

Pengaruh Virus Newcastle Disease Isolat Virulen Terhadap Gambaran Histopatologi Otak dan Berat Embrio Ayam

(EFFECT OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS VIRULENT ISOLATES TO BRAIN HISTOPATHOLOGIC AND CHICKEN'S EMBRYO WEIGHT)

Maria Elisabeth Purnasari¹, Anak Agung Ayu Mirah Adi², Ida Bagus Oka Winaya²

1. Mahasiswa Pendidikan Profesi Dokter Hewan,
2. Laboratorium Patologi Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman Denpasar, Bali; Tlp. (0361) 223791, 701808.
Email maria.elisabeth199@gmail.com

ABSTRAK

Virus *Newcastle Disease* (VND) strain virulen menimbulkan gangguan pada sistem saraf, pencernaan dan pernafasan unggas, sementara pada embrio ayam infeksi menyebabkan gangguan pertumbuhan hingga menimbulkan kematian. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dari virus APMV-1 isolat Badung-2/AK/2014 terhadap berat embrio dan gambaran histopatologis otak dari embrio ayam. Penelitian ini menggunakan 18 butir telur ayam berembrio (TAB) berumur 11 hari yang dibagi ke dalam dua kelompok perlakuan, yakni kelompok A dan Kelompok B yang masing masing terdiri dari sembilan butir telur. Kelompok A diinokulasi dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dan kelompok B diinokulasi dengan isolat Badung-2/AK/2014. Tiga hari setelah diinokulasi, cairan allantois dari semua kelompok perlakuan dikoleksi. Untuk membuktikan bahwa kedua kelompok tidak saling mengkontaminasi maka dilakukan uji *hemagglutination* (HA) dan *hemagglutination inhibition* (HI). Embrio ayam dikeluarkan dari cangkang telur, kemudian ditimbang dan rerata berat embrio kelompok A dan B dianalisis dengan *independent sample T-test*. Setelah itu embrio ayam dinekropsi untuk diambil organ otak dan dimasukkan ke dalam *Neutral Buffer Formaline* (NBF) 10%. Selanjutnya dilakukan pembuatan preparat dengan teknik pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE). Lesi histopatologis diamati di bawah mikroskop dan hasil pengamatan disajikan secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat menimbulkan lesi histopatologis berupa vaskulitis dan edema perivaskuler pada otak dan mengakibatkan penurunan berat badan embrio ayam.

Kata kunci: *Virus Newcastle Disease*, berat embrio ayam, gambaran histopatologi.

ABSTRACT

Virulent Newcastle Disease Virus (NDV) infected in the chicken's embryo cause growth disorders and died. This research conducted to determine the development of the chicken's embryo and histopathological lesion of the brain post inoculated with isolates APMV type-1 Badung-2/AK/2014. This research used 18 Chicken's Embryo Eggs (CEE) day 11, were divided into the two groups. Group A inoculated with PBS and group B inoculated with NDV isolates Badung-2/AK/2014, every groups had nine CEE. After three days the allantoic fluid were collected then to be tested with HA and HI test. Chicken's embryos then to be weight. The average of body weight of each groups were then analyzed by independent samples T-test. The brain were removed and then inserted into NBF 10%, subsequently used for making preparations with staining technique HE. The result showed that NDV virulent isolate cause lesions such as vasculitis and perivascular edema and growth disorders such as loss of weight in chicken's embryo.

PENDAHULUAN

Newcastle disease (ND) atau dikenal dengan nama lain penyakit Tetelo, *Avian Pest*, *Avian Distemper*, *Ranikhet*, *Avian Pneumoencephalitis*, *Pseudo Vagel Pest*, merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus dari familia *Paramyxoviridae*, genus *Avulavirus*, spesies *Avian Paramyxovirus* serogrup *Avian Paramyxovirus tipe 1* (APMV-1). Virus ini merupakan virus *Ribonucleic Acid* (RNA), genom serat tunggal (*single stranded*), berpolaritas negatif dan beramplop. Familia *Paramyxoviridae* berbentuk *pleomorfik*, biasanya berbentuk bulat dengan diameter 100-500 nm namun ada pula yang berbentuk filamen, sedangkan panjang dari virus *Paramyxovirus* terlihat bervariasi (Miller *et al.*, 2010; Yussof dan Tan, 2001). Induk semang dan strain virus ND menentukan tingkat keparahan penyakit ini. Penelitian menunjukkan bahwa virus ND peka pada semua jenis unggas, tetapi paling patogen pada ayam baik ras maupun bukan ras terutama ayam muda (Abdelrhman *et al.*, 2013; Hewajuli dan Dharmayanti, 2011).

Dampak yang merugikan dari penyakit ND berupa kematian bagi unggas penderita, penurunan produksi telur dan daging, ditambah lagi dengan tingginya biaya pengendalian penyakit. *Newcastle disease* sendiri merupakan penyakit endemik di Indonesia, pertama kali ditemukan di Jakarta pada tahun 1926 oleh seseorang bernama Kraneveld, sejak saat itu penyakit ini dilaporkan terjadi di berbagai negara di seluruh penjuru dunia (Adi dan Astawa, 2014). Penyakit ND bersifat akut dan menular, menimbulkan gejala pada sistem pernafasan, pencernaan dan saraf pada unggas dengan angka mortalitas dan morbiditas antara 30%-100% tergantung strain virulensinya (Tabbu, 2000).

Berdasarkan sifat virulensinya ND dikelompokkan menjadi 3 patotipe yaitu, 1) *velogenik*, patotipe ini menimbulkan gejala pada sistem respirasi, digesti, dan saraf, angka morbiditas maupun mortalitas dapat mencapai 50-100% dan merupakan patotipe paling virulen; 2) *mesogenik* menimbulkan gejala pada pernafasan diikuti oleh penurunan produksi telur dan hambatan pertumbuhan pada ayam dewasa, angka morbiditas maupun mortalitas mencapai 50%; 3) *lentogenik*, biasanya tidak disertai gejala klinis dan tanda yang tidak spesifik pada ayam dewasa dengan angka morbiditas dan mortalitas 30% (Alexander dan Senne, 2008; Quin *et al.*, 2011).

Patotipe *velogenik* dibagi menjadi dua tipe yaitu *viscetropic-velogenic* dan *neurotropic-velogenic*. *Viscetropic-velogenic* ditandai dengan dengan pendarahan yang hebat pada saluran cerna sedangkan *neurotropic-velogenic* menimbulkan lesi yang dominan pada susunan sistem saraf dan minimal pada organ lain (Adi dan Astawa, 2014). Kelainan

pada sistem saraf yang disebabkan oleh virus menunjukkan gejala saraf pada ayam dewasa berupa tremor otot, tortikolis juga kelumpuhan sayap dan kaki (Alexander dan Senne, 2008).

Virus ND galur virulen mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan sampai menyebabkan kematian embrio ayam pada telur ayam berembrio (TAB), hal ini dapat digunakan sebagai penilaian karakter virulensi virus tersebut. Pada bentuk *velogenik*, menyebabkan kematian embrio ayam kurang dari 60 jam. Virus bentuk *mesogenik* menyebabkan kematian embrio ayam antara 60-90 jam, sedangkan bentuk *lentogenik* menyebabkan kematian embrio ayam lebih dari 90 jam pasca inokulasi (Alexander and Senne, 2008). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek yang ditimbulkan oleh infeksi virus ND isolat Badung-2/AK/2014 terhadap gambaran histopatologis otak dan berat embrio ayam.

METODE PENELITIAN

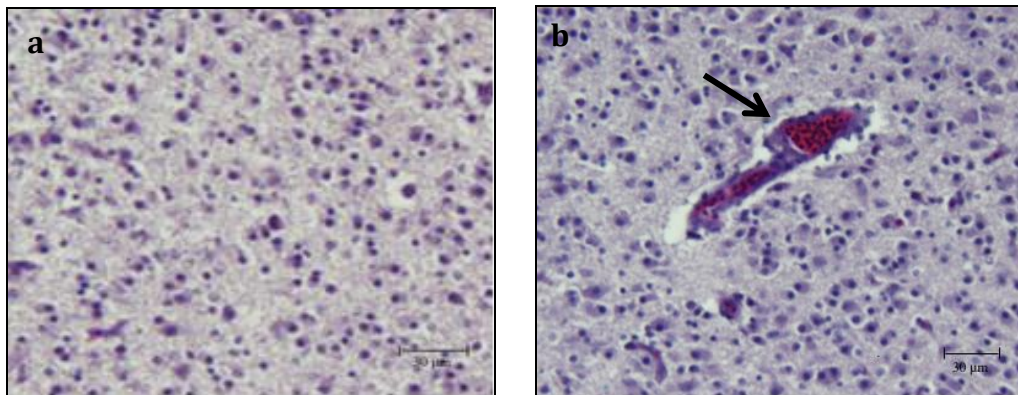
Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 18 TAB (Telur Ayam Berembrio) berumur 11 hari, didapat dari Balai Besar Veteriner Denpasar, Provinsi Bali. Telur ayam berembrio kemudian dibagi menjadi dua kelompok perlakuan yang terdiri dari sembilan butir TAB. Masing masing TAB pada Kelompok A diinokulasi dengan PBS sebanyak 0,2 mL sedangkan pada kelompok B diinokulasi dengan isolat *Avian Paramyxovirus* Tipe-1 (APMV-1) Badung-2/AK/2014 (Adi *et al.*, 2015) dengan dosis 0,2 mL pertelur. Semua TAB tersebut lalu diinkubasi selama tiga hari, di hari ketiga TAB dipanen dan cairan alantoisnya kemudian diuji dengan uji *hemagglutination* (HA) dan uji *hemagglutination inhibition* (HI) menggunakan serum ND rujukan. Tujuannya adalah untuk membuktikan bahwa isolat yang diinokulasikan memang mengandung virus ND. Embrio ayam dikeluarkan dari cangkang telur ditempatkan pada cawan petri, kemudian ditimbang. Tahap selanjutnya embrio ayam dinekropsi dan dikoleksi organ otak yang diduga sebagai salah satu tempat replikasi virus. Sampel otak kemudian difiksasi dengan cara direndam di dalam pot yang berisi NBF 10%. Kemudian dijadikan preparat histopatologi dan diwarnai dengan metode pewarnaan *Hematoxilin – Eosin* (HE). Seluruh kegiatan penelitian ini dilakukan sesuai dengan protokol di Balai Besar Veteriner Denpasar, Provinsi Bali.

Penelitian ini menggunakan dua metode yaitu metode kuantitatif dan metode kualitatif. Metode kuantitatif yaitu pengaruh ND pada variabel berat badan embrio ayam dalam gram. Metode kualitatif yaitu dengan mendeskripsikan perubahan histopatologis yang ditemukan pada otak embrio ayam. Data hasil pengukuran berat badan embrio ayam dikumpulkan dan

dianalisis menggunakan rancangan eksperimental *post test-only group control design* menggunakan uji *independent sample T-test*. Sementara untuk histopatologis otak dilakukan pengamatan di bawah mikroskop, dilihat lesi yang terjadi pada embrio ayam dari TAB yang diinokulasi PBS dan kelompok yang diinokulasi isolat APMV-1 Badung-2/AK/2014. Hasil pengamatan histopatologi kemudian dipaparkan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran mikroskopis otak embrio ayam dari kelompok TAB yang diinokulasi virus ND berupa vaskulitis dan edema perivaskuler pada *cerebrum* (Gambar 1a), sedangkan kelompok yang diinokulasi PBS terlihat normal (1b). Virus ND tipe *neurotropic-velogenic* memiliki karakteristik yaitu menimbulkan lesi yang dominan pada sistem saraf pusat dan sangat minimal pada organ lain dengan angka kematian yang tinggi (Adi *et al.*, 2010).



Gambar 1. Gambaran otak embrio ayam tiga hari pasca inokulasi PBS tidak ditemukan vaskulitis dan edema. (a), dan gambaran histopatologi otak embrio ayam tiga hari pasca inokulasi virus ND isolat Badung-2/AK/2014 terjadi vaskulitis dan edema perivaskuler pada *cerebrum*(→) (HE, 400X).

Beberapa infeksi virus yang bersifat sistemik seperti *mumps* dan *measles*, mencapai sistem saraf pusat melalui aliran darah (Oglesbee dan Niewiek, 2015). *Avian Paramyxovirus tipe 1* tipe *velogenic* dan *mesogenik* juga dilaporkan dapat mencapai otak dan bereplikasi pada jaringan otak (Adi dan Astawa, 2014). Lesi pada otak yang disebabkan oleh infeksi APMV ditemukan terjadi pada Burung Puyuh Jepang berumur 83 minggu (Usman *et al.*, 2008). Pada ayam broiler berusia 22 sampai 46 hari dengan penyakit ND, secara mikroskopik ditemukan *perivascular cuffing*, degenerasi neuron, nekrosis, dan proliferasi glial di otak besar, otak kecil, dan medula oblongata (Nakamura *et al.*, 2008).

Secara umum morfologi embrio ayam yang berumur 11 hari sudah terlihat seperti ayam dewasa, pada fase ini ukuran embrio menjadi lebih besar sehingga menyebabkan *yolk* menyusut (Hartono dan Isman, 2013). Menurut Alcantara *et al.* (2013), sistem pencernaan embrio ayam berdiferensiasi mendekati sempurna yakni pada hari ke 11 pasca inkubasi. Pada hari ke 10 sistem pernafasan, bursa fabrisius, limpa dan timus sudah terbentuk sempurna (terhitung dari TAB mulai dimasukkan ke dalam *incubator*).

Berdasarkan hasil penelitian rerata berat badan embrio ayam dari TAB yang diinokulasi PBS adalah 11,524 gram \pm 2,447 gram, sedangkan rerata berat badan embrio dari TAB yang diinokulasi virus adalah 7,213 gram \pm 1,899 gram. Dari hasil analisis komparasi dengan menggunakan *independent sample T-test* didapatkan bahwa rerata berat badan embrio ayam yang diinokulasi virus nyata lebih rendah ($p < 0,05$) dibandingkan dengan yang diinokulasi PBS (Tabel 1).

Tabel 1. Data berat badan embrio ayam yang diinokulasi virus ND dan PBS

Ulangan	Perlakuan	
	Inokulasi dengan PBS(BB/gr) (Kelompok A)	Inokulasi dengan VND (BB/gr) (Kelompok B)
1	13,200	8,010
2	8,260	3,988
3	12,139	6,960
4	8,800	6,851
5	14,810	6,110
6	11,920	6,610
7	12,970	10,700
8	13,320	6,600
9	8,300	6,090
Rerata	11,524	7,213*

*Catatan: Rerata berat embrio kelompok B lebih rendah dibandingkan dengan kelompok A ($p < 0,05$).

Pengamatan makroskopik embrio ayam yang diinokulasi dengan virus ND terlihat mengalami kekerdilan, hemoragi pada seluruh permukaan kulit, pertumbuhan bulu tidak berkembang dengan baik, bahkan ada pula yang sama sekali tidak ditumbuhi bulu. Embrio ayam yang diinokulasi PBS terlihat normal tanpa adanya kelainan yang terlihat. Hal ini sesuai dengan pernyataan Putra *et al* (2012) bahwa embrio ayam umur 11 hari yang diinokulasi virus ND virulen menimbulkan lesi hemoragi pada kulit ditandai dengan permukaan kulit yang berwarna merah, selain itu embrio juga mengalami kekerdilan.

Penyakit ND khususnya strain *velogenik* dan *mesogenik* mengakibatkan terjadinya penurunan berat badan pada embrio ayam, hal ini disebabkan oleh infeksi virus yang bersifat

sistemik (Masum *et al.*, 2014). Virus ND strain *velogenik* dan *mesogenik* dapat menyerang berbagai organ termasuk paru-paru, proliferasi pada paru-paru menyebabkan terjadinya nekrosis dan infiltrasi sel-sel radang (Arthur *et al.*, 2011). Replikasi virus ND tipe *mesogenic* biasanya pada mukosa terutama trakea dan esophagus. Myokarditis ditemukan pada kalkun SPF (*Specific Pathogen Free*) yang diinfeksi virus tipe *mesogenic*. Ini mengindikasikan adanya penyebaran virus ND terjadi secara sistemik dan berpotensi menyebabkan penyakit yang lebih parah (Piacenti *et al.*, 2006). Sementara virus ND yang bersifat *velogenik viscerotropik* dan *mesogenik* umumnya menyukai saluran pencernaan, terlebih-lebih virus yang bersifat *velogenik viscerotropik*, sistem pencernaan merupakan organ targetnya (Adi *et al.*, 2010). Pada sistem pertahanan seperti bursa fabrisius, ditemukan perdarahan dan kerusakan yang disebabkan oleh infeksi virus ND yang bersifat sistemik sehingga menimbulkan efek immunosupresif pada unggas (Masum *et al.*, 2014). Pada sistem saraf menyebabkan gejala klinis tortikolis. Infeksi virus yang bersifat sistemik ini merusak berbagai organ vital seperti otak, paru-paru, usus, dan organ lainnya. Pertumbuhan virus ND virulen merusak sel-sel epitel, makrofag, fibroblast, endotel, dan akhirnya menyebar ke seluruh tubuh embrio ayam dan mengakibatkan kematian (Wibowo *et al.*, 2012).

SIMPULAN

Virus *Newcastle disease* strain isolat Badung-2/AK/2014 menyebabkan penurunan berat badan pada embrio ayam dan menimbulkan lesi histopatologis pada otak berupa vaskulitis dan edema perivakuler.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai histopatologi pada organ yang berbeda, sehingga dapat diketahui organ apa saja yang dapat digunakan virus ND strain virulen sebagai tempat replikasi, khususnya APMV-1 isolat Badung-2/AK/2014.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih terutama kepada Balai Besar Veteriner Kelas I Denpasar, Provinsi Bali serta semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelrhman SS, Rihan EEM, Almotairy HM, Jassem AHA, Al-Blowi M. 2013. Sero-Virological studies on Newcastle Disease and Avian Influenza in Farmed Ostriches (*Struthio camelus*) in Saudi Arabia. *J World's Poult Res* 3(2): 38-42.
- Adi AAAM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi Y, Matsutomo Y. 2010. Isolation and Characterization of Pathogenic Newcastle disease virus from a Nature Case in Indonesia. *J. Vet. Med. Sci* 72(3): 313-319.
- Adi AAAM, Astawa NM. 2014. *Avian Paramyxovirus Tipe 1: Biologi dan Polimorfisme Genetik*. Swasta Nulus. Denpasar.
- Adi AAAM, Astawa NM, Putra IGAA. 2015. Pathological and Phylogenic Analysys of APMV-I Isolated from Neuronal Chicken Disorder. *The 6th International Conference on Bioscience and Biotechnology*. Denpasar.
- Alcantara D, Rodrigues MN, Francioli ALR, Fonseca ETD, Silva FMO, Carvalho RC, Fratini P, Sarmiento CAP, Ferreira AJP, Miglino MA. 2013. Embryonic Development of Endoderm in Chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Microscopy reseach and technique* 76: 803–810.
- Alexander DJ, Senne DA. 2008. *Newcastle Disease, Other Avian Paramyxovirus, and Pneumovirus Infection in: Disease of Poultry*. Iowa: Blackwell Publishing.
- Arthur SS, Subbiah M, Shive H, Collins PL, Samal SK. 2011. Experimental Infection Of Hamsters with Avian Paramyxovirus Serotypes 1 to 9. *Vet. Research* 42:38.
- Hewajuli DY, Dharmayanti NLPI. 2011. Patogenitas Virus Newcastle Disease pada Ayam. *Balai Besar Veteriner Bogor* 21(2): 72-80.
- Masum MA, Khan MZI, Nasrin M, Siddiqi MNH, Khan MZI, Islam MN. 2014. Detection of Immunoglobulins Containing Plasma Cells in Thymus, Bursa Fabrisius and Spleen of Vaccinated Boiler Chicken with Newcastle disease Virus Vaccine. *International JournalOf Veterinary Sci. and Med* 2(2): 103-108.
- Miller P, Decanini E, Afonso C. 2010. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, Genetics and Evolution* 10(1): 26-35.
- Nakamura K, Ohtsu N, Nakamura T, Yamamoto Y, Yamada M, Mase M, Imai K. 2008. Pathologic and immunohistochemical studies of Newcastle disease (ND) in broiler chickens vaccinated with ND: severe nonpurulent encephalitis and necrotizing pancreatitis. *Vet Pathol.* 45(6):928-33.
- Oglesbee M, Niewiek S. 2015. Measles Virus Neurovirulence and Host Immunity. *Future Virol* 6(1): 85-99.
- Piacenti AM, King DJ, Seal BS, Zhang J, Brown CC. 2006. Phatogenesis of Newcastle disease in commersial and specific pathogen-free turkey experimentally infected with isolates of different virulence. *Vet. Pathol.* 43:168 – 178.
- Putra HH, Wibowo MH, Untari T, Kurniasih. 2012. Studi Lesi Makroskopik dan Mikroskopik Embrio ayam yang Diinfeksi Newcastle Disease Virus Field Isolates. *Jurnal Sain Veteriner* 30(1): 50-67.
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. 2011. *Veterinary Microbiology and Mircobial Disease, Second Edition*. Blackwell Science Edition. Iowa.
- Tabbu, CR. 2000. *Diseases of Chicken and Their Control. Bacterial, Fungal, and Viral Diseases. Volume 1*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Usman B, Mani A, Yuguda AE, Diarra S. 2008. The Effect of Supplemental Ascorbic Acid on the Development of Newcastle Disease in Japanese Quai (*Coturnix coturnix Japonica*) Exposed to High Ambient Temperature. *International Journal of Poultry Science* 7(4): 328-332.

Wibowo MH, Utari T, Wahyuni AETH. 2012. Isolasi, Identifikasi, Sifat Fisik dan Biologi Virus Tetelo yang Diisolasi dari Kasus di Lapangan. *J. Vet.* 13(4): 425-433.

Yusoff K, Tan W. 2001. Newcastle disease virus: Macromolecules and opportunities. *Avian Pathology* 30(5): 439-455.