

Gambaran Patologi *Bursa Fabricius* Embrio Ayam Pascavaksinasi Gumboro Secara *In Ovo* Menggunakan Vaksin Lokal dan Komersial

(*PATHOLOGIC DESCRIPTION OF BURSA FABRICIUS CHICKEN EMBRYOS AFTER
IN OVO VACCINATED WITH LOCAL AND COMMERCIAL GUMBORO VACCINES*)

Sutiastuti Wahyuwardani¹,
Dewi Ratih Agung Priyono², Wasmen Manalu³

¹Laboratorium Patologi, Balai Besar Penelitian Veteriner,
Jl. RE Martadinata No 30, Bogor 16114.

Telp 0251-86331048, Fax 0251-8336425, email: sutiastutiw@yahoo.co.id.

²Laboratorium Patologi, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi,

³Laboratorium Fisiologi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

ABSTRAK

Bursa Fabricius merupakan target organ virus gumboro ketika terjadi infeksi, yang sering kali mengalami kerusakan setelah ayam divaksinasi gumboro menggunakan vaksin hidup intermediet *plus*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan informasi gambaran patologi *bursa Fabricius* embrio ayam yang divaksinasi dengan vaksin lokal dibandingkan dengan vaksin komersial. Sebanyak 45 butir telur ayam berembrio *clean egg* umur sembilan hari digunakan pada penelitian ini. Telur ayam berembrio (TAB) dikelompokkan menjadi tiga kelompok, masing-masing terdiri 15 butir yaitu kelompok yang divaksinasi *infectious bursal disease* (IBD) dengan vaksin komersial dan kelompok yang divaksin dengan vaksin lokal dan kelompok kontrol. Vaksinasi dilakukan pada TAB umur 14 hari. Pascamenetas dilakukan terminasi pada TAB umur 12 jam, satu, dua, dan tiga hari. Perubahan patologi anatomi tidak terlihat nyata. Sementara itu perubahan histopatologi teramati pada kelompok embrio ayam yang divaksin dengan IBD lokal dengan tingkat keparahan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok vaksin komersial. Pada umur satu hari pascavaksinasi terlihat perubahan pada *bursa Fabricius* berupa: edema, perdarahan, infiltrasi sel heterofil, proliferasi sel *reticuloendothelial system*, nekrosis sel limfoid, dan semakin parah pada umur dua hari dan tiga hari pascavaksinasi, namun tidak terdeteksi lagi pada ayam tiga hari pasca menetas. Deteksi antigen menggunakan teknik imunohistokimia pada *bursa Fabricius* embrio ayam, menunjukkan bahwa antigen terdeteksi hingga umur tiga hari pascavaksinasi, dan menghilang ketika umur tiga hari pascamenetas. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa gambaran patologi yang terlamati menunjukkan bahwa virus vaksin yang digunakan untuk vaksin IBD intermediet *plus* pada embrio masih cukup ganas, dan menyebabkan lesi histopatologi, sehingga vaksin perlu diperlemah sebelum digunakan untuk vaksinasi *in ovo*.

Kata-kata kunci : *bursa Fabricius*, patologi, telur ayam berembrio, Gumboro, vaksinasi *in ovo*

ABSTRACT

Bursa Fabricius is a target organ of gumboro virus infection which is often damaged after vaccination using hot intermediate gumboro live vaccine. The purpose of this study was to assess pathologic effect of local and commercial gumboro vaccines. As many as 45 embryo chicken eggs at nine day old were used in this research, then grouped into three groups of 15 embryos chicken eggs each, these were: Embryo chicken eggs without vaccination (Group I), vaccinated with IBD intermediate plus commercial vaccine (Group II) and IBD intermediate plus local vaccine (Group III). Vaccinations were done at 14 days old. All groups then terminated each three embryos at 12 hours, 1, 2, 3 days post vaccination. The results showed that pathologic anatomic lesions could not be detected. Whereas pathologic lesions were detected in the group that were vaccinated with intermediate plus local IBD observed more severe than in the group that vaccinated with intermediate plus commercial IBD. Lesions such as edema, hemorrhages, necrosis of lymphoid cells were observed microscopically in embryo at 12 hours, 1, 2 and 3 days post vaccination in Group II and group III. The lesions were more severe at two days post vaccination causing some lymphoid follicles disappeared at

three days post vaccination. However, they were not detected again in the bursa Fabricius three days after hatching. Cells containing antigens of gumboro were detected in the bursa Fabricius of chicken embryo at one day until three days post vaccination, then disappeared after three days post hatch. It was concluded that pathologic description of bursa fabricius showed that virus vaccines used for vaccinated IBD in ovo were still virulent, that can cause histopathologic lesions. The viruses are suggested to be more attenuated before using as vaccine in ovo.

Keywords: pathologic effect, bursa fabricius, embryonated chicken egg, gumboro, in ovo vaccination

PENDAHULUAN

Bursa Fabricius adalah organ limfoid primer pada ayam atau jenis unggas lainnya. *Bursa Fabricius* yang terletak di bagian dorsokaudal dari kolorektal unggas berfungsi sebagai organ pertahanan. *Bursa Fabricius* terbentuk sejak masa embrio dan menghilang setelah unggas dewasa. *Bursa Fabricius* tersebut mengalami kerusakan jika ayam terinfeksi oleh virus *infectious bursal disease* (IBD). Infeksi virus IBD atau penyakit gumboro hanya menyerang unggas dan serangannya berlangsung selama *bursa Fabricius* masih ada. Infeksi IBD tidak menjadi ancaman kembali setelah unggas dewasa. Fungsi *bursa Fabricius* kemudian diganti oleh organ limfoid lainnya seperti limpa, timus, atau sekaton sil.

Gumboro adalah penyakit yang disebabkan oleh virus yang termasuk dalam famili *Birnaviridae*, sesuai dengan namanya virus ini terdiri dari dua untaian RNA yang dibedakan atas serotipe 1 dan serotipe 2. Serotipe 1 bersifat immunosupresif yang umumnya menyerang ayam, sedangkan serotipe 2 menyerang unggas lain termasuk kalkun yang tidak menyebabkan hewan sakit. Berdasarkan tingkat keganasan virus IBD serotipe 1 dibedakan atas: *sub-clinical* (Sc-IBD), *classic virulent* (cv-IBD), dan *very virulent* (vvIBD) (van den Berg *et al.*, 2004). Penyakit Gumboro pertama kali ditemukan di Delaware Amerika Serikat dan hingga saat ini kasus masih sering ditemukan di peternakan ayam pedaging di Indonesia

Ayam yang terserang biasanya berumur di atas tiga minggu. Gejala klinis muncul 2-3 hari setelah ayam terpapar virus IBD (Etteradossi dan Saif, 2008). Gejala klinis yang umumnya terlihat adalah ayam lemah atau lesu, bulu terlihat kusam, sayap terkulai, dan kadang-kadang ditemukan kotoran berwarna putih yang menempel pada kloaka (Park *et al.*, 2009; Wahyuwardani *et al.*, 2008, Jackwood *et al.*, 2011). Pada saat dilakukan nekropsi (bedah bangkai) ditemukan perubahan berupa perdarahan pada otot dada dan otot paha

(Acribasi *et al.*, 2010), *bursa Fabricius* membesar, lumen *bursa Fabricius* berisi cairan berwarna kekuningan seperti gelatin, serta perdarahan *petechial* dan *ecchymotic* pada permukaan mucosa dan serosa *bursa Fabricius* (Stoute *et al.*, 2009; Jackwood *et al.*, 2009). Infeksi virus gumboro pada ayam dapat berakhir dengan kematian (Park *et al.*, 2009), dan apabila ayam bertahan hidup, kekebalan ayam terhadap serangan penyakit lain akan menurun. Tingkat morbiditas dan mortalitas sangat bervariasi tergantung jenis ayam dan tingkat keganasan virus. Tingkat kematian dapat mencapai 56,09% pada ayam pedaging dan 25,08% pada ayam petelur (Zelege *et al.*, 2005). Sementara itu, infeksi buatan pada ayam *specific pathogen free* umur tiga minggu, kematian dapat mencapai 60% (Jeon *et al.*, 2008), bahkan dapat mencapai 100% pada ayam spf umur empat dan enam minggu yang diinfeksi dengan vvIBD strain rB (Stoute *et al.*, 2013).

Pencegahan terhadap serangan penyakit gumboro atau IBD umumnya dengan melakukan vaksinasi yang biasanya sudah rutin dilakukan, dengan menggunakan berbagai jenis vaksin yang diaplikasikan pada ayam. Namun demikian kasus IBD masih sering terjadi di lapangan, yang diperparah dengan infeksi sekunder *Escherichia coli*, sehingga banyak menimbulkan kematian pada ayam yang terserang. Umumnya peternak akan segera menjual ayamnya sebelum waktu panen untuk mencegah kerugian yang lebih besar. Pada kandang yang pernah ditemukan kasus IBD dapat ditemukan kasus yang sama jika sanitasi kandang tidak diperhatikan dengan baik.

Pencegahan terhadap serangan IBD adalah dengan melakukan vaksinasi rutin di lapangan pada saat maternal antibodi terhadap IBD mulai menurun, yaitu memasuki minggu ke-3 umur ayam. Vaksinasi IBD yang sering digunakan saat ini adalah vaksin hidup yang dilemahkan, dari jenis *hot intermediet* yang masih patogenik. Vaksin jenis ini digunakan karena umumnya mempunyai sifat imunogenik dan imunoprotektif lebih tinggi dibandingkan vaksin

intermediet yang lain dan tergolong masih aman Syahroni *et al.*, (2007). Vaksin *hot intermediet* ini menyebabkan atrofi *bursa Fabricius* (OIE, 2007). Jika biosekuritas tidak dilaksanakan secara ketat, maka ayam yang divaksin gumboro mudah mendapatkan infeksi sekunder.

Beberapa penelitian penggunaan vaksin yang diaplikasikan *in ovo* atau pada masa embrio telah dilakukan, bahkan vaksin jenis ini sudah mulai dipasarkan. Jenis vaksin ini dilaporkan mempunyai kelebihan dibandingkan vaksin yang diaplikasikan pada masa pascatetas, yaitu *bursa Fabricius* tidak mengalami kerusakan (Moura *et al.*, 2007). Pemberian vaksin *in ovo* dapat memicu produksi antibodi yang bersifat protektif dengan titer antibodi yang tidak berbeda jika dibandingkan pada vaksinasi secara subkutan (Hassanzadeh *et al.*, 2006).

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan gambaran patologi *bursa Fabricius* embrio ayam pascavaksinasi IBD *intermediet plus* lokal dibandingkan dengan vaksin IBD *plus* komersial dan mendeteksi keberadaan antigen virus IBD pada *bursa Fabricius* embrio ayam.

METODE PENELITIAN

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap menggunakan telur *clean egg* sebanyak 45 butir, yang dikelompokkan menjadi tiga kelompok, masing-masing sebanyak 15 butir telur ayam berembrio (TAB). Kelompok-1 adalah kelompok kontrol, kelompok-2 adalah kelompok yang divaksin dengan vaksin IBD *intermediet plus* lokal dan kelompok-3 adalah kelompok yang divaksin dengan vaksin IBD *intermediet plus* komersial. Vaksinasi dilakukan pada TAB umur 14 hari dengan dosis 0,2 mL yang disuntikkan pada ruang *chorioallantois* dengan dosis 0,2 mL inokulum yang mengandung 100 TCID₅₀/50 µL *master seed* vaksin IBD *intermediet plus* isolat lokal dan satu dosis vaksin IBD *intermediet plus* komersial.

Pengamatan Perubahan Patologi Anatomi (PA) dan, Pembuatan Slide Histopatologi (HP)

Gambaran patologi baik secara makroskopis (perubahan patologi anatomi) maupun perubahan mikroskopik (histopatologi) diamati pada *bursa Fabricius* embrio ayam setelah 0,5; 1; 2; dan 3 hari pascavaksinasi,

dengan melakukan terminasi pada tiga ekor embrio ayam dan *day old chick* (DOC) umur tiga hari dari setiap kelompok. Terminasi embrio dilakukan dengan mengeluarkan TAB dari mesin tetas, kemudian dipindahkan ke dalam *freezer* dengan suhu 4°C selama 15 menit. Embrio kemudian dikeluarkan dari dalam telur dengan menggunakan pinset, kemudian dilakukan nekropsi (bedah bangkai). *Bursa Fabricius* dipanen, disimpan dalam fiksatif buffer normal formalin (BNF) 10%, selanjutnya diproses menjadi blok parafin untuk pembuatan preparat untuk pemeriksaan perubahan histopatologi dan pewarnaan immunohistokimia (IHK). Pewarnaan IHK dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan virus IBD pada *bursa Fabricius* (Hamoud *et al.*, 2007; Oladede *et al.*, 2009).

Perubahan PA pada *bursa Fabricius* yang terjadi dicatat dan difoto, selanjutnya *bursa Fabricius* dikoleksi dan disimpan dalam BNF-10%, sebagai bahan pembuatan blok parafin. Potongan organ *bursa Fabricius* yang telah difiksasi di-*triming* dengan ketebalan 5 cm, lalu dimasukkan ke dalam *tissue cassette* kemudian dehidrasi secara bertingkat dengan alkohol dan selanjutnya dimasukkan dalam *xylol* bertingkat untuk penjernihan. Setelah proses dehidrasi dan penjernihan organ dalam *tissue cassette* diisi dengan parafin cair dan didiamkan hingga terbentuk blok parafin. Blok parafin diiris dengan ketebalan 3,5-5,0 mm dan dilekatkan pada gelas objek. Preparat kemudian diwarnai dengan hematoxylin eosin (HE) menggunakan metode standar.

Perubahan (lesi) histopatologi diamati di bawah mikroskop cahaya untuk menentukan derajat keparahannya. Pengamatan lesi HP pada jaringan organ *bursa Fabricius* meliputi perubahan pada jaringan epitel, folikel limfoid, dan interstisial. Perubahan yang umum ditemukan pada infeksi IBD antara lain : nekrosis jaringan epitel, nekrosis sel limfoid pada folikel limfoid, edema, infiltrasi sel radang (Rautensclein dan Haase 2005) Parameter yang dihitung adalah jumlah folikel dari lima lapang pandang, yang diamati pada perbesaran 20 kali, dan rata-rata diameter folikel dari lima folikel.

Teknik Immunohistokimia

Pewarnaan IHK dilakukan pada potongan jaringan organ *bursa Fabricius* yang sudah dilekatkan pada gelas objek yang telah dilapisi dengan *L-Lysine-monohydrochloride* dan disimpan pada inkubator bersuhu 56°C selama

satu malam. Preparat kemudian dideparafinisasi dan rehidrasi secara bertahap dengan jalan dicelupkan ke dalam *xylol* dan alkohol secara bertingkat. Metode pewarnaan merupakan modifikasi dari Tanimura *et al.*, (1995) yang menggunakan *actinase E* sebagai *antigen retrieval* yang diinkubasikan selama lima menit. Bloking menggunakan serum kambing yang diinkubasikan selama 20 menit. Antibodi primer (antibodi monoklonal) diinkubasikan semalam dan antibodi sekunder diinkubasikan 30 menit, menggunakan Vectasin ABC kit, pewarnaan menggunakan *diaminobenzidine tetrahydrochloride*, sedangkan pada percobaan ini digunakan tripsin 0,5% sebagai *antigen retrieval* yang diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C, kemudian dicuci dengan PBS dingin. Aktivitas endogenous peroksidase di blok dengan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% selama 20 menit kemudian dicuci dengan PBS *tween*, dilanjutkan dengan *blocking* menggunakan susu skim 0,1% selama 30 menit. Setelah dicuci dengan PBS *tween*, antibodi primer 1:600 ditambahkan dan diinkubasikan selama satu jam pada suhu ruang. Preparat kemudian dibilas menggunakan PBS *tween*, lalu ditambahkan antibodi sekunder (Envision kit) dan diinkubasikan selama 45 menit. Preparat dicuci dengan air suling, selanjutnya dilakukan pewarnaan menggunakan *Amino Ethyl Carbazol* (AEC) sebagai kromogen yang memberikan warna kemerahan pada sel berantigen. Latar belakang diwarnai menggunakan *Lilie Mayer Hematok-silin* untuk mendapatkan warna kebiruan.

Keberadaan sel berantigen diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 20×10 pada tiga lapang pandang pada daerah yang mengandung sel berantigen. Jika per lapang pandang ditemukan sel berantigen dengan jumlah 1-5 diberikan skor satu, jumlah sel berantigen 6-10 diberikan skor dua dan jumlah sel berantigen di atas 10 diberikan skor tiga (Damayanti *et al.*, 2004). Selanjutnya hasil skoring dianalisis menggunakan Kruskal Wallis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Vaksinasi IBD menggunakan vaksin IBD intermediet *plus* isolat lokal maupun komersial pada embrio ayam, tidak menyebabkan perubahan anatomi yang nyata. Sementara itu, perubahan histopatologi yang ditimbulkan berupa: edema, infiltrasi sel heterofil, nekrosis,

proliferasi *reticuloendotelial system* (RES), pada folikel limfoid. Infiltrasi eksudat, edema, sel heterofil juga ditemukan pada kelompok kontrol, kemungkinan dalam hal ini telah terjadi infeksi non spesifik (Tabel 1). Oleh karena itu yang dianggap akibat infeksi virus IBD adalah: proliferasi RES, nekrosis, dan deplesi folikel limfoid. Epitel penutup plika tidak mengalami perubahan, namun mengalami penebalan karena proliferasi *progenitors* sel B yang berkolonisasi pada epitel *bursa Fabricius* dan selanjutnya akan membentuk folikel limfoid. Infiltrasi sel heterofil lebih banyak dijumpai pada embrio ayam yang diinfeksi IBD intermediet komersial dibandingkan dengan kelompok yang diinfeksi virus IBD intermediet *plus* lokal (Gambar 1). Proliferasi RES terlihat lebih banyak pada kelompok yang diinfeksi IBD intermediet *plus* lokal jika dibandingkan dengan kelompok yang diinfeksi virus IBD intermediet *plus* komersial.

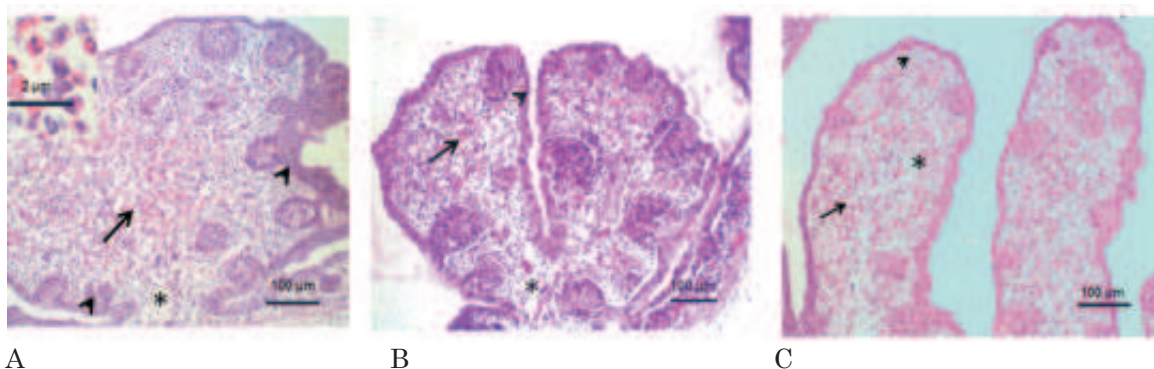
Proliferasi sel RES, infiltrasi sel heterofil, dan deplesi folikel limfoid masih ditemukan pada kelompok yang diinfeksi virus IBD intermediet *plus* lokal maupun komersial, dan eksudat ditemukan di lumen bursa pada semua kelompok perlakuan (Gambar 2). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa vaksinasi IBD dengan vaksin lokal dan komersial menyebabkan lesi berupa proliferasi RES, nekrosis sel limfoid, dan deplesi folikel limfoid, sedangkan lesi lainnya yang juga ditemukan pada kelompok kontrol, disebabkan infeksi non spesifik, yang tidak diketahui penyebabnya. Vaksinasi IBD Intermediet *plus* lokal menimbulkan lesi yang cenderung lebih parah dibandingkan dengan lesi yang ditemukan pada kelompok yang divaksin IBD Intermediet *plus* komersial. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan virus vaksin IBD Intermediet *plus* lokal yang digunakan masih cukup ganas.

Struktur *bursa Fabricius* anak ayam umur tiga hari yang divaksin dengan Intermediet *plus* lokal dan komersial pada saat embrio, tidak terlihat berbeda dengan struktur bursa kelompok ayam kontrol. Jarak antar folikel limfoid sudah terlihat rapat (Gambar 3) dan tidak ditemukan folikel limfoid yang mengalami deplesi, yang menunjukkan telah terjadi proses persembuhan. Jumlah sel heterofil dan sel makrofag sudah berkurang. Hasil ini menunjukkan bahwa vaksinasi IBD Intermediet *plus* lokal dan komersial pada embrio ayam umur 14 hari, tidak menyebabkan kerusakan permanen pada ayam setelah menetas, sesuai

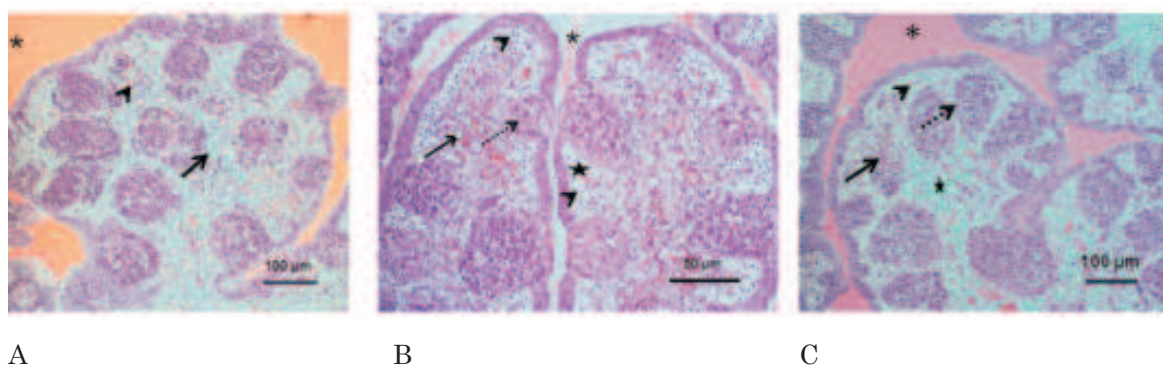
Tabel. 1. Lesi Histopatologi yang ditemukan pada bursa fabricius embrio ayam

No	Lesi Histopatologi	Divaksinasi IBD <i>Intermediate plus</i> lokal (hari pasca vaksinasi)					Diinfeksi IBD <i>Intermediate plus</i> komersial (hari paca vaksinasi)					Kontrol (hari pasca vaksinasi)				
		1/2	1	2	3	DOC	1/2	1	2	3	DOC	1/2	1	2	3	DOC
1.	Edema	v	v	v	v	-	v	v	v	v	-	v	v	v	v	-
2.	Sel Heterofil	v	v	v	v	-	v	v	v	v	-	v	v	v	v	-
3.	Eksudat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	v	-
4.	Proliferasi RES	v	v	v	v	-	v	v	v	v	-	-	-	-	-	-
5.	Nekrosis sel limfoid	v	v	v	v	-	v	v	v	v	-	-	-	-	-	-
6.	Deplesi limfoid folikel	v	v	v	v	-	-	-	v	v	-	-	-	-	-	-

* Keterangan : v : ditemukan lesi; - : tidak ditemukan lesi



Gambar 1. *Bursa Fabricius* embrio ayam umur 15 hari pada kelompok kontrol (A), kelompok yang divaksin IBD intermediet plus lokal (B), kelompok yang divaksin IBD intermediet komersial (C) : folikel limfoid sudah terbentuk (kepala panah), ditemukan sel heterofil (panah) dan ditemukan edema (asterik) pada jaringan interstisial. Insert perbesaran dari sel heterofil pada jaringan interstisial. Pewarnaan HE.



Gambar 2. *Bursa Fabricius* embrio ayam umur 17 hari (tiga hari pascavaksinasi) pada kelompok kontrol (A), Kelompok yang divaksin IBD intermediet plus lokal (B), kelompok yang divaksin IBD intermediet komersial (C) : terlihat folikel limfoid banyak yang masih utuh, edema (panah) dan infiltrasi heterofil (kepala panah) masih persisten terlihat, dan ditemukan eksudat pada lumen bursa (asterik). Pewarnaan HE.

Tabel 2. Rataan jumlah folikel limfoid dalam plika bursa fabricius embrio ayam percobaan yang diinfeksi pada umur embrio 14 hari

Kelompok Perlakuan	Waktu Terminasi(pascainfeksi/pi)			
	12 jam	1 hari	2 hari	3 hari
Kontrol	14,0 ^{efg}	21,07 ^{ed}	29,67 ^{bcd}	34,93 ^{bc}
Diinfeksi virus IBD <i>Intermediate plus</i> lokal	6,3 ^g	8,03 ^{fg}	35,60 ^{bc}	35,70 ^{bc}
Diinfeksi IBDv <i>Intermediate plus</i> komersial	18,5 ^{efd}	24,65 ^{cde}	38,45 ^{ab}	47,72 ^a

Keterangan : huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada taraf uji $\alpha \leq 0,05$

Tabel 3. Rataan diameter folikel limfoid dalam plika bursa fabricius embrio ayam percobaan (μm) yang diinfeksi pada umur embrio 14 hari

Kelompok Perlakuan	Waktu Terminasi (pascainfeksi)			
	12 jam	1 hari	2 hari	3 hari
Kontrol (tanpa infeksi)	41,21 ^f	51,22 ^f	69,87 ^{ed}	112,60 ^a
Diinfeksi virus IBD <i>Intermediate plus</i> lokal	46,60 ^f	65,31 ^{ed}	86,70 ^b	106,16 ^a
Diinfeksi virus IBD <i>Intermediate plus</i> komersial	46,60 ^f	53,54 ^{ef}	80,55 ^{bc}	106,19 ^a

Keterangan : huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada taraf uji $\alpha \leq 0,05$

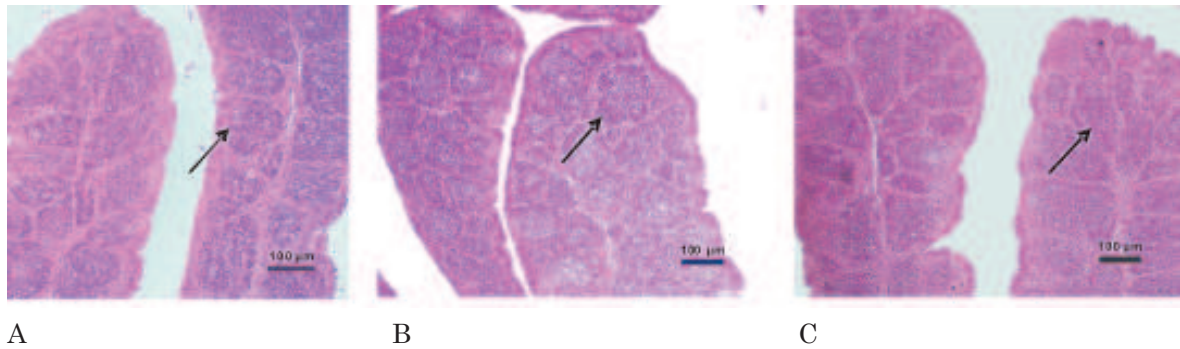
Tabel 4. Rataan skor jumlah sel positif terdeteksi antigen pada organ bursa fabricius embrio ayam dan DOC pada berbagai kelompok umur dan kelompok perlakuan yang diinfeksi IBD pada umur 14 hari.

Perlakuan	Umur embrio (pascavaksinasi)			DOC 3 hari
	1 hr	2 hr	3 hr	
Kelompok kontrol	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Diinfeksi virus IBD <i>Intermediate plus</i> lokal	3 ^b	3 ^b	3 ^b	0 ^a
Diinfeksi virus IBD <i>Intermediate plus</i> komersial	3 ^b	3 ^b	3 ^b	0 ^a

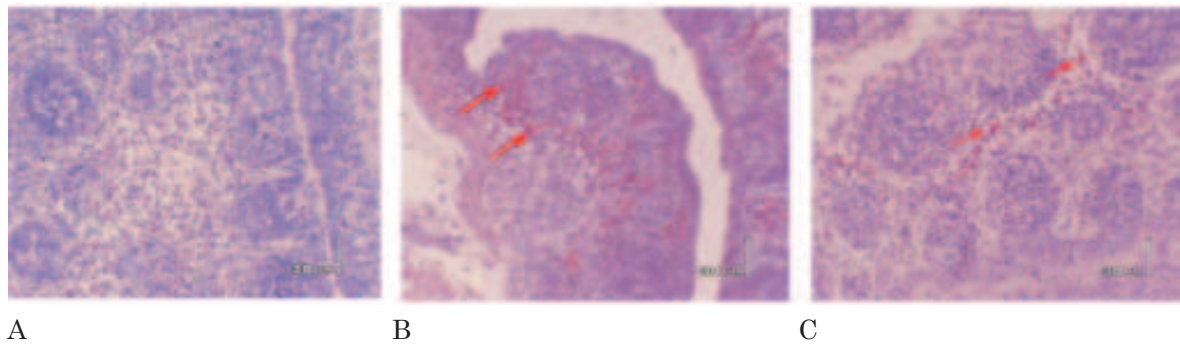
Keterangan : * huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada taraf uji $\alpha \leq 0,05$

dengan hasil penelitian Rautenslein dan Haase (2005). Lesi yang terjadi lebih cepat mengalami persembuhan pada vaksinasi *in ovo* dibandingkan vaksinasi IBD pascatetas. Hal tersebut diduga karena pada vaksin *in ovo* tidak menginduksi sel-T, karena keberadaan sel-T

yang menyebabkan persembuhan berjalan lambat (Rautenslein *et al.*, 2002). Repopulasi bursa Fabricius terjadi oleh aktivitas bursa stem cell yang menghasilkan folikel limfoid dengan morfologi dan fungsi yang normal. Sementara itu, sel B di bagian medula yang masih tersisa



Gambar 3. *Bursa Fabricius* ayam kelompok kontrol 3 hari pasca menetas. Folikel limfoid terlihat penuh dengan sel limfoid pada kelompok kontrol (A), Kelompok yang divaksin dengan vaksin IBD intermediet plus lokal (B), Kelompok yang divaksin dengan vaksin IBD intermediet plus komersial (C).



Gambar 4. Sel berantigen tidak ditemukan pada *bursa fabricius* embrio ayam kelompok kontrol (A), *bursa fabricius* embrio ayam yang divaksin IBD intermediet plus lokal (B) ditemukan sel berantigen tanda panah, *bursa fabricius* embrio ayam yang divaksin IBD intermediet plus komersial (C) ditemukan sel berantigen berwarna merah tanda panah.

membentuk folikel limfoid yang berukuran kecil (Withers *et al.*, 2006). Menurut Moura *et al.*, (2007), vaksinasi *in ovo* menggunakan IBD yang telah diatenuasi tidak menimbulkan kerusakan pada *bursa Fabricius*.

Jumlah folikel limfoid *bursa Fabricius* pada unggas normal kurang lebih sebanyak 820 (Olah dan Glick, 1978). Vaksinasi IBD Intermediet *plus* lokal pada embrio menyebabkan penurunan jumlah folikel limfoid pada *bursa Fabricius* yang berbeda nyata dibandingkan kelompok lainnya (Tabel 2). Penurunan jumlah folikel limfoid disebabkan terjadinya nekrosis sel limfoid yang dapat menyebabkan limfoid folikel terlihat kosong (Rautensclein *et al.*, 2002). Jumlah folikel limfoid tidak berbeda setelah tiga hari pascainfeksi. Sebaliknya, jumlah folikel limfoid *bursa Fabricius* embrio yang divaksin IBD Intermediet *plus* komersial mengalami

peningkatan yang lebih tinggi dibandingkan pada embrio ayam kelompok perlakuan atau kelompok yang divaksin IBD intermediet *plus*. Hal ini kemungkinan disebabkan *bursa Fabricius* embrio ayam mengalami respons yang berlebihan dalam memulihkan respons antibodi, yaitu dengan cepat membentuk folikel limfoid yang baru.

Diameter folikel limfoid *bursa Fabricius* atau ukuran folikel limfoid semakin besar dengan bertambahnya umur ayam (Tabel 3). Diameter folikel limfoid *bursa Fabricius* pada awal infeksi lebih besar dibandingkan dengan diameter folikel limfoid *bursa Fabricius* ayam kontrol. Pada *bursa Fabricius* ada dua macam folikel limfoid, yaitu folikel limfoid besar dan folikel limfoid kecil. Pada waktu terjadi infeksi virus IBD, dua jenis folikel limfoid tersebut dapat hilang, namun akan segera muncul folikel

limfoid baru. Folikel limfoid yang besar mengalami perkembangan cepat dengan struktur yang normal dalam rangka memulihkan respons antibodi, sementara folikel limfoid yang kecil tidak menghasilkan sel B yang responsif terhadap antigen (Withers *et al.*, 2006). Pada penelitian ini yang diukur adalah folikel limfoid yang besar, kemungkinan sel B pada ayam kelompok ayam yang divaksin mengalami proliferasi sel B yang cepat pada satu, dan dua hari pascainfeksi. Namun, pada hari ke-3 pascavaksinasi ukuran folikel limfoid *bursa Fabricius* cenderung lebih kecil dibandingkan pada embrio ayam kontrol (Tabel 2). Hal tersebut terjadi karena sel limfoid banyak yang mengalami nekrosis yang parah sehingga folikel limfoid banyak yang menghilang, sementara proses pemulihan berjalan lambat.

Deteksi Antigen Virus IBD pada *Bursa Fabricius*

Deteksi antigen virus IBD pada *bursa Fabricius* embrio ayam yang yang divaksin IBD Intermediet *plus* lokal dan komersial pada umur satu hari pascainfeksi menunjukkan hasil positif (Tabel 4). Antigen terdeteksi di daerah interstisial, maupun di bagian korteks dan medula folikel limfoid *bursa Fabricius* (Gambar 4). Antigen terdeteksi pada sel makrofag maupun sel limfoid dan sel heterofil, yang terdapat di dalam inti maupun di dalam sitoplasma sesuai yang dilaporkan oleh Kathri *et al.*, (2005). Sel berantigen tersebut terdeteksi mulai umur satu hari sejalan dengan meningkatnya sel makrofag, dan infiltrasi sel heterofil yang sudah ditemukan mulai umur satu hari pascainfeksi. Sel berantigen masih terdeteksi pada umur dua hari dan tiga hari pascainfeksi dengan jumlah antigen yang tetap banyak (skor 3). Mekanisme terdeteksinya antigen virus IBD pada sel-sel heterofil, makrofag, yang terdapat pada *bursa Fabricius* ayam, menunjukkan sistem kekebalan berperantara sel menjadi aktif selama tiga hari, pada saat vaksinasi IBD. Namun demikian, pada umur ayam tiga hari pascamenetas antigen tidak terdeteksi lagi pada sel limfoid *bursa Fabricius*, sejalan dengan hilangnya lesi, sel heterofil, serta sel makrofag.

SIMPULAN

Gambaran patologi *bursa Fabricius* embrio ayam pascavaksinasi pada kelompok IBD intermediet *plus* lokal menunjukkan lesi yang lebih parah dibandingkan lesi pada kelompok IBD intermediet *plus* komersial. Lesi mulai terlihat 12 jam pascavaksinasi berupa: edema, nekrosis, deplesi sel limfoid, dan deplesi limfoid folikel. Lesi tidak terdeteksi lagi pada organ *bursa Fabricius* ayam setelah tiga hari menetas.

Deteksi antigen pada *bursa Fabricius* kelompok embrio ayam yang divaksin IBD intermediet *plus* menunjukkan bahwa antigen virus IBD terdeteksi pada umur 12 jam pascavaksinasi hingga umur tiga hari pascavaksinasi. Antigen virus IBD tidak terdeteksi lagi pada umur tiga hari pascatetas. Hasil ini menunjukkan bahwa antigen virus telah tereliminasi pada ayam pascatetas, artinya ayam telah sembuh dari infeksi IBD.

SARAN

Vaksin yang digunakan untuk vaksinasi masih perlu dilemahkan lagi sehingga virus vaksin tidak menimbulkan lesi pada *bursa Fabricius* embrio ayam dengan derajat kerusakan yang parah. Perlu dilakukan pengamatan terhadap titer antibodi ayam pascamenetas hingga umur 14 hari pascainfeksi, untuk mengetahui apakah titer yang dihasilkan tersebut tetap tinggi dan bersifat protektif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Kementerian Pertanian yang telah memberikan dukungan dana dalam penelitian ini, Balai Besar penelitian Veteriner serta Laboratorium Patologi FKH-IPB yang telah menyediakan fasilitas selama penelitian berlangsung. Demikian juga ucapan yang sama penulis sampaikan kepada Bpk Kusmaedi dan Ibu Ani dari Lab Virologi Balai Besar Penelitian (BB Litvet), Bpk Yudi Mulyadi dan Bpk Ahmad Syarif dari Lab Patologi BB Litvet serta Bpk Kasnadi dari Laboratorium Patologi FKH-IPB yang telah memberikan bantuan teknis selama penelitian.

DAFTAR PUTAKA

- Acribasi M, Jung A, Heller ED, S.Rautenschlein S. 2010. Differences in genetic background influence the induction of innate and acquired immuneresponses in chickens depending on the virulence of the infecting Infectious Bursal Disease virus (IBDV) strain. *Vet Immunol Immunopathol* 135: 79–92.
- Damayanti R, Dharmayanti NLP, Indriani R, Wiyono A, Darminto. 2004. Detection of avian influenza virus subtype H5N1 in chickens organ that infected highly pathogenic avian influenza in East Java and West Java by Immunohistochemistry techniques. *Animal Sci and Vet J* 9: 197-203.
- Etteradossi N, Saif YM. Infectious Bursal Disease. 2008. In: Saif YM editors. *Disease of Poultry*. 12th ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional. p. 185-208. <https://himakahaunhas.files.wordpress.com/2013/03/disease-of-poultry.pdf> (5 Februari 2015)
- Hamoud MM, Villegas P, William SM. 2007. Detection of infectious bursal disease virus from formalin-fixed paraffin-embedded tissue by immunohistochemistry and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Vet Diag Invest* 19: 35-42.
- Hassanzadeh M, Fard MHB, Tooluo A. 2006. Evaluation of the immunogenicity of immune complex infectious bursal disease vaccine delivered *In ovo* to embryonated eggs or subcutaneously to day-old chickens. *Int J Poultr Sci* 5: 70-74.
- Jackwood DJ, Sommer-Wagner SE, Stoute ST, Woolcock PR, Crossley BM, Hietala SK, Charlton BR. 2009. Characteristics of a very virulent infectious bursal disease virus from California. *Avian Dis* 53: 592–600.
- Jackwood DJ, Sommer-Wagner SE, Crossley BM, Stoute ST, Woolcock PR, Charlton BR. 2011. Identification and pathogenicity of a natural reassortant between a very virulent serotype 1 infectious bursal disease virus (IBDV) and a serotype 2 IBDV. *Virology* 420: 98–105.
- Jeon WJ, Lee EK, Joh SJ, Kwon JH, Chang-Bum Yang CB, Yoon YS, Choi KS. 2008. Very virulent infectious bursal disease virus isolated from wild birds in Korea: Epidemiological implications. *Virus Res* 137 : 153–156.
- Kathri M, Palmquist JM, Cha RM, Sharma JM. 2005. Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus. *Virus Res* 113: 44-50.
- Moura L, Vakharia V, Liu M, Song H. 2007. *In ovo* vaccine against infectious bursal disease. *Inter J Poultr Sci* 6: 770-775
- OIE. (Office International des Epizooties). 2008. Infectious bursal disease (Gumboro disease). In: *Terrestrial Manual*. Chapter.2.3.12.
- Oladele OA, Adene DF, Obi TU, Nottige HO. 2009. Comparative susceptibility of chickens, turkey and ducks to infectious bursal disease virus using immunohistochemistry. *Vet Res Comm* 33: 112-121.
- Olah I, Glick B. 1978. The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius. Abstrak. *Poult Sci* 57: 1445-1450.
- Park JH, Sung HW, Yoon BII, Kwon HM. 2009. Protection of chicken against very virulent IBDV provided by *in ovo* priming with DNA vaccine and boosting with killed vaccine and adjuvant effects of plasmid-encoded chicken interleukin-2 and interferon- α . *J Vet Sci* 10(2): 131–139.
- 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* 147: 285-304.
- Rautenschlein S, Haase C. 2005. Differences in the immunopathogenesis of infectious bursaldisease virus (IBDV) following *in ovo* and post-hatch vaccination of chickens. *Vet Immun and Immunopathol* 106: 139-150.
- Stoute ST, Jackwood DJ, Sommer-Wagner SE, Cooper GL, Anderson ML, Woolcock PR, Bickford AA, Sentý'es-Cue' CG, Charlton BR. 2009. The diagnosis of very virulent infectious bursal disease in California pullets. *Avian Dis* 53: 321–326.

- Stoute ST, Jackwood DJ, Sommer-Wagner SE, Crossley BM, Woolcock PR, Charlton BR. 2013. Pathogenicity associated with coinfection with very virulent infectious bursal disease and Infectious bursal disease virus strains endemic in the United States. *J of Vet Diag Invest* 20(10): 1–7.
- Syahroni B, Handharyani E, Soejoedono R, Jusa E. 2005. Kajian Morfopatologi dan Imunologi pada ayam specific pathogen free (SPF) setelah divaksinasi dengan vaksin Gumboro aktif strain intermediate. *Bull Pengujian Mutu Obat Hewan* 11: 11-16.
- Tanimura N, Tsukamoyo K, Nakamura K, Narita M, Maeda M. 1995. Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. *Avian Dis* 39: 9-20.
- van den Berg, TP, Morales D, Etteradossi N, Rivallan G, Toquin D, Raue R, Zierenberg K, Zhang MF, Zhu YP, Wang CQ, Zheng HJ, Wang X, Chen, GC, Lim BL, Muller H. 2004. Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol* 33, 470–476.
- Wahyuwardani S, Agungpriyono DR, Parede L, Manalu W. 2011. Patogenesis virus Gumboro isolat lokal pada ayam pedaging. *J Veteriner* 12: 288-299.
- Withers DR, Davison F, Young JR. 2006. Diversified bursal medulary B cells survive and expand independently after depletion following neonatal infectious bursal disease virus infection. *Immunol* 117: 558-565.
- Zelege A, Gelaye E, Sori T, Ayelet G, Sirak A, and Zekarias B. 2005. Investigation on infectious bursal disease outbreak in Debre Zeit, Ethiopia. *Int J Poult Sci* 4: 504–506.