

SKRIPSI

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



Oleh :

YUDI PRASETYO
SURABAYA-JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

LEMBAR PERSETUJUAN

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

Seminar sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Oleh :

Yudi Prasetyo
NIM. 069812527

Menyetujui,

Komisi Pembimbing



Arimbi, M.kes.,drh

Pembimbing Pertama



Roesno Darsono,drh

Pembimbing Kedua

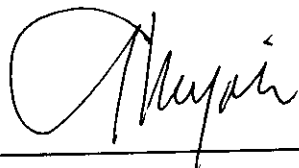
Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, Kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar **SARJANA KEDOKTERAN HEWAN**

Menyetujui
Panitia Penguji,



Jola Rahmahani, M.Kes., drh

Ketua




Ajik Azmijah, S.U., drh

Sekretaris



Arimbi., M.Kes., drh

Anggota



Adi Prijo Rahardjo, drh

Anggota



Roesno Darsono, drh

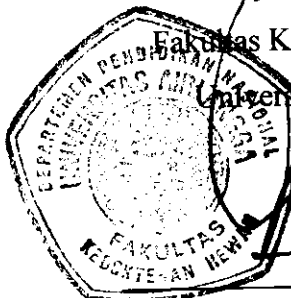
Anggota

Surabaya, 6 Februari 2004

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



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

NIP.130 687 297

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

YUDI PRASETYO

ABSTRAK

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

Hewan coba ayam pedaging sebanyak 50 ekor dengan umur 3 minggu. Perlakuan dengan infeksi virus gumboro digunakan 25 ekor ayam dan 25 ekor lainnya untuk kontrol. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Percobaan Faktorial atau *Univariate Analysis of Variance*. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan Uji Anava dilanjutkan dengan Uji Duncan. Semua perlakuan diinfeksi dengan virus gumboro melalui peroral, intraokuler dan intrakloaka dengan dosis 1000 EID 50, sedangkan kontrol negatif tanpa diberikan perlakuan apapun.

Hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) dari hasil analisis statistik jumlah sel bursa ayam yang mengekspresikan *caspase 10* pada perlakuan dan kontrol. Ekspresi *caspase 10* pada perlakuan dengan rata-rata $61,40 \pm 24,206$, sedangkan kontrol $7,12 \pm 1,468$. Ekspresi *caspase 10* menurut hari, tidak ada perbedaan yang nyata antara hari ke-2, 4, 6 yaitu $44,70 \pm 38,286$, $42,80 \pm 36,563$, $41,90 \pm 38,777$. Berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) antara hari ke-2, 4, 6 dengan hari ke 8 dan 10 yaitu $28,60 \pm 22,046$ dan $13,30 \pm 10,177$. Terjadi interaksi yang sangat nyata ($p < 0,01$) pada 10 perlakuan kombinasi atau perlakuan faktorial.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah *Caspase 10*, yang merupakan *caspase* inisiator terjadinya apoptosis, mengalami peningkatan ekspresi pada bursa fabrisius ayam pedaging yang dilihat dari pemeriksaan mikroskopis pada pembesaran 400 x dengan pewarnaan imunohistokimia..

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan rahmat dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan ini sebagai tugas akhir. Naskah tugas akhir ini dibuat untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Penyakit Gumboro merupakan penyakit yang sering terjadi pada unggas dan menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar. Virus Gumboro merupakan penyebab penyakit ini dan sangat immunosupresif sehingga menimbulkan kegagalan vaksinasi serta kematian akibat infeksi sekunder. *Caspase 10* merupakan enzim yang normal terdapat pada tubuh dan mempunyai peranan yang sangat penting untuk memulai proses apoptosis. Apoptosis merupakan proses kematian sel terutama pada sel bursa ayam selain pada timus, limpa, dan hati.. Sel bursa sangat berperan penting pada pembentukan antibodi. Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar molekuler untuk menanggulangi penyakit gumboro dengan pembuatan *blocking agent*.

Dengan penuh rasa hormat, Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Ibu Arimbi, drh, M.Kes selaku pembimbing pertama dan Bapak Roesno Darsono, drh selaku pembimbing kedua yang selalu bersedia dan memberikan dukungan, saran dan nasihat yang sangat berguna dalam penyusunan tugas akhir ini.

Demikian pula penulis menyampaikan rasa terima kasih Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh selaku Dekan Fakultas Universitas Airlangga; Ibu Ajik Azmiyah, SU., drh, selaku ketua peneliti Proyek Due-Like untuk penelitian ini; Ibu Hani Plumeriastuti, M.Kcs.,drh; Bapak Bambang drh, Bapak Iwan Syahrial,M.Si., drh, atas saran-saran dan bantuannya.

Tak lupa penulis juga menyampaikan rasa terima kasih kepada Ayahanda Suratno Ibunda Mujirah, Widodo, Masrifah, Ririn Setyorini atas kasih sayang, doa dan dorongan semangatnya sehingga penyusunan tugas akhir ini dapat terselesaikan. Untuk rekan-rekan Novia Astuti, Laili, Ari, Edi, Heru, Bagus, Tatang atas bantuannya.

Walaupun penulis telah berusaha sebaik mungkin dalam mewujudkan penulisan tugas akhir ini sesempurna mungkin, namun penulis menyadari bahwa penulisan ini jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan dan menerima segala bentuk kritik, saran yang sangat berguna bagi penyempurnaan lebih lanjut, agar kelak tulisan ini dapat dimanfaatkan oleh pihak-pihak yang membutuhkan.

Surabaya, Februari 2004

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Landasan Teori.....	3
1.4 Tujuan.....	4
1.5 Manfaat.....	5
1.6 Hipotesis.....	5
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Virus Gumboro.....	6
II.2 Mekanisme Respon Imun Terhadap Virus.....	7
II.3 Famili <i>Caspase</i>	9
II.5 <i>Caspase 10</i>	12
II.6 Jalur Perforin/Granzim.....	13
II.7 Apoptosis.....	14
 BAB III MATERI DAN METODE	
III.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	16
III.2 Bahan dan Materi Penelitian.....	16
III.2.1 Hewan Coba.....	16

III.2.2 Unit Analisis.....	16
III.2.3 Virus Gumboro.....	16
III.2.4 Alat dan Perlengkapan Penelitian	17
III.2.5 Bahan.....	17
III.3 Metode Penelitian.....	18
III.4 Peubah yang Diamati.....	18
III.5 Rancangan Penelitian dan Analisis Data.....	19
BAB IV HASIL PENELITIAN.....	20
BAB V PEMBAHASAN.....	29
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
RINGKASAN.....	35
DAFTAR PUSTAKA.....	37
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Jumlah <i>caspase 10</i> pada masing-masing perlakuan dan kontrol.....	20
Tabel 4.2 Hasil analisis statistika menurut kombinasi hari x perlakuan dari jumlah sel bursa yang mengekspresikan <i>caspase 10</i> pada infeksi virus gumboro	21
Tabel 4.3 Hasil analisis statistika jumlah sel bursa ayam yang mengekspresikan <i>caspase 10</i> pada infeksi virus gumboro pada hari ke-2, 4, 6,8, 10.....	22
Tabel 4.4 Hasil analisis jumlah sel bursa ayam yang mengekspresikan virus gumboro pada perlakuan dan kontrol.....	23

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Jenis, fungsi dan struktur <i>caspase</i>	11
Gambar 2.2 Apoptosis melalui interaksi fas-fas ligand dan jalur perforin/granzim.....	14
Gambar 4.1 Sel bursa dengan kandungan <i>caspase 10</i> dalam sitoplasma pada kelompok kontrol (perbesaran 400 x, pewarnaan imunohistokinma).....	24
Gambar 4.2 Ekspresi <i>caspase 10</i> pada bursa kelompok perlakuan hari keempat setelah infeksi virus gumboro (perbesaran 400 x, pewarnaan imunohistokimia).....	25
Gambar 4.3 Bursa pada kelompok kontrol dengan folikel limfoid yang masih penuh (perbesaran 400 x, pewarnaan imunohistokimia).....	26
Gambar 4.4 Ekspresi <i>caspase 10</i> pada bursa kelompok perlakuan hari kesepuluh setelah infeksi virus gumboro (perbesaran 400 x, pewarnaan imunohistokimia).....	27
Gambar 4.5 Ekspresi <i>caspase 10</i> pada bursa kelompok kontrol hari kesepuluh setelah infeksi virus gumboro (perbesaran 400 x, pewarnaan imunohistokimia).....	28
Gambar 5.1 Apoptosis sel terinfeksi virus melalui stimulasi CTL.....	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1: Pengamatan jumlah <i>caspase 10</i>	
secara mikroskopis.....	42
Lampiran 2: Univariate Analysis of Variance.....	45
Lampiran 3: Test of Between Subjects Effects.....	46
Lampiran 4: <i>Poc Hoc Test</i>.....	47
Lampiran 5: Perlakuan kombinasi hari x perlakuan.....	48
Lampiran 6: Cara kerja pewarnaan imunohistokimia	
pada <i>caspase 10</i>	49

BAB I
PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit Gumboro disebut juga *infectious avian nephrosis*, *infectious bursal disease* (IBD), merupakan penyakit infeksi pada unggas yang ditemukan di seluruh dunia dan disebabkan oleh virus (Retno dkk, 1998). Faktor predisposisi dari penyakit ini adalah umur ayam dan umur ini berhubungan erat dengan ada dan tidaknya bagian-bagian fungsional dari bursa fabrisius (Ressang, 1984). Sifat dari penyakit ini akut, sangat menular dan immunosupresif. Angka morbiditasnya mencapai 100%, sedang angka mortalitasnya berkisar 5-60%. Dan bila disertai dengan infeksi sekunder dapat mengalami peningkatan angka kematian (Becht and Miller, 1991 ; Kibenge *et al*, 1998, Retno dkk, 1998). Mewabahnya penyakit gumboro telah menimbulkan kerugian cukup besar bagi peternak, mulai dari peningkatan biaya produksi hingga kematian pada ayam-ayam yang terserang (Nabib, 1992). Penyakit Gumboro sebenarnya tidak secara langsung menyebabkan kematian pada ayam (Rumawas, 1992). Indonesia pernah terjadi wabah pada tahun 1991 menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar karena penyakit ini dapat menimbulkan gejala klinik dan menyebabkan kematian sampai 60% pada ayam terutama bila diikuti dengan infeksi sekunder. (Parede, 1993).

Virus Gumboro berpotensi sebagai penyebab penyakit komplikasi pada sistem imun, karena sebagai target infeksi virus Gumboro adalah bursa fabrisius.

Selain juga menyerang pada hati, limpa dan ginjal. Bursa fabrisius adalah organ yang bertanggung jawab pada perkembangan sel penghasil antibodi (Arias, *et al.*, 1997; Jungmann, *et al.*, 2001). Ayam merupakan salah satu spesies yang rentan terhadap virus gumboro dengan memperlihatkan gejala klinis dan perubahan patologi yang khas (Partadiredja, 1992) Dilaporkan bahwa ayam ras dari *strain White leghorn* paling peka terhadap virus gumboro dengan gejala klinis yang lebih hebat (Weisman & S. B. Hitchner, 1987). 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)

Beberapa hasil penelitian membuktikan bahwa kontribusi terbesar terjadinya immunosupresi adalah dari pengosongan sel limfoid pada bursa akibat infeksi yang berupa apoptosis. Apoptosis merupakan program kematian sel melalui mekanisme genetik (Thompson, 1995). Apoptosis dapat terjadi karena keterlibatan berbagai perangkat seluler yang disebut perangkat apoptotik. Komponen sentral dari perangkat apoptotik ini adalah suatu kelompok protease sistein yang disebut *caspase* .(Hunot & Flavel, 2001).

Caspase (Cystein Aspartate Specific Protease) adalah kelompok dari protease sistein intraseluler yang berfungsi penting dalam proses inisiasi dan eksekusi dari 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. *Caspase 1, 4, 5* merupakan *caspase* yang terlibat dalam proses inflamasi (Reed, 2000).

Indonesia sampai sekarang belum ditemukan vaksin yang sesuai dengan *strain* yang ada, oleh karena itu masih sering dilaporkan kasus penyakit Gumboro di lapangan, terutama dampak immunosupresinya sehingga menimbulkan kematian yang tinggi akibat rentan terhadap penyakit lain (Dirjen Prod. Ternak, 2002). Alternatif penanggulangan penyakit gumboro selain vaksin perlu diteliti. Penghambatan proses apoptosis pada bursa fabrisius merupakan alternative penanggulangan penyakit gumboro. Komponen sentral dari apoptosis adalah *caspase*. *Caspase 10* adalah *caspase* inisiator terjadinya apoptosis. Ekspresi *caspase 10* pada ayam muda lebih banyak dibanding ayam dewasa (Patrick *et al*, 1999). Saat ini belum dilakukan penelitian tentang seberapa besar peran *caspase 10* pada apoptosis di bursa fabrisius ayam pedaging. Indikasi dari besarnya peran *caspase 10* pada apoptosis dapat dilihat dari peningkatan ekspresi *caspase 10*.

1.2 Perumusan Masalah

Apakah terdapat peningkatan ekspresi *caspase 10* pada bursa fabrisius ayam pedaging setelah diinfeksi virus gumboro.

1.3 Landasan Teori

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 ditentukan 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).

Terjadinya destruksi sel bursa dibutuhkan peran limfosit T (Rautenschlein *et al.*, 2002). Sedangkan menurut Goldsby *et al.*, (2000), limfosit T sitotoksik dan sel NK dapat menimbulkan lisis pada sel target melalui pengeluaran perforin dan granzim. Perforin merupakan enzim yang mampu membentuk celah pada membran sel target sehingga kemudian granzim dapat menerobos masuk untuk melisis sel tersebut (Abbas, 2000). Granzim yang masuk sitoplasma sel target, akan dapat langsung mengaktifasi *caspase 3* atau mengaktifasi *caspase 10*. Aktifasi kaskade *caspase* yang selanjutnya memicu apoptosis.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa setelah infeksi virus gumboro, terdapat peningkatan ekspresi *caspase 10* di bursa fabrisius ayam pedaging.

1.5 Manfaat Penelitian

Mengetahui seberapa besar peran *caspase 10* dalam menginisiasi apoptosis. Manfaat jangka panjangnya sebagai dasar molekuler penanggulangan penyakit gumboro dan pencegahan infeksi sekunder melalui penggunaan *blocking agent*.

1.6 Hipotesis Penelitian

Terdapat peningkatan ekspresi sel bursa fabrisius yang mengekspresikan *caspase 10* setelah diinfeksi virus gumboro.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Virus Gumboro

Virus Gumboro adalah virus yang termasuk famili Birnaviridae yang berukuran kecil, non envelope dengan inti dsRNA, virionnya berbentuk ikosahedral simetris yang terdiri dari 32 kapsomer dengan diameter 60-70 nm (Bayliss *et al.*, 1991). Sifat dari penyakit ini adalah akut, sangat menular dan immunosupresif. Angka morbiditasnya mencapai 100%, sedang angka mortalitasnya berkisar 5-60 %. Penyakit yang disertai dengan infeksi sekunder dapat mengalami peningkatan angka kematian (Becht and Miller, 1991 ; Kibenge *et al.*, 1998; Retno dkk, 1998) Gejala klinis dari penyakit ini adalah diare, anoreksia, ayam gemetar, penurunan pertumbuhan dan produktivitas. Perubahan pasca mati adalah perdarahan-perdarahan dalam jaringan otot paha, dada, limpa dan hati dapat membengkak, sesudah enam hingga delapan hari bursa mengalami atropi (Ressang, 1984) Penularan gumboro dapat terjadi secara mekanis yaitu melalui peralatan, kendaraan, air, pakan dan kotoran. Virus gumboro tahan 122 hari dalam kandang bekas ayam sakit, air, makanan, sedangkan kotoran ayam dari kandang bekas tertular masih menular setelah 52 hari. Virus gumboro tidak dapat ditularkan melalui telur (Rumawas, 1992)

Virus ini jika menginfeksi akan menimbulkan gejala klinis yang menyerang pada anak ayam, sebagai targetnya adalah bursa fabrisius yang sudah berkembang maksimum. (Nielsen *et al.*, 1998). Bursa fabrisius merupakan sumber limfosit B. Fungsi limfosit B adalah memproduksi antibodi (Hiraga

et al., 1994). Umur paling rentan terhadap infeksi virus Gumboro adalah ayam yang berumur 3-6 minggu, (Van den Berg, *et al.*, 2000; Hong, *et al.*, 1998). Virus setelah masuk melalui inhalasi kemudian masuk kedalam saluran pencernaan kemudian mencapai bursa fabrisius melalui aliran darah. Virus dijumpai pada bursa fabrisius 13 jam setelah infeksi dan banyak dipresentasikan pada folikel bursa. Virus ke organ lain jika terjadi replikasi kedua , yang biasanya diikuti kematian hewan tersebut (Muller, *et al.*, 1988). Tingkat keparahan penyakit berhubungan langsung dengan jumlah sel peka yang ada di bursa fabrisius (Berg *et al.*, 1991 ; Nunoya *et al.*, 1992). Infeksi dengan virus virulen yang dilakukan pada ayam yang mengalami bursektomi tidak akan menimbulkan penyakit (Hiraga *et al.*, 1994)

Pencegahan terhadap penyakit Gumboro yang esensial adalah dengan cara vaksinasi. Bahan vaksin yang dipakai sampai sekarang adalah isolat klasik yang berasal dari USA, Eropa atau Cina (OIE, Paris, 1995) Vaksinasi di Indonesia merupakan andalah terhadap penyakit virus, tetapi semenjak adanya *outbreak* pada tahun 1985, vaksin yang ada tidak mampu untuk menetralsisir atau menekan angka kejadian penyakit di Industri perunggasan. Sampai sekarang di Indonesia belum ditemukannya vaksin yang sesuai *strain* yang ada di Indonesia (Dirjen Prod. Ternak, 2002).

2.2 Mekanisme Respon Imun Terhadap Virus

Virus merupakan mikroorganisme obligat (hanya dapat berkembang dalam sel hidup) yang melakukan replikasi di dalam sel dengan menggunakan asam nukleat dan perangkat sistein protein host (Abbas, 2000). Mekanisme respon imun tubuh terhadap sel yang mengandung virus diawali dengan respon virus imun alami, kemudian diikuti respon imun adaptif. Respon imun alami terhadap infeksi virus pertama-tama melalui induksi interferon tipe 1 (Interferon α dan Interferon β) dan aktivasi sel NK. Interferon α dan interferon β dapat menginduksi respon antiviral atau menahan replikasi virus melalui ikatan terhadap reseptor Interferon α dan interferon β . Ikatan Interferon α dan interferon β 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 mekanisme respon imun terhadap infeksi viral (Goldsby, 2000). Mekanisme antiviral adaptif secara umum melibatkan beberapa komponen yang meliputi : CD8+, Cytotoxic T Lymphocyte (CTL), CD4+ atau sel T Helper 1 (TH 1). Sel TH 1 yang teraktivasi menghasilkan sejumlah sitokin yang meliputi IL-2, Interferon γ dan TNF yang berfungsi menahan virus baik secara langsung maupun secara tidak langsung. Interferon γ secara langsung menginduksi keadaan antiviral di dalam sel. IL-2 beraktivitas secara langsung membantu penarikan Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) *precursor* dalam populasi efektor. IL-2 dan Interferon γ mengaktifkan sel NK yang berperan penting dalam pertahanan tubuh selama beberapa hari sampai terbentuk respon Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) spesifik (Goldsby, 2000).

Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) dan sel NK dapat menimbulkan lisis pada sel target melalui pengeluaran perforin dan Granzim. Perforin merupakan enzim yang mampu membentuk celah pada membran sel sehingga kemudian granzim masuk untuk melisis sel tersebut (Abbas, 2000).

Virus gumboro dapat menyebabkan apoptosis pada sel B (Rodernberg *et al.*, 1994). Menurut Nieper *et al* (1999) dan DeHardt *et al* (2000), Kerusakan sel limfoid pada bursa akibat infeksi virus gumboro akan menyebabkan apoptosis pada sel B. Apoptosis pada sel B ini dapat menekan sistem antivirus adaptif (imunosupresif) dan mempermudah infeksi sekunder yang meningkatkan angka kematian pada ayam yang terinfeksi virus gumboro.

2.3 Famili *Caspase*

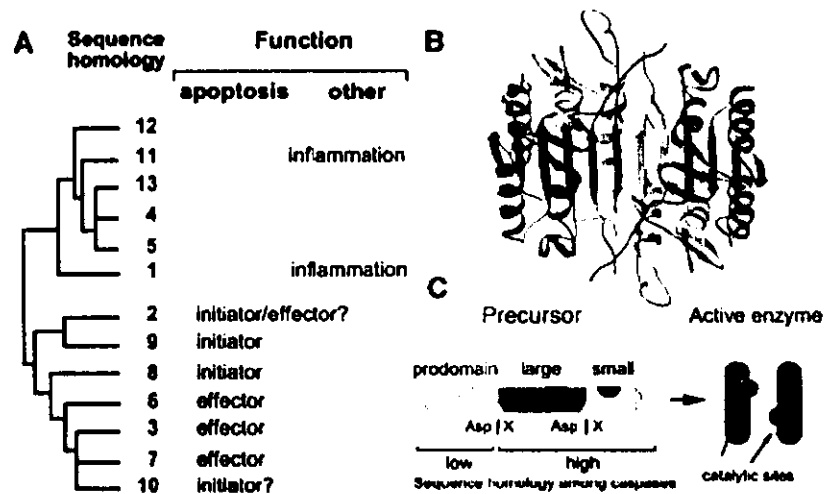
Caspase merupakan singkatan dari *Cystein Aspartyl Specific Protease*. *Caspase* merupakan enzim dengan berat molekul 30-50 kDa, dan berada di sitoplasma semua sel hewan. Lebih spesifik lagi *Caspase* mempunyai daerah prodomain terminal NH₂, sub unit besar (~20 kd) dan subunit (~10 kd) (Reed, 2000).

Caspase termasuk dalam kelompok protease sistein yang berfungsi sebagai eksekutor terakhir dalam sebuah alur khas peristiwa molekuler yang menyebabkan kematian sel terprogram. *Caspase* dibutuhkan untuk melengkapi manifestasi dari morfologi apoptosis dan sangat diperlukan untuk kematian sel terprogram dalam beberapa jaringan, tetapi *caspase* tidak selalu dibutuhkan dan

jalannya apoptosis dapat lebih kompleks dan lebih luas (Hunot and Flavell, 2001)

Caspase 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. *Caspase 1, 4, 5* merupakan *caspase* yang terlibat dalam proses inflamasi (Reed, 2000).

Caspase diimplikasikan dalam apoptosis setelah ditemukannya CED-3 yaitu gen yang dibutuhkan untuk kematian sel dan diproduksi oleh cacing *Caenorhabditis elegans*. CED-3 sesuai dengan *Interleukin 1 β Converting Enzyme* (ICE atau disebut juga *caspase 1*). *Caspase 1* tidak mempunyai peranan yang sangat jelas terhadap kematian sel, tetapi famili protease ini yang pertama kali diidentifikasi peranannya dalam inflamasi dan apoptosis (Thornberry and Lazebnik, 1998).



Gambar 2.1 : Jenis, fungsi dan struktur caspase (Thornbery and Lazebnik, 1998)

Apoptosis pertama kali dipelajari pada nematode *Caenorabditis elegans*. Terdapat 3 gen esensial yang berperan dalam proses apoptosis, yaitu CED-3, CED-4 dan CED-9. CED-3, CED-4 mendorong terjadinya apoptosis, sedangkan CED-9 berfungsi menghambat apoptosis. CED-3 merupakan suatu *caspase* yaitu suatu protein 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 tersebut akan menyebabkan CED-3 teraktivasi sehingga proses apoptosis dimulai. CED-9 dapat menghambat apoptosis karena CED-9 dapat membentuk kompleks dengan CED-4 dan CED-3, sehingga CED-4 tidak dapat mengaktivasi CED-3, sehingga apoptosis dapat dihambat (Adams *et al*, 1998) Pada *caspase* mamalia juga dikenal CED-3, Apaf-1 pada mamalia setara dengan CED-4, sedangkan Bcl-2 identik dengan CED-9 (Ashkenazi and Dixit, 1998).

2.4 Caspase 10

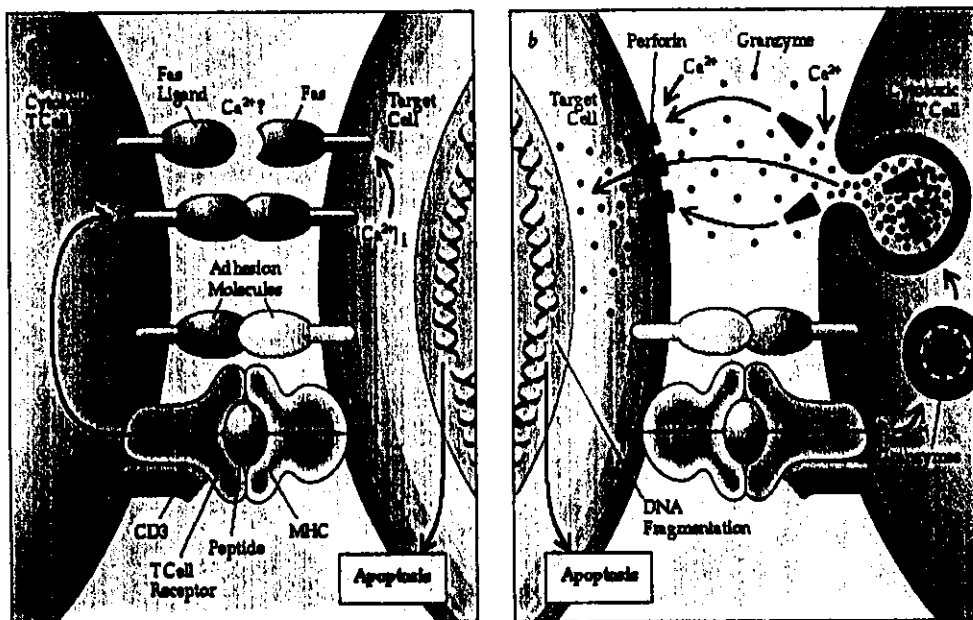
Enzim ini adalah suatu anggota dari suatu famili protein sistein protease yang dikenal sebagai *caspase*. Enzim ini menjadi bagian dari kaskade proteolitik yang berperan pusat di dalam kematian sel oleh apoptosis. *Caspase 10* memerlukan perpecahan proteolitik proenzimnya yang terbentuk ke dalam 2 subunit. Dimerize ini untuk membentuk enzim yang aktif (Alnemri *et al*, 1996). Protein yang aktif membelah format proenzim *caspase 3* dan *caspase 7* ke dalam bentuk yang aktif. Pembelahan *poly ADP ribose polymerase* (PARP) untuk menghasilkan format 85 kD yang mempromosikan kematian sel atau apoptosis. *Caspase 10* berisi DED (*Death Effector Domain*) dan FADD (*Fas Associated Death Domain*), yang mana memungkinkannya untuk saling berhubungan dengan protein lain yang berisi daerah seperti itu . Enzim mengikat . kepada FADD dan sel CD95 dan TNF yang peka rangsangan . *Caspase 10* adalah salah satu *caspase inisiator* yang dilibatkan di dalam pemberian isyarat melalui suatu protein reseptor kematian (Wang *et al*, 1999).

2.5 Jalur Perforin/Granzim

Perforin adalah suatu protein sitotoksik dengan berat 60-kDa (Spaner *et al*. 1999), yang disimpan di dalam granul litik pada permukaan atas dari T sel sitotoksik. Reseptor T sel 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 dari sel target, akan melepaskan muatan granul litiknya melalui suatu kalsium. Granul ini berisi dua kelas yang utama dari efektor protein sitotoksik yaitu perforin dan protease 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 (Spanner *Et al.*, 1999), memproduksi suatu struktur silindris di dalam lemak ganda itu adalah lipofilik pada atas yang di luar dan hidrofili sepanjang pusat cekungannya. Kalsium dan air kemudian mampu masuk sel melalui pori-pori ini, menghancurkan integritas dari membran sel target (Janeway *et al.*, 1999).

Percobaan *in vitro* menunjukkan bahwa perforin membuat lubang-lubang kecil pada permukaan sel B, kemudian granzim masuk memecah dan memfragmentasi DNA menjadi amplop nuklear yang dihubungkan dengan apoptosis (Blink *et al.*, 1999). Lebih secara rinci, granzim diperkenalkan ke dalam sel target dan mengaktifkan *caspase 10* (Goldsby *et al.*, 2000). Kaskade *Caspase* yang secepatnya menuju ke arah pengaktifan *caspase-activatable DNase* (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* penghambat, menahan peristiwa apoptotik ini (Blink *et al.*, 1999).



Gambar 2.2 : a. Apoptosis melalui Interaksi Fas-Fas ligand. b Jalur Perforin/Granzim (Blink *et al*, 1999)

2.6 Apoptosis

Sel dapat mati dengan 2 cara. Pertama, mereka dapat mati karena sebab fisik atau agen-agen kimia atau kerusakan membran, yang menyebabkan nekrosis atau disintegrasi sel. Jaringan yang mati kemudian diambil dan yang didegradasi oleh sel fagosit. Kedua, sel mengalami kematian sel diprogram, yang juga dikenal sebagai apoptosis, di mana DNA itu dipecah ke dalam 200 fragmen pasangan dasar (Janeway *et al.*, 1999). Sel fagosit yang berdekatan memproses sel dengan cepat dan mencegah pelepasan dari muatan sitosol ke dalam ruang ekstraselular. (Alberts *et al.* 1994).

Sel T sitotoksik membunuh sel yang terinfeksi dengan menginduksinya untuk mengalami apoptosis. Dua jalur yang digunakan oleh sel T sitotoksik

adalah jalur kecil perforin atau granzim dan jalur kecil Fas/Fas-L (Spielman *et al.*, 1998).

BAB III

MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Periode penelitian dilaksanakan mulai bulan Agustus 2003 sampai dengan awal bulan Desember 2003 bertempat di : Laboratorium Penyakit Mulut dan Kuku di Pusat Veteranari Farma Jl. Ahmad Yani. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Graha Medik di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

3.2 Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah ayam pedaging umur 21 hari yang diperoleh dari P.T Reza Perkasa Breeding Farm.

3.2.2 Unit analisis

Unit analisis pada penelitian ini adalah jumlah ekspresi *caspase 10* pada bursa fabrisius ayam ras pedaging.

3.2.3 Virus Gumboro

Untuk melakukan penginfeksi pada virus gumboro, digunakan isolat Tasik yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma.

3.2.4 Alat dan Perlengkapan Penelitian

Pinset, Skalpel, Gunting, Bunsen, Mikrotom, Dehidrasi Otomatik, Staining Jar, Oven, Mikroskop, Fotografik Mikroskop, Cover glass, Object glass

3.2.5 Bahan

Formalin 40 %, Alkohol, Xylol, Parafin *Histosec*, Parafin Blok, Aquabides, Antibodi Poliklonal Ayam Anti *Caspase 10*, Film negatif ASA 200

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian ini akan digunakan 50 ekor ayam umur 21 hari sebagai sampel yang kemudian secara random dibagi menjadi 10 kelompok yang terdiri dari 5 kelompok perlakuan dan 5 kelompok kontrol. Untuk mendapatkan infeksi virus Gumboro, 5 kelompok perlakuan diinfeksi dengan virus Gumboro isolat Tasik dari Pusvetma secara intraokular, peroral, dan intrakloaka. Dosisnya adalah 1000 EID 50/ml. Kemudian secara bertahap, unit analisa berupa bursa dari tiap kelompok perlakuan dan kelompok kontrol diambil, yaitu berturut-turut pada hari ke-2, 4, 6, 8, dan 10 setelah infeksi.

Bursa yang diperoleh, diproses menjadi sediaan mikroskopik dan diwarnai dengan teknik imunohistokimia. Pemeriksaan mikroskopis bursa dilakukan untuk mengukur jumlah ekspresi ekspresi *caspase 10*. Untuk pemerciksaan terhadap ekspresi *caspase 10* digunakan antibodi poliklonal anti *caspase 10* (Metode pewarnaan terlampir).

3.4 Peubah yang Diamati

Peningkatan ekspresi *caspase 10* yang diamati secara mikroskopis dari sediaan bursa fabrisius yang diwarnai dengan pewarnaan imunohistokimia. Dengan cara menghitung *caspase 10* dibawah. Penghitungan *caspase 10* pada 5 lapangan pandang, yaitu pada 4 pojok dan 1 di tengah preparat.

3.5 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan yang dipakai pada penelitian ini adalah Percobaan Faktorial atau *Univariate Analysis of Variance*. Penelitian ini memperhatikan ekspresi *caspase 10* pada hari yang berbeda-beda. Data dianalisis dengan uji anava, apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji duncan

BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Hasil pemeriksaan ekspresi *caspase 10* pada sediaan mikroskopis dengan pewarnaan imunohistokimia pada infeksi virus gumboro adalah sebagai berikut :

Tabel 4.1 Jumlah *Caspase 10* pada masing-masing Perlakuan dan Kontrol Setelah Diinfeksi Virus Gumboro

PERLAKUAN			KONTROL		
Hari Ke-	Sampel	Jumlah	Hari Ke-	Sampel	Jumlah
II	1	14	II	1	1
	2	14		2	2
	3	16		3	2
	4	17		4	2
	5	19		5	2
IV	1	16	IV	1	2
	2	18		2	1
	3	14		3	1
	4	14		4	1
	5	15		5	3
VI	1	16	VI	1	1
	2	15		2	2
	3	14		3	1
	4	15		4	1
	5	19		5	1
VIII	1	10	VIII	1	2
	2	11		2	2
	3	11		3	1
	4	10		4	1
	5	8		5	3
X	1	5	X	1	0
	2	5		2	1
	3	3		3	0
	4	4		4	2
	5	5		5	1

Tabel 4.2 : Hasil Analisis Statistik menurut Kombinasi Hari dan Perlakuan dari Ekspresi *Caspase 10* Pada Sel Bursa Setelah Diinfeksi Virus Gumboro

Hari ke-	Kombinasi	Rata-rata \pm Standar Deviasi
II	Kontrol	9,00 ^a \pm 2,646
	Perlakuan	80,40 ^d \pm 10,237
IV	Kontrol	8,60 ^a \pm 4,393
	Perlakuan	77,00 ^d \pm 8,310
VI	Kontrol	5,60 ^a \pm 1,817
	Perlakuan	78,20 ^d \pm 9,257
VIII	Kontrol	8,20 ^a \pm 3,271
	Perlakuan	49,00 ^c \pm 6,519
X	Kontrol	4,20 ^a \pm 3,114
	Perlakuan	22,40 ^b \pm 4,037

Keterangan : a, b, c, d adalah *superscript* yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

Berdasarkan tabel diatas, jumlah ekspresi *caspase 10* tertinggi tampak pada perlakuan hari ke-2 yaitu : 80,40 \pm 10,237 kemudian pada perlakuan hari ke-6 yaitu : 78,20^d \pm 9,257, selanjutnya pada perlakuan hari ke-4 yaitu: 77,00^d \pm 8,310. Ketiga perlakuan diatas, yaitu pada perlakuan hari ke-2, 4, 6 tidak berbeda nyata. Ekspresi *caspase 10* terendah pada kontrol hari ke-10 yaitu: 4,20 \pm 3,114

Tabel 4.3 : Hasil Analisis Statistik ekspresi *Caspase 10* Pada Sel Bursa Fabrisius Ayam Pedaging Pada Hari ke-2, 4, 6, 8, 10 Setelah Diinfeksi Virus Gumboro

Hari ke-	Rataan \pm Standar Deviasi
II	44,70 ^c \pm 38,286
IV	42,80 ^c \pm 36,563
VI	41,90 ^c \pm 38,777
VIII	28,60 ^b \pm 22,046
X	13,30 ^a \pm 10,177

keterangan : a, b, c adalah *superskript* yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

Berdasarkan tabel diatas, tidak ada perbedaan yang nyata antara hari ke2, 4, 6 yaitu: 44,70 \pm 38,286; 42,80 \pm 36,563; 41,90 \pm 38,777. Berbeda sangat nyata antara hari ke-2, 4, 6 dengan hari ke-8 dan 10 yaitu : 28,60^b \pm 22,046; 13,30^a \pm 10,177

Tabel 4.4 : Hasil Analisis Statistik Pada Sel Bursa Fabrisius Ayam Pedaging pada Perlakuan dan Kontrol Setelah Diinfeksi Virus Gumboro

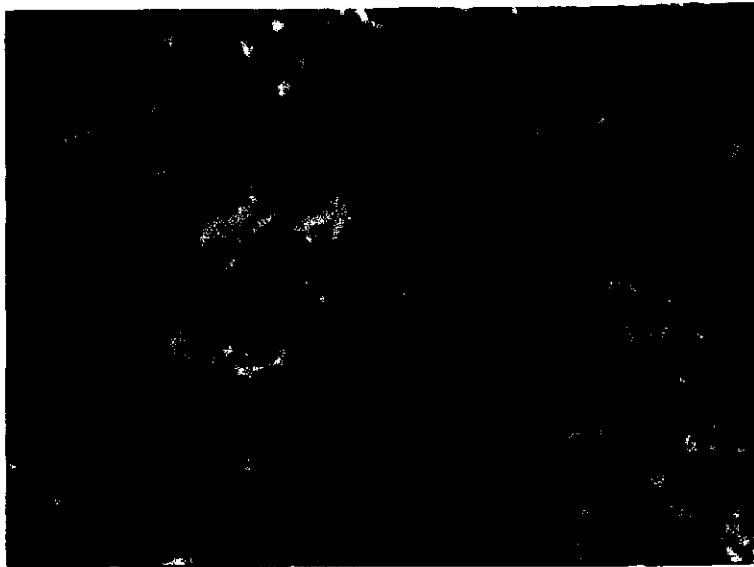
Perlakuan	Rataan \pm Standar Deviasi
Kontrol	7,12 ^a \pm 1,468
Perlakuan	61,40 ^b \pm 24,206

keterangan : a, b, c adalah *superskript* yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

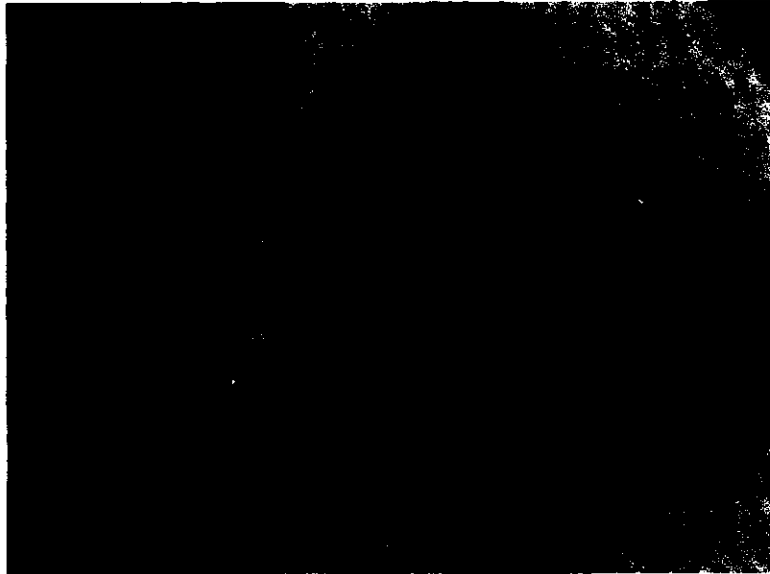
Berdasarkan tabel diatas jumlah ekspresi *caspase 10* yang tertinggi pada perlakuan yaitu: $61,40 \pm 24,206$. Kontrol jauh lebih rendah yaitu: $7,12 \pm 1,468$



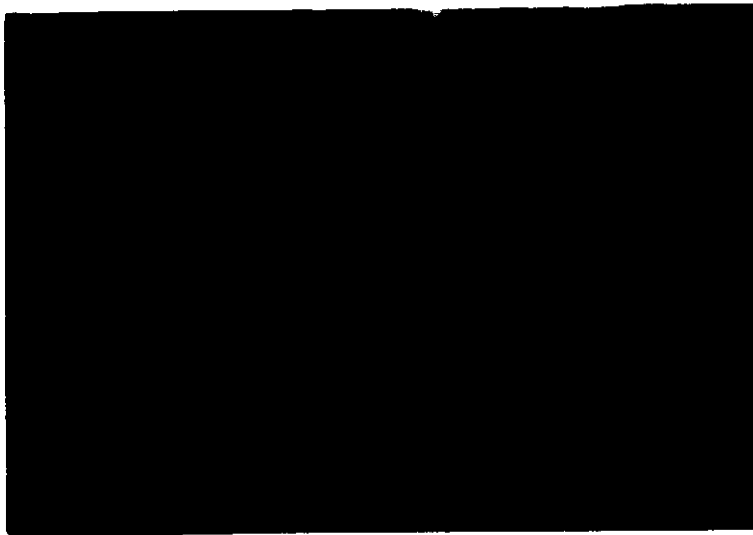
Gambar 4.1 :Sel bursa dengan kandungan *caspase 10* dalam sitoplasma pada kelompok kontrol (Perbesaran 400 x, pewarnaan imunohistokimia)



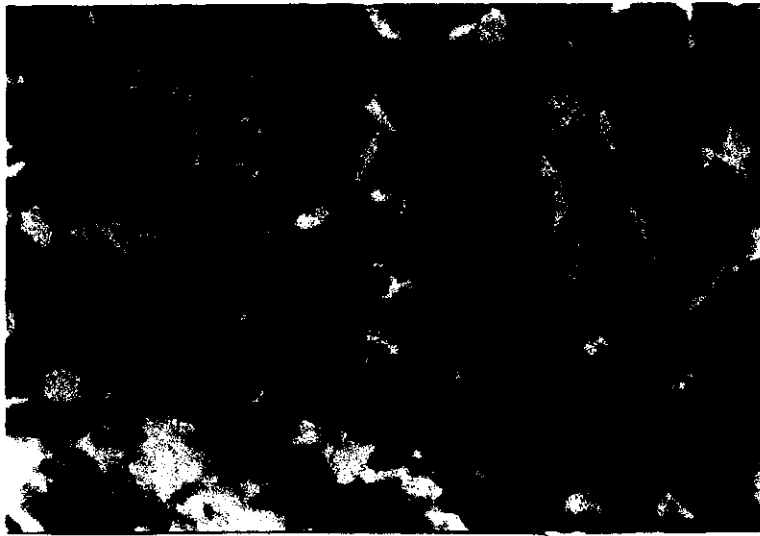
Gambar 4.2 : Ekspresi *caspase 10* pada bursa kelompok perlakuan hari keempat setelah infeksi virus gumboro (Perbesaran 400 x pewarnaan imunohistokimia)



Gambar 4.3 : Bursa pada kelompok kontrol dengan folikel limfoid yang masih penuh (Perbesaran 400 x, pewarnaan imunohistokimia).



Gambar 4.4 :Ekspresi *caspase 10* pada bursa kelompok perlakuan hari kesepuluh setelah infeksi virus gumboro (Perbesaran 400 x dengan pewarnaan imunohistokimia)



Gambar 4.5: Ekspresi caspase 10 pada bursa kelompok kontrol hari kesepuluh setelah infeksi virus gumboro (Perbesaran 400 x dengan pewarnaan imunohistokimia)

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

Dosis virus alam penelitian ini 1000 EID 50, setiap ayam perlakuan difeksi dengan virus gumboro secara peroral, intraokular dan intrakloaka pada umur 3 minggu. Secara bertahap tiap-tiap kelompok perlakuan dan kelompok kontrol diambil 5 ayam untuk diambil bursa fabrisiusnya. Tiap tahap-tahap itu yaitu hari ke-2, 4, 6, 8, 10. Pemeriksaan ekspresi bursa secara mikroskopis dengan pembesaran 400 kali setelah dilakukan pewarnaan imunohistokimia.

Analisa statistika dilakukan dengan dengan *Univariate Analisa of Variance* atau disebut juga Percobaan Faktorial, uji yang dilakukan dengan uji Anava dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasilnya menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) antara kelompok perlakuan dengan infeksi virus gumboro 1000 EID 50/ml terhadap kelompok kontrol, serta adanya perbedaan ekspresi *caspase 10* pada hari yang berbeda.

Penelitian ini menghasilkan 10 perlakuan kombinasi atau perlakuan faktorial, yaitu kombinasi perlakuan dan hari. Paling banyak mengekspresikan *caspase 10* adalah hari ke-2 pada perlakuan yaitu $80,40 \pm 10,237$. Secara berurutan sampai ke yang paling sedikit yaitu; hari ke-6 pada perlakuan yaitu $78,20 \pm 9,257$, hari ke-4 pada perlakuan yaitu $77,00 \pm 8,310$, hari ke-8 pada perlakuan yaitu $49,00 \pm 6,519$, hari ke-10 pada perlakuan yaitu $22,40 \pm 4,037$, hari ke-2 pada kontrol yaitu $9,00^a \pm 2,646$, hari ke-4 pada kontrol yaitu $8,60$

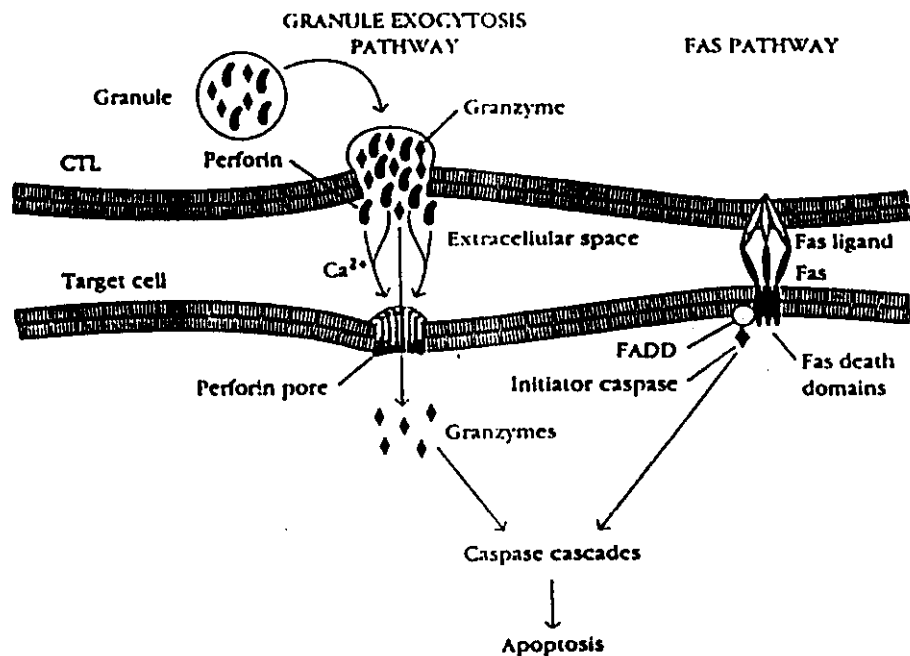
$\pm 4,393$, hari ke-8 pada kontrol yaitu $8,20 \pm 3,271$, hari ke-6 pada kontrol yaitu $5,60 \pm 1,817$, dan hari ke-10 pada kontrol yaitu $4,20 \pm 3,114$.

Ekspresi *caspase 10* yang tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan pada hari ke-2, 4, 6 setelah infeksi pada minggu ke-3, dimana ketiga perlakuan tersebut tidak berbeda nyata. Ke-3 perlakuan kombinasi diatas mengekspresikan *caspase 10* yang tertinggi sebab jumlah sel T yang tertinggi pada 7 hari pertama setelah infeksi virus gumboro (Rautenschlein et al., 2002) Menurut Goldsby et al., (2000), limfosit T sitotoksik dan sel NK dapat menimbulkan lisis pada sel target melalui pengeluaran perforin dan granzim. Perforin merupakan enzim yang mampu membentuk celah pada membran sel target sehingga kemudian granzim dapat menerobos masuk untuk melisis sel tersebut (Abbas, 2000). Akibat adanya infeksi ini akan mempunyai dampak sangat luas, karena efek dari infeksi akan merusak sel-sel imun sehingga akan menyebabkan immunosupresi. Kondisi yang demikian akan mengakibatkan proses pertahanan tubuh menjadi rapuh dan akhirnya berbagai macam penyakit dapat menyerangnya sebagai infeksi sekunder. (Arias, et al., 1997; Jungmann, et al., 2001).

Virus setelah masuk melalui inhalasi kemudian masuk kedalam saluran pencernaan kemudian mencapai bursa fabrisius melalui aliran darah. Virus dijumpai pada bursa fabrisius 13 jam setelah infeksi dan banyak dipresentasikan pada folikel bursa. Virus ke organ lain jika terjadi replikasi kedua, yang biasanya diikuti kematian hewan tersebut (Moeller, et al., 1979). Menurut Rautenschlein, et al (2002), pada hari kelima 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*.

Peran *Caspase 10* pada apoptosis terkait erat dengan aktivasi perforin dan granzim. Sel yang terinfeksi virus, maka virus dikenali oleh APC (*Antigen Presenting Cells*) kemudian dipresentasikan bersama molekul MHC I. Reseptor pada CTL (Cytotoxic T Limfosit) mengenali molekul MHC I yang kemudian CTL (Cytotoxic T Limfosit) melepas granul-granulnya kearah sel target. Dan mengeluarkan perforin dan granzim.. Selain pada CTL (Cytotoxic T Limfosit), granul enzim ini juga terdapat pada sel NK. Granul enzim yang dihasilkan CTL (Cytotoxic T Limfosit) dan sel tersebut bekerja sinergis, perforin membentuk lubang pada membran sel target yang merupakan pintu masuk granzim ke dalam sel target. Granzim masuk ke dalam sitoplasma sel target, granzim menjalankan fungsi *lethal effects* dengan mengaktifkan *proapoptotic cystein protease* (*caspase*) (Brown, 1999). Menurut Atkinson (1998), di dalam sitoplasma sel target, granzim dapat mengalami pembelahan dan mengaktifkan *caspase 3* secara langsung atau melalui *caspase 10*. Melalui kaskade *caspase* akhirnya memicu fragmentasi DNA inti dan terjadi apoptosis.



Gambar 5.1 : Apoptosis sel terinfeksi virus melalui stimulasi CTL (Goldsby, 2000)

Eksresi *caspase 10* ini dapat dijumpai pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, disebabkan antibodi poliklonal anti *caspase 10* yang digunakan pada pewarnaan imunohistokimia mengikat *caspase 10* baik dalam bentuk aktif dan inaktif, sehingga pada kelompok kontrol juga terekspresi pada sel bursa. Menurut Huppertz et al (1999), sampai saat ini teknik imunohistokimia belum dapat digunakan untuk mendeteksi *caspase 10* yang dalam keadaan aktif karena tidak ada antibodi yang khusus hanya mengenali enzim aktif. Namun demikian, bila dibandingkan antara kelompok kontrol dan dan kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,001$).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI. 1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

Caspase 10 mengalami peningkatan ekspresi pada bursa fabrisius ayam pedaging yang dilihat dari pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan imunohistokimia

VI. 2 Saran

Saran yang diberikan pada penelitian ini adalah :

- 1 Perlu diteliti jumlah ekspresi *caspase 10* dengan menggunakan antibodi monoklonal anti *caspase 10*.
- 2 .Perlu diteliti *caspase* inisiator lainnya pada infeksi virus gumboro
- 3 .Perlu diteliti lebih lanjut tentang *blocking agent* yang dapat mengeblok aktifitas *caspase 10* pada jalur perforin/ granzim untuk mencegah apoptosis.

RINGKASAN

Yudi Prasetyo, Peningkatan Ekspresi *Caspase 10* pada Bursa Fabrisius Ayam Pedaging Setelah Diinfeksi Virus Gumboro.

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

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

Berturut-turut mulai hari ke-2, 4, 6, 8, 10 sejak diinfeksi pada umur 3 minggu bursa fabrisius dari 5 ayam perlakuan dan 5 ayam kontrol diambil secara acak. Pemeriksaan secara mikroskopis setelah dilakukan pewarnaan imunohistokimia. Penghitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang pada pembesaran 400 kali.

Hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) dengan perlakuan kombinasi atau perlakuan faktorial antara hari dan perlakuan, dimana terdapat 10 perlakuan kombinasi atau perlakuan faktorial, yang terbanyak pada hari ke-2 pada perlakuan yaitu $80,40 \pm 10,237$. Secara berurutan sampai ke

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, KA, Lichtman, AH, Pober, JS., 2000. Cellular and molecular immunology 4th ed. WB Saunders Company A Harcourt Health Sciences Company Philadelphia London. New York. St Louis. Sydney. Toronto.
- Adler, B., Adler, H., Pfister, H., Jungi, H, and Peterhans, E. 1997. Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus release a factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation induce apoptosis. *J. Virol.* 71: 3255-3258.
- Alnemri *et al.*, 1996, In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic esterase containing two FADD-like domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 93:7464-9
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. 1994. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed: New York: Garland Publishing, Inc., Bink, E.,
- Askandar Tj., Widodo J., Suharono T., 1996. *Pedoman penulisan kedokteran*. Surabaya: Airlangga University Press: 69-95
- Arias, A.F.; Martinez, S. and Rodriguez, J.F, 1997. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *J. Virol.* 71: 8014-8018.
- Atkinson, A: Wu, C.C. and Lin, T.L, 1999. Amplification and cloning of infectious bursal disease virus genomic RNA segment by long and accurate PCR. *J. Virol. Method.* 83: 55-61
- Baratawidjaya, K. G., 2000. *Imunologi Dasar*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 9.
- Bayliss CD, Peters RW, Cook JK, Reece RL, Heine HG, Chapman A, Ward CW, Fahey KJ, 1991. Physicochemical and immunological characterization of the recombinant host-protective antigen (VP2) of infectious bursal disease virus. *Vaccine* 9:715.
- Becht, H.: Müller, H. and Müller, H.K., 1988. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 69: 631-640.

- Becht, H, and Müller, H. 1991. Infectious bursal disease- a B cell dependent immunodeficiency syndrome in chickens, Bhering Institut Mitteilungen 89: 217-225.
- Bellanti, J.,1993. *Imunologi III: Imunosupresi*, Yogyakarta: Gajah Mada University Press, 210-211,
- Bellanti, J.,1993. *Imunologi III: Akibat Penekanan Respon Imun*, Yogyakarta: Gajah Mada University Press, 438-439
- Brown, M.D. and Skinner, M.A., 1996. Coding sequence of both genomic segments of a Europe very virulent infectious Bursal Disease Virus. *Virus Research*. 40: 1-15.
- Brown, M.D.; Green, P. and Skinner, M.A. 1994. VP2 sequences of recent European very virulent isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of classical strains. *J. Gen. Virol.* 75: 675-680.
- Burkhardt E. and Müller, H. 1987. Susceptibility of chicken blood lymphoblast and monocytes to infection bursal disease virus (IBDV). *Arch. Virol.* 94: 297-305.
- Darminto P., Ronohardjo dan L. Pardede. 1985. *Studi Penyakit Gumboro di Indonesia : Isolasi dan Identifikasi Agen Penyakit-Penyakit Hewan.* Xvii : 258-261
- De Herdt, P.; Ducatelle, R.; Uyttebroeck, E.; Snee, A. and Torbeyns, R., 2000. Significance of infectious bursal disease serology in an integrated quality control program under European epidemiologic conditions. *Avian Diseases*, 44:611-617
- Direktor Jenderal Produksi Ternak. 2002. *Keterpaduan Kebijakan Pembangunan sector Peternakan dan Perikanan.* Seminar Nasional Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
- Goldsby, AR, Kindt, TJ, and Osborne, BA, 2000, *Kuby Immunology.* WH Feeman and Company New York.
- Hiraga, M.; Nanoya, T.; Otaki, Y.; Tajima, M.; Saito, T and Nakamura, T.. 1994. Pathogenesis of highly virulence infectious bursal disease virus infection in intact and bursectomized chickens. *J. Vet.Med and Med. Science.* 56: 1057-1063.
- Hunot S and Flavell RA..2001. Death of a Monopoly. *Science* 292 : 865-866

- Hong, J.R.; Lin, T.L.; Hsu, Y.L.; and Wu, J.L., 1998, Apoptosis precedes necrosis of fish cell line with infectious pancreatic necrosis virus infection. *Virology* 250: 76-84.
- Janeway, Charles A. Jr., Paul Travers, Mark Walport, and J. Donald Capra. 1999. *ImmunoBiology: The immune system in health and disease*, 4th ed. London: Elsevier Science,
- Jungmann, A.; Nieper, H. and Müller, 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. *J. Gen. Virol.* 82: 1107-1115.
- Kibenge FS, Dhillon AS, Russell RG. 1988. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* 69:1757.
- Kim I-J, Gagic M, Sharma JM., 1999. Recovery of antibody producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 43:401.
- Kusriningrum, R, 1990. Perancangan Percobaan. Universitas Airlangga, 89-98.
- Nabib, R., 1992. Kerugian Ekonomi akibat Serangan Penyakit Gumboro. *Poultry Indonesia*. Februari : 144 : 14
- Nielsen, O.L.; Sorensen, P.; Hedemand, J.E.; Laursen, S.B. and Jorgensen, P.H., 1998. Inflammatory of different chicken and B haplotypes to infection with infectious bursal disease virus. *Avian Pathology*. 27: 181-189.
- 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.
- Office International des Epizootic 1995. *Congres International des Epizootic, Paris*. Committee or to rgional Commission: 75-82.
- Okeyo JOA, Uzoukwu M., 1990. Pathogenesis of infectious bursal disease virus in embryonally bursectomized chickens, *Avian Pathol*;19:550.
- Partadiredja, M., 1992, Virus Penyebab da Program Pencegahan Penyakit Gumboro. *Poultry Indonesia*. Februari 144 : 19-24

- Parede, L, 1992. Laporan Proyek Hasil Penelitian Virus dan Penyakit Gumboro. Kerjasama Balitvet dan P4N Badan Litbang Pertanian.
- Rautenschlein S, Yeh HY, Njenga MK, Sharma JM, 2002. Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery. *Arch Virol* 2002;147(2):285-304
- Reed, CJ 2000. Mechanisms of Apoptosis. *American Journal of Pathology* vol 157: 1415-1430
- Retno, dkk.1998. Penyakit-Penyakit Penting pada Ayam. Halaman 21-24
- Ressang, A. A., 1984. Patologi Veteriner. Edisi II. Institut Pertanian Bogor. Halaman 610-611.
- Rodenberger JK, Sharma JM, Balzer S, Nordgren R, Naqi S., 1994. Flow cytometric analysis of B-cell and T-cell subpopulations in specific pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis*;38:16-21.
- Rumawas, W., 1992. Infectious Bursal Disease. *Poultry Indonesia*. Februari 144 : 28-29
- Spaner, D., Raju, K., Rabinovich, B., & Miller, R. 1999. A Role for Perforin in Activation-Induced T Cell Death in Vivo: Increased Expansion of Allogeneic Perforin-Deficient T Cells in SCID mice. *The Journal of Immunology* 162 (2):1192-9.
- Spielman, J., Lee, R., & Podack, E., 1998. Perforin/Fas-Ligand Double Deficiency is Associated with Macrophage Expansion and Severe Pancreatitis. *The Journal of Immunology* 161: 7063-7070. Thornberry NA and Lazebnik Y. 1998. Caspase : Enemies Within. *Science* 281 : 1312-1316
- Thompson C B,1995, Apoptosis in the Patogenesis and Treatment of Disease. *Science* vol 267 :1445-1448.
- Tanimura, N, and Sharma, JM. 1998. In-situ apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Journal of Comparative Pathology*, 118 : 15-27.

- 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.
- Van den Berg, T.P., 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathology*, 29: 175-194.
- Wang J *et al.* 1999. Inherited human *caspase 10* mutations underline defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98: 47-58
- Weisman, J., and S.B Hitchner., 1985. Infectious Bursal Disease Virus Infectious Attemps in Turkey and Coturnix Quaiz. *Avian Disease*. 22: 604-608

LAMPIRAN

Lampiran 1: Pengamatan jumlah caspase 10 pada bursa fabrisius pada ayam buras secara mikroskopis

Hari	Ayam	Sam pel		LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	Caspase 10
II	Kontrol	1		0	3	1	2	0	6
		2		2	0	1	4	1	8
		3		5	4	3	0	1	13
		4		2	1	2	0	5	10
		5		0	0	5	2	1	8
		Total	Sum	9	8	12	8	8	4
		Mean	1.80	1.60	2.40	1.60	1.60	9.00	
		SD	2.049	1.817	1.673	1.673	1.949	2.646	
	Perlakuan	1		16	10	26	9	14	75
		2		15	9	14	12	18	68
		3		13	11	21	18	16	79
		4		25	13	14	21	12	85
		5		15	17	18	21	24	95
		Total	Sum	84	60	93	81	84	402
		Mean	16.80	12.00	18.60	16.20	16.80	80.40	
		SD	4.712	3.162	0.079	5.45	4.604	10.237	
	Total	Sum	93	68	105	89	92	447	
Mean SD		9.3 8.616	6.8 5.996	10.5 9.253	8.9 8.582	9.2 8.677	44.7 38.286		
IV	Kontrol	1		4	0	1	2	2	9
		2		4	0	0	3	0	7
		3		1	0	2	2	0	5
		4		6	0	0	0	0	6
		5		4	2	5	3	2	16
		Total	Sum	19	40	8	10	4	43
		Mean	3.80	0.40	1.60	2.00	0.80	8.60	
		SD	1.789	0.894	2.074	1.225	1.095	4.393	
	Perlakuan	1		13	18	18	13	15	77
		2		17	20	16	22	15	90
		3		15	16	12	14	15	72
4			15	14	13	11	16	69	
5			17	12	17	16	15	77	
Total	Sum	77	80	76	76	76	385		

Hari	Ayam	Sam pel		LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	Caspase 10	
VI	Total		Mean	15.40	16.00	1.20	1.20	15.20	77.00	
			SD	1.673	3.162	2.588	4.207	4.207	8.031	
		Sum	96	82	84	86	80	428		
			Mean	9.60	8.20	8.40	8.60	8.00	42.80	
		SD	6.28	8.509	7.501	7.545	7.63	36.563		
			1	0	1	1	1	4		
		2	3	1	1	3	0	8		
			3	1	4	2	0	7		
		4	1	0	4	0	1	4		
			5	0	0	0	1	0	5	
Total	Sum	5	6	10	5	2	28			
	Mean	1.00	1.20	2.00	1.00	0.40	5.00			
SD	1.225	1.643	1.225	1.225	0.548	1.817				
	VI	Perlakuan	1	14	20	18	13	14	79	
2			20	12	12	14	16	74		
3			15	10	14	15	14	68		
4			18	13	1	16	15	77		
5			21	15	18	19	20	93		
Total			Sum	88	70	77	77	79	391	
			Mean	17.60	14.00	15.40	1.40	1.80	78.00	
SD			3.05	3.808	2.608	2.302	2.49	9.257		
			Sum	93	76	87	82	81	419	
Mean			9.30	7.60	8.70	8.20	8.10	41.90		
	SD	9.019	7.291	7.319	7.786	8.293	38.777			
VIII	Kontrol	1	2	1	0	3	3	9		
		2	5	0	1	2	0	8		
		3	1	0	2	4	0	7		
		4	0	3	0	0	1	4		
		5	6	1	0	0	1	13		
		Total	Sum	14	5	8	9	41		
			Mean	2.80	1.00	1.60	1.80	1.00	8.20	
		SD	2.588	1.225	2.074	1.789	1.225	3.271		
			VIII	Perlakuan	1	10	10	9	7	13

Hari	Ayam	Sam pel		LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	Caspase 10	
X	Total	2		7	11	14	10	15	57	
		3		7	8	12	11	15	53	
		4		10	6	5	12	13	46	
		5		9	6	7	9	9	40	
		Total	Sum	43	41	47	49	65	245	
			Mean	8.60	8.20	9.40	9.80	13.00	49.00	
			SD	1.517	2.28	3.647	1.924	2.449	6.519	
			Sum	57	46	55	58	70	286	
			Mean	5.7	4.6	0.5	5.8	7	28.6	
			SD	3.63	4.169	4.972	4.566	6.583	22.046	
	Kontrol	1		0	0	1	0	0	0	1
		2		6	1	0	0	0	0	7
		3		0	2	0	0	0	0	2
		4		3	1	0	4	0	0	8
		5		3	0	1	0	0	0	3
		Total	Sum	12	4	1	4	0	21	
			Mean	2.40	0.80	0.20	0.80	0.00	4.20	
			SD	2.51	0.837	0.447	1.789	0	3.114	
		Perlakuan	1		5	3	3	6	7	24
			2		5	4	4	3	7	23
	3			3	3	5	2	3	16	
4			2	3	6	6	5	22		
5			7	5	8	4	3	27		
Total	Sum		22	18	28	21	25	112		
	Mean		4.40	3.60	5.20	4.20	5.00	22.40		
	SD		1.949	0.894	1.924	1.789	2	4.037		
Total	Sum		34	22	27	25	25	133		
	Mean		3.40	2.20	2.70	2.50	2.00	13.30		
	SD		2.366	1.687	2.946	2.461	2.953	10.177		

Lampiran 2 : Univariate Analysis of Variance**Descriptive Statistic**Dependent Variable : *Caspase 10*

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

Lampiran 3 : Test of Between-Subjects Effects

Dependent Variable : Caspase 10

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	49724.420 ^a	9	5524.936	151867	.000
Intercept	58687.38	1	8687.380	1613.177	.000
Hari	7116.52	4	1779.13	48.904	.000
Perlakuan	36828.98	1	36828.980	1012.341	.000
Hari * Perlakuan	5778.92	4	1444.73	39.712	.000
Error	145.200	40	36.38		.000
Total	109867.000	50			.000
Corrected Total	51179.620	49			.000

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

Lampiran 4. Poc Hoc Tests**Waktu (Hari)***Caspase 10***Duncan ^{a,b}**

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

Means for groups I homogenous subsets are displayed.

Based on Type III sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) =36.380

a. Uses Harmonic Mean sample Size = 10.000

b. Alpha = .0,5

Lampiran 5. Perlakuan Kombinasi Hari * Perlakuan*Caspase 10***Duncan^a**

Duncan's (1%)	N	Subset for Alpha = .01			
		1	2	3	4
Hari X~Kontrol	5	4.20 a			
Hari VI~Kontrol	5	5.60 a			
Hari VIII~Kontrol	5	8.20 a			
Hari IV~Kontrol	5	8.60 a			
Hari II~Kontrol	5	9.0 a			
Hari X~Perlakuan	5		22.40 b		
Hari VIII~Perlakuan	5			49.0 c	
Hari IV~Perlakuan	5				77.0 d
Hari VI~Perlakuan	5				78.20 d
Hari II~Perlakuan	5				80.40 d
Sig.		.271	1.000	1.000	.407

Means for groups in homogenous subset are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000

Lampiran 6. Cara Kerja Pewarnaan Immunohistokimia pada *Caspase 10*

1. Melakukan deparanisasi dengan cara :

Sampel dari *caspase 10* direndam dalam larutan :

- Xylol I
- Xylol II
- Xylol III

Masing-masing selama 10 menit, kemudian

Sampel direndam dalam larutan :

- Alkohol absolut I
- Alkohol absolut II

Masing-masing selama 3 menit

Sampel direndam dalam larutan :

- Alkohol 96 % I
- Alkohol 96 % II

Masing-masing selama 3 menit

Sampel direndam dalam larutan :

- Alkohol 80 %
- Alkohol 70 %

Masing-masing selama 3 menit

Dicuci dengan air mengalir selama ± 1 menit

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

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

3. H_2O_2 3 % selama 10 menit.

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

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

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

5. AB Sekunder / Link AB selama 30 menit.

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

6. Streptavidin selama 30 menit.

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

7. DAB-Chromogen selama 6-10 menit.

8. Kemudian dicuci dengan PBS , Aquadestilata, air mengalir masing-masing

selama 5 menit

9. Counterstain : Meyer's Haematoxylin selama \pm 15 menit

10. Dibilas dalam air mengalir sampai biru

11. Dikeringkan di udara

12. Mounting

Keterangan :

PBS pH 7,2-7,4

H_2O_2 3 % = 1 bagian H_2O_2 30 % : 9 Bagian Aquadestilata