

Studi Kasus Newcastle Disease Velogenik pada Ayam Buras yang Tidak Diberi Vaksin

Reina Puspita Rahmaniar^{1}, Dyah Widhowati², Olan Rahayu Puji Astuti Nussa³, Jessica Amelia⁴*
1,2 Laboratorium Mikrobiologi, 3. Laboratorium Patologi, 4. Koasistensi
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya
60225, Surabaya
Puspita.reina@gmail.com, reinauspita@uwks.ac.id

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian studi kasus ini untuk mengetahui adanya kasus Newcastle Disease (ND) dari ayam buras yang tidak divaksinasi dari perubahan patologi anatomi secara makroskopis dan mikroskopis, isolasi virus serta deteksi antigen dan antibodi. Metode yang dilakukan yaitu dengan melakukan nekropsi, pengamatan lesi pada organ, pembuatan histopatologi, isolasi virus pada Telur Ayam Berembrio (TAB) pada umur 10 hari dengan rute allantois. Pengujian titer antigen menggunakan HA rapid dan mikroteknik sedangkan pengujian antibodi menggunakan uji HI mikroteknik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ayam buras dengan kode sampel A-205 terinfeksi virus ND velogenik (ganas) karena terjadi kematian embrio kurang dari 60 jam, pada organ otak terjadi encephalitis serta pada paru-paru terjadi pneumonia hemoragika

Kata Kunci: Newcastle Disease, Ayam, Velogenik, Vaksin

ABSTRACT

This case study research aims to determine the presence of Newcastle Disease (ND) from unvaccinated free-range chickens from macroscopic and microscopic anatomical pathological changes, virus isolation, and detection of antigens and antibodies. The method used is carrying out a necropsy, observing lesions on organs, making histopathology, and isolating the virus in embryonated chicken eggs (TAB) at the age of 10 days using the allantois route. Antigen titer testing uses HA rapid and microtechniques while antibody testing uses the HI microtechnique test. The results of the study showed that free-range chickens with sample code A-205 were infected with the velogenic ND virus because embryos died in less than 60 hours, encephalitis occurred in the brain and hemorrhagic pneumonia occurred in the lungs.

Keywords: Newcastle Disease, Chicken, Velogenic, Vaccine

Latar Belakang

Penyakit Newcastle (ND) adalah salah satu penyakit menular yang menyebabkan morbiditas dan mortalitas tinggi pada peternakan unggas. Penyakit ini disebabkan oleh virus Newcastle Disease (NDV) atau avian paramyxovirus-1 (APMV-1) yang termasuk dalam genus Avulavirus dari keluarga Paramyxoviridae (Shofa *et al.*, 2018).

Wabah ND biasanya mengakibatkan tingkat kematian mulai dari 80% hingga 100% pada unggas yang tidak divaksinasi, sehingga menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar akibat kematian unggas. Penyakit ini dapat ditularkan melalui berbagai rute, termasuk kotoran burung, ekskresi, kontak langsung, penularan melalui udara dan bahan yang terkontaminasi seperti kendaraan, makanan, atau kandang yang terinfeksi (Ipara *et al.*, 2023). Faktor-faktor yang berkontribusi terhadap prevalensi ND yang berkelanjutan pada unggas yang divaksinasi antara lain adanya penyakit immunosupresif bersamaan, mutasi virus yang mengubah sifat biologis dan patogenisitas virus NDV (Hassanzadeh *et al.*, 2024).

Penyakit ND yang sangat menular dan fatal pada unggas domestik, secara klinis dimanifestasikan dengan tanda klinis gastroenteritis hemoragik, pneumonia, ensefalitis tergantung pada faktor-faktor seperti strain virus, jenis, usia, status kekebalan dari spesies unggas yang terkena dan faktor eksternal lain (*Kariithi et al., 2023*). Penyakit ini sering berakibat fatal, ditandai dengan beberapa infeksi otak, saluran pernapasan dan pencernaan. NDV juga dapat menginfeksi manusia, tetapi hanya menyebabkan gejala mirip flu ringan, konjungtivitis, radang tenggorokan. Konjungtivitis biasanya sembuh dengan cepat, dalam beberapa kasus gejala demam dan sakit kepala juga telah dilaporkan pada manusia namun tidak ada bukti yang ditemukan untuk mendukung penularan dari manusia ke manusia tetapi terdapat potensi penularan dari manusia ke unggas (*Ashraf and Shah, 2014*).

NDV diklasifikasikan menjadi tiga jenis, berdasarkan kekuatan virulensinya antara lain, Velogenik, menyebabkan penyakit gastrointestinal dan neurologis yang mengakibatkan tingkat kematian burung yang terinfeksi tinggi, Lentogenik menyebabkan penyakit pernapasan ringan dan Mesogenik, menghasilkan tanda-tanda pernapasan dan saraf (*Ahmad et al., 2014*).

Penyakit ND selain menyebabkan kerugian ekonomi karena morbiditas juga menyebabkan penurunan produksi telur. ND telah menyebabkan kerugian yang signifikan dalam industri perunggasan di berbagai belahan dunia termasuk di Indonesia. Infeksi NDV virulen dapat menyebabkan tingkat kematian mencapai 100% menyebabkan pembatasan perdagangan internasional produk unggas (*Ansori and Kharisma, 2020*). Pentingnya penyakit ini pada industri perunggasan maka studi kasus dari lapangan dari ayam yang tidak divaksin perlu dilakukan untuk melihat perubahan patologi anatomi, perubahan histopatologi, hasil isolasi antigen serta pengujian antigen antibodi.

Metode

Pengambilan Sampel

Tahap awal dilakukan pemeriksaan fisik, observasi tanda klinis pada ayam buras dengan kode sampel A-205 dilanjutkan dengan pengambilan darah untuk keperluan uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI), selanjutnya dilakukan euthanasia dengan cara dislokasi cervicalis, dilakukan pengamatan perubahan patologi anatomi organ secara makroskopis untuk menentukan sampel yang diambil sampel untuk isolasi virus diambil dari organ yang mengalami lesi yaitu otak dan pulmo untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi dan isolasi virus

Pembuatan Suspensi Virus

Pembuatan suspensi antigen atau inokulum berupa sampel organ atau jaringan diambil sebanyak 1 gram, digerus dan ditambahkan PBS sebanyak 4 ml, di *sentrifuge* dan *supernatant* diambil kemudian ditambahkan dengan antibiotika 1000-5000 IU *penicillin* dan 1000-5000 µg/ml *streptomycin*. Suspensi tersebut selanjutnya digunakan sebagai bahan untuk isolasi virus pada tahap berikutnya

Isolasi Virus

Telur ayam berembrio yang digunakan pada saat inokulasi dengan umur 10 hari yang diperoleh dari PUSVETMA Surabaya, TAB yg dipakai *Specific Pathogen Free* (SPF) serta dipastikan dalam keadaan hidup. Rute inokulasi pada allantois, sebanyak 1 ml suspensi virus diinokulasi ke dalam lubang setiap telur menggunakan jarum suntik 1 ml. Telur disterilkan dengan etanol 70% sebelum dan sesudah inokulasi. Lubang inokulasi ditutup dengan selotip dan telur kemudian disimpan di dalam inkubator. Pengamatan kematian embrio pada TAB dilakukan setiap dua kali sehari dengan *candling*, tahap berikutnya apabila embrio sudah mati, TAB disimpan di lemari es 4 ° C kurang lebih 18 jam sebelum panen untuk memastikan penyempitan pembuluh darah dengan tujuan menghindari penghisapan darah saat memanen cairan allantois (*Ahmad et al., 2014*). Cairan allantois yang diambil diperuntukkan untuk pengujian hemaglutinasi (HA) dan Hemaglutinasi Inhibisi (HI).

Pengujian HA

Uji HA dan HI untuk mendeteksi virus golongan myxovirus. Pengujian pertama yang dilakukan yaitu HA rapid, langkah awal dengan meneteskan antigen yang berasal dari allantois diatas *object glass* sebanyak 1 tetes, lalu ditambahkan suspensi eritrosit 2,5 % dengan konsentrasi sesuai kebutuhan sebanyak 1 tetes, dan homogenkan sambil diperhatikan adanya aglutinasi. Selanjutnya dilakukan Uji HA Mikroteknik untuk mengetahui titer antigen, langkah awal ialah mengisi lubang

mikroplate dengan 25 µl PBS mulai dari lubang 1-12, selanjutnya lubang 1 diisi dengan antigen yang berasal dari cairan allantois sebanyak 25 µl dan dilakukan pengenceran antigen menggunakan PBS pada lubang 1 dengan cara mengambil dan mengeluarkan campuran tersebut menggunakan mikropipet, kemudian dipindahkan ke lubang berikutnya. Demikian seterusnya sampai lubang 11 dan lubang 12 digunakan sebagai kontrol eritrosit (tanpa antigen). Langkah selanjutnya semua lubang diisi 50 µl eritrosit ayam 0,5%. kemudian dibaca titernya setelah inkubasi selama 30 menit. Interpretasi hasil HA mikroplate ialah adanya aglutinasi sempurna (100%) terlihat jelas berupa lapisan eritrosit secara merata (*diffuse*) pada dasar sumuran.

Pengujian HI

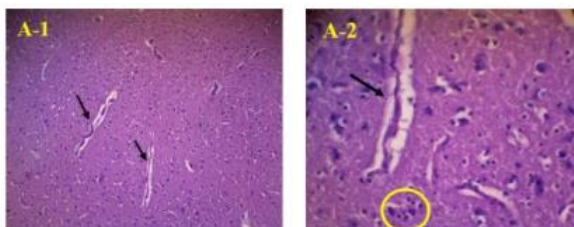
Uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI) bertujuan untuk mengetahui titer antibodi. Langkah awal dilakukan dengan mengisi lubang mikroplate sebanyak 25 µl PBS menggunakan mikropipet dari lubang 1 sampai 12. Selanjutnya lubang 1 dan 12 diisi dengan serum yang diperiksa sebanyak 25 µl menggunakan mikropipet. Kemudian homogenkan serum dan PBS pada lubang 1 dengan menarik dan mengeluarkan dari tip mikropipet sebanyak 25 µl dan dipindahkan ke lubang berikutnya sampai lubang 10. Langkah selanjutnya lubang 1 sampai 10 diisi dengan antigen 4 HA unit sebanyak 25 µl dengan menggunakan mikropipet, inkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, dan semua lubang diisi dengan eritrosit sebanyak 50 µl. dilanjutkan dengan pembacaan titer antibodinya setelah inkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Interpretasi hasil uji HI adalah nampak dari pengendapan eritrosit pada dasar lubang mikroplate yang terlihat seperti bentuk titik.

Hasil dan Pembahasan

Pemeriksaan patologi anatomi ayam buras dengan kode sampel A-205 menunjukkan adanya perubahan Makroskopis pada organ otak dan pulmo. Secara Makroskopis organ otak mengalami dilatasi pembuluh darah dan hemoragi sedangkan secara mikroskopis terdapat perivascular cuffing (Gambar 2. panah) dan gliosis (kuning). Hasil pemeriksaan tersebut sesuai dengan penelitian (Nofantri *et al.*, 2017) yang menyatakan lesi histopatologi yang ditemui pada otak ayam yang terinfeksi ND menunjukkan vaskulitis, gliosis, perivascular cuffing, edema perivascular dan nekrosis sel purkinje. Keberadaan virus ND menyebabkan terjadinya proses inflamasi. Beberapa respons inflamasi yaitu hiperemi, edema, perivascular cuffing dan gliosis. Salah satu usaha dari sistem syaraf untuk menjaga keutuhan neuron dari infeksi virus ND adalah terbentuknya gliosis. Penelitian (Angreini *et al.*, 2023) juga menunjukkan hiperemi pada otak akibat infeksi virus ND.



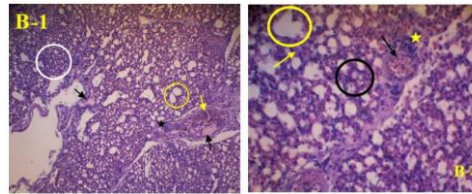
Gambar 1. Gambaran makroskopis otak A-205



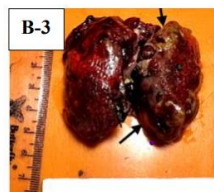
Gambar 2. Gambaran mikroskopis otak A-205. Pembesaran mikroskop gambar A1 HE Pembesaran 100X; A2 HE 400X

Menurut (Berata *et al.*, 2014) juga mengatakan bahwa perivascular cuffing merupakan respons dari imun dan manifestasi reaksi inflamasi. Lesi perivascular cuffing menunjukkan penyakit bersifat

kronis (Kattenbelt *et al.*, 2006). Perivascular cuffing merupakan akumulasi limfosit di sekitar pembuluh darah sebagai manifestasi reaksi peradangan atau respons imun (Hunt, 2013). Kasus-kasus penyakit yang bersifat neurotrofik, lesi perivascular cuffing menunjukkan penyakit bersifat kronis (menahun).



Gambar 3. Gambaran mikroskopis pulmo. Pembesaran mikroskop gambar B1 100X; B2 400X



Gambar 4. Gambaran makros pulmo A205 tampak nekrosis berat, uji apung tampak tenggelam (B3).

Gambaran makroskopis pulmo A-205 tampak nekrosis berat, sedangkan pada mikroskopis pulmo terdapat eksudat, kongesti, infiltrasi sel radang, emfisema, atelektasis, hiperemia dan rupturnya septa parabronkial. Hal ini sesuai dengan penelitian Putra *et al.*, (2012) bahwa lesi utama pada gambaran mikros pulmo A-205 tampak eksudat (panah hitam), kongesti (panah kuning), infiltrasi sel radang (bintang hitam), emfisema (lingkaran kuning), dan atelektasis (lingkaran putih) (B1); rupturnya septa parabronkial (panah), hiperemi (panah hitam), eksudat (lingkaran hitam), atelektasis (lingkaran kuning).

Hasil pengamatan kematian TAB saat *candling*, menunjukkan tidak terlihatnya pembuluh darah dan pergerakan embrio. Kematian TAB yang telah diinokulasi suspensi otak ayam A205 mengalami kematian setelah 48 jam. Hal ini menunjukkan bahwa virulensi ND yang menginfeksi ayam buras A-205 adalah strain velogenik (ganas). TAB yang sudah mati dimasukkan ke dalam kulkas selama 24 jam. Artikel dari Wibowo dkk., (2012) menyatakan bahwa virus ND dapat dibedakan berdasarkan virulensinya yaitu velogenik kurang dari 60 jam, mesogenik antara 60- 90 jam dan lentogenik lebih dari 90 jam, pada penelitian Angeliya *et al.*, (2023) hasil inokulasi juga menunjukkan adanya kekerdilan, pertumbuhan bulu sedikit, terdapat pendarahan serta embrio mati kurang dari 60 jam, dinyatakan bahwa embrio TAB yang mengalami kematian kurang dari 60 jam termasuk dalam strain velogenik.



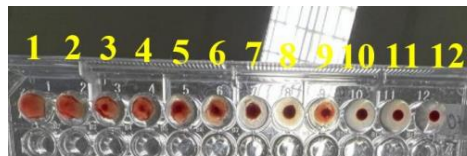
Gambar 5. perubahan embrio dari inokulasi suspensi otak

Pengamatan pada embrio yang telah diinokulasi dari suspensi otak menunjukkan hemoragi di seluruh tubuh, tidak ada bulu dan konsistensi rapuh. Putra *et al.*, (2012) menyatakan bahwa virus ND menyebabkan perubahan pada embrio berupa hemoragi di seluruh tubuh, kekerdilan dan tidak tumbuh bulu.

Pemeriksaan HA makroteknik atau uji HA rapid pada suspensi otak ayam A-205 didapati reaksi positif (+) berupa aglutinasi sempurna, tampak adanya bintik-bintik halus yang menyebar (Diffuse). Cahyani *et al.*, (2020) menyatakan bahwa uji HA dilakukan untuk mengetahui jumlah partikel virus yang dapat mengaglutinasi eritrosit. Uji HA merupakan suatu uji untuk mengetahui keberadaan antigen virus yang dapat mengaglutinasi eritrosit. Hemagutinasi terjadi karena adanya aktivitas hemglutinin pada dinding virus. Virus Newcastle Disease memiliki protein Hemaglutinin Neuraminidase (HN). Protein HN akan berikatan dengan reseptor asam sialat pada membran sel eritrosit (Mao *et al.*, 2022)



Gambar 6. Pengujian HA Rapid



Gambar 7. Pengujian HA Mikroteknik

Hasil positif juga ditemukan pada uji HA mikroteknik, didapati hemaglutinasi pada sumuran ke 1 hingga 4 pada organ otak. Sehingga didapatkan titer antigen otak $2^4 = 16$ HA unit. Titer dengan nilai 2^4 memiliki arti bahwa pengenceran ke 4 merupakan pengenceran tertinggi dan menjadi batas akhir kemampuan antigen yang mampu mengaglutinasi eritrosit secara sempurna. Hasil titer yang diperoleh dapat dipengaruhi oleh virulensi virus. Semakin tinggi titer maka semakin virulen virus tersebut (Cahyani *et al.*, 2020).

Uji HI pada ayam buras menunjukkan reaksi negatif (-) ditandai dengan tidak adanya endapan dari sumur 1 hingga 10. Titer antibodi otak 2^0 . Sumur ke 11 dan 12 sebagai kontrol (Erina dkk., 2021) menyatakan bahwa uji HI dikatakan positif bila terbentuk endapan eritrosit yang terlihat seperti tetes air mata pada dasar *microplate*. Uji HI positif bila terjadi ikatan antara antibodi spesifik dengan antigen virus ND, sehingga virus ND tidak dapat mengaglutinasi eritrosit. Hasil titer antibodi ayam A-205 menunjukkan ayam tidak memiliki kekebalan terhadap serangan virus ND.



Gambar 8. uji HI mikroteknik

Hasil negatif ini diduga karena limfosit sebagai sel darah putih penghasil antibodi bermigrasi ke jaringan. pada keadaan kronis terjadi migrasi sel radang dari tempat proliferasi, pematangan, dan penyimpanan pada sum-sum tulang belakang ke jaringan, sehingga jumlah leukosit dalam sirkulasi darah menurun (Widyanti *et al.*, 2018). Gambaran mikroskopis pada organ lainnya seperti hepar dan pulmo dijumpai banyak infiltrasi radang, salah satunya limfosit. Sehingga ayam mengalami limfositopenia dan tidak menghasilkan antibodi yang cukup untuk menghambat virus ND. Penelitian yang dilakukan (Andriyani *et al.*, 2022), beberapa juga menunjukkan hasil yang sama, diperoleh 2 sampel sebagai seronegatif dengan titer 2^0 .

Berdasarkan hasil penelitian masih terdapat kasus ND dan hewan belum dilakukan vaksinasi. Sejauh ini, vaksinasi adalah pendekatan yang efektif untuk mengendalikan penyakit virus pada hewan. Vaksin adalah agen yang meningkatkan respon imun adaptif. Vaksinasi dapat mengurangi efek infeksi dan penyakit. Dengan demikian, sistem kekebalan tubuh mengenali agen infeksi sebagai benda asing (Ansori and Kharisma, 2020). Keragaman antigenik, patogenisitas, dan genetik dari NDV juga perlu dikaji untuk menjawab mengapa wabah ND selalu muncul atau endemik. Apabila vaksinasi terhadap NDV telah dilakukan secara rutin, namun kekebalan yang diinduksi vaksin tidak dapat menetralkan NDV di lapangan, perlu upaya baru untuk mengembangkan vaksin baru.

Kesimpulan

Berdasarkan studi kasus, ayam buras dengan nomor sampel A-205 yang tidak divaksinasi masih terisolasi virus ND dengan titer antigen 2^4 , dan titer antibodi 2^0 . terjadi encephalitis serta pneumonia hemoragika

Daftar Pustaka

- Andriyani, N. R., Shanti, A. R., Angeliya, L., Anggita, M., Untari, T., Wahyuni, A. E. T. H., Asmara, W., dan Wibowo, M. H. 2022. Deteksi Virus Newcastle Disease pada Burung Merpati (*Columba livia*) dan Burung Tekukur (*Streptopilia chinensis*) yang Menunjukkan Gejala Syaraf. *Acta Veterinaria Indonesiana*, 10(3):220–227.
- Angeliya, L., Mussama, A. A. A., Alawiyah, S., Guntoro, T., Srihanto, E. A., Kristianingrum, Y. P., Asmara, W., dan Wibowo, M. H. 2023. Karakterisasi Virus Newcastle Disease yang Diisolasi dari Burung Merak di Kota Palembang Sumatera Selatan. *Jurnal Sain Veteriner*. 41(1): 119.
- Angreini, M., Balqis, U., Irmawati Hasan, D., Aisyah, S., dan Nur Salim, M. 2023. Newcastle Disease Case in Broiler Chicken. *Jurnal Medika Veterinaria* 17(2):57–61.
- Ansori, A. N. M., dan Kharisma, V. D. 2020. Characterization of Newcastle Disease Virus in Southeast Asia and East Asia: Fusion Protein Gene. *EKSAKTA: Journal of Sciences and Data Analysis*. 1(1): 14–20.
- Ashraf, A., and Shah, M. S. 2014. Newcastle Disease: Present status and future challenges for developing countries. *African Journal of Microbiology Research*. 8(5): 411–416.
- Berata, I. K., Kardena, I. M., Winaya, I. B. O., dan Supartika, I. K. E. 2014. Kombinasi Lesi Badan Negri, Spongiform, dan Perivascular Cuffing pada Otak Anjing Penderita Rabies. *Jurnal Veteriner*. 15(3): 363–369.
- Cahyani, N. L. R., Suardana, I. B. K., dan Nindhia, T. S. 2020. Seroprevalensi Tetelo pada Peternakan Itik di Desa Takmung Kabupaten Klungkung. *Indonesia Medicus Veterinus*. 9(4): 641–649.
- Erina, Hanni Aninaidu, Zuhrawati, Etriwati, Abdullah Hamzah, Mahdi Abrar, M. D. A. 2021. Deteksi Antibodi terhadap Virus Newcastle Disease pada Burung Trucukan (*Pycnonotus goiavier*). *Acta Veterinaria Indonesiana*. 9(3): 173–178.
- Hassanzadeh, M., Abedi, M., Bashashati, M., Yousefi, A. R., Abdoshah, M., dan Mirzaie, S. 2024. Evaluation of the Newcastle disease virus genotype VII–mismatched vaccines in SPF chickens: A challenge efficacy study. *Veterinary and Animal Science*. 24(March): 100348.
- Ipara, B. O., Otieno, D. J., Nyikal, R. A., and Makokha, N. S. 2023. Farmers' awareness and perceptions on Newcastle disease in chicken: Evidence from high and low rainfall regions of Kenya. *Cogent Food and Agriculture*. 10(1)
- Kariithi, H. M., Volkening, J. D., Chiwanga, G. H., Goraichuk, I. V., Olivier, T. L., Msoffe, P. L. M., and Suarez, D. L. 2023. Virulent Newcastle disease virus genotypes V.3, VII.2, and XIII.1.1 and their coinfections with infectious bronchitis viruses and other avian pathogens in backyard chickens in Tanzania. *Frontiers in Veterinary Science*. 10(October)
- Kattenbelt, J. A., Stevens, M. P., and Gould, A. R. 2006. Sequence variation in the Newcastle disease virus genome. *Virus Research*. 116(1–2): 168–184.
- Mao, Q., Ma, S., Schrickel, P. L., Zhao, P., Wang, J., Zhang, Y., Li, S., and Wang, C. 2022. Review detection of Newcastle disease virus. *Frontiers in Veterinary Science*. 9(2).
- Michael Haryadi Wibowo, Tri Untari, A. E. T. H. W. 2012. Isolasi, Identifikasi, Sifat Fisik, dan Biologi Virus Tetelo yang Diisolasi dari Kasus di Lapangan. 13(4), 425–433.
- Nofantri, L., Berata, I. K., dan Anak Agung Ayu Mirah Adi. 2017. Studi Histopatologi Limpa dan

- Otak Ayam Terinfeksi Penyakit Tetelo. 6(5):417–427.
- 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. *Jurnal Sain Veteriner*. 30(1): 57–67.
- Shofa, M., Wibawan, I. W. T., Zarkasie, K., and Setiyaningsih, S. 2018. Molecular Analysis of Newcastle Disease Virus Isolated from A Vaccinated Layer Farm in Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 197(1)
- Umar Ahmada, Ismaila Ahmeda, Fauziah Othmana, and Yong Yoke Keonga, C., 2014. Effectiveness of Haemagglutination Test in Detection of Newcastle Disease Virus (NDV) AF2240 Strain from Harvested Allantoic Fluids of Infected Chicken Eggs Umar. *International Journal of Biomedical Research*. 5(10): 606–609.
- Widyanti, A. I., Suartha, I. N., Erawan, I. G. M. K., Anggreni, L. D., dan Sudimartini, L. M. 2018. Hemogram Anjing Penderita Dermatitis Kompleks. *Indonesia Medicus Veterinus*. 7(5): 576–587.