus berada di sel yang sama di duodenum dan jejunum. Selanjutnya virus masuk hepar, mencapai peredaran darah umum dan didistribusikan ke organ lain, khususnya bursa fabrisius. Di bursa fabrisius ini virus menempatkan diri dan mengadakan replikasi secara masif. Kejadian ini hanya berlangsung selama 11 jam setelah infeksi peroral, bahkan dapat berlangsung hanya 6 jam bila virus diaplikasikan langsung pada bursa fabrisius (Saif, 1991).

Mortalitas Gumboro relatif rendah, bahkan kadang-kadang 0%, akan tetapi dapat pula sebesar 20–30% apabila disertai dengan infeksi sekunder. Sedangkan morbiditasnya sangat tinggi, mendekati 100%. Penyakit ini menunjukkan gambaran yang khas, yaitu angka penularan melonjak tiba-tiba, bentuk penyakit yang terjadi pada wabah pertama biasanya akut, kemudian bila terjadi wabah ulang, bentuk penyakit lebih ringan, bahkan sering kali tidak terdeteksi (Lukert and Saif, 1991).

Infeksi virus gumboro pada umumnya menimbulkan lesi baik makroskopik maupun mikroskopik. Lesi makroskopik yang sering dijumpai adalah berupa perdarahan otot paha dan otot dada. Dalam usus terjadi peningkatan cairan mukus. Perubahan yang menyolok adalah pada bursa fabrisius, diawali dengan timbulnya transudat kuning seperti gelatin melapisi serosa, volume dan berat bursa meningkat dua kali berat bursa normal. Selanjutnya ukuran bursa mulai menurun, pada hari kedelapan setelah inokulasi berat bursa menjadi 1/3 dari berat bursa normal. Perubahan histologik yang mula-mula tampak adalah, folikel limfoid bursa fabrisius berisi sel limfoid dewasa dalam jumlah sedikit, tetapi banyak makrofag (Lukert and Saif, 1991).

2.1.3. Imunosupresi

Dampak imunosupresi yang ditimbulkan oleh virus IBD ini adalah melalui pengosongan sel limfoid pada bursa akibat infeksi yang berupa apoptosis dan nekrosis. Menurut Rautenschlein, *et al.*, (2002), untuk destruksi sel bursa diperlukan peran limfosit T. Limfosit T sitotoksik dan sel NK (*Natural Killer*) dapat menimbulkan lisis pada sel target melalui pengeluaran perforin dan granzim (Goldsby *et al.*, (2002)). Perforin merupakan enzim yang mampu membentuk celah pada membran sel target sehingga kemudian granzim dapat menerobos masuk untuk melisis sel tersebut (Abbas, 2000), setelah masuk ke sitoplasma sel target. Granzim akan langsung mengaktifkan *caspase 3* atau *caspase 10* kemudian mengaktifasi kaskade *caspase* selanjutnya memicu apoptosis (Alnemri *et al.*, 1996).

Pengosongan limfosit bursa fabrisius ini permanen, akibatnya walaupun terjadinya penyembuhan, inang tetap mengalami immunosupresi (Tanimura and Sharma, 1998).

2.1.4. Respon Imun Terhadap Virus.

Virus adalah mikroorganisme obligat yang berreplikasi di dalam sel dengan menggunakan asam nukleat dan perangkat sintesis protein inang. Apabila antigen (virus) masuk ke dalam jaringan tubuh, pertama-tama terjadi proses pengikatan antigen oleh sel fagosit maupun makrofag, sehingga dapat dikenali sebagai benda asing. Selanjutnya informasi dikirim ke sel peka antigen, yaitu sel limfosit T dan limfosit B (Tizard, 1988).

Respon imun alami terhadap infeksi virus pertama-tama melalui induksi interferon tipe I yaitu Interferon Alfa ($IFN\alpha$) dan Interferon Beta ($IFN\beta$) dan aktivasi sel NK. $IFN\alpha$ dan $IFN\beta$ dapat menginduksi respon 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-2, yaitu merupakan sitokin yang paling awal dalam respon terhadap infeksi viral (Goldsby, 2000). Adapun mekanisme antiviral berperantara sel secara umum melibatkan beberapa komponen yang meliputi : $CD8^+$ *Cytotoxic T Lymphosit* (CTL) dan $CD4^+$ sel T helper 1 (Th 1). Sel Th 1 yang teraktivasi menghasilkan sejumlah sitokin yang meliputi IL-2, $IFN-\gamma$, dan TNF (Tumor Nekrosis faktor) yang berfungsi menahan virus baik secara langsung maupun secara tidak

langsung. $\text{INF-}\alpha$ secara langsung menginduksi keadaan antiviral didalam sel. IL-2 beraktifitas secara langsung dengan membantu penarikan *CTL precursor* ke dalam populasi efektor. IL-2 dan $\text{INF-}\gamma$ mengaktifkan sel NK yang berperan penting dalam pertahanan tubuh selama beberapa hari sampai terbentuk respon CTL spesifik (Goldsby, 2000). CTL dan NK dapat menimbulkan lisis pada sel target melalui pengeluaran perforin dan granzim. Perforin merupakan enzim yang membentuk celah pada membran sel target sehingga kemudian granzim dapat menerobos masuk untuk melisis sel tersebut (Abbas, 2000).

2.2 Apoptosis

Apoptosis merupakan kematian sel terprogram melalui mekanisme genetik yang dapat terjadi secara fisiologis maupun patologis serta bertujuan untuk menghilangkan sel sel yang rusak atau tidak diperlukan. Aktivitas enzim telomerase diketahui sangat berperan pada apoptosis fisiologis, sedangkan apoptosis patologis terjadi karena terdapat gangguan keseimbangan sistem genetik yang dipicu oleh faktor lingkungan, misalnya infeksi virus (Thomson, 1995).

Apoptosis pertama kali dipelajari pada cacing *Caenorhabditis elegans*. Gen yang terlibat disebut gen *Ced* (*Caenorhabditis elegans gene*). Gen *Ced* tersebut meliputi *Ced-3*, *Ced-4*, dan *Ced-9*. Pada mamalia *Ced-3* homolog dengan *caspase* dan *Ced-4* homolog dengan *Apaf-1* (*apoptosis protease activating faktor-1*).

Program kematian ini memainkan peranan penting pada berbagai proses fisiologik selama perkembangan fetus dan homeostasis pada jaringan dewasa. Apabila sistim pengaturan apoptosis tidak berfungsi akan terjadi berbagai

penyakit seperti Kanker, penyakit Neurodegenerasi, dan Autoimun. Kematian sel secara fisiologis terjadi secara apoptosis, bukan secara nekrosis.

Secara morfologis, ciri-ciri sel yang mengalami apoptosis antara lain: terjadinya kondensasi kromatin, fragmentasi inti (piknosis), membran plasma menggumpal dan sel mengkerut. Biasanya, sel terbagi menjadi fragmen kecil-kecil yang dikelilingi dengan membran (badan apoptotik atau *apoptotic bodies*). Badan apoptotik akan dibersihkan dengan cara fagositosis tanpa menimbulkan respon inflamasi. Proses tersebut terjadi sangat cepat yaitu antara 30 sampai 60 menit (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Apoptosis terjadi karena kerlibatan berbagai perangkat seluler yang disebut perangkat apoptotik. Komponen sentral dari perangkat apoptotik ini adalah suatu kelompok Sistein Protease yang disebut *Caspase (Cysteine Aspartyl Spesifik Protease)*. Perangkat-perangkat lainnya yaitu berupa molekul-molekul protein yaitu protein adaptor dan protein regulator (pro- dan anti apoptotik).

Berdasarkan dari aktivitas *caspase*, maka mekanisme terjadinya apoptosis dapat terjadi melalui proses enzimatik, yaitu jalur sitotoksin. Pada sel Sitotoksin dan sel NK untuk dapat membunuh sel target (sel abnormal seperti sel tumor atau sel terinfeksi virus) dapat dengan menggunakan sitotoksin. Sitotoksin mengandung dua macam bahan yaitu perforin dan granzim, dengan adanya perforin maka membran sel target akan mengalami perforasi, melalui lubang tersebut akan diinjeksikan granzim, granzim ini akan mengaktifkan *caspase* secara bertahap, yaitu *caspase* aktif ini akan mengaktifasi DNAase yang akhirnya DNAase ini akan merusak DNA (Kuby, 2000).

Meskipun *caspase* merupakan komponen sentral pada apoptosis bukan berarti pada apoptosis selalu memerlukan *caspase*. Hal ini dibuktikan oleh Josadkk (Humot & Flavell, 2001) yang menemukan suatu protein dalam mitokondria yang disebut *apoptosis-inducing factor* (AIF) yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis tanpa keterlibatan *caspase*.

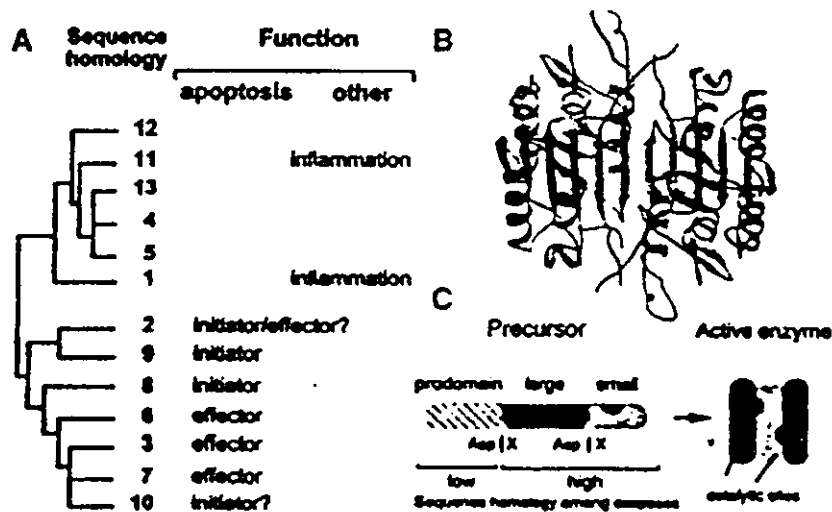
Proses apoptosis juga dapat terjadi melalui *ribonukleoprotein* atau telomerase. Telomerase ini pertama kali dimurnikan melalui *tetrahymena*, enzim ini didapat pada semua sel eukaryota termasuk pada manusia. Telomerase ini berfungsi untuk mempertahankan ukuran telomer dari kromosom pada sel eukaryota (Alberts, 1989 ; Lingner, 1997), karena telomer akan mengalami pemendekan pada waktu sel melakukan pembelahan sel, apabila telomer tersebut mencapai ukuran tertentu (level kritis) sebagai akibat pembelahan secara berulang, maka sel tersebut tidak melakukan pembelahan sel lagi dan akhirnya mengalami kematian (apoptosis) (Taylor, 1996 ; Murakami, 1997).

2.3 Caspase

Caspase merupakan enzim dari kelompok *cystein protease* yang dikenal dengan *Cysteine Aspartyl Specific Protease* (Alnemri et al.,1996). Enzim ini berada dalam suatu kantong di sitoplasma dalam keadaan inaktif (proenzim) dengan berat molekul 30 – 50 kDa. *Caspase* mempunyai daerah prodomain terminal NH₂, subunit besar (~20 kDa) dan subunit kecil (~10 kDa) (Reed, 2000).

Pada manusia dan mencit terdapat 14 *caspase* yang telah berhasil diidentifikasi, yang dikelompokkan menurut sekuen asam amino yang sama atau

spesifik proteasenya. Berdasarkan fungsinya *caspase* dibagi menjadi dua, yaitu *caspase* inisiator (upstream atau initiator *caspase*) yaitu *caspase* 2, 8, 9, 10 dan *caspase* efektor (downstream atau effector *caspase*) yaitu *caspase* 3, 6, 7. Sebagian besar *caspase* diperkirakan terlibat secara langsung dalam kematian sel, tetapi tidak semua 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).



Gambar 2.1. Jenis, Struktur, dan Fungsi *Caspase* (Thornberry and Lazebnik, 1998)

2.4. *Caspase 10*

Caspase 10 merupakan salah satu anggota dari suatu famili protein Protease Sistein yang dikenal sebagai *caspase*. Beberapa anggota dari enzim ini menjadi bagian dari kaskade proteolitik yang berperan sebagai pusat didalam kematian sel oleh apoptosis. *Caspase* memerlukan perpecahan proteolitik proenzimnya yang

terbagi menjadi dua subunit yang aktif. Protein yang aktif ini akan mengaktifkan proenzim dari *caspase 3* dan *caspase 7* menjadi bentuk aktif, kemudian membelah *Poly ADP Ribose Polimerase (PARP)* untuk menghasilkan bentuk 85 kDa yang akan menginduksi terjadinya apoptosis atau kematian sel. *Caspase 10* memiliki domain efektor kematian (*Death Efector Domain* atau DED) dan FADD (*Fas Associated Death Domain*) yang mampu berinteraksi dengan protein lain yang juga memiliki domain yang sama.

Caspase 10 merupakan salah satu dari *caspase* inisiator yang terlibat dalam pengisyratan melalui suatu protein reseptor kematian (Wang, *et al.*, 2001).

Tabel 2.1. Karakteristik *Caspase*

TABLE I
Caspase characteristics

Zyzoene	Predomin, length and motif	Active subunit kDa	Activation adaptor	Tetrapeptide preference ^a
Apoptotic initiators				
<i>Caspase-3</i> (51)	Long, CARD	20/12	RAIDD	DEXD ^a
<i>Caspase-8</i> (58)	Long, DED	18/11	FADD	(L/V/D)EXD ^a
<i>Caspase-9</i> (45)	Long, CARD	17/10	APAF-1	(L/V/L)EHD
<i>Caspase-10</i> (56)	Long, DED	17/13	FADD	Unknown
Apoptotic executioners				
<i>Caspase-3</i> (33)	Short	17/12	NA ^c	DEXD
<i>Caspase-6</i> (34)	Short	18/11	NA	(V/D)EXD
<i>Caspase-7</i> (35)	Short	20/12	NA	DEXD
Cytokine processors				
<i>Caspase-1</i> (46)	Long, CARD	20/10	^c CARDIAC	(W/L/F)EHD
<i>Caspase-4</i> (43)	Long, CARD	20/10	Unknown	(W/L/F)EHD
<i>Caspase-5</i> (48)	Long	20/10	Unknown	(W/L/F)EHD
<i>mCaspase-11</i> ^d (42)	Long	20/10	Unknown	Unknown
<i>mCaspase-12</i> (50)	Long	20/10	Unknown	Unknown
<i>Caspase-13</i> (43)	Long	20/10	Unknown	Unknown
<i>mCaspase-14</i> (30)	Short	20/10	NA	Unknown
Invertebrate caspases				
CEC-3 (56)	Long, CARD	17/14	CEC-4	DEXD
DCF-1 ^e (36)	Short	22/13	NA	Unknown

^a Adapted from Ref. 21.

^b The tetrapeptides are listed in the P₁-P₂ direction. Proteolysis occurs solely after the P₁ aspartate.

^c X denotes subsites with broad amino acid specificity.

^d When more than one amino acid is listed for a given subsite, each amino acid possibility is listed in order of preference.

^e NA, not applicable.

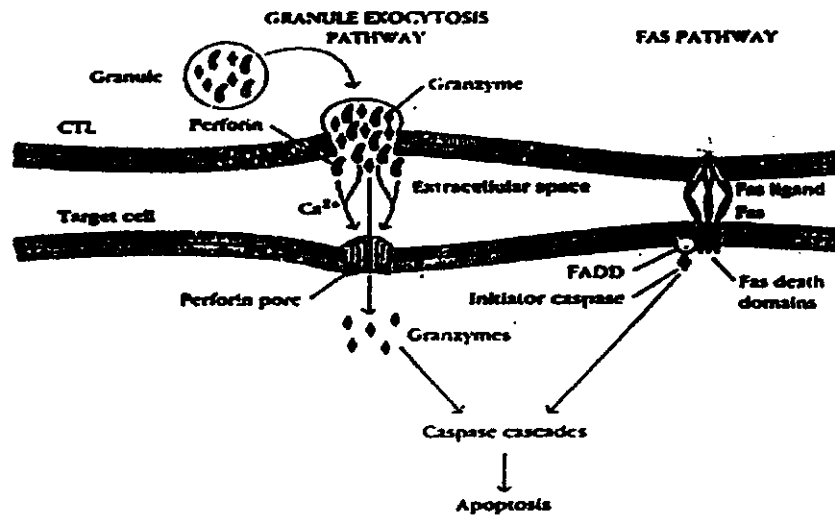
^f m denotes murine.

^g *Drosophila caspase-1*.

2.5. Peran *Caspase* Terhadap Apoptosis

Peran *caspase 10* pada apoptosis terkait erat dengan aktivasi granzim. Apabila sel terinfeksi virus, maka virus dikenal oleh APC (Antigen Presenting Cells) kemudian dipresentasikan bersama molekul MHC 1 (Major

Histocompatibilitas Complex 1). Reseptor pada CTL mengenali molekul MHC I kemudian terjadi proses kematian sel yang melalui dua mekanisme, yang pertama CTL membentuk ikatan dengan sel target melalui ikatan *fasligan* pada CTL dengan fas sel target. Adapun mekanisme yang kedua yaitu CTL melepas protein eksosistosis 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* B7 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 serin protease yang disebut granzim 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 terget yang merupakan pintu masuk granzim kedalam sel target. Setelah granzim masuk kedalam sitoplasma sel target, granzim menjalankan fungsi *lethal effects* dengan mengaktifkan *proapoptotic cystein protease (caspase)* (Browne, 1999). Menurut Atkinson (1998), didalam sitoplasma sel target, granzim B dapat mengalami pembelahan dan mengaktifkan 3 secara langsung atau melalui *caspase 10*. Kemudian melalui kaskade *caspase* akhirnya memicu fragmentasi inti DNA dan terjadi apoptosis.



Gambar 2.2. Apoptosis Sel Terinfeksi Virus Melalui Stimulasi CTL (Goldsby, 2000).

2.6. Jalur Perforin / Granzim

Menurut Spanner *et al.*, (1999) perforin adalah suatu protein sitotoksik dengan berat molekul 60 kDa, yang disimpan dalam granulitik pada permukaan atas sel T Sitotoksik. Reseptor sel T Sitotoksik mengenali antigen pada permukaan dari suatu target sel (yang terkena infeksi), perforin seperti halnya efektor protein sitotoksik lain, dilepaskan oleh eksositosis lokal dan menginduksi sel target untuk mengalami apoptosis (Spaner *et al.*, 1999; Alberts *et al.*, 1994). Sel T sitotoksik mengenali antigen pada permukaan sel target, akan melepaskan muatan granulitiknya melalui suatu kalsium. Granul ini berisi dua kelas yang utama dari efektor protein sitotoksik yaitu perforin dan protease yang disebut granzim (Janeway *et al.*, 1999). Perforin dilepaskan melalui eksositosis pada tempat untuk bereaksi (Alberts *et al.*, 1994) dan polimer di dalam membran dari sel target (Spaner *et al.*, 1999), memproduksi suatu silindris di dalam lemak ganda yang lipofilik di permukaan luar dan hidrofil di sepanjang pusat cekungannya.

Kalsium dan air kemudian mampu masuk melalui sel pori-pori ini, kemudian menghancurkan integritas dari membran sel target (Janeway *et al.*, 1999).

Dalam percobaan invitro menunjukkan bahwa perforin membuat lubang-lubang kecil pada permukaan sel B, kemudian granzim masuk dan memecah dan memfragmentasi DNA menjadi amplop nuklear yang dihubungkan dengan apoptosis (Blink *et al.*, 1999). Secara rinci granzim masuk ke dalam sel target dan mengaktifkan *caspase 10* (Goldsby *et al.*, 2000). Kaskade *caspase* yang secepatnya menuju ke arah pengaktifan *caspase-activable* DNAase (CAD) yang kemudian bisa masuk inti dari sel target dan membelah DNA ke dalam 200 fragmen pasangan dasar. Pencegahan translokasi granzim sampai perawatan sel target dengan *caspase inhibitor* mampu menahan peristiwa apoptosis ini (Blink *et al.*, 1999).

BAB III

MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Waktu Dan Tempat Penelitian

Periode pelaksanaan penelitian dimulai bulan Juni 2003 berakhir bulan Januari 2004. Bertempat di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Tropical Disease Center Universitas Airlangga, dan Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah ayam pedaging berumur satu hari (DOC) sebanyak 50 ekor, yang kemudian dipelihara sampai dengan umur 21 hari, yang diperoleh dari PT. Reza Perkasa Breeding Farm.

3.2.2. Virus Gumboro

Virus gumboro yang digunakan dalam penelitian ini adalah virus gumboro isolat Tasik 98 yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma.

3.2.3. Bahan Penelitian

PBS steril (*Phospat Buffer Salin*), *running gel* 12%, *stacking gel* 12%, pewarna silver, elektroforesis buffer, transfer buffer, BSA (*Bovine Serum Albumin*) 1%,

laemli buffer dan butanol 50%, alkohol 70%, antibodi *poliklonal chicken anti caspase 10*, buffer sulfat, pengembang warna, formalin 10%, garam dapur, es batu.

3.2.4. Alat Penelitian

Untuk perbanyak virus digunakan alat-alat sebagai berikut: pinset, scalpel, gunting, petridish berdiameter 9 cm, mortir dan penggerus, spuit 1 cc, pipet hisap 1 ml; 5 ml, gelas beker 100 ml, *laminar flow cabinet*, api bunsen, sentrifus, freezer -20 °C; -80 °C, tabung reaksi, dan tabung universal. Semua peralatan untuk perbanyak virus digunakan dalam keadaan steril. Sedangkan untuk sonikasi digunakan peralatan sebagai berikut: *Ultrasonic Homogenizer*, gelas beker 300 ml, pipet dropper, rak tabung reaksi. Untuk pengerjaan SDS PAGE dan Western Immunoblotting digunakan alat-alat sebagai berikut: gelas beker 100 ml, erlemeyer 100 ml, pipet hisap 1 ml; 5 ml; 10 ml, *eppendorf tube* 1,8 ml, jarum, petridish berdiameter 12 cm, api bunsen, pipet dropper, freezer -20 °C, lemari es, *elektroblotting transfer apparatus*, gelas plate bersekat, *comb*, vertikal gel, *elektrophoresis apparatus*, sentrifuse, *shaker*, aluminium foil, kertas Watman, kertas saring, kertas filter, membran nitroselulose.

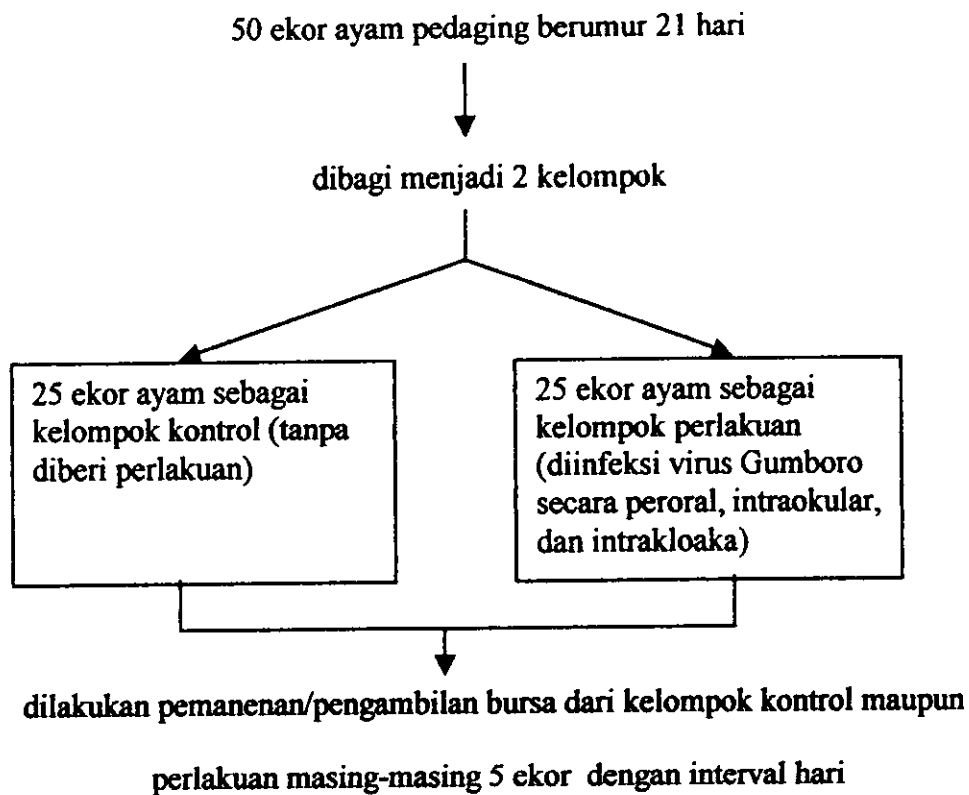
3.3. Metode Penelitian

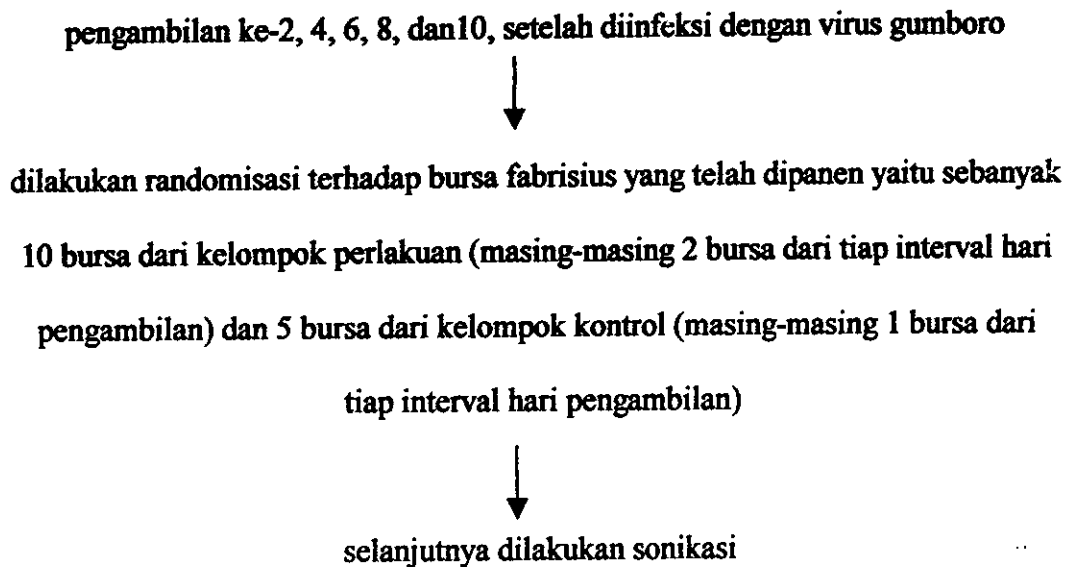
3.3.1. Perbanyak Virus

Perbanyak virus pertama dilakukan pada dua ekor ayam yang masing-masing diinfeksi dengan virus gumboro dengan dosis 1000 EID₅₀ / ml, sebanyak 0,4 ml secara peroral, intraokular, dan intrakloaka. Setelah dua hari bursanya dipanen, digerus sampai halus, dan kemudian ditambah dengan PBS steril sampai

konsentrasinya menjadi 20%. Hasil pengenceran ditampung dalam botol universal untuk kemudian dilakukan *Freeze Thawing*. *Freeze* dilakukan pada suspensi bursa dengan cara disimpan dalam freezer bersuhu -80°C selama kurang lebih 15 menit atau sampai beku, sedang *Thawing* dilakukan pada suspensi bursa yang telah di *freezing* dengan cara direndam dalam air sampai suspensi bursa tersebut cair kembali. Hal tersebut dilakukan sebanyak dua kali dengan tujuan virusnya keluar dari jaringan. Setelah perlakuan *Freeze Thawing* suspensi di sentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama kurang lebih 15 menit. Kemudian diambil supernatannya dan diinfeksi lagi 6 ekor ayam dengan cara yang sama seperti pasasse pertama, semua perlakuan terhadap bursa diatas dikerjakan secara steril didalam *laminar flow cabinet*.

3.3.2. Perlakuan, Infeksi, dan Pemanenan Bursa





3.3.3. Sonikasi Bursa

Sonikasi merupakan suatu metode yang digunakan dengan tujuan mengeluarkan protein jaringan, dengan menggunakan alat *Ultrasonic Homogenizer*. Bursa ayam yang telah dipanen dan disimpan pada -80°C , ditambah PZ steril 2 ml dan diletakkan didalam tabung, kemudian dilakukan sonikasi dengan *Ultrasonic Homogenizer* dengan output sebesar 30 % dengan metode 5 1 5 1 5 1 5 1 5, yaitu 5 menit proses dan 1 menit berhenti.

3.3.4. SDSPAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gels Electrophoresis*)

SDS adalah salah satu cara yang digunakan untuk memisahkan protein. Pemisahan dengan menggunakan SDS (*Sodium Dodecyl Sulfat*) yaitu suatu detergen bermuatan negatif yang dapat mengikat protein. Dengan SDS-PAGE protein penyusun virus dapat dipisahkan dalam pita terpisah sesuai dengan berat molekul dengan elektrophoresis gel poliakrilamide (SDS-PAGE) (Davis. *et al.*, 1994).

Selama elektroforesis, SDS dan protein kompleks berpisah melalui poliakrilamide gel. Protein yang kecil bergerak melalui pori gel dengan lebih mudah dan cepat daripada protein yang besar. Protein yang terpisah terlihat seperti pita (Lodish *et al.*, 1995).

a. Mencetak *Running Gel* 12 %

Langkah awal dari proses ini adalah mencampurkan bahan-bahan *running gel* sampai homogen kemudian dengan cepat memasukkannya ke dalam gelas plate yang telah bersekat dan melakukan fiksasi sedemikian rupa agar hasil *running gel* rata. Untuk meratakan bagian atas *running gel* yaitu dengan cara menambahkan butanol 50% diatas *running gel* kemudian menginkubasi selama 25 menit pada suhu kamar agar *running gel* memadat. Langkah terakhir adalah membuang butanol 50% dan mencuci *running gel* dengan elektroforesis buffer yang sudah diencerkan 10 kali kemudian membersihkan dan mengeringkan *running gel* dengan kertas filter.

b. Mencetak *stacking gel* 12 %

Seperti cara mencetak *running gel*, setelah bahan *stacking gel* tercampur menjadi satu dan homogen, kemudian menuangkannya pada cetakan *running gel*, dan memasukkan *comb*. Inkubasi selama 25 menit pada suhu kamar sampai *stacking gel* padat. Langkah akhir yaitu melepaskan *comb* dan membersihkan serta mencuci *stacking gel*.

c. Menyiapkan sampel

Dimulai dengan mencampur hasil sonikasi bursa dari masing-masing sampel sebanyak 20 μ l, dan laemmli buffer (indikator warna) sebanyak 10 μ l kedalam tabung

ependorf yang tutupnya sudah berlubang. Langkah selanjutnya dilakukan denaturasi protein dengan cara memanaskan campuran tersebut pada suhu 100 °C selama 5 menit.

d. Elektrophoresis

Diawali dengan memasang gelas plate pada elektrophoresis (sebelumnya sekatnya dilepas) dan memfiksasi gelas plate dengan baik. Langkah berikutnya adalah menuangkan sampel dan prestained (marker) pada stacking gel, kemudian menyalakan elektrophoresis 125 V, 40 mA. Untuk menghentikan elektrophoresis harus menunggu sampel sampai turun melewati *running gel*.

Hasil elektrophoresis diproses dalam beberapa tahap: tahap pertama mencuci dengan methanol 25 ml dan asam asetat 3,75 ml dalam 71,29 ml aquadest selama 20 menit dengan shaker. Tahap kedua pencucian dengan methanol 2,5 ml ditambah asam asetat 3,75 ml dalam 93,75 ml aquadest selama 30 menit. Tahap ketiga pencucian dengan glutaraldehid 10 % dalam aquadest 100 ml selama 30 menit. Tahap keempat pencucian dengan aquadest 100 ml selama 30 menit sebanyak 3 kali. Tahap kelima memasukkan pewarna silver selama 15 menit. Tahap keenam pencucian dengan aquadest 100 ml selama 2 menit sebanyak 2 kali. Tahap ketujuh memasukkan cairan pengembang warna band selama kurang lebih 5 menit. Setelah itu pewarnaan dihentikan dengan menambah asam asetat 10 %. Tahap kedelapan pencucian dengan aquadest 100 ml selama 2 menit sebanyak 2 kali. Tahap terakhir meletakkan gel dalam larutan 10 % gliserol dalam 100 ml aquadest agar tidak rusak.

Semua tahapan diatas selalu dilakukan diatas shaker dengan kecepatan 42 getaran/detik dan diakhiri dengan membuang cairan.

e. Pembacaan hasil SDS-PAGE

SDS-PAGE merupakan salah satu metode yang digunakan untuk memisahkan protein. Protein terpisah menjadi pita-pita berdasarkan berat molekulnya. Menurut Rantam (2003) berat molekul protein-protein tersebut dapat dicari dengan menghitung nilai RF (*Retardiation Faktor*) dari masing-masing pita (band) dengan rumus :

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

$$Y = a + bx + cx^2$$

Keterangan : Y = log dari berat molekul

x = Rf sampel

a, b, c = koefisien

3.3.5. Western Blot

Western blot adalah suatu analisa yang dapat digunakan untuk mendeteksi secara simultan antibodi terhadap beberapa protein atau virus tertentu. Langkah awal dari analisa ini adalah pemisahan protein dengan SDS-PAGE, kemudian protein-protein itu dialihkan secara elektroforetik (blotted) ke dalam membran nitroselulosa. Hasil pengalihan protein ke membran nitriselulosa direaksikan dengan antibodi poliklonal dari kelinci (antibodi I) dan konjugat fragmen Ig G α (anti) kelinci berlabel

enzim alkalin phosphatase (antibodi II). Untuk menunjukkan protein yang dapat berikatan dengan antibodi I dan II dilakukan penggoyangan dalam larutan substrat dalam ruang gelap.

a. Semi dry elektrophoresis

Pertama-tama hasil SDS-PAGE tanpa dilakukan pencucian dan pewarnaan, ditransfer ke membran nitroselulosa. Cara mentransfer dilakukan dalam beberapa tahap. Tahap pertama yaitu dengan memotong kertas filter dan membran nitroselulose sama besar dengan gel, kemudian merendamnya selama kurang lebih 15menit dalam transfer buffer. Tahap kedua pada anode elektrobloting transfer apparatus diletakkan secara berturut-turut 5 lembar kertas watman yang telah dibasahi dengan transfer bufer, membran nitroselulose, gel hasil SDS-PAGE dan 5 lembar kertas watman. Setelah tersusun rapi dan dipastikan tidak ada gelembung udara, dilanjutkan dengan memasang katode dan menghubungkannya dengan aliran listrik (dengan voltage kurang lebih 100 V, 45 mA) selama 1-2 jam. Tahap akhir mengambil membran nitroselulose dari alat tersebut dan memasukkannya kedalam transfer buffer.

b. Immunoblotting

Diawali dengan mencuci membran nitroselulosa dengan TBS satu kali dan memindahkannya ke cawan petri baru, dilakukan bloking membran nitroselulose dengan 1 % BSA dalam TBS tween 0,5 % selama semalam pada suhu 4 °C, untuk mengeblok protein yang tidak spesifik. Langkah berikutnya mencuci membran nitroselulose dengan TBS Tween 0,05 % sebanyak 5 kali, masing-masing 10 menit

dengan shaker. Kemudian menambahkan antibodi primer dalam bufer inkubasi dan diinkubasi pada ruang dengan shaker selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan pencucian membran nitroselulosa dengan TBS Tween 0,05 % lima kali, masing-masing selama 10 menit dengan shaker. Tahap berikutnya membran nitroselulose dimasukkan kedalam larutan antibodi II (konjugat) dalam bufer inkubasi, dan diinkubasi pada suhu ruang dengan shaker selama 1 jam dilanjutkan dengan mencuci membran nitroselulose dengan TBS Tween 0,05 % lima kali, masing-masing selama 10 menit dengan shaker. Langkah selanjutnya dengan menambahkan substrat dan diinkubasi pada suhu kamar dalam ruang gelap dengan penggoyangan sampai terlihat warna (hasil). Setelah terlihat hasilnya, reaksi dihentikan dengan memindahkan membran nitroselulosa kadalam aquabidest non deionized. Kemudian membran nitroselulose dikeringkan pada suhu ruang. Hasil proses ini sudah dapat digunakan untuk menentukan protein imunogenik dan spesifik. Semua proses diatas dilakukan diatas alat shaker dengan kecepatan 42 getaran/detik dan selalu diakhiri dengan membuang cairan.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Hasil SDS-PAGE 12% menunjukkan adanya pita protein yang terekspresi dalam berat molekul (kDa) seperti ditunjukkan pada tabel 4.1. dan tabel 4.2.

4.1 Tabel Berat Molekul Hasil SDS-PAGE 12 pada Gel I.

Kolom	Berat Molekul (kDa)						
I	17	29	33	42	60	70	91
II	17	29	33	42	60	70	91
III	17	55	60	70			
IV	17	29	33	42	60	70	91
V	17	29	33	42	60	70	91
VI	17	55	60	70			
VII	17	29	33	42	60	70	91
VIII	17	29	33	42	60	70	91

Keterangan :

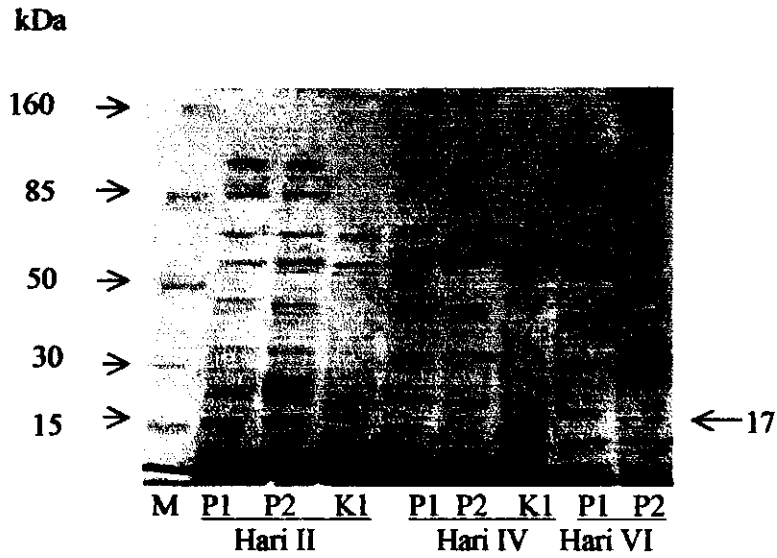
- kolom I & II : bursa perlakuan , pengambilan ke-1 hari ke-2 post infeksi (P1 & P2, Hr-II)
- kolom III : bursa kontrol, pengambilan ke-1 hari ke-2 post infeksi (K1, Hr II)
- kolom IV & V : bursa perlakuan, pengambilan ke-2 hari ke-4 post infeksi (P1 & P2, Hr IV)
- kolom VI : bursa kontrol, pengambilan ke-2 hari ke-4 post infeksi (K1, Hr IV)
- kolom VII & VIII : bursa perlakuan, pengambilan ke-3 hari ke-6 post infeksi (P1 & P2, Hr VI)

4.2 Tabel Berat Molekul Hasil SDS-PAGE 12% pada Gel II.

Kolom	Berat Molekul (kDa)						
IX	17	55	60	70			
X	17	29	33	42	60	70	91
XI	17	29	33	42	60	70	91
XII	17	55	60	70			
XIII	17	29	33	42	60	70	91
XIV	17	29	33	42	60	70	91
XV	17	55	60	70			

Keterangan :

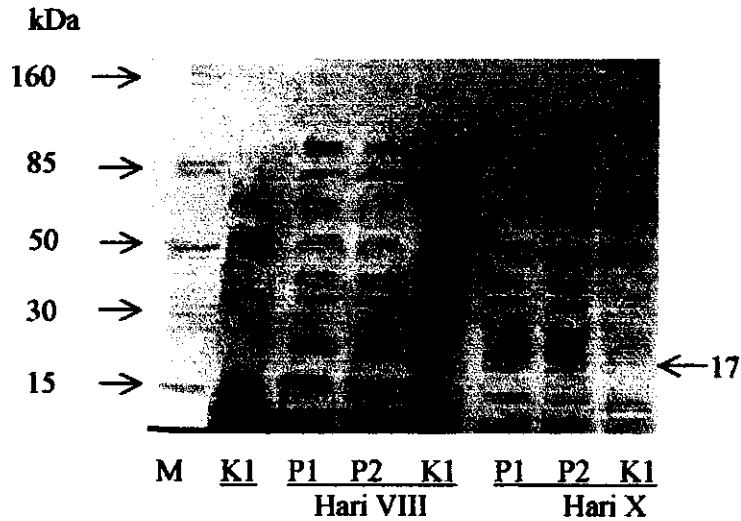
- kolom IX : bursa kontrol, pengambilan ke-3 hari ke-6 post infeksi (K1, Hr VI)
- kolom X & XI : bursa perlakuan, pengambilan ke-4 hari ke-8 post infeksi (P1 & P2, Hr VIII)
- kolom XII : bursa kontrol, pengambilan ke-4 hari ke-8 post infeksi (K1, Hr VIII)
- kolom XIII & XIV : bursa perlakuan, pengambilan ke-5 hari ke-10 post infeksi (P1& P2, Hr X)
- kolom XV : bursa kontrol, pengambilan ke-5 hari ke-10 post infeksi (K1, Hr X)



Gambar 4.1. Hasil SDS-PAGE 12% bursa fabrisius ayam pedaging yang diinfeksi virus gumboro pada hari pengambilan ke-2, 4 dan 6 dengan pewarnaan perak nitrat

Keterangan :

- P1, P2, K1 : bursa perlakuan (P1 & P2), kontrol (K1), pengambilan ke-1 hari ke-2 post infeksi Hari II
- P1, P2, K1 : bursa perlakuan (P1 & P2), kontrol (K1), pengambilan ke-2 hari ke-4 post infeksi Hari IV
- P1, P2, K1 : bursa perlakuan (P1 & P2), kontrol (K1), pengambilan ke-3 hari ke-6 post infeksi Hari VI



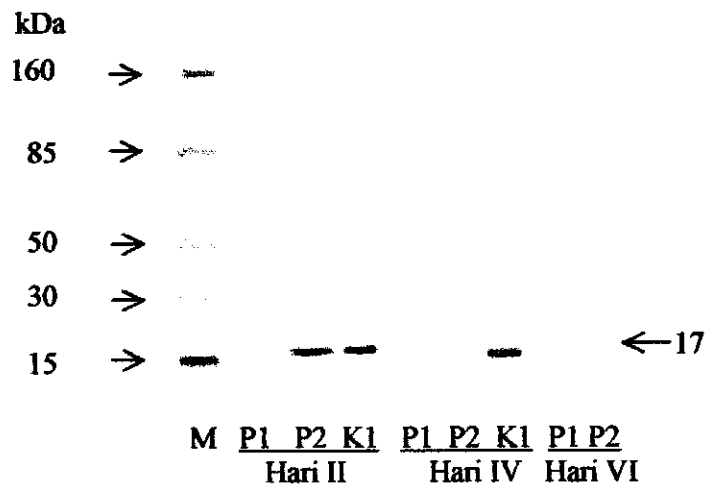
Gambar 4.2 Hasil SDS-PAGE 12 % bursa fabrisius ayam pedaging yang diinfeksi virus gumboro pada hari pengambilan ke-6, 8, dan ke-10 dengan pewarnaan perak nitrat

Keterangan :

P1, P2, K1 : bursa perlakuan (P1 & P2), kontrol (K1), pengambilan ke-4 hari ke-8 post infeksi
Hari VIII

P1, P2, K1 : bursa perlakuan (P1 & P2), kontrol (K1), pengambilan ke-5 hari ke-10 post infeksi
Hari X

Untuk mengetahui protein mana yang merupakan protein inisiator apoptosis, gel SDS PAGE ditransferkan pada membrane nitroselulose dan direaksikan dengan antibodi poliklonal anti *caspase 10*. hasilnya yaitu dapat diamati pada gambar 4.3 dan 4.4,. Dari gambar tersebut dapat diamati adanya band pada berat molekul 17 kDa, dan yang bereaksi positif terhadap antibodi poliklonal anti *caspase 10* adalah kolom 3, 6, 9, 12, dan 15.



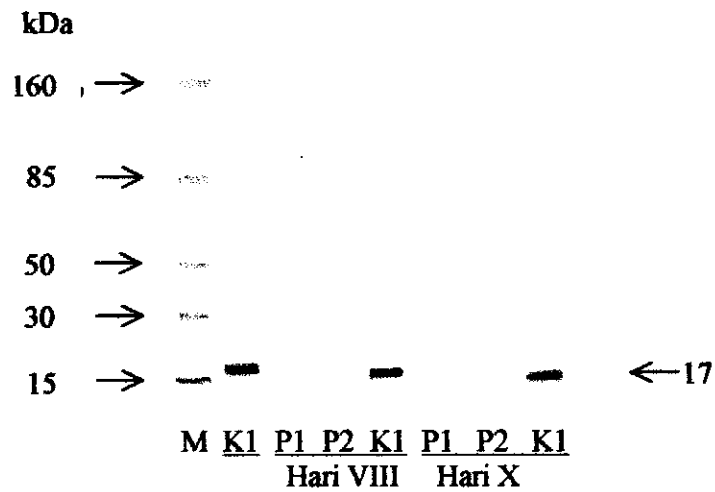
Gambar 4.3 Hasil Immunoblotting bursa fabrisius ayam pedaging yang diinfeksi virus gumboro pada hari pengambilan ke-2, 4, dan ke-6

Keterangan :

P1, P2, K1 : bursa perlakuan (P1 & P2), kontrol (K1), pengambilan ke-1 hari ke-2 post infeksi
Hari II

P1, P2, K1 : bursa perlakuan (P1 & P2), kontrol (K1), pengambilan ke-2 hari ke-4 post infeksi
Hari IV

P1, P2, K1 : bursa perlakuan (P1 & P2), kontrol (K1), pengambilan ke-3 hari ke-6 post infeksi
Hari VI



Gambar 4.4 Hasil Immunobloting bursa fabrisius ayam pedaging yang diinfeksi virus gumboro pada hari pengambilan ke-6, 8, dan ke-10

Keterangan :

P1, P2, K1 : bursa perlakuan (P1 & P2), kontrol (K1), pengambilan ke-4 hari ke-8 post infeksi Hari VIII

P1, P2, K1 : bursa perlakuan (P1 & P2), kontrol (K1), pengambilan ke-5 hari ke-10 post infeksi Hari X

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

Ayam perlakuan dalam penelitian ini diinfeksi dengan virus gumboro secara peroral, intrakloaka, dan intraokular pada umur 21 hari. Secara bertahap tiap-tiap kelompok perlakuan dan kelompok kontrol diambil 5 ekor ayam untuk diambil bursa fabrisiusnya. Tiap-tiap tahap itu adalah hari ke-2, 4, 6, 8, dan 10. Untuk karakterisasi *caspase 10* sebagai protein inisiator apoptosis, diambil secara random masing masing 2 sampel untuk kelompok perlakuan dan 1 sampel untuk kelompok kontrol dari tiap-tiap hari pengambilan.

Untuk mengetahui karakter dari *caspase 10* sebagai protein inisiator apoptosis dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan metode SDS-PAGE, yaitu metode yang digunakan untuk memisahkan molekul-molekul protein berdasarkan berat molekulnya.

Dari pita protein yang terekspresikan dari hasil SDS-PAGE, masing-masing sampel menunjukkan adanya variasi protein berdasarkan berat molekul.

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya protein spesifik berdasarkan berat molekul pada kolom ke-1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, dan 14. Protein-protein tersebut adalah *caspase 10* yang terekspresi dengan berat molekul 17 kDa (Reed,2000), protein virus 1 (VP 1) yang terekspresi dengan berat molekul 91 kDa, protein virus 2 (VP 2) yang terekspresi dengan berat molekul 42 kDa, protein virus 3 (VP 3) yang terekspresi dengan berat molekul 33 kDa, dan protein virus 4 (VP 4) yang

terekspresikan dengan berat molekul 29 kDa. Protein-protein spesifik tersebut hanya diekspresikan oleh bursa ayam setelah diinfeksi virus gumboro baik dari pengambilan pada hari ke-2, ke-4, ke-6, ke-8, dan ke-10. Menurut Muller *et al.*, (1996), setelah virus masuk melalui inhalasi kemudian masuk kedalam saluran pencernaan kemudian mencapai bursa fabrisius 13 jam setelah infeksi dan banyak dipresentasikan ke organ lain. Sedangkan pada kelompok kontrol pada setiap hari pengambilan baik hari ke-2, ke-4, ke-6, ke-8, maupun ke-10 tidak mengespresikan protein-protein spesifik seperti VP 1, VP 2, VP 3, dan VP 4, tetapi *caspase 10* dengan berat molekul 17 kDa terekspresi pada kelompok ini. Hal ini dikarenakan *caspase 10* terdapat pada sitoplasma sel meskipun dalam keadaan normal (Emari, 1997).

Pada hasil SDS-PAGE 12 % dengan pewarnaan perak nitrat mengekspresikan pita protein dengan berat molekul 55 kDa dalam hal ini diduga sebagai bentuk inaktif dari *caspase10*, serta pita protein dengan berat molekul 17 kDa yang merupakan bentuk aktif dari enzim *caspase 10*. hal ini dikarenakan *caspase 10* terdapat pada sitoplasma sel meskipun dalam keadaan normal (Emari, 1997), Menurut Fesik, (2001) proenzim *caspase* tidak sepenuhnya tidak aktif, tetapi mempunyai aktivitas yang sangat lemah (diperkirakan aktivitasnya 1 % dari enzim yang aktif penuh). Melalui interaksi dengan protein lain, enzim ini dapat saling memproses satu sama lain, menghasilkan protease yang aktif penuh. Beberapa pendapat mengatakan bahwa aktivasi *caspase* terjadi secara autoaktivasi, transaktivasi, atau proteolisis oleh protease lain.

Selain dapat diamati adanya protein spesifik, juga dapat diamati adanya protein non spesifik pada setiap kolom baik perlakuan maupun kontrol dengan berat molekul yang beragam.

Untuk mengetahui protein inisiator apoptosis yang imunogenik, yaitu protein (enzim) yang mampu bereaksi dengan antibodi poliklonal anti *caspase 10*, gel SDS-PAGE ditransferkan ke membran nitroselulose yang kemudian direaksikan dengan antibodi poliklonal anti *caspase 10*.

Hasil dari penelitian dengan menggunakan metode *western blot* ini menunjukkan adanya beberapa pita yang terekspresi setelah direaksikan dengan antibodi poliklonal anti *caspase 10*. Beberapa pita tersebut terekspresi pada kolom ke-2, 3, 6, 9, 12, dan 15 dengan berat molekul 17 kDa. Pada perlakuan yaitu kolom ke-2 terbukti bahwa *caspase 10* terdapat pada sel bursa yang sedang mengalami proses apoptosis. Menurut Rautenschein *et al.*, (2002) setelah infeksi virus gumboro terjadi peningkatan jumlah limfosit T untuk regulasi antigen pada fase akut. Limfosit yang aktif ini akan membebaskan granzim yang dapat memicu peningkatan ekspresi *caspase 10*. Dalam proses apoptosis *caspase 10* teraktivasi oleh reaksi proteolitik yang disebabkan oleh adanya infeksi virus, dari bentuk inaktif (proenzim) menjadi 2 subunit yang aktif (Fernandes, Alnemri *et al.*, 1996). *Caspase 10* dalam bentuk aktif ini dapat mengaktifkan proenzim dari *caspase 3* dan *7* menjadi bentuk aktif serta mengaktifkan proses biologis dari enzim-enzim tersebut, sehingga dapat membentuk *caspase* yang aktif dengan berat molekul 85 kDa, yang dapat menyebabkan kematian sel terprogram yang dikenal dengan apoptosis. *Caspase 10* merupakan salah satu dari

caspase inisiator yang terlibat dalam proses kematian sel terprogram, yang disebut dengan apoptosis.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah protein inisiator apoptosis yaitu salah satunya adalah *caspase 10*, terekspresi dengan berat molekul 17 kDa pada metode SDS-PAGE 12 %, dan mampu bereaksi dengan antibodi anti *caspase 10* yang juga terekspresi dengan berat molekul 17 kDa pada metode Immunoblotting.

4.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dalam penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap *caspase* inisiator lainnya pada infeksi virus gumboro.
2. Perlu dilakukan karakterisasi *caspase 10* dengan menggunakan antibodi monoklonal anti *caspase 10*.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang *blocking agent* yang diharapkan mampu mengemblok aktivitas *caspase 10* pada jalur perforin maupun granzim untuk mencegah apoptosis.

RINGKASAN

Novia Yuli Astuti, Karakterisasi *Caspase 10* Sebagai Protein Inisiator Apoptosis Pada Bursa Fabrisius Ayam Pedaging Setelah Diinfeksi Virus Gumboro. Penelitian ini dilaksanakan dibawah bimbingan ibu Ajik Asmijah, Drh, SU, selaku pembimbing pertama dan ibu Nunuk Dyah Retno Lestari, MS, Drh, selaku pembimbing kedua.

Gumboro merupakan penyakit viral yang disebabkan oleh genus Avibirnavirus. Penyakit ini menyerang unggas dengan umur 3 - 6 minggu. Penyakit ini bersifat immunosupresif yang ditandai dengan adanya pengrusakan pada prekursor pembentuk antibodi sel B yang ada di bursa fabrisius. Karena dampak immunosupresi tersebut penyakit ini mengakibatkan kerugian dibidang ekonomi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi *caspase 10* protein inisiator apoptosis pada bursa fabrisius yang telah diinfeksi dengan virus gumboro, berdasarkan berat molekul dengan menggunakan metode SDS-PAGE dan adanya reaksi positif dengan antibodi protein inisiator dengan menggunakan metode immunoblotting.

Hewan coba ayam pedaging umur 3 minggu sebanyak 50 ekor. Untuk perlakuan 25 ekor ayam diinfeksi virus gumboro dengan dosis 1000 EID50 secara peroral. Intraokuler, dan intrakloaka, dan 25 ekor lainnya sebagai kontrol. Ayam yang telah diinfeksi dipanen dipanen bursanya pada hari ke-2, 4, 6, 8, dan 10 setelah infeksi, sebanyak masing-masing 5 ekor ayam perlakuan dan kontrol. Bursanya

disonikasi dan kemudian diuji dengan metode SDS-PAGE 12 % dengan pewarnaan perak nitrat untuk mengetahui masing-masing berat molekul dari protein tersebut. Kemudian dilanjutkan dengan metode imunobloting untuk mengetahui adanya reaksi positif terhadap antibodi anti protein inisiator apoptosis.

Hasil penelitian menunjukkan adanya ekspresi *caspase 10* pada gel SDS-PAGE disamping protein-protein lain seperti VP1, VP2, VP3, dan VP4. Pada SDS-PAGE *caspase 10* terekspresi dengan berat molekul 17 kDa, yaitu subunit besar dari *caspase 10*. Pada imunobloting *caspase* terekspresi dengan berat molekul 17 kDa pada kolom II, III, VI, IX, XII, dan XV. Dalam hal ini *caspase* juga terekspresi pada kelompok kontrol karena secara normal *caspase* berada di dalam sitoplasma sel hewan.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah *caspase* terekspresi dengan berat molekul 17 kDa pada gel SDS-PAGE, dan dengan metode Imunobloting *caspase* mampu bereaksi dengan antibodi anti *caspase 10* yang terekspresi dengan berat molekul 17 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, K.A., Litchman, A.H., Pober, J.S., 2000. *Cellular and Molecular Immunology 4th ed.* WB Saunder Company A. Harcourt Health Sciences Company Philadelphia London. New York. St Louis. Sydney. Toronto
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1989. *Molecular Biology of the cell, 2nd edition.* New York, London: Garland Publishing, Inc. PP. 1192
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1989. *Molecular Biology of the Cell, 3rd ed.* New York: Garland Publishing, Inc. Blink, E
- Alnemri, E.S., Livingstone, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry N.A., Wong, W.W., Yuan J.L. 1996. *In Vitro Activation of cyp 32 and Mhc3 by Mhc4, A Novel Human Apoptotic Cysteine Protease Containing Two FADD-like Domains.* Proceedings of the National Academy of Science (USA) 93:7464-9
- Atkinson, E.A., Barry, M., Darmon, A.J., Shostak, I, Turner, P.C., Moyer, R.W., Bleakley, R.C. 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
- Becth, H, and Muller, H.K., 1998. *Comparative Studies on Structural and Antigenic Properties of Two Serotype of Infectious Bursal Disease Virus.* J. Gen. Virol. 69: 631-640
- Betch, H, and Muller, H.K. 1991. *Infectious Bursal Disease- a B Cell Dependent Immunodeficiency Syndrome in Chickens.* Behring Institute Mitteilungen. 89:217-225
- Darminto P., Ronoharjo dan L.Perede. 1985. *Studi Penyakit Gumboro di Indonesia : Isolasi dan identifikasi Agen Penyakit-Penyakit Hewan*
- Davis, L., M. Kuehl and Battey. 1994. *Basic Molecular In Biology.* Apleton. And Lange Press. Connecticut. 616-689

- Emari, M., Sakahira, H., Yokohama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. 1998. *A Caspase Activated DNAase That Degradase DNA During apoptosis, and Inhibitor ICAD*, J. Natural Japan
- Fesik, S. W. and V. Shi. 2001. *Controlling The Caspases*. Science 294 : 1477-1478
- Goldsby, A.R., Kindt, T.J., and Osborne, B.A. 2000. *Kuby Immunology*. W H Freeman and Company. New York
- Gordon, R.F., Jordon. 1980. *Infectious Bursitis In Poultry Disease*. Bailliere Tindal, London. 117-125
- Inoue, M., Fakuda, M., & Miyano, K. 1994. *Thymic Lesion in Chicken Infected With Infectious Bursal Disease Virus*. Avian Disease 38:839-846
- Jackwood, D.J., Y.M. Saif, P.D. Moorhead. 1985. *Immunogenecity and Antigenecity of Infectious Bursal Disease Virus Serotype I and II in Chickens*. Avian J. 29:1184-1196
- Jeneway, Charles, A.Jr., Paul Travers, Mark Walpot, and J. Donald Capra. 1999. *Immunobiology : The Immune System in Health and Disease, 4th ed*. London : Elsevier Science
- Kibenge, F.S., Dhillon, A.S., Russel, R.G. 1988. *Biochemistry and immunology of Infectious Bursal Disease Virus*. J Gen Virol 69:1757
- Kuby, 2000. *Immunology, 4th edition*, W.H. Freeman and Company, New York, P.351-362
- Lam, K.M. 1997. *Morphological Evidence of Apoptosis in Chicken Invected With Infectious Bursal Disease Virus*. Journal of Comparative Pathology. 116,367-377
- Lingner, 1997. *Reverse Transcriptase Motifs in the Catalitic Subunit of Telomerase*, Science, April, 276:561-566
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S.C. Zipusky, P. Matsudaria and Darnel. 1995. *Molecular Cell Biologi*. 3th Edition. Scientific American Book. New York
- Lukert, P.D., and Y.M. Saif. 1991. *Infectious Bursal Disease*. Ames, Iowa; Iowa State university Prees

- Muller, H., Scholtisek, C. & Becht, H. 1979. *The Genome of Infectious Bursal Disease Virus Consist of Two Segment of Double Stranded RNA*. Journal of Virology. 31, 584-589
- Murakami, J., Nagai, N., Ohana, K., Tahara, H., Ide, T. 1987. *Telomerase Activity in Ovarian Tumors*. J. Cancer, Sept 80 (6):1085-1092
- Neiper, H., Tiefke, J.P., Jungman, A., Lohr, C.V., & Muller, H. 1999. *Infected and Apoptotic Cells in the IBDV-infected Bursa of Fabricius, Studied by double-labeling techniques*. Avian Pathology. 28,279-285
- Ojeda, F., Sakardova, I., Guarda, M.L., Ulloa, J. & Folch, H. 1997. *Proliferation and Apoptosis in Infection with Infectious Bursal Disease Virus: a Cytometric Study*. Avian Disease 41, 312-316
- Parede, L. 1993. Laporan Proyek hasil Penelitian Virus dan Penyakit Gumboro. Kerjasama Balivet dan P4N Badan Litbang pertanian
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya. 145-155
- Rautenschlein, S., Yeh, Y.H., Njengah, M.K., Sharma, J.M. 2000. *Role of Intra Bursal T Cells in Infectious Bursa Disease (IBDV) Infection: T cells Promote Viral Clearance but Delay Follicular Recovery*. Arch Virol 2002; 147(2):825-304
- Reed, C.J. 2000. *Mechanism of Apoptotic*. American Journal of Pathology vol. 1415-1430
- Ressang, A. A. 1984. Patologi Veteriner Edisi II. Institute Pertanian Bogor. Hal 610-611
- Retno, dkk. 1998. Penyakit-Penyakit Penting pada Ayam. Halaman 21-24
- Saif, Y.M. 1991. *Immunosuppression Induced by Infectious Bursal Disease Virus*. Veterinary Immunology an Immunopathology. 30:45-50. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam
- Sparger, D., Raju, K., Rabinovich, B., & Miller, R. 1999. *A Role for Perforin in Activation-Induced T.cell Death in Vivo: Increase Expansion of Allogenic Perforin-Deficient T Cells in SCID mice*. The Journal of Immunology 162(2): 1192-9

- Tanimura, N. & Sharma, J.M. 1998. *In-situ Apoptosis in Chicken Infected with Infectious Bursal Disease Virus*. *Journal of Comparison Pathology*. 112,327-338
- Taylor, R.S., Ramirez, R.D., Ogoshi, M., Chaffins, M., Piatyzek, M.A., Shay, J.W. 1996. *Detection of Telomerase Activity in Malignant and Non Malignant Skin Conditions*. *J. Invest Dermatol*. April. 106: 4759-4765
- Thompson, C.B., 1995. *Apoptosis in Pathogenesis and Treatment of Disease*. *Science* vol 267: 1445-1448
- Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik. 1998. *Caspase Enemies Whithin* : *Science* 281 : 1312-1316
- Tizard, I. 1998. *Pengantar Immunologi Veteriner* , Edisi 2. AUP Surabaya
- Vasconcellos, A.C., & Lam, K.M., 1995. *Apoptosis in Chicken Embryo Induced by the Infectious Bursal Disease Virus*. *Journal of Comparison Pathology*. 112, 327-338
- Wang J. et al. *Caspase 10 is an Inhibitor Caspase in Dheath Receptor Signaling*. *Proceedings of The National Academy of Science (USA)* 98 : 13884-13888 (2001)
- Weisman, J., and S.B. Hitchner. 1985. *Infectious Bursal Disease virus Infectious Attempts in Turkey an Coturnix Quaiz*. *Avian Disease*. 22: 604-608
- Zakian, V.A. 1995. *Telomerase : Beginning to Understand the End*. *J. Science*, 270: 1601-1606

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1

Penentuan Berat Molekul pada protein berdasarkan pita protein yang terbentuk menggunakan rumus :

$$R_f = d/l$$

Keterangan : R_f = Retardation Faktor

d = Jarak pergerakan protein dari tempat awal

L = Jarak pergerakan warna dari tempat awal = 68 mm

Marker

1. Protein 160 kDa $\longrightarrow R_f = 3/68 = 0,04$
2. Protein 85 kDa $\longrightarrow R_f = 19/68 = 0,27$
3. Protein 50 kDa $\longrightarrow R_f = 35/68 = 0,51$
4. Protein 30 kDa $\longrightarrow R_f = 49/68 = 0,72$
5. Protein 15 kDa $\longrightarrow R_f = 60/68 = 0,88$

Dari data yang didapatkan dari marker, selanjutnya nilai R_f dan log berat molekul dimasukkan ke dalam persamaan kuadrat (Sudjana, 2001), dengan rumus :

$$Y = a + bx + cx^2$$

Keterangan : Y = berat molekul sampel

x = R_f sampel

a, b, c = koefisien

Sehingga didapatkan persamaan yaitu :

$$Y = 5,2489 - 0,9609x - 0,2631x^2$$

Y = log dari berat molekul protein marker

$x = R_f$ marker

a. Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada Kolom I

- $R_f = 19/68 = 0,28 \longrightarrow 91 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 4}$
- $R_f = 25/68 = 0,37 \longrightarrow 72 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 59 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 38/68 = 0,55 \longrightarrow 42 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 3}$
- $R_f = 44/68 = 0,65 \longrightarrow 33 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 2}$
- $R_f = 47/68 = 0,69 \longrightarrow 29 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 1}$
- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$

b. Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada Kolom II

- $R_f = 19/68 = 0,28 \longrightarrow 91 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 4}$
- $R_f = 25/68 = 0,37 \longrightarrow 72 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 59 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 38/68 = 0,55 \longrightarrow 42 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 3}$
- $R_f = 44/68 = 0,65 \longrightarrow 33 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 2}$
- $R_f = 47/68 = 0,69 \longrightarrow 29 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 1}$
- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$

c. Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada Kolom III

- $R_f = 25/68 = 0,37 \longrightarrow 72 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 59 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 54.7 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10 inaktif}$

- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$

d. Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada Kolom IV

- $R_f = 19/68 = 0,28 \longrightarrow 91 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 4}$
- $R_f = 25/68 = 0,37 \longrightarrow 72 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 59 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 38/68 = 0,55 \longrightarrow 42 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 3}$
- $R_f = 44/68 = 0,65 \longrightarrow 33 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 2}$
- $R_f = 47/68 = 0,69 \longrightarrow 29 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 1}$
- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$

e. Hasil Perhitungan Berat Molekul pada kolom V

- $R_f = 19/68 = 0,28 \longrightarrow 91 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 4}$
- $R_f = 25/68 = 0,37 \longrightarrow 72 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 59 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 38/68 = 0,55 \longrightarrow 42 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 3}$
- $R_f = 44/68 = 0,65 \longrightarrow 33 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 2}$
- $R_f = 47/68 = 0,69 \longrightarrow 29 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 1}$
- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$

f. Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada Kolom VI

- $R_f = 25/68 = 0,37 \longrightarrow 72 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 59 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$

- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 54.7 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10 inaktif}$
- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$

g. Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada Kolom VII

- $R_f = 19/68 = 0,28 \longrightarrow 91 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 4}$
- $R_f = 25/68 = 0,37 \longrightarrow 72 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 59 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 38/68 = 0,55 \longrightarrow 42 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 3}$
- $R_f = 44/68 = 0,65 \longrightarrow 33 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 2}$
- $R_f = 47/68 = 0,69 \longrightarrow 29 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 1}$
- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$

h. Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada Kolom VIII

- $R_f = 19/68 = 0,28 \longrightarrow 91 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 4}$
- $R_f = 25/68 = 0,37 \longrightarrow 72 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 59 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 38/68 = 0,55 \longrightarrow 42 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 3}$
- $R_f = 44/68 = 0,65 \longrightarrow 33 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 2}$
- $R_f = 47/68 = 0,69 \longrightarrow 29 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 1}$
- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$

Penentuan Berat Molekul pada protein berdasarkan pita protein yang terbentuk, menggunakan rumus :

$$Rf = d/L$$

Keterangan : Rf = Retardation faktor

d = Jarak Pergerakan Protein

L = Jarak pergerakan warna dari tempat awal = 74 mm

Marker

1. Protein 160 kDa \longrightarrow Rf $3/74 = 0,04$
2. Protein 85 kDa \longrightarrow Rf $20/74 = 0,27$
3. Protein 50 kDa \longrightarrow Rf $40/74 = 0,54$
4. Protein 30 kDa \longrightarrow Rf $52/74 = 0,70$
5. Protein 17 kDa \longrightarrow Rf $67/74 = 0,90$

Dari data yang didapatkan dari marker, selanjutnya nilai Rf dan log berat molekul dimasukkan ke dalam persamaan kuadrat (Sudjana, 2001) dengan rumus :

$$Y = a + bx + cx^2$$

Keterangan : Y = Berat Molekul Sampel

x = Rf sampel

a, b, c = koefisien

sehingga didapatkan persamaan yaitu :

$$Y = 5,2214 - 0,8597x - 0,3696x^2$$

Y = log dari berat molekul

x = Rf marker

a. Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada Kolom IX

- Rf = $25/68 = 0,37$ → 72 kDa → Non Spesifik Protein
- Rf = $30/68 = 0,44$ → 59 kDa → Non Spesifik Protein
- Rf = $35/74 = 0,47$ → 53,9 kDa → Caspase 10 inaktif
- Rf = $58/68 = 0,87$ → 17 kDa → Caspase 10

b. Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada Kolom X

- Rf = $19/68 = 0,28$ → 91 kDa → VP 4
- Rf = $25/68 = 0,37$ → 72 kDa → Non Spesifik Protein
- Rf = $30/68 = 0,44$ → 59 kDa → Non Spesifik Protein
- Rf = $38/68 = 0,55$ → 42 kDa → VP 3
- Rf = $44/68 = 0,65$ → 33 kDa → VP 2
- Rf = $47/68 = 0,69$ → 29 kDa → VP 1
- Rf = $58/68 = 0,87$ → 17 kDa → Caspase 10

c. Hasil Perhitungan Berat molekul Pada Kolom XI

- Rf = $19/68 = 0,28$ → 91 kDa → VP 4
- Rf = $25/68 = 0,37$ → 72 kDa → Non Spesifik Protein
- Rf = $30/68 = 0,44$ → 59 kDa → Non Spesifik Protein
- Rf = $38/68 = 0,55$ → 42 kDa → VP 3

- $R_f = 44/68 = 0,65 \longrightarrow 33 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 2}$
- $R_f = 47/68 = 0,69 \longrightarrow 29 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 1}$
- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$

d. Hasil Perhitungan Berat molekul Pada kolom XII

- $R_f = 25/68 = 0,37 \longrightarrow 72 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 59 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 35/74 = 0,47 \longrightarrow 53,9 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10 inaktif}$
- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$

e. Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada Kolom XIII

- $R_f = 19/68 = 0,28 \longrightarrow 91 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 4}$
- $R_f = 25/68 = 0,37 \longrightarrow 72 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 59 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 38/68 = 0,55 \longrightarrow 42 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 3}$
- $R_f = 44/68 = 0,65 \longrightarrow 33 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 2}$
- $R_f = 47/68 = 0,69 \longrightarrow 29 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 1}$
- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$

f. Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada kolom XIV

- $R_f = 19/68 = 0,28 \longrightarrow 91 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 4}$
- $R_f = 25/68 = 0,37 \longrightarrow 72 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 59 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$

- $R_f = 38/68 = 0,55 \longrightarrow 42 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 3}$
- $R_f = 44/68 = 0,65 \longrightarrow 33 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 2}$
- $R_f = 47/68 = 0,69 \longrightarrow 29 \text{ kDa} \longrightarrow \text{VP 1}$
- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$

g. Hasil Perhitungan Berat Molekul Pada Kolom XV

- $R_f = 25/68 = 0,37 \longrightarrow 72 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 30/68 = 0,44 \longrightarrow 59 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Non Spesifik Protein}$
- $R_f = 35/74 = 0,47 \longrightarrow 53,9 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10 inaktif}$
- $R_f = 58/68 = 0,87 \longrightarrow 17 \text{ kDa} \longrightarrow \text{Caspase 10}$