

PENGISOLASIAN VIRUS GUMBORO DARI LARVA DAN KUMBANG "DARKLING" (*CARCINOPS PUMILIO*)

LIES PAREDE, RISA INDRIANI, dan SUKARSIH

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O.Box 52, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 8 September 1995)

ABSTRACT

PAREDE, L., RISA INDRIANI, and SUKARSIH. 1996. The isolation of Gumboro virus from larvae and darkling beetles (*Carcinops pumilio*). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2 (1).

Gumboro (infectious bursal disease, IBD) virus was isolated from darkling beetles (*Carcinops pumilio*) and their larvae in a commercial pullet chicken farm with repeated outbreaks incidence of Gumboro disease in Tangerang, West Java. In addition, these over populated beetles and their larvae were suspected to be infected and then shed the virus or acted as vectors. Isolation was done by repeated passages of virus using chicken embryo fibroblast cells as prime media, which then showed the evidence of cytopathic effects. The isolation was followed by antigen detection by means of ELISA test.

Key words: Gumboro disease, infectious bursal disease, darkling beetle, *Carcinops pumilio*

ABSTRAK

PAREDE, L., RISA INDRIANI, dan SUKARSIH. 1996. Pengisolasian virus Gumboro dari larva dan kumbang "darkling" (*Carcinops pumilio*). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2 (1).

Virus Gumboro (penyakit bursitis infeksiosa, *infectious bursal disease*, IBD) telah dapat diisolasi dari sejenis kumbang (kumbang "darkling", *Carcinops pumilio*) dan larvanya di sebuah peternakan ayam petelur dara di daerah Tangerang, Jawa Barat, yang berulang kali terserang wabah penyakit ini. Selain itu, populasi kumbang dan larvanya yang berlebihan di peternakan tersebut diduga telah terinfeksi dan selanjutnya menularkan virus atau bertindak sebagai vektor. Pengisolasian dilakukan melalui pasase virus secara berulang dengan menggunakan biakan primer sel fibroblas embrio ayam, yang kemudian memperlihatkan perubahan kerusakan sel (*cytopathic effects*). Pengisolasian lalu dilanjutkan dengan pendeteksian antigen dengan menggunakan uji ELISA.

Kata kunci: Penyakit Gumboro, infectious bursal disease, kumbang "darkling", *Carcinops pumilio*

PENDAHULUAN

Penyakit Gumboro yang disebabkan oleh virus *infectious bursal disease* (IBD) (LUKERT dan SAIF, 1991) bersifat akut dan sangat menular, menyerang ayam dengan morbiditas mencapai 100%, angka kematian yang rendah, gangrenosa kulit dan bobot badan yang tidak optimal dapat terjadi pada ayam pedaging. Dikenal dengan virus Gumboro klasik (standar). Sifat virus ini dibedakan dengan varian yang ada di Amerika, yang menimbulkan gejala subklinis dan biasanya terdapat pada ayam umur 1-3 minggu. Tetapi sejak 1986, di berbagai negara di Eropa dan Asia, termasuk Indonesia, muncul virus IBD yang bersifat ganas, menimbulkan gejala klinis dan kematian sampai 60% pada ayam petelur dara, terutama bila disertai dengan infeksi sekunder. Gejala klinis dan kematian yang berlangsung hanya beberapa hari jelas terlihat pada ayam berumur 3-6 minggu (PAREDE, 1993).

Suatu peternakan ayam petelur yang masih dara (pullet) di daerah Tangerang (Jawa Barat) berulang kali menghadapi masalah penyakit Gumboro. Pada setiap periode pemasukan ayam baru tidak pernah terbebas dari serangan penyakit tersebut. Padahal DOC yang dikirim dari sumber yang sama ke beberapa lokasi peternakan di sekitarnya tidak mempunyai masalah demikian. Selain itu, program vaksinasi yang dipakai pun sama. Gejala klinis Gumboro muncul pada waktu ayam berumur 2-3 minggu, dan angka kematian pernah mencapai 17%.

Kecurigaan mulai dialihkan kepada penyebab lain. Perbedaan yang ada adalah tidak terjadi wabah pada peternakan yang mempunyai lantai semen, sedangkan pada peternakan yang selalu berulang terjadi wabah Gumboro mempunyai lantai tanah yang diberi sekam. Ternyata bahwa serangan (kumbang) tertentu sangat mudah berkembang biak di peternakan berlantai tanah yang diberi sekam sehingga populasinya meningkat. Serangga sejenis kumbang tersebut dikenal dengan nama *darkling*

beetle dengan nama Latin *Carcinops pumilio* (Gambar 1). Pengamatan mulai diarahkan kepada kumbang dan larvanya sebagai penyebab wabah. Kumbang dan larva yang besarnya 1-2 cm dan berwarna hitam dikumpulkan dalam jumlah yang cukup banyak, lalu dikirim ke laboratorium untuk pemeriksaan virologik.

Tulisan ini menjabarkan isolasi dan identifikasi virus Gumboro dari kumbang "darkling" dan larvanya.



Gambar 1. Larva dan kumbang darkling (*Carcinops pumilio*)

MATERI DAN METODE

Sampel yang diperiksa

Kumbang dan larvanya ditimbang untuk dibuat suspensi 10% dengan garam bufer fosfat (PBS) steril yang diberi antibiotika Penisilin (200 IU/ml) dan Streptomisin (200 µg), lalu ditambah 20% serum kebal anti ND, kemudian didiamkan 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya suspensi disaring dengan saringan berukuran 0,22 µm dan siap diinfeksi pada biakan sel primer fibroblas embrio ayam.

Virus

Virus Gumboro isolat lapang dipakai sebagai pembandingan (kontrol) positif pada perubahan atau kerusakan biakan sel primer fibroblas embrio ayam, sedangkan pembandingan (kontrol) negatif yang digunakan adalah suspensi medium dan biakan sel yang tidak diinfeksi.

Medium dan biakan sel fibroblas dibekukan sebanyak 3 kali, lalu disentrifuse 11.000 g selama 5 detik (mikrosentrifuse Eppendorf, Jerman), sedangkan supernatannya diambil untuk pendeteksian antigen.

Biakan jaringan sel primer asal embrio ayam

Biakan jaringan sel fibroblas embrio ayam (*chicken embryo fibroblast*, CEF) dibuat dari embrio ayam bebas patogen (*specific pathogen free*, SPF) umur 8 hari mengikuti metode standar (PURCHASE, 1980). Sel fibroblas dimasukkan sebanyak 10^4 sel/ml medium penumbuh (DMEM, 5% FBS, L-glutamine, Penstrep 100 IU, 100 µg) dan didistribusikan sebanyak 200 µl/lubang. Biakan tersebut dieramkan pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ 5% selama 24-48 jam atau bila sudah terbentuk sel selapis.

Cara isolasi

Suspensi serangga dan larva ditanamkan pada sel selapis fibroblas yang sudah disiapkan sebanyak 100 µl/lubang. Mikroplat tersebut dieramkan pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ 5% selama 3-4 hari. Suspensi dan biakan sel tersebut kemudian dibekukan sebanyak 3-4 kali, lalu disentrifuse 11.000 g selama 5 detik. Supernatan yang diambil disaring dengan saringan 0,22 µm dan siap untuk dipasase ulang pada biakan sel fibroblas atau untuk mendeteksi antigen. Kemudian dilakukan pasase berulang yang pada pasase keempat dan kelima sudah mulai terlihat kerusakan pada biakan sel. Suspensi berbagai pasase dideteksi terhadap adanya virus Gumboro secara *capture ELISA*.

Capture ELISA

Kandungan antigen di dalam biakan sel dan medium diuji dengan metode *capture ELISA* (Capture Antigen TropBio kit). Prinsip kerjanya mengikuti petunjuk dari produsen, yaitu sebagai berikut: Lubang mikroplat yang sudah dilapisi dengan antibodi monoklonal IBD masing-masing diberi 100 µl suspensi biakan sel IBD (sebagai kontrol positif), biakan sel CEF normal (sebagai kontrol negatif), biakan sel IBD dari berbagai pasase yang akan diperiksa, antigen standar kontrol positif dan negatif dari kit. Setelah diinkubasikan selama 1 jam pada suhu ruang, mikroplat dicuci dengan larutan penyangga 3-4 kali, diberi serum antibodi kontrol positif Gumboro sebanyak 50 µl setiap lubang, dieramkan 1 jam pada suhu ruang, dicuci dengan larutan penyangga 3-4 kali. Kemudian diberi antibodi (Ab kambing anti-ayam) yang

sudah dikonjugasi dengan *horse radish peroxidase* (HRPO) sebanyak 50 µl setiap lubang dieramkan 1 jam pada suhu ruang; dicuci dengan larutan penyangga 3-4 kali. Tahap terakhir diberi substrat ABTS [1mM 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline-sulfonic acid (Sigma Ltd); 0,5 mM H₂O₂ (pH 4,2) dilarutkan dalam 0,01M penyangga sitrat] sebanyak 100 µl setiap lubang. Setelah diinkubasikan 15 menit di tempat gelap pada suhu kamar, perubahan warna *optical density* (OD) dapat dibaca dengan memakai panjang gelombang 415 nm pada ELISA reader (Titertek, Multiskan^R, UK) dan dihitung memakai program TropBio.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perubahan pada biakan sel berupa kerusakan sel selapis dibandingkan dengan kontrol negatif dan diamati selama 3-4 hari sesudah diinfeksi. Kerusakan sel yang dikenal dengan *cytopathic effect* (CPE) mulai terlihat pada pasase keempat dan kelima (Tabel 1).

Tabel 1. Perubahan biakan sel primer fibroblas sesudah diinfeksi dengan suspensi kumbang dan larva, dan deteksi antigen Gumboro secara *capture ELISA*

Antigen virus Gumboro	Perubahan sel (CPE)	Deteksi Antigen
Kontrol + (Ag IBD standar)	TD	+
Kontrol + (IBD lokal)	+	+
Kontrol - (biakan sel)	-	-
Suspensi kumbang+larva:		
Pasase 2	-	-
Pasase 3	-	-
Pasase 4	+	+
Pasase 5	+	+

Keterangan:

TD = tidak dikerjakan

Ag IBD standar disediakan oleh kit TropBio

+ = positif

- = negatif

Demikian juga dengan metode *capture ELISA* antigen virus Gumboro tidak dapat dideteksi pada pasase kesatu sampai ketiga, tetapi sudah terdeteksi pada suspensi pasase keempat dan kelima. Perbandingan antara OD antigen positif (standar Lukert dan lokal) dan antigen pasase kesatu sampai kelima dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Perbandingan *optical density* antigen positif terhadap antigen negatif (ratio P/N)

Antigen virus Gumboro	Rataan OD	Rasio P/N
Kontrol + (Ag IBD standar)	(0,177)	17,7
Kontrol + (IBD lokal)	(0,371)	37,1
Kontrol - (biakan sel)	(0,01)	1,0
Suspensi kumbang+larva:		
Pasase 1	(0,039)	3,9
Pasase 2	(0,031)	3,1
Pasase 3	(0,030)	3,0
Pasase 4	(0,717)	71,7
Pasase 5	(0,371)	37,1

Keterangan:

+/- = rasio positif/negatif

+ = positif

- = negatif

Sebetulnya sudah dilaporkan bahwa hewan di sekitar kandang (peternakan) misalnya tikus dan serangga dapat menyebarkan virus Gumboro (SNEDEKER *et al.*, 1967; HOWIE dan THORSEN, 1981), walaupun tidak dijelaskan serangga seperti kumbang ini menularkan virus secara biologis, mekanis atau hanya sebagai vektor (pembawa virus tanpa menimbulkan sakit induk semang perantara tersebut).

Hasil ini menunjang bahwa Gumboro dapat ditularkan oleh kumbang *darkling* (*Carcinops pumilio*) dan larvanya, walaupun dalam hal ini tidak dapat dijelaskan apakah kumbang tersebut merupakan vektor atau hanya sebagai penular mekanis. Di samping itu, hasil ini pun menunjang beberapa laporan sebelumnya (LUKERT dan DAVIS, 1974; McFERRAN *et al.*, 1980) tentang kesulitan dalam mengisolasi virus Gumboro dan diperlukannya adaptasi beberapa kali pada biakan sel. Biakan primer sel fibroblas ayam dapat digunakan untuk mengisolasi virus Gumboro, tetapi membutuhkan pasase berulang (*blind passages*) sampai terlihat kerusakan sel (CPE). Hasil kerusakan pada biakan sel dikonfirmasi dengan uji deteksi antigen Gumboro secara ELISA. Kedua hasil ini menunjukkan bahwa ada hubungan antara jumlah virus minimal yang berbiak, adaptasi pada sel fibroblas primer dan perubahan CPE, dan jumlah antigen minimal yang dibutuhkan untuk dapat terdeteksi dengan metode *capture ELISA*. Sifat dan keganasan isolat tersebut masih perlu dipelajari lebih lanjut.

Juga hal ini membuktikan bahwa virus Gumboro dapat bertahan cukup lama dalam lingkungan yang sudah tercemar. Bila ada induk semang yang peka, yaitu dimulainya kelompok ayam baru, maka dengan mudah penyakit ini timbul kembali, karena infeksi baru akan terjadi dan seterusnya. Peranan antibodi bawaan pada

ayam muda menghambat terlihatnya gejala klinis sampai pada umur tertentu pada saat kekebalan bawaan sudah sangat rendah dan ayam mulai peka terhadap jumlah virus yang berkembang biak di kandang tersebut, sedangkan program vaksinasi belum sempat dikerjakan.

Hasil ini juga menunjukkan bahwa kebersihan kandang sesudah terjadi wabah sangat perlu diperhatikan untuk memutuskan siklus ulang perkembangan virus di lapangan. Untuk menanggulangi hal ini manajemen peternakan juga merupakan faktor yang perlu diperhatikan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kusmaedi dan Heri atas bantuan teknis yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

- HOWIE, R.I. and J. THORSEN. 1981. Identification of a strain of infectious bursal disease virus isolated from mosquitoes. *Can. J. Comp. Med.* 45: 315-320.
- LUKERT, P.D. and R.B. DAVIS. 1974. Infectious bursal disease virus: Growth and characterisation in cell cultures. *Avian Disease* 18: 243-250.
- LUKERT, P.D. and Y.M. SAIF. 1991. Infectious Bursal Disease. In: *Diseases of Poultry*. 9th ed; Eds: B.W. Calnek *et al.* Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, USA. pp. 648-663.
- McFERRAN, J.B., M.S. McNULTY., E.R. McKILLOP., T.J. CONNER., R.M. McCracken., D.S. COLLINS, and G.M. ALLAN. 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkey and duck: Demonstration of a second serotype. *Avian Path.* 9: 395-404.
- PAREDE, L. 1993. Laporan Proyek Hasil Penelitian Virus dan Penyakit Gumboro, kerjasama Balitvet dan P4N, Badan Litbang Pertanian.
- PURCHASE, H.G. 1980. 36. Cell-culture methods. In: *Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 2nd Edition. Editors: Hitchner, S.B. *et al.*, AAAP. pp:112-115.
- SNEDEKER, C., F.K. WILLS, and I.M. MOULTHROP. 1967. Some studies on the infectious bursal agent. *Avian Disease* 11: 519-528.