

## **Deteksi Molekuler Virus *Infectious Bursal Disease* (IBD) pada Sampel Bursa Fabrisius yang Diperoleh dari Ayam Terdiagnosa Penyakit IBD**

### **Molecular Detection of Infectious Bursal Disease Virus at Bursa Fabrisius Samples Obtained from Chicken Suspected to IBD Infection**

**Michael Haryadi Wibowo<sup>1</sup>, Radhiyan Fadiar<sup>2</sup>, Dito Anggoro<sup>3</sup>, Sidna Artanto<sup>1</sup>, Surya Amanu<sup>1</sup>,  
Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departemen Mikrobiologi, <sup>2</sup>Mahasiswa Kedokteran Hewan, <sup>3</sup>Mahasiswa Program Studi Sain Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, UGM. Jln. Fauna No2. Karangmalang, Yogyakarta.  
Email : mhwibowo@ugm.ac.id

#### **Abstract**

Infectious Bursal Disease (IBD) still existing in the commercial layer and broiler farm in Indonesia. Diagnosis of IBD was done according to specific lesion finding and in ovo inoculation based on macroscopic examination of chicken embryo and further identification using agar gel precipitation test (AGPT). The aim of this research was to applied molecular diagnostic test using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to confirm IBD virus from BF samples suspected to IBD virus infection. Virus detection using AGPT with *chorioallantoic membrane* (CAM) and embryo as source of antigen, to choose the best antigen source for AGPT. Five samples of bursa fabricius were collected from commercial farms in Yogyakarta special province which were further processed for virus detection. Confirmation test was performed by RT-PCR method using specific primers targeted to VP2 gene fragment. Positive RT-PCR were subjected to virus isolation on chicken embryonated egg 11-days old, and antibody negative to IBD virus. Inoculation materials were injected at chorioallantoic membrane of chicken embryonated eggs, incubated, and collected from refrigerator at 5 days post infection. Membrane chorioallantois and embryo were harvested and further processed for AGPT. Confirmation test using RT-PCR method that amplified VP2 gene fragment showed that 3 samples out from 5 samples were positive. Serologic assay of AGPT using CAM obtained from positive PCR as source of antigen indicated 2 positive out of 3 samples, meanwhile AGPT using embryo as sources antigen were negative. Based on the research could be concluded that RT-PCR method could be used to detect IBD virus genom from directly BF samples. AGPT test was performed with antigen obtained from CAM indicated better result compared to that embryo.

**Key words:** bursa fabricius, chorioallantoic membrane, precipitation, amplification, IBD virus.

## Abstrak

Kasus penyakit *Infectious Bursal Disease* (IBD) dewasa ini masih sering ditemukan pada peternakan ayam komersial baik layer maupun broiler di Indonesia. Diagnosis penyakit IBD sejauh ini mengandalkan lesi patologik spesifik dan kultur *in ovo* dengan mengamati lesi makroskopis embrio, serta diidentifikasi dengan uji agar gel presipitasi (AGP). Penelitian ini bertujuan menerapkan diagnosis dengan teknik *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) dari sampel Bursa Fabricius (BF) sebagai konfirmasi pada kasus terdiagnosa IBD. Deteksi serologis virus IBD dengan uji AGP dengan sumber antigen *chorioallantoic membrane* (CAM) dan embrionya, untuk melihat potensinya sebagai sumber antigen uji AGP. Sampel Bursa Fabricius sebanyak 5 yang diperoleh pada kasus terdiagnosa IBD, dikoleksi dari peternakan ayam komersial di Yogyakarta. Konfirmasi diagnosis dilakukan dengan metode RT-PCR. Sampel positif uji RT-PCR yang mengamplifikasi fragmen gen VP2. Isolasi virus IBD yang dilakukan kultur *in ovo* pada telur ayam berembrio (TAB) antibodi negatif terhadap virus IBD, berumur 11 hari. Desposisi materi inokulasi dilakukan pada (CAM), diinkubasi selama lima hari. Panen virus dilakukan dengan mengkoleksi membran korioalantois dan embrio, selanjutnya diamati lesi makroskopis yang timbul akibat infeksi virus IBD. Membran korioalantois dan embrio selanjutnya digerus dan diproses sebagai suspensi antigen yang digunakan dalam uji AGP. Hasil uji RT-PCR terhadap lima sampel Bursa Fabricius yang dikoleksi dari peternakan ayam terdiagnosa penyakit IBD, tiga sampel menunjukkan hasil positif teramplifikasi fragmen gen VP-2 virus IBD dengan produk amplifikasi sebesar 440 bp, sedangkan dua sampel sisanya menunjukkan hasil negatif. Uji AGP dengan sumber antigen CAM menunjukkan hasil positif 2 dari 3 sampel yang diuji, sedangkan sumber antigen embrio menunjukkan hasil negatif. Berdasarkan data yang diperoleh dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa uji RT-PCR dapat digunakan dalam mendeteksi virus IBD dari sampel BF terdiagnosa IBD. Uji AGP dengan sumber antigen CAM menunjukkan hasil lebih baik dari pada embrionya.

**Kata kunci:** bursa fabricius, membran korioalantois, presipitasi, amplifikasi, virus IBD

## Pendahuluan

*Infectious Bursal Disease* (IBD) dikenal juga sebagai penyakit Gumboro karena pertama kali diisolasi di kota Gumboro, Delaware, Amerika pada tahun 1957, merupakan penyakit viral yang bersifat akut, mudah menular dan menyerang ayam muda kurang dari 4 bulan. Target infeksi virus IBD adalah sel pertahanan dalam Bursa Fabricius dan berbagai organ limfoid, oleh karena itu infeksi virus IBD dapat mengakibatkan penekanan terhadap sistem pertahanan ayam atau immunosupresi. Infeksi virus IBD mempunyai arti penting dalam industri perunggasan karena dapat menyebabkan angka morbiditas tinggi, bervariasi antara 10-90% dan mortalitasnya mencapai 20%, gangguan pertumbuhan, meningkatnya biaya pemakaian obat-obatan dan desinfektan (Tabbu, 2000; Lukert and Saif, 2003).

*Infectious Bursal Disease* disebabkan oleh virus famili *Birnaviridae* dan genus *Avibirnavirus*. Virus ini memiliki bentuk simetris ikosahedral, berdiameter 55 sampai 65 nm, dan tidak beramplop (Fenner *et al.*, 1993; Lukert and Saif, 2003). Genom virus berupa dsRNA yang mempunyai 2 segmen, yaitu: segmen A dengan panjang 3.261 nukleotida dan segmen B dengan panjang 2.827 nukleotida. Segmen A mengandung *open reading frame* (ORF) tunggal besar yang akan dipotong oleh enzim proteolitik dan mengkode protein VP2, VP3, VP4, dan nonstruktural protein (NS). Protein VP2 dan VP3 merupakan protein struktural utama pada virion. Protein VP2 juga berperan penting dalam imunitas protektif virus IBD. Segmen B lebih kecil dari segmen A dan mengkode protein VP1, suatu enzim yang mempunyai aktivitas *RNA dependent-RNA polymerase* (Fenner *et al.*, 1993; Nagarajan and Kibenge, 1997; Muller *et al.*, 2003; Van den Berg,

2010).

Virus IBD memasuki tubuh hospes peroral, selanjutnya virus bereplikasi dalam sel limfosit dan makrofag dalam jaringan usus. Melalui peredaran darah virus IBD menuju ke berbagai organ, termasuk Bursa Fabricius sebagai target replikasi virus IBD. Sel limfosit B muda dalam folikel Bursa Fabricius merupakan sel target virus untuk replikasi (Van den Berg, 2010). Sel yang peka terhadap virus IBD pada ayam adalah sel B yang dihasilkan oleh Bursa Fabricius, karena sel B mempunyai immunoglobulin Ig-M pada permukaan yang merupakan tempat spesifik infeksi virus IBD (Hirai and Calnek, 1979; Kaufer and Weiss, 1980). Virus IBD mempunyai sasaran utama pada sel-sel yang aktif berproliferasi dan dilaporkan bahwa afinitas virus IBD lebih besar pada sel muda atau calon limfosit-B dibandingkan dengan limfosit-B dewasa (Nagarajan and Kibenge, 1997). Setelah 13 jam pasca inokulasi folikel bursa positif mengandung virus IBD dan viremia terjadi setelah 16 jam pasca infeksi, yang ditandai dengan replikasi sekunder di berbagai organ lain. Kondisi tersebut akan menyebabkan ayam sakit dan akhirnya mati (Müller *et al.*, 1979).

Infeksi virus IBD menyebabkan terjadi hambatan diferensiasi *stem cell* dalam pembentukan sel B dan prekursor sel B secara drastis (Siavanandan and Maheswaren, 1980). Allan *et al.* (1972), melaporkan bahwa kerusakan sel B mengakibatkan penurunan reaksi terhadap vaksinasi. Di samping itu, ayam yang terinfeksi virus IBD pada umur dini akan mengalami penurunan respon antibodi yang dapat mengakibatkan ayam lebih rentan terhadap berbagai penyakit. Pada infeksi virus IBD dapat terjadi penurunan respon antibodi terhadap berbagai antigen vaksin, namun respon antibodi terhadap virus IBD sendiri adalah normal. Keadaan ini

dikenal dengan nama fenomena paradoks virus IBD (Lukert and Saif, 2003).

Virus IBD isolat lapang dapat menimbulkan derajat patogenesis yang berbeda pada ayam maupun jenis unggas lain yang peka oleh infeksi virus tersebut (Tabbu, 2000). Kepekaan paling tinggi terjadi pada unggas umur 3-6 minggu, ketika Bursa Fabricius berkembang secara maksimal (Nunoya *et al.*, 1992). Gejala klinis penyakit IBD pada ayam dapat bervariasi tergantung dari galur virus IBD yang menyerang. Ayam yang terinfeksi virus IBD menunjukkan gejala klinis, antara lain: terjadi kematian mendadak yang diikuti dengan peningkatan mortalitas dengan cepat. Morbiditas dan mortalitas dimulai 3 hari pasca infeksi, mencapai puncak dan mereda pada hari ke 5 sampai 7. Pola kematian tersebut menunjukkan standar kurva normal. Gejala awal yang terlihat pada kasus IBD adalah kecenderungan ayam untuk mematok daerah kloaka dan sekitarnya. Gejala tersebut diikuti dengan depresi, bulu berdiri, diare putih yang teramati di daerah kloaka, anoreksia, dan tremor (Tabbu, 2000; Lukert and Saif, 2003). Pada kondisi tersebut ayam terlihat menurun nafsu makan dan minumannya, sehingga dapat terjadi dehidrasi. Ayam dalam flock yang terserang penyakit IBD terlihat tidak teratur, akan mengalami peningkatan temperatur tubuh pada stadium awal, tetapi pada stadium akhir menjadi subnormal (Tabbu, 2000).

Isolasi virus IBD dapat dilakukan *in ovo* pada telur ayam berembrio *specific pathogen free* atau spesifik antibodi negatif terhadap virus IBD. Inokulasi sampel dilakukan pada CAM dan ruang alantois, tetapi pertumbuhan virus menghasilkan titer yang lebih tinggi pada CAM. Virus IBD juga tumbuh baik pada biak sel yang berasal dari embrio ayam. Pertumbuhan virus dapat diamati dengan

terbentuknya efek sitopatik pada biak sel tersebut (Lukert and Saif, 2003). Beberapa uji laboratorium dapat digunakan dalam diagnosis virus IBD. Salah satu teknis deteksi virus IBD adalah uji agar gel presipitasi (AGP), merupakan uji konvensional yang banyak digunakan dalam laboratorium diagnostik. Uji AGP tersebut digunakan untuk menentukan antigen, bersifat kualitatif, tanpa dapat membedakan serotipe virus IBD. Keunggulan uji AGP merupakan salah satu uji serologis yang cukup akurat, murah, dan mudah dilaksanakan (Beard, 1989). Dewasa ini teknik *reverse-transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) telah dikembangkan untuk mendeteksi genom virus IBD (Kataria *et al*, 2001; Ashraf *et al*, 2007). Metode RT-PCR mampu mendeteksi genom virus IBD yang tidak dapat tumbuh di dalam biakan sel, dan tidak diperlukan propagasi virus sebelum proses amplifikasi (Anonimous, 2001).

Diagnosis penyakit IBD di lapangan didasarkan pada anamnesa, gejala klinis, dan perubahan patologi makroskopis. Konfirmasi diagnostik dalam penelitian ini dengan uji RT-PCR terhadap sampel Bursa Fabricius (BF) dengan amplifikasi fragmen genom VP2 virus IBD menggunakan primer spesifik. Sampel positif RT-PCR dilanjutkan dengan kultur *in ovo* pada telur ayam berembrio (TAB) dan dideteksi virus IBD menggunakan uji agar gel presipitasi (AGP). Uji AGP merupakan uji serologis sederhana yang digunakan untuk mendeteksi antibodi terhadap berbagai virus berdasarkan reaksi positif atau negatif. Penelitian ini juga bertujuan melakukan deteksi virus IBD dengan uji AGP menggunakan sumber antigen CAM dan embrio, untuk melihat potensinya sebagai sumber antigen dalam uji AGP.

## Materi dan Metode

Sampel lima Bursa Fabricius terdiagnosa penyakit IBD, diperoleh dari lima peternakan farm ayam petelur dan broiler di Daerah Istimewa Yogyakarta yang dikoleksi Laboratorium Mikrobiolog FKH UGM. Kontrol positif uji AGP digunakan virus vaksin IBD produksi Sanbio Laboratoris.

Ekstraksi RNA dilakukan terhadap gerusan Bursa Fabricius yang diperoleh dari kasus terdiagnosa IBD. Virus kontrol diperoleh dari pengenceran virus vaksin IBD (produksi Sanbio Laboratoris). Isolasi RNA virus AI dilakukan dengan menggunakan *micro-to Midi RNA isolation kit* (Invitrogen, USA) sesuai dengan prosedur standar yang disarankan oleh Invitrogen. Secara prinsip, 0,2 ml suspensi isolat IBD/virus kontrol IBD dalam PBS ditambahkan ke dalam 0,2 ml larutan lisis yang mengandung 0,002 ml  $\beta$ -*mercaptoethanol*. Campuran tersebut, kemudian disentrifugasi pada 12.000 x g selama 2 menit suhu 25°C (*refrigerated microcentrifuge*, model 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany). Selanjutnya supernatan dipindahkan ke dalam tabung bersih dan ditambah dengan 0.2 ml etanol absolut, kemudian dimasukkan kedalam *RNA spin cartridge*, dan disentrifugasi pada 12.000xg selama 15 menit 25°C. *Cartridge* dicuci 1 x dengan 0,7 ml *wash buffer I* dan 1 x dengan 0,5 *wash buffer II*. *Cartridge* tersebut kemudian dipindahkan ke dalam *RNA recovery tube*. RNA diperoleh dengan melakukan elusi *cartridge* tersebut dengan 0,03 ml *RNAse-free water* dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 12.000xg selama 2 menit 25°C. Suspensi RNA yang diperoleh, kemudian dipakai untuk *template* pada reaksi RT-PCR.

Amplifikasi dilakukan dengan metode RT-PCR. Reaksi dilakukan dengan kit *Superscript III-one-step-RT-PCR with platinum Taq* (Invitrogen) menggunakan *Gene-Amp PCR System 2400* (Applied Biosystem, USA). Amplifikasi gen VP2 dilakukan dengan primer, forward : 5' – GTCTACACCATAACTGCCGCAGATGAT – 3' dan Reverse : 5' – GGCTACTAGTGTGACGGGGCGGAGGGCAC C – 3'. Rancangan primer berasal dari manual standar pengujian virus IBD *Australian Animal Health Laboratory*, Gelong, Australia, dengan produk amplifikasi sebesar 440 bp. Produk PCR divisualisasi dengan metode elektroforesis menggunakan gel agarose 2% dan pewarnaan *ethidium bromide*. Pita DNA yang teramplifikasi diamati di dalam ruangan gelap menggunakan *UV transluminator*, untuk selanjutnya didokumentasi.

Hasil RT-PCR positif selanjutnya diproses untuk isolasi virus menggunakan telur ayam berembrion umur 11 hari, spesifik antibodi negatif terhadap virus IBD. Bursa Fabricius merupakan sampel terbaik untuk isolasi dan identifikasi virus IBD. Bursa dipotong, kemudian ditampung dalam tabung steril dan ditambah PBS yang mengandung penisilin dan streptomisin (masing-masing 1000 um/ml). Selanjutnya BF tersebut diproses dengan cara dihomogenasi menggunakan *vortex*. Setelah homogen disentrifugasi pada kecepatan putar sekitar 3000 x g selama 10 menit. Supernatan diambil, dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 2 jam agar antibiotik bekerja. Untuk memastikan sampel inokulasi steril maka diuji dengan melakukan kultur sampel tersebut pada media perbenihan bakteri. Sampel inokulasi yang terbukti steril baru dapat digunakan dalam inokulasi *in ovo*.

Sampel inokulasi yang telah dipersiapkan

dan terbukti steril dideposisi pada CAM. Telur dipersiapkan dengan membuat lubang di atas embrio dan satu lubang lagi pada rongga udara. Ruang udara alami pada telur dihisap dengan bola karet, sampai CAM yang melekat pada selaput telur lepas dan terbentuk ruangan udara buatan pada posisi di atas embrio. Inokulasi dan deposisi suspensi ditempatkan pada membran tersebut. Selanjutnya kedua lubang pada telur ditutup dengan parafin cair dan diinkubasi sampai 5 hari. Embrio mati diambil dan disimpan dalam refrigerator, embrio yang tidak mati sampai dengan 5 hari juga diambil dan disimpan dalam refrigerator. Panen virus dilakukan dengan mengkoleksi CAM dan embrio ayam. Pengamatan dilakukan terhadap lesi embrio secara makroskopis dan adanya *plaque* pada membran tersebut.

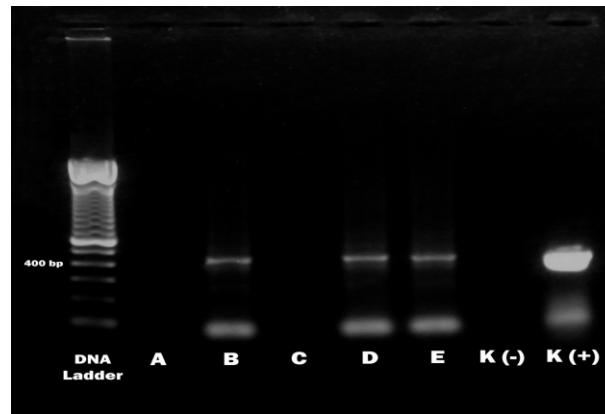
Ke dalam sebuah obyek gelas, bersih dari kotoran dan lemak, ditambahkan 3 ml 0,3% larutan agar dalam air yang telah dipanaskan sampai mendidih. Setelah agar memadat, kaca benda ditempatkan ke dalam incubator 37°C sampai dengan kering. Kaca benda yang telah dilapisi tersebut, ditambahkan larutan agar 1% dalam 8,5% NaCl dalam PBS dengan 1% phenol sebagai pengawet, kemudian didiamkan sampai dengan kering. Setelah agar tersebut mengeras, dibuat sumuran dengan pola tertentu (sumuran tengah dikelilingi dengan 4 sumuran sisi kiri dan kanan), tanpa merusak dasar sumuran yang telah terbuat. Ke dalam sumuran ditengah selanjutnya diteteskan 0,05 ml serum antivirus IBD, dan ke dalam sumuran yang mengelilingi diteteskan 0,05 ml suspensi sampel gerusan CAM dari masing masing kultur *in ovo*. Dengan pola dan metode yang sama dilakukan dan diproses sampel dari embrio ayam dari masing-masing hasil kultur. Inkubasi dilakukan pada cawan petri yang diberikan kapas basah, dan ditempatkan

pada suhu ruangan. Pengamatan dilakukan setiap hari, sampai 3 hari, untuk mengamati garis presipitasi yang terjadi diantara sumuran antigen dan antibodi, untuk selanjutnya didokumentasi.

### Hasil dan Pembahasan

Konfirmasi diagnostik dengan mengamplifikasi genom virus IBD, telah banyak dilakukan oleh para peneliti (Lin *et al.*, 1994; Chao *et al.*, 1998; Kataria *et al.*, 2001; Ashraf *et al.*, 2007). Pada umumnya identifikasi virus IBD banyak difokuskan pada amplifikasi gen VP2. Protein VP-2

dianggap penting karena mempunyai tapak antigenik yang bertanggung jawab dalam menstimulasi antibodi netralisasi sehingga dapat menimbulkan antibodi yang bersifat imunoprotektif (Van den Berg, 2000). Setidaknya terdapat dua epitope netralisasi yang terdapat pada polipeptida VP2 virus IBD tersebut (Mahgoub, 2012). Hasil amplifikasi fragmen gen VP2 terhadap 5 sampel bursa fabrisius dalam penelitian ini, 3 sampel positif (kode B, D, dan E) menghasilkan produk amplifikasi 440 bp, sedangkan 2 sampel (kode A dan C) menunjukkan hasil negatif, tidak teramati pita amplifikasi target (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil elektroforesis RT-PCR fragmen VP-2 gene virus IBD, teramati pita DNA pada posisi 440 bp. Lubang B, D, dan E menunjukkan hasil positif. Lubang K (+) adalah kontrol positif, dan K (-) adalah kontrol negatif.

Beberapa laporan penelitian lain, yang mengembangkan teknik molekular dalam deteksi virus IBD dilakukan oleh Chao *et al.* (1998) dengan mendesain primer yang mengamplifikasi daerah yang bersifat lestari pada gen VP2 posisi *forward* primer 733-756 dan *reverse* primer posisi 1212-1189. Primer tersebut juga telah diaplikasikan untuk mendeteksi virus IBD yang diekstraksi dari berbagai organ dan leukosit oleh Barlic-Maganja *et al.* (2002). Lin *et al.* (1994), mengembangkan multipleks PCR untuk pertama kali yang ditujukan untuk membedakan virus IBD serotipe 1 dan 2. Primer disusun untuk menamplifikasi fragmen gen VP-4

pada posisi 1.730 – 1.879, dan fragmen gen VP-2 posisi 772 – 1.122, Gen VP-4 merupakan proteinase virus IBD dan berperan dalam prosesing dari prekursor poliprotein VP-2, VP3, dan VP-4. Gen VP-2 merupakan protein penting dalam determinasi serotipe dan merupakan antigen yang bersifat protektif dari virus IBD (Becht *et al.*, 1988). Teknis diagnosis secara molekular tersebut mempunyai kemampuan deteksi sangat akurat, sensitif, cepat, dan dapat digunakan menggantikan diagnosis mikrobiologi *in vivo* dan *in vitro* (Lin *et al.*, 1994; Barlic-Maganja *et al.*, 2002).

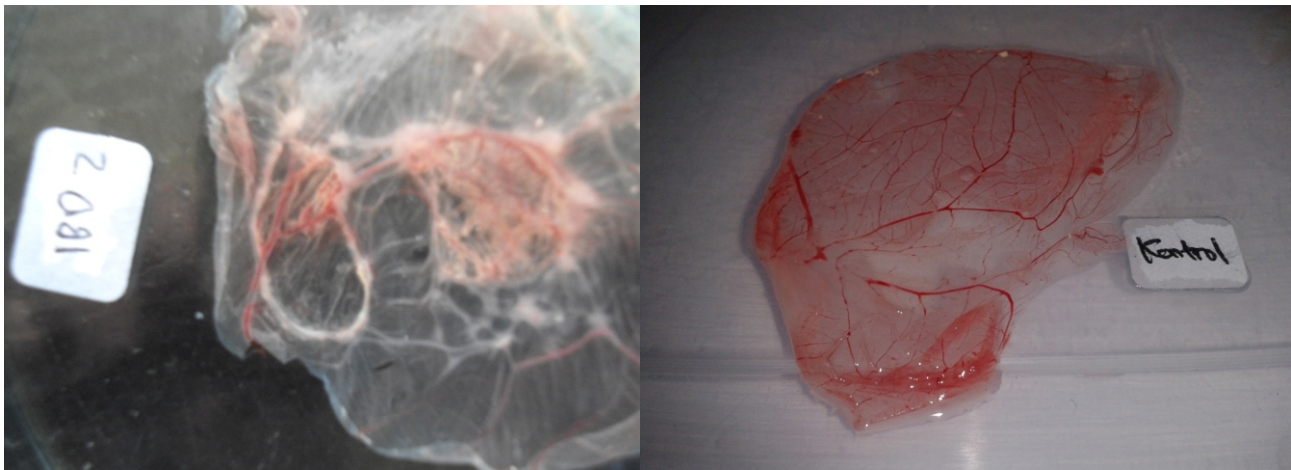


Gambar 2: Embrio yang diinfeksi virus IBD lapangan teramati hemorhagie (A) dan embrio kontrol (B).

Sampel IBD dalam penelitian ini adalah 3 Bursa Fabricius yang telah diskrening dengan RT-PCR positif, selanjutnya diinokulasikan pada telur ayam berembrio (TAB), spesifik antibodi negatif terhadap penyakit IBD. Menurut Butt *et al.*, (2015), BF merupakan sampel terbaik untuk isolasi virus IBD. Hal tersebut ditegaskan oleh Singh *et al.*, (2015), bahwa BF merupakan organ utama yang berhubungan dengan patogenesis virus IBD dan telah diketahui sebagai sumber antigen IBD yang baik. Inokulasi pada TAB menghasilkan lesi embrio yang teramati antara lain: perdarahan kulit yang ditemukan hampir di semua permukaan kulit, bulu tidak berkembang sempurna (Gambar 2).

Menurut Mutinda *et al.*, (2015) lesi embrio ayam yang diinfeksi virus IBD menunjukkan variasi lesi, yaitu: embrio kerdil, beberapa dapat terjadi kematian embrio, kongesti, udem dan perdarahan embrio. Hasil tersebut juga sesuai dengan pendapat Lukert dan Saif (2003). Kondisi tersebut sangat berbeda dengan embrio kontrol yang tidak teramati

adanya lesi tertentu. Lesi embrio yang diinokulasi virus IBD pada dasarnya mirip dengan embrio ayam yg diinfeksi oleh virus IB (Cavanagh and Naqi, 2003), virus ND (Wibowo dkk., 2012; Putra, dkk., 2012) maupun AI (Wibowo dkk., 2007). Perbedaan dengan kasus AI terletak pada adanya lesi hemoragi dan kerontokan bulu yang lebih hebat (Wibowo dkk., 2007). Demikian juga pada embrio yang diinfeksi virus ND perdarahan embrio teramati lebih parah (Wibowo, dkk., 2012; Putra dkk., 2012). Lesi pada kasus infeksi IB cenderung lebih mirip, namun dapat teramati kekerdilan yang lebih nyata, jika embrio kontrol dan yang diinfeksi dieramkan sampai hari ke-19 (Cavanagh and Naqi, 2003). Pada penelitian ini embrio diinkubasi sampai 4 hari pasca infeksi, oleh karena itu tidak teramati kekerdilan pada embrio yang diinfeksi virus IBD. Pada beberapa penelitian infeksi virus lain, misalnya virus ND pada embrio, gambaran lesi mikroskopis teramati dominan hemoragi yang terdistribusi secara merata pada berbagai organ (Putra dkk., 2012).



Gambar 3. Foto CAM dengan *plaque* (A) dan kontrol (B) tanpa *plaque*.

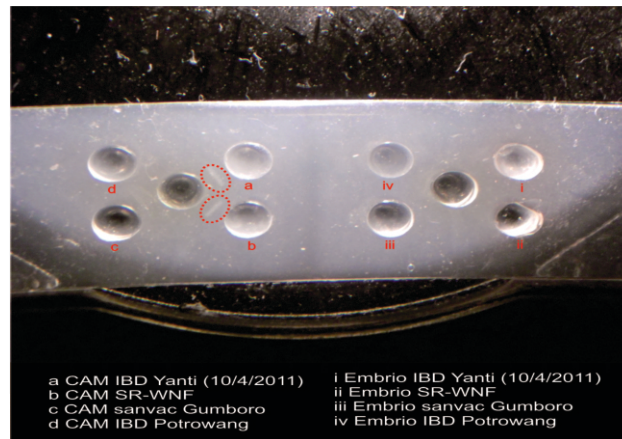
Hasil infeksi pada CAM teramati lesi, antara lain: penebalan membran yang diikuti adanya plak (Gambar 3). Hasil penelitian Mutinda *et al* (2015), menunjukkan lesi CAM yang diinfeksi virus IBD pada pasase pertama, teramati: udem, kongesti, dan hemoragi. Lesi makroskopis CAM oleh infeksi virus IBD teramati adanya hemoragi juga dilaporkan oleh Mawgod *et al.* (2014).

Beberapa virus unggas yang dipropagasi pada CAM, pada umumnya menghasilkan lesi yang mirip, sebagaimana terjadi pada virus IBD. Virus *avian pox* dan virus *ILT* juga mampu menyebabkan *plaque* (Anonimus, 1971; Wibowo, 2003, Tripathy and Reed, 2003), oleh karena itu memang sulit membedakan karakter lesi membran untuk kepentingan diagnosis. Lesi makroskopis tersebut perlu dilanjutkan dengan pemeriksaan secara mikroskopis untuk melihat karakter lesi spesifik dari masing-masing virus. Infeksi virus *ILT* pada CAM dapat ditemukan benda inklusi intranuklear (Anonimus, 1971, Wibowo, 2003) sedangkan pada virus *pox* ditemukan benda inklusi intrasitoplasmik yang juga dikenal sebagai bohringer body, akan bernilai diagnostik (Tripathy and Reed, 2003). Pada infeksi virus IBD tidak ditemukan lesi spesifik tertentu (Lukert and Saif, 2003), sebagaimana

ditunjukkan oleh virus *pox* dan *ILT* tersebut.

Diagnosis IBD dalam penelitian ini dilakukan dengan uji AGP, dengan sumber antigen CAM dan embrio ayam yang diinfeksi gerusan BF positif RT-PCR. Uji tersebut dipilih karena cukup akurat, murah, dan mudah dilaksanakan (Beard, 1989). Menurut Mawgod *et al*, (2014) identifikasi virus IBD dalam kultur *in ovo* paling banyak dilakukan dengan uji AGP, meskipun hasil uji AGP tersebut dapat bervariasi tergantung beberapa faktor. Dalam penelitian ini sumber antigen digunakan dua jenis, yaitu: membran CAM dan embrio. Hasil uji AGP dengan kedua sumber antigen tersebut menunjukkan bahwa antigen dari CAM teramati 2 isolat positif IBD, sedangkan 1 isolat negatif IBD. Hasil uji AGP dengan antigen vaksin sebagai kontrol positif menunjukkan hasil negatif. Hal ini tampaknya lebih disebabkan tidak terjadinya kesetimbangan antigen antibodi yang diuji, karena kemungkinan titer virus vaksin tidak sesuai dengan antibodi yang ada. Sementara itu hasil uji AGP dengan sumber antigen embrio, ketiganya menunjukkan hasil negatif (Gambar 4). Hasil tersebut menunjukkan bahwa sumber antigen CAM memberikan hasil yang lebih baik dibanding embrio.





Gambar 4: Hasil uji AGP preparasi antigen dari CAM dan embrio

Menurut Lukert and Saif (2003), virus IBD tumbuh pada CAM dan menghasilkan titer virus lebih banyak. Peneliti lain melaporkan bahwa virus IBD tidak dapat dengan mudah berkembang dengan baik pada TAB, oleh karena itu untuk memperoleh titer virus yang tinggi diperlukan beberapa kali pasase. Menurut Mutinda *et al.*, (2015) hasil uji AGP menunjukkan hasil yang baik setelah dilakukan pasase tiga kali. Butt *et al.*, (2015) melaporkan bahwa untuk mendapatkan hasil yang baik dalam uji AGP, virus IBD yang dipropagasi dalam TAB yang akan digunakan sebagai sumber antigen, diperlukan purifikasi dan dikonsentrasi dengan ultrasentrifugasi berpendingin. Penelitian Wibowo (2003) melakukan uji AGP terhadap virus ILT lebih sulit diperoleh hasil positif oleh karena itu diperlukan modifikasi teknis tertentu, misalnya dengan pemekatan antibodi. Faktor penting yang berperan dalam keberhasilan uji AGP adalah konsentrasi antigen-antibodi. Pembentukan presipitat akan terjadi apabila konsentrasi antigen antibodi tersebut mencapai proporsi yang seimbang (Kresno, 2000). Hasil uji AGP tidak bersesuaian dengan hasil RT-PCR dalam skrening awal, yaitu bahwa 3 sampel positif RT-PCR tidak semua positif dalam uji AGP. Hal tersebut sangat beralasan karena uji RT-PCR merupakan

sarana deteksi dalam aras molekuler yang diketahui lebih sensitif untuk mendeteksi virus IBD (Müller *et al.*, 2003).

### Kesimpulan

Berdasarkan data yang diperoleh pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa uji RT-PCR dapat digunakan dalam mendeteksi virus IBD secara langsung dari sampel Bursa Fabrisius yang terdiagnosa penyakit IBD. Hasil RT-PCR menunjukkan tiga dari lima sampel yang diperiksa menunjukkan hasil positif teramplifikasi fragmen gen VP-2 virus IBD dengan produk amplifikasi sebesar 440 bp, dua sampel menunjukkan hasil negatif. Uji AGP dengan sumber antigen membran korioalantois menunjukkan hasil positif 2 dari 3 sampel, sedangkan uji AGP dengan antigen embrio dari kultur yang sama dengan CAM menunjukkan hasil negatif, oleh karena itu CAM merupakan sumber antigen yang lebih baik dari pada embrio.

### Ucapan Terima Kasih

Sumber dana penelitian ini adalah Hibah Pengembangan Bagian Tahun 2012, No.

1642/J01.1.22/LK/2012, dan dana masyarakat (PNBP) FKH UGM tahun 2013 dengan kontrak /J01.1.22/HK4/2013.

### Daftar Pustaka

- Allan, W.H., Faragher, J.T. and Cullen, G.A. (1972) Immunosuppression by the Infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. *Vet. Rec.* 90:511-512.
- Anonimus (1979) Methods for examining poultry biologics for identifying and quantifying avian pathogen. Subcommitte, national academic science, Washington D.C. : 109-125.
- Anonimus (2001) *Manual of Standards Ddiagnostic Tests and Vaccines Infectious Bursal Disease* ([http://education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8124/VM8124toth\\_2002/VirDis/avia/avia.htm#reoviridae](http://education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8124/VM8124toth_2002/VirDis/avia/avia.htm#reoviridae))
- Ashraf, S., Tang, y. and Saif, M. (2007) Development of differential RT-PCR assays and molecular characterization of the complete VP1 gene of five strains of very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 51 (4): 935-941.
- Barlic-Maganja, D., Zorman-Rojs, O. and Grom, J. (2002) Detection of infectious bursal disease virus in different lymphoid organ by single-step reverse transcriptase polymerase chain reaction and microplate hybridization assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 243-246.
- Beard, C.W. (1989) Serologic procedures. *Dalam*: Purchase, H.G, Arp, H.L., Domermuth, C.H. and Pearson, J.E. (Eds). A Laboratory manual for the isolation and identification avian pathogens. 3<sup>rd</sup>ed. Kendal/Hunt publishing company, Iowa : 192-200.
- Becht, H., Muller, H. and Muller, H.I.S. (1998) Comparative studies of structural and antigenic properties of two serotype of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 69: 631-640.
- Cao, Y.C., Young, W.S. and Law, M. (1998) Molecular characterization of seven chinese isolates of infectious bursal diseases virus: classical, very virulent and variant strain. *Avian Dis.* 42: 340-351.
- Cavanagh, D. and Naqi, S.A. (2003) Infectious bronchitis. *In*: Diseases of poultry, 11<sup>th</sup> ed. Saif, Y.M. (Ed). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA: 101-119.
- Hirai, K., Kunihiro, K. and Shimakura, S. (1974) Characterization of immunosuppression in chickens by infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 23:950-965.
- Hitchner, S.B. (1970) Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. *Poult. Sci.* 49, 511-516.
- Kataria, R.S., Tiwari, A.K., Nanthakumar, T. and Goswani, P.P. (2001) One-step RT-PCR for the Detection of infectious bursal disease virus in clinical samples. *Vet. Res. Comm.* 25(5): 429-436.
- Kaufert, I. and Weiss, E. (1980) Significance of bursa fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect. Immun.* 27: 364-367.
- Kresno, S.B. (2000) *Imunologi: Diagnosis dan prosedur.* Edisi III. Penerbit Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta : 271-273.
- Lin, T.L., Wu C.C., Rosenberger, J.K., and Saif, Y.M. (1994) Rapid differentiation of infectious bursal diseases virus serotypes by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 100-102.
- Lukert, P.D. and Saif, Y.M. (2003) Infectious bursal disease. *In*: Diseases of poultry, 11<sup>th</sup> ed, Saif, Y.M. (Ed). Iowa state university press, Ames, Iowa, USA: 161-179.
- Mahgoub, H.A. (2012) An overview of infection bursal disease. *Arch Virol.* 157: 2047-2057.
- Mawgod, S.A., Arafa, A.S. and Hussein, H.A. (2014) Molecular genotyping of infectius bursal disease virus isolated from broiler flock in agypt. *Int. J. Vet. Sci. and Med.* 2: 46-52.
- Müller, H., Islam, R.Md. and Raue, R. (2003) Research on infectious bursal disease: The past, the present and the future. *Vet. Microbiol.* 97: 153-165.

- Müller, R., Kaufer, I., Reinacher, M. and Weiss, E. (1979) Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus (IBDV). *Zentralbl. Veterinarmed. B*, 26, 345-352.
- Mutinda, U.W., Njagi, L.W., Nyaga, P.N., Debora, L.C., Mbuthia, P.G., Kemboi, D., Githinji, J.W.K. and Mariuki, A. (2015) Isoaltion of infectious bursal disease virus using indigenous chicken embryos in kenya. *Int Scholarly Res. Notices*, ID 464376, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/464376>.
- Nagarajan, M.M. and Kibenge, F.S.B. (1997) Infectious bursal disease virus: A review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. *Can. J. Vet. Res.* 61: 81-88.
- 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 specific pathogen free chickens. *Avian Dis.* 36, 597-609.
- Putra, H.H., Wibowo, M.H., Untari, T. dan Kurniasih (2012) Studi lesi makroskopis dan mikroskopis embrio ayam yang diinfeksi virus newcastle disease isolat lapang yang virulen. *J. Sain Vet.* 30(1): 57-67.
- Raj, D.G., Thangavelu, R., Govindarajan, K., Nachimuthu and Venugopalan, A.T. (1995) Precipitation reaction with newcastle disease virus. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 27: 71-75.
- Singh J., Banga H.S., Brar R.S., Singh N.D., Sodhi S. and Leishangthem G.D. (2015) Histopathological and immunohistochemical diagnosis of infectious bursal disease in poultry birds. *Vet. Word* 8(11): 1331-1339.
- Sivanandan, V. and Maheswaran, S. K. (1980) Immune profile of infectious bursal disease. I. Effect of infectious bursal disease virus on peripheral blood T and B lymphocytes in chickens. *Avian Dis.* 24:715-725.
- Tabbu., C.R. (2000) Penyakit ayam dan penanggulangannya. Vol. 1. Kanisius: Yogyakarta: 213-221.
- Tripathy, N.D. and Reed, W.M. (2003) Pox. In: Diseases of poultry, 11<sup>th</sup> ed. Saif, Y.M. (Ed). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA: 253-269.
- Van den Berg, T.P. (2000) Acute infectious bursal disease in poultry: A Rev. *Avian Pathol.* 29 (3): 175-194.
- Wibowo, M.H. (2003) Identifikasi serologis virus infectious laryngotracheitis isolat mangestoni farm dengan uji agar gel presipitasi dan uji netralisasi. *J. Sain Vet.* 21 (2): 1-5.
- Wibowo, M.H., Susetya, H. Untari, T., Wahyuni, A.E.T.H. Tabbu, C.R. dan Asmara, W. (2007) Identifikasi molekuler virus avian influenza yang diisolasi dari kasus dengan dan tanpa gejala klinis khas penyakit avian influneza. *J. Vet.* 8(3): 103-110.
- Wibowo, M.H., Untari, T. dan Wahyuni, A.E.T.H. (2012) Isolasi, identifikasi, sifat fisik dan biologik virus tetelo yang diisolasi dari kasus di lapangan. *J. Vet.* 13 (4) 425-433.