

PENGAMATAN ANTIGEN DAN ANTIBODI GUMBORO PADA AYAM HASIL INFEKSI DENGAN VIRUS GUMBORO ISOLAT LAPANG¹

DETECTION OF GUMBORO ANTIGEN AND ANTIBODY IN CHICKEN INOCULATED EXPERIMENTALLY BY FIELD ISOLATE OF GUMBORO VIRUS

Anak Agung Ayu Mirah Adi², Masduki Partadiredja³,
Hernomoadi Huminto⁴, dan I Wayan Teguh Wibawan⁴

ABSTRAK

Pengamatan antigen dan antibodi Gumboro telah dilaksanakan untuk mengetahui keberadaan antigen virus Gumboro pada berbagai jeroan ayam yang diinfeksi virus Gumboro dengan menggunakan metode Teknik Antibodi Fluoresen langsung (*Direct Fluorescent Antibody Technique - direct FAT*) dan untuk mendeteksi antibodi Gumboro pada serum menggunakan metode *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Hasil percobaan menunjukkan bahwa antigen Gumboro terdapat di semua organ yang diamati pada kelompok yang diinfeksi pada hari ke-1 pasca infeksi (p.i.): limpa, bursa Fabrisius, timus, tonsil sekum, ginjal, hati. Antigen menghilang dari ginjal dan hati pada hari ke-4 p.i, dari tonsil sekum dan timus pada hari ke-7 p.i., dari limpa hari ke-9 p.i. dan dari bursa Fabrisius hari ke-14 p.i. Titer antibodi kelompok ayam yang diinfeksi secara keseluruhan sangat nyata lebih tinggi dari kelompok kontrol dan peningkatan titer sangat nyata terjadi pada hari ke-14 sampai ke-18 p.i. ($p < 0,01$).

Kata-kata kunci : antigen dan antibodi Gumboro, virus Gumboro, FAT, ELISA

¹ Bagian dari Thesis Magister Sains pada Program Studi Sains Veteriner Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor

² Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Jimbaran-Bali, INDONESIA

³ Laboratorium Imunologi, Bagian Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151, INDONESIA

⁴ Laboratorium Patologi Veteriner, Bagian Parasitologi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151, INDONESIA

Detections of Gumboro antigen in the viscera of chicken using direct FAT and antibody against those virus using ELISA were conducted.

At day 1 post inoculation (p.i.) the antigen was detected in all organs examined. Such antigen, however, disappeared from kidney and liver at day 4 p.i., thymus and caecal tonsil at the day 7 p.i., spleen at day 9 p.i., and bursa of Fabricius at day 14 p.i. The antibody titre in the infected group was higher than that in uninfected groups, ($p < 0.01$). An antibody titre was increased significantly at day 14-18 p.i. ($p < 0.01$).

Key words : Gumboro antigen and antibody, Gumboro virus, FAT, ELISA

PENDAHULUAN

Sejak ditemukannya pada tahun 1962 di Gumboro-Delaware negara bagian Amerika Serikat, penyakit Gumboro terus meluas dan menyebar ke berbagai negara di seluruh dunia dan menimbulkan kerugian yang tinggi pada industri perunggasan (Reddy dan Silim, 1991). Penyakit ini masih sering muncul bersamaan dengan penyakit lainnya, seperti Newcastle Disease (ND), pada peternakan yang telah divaksinasi secara teratur terhadap Gumboro maupun penyakit lainnya (Partadiredja *et al.*, 1991).

Kerugian yang ditimbulkan oleh penyakit Gumboro atau IBD (*Infectious Bursal Disease*) pada ayam yang terinfeksi di atas umur tiga minggu berupa kematian yang mencapai lebih dari 20 %, pengafkiran karkas karena pendarahan pada otot dada dan paha dan efek penekanan tanggap kebal pada ayam yang terinfeksi pada usia dini (Lukert dan Saif, 1991). Virus IBD yang sekarang ada di lapang, berbeda dengan virus IBD klasik, karena mempunyai sifat patogenik yang lebih ganas dan menimbulkan penyakit yang berlangsung secara akut (Van den Berg *et al.*, 1991; Tsukamoto *et al.*, 1992).

Metode *direct immunofluorescence* merupakan metode yang sensitif untuk mendeteksi antigen virus dari preparat sentuh bursa Fabricius (Allan *et al.*, 1984). Dengan metode yang sama Weis dan Kauffer (1994) menemukan bahwa dalam jangka waktu 4-5 jam pasca infeksi virus sudah mengadakan perbanyakan pada tempat perkembangbiakan primernya di organ limfoid dan makrofag usus, kemudian diikuti dengan fase viremia primer. Fase viremia sekunder terjadi 11 jam pasca infeksi dan pada fase ini virus menyebar dari tempat perkembangbiakan sekundernya di bursa

Fabrisius ke organ lainnya. Menurut Becht (1980) virus yang dihasilkan dalam jumlah besar pada bursa berperan penting dalam patogenitas penyakit Gumboro.

Penelitian ini dilakukan untuk mengamati keberadaan antigen Gumboro pada berbagai organ dan mendeteksi antibodi terhadap virus Gumboro pada serum dalam beberapa waktu pasca inokulasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Percobaan ini menggunakan ayam petelur jenis *Hisex Brown* usia sehari sebanyak 72 ekor yang berasal dari PT. Peternakan Ayam Manggis. Ayam percobaan diberi pakan ayam komersil dan air minum *ad libitum*. Sebagai sumber virus digunakan suspensi gerusan bursa Fabrisius yang mengandung virus Gumboro isolat lapang (dengan kode 5 hasil isolasi yang dilakukan oleh Laboratorium Imunologi, Bagian Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor).

Metode

Antibiotika berspektrum luas diberikan setiap hari melalui air minum selama seminggu untuk mencegah infeksi sekunder. Uji netralisasi serum (SN test) dilakukan dua kali, yaitu pada saat ayam berumur sehari dan dua minggu untuk melihat titer antibodi terhadap virus Gumboro yang berasal dari induk.

Setelah berumur tiga minggu, ayam dikelompokkan secara acak menjadi dua kelompok yaitu kelompok yang diinfeksi (I) dan kelompok kontrol (K). Masing-masing kelompok terdiri atas 36 ekor ayam. Kelompok I diinfeksi dengan 0,2 ml suspensi gerusan bursa Fabrisius yang mengandung virus Gumboro $10^{4,5}$ TCID₅₀/0,2 ml secara intraokuler. Sedangkan Kelompok K, hanya diberi 0,2 ml Larutan Penyangga Fosfat (PBS). Kedua kelompok tersebut ditempatkan pada lokasi yang terpisah. Selama percobaan berlangsung, pegawai kandang dan perlengkapannya untuk masing-masing kelompok ini dibedakan.

Pengambilan Serum

Setiap hari diambil masing-masing tiga ekor ayam dari kelompok kontrol dan kelompok yang diinfeksi. Masing-masing ayam diambil darahnya melalui jantung sebanyak lima mililiter, kemudian serumnya dipisahkan dan disimpan pada suhu -20°C . Nekropsi dilakukan setelah ayam dieuthanasia dengan memberikan emboli udara melalui jantung. Organ-organ yang diperlukan diambil untuk diproses lebih lanjut. Pengambilan serum dan nekropsi ini dilakukan selama 12 kali mulai dari hari ke-1 sampai ke-10 p.i., kemudian dilanjutkan pada hari ke-14 dan ke-18 p.i.

Pemeriksaan Antigen

Jaringan organ limpa, bursa Fabricius, timus, tonsil sekum, ginjal dan hati diperiksa terhadap adanya antigen Gumboro dengan Teknik Antibodi Fluoresen langsung. Organ diambil secara aseptik, kemudian dibuatkan preparat sentuh pada kaca objek yang bersih dilanjutkan dengan proses fiksasi menggunakan aseton dingin dan pewarnaan dengan konjugat. Konjugat yang dipakai adalah antibodi Gumboro yang ditandai dengan *Fluorescent Isothiocyanate* - FITC (Salsbury). Kemudian diamati di bawah mikroskop fluoresen. Penilaian dilakukan secara ordinal berdasarkan banyaknya sel yang positif mengandung antigen dengan bobot 1 = antigen sedikit, 2 = sedang, dan 3 = banyak.

Pemeriksaan Antibodi

Kadar antibodi terhadap Gumboro di dalam serum diperiksa dengan metode ELISA (*capture antibody*), menggunakan perangkat yang diproduksi Trop Bio (Australia). Ke dalam pelat mikro yang sudah dilapisi antibodi monoklonal (AbMo) Gumboro dan sudah diberi antigen (virus Gumboro) dimasukkan serum ayam yang akan diperiksa titer antibodi poliklonalnya (AbPo) terhadap Gumboro. Tahap selanjutnya ke dalam pelat mikro diteteskan AbPo yang sudah dikonjugasikan dengan *horseradish peroxidase* (HRP), diikuti dengan pemberian substrat 2,2 azinodietil benzothiazoline sulfonic acid (ABTS). Perubahan warna hijau menunjukkan reaksi positif antibodi terhadap Gumboro. Hasil dibaca dengan program ELISA pada *Titertek ELISA reader*.

Rancangan Percobaan

Percobaan ini menggunakan rancangan *Split in time* dalam Rancangan Acak Lengkap, dengan dua petak utama (pemberian virus dan tanpa pemberian virus), kemudian masing-masing petak

dipisah dalam 12 kali waktu pengamatan dengan 3 kali ulangan setiap pengamatan. Data dianalisis menggunakan Analisis Sidik Ragam, kemudian dilanjutkan dengan Uji Wilayah Berganda Duncan. Hasil percobaan yang berupa data *non parametrik* dianalisis menggunakan Uji Kruskal Wallis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ditemukannya perpendaran (*fluorescent*) sel yang khas dan berwarna kehijauan pada pemeriksaan Teknik Antibodi Fluoresen secara langsung, menandakan bahwa suatu organ positif mengandung antigen. Perpendaran selalu ditemukan pada sitoplasma, seperti cincin mengelilingi inti. Antigen sudah ditemukan pada hari ke-1 p.i pada semua organ yang diperiksa dari kelompok yang diinfeksi (Tabel 1), dan tidak ditemukan pada semua organ yang diperiksa dari kelompok kontrol sepanjang waktu pengamatan.

Tabel 1. Distribusi Antigen Virus Gumboro pada Berbagai Organ Berdasarkan FAT Langsung Setelah Diinfeksi dengan Virus Gumboro Isolat Lapang $10^{4,5}$ TCID₅₀/0,2 ml.

Hari	Bursa	Limpa	Timus	Tonsil Sekum	Ginjal	Hati
1	1	1	0,7	1,7*	1	1
2	2,7*	2	1,3	2*	2*	1
3	3*	2,7*	2,3*	1	2,3*	1
4	2	1,7	1,7	0,7	0	0
5	1	0,7	1,3	0,3	0	0
6	0,7	0,7	0,7	0,3	0	0
7	0,7	0,7	0	0	0	0
8	0,7	0,3	0	0	0	0
9	0,7	0	0	0	0	0
10	0,7	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0

Keterangan: * = Berbeda nyata ($p < 0,01$). 0 = negatif, 1 = sedikit, 2 = sedang, 3 = banyak. (Notasi dalam tabel merupakan hasil rata-rata dari 3 ulangan).

Antigen yang terdeteksi di semua organ pada hari ke -1 p.i. sebagai akibat dari penyebaran antigen dari bursa Fabricius bersama aliran darah ke berbagai organ. Weiss dan Kauffer (1994)

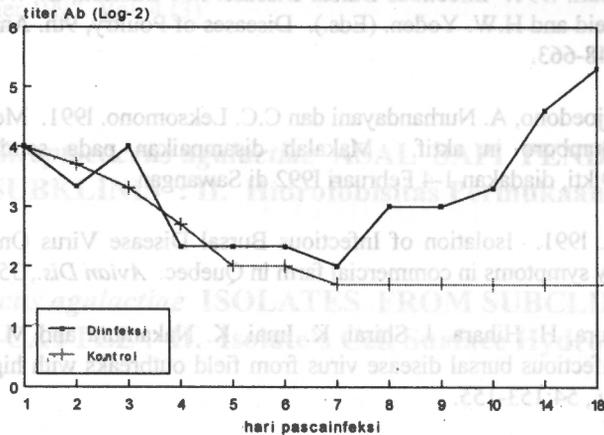
menyatakan bahwa 11 jam p.i. sudah berlangsung viremia sekunder berupa penyebaran virus dari tempat perkembangbiakan sekundernya di bursa Fabrisius menuju ke berbagai organ melalui peredaran darah.

Dari hasil penelitian di atas terlihat adanya perbedaan waktu menghilangnya antigen dari berbagai organ. Untuk organ yang bukan organ limfoid, seperti ginjal dan hati, antigen sudah menghilang pada hari ke-4 p.i. Hilangnya antigen dari kedua organ ini erat hubungannya dengan keterbatasan jumlah sel yang peka terhadap antigen virus IBD yaitu sel limfosit B, sehingga antigen yang tiba di ginjal dan hati tidak akan bertahan lama karena akan disingkirkan oleh mekanisme pertahanan setempat.

Antigen virus IBD yang sampai di organ limfoid seperti limpa, tonsil sekum, timus dan bursa Fabrisius akan segera menginfeksi sel limfosit B dan mengadakan perbanyakan pada sel tersebut. Virion-virion yang dihasilkan akan menginfeksi sel sehat di sekitarnya. Kejadian itu terus berlangsung sampai tidak ada lagi sel sehat yang tersisa. Hilangnya antigen dari organ timus dan tonsil sekum terjadi pada hari ke-7 p.i., dari limpa pada hari ke-9 p.i. dan dari bursa Fabrisius pada hari ke-14 p.i. Diantara keempat organ limfoid yang diamati, antigen bertahan paling lama pada bursa Fabrisius karena populasi sel limfosit B pada bursalah yang paling banyak.

Dari hasil deteksi antibodi dengan metode ELISA, didapatkan titer antibodi pada serum yang meningkat pada hari ke-8 p.i. dan peningkatan titer antibodi sangat nyata pada hari ke-14-18 p.i. ($p < 0,01$) seperti yang terlihat pada Gambar 1. Peningkatan titer antibodi hampir bersamaan waktunya dengan menghilangnya antigen dari timus, tonsil sekum dan limpa. Diduga menghilangnya antigen dari ketiga organ limfoid ini, selain disebabkan oleh faktor keterbatasan sel sasaran yang peka, juga disebabkan oleh kemunculan antibodi penetral yang aktif bereaksi terhadap selubung protein (kapsid), virion yang bebas dan terhadap sel tertular yang membawa antigen viral pada permukaannya, sehingga menyebabkan sel ini peka terhadap penghancuran.

Bursa Fabrisius merupakan tempat perkembangbiakan utama dari virus Gumboro. Hal ini dipertegas dengan menghilangnya antigen dari bursa Fabrisius baru terjadi pada hari ke-14 p.i. yaitu pada saat titer antibodi pada serum sangat nyata lebih tinggi dibandingkan hari-hari sebelumnya.



Gambar 1. Profil titer antibodi terhadap Gumboro pada kelompok ayam yang diinfeksi dan kontrol.

KESIMPULAN

Antigen Gumboro ditemukan pada semua organ ayam yang diamati pada hari ke-1 p.i., menghilang dari ginjal dan hati pada hari ke-4 p.i., dari timus dan tonsil sekum hari ke-7 p.i., dari limpa hari ke-9 p.i. dan dari bursa Fabrisius hari ke-14 p.i. Titer antibodi pada kelompok ayam yang diinfeksi mulai meningkat hari ke-8 p.i. dan peningkatan titer sangat nyata terjadi pada hari ke-14 sampai ke-18 p.i.

DAFTAR PUSTAKA

- Allan, G.M., M. S. Mc. Nulty, T.J. Connor, R.M. Mc. Cracken and J.B. McFerran. 1984. Rapid Diagnosis of Infectious Bursal Disease Infection By Immunofluorescence on Clinical Material. *Avian Pathol.*, 13: 419-427.
- Becht, H. 1980. Infectious Bursal Disease. *Curr. Top. Microbiol, Immunol.*, 90: 107-121.

