

Gambaran Mikroskopis Berbagai Organ Merpati yang Menunjukkan Gejala Tortikolis dan Identifikasi Virus Penyakit Tetelo Berdasarkan Uji Agar Gel Presipitasi

(*MICROSCOPIC OBSERVATION OF VARIOUS ORGANS OF PIGEONS WITH SYMPTOM OF TORTICOLLIS AND IDENTIFICATION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS BASED ON AGAR GEL PRECIPITATION TEST*)

Risang Aji Dewandaru¹, Ferdinand Prayogo Cahyo Santoso¹,
Sugiyono², Michael Haryadi Wibowo^{2*}

¹Mahasiswa Pendidikan Sarjana Kedokteran Hewan,

²Departemen Patologi,

³Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Gadjah Mada,

Jln Fauna 2, Kampus UGM Yogyakarta, Indonesia 55281

*Email: mhwibowo@ugm.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran mikroskopis organ burung merpati yang menunjukkan gejala tortikolis dan untuk melakukan identifikasi virus penyakit tetelo atau *Newcastle Disease* (ND) pada merpati tortikolis tersebut. Tiga ekor burung merpati dengan gejala tortikolis digunakan sebagai sampel dengan kode A, B dan C. Perubahan mikroskopis pada organ diamati dengan pembuatan preparat histopatologi dengan pengecatan Hematoksin dan Eosin (HE). Isolasi dilakukan dengan inokulasi sampel dalam ruangan alantois telur merpati berembrio yang diperoleh dari merpati yang tidak ada riwayat vaksinasi dan tidak terindikasi ND. Identifikasi virus ND dilakukan dengan uji agar gel presipitasi (AGP). Hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan bahwa merpati mengalami neuritis vagus, trakheitis, pneumonia, *air sacculitis*, hepatitis, pankreatitis, nefritis, jejunoileitis, ileokolitis dan orchitis. Otak ditemukan *perivascular cuffing*. Perubahan degeneratif ditemukan pada hepar dan ginjal. Jantung mengalami miokardial nekrosis, dan deplesi ditemukan di area pulpa putih lien. Proventrikulus menunjukkan epitel mukosa memipih, sedangkan organ pulmo ditemukan kongesti. Hasil isolasi dengan uji hemaglutinasi lambat cairan alantois telur merpati menunjukkan hasil positif HA dengan titer bervariasi antara 2, 32 dan 64. Identifikasi serologis dilakukan dengan Uji AGP pada semua sampel kultur dengan antiserum positif ND menunjukkan hasil positif terjadi presipitasi. Berdasarkan data histopatologi dan konfirmasi uji AGP tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa burung merpati dengan gejala tortikolis disebabkan oleh virus ND.

Kata-kata kunci: tortikolis; lesi mikroskopis; *Columba livia*; *Newcastle disease*

ABSTRACT

This study aimed to determine the microscopic conditions of organs of pigeons that suffered from torticollis and identify the cause of disease in torticollis pigeons. Three pigeons showed torticollis symptoms were obtained as sample and marked as pigeon A, B and C, respectively. Isolation of pathogen with inoculation into embryonated pigeon eggs obtained from parents with no history of vaccination and not indicated ND. Identification of ND with agar gel precipitation (AGP) test. Observation of microscopical changes with histopathologic preparation using hematoxylin and eosin staining. Histopathological examination showed that pigeons was done severe neuritis vagus, trakheitis, pneumonia, air sacculitis, hepatitis, pankreatitis, nefritis, jejunoileitis, ileocolitis and orchitis. Perivascular cuffing found in brain. Degenerative changes found in the hepar and ren. Cardiac severe necrotic lesion, and depletion in white pulp area of spleen. Proventricular tissue showed flattening of mucosal epithelium, congestion lesions found in pulmonary tissue. The results of slow hemagglutination test of pigeon egg allantoic fluid, which

tested for hemagglutination (HA) showed positive HA result with titers varying between 2, 32, and 64. Serological identification carried out with the AGP test on all culture samples against ND antiserum showing positive results of ND virus. Based on these data, it can be concluded that the pigeons with symptoms of torticollis is caused by ND virus.

Key words: Torticollis, microscopic lesions, *Columba livia*, Newcastle disease.

PENDAHULUAN

Tortikolis adalah suatu gejala gangguan saraf yang ditunjukkan dengan kondisi terpilinnya area leher dan kepala, biasanya diikuti tremor dan inkoordinasi leher (Capua dan Alexander, 2009), umum terlihat di berbagai jenis unggas yang dapat disebabkan oleh kausa infeksius, non-infeksius dan nutrisi (Ali *et al.*, 2014). Istilah tortikolis berasal dari bahasa Latin, yaitu kata *tortus* yang berarti terputar, dan kata *collum* berarti leher. Burung merpati adalah salah satu burung domestik yang dipelihara manusia untuk berbagai tujuan seperti makanan, hobi balap, dan pengobatan (Mushtaq *et al.*, 2006). Tortikolis menyebabkan penurunan *intake* pakan yang berdampak pada penurunan produksi dan fungsi ternak merpati sehingga menjadi tantangan bagi para peternak terhadap wabah penyakit dengan gejala tortikolis. Menurut Ali *et al.* (2014), penyebab tortikolis yang paling signifikan dan sudah banyak dilaporkan adalah pada kasus penyakit *Newcastle disease* (ND). Merpati merupakan salah satu unggas yang peka terhadap infeksi virus ND, selain ayam, kalkun dan angsa (Cattoli *et al.*, 2011).

Virus ND memiliki bentuk pleomorfik yang khas sebagai anggota subfamili *Paramyxovirinae*. Karakteristik virus diantaranya molekul tunggal RNA *single-stranded*, dengan genom virus ND tersusun dari 15.186 nukleotida. Dua protein penting diantaranya Protein Hemagglutinin-Neuraminidase (HN) dan Protein Fusi (F). Protein HN berfungsi pada pengikatan ke reseptor asam sialat, sehingga berperan dalam diagnosis dari sifat hemagglutinasinya dengan adanya protein tersebut (Samal, 2011), serta protein fusi sebagai mediator fusi amplop virus dengan membran plasma sel. Sifat patogenitas strain virus dapat dibedakan dari protein Fusi (Alexander dan Senne, 2008), virus lentogenik memiliki susunan asam amino monobasis, dan virus mesogenik dan velogenik memiliki susunan asam amino multibasis (Dortmans *et al.*, 2011).

Isolasi virus ND dapat dilakukan

menggunakan telur ayam berembrio (TAB) atau telur merpati berembrio (TMB) yang bersifat *Specific Pathogen Free* (SPF) atau setidaknya negatif antibodi terhadap ND. Kultur dilakukan dengan deposisi sampel inokulasi dalam ruang alantois (Al-Sheikhly *et al.*, 1979). Untuk mendeteksi adanya perkembangan virus ND dapat dilakukan dengan Uji hemagglutinasinya. Uji tersebut sangat sederhana, murah tetapi merupakan salah satu teknik yang cukup baik digunakan untuk mendeteksi virus ND dalam sampel kultur berdasarkan adanya reaksi ikatan eritrosit dengan *spike* hemagglutinin-neuraminidase (HN) virus ND. Sedangkan identifikasi virus ND secara serologis dapat dilakukan dengan uji HI menggunakan serum anti spesifik ND. Prinsip uji tersebut adalah dengan adanya serum anti spesifik ND akan berikatan dengan virus ND, sehingga ikatan virus pada sel darah merah akan dihambat (Thayer dan Beard, 2008). Demikian pula prinsip uji AGP adalah dengan adanya antigen terlarut, dalam hal ini virus ND yang dipertemukan dengan serum anti spesifik ND sehingga terjadi reaksi netralisasi yang menghasilkan presipitat yang dapat diamati (Leboffe dan Pierce, 2011). Menurut Turgeon (2014), antibodi yang berperan penting dalam proses presipitasi adalah imunoglobulin M (IgM). Antibodi tersebut juga dilaporkan merupakan antibodi yang dominan terhadap imunogen yang pertama kali dikenali (Ahmed *et al.*, 2007). Reaksi positif AGP ditunjukkan dengan adanya garis presipitasi antara sumuran antigen dan antibodi (Angi, 2009). Faktor-faktor yang sangat mempengaruhi formasi presipitat pada hasil uji, di antaranya: konsentrasi antigen atau antibodi yang terutama berdampak pada posisi terbentuknya garis; konsentrasi elektrolit; *buffer*; pH dan suhu (Shafer, 2006). Konsentrasi antara antigen dengan antibodi yang berdampak pada hasil presipitasi dikenal tiga istilah yaitu *prozone*, *equivalence zone*, dan *post-zone*. *Prozone* terjadi ketika konsentrasi antigen sangat rendah dan konsentrasi antibodi berlebihan, sehingga kompleks ikatan yang terbentuk kecil untuk tervisualisasi menjadi presipitat. *Post-zone* terjadi jika konsentrasi

antigen berlebihan sehingga jumlah antibodi yang mengikat antigen menjadi kurang dan reaksi terlalu kecil untuk membentuk presipitat. *Equivalence zone* adalah kondisi paling seimbang antara jumlah antigen dan antibodi sehingga presipitasi yang maksimal dapat terbentuk (Linjawi, 2017).

Kasus tortikolis pada merpati belum banyak di laporkan, oleh karena itu perlu diteliti penyebabnya dalam rangka penanganan unggas secara tepat. Gambaran lesi makroskopis dan mikroskopis pada berbagai organ merpati sangat mendukung konfirmasi diagnostik yang dilakukan. Data yang diperoleh juga penting dalam pengendalian penyakit ND karena peluang burung merpati dalam penyebaran penyakit ND pada ayam komersial.

METODE PENELITIAN

Burung merpati berjumlah tiga ekor, dengan dua ekor jantan dan satu ekor betina dewasa menunjukkan gejala tortikolis. Organ otak, nervus vagus, trakhea, pulmo, *air sac*, jantung, proventrikulus, ventrikulus, jejunum, ileum, kolon, hepar, limpa, pankreas, ginjal, testis dan ovarium yang telah diawetkan dalam larutan formalin 10%, dibuat preparat histopatologi. Organ diproses dengan *paraffin block* dan diberi perlakuan pewarnaan dengan *Hematoxylin & Eosin (H&E)*. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan sesuai dengan metode Alturkistani *et al.* (2016).

Media kultur virus secara *in ovo* digunakan telur merpati berembrio, inokulasi sesuai metode Gough *et al.* (1988). Sampel organ yang digunakan untuk isolasi adalah otak dan pulmo (Alexander dan Senne, 2008) dalam *viral transport media (VTM)* yang selanjutnya dibuat suspensi. *Phosphate buffer saline (PBS)* digunakan sebagai pengencer dan pencuci suspensi. Sentrifugasi 1000g selama sekitar 10 menit pada suhu 25°C (OIE, 2012). Supernatan diambil dan ditambah antibiotik gentamisin 0,25 mg/mL sebelum inokulasi, didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang (Alexander dan Senne, 2008). Sebanyak 0,05 ml dari masing-masing suspensi empat sampel diinokulasikan pada masing-masing telur merpati berembrio umur 11 hari melalui ruang korioalantois, diinjeksi dengan posisi jarum tegak lurus pada area ruang udara. *Candling* secara rutin dilakukan pada telur untuk mengetahui perkembangan embrio (Susanto dan

Suliswanto, 2013). Telur diinkubasi pada suhu 37°C tidak lebih dari tujuh hari. Telur yang mengalami kematian embrio segera didinginkan pada suhu 4°C. Cairan korioalantois dikoleksi untuk uji identifikasi.

Prosedur Uji hemaglutinasi (HA), uji agar gel presiptasi (AGP), dan uji hemaglutinasi inhibisi (HI) dilakukan sesuai metode Thayer dan Beard (2008). Cairan alantois telur merpati berembrio hasil inokulasi dari sampel gerusan pulmo dan otak disiapkan untuk dilakukan uji HA. Cairan alantois yang menunjukkan uji HA positif selanjutnya diidentifikasi serologis dengan uji AGP, menggunakan serum anti-spesifik ND yang diperoleh dari ayam petelur yang divaksin ND dengan titer HI 2⁶. Serum anti ND tersebut merupakan koleksi laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan UGM, sedangkan kontrol virus positif menggunakan virus vaksin *live attenuated ND strain LaSota*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran Penyakit pada Merpati.

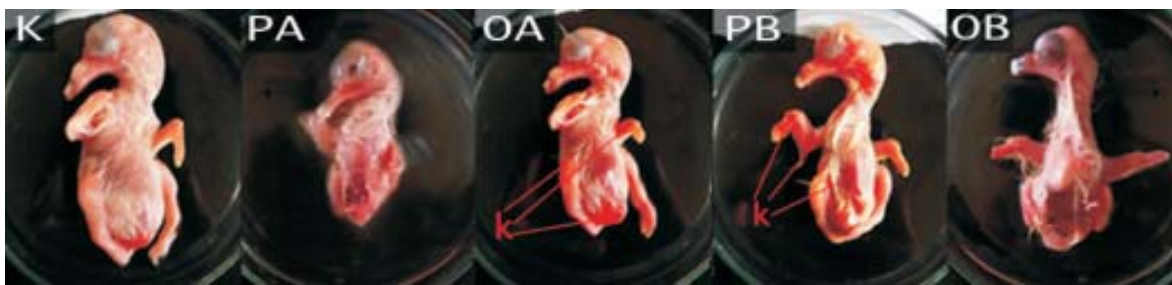
Merpati A dan B berasal dari peternakan I dengan populasi 20 ekor berumur enam bulan, morbiditas 20%, dan merpati C berasal dari peternakan II dengan populasi 20 ekor berumur enam bulan, morbiditas 15%. Gejala klinis yang muncul yaitu leher merpati tortikolis disertai inkoordinasi, dapat dilihat pada Gambar 1. Feses berupa diare berwarna kehijauan dengan konsistensi agak encer dan sedikit berair. Gejala klinis di peternakan I berlangsung selama dua minggu, sedangkan di peternakan II selama tiga hari. Jumlah kematian yang sama terjadi di kedua peternakan, yaitu masing-masing sebanyak dua ekor merpati atau mortalitas 10%. Dari anamnesa dan lesi tortikolis tersebut maka burung merpati dari kedua peternakan tersebut diduga akibat infeksi virus *Newcastle disease (ND)*. Data klinis ini sesuai dengan laporan (Ali *et al.*, 2014; Bukhari *et al.*, 2014) adanya kasus tortikolis yang disebabkan oleh penyakit ND. Morbiditas akibat infeksi ND pada merpati dewasa biasanya 10% atau lebih rendah (Capua dan Alexander, 2009).

Isolasi dan Identifikasi Penyebab Tortikolis

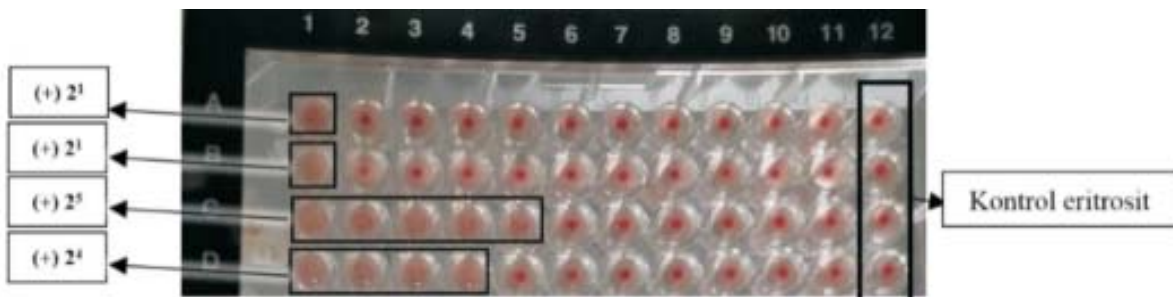
Hasil inokulasi pada telur merpati berembrio menyebabkan kematian embrio pada hari ke-3 pasca inokulasi (72 jam). Embrio



Gambar 1. Foto gejala tortikolis yang ditunjukkan oleh merpati hitam (A), merpati coklat (B) dan merpati putih (C).



Gambar 2. Foto embrio merpati pascainokulasi. Embrio kontrol (K) terlihat pertumbuhan normal dan tidak ada lesi; embrio yang diinjeksi sampel asal pulmo merpati A (PA) pertumbuhan terhambat dan berukuran paling kecil dari sampel embrio lain; embrio yang diinjeksi sampel asal otak merpati A (OA) terlihat kongesti (k) di sebagian area kulit; embrio yang diinjeksi sampel asal pulmo merpati B (PB) terlihat kongesti (k) di sebagian area kulit; embrio yang diinjeksi sampel asal otak merpati B (OB) terlihat gangguan pertumbuhan dan kongesti di beberapa titik area kulit.



Gambar 3. Foto hasil uji hemaglutinasi lambat. Sampel asal pulmo merpati A (baris A), otak merpati A (baris B), otak merpati B (baris C) dan pulmo merpati B (baris D).

merpati menunjukkan berbagai perubahan klinis, yaitu embrio teramat lebih merah karena kongesti area kulit, hemoragi, dan kekerdilan, yang dapat dilihat pada Gambar 2. Lesi tersebut tidak spesifik terhadap penyakit ND, tetapi mirip dengan lesi akibat infeksi virus lain pada embrio ayam (Hasan *et al.*, 2010; Putra *et al.*, 2012). Hemoragi, kekerdilan dan kerontokan bulu ditemukan pada embrio pasca infeksi buatan virus *Infectious Bursal Disease* (IBD) (Ebrahimi

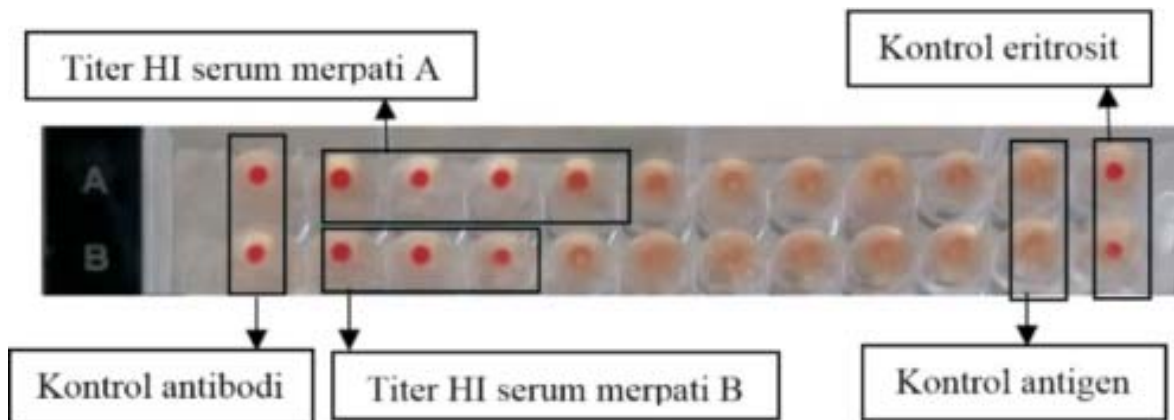
et al., 2013; Mutinda *et al.*, 2015), virus *Infectious Bronchitis* (IB) (Selim *et al.*, 2013), dan virus *Avian Influenza* (AI) (El-Zoghby *et al.*, 2012). Selain itu, lesi-lesi pada embrio yang disebabkan oleh virus dari hasil inokulasi yang pernah dilaporkan di Indonesia diantaranya : plak dan edema pada membran korioalantois akibat virus ILT (Wibowo *et al.*, 2002); embrio kerdil, hemoragi dan bulu rontok akibat virus AI (Wibowo *et al.*, 2006); dan hemoragi akibat



Gambar 4. Foto hasil uji AGP cairan korioalantois. Kontrol positif vaksin virus ND *Strain LaSota* (V); Cairan korioalantois asal suspensi pulmo merpati A (HP); Cairan korioalantois asal suspensi otak merpati A (HO); Cairan korioalantois asal suspensi pulmo merpati B (CP); Cairan korioalantois asal suspensi otak merpati B (CO); dan Serum anti-ND (S) koleksi dari ayam petelur yang divaksin dengan titer HI 2^6 . Terbentuk presipitasi antara sumuran serum dengan antigen yang ditunjukkan dengan anak panah (P).

positif memberikan informasi bahwa dalam cairan alantois terdapat perkembangan virus yang mempunyai protein hemaglutinasi. Uji HA tidak khusus sebagai pendeteksi virus ND, karena aglutinasi eritrosit dapat terjadi pada virus lain, diantaranya AI (Elfidasari *et al.*, 2014), *Infectious Bronchitis* (IB) (setelah perlakuan enzimatik khusus), serta Adenovirus dan beberapa spesies *Mycoplasma* (Thayer dan Beard, 2008), sehingga diperlukan identifikasi lebih lanjut menggunakan antiserum spesifik terhadap virus ND, dengan uji HI.

Data titer HA yang diperoleh pada penelitian ini adalah sebagai berikut : 2^5 , 2^5 , 2^1 dan 2^1 . Titer rendah yaitu 2^1 adalah sampel asal merpati A, dimungkinkan karena kurangnya propagasi virus, atau karena telur merpati yang digunakan untuk propagasi, membawa antibodi terhadap virus ND meskipun titer tidak tinggi. Faktor yang mempengaruhi hemaglutinasi dapat bervariasi pada masing-masing virus, diantaranya eritrosit asal hewan, pH pengencer, suhu inkubasi, pengenceran, volume dan perlakuan serum (Burlison *et al.*, 1992). Uji HI dengan serum anti ND yang dilakukan pada



Gambar 5. Foto Hasil Uji HI serologis titer antibodi serum merpati A (baris A) adalah 16 dan titer antibodi serum merpati B (baris B) adalah 8.

virus IBD (Wibowo *et al.*, 2015).

Hasil uji HA diketahui titer antigen dari sampel pulmo merpati B adalah 2^5 dan titer antigen dari sampel otak merpati B adalah 2^6 . Merpati A dengan sampel pulmo diketahui titer antigen adalah 2^1 dan sampel otak titer antigen adalah 2^1 . Hasil uji hemaglutinasi lambat diperlihatkan pada Gambar 3. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya aglutinasi yang dapat diamati sebagai bentukan berpasir pada dasar tabung (Leboffe dan Pierce, 2011). Uji HA

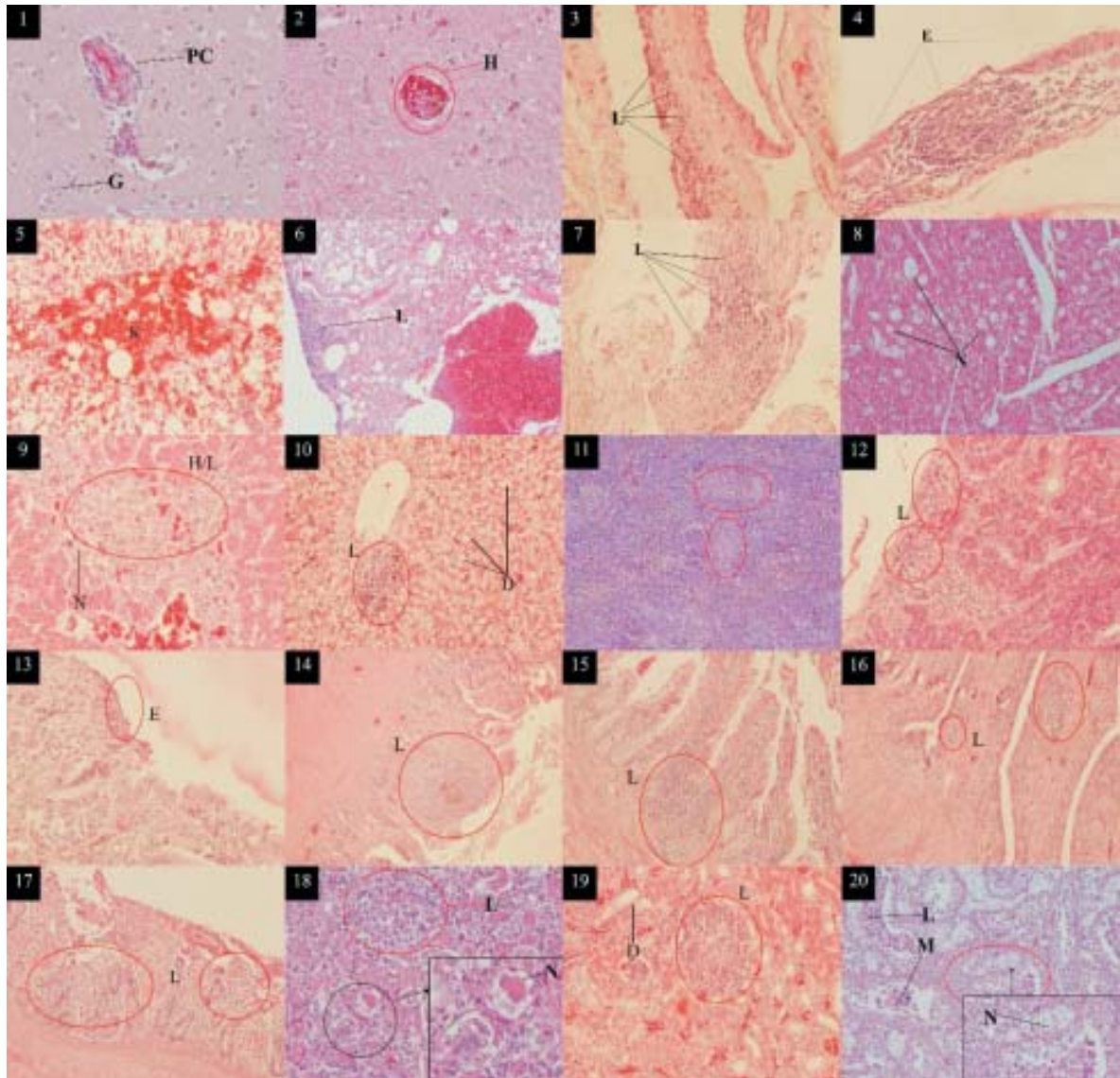
penelitian ini menunjukkan hasil negatif, meskipun sudah dicoba beberapa kali dengan teknis yang sesuai referensi. Hal tersebut diduga adanya perbedaan genotipe virus ND penyebab kasus ND pada merpati dengan virus ND pada ayam (Kim *et al.*, 2008 ; Miller *et al.*, 2014), sehingga diduga mempunyai perbedaan respon imunitas di antara dua genotipe yang berbeda tersebut.

Kegagalan dalam melakukan uji HI dalam penelitian ini dikonfirmasi dengan uji serologis

Tabel 1. Hasil pemeriksaan mikroskopis berbagai organ burung merpati sampel.

No.	Organ*	Sampel	Lesi Dominan	Derajat Keparahan
1.	Otak	Merpati A	<i>Perivascular cuffing</i>	-
2.	Nervus Vagus	Merpati A	Infiltrasi limfosit	+
3.	Trakhea	Merpati A	Erosi silia	-
4.	Pulmo	Merpati A	Kongesti	+
5.	<i>Air Sac</i>	Merpati A	Infiltrasi limfosit	+
6.	Ren	Merpati A	Degenerasi epitel	+
			Infiltrasi limfosit	+
7.	Hepar	Merpati A	Degenerasi hidrofik	++
			Infiltrasi limfosit	+
10.	Jantung	Merpati A	Infiltrasi Limfosit	-
11.	Pankreas	Merpati A	Infiltrasi limfosit	++
12.	Ventrikulus	Merpati A	Infiltrasi limfosit	-
13.	Proventrikulus	Merpati A	Penipisan epitel	+
14.	Jejunum	Merpati A	Infiltrasi limfosit	++
15.	Ileum	Merpati A	Infiltrasi limfosit	++
16.	Kolon	Merpati A	Infiltrasi limfosit	++
17.	Ovarium	Merpati A	Infiltrasi limfosit	-
18.	Otak	Merpati B	<i>Perivascular cuffing</i>	-
19.	Nervus Vagus	Merpati B	Infiltrasi limfosit	-
20.	Trakhea	Merpati B	Erosi silia	+
21.	Pulmo	Merpati B	Kongesti	++
22.	<i>Air Sac</i>	Merpati B	Infiltrasi limfosit	-
23.	Ren	Merpati B	Infiltrasi limfosit	+
24.	Hepar	Merpati B	Nekrosis	++
			Infiltrasi limfosit	+
			Infiltrasi limfosit	-
25.	Jantung	Merpati B	Infiltrasi limfosit	-
26.	Pankreas	Merpati B	Infiltrasi limfosit	+
27.	Ventrikulus	Merpati B	Infiltrasi limfosit	-
28.	Proventrikulus	Merpati B	Penipisan epitel	+
29.	Jejunum	Merpati B	Infiltrasi limfosit	++
30.	Ileum	Merpati B	Infiltrasi limfosit	++
31.	Kolon	Merpati B	Infiltrasi limfosit	+
32.	Lien	Merpati B	Infiltrasi limfosit	-
33.	Otak	Merpati C	<i>Perivascular cuffing</i>	++
			Hemoragi	+
			Infiltrasi limfosit	-
34.	Nervus Vagus	Merpati C	Infiltrasi limfosit	-
35.	Trakhea	Merpati C	Erosi silia	-
36.	Pulmo	Merpati C	Infiltrasi limfosit	+
37.	<i>Air Sac</i>	Merpati C	Infiltrasi limfosit	-
38.	Ren	Merpati C	Infiltrasi limfosit	+
			Nekrosis	+
39.	Hepar	Merpati C	Infiltrasi limfosit	++
40.	Jantung	Merpati C	Nekrosis	++
41.	Pankreas	Merpati C	Infiltrasi limfosit	-
42.	Ventrikulus	Merpati C	Infiltrasi limfosit	-
43.	Proventrikulus	Merpati C	Penipisan epitel	-
44.	Jejunum	Merpati C	Infiltrasi limfosit	++
45.	Ileum	Merpati C	Infiltrasi limfosit	++
46.	Kolon	Merpati C	Infiltrasi limfosit	++
47.	Lien	Merpati C	Deplesi pulpa putih	-
48.	Testis	Merpati C	Nekrosis tubulus seminiferus	+
			Infiltrasi limfosit	+

*Pewarnaan preparat digunakan *Hematoxylin & Eosin (H & E)*. Keterangan : + (parah); ++ (sangat parah); - (lesi tidak tampak).



Gambar 6. Foto mikrograf organ merpati terlihat : otak (nomor 1 dan 2) terdapat mononuklear *perivascular cuffing* (PC), gliosis (G) dan hemoragi (H) di parenkim; saraf vagus (nomor 3) terdapat infiltrasi limfosit (L); trakheia (nomor 4) ditemukan desiliasi epitel mukosa (E); pulmo (nomor 5 dan 6) mengalami kongesti (K) dan infiltrasi limfosit fokal di dinding parabronkus (L) *air sac* (nomor 7) mengalami penebalan disertai banyak infiltrasi limfosit (L); jantung (nomor 8) mengalami nekrosis miokardium disertai infiltrasi lemak (N); hepar (nomor 9 dan 10) mengalami nekrosis (N), infiltrasi heterofil dan limfosit (H/L), degenerasi hidrofik (D) serta infiltrasi limfosit (L); lien (nomor 11) mengalami deplesi pulpa putih ditandai dengan lingkaran; pankreas (nomor 12) mengalami infiltrasi limfosit (L); proventrikulus (nomor 13) mengalami perubahan pada epitel menjadi lebih pipih (E); jejunum (nomor 14) tampak infiltrasi sel radang limfosit di tunika mukosa dan tunika submukosa bersifat multifokal; ileum (nomor 15) tampak infiltrasi limfosit di tunika mukosa dan submukosa (L); sekum merpati A (nomor 16) tampak infiltrasi limfosit di tunika mukosa dan submukosa (L); kolon merpati kode B (nomor 17) tampak infiltrasi limfosit di tunika submukosa (L); ginjal (nomor 18 dan 19) nekrosis apparatus glomerulus beserta epitel glomerulus (N), degenerasi parenkimatosa epitel tubulus (D) dan infiltrasi limfosit (L); testis (nomor 20) terlihat nekrosis tubulus seminiferus (sel-sel nekrosis : N) disertai infiltrasi limfosit (L) dan makrofag (M) di tubulus seminiferus (Pengecatan H&E, perbesaran 10 x 40).

yang lain, yaitu dengan uji agar gel presipitasi (AGP) untuk memastikan keberadaan virus ND dalam sampel kultur. Hasil uji AGP dalam penelitian ini terbentuk garis presipitasi di antara sumuran antigen dan antibodi pada semua sampel, setelah inkubasi selama 48 jam, seperti yang diperlihatkan pada Gambar 4. Desain uji AGP dalam penelitian, tidak menggunakan serum anti berdekatan, sehingga tidak dapat ditunjukkan garis identitas, tetapi visualisasi reaksi ikatan spesifik antigen dan antibodi terhadap ND dapat diamati pada garis presipitasi yang terbentuk antara sumuran antigen dan antibodi. Faktor yang mempengaruhi formasi presipitat pada hasil uji diantaranya: konsentrasi antigen atau antibodi yang berdampak pada posisi terbentuknya garis; konsentrasi elektrolit dan *buffer* kondisi pH; dan suhu. Presipitasi yang baik dapat terjadi dengan adanya *equivalence zone*, yaitu kondisi paling seimbang antara jumlah antigen dan antibodi sehingga presipitasi yang maksimal dapat terbentuk (Linjawi, 2017).

Data uji HI yang dilakukan terhadap sampel serum dari merpati yang menunjukkan tortikolis yaitu: merpati A adalah 2^4 dan merpati B adalah 2^3 , dapat dilihat pada Gambar 5. Berdasarkan anamnesa yang diperoleh bahwa merpati tersebut tidak pernah dilakukan vaksinasi ND, membuktikan bahwa merpati menunjukkan adanya paparan infeksi virus ND, sehingga mempunyai kekebalan terhadap virus ND. Menurut Kapczynski *et al.* (2013), titer antibodi yang tinggi, yaitu 2^5 atau lebih, dapat dicapai dalam waktu 3-4 minggu setelah infeksi. Namun demikian adanya gejala penyakit yang telah lama muncul, dapat menjadi indikator kejadian penyakit telah berlangsung lama dan akibatnya titer antibodi telah menurun. Berdasarkan anamnesa, diketahui tidak ada riwayat vaksinasi sehingga antibodi yang terdeteksi adalah karena tantangan virus ND di lapangan yang telah beberapa waktu menginfeksi.

Lesi Mikroskopis

Organ-organ hasil pemeriksaan histopatologis menunjukkan berbagai perubahan patologik, dapat disajikan pada Tabel 1. Lesi yang muncul di berbagai organ tersebut mengindikasikan adanya infeksi sistemik. Gambaran lesi secara mikroskopis pada berbagai organ yang diperiksa dapat dilihat pada Gambar

6. *Perivascular cuffing* yang ditemukan di otak akibat infeksi ND pernah dilaporkan oleh Adi *et al.* (2009), Ecco *et al.* (2011), Rwuaan *et al.* (2012), dan Schmidt *et al.* (2015), serta dapat ditemui gliosis sesuai data Cattoli *et al.* (2011). *Perivascular cuffing* tidak spesifik untuk infeksi virus ND, karena virus selain ND juga dapat menyebabkan lesi tersebut, diantaranya : infeksi *Avian encephalomyelitis* (Freitas dan Back, 2015). Gliosis juga tidak spesifik untuk infeksi virus ND, karena infeksi virus *Avian encephalomyelitis* dan infeksi virus *Avian Influenza* dapat pula ditemukan gliosis (Freitas dan Back, 2015 ; Chaves *et al.*, 2011). Desiliasi epitel mukosa pada trakhea, *air sacculitis*, dan kongesti pulmo pada unggas yang terinfeksi ND pernah dilaporkan oleh Al-Mulhim *et al.* (2006) dan Nakamura *et al.* (2008). Lesi mikroskopis jantung menunjukkan perubahan yang sama pada penelitian Susta *et al.* (2014) berupa nekrosis miokardium, tetapi tidak disertai infiltrasi lemak. Diferensial diagnosa terhadap infeksi AI, juga ditemukan lesi nekrosis pada parenkim jantung yang dapat bersifat multifokal ringan sampai dengan berat (Pantin-Jackwood *et al.*, 2017). Depleksi pada lien juga pernah dilaporkan oleh Cattoli *et al.* (2011), Nakamura *et al.* (2013) dan Adi *et al.* (2019), yang menunjukkan infeksi ringan pada organ tersebut. Infeksi yang parah ditunjukkan dengan adanya debris seluler dan karioreksis, piknosis, dan infiltrasi makrofag dengan vakuolisasi yang berisi debris nukleus (Susta *et al.*, 2010). Degenerasi hidropik hepar yang ditemukan dapat disertai dengan perubahan melemak pada hepatosit (Bukhari *et al.*, 2014). Nekrosis hepar dan pankreas juga pernah dilaporkan oleh Cattoli *et al.* (2011). Diagnosa banding terhadap burung merpati yang menderita *trichomoniasis* dengan gejala tortikolis, yaitu temuan infiltrasi heterofil dan eosinofil, serta nekrosis hepatoseluler masif, dengan temuan parasit di area nekrosis (ELTigani-Asil, 2016). Lesi mikroskopis ginjal ditemukan nefritis di area intersisial, atau juga dapat berupa nekrosis yang mengindikasikan perubahan patologik yang lebih parah (Etriwati *et al.*, 2017). Infiltrasi limfosit juga ditemukan di berbagai organ sesuai data Bukhari *et al.* (2014) dan Cattoli *et al.* (2011), dalam penelitian ini ditemukan di saraf vagus, organ-organ pencernaan dan testis.

SIMPULAN

Data yang diperoleh dari penelitian ini, antara lain: hasil pemeriksaan histopatologik pada berbagai organ didominasi oleh infiltrasi limfosit, dan ditemukan *perivascular cuffing* pada otak, merupakan ciri adanya infeksi virus. Isolasi sampel otak dan paru merpati tortikolis menggunakan TMB menunjukkan uji HA positif, sedangkan konfirmasi diagnosis dengan uji AGP terhadap cairan alantois HA positif dengan serum anti ND menunjukkan hasil positif presipitasi. Serum merpati tanpa vaksinasi yang diperiksa terhadap titer antibodi ND menunjukkan titer 2^3 dan 2^4 . Berdasarkan data tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa merpati dengan gejala tortikolis dapat diisolasi dan diidentifikasi penyebabnya sebagai virus ND.

UCAPAN TERIMA KASIH

Data penelitian ini, merupakan bagian dari data penelitian yang difasilitasi oleh USDA project award, number ARS/CRDF Project 600672/2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Adi AAAM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi Y, Matsumoto Y. 2010. Isolation and Characterization of a Pathogenic Newcastle Disease Virus from a Natural Case in Indonesia. *Journal of Veterinary Medical Science* 72: 313-319.
- Adi AAAM, Astawa INM, Putra IGAA. 2019. The Wfficacy of Binary Ethylenimine-inactivated Vaccines of Gianyar-1/AK/2014 Virulent Strain in Protecting Chickens Against Tabanan-1/ARP/2017 Virulent Newcastle Disease Virus Isolates. *Veterinary World* 2231-0916: 758-764.
- Ahmed N, Dawson M, Smith C, Wood E. 2007. *Biology of Disease*. New York. Taylor and Francis Group.. Hlm. 297.
- Alexander DJ, Senne DA. 2008. Newcastle Disease, Other Avian Paramyxovirus, and Pneumovirus Infection. In: Saif YM. *Disease of Poultry*. 12th ed. Iowa. Blackwell Publishing. Hlm. 75-92.
- Ali A, Siddique N, Abbas MA, Rafi MA, Naeem K. 2014. Rehabilitation and Curing of Domestic Pigeons Exhibiting Signs of Torticollis. *Research Journal for Veterinary Practitioners* 2: 105-107.
- Al-Mulhim A, Abu-Elzein EME, Gameel AA, Manvell R, Alexander D, Al-Afaleq AI. 2006. Observations on the pigeon paramyxoviruses-1 infection in Pigeons at Al-Ahsa oasis of Eastern Saudi Arabia. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 5: 1058-1061.
- Al-Sheikhly F, Tantawi HH, Al-Falluji MM. 1979. Growth of the Virus in Embryonated Eggs. *Journal of Avian Diseases* 24: 112-119.
- Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammed-saleh ZM. 2016. Histological Stains : A Literature Review and Case Study. *Global Journal of Health Science* 8: 72-79.
- Angi AH, Wibawan IWT, Murtini S. 2009. Kemampuan Netralisasi Antibodi Spesifik Avian Influenza H5 terhadap Beberapa Virus H5N1 Isolat Lapang. *Jurnal Forum Pascasarjana* 32: 55-56.
- Bukhari M, Rizvi F, Sikandar A, Malik AN, Adil M, Akbar M. 2014. Co-infection of domestic pigeons with Newcastle Disease, Round Worms and Cestodes in Distric Faisalabad, Pakistan. *Jurnal Global Veterinaria* 12: 835-839.
- Burleson FG, Thomas MC, Danny LW. 1992. *Virology, A Laboratory Manual*. London. Academic Press. Hlm. 86-92.
- Capua I, Alexander D. 2009. *Avian Influenza and Newcastle Disease*. Milan. Springer. Hlm. 35, 73, 113, 123.
- Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C. 2011. Newcatle disease : a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 23 : 637-656.
- Chaves AJ, Busquets N, Valle R, Rivas R, Alert JV, Dolz R, Ramis A, Darji A, Majo N. 2011. Neuropathogenesis of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H7N1) in Experimentally Infected Chickens. *Veterinary research* 42: 1-12.
- Dortmans JCFM, Koch G, Rottier PJM, Peeters BPH. 2011. Virulence of Newcastle Disease Virus : What is Known SO Far? *Veterinary Research* 42: 122.

- Ebrahimi MM, Shahsavandi Sh, Masoudi Sh, Ghodsian N. 2013. Isolation, Characterization and Standardization of New Infectious Bursal Disease Virus for Development of a Live Vaccine. *Iranian Journal of Virology* 7: 29-36.
- Ecco R, Susta L, Afonso CL, Miller PJ, Brown C. 2011. Neurological Lesions in Chicken Experimentally Infected with Virulent Newcastle Disease Virus Isolates. *Avian Pathology* 40: 145-152.
- ELTigani-Asil EA. 2016. Pigeon Trichomoniasis in AL-Qassim, Saudi Arabia. *Inter J Vet Sci* 5: 91-94.
- Elfidasari D, Puspitasari RL, Frisa A. 2014. Deteksi Antibodi Akibat Paparan Virus AI Subtipe H5N1 pada Unggas Air Domestik di Sekitar Cagar Alam Pulau Dua. *Jurnal AL-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi* 2: 260-269.
- El-Zoghby EF, Arafa AS, Kilany WH, Aly MM, Abdelwhab EM, Hafez HM. 2012. Isolation of Avian Influenza H5N1 Virus from Vaccinated Commercial Layer Flock in Egypt. *Virology Journal* 9: 294.
- Etriwati, Ratih D, Handharyani E, Setiyaningsih S. 2017. Pathology and Immunohistochemistry Study of Newcastle Disease Field Case in Chicken in Indonesia. *Veterinary World* 10: 1066-1071.
- Freitas AE, Back A. 2015. New Occurrence of Avian Encephalomyelitis. *Brazilian Journal of Poultry Science* 17: 399-404.
- Gough RE, Alexander DJ, Collins MS, Lister SA, Cox WJ. 1988. Routine Virus Isolation or Detection in the Diagnosis of Diseases in Birds. *Avian Pathology* 17: 893-907.
- Hasan AKMR, Ali MH, Siddique MP, Rahman MM, Islam MA. 2010. Clinical and Laboratory Diagnoses of Newcastle and Infectious Bursal Diseases of Chickens. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* 8: 131-140.
- Kapczynski DR, Alfonso CL, Miller PJ. 2013. Immune Responses of Poultry to Newcastle Disease Virus. *Developmental and Comparative Immunology* 41: 447-453.
- Kim LM, King DJ, Guzman H, Tesh RB, Travassos da Rosa AP, Bueno Jr. R, Dennet JA, Alfonso CL. 2008. Biological and Phylogenetic Characterization of Pigeon Paramyxovirus serotype-1 Circulating in Wild North American Pigeons and Doves. *J Clin Microbiol* 46: 3303-3310.
- Leboffe MJ, Pierce BE. 2011. *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory*, Edisi keempat. Colorado. Morton Publishing. Hlm. 101-102.
- Linjawi MH. 2017. *Laboratory Methods, Detection of Antigen-Antibody Interactions : Precipitation Reactions*. Jeddah. King Abdul Azis University Publications. Hlm. 1-23.
- Miller PJ, Haddas R, Simanov L, Lublin A, Rehmani SF, Wajid A, Bibi T, Khan TA, Yaqub T, Setiyaningsih S, dan Alfonso CL. 2014. Identification of New Sub-Genotypes of Virulent Newcastle Disease Virus with Potential Panzootic Features. *Infection, Genetics and Evolution* 32: 1-14.
- Mushtaq I, Rizvi F, Ullah S. 2006. Effect of pigeon origin Newcastle Disease Virus on various liver enzymes and associated pathological changes in experimentally infected pigeons. *Pakistan Vet J* 26: 171-175.
- Mutinda WU, Njagi LW, Nyaga PN, Bebora LC, Mbuthia PG, Kemboi D, Githinji JWK, Muriuki A. 2015. Isolation of Infectious Bursal Disease Virus Using Indigenous Chicken Embryos in Kenya. *Hindawi Publishing Corporation* 10: 1155-1161.
- 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. *Journal of Veterinary Pathology* 45: 928-933.
- Nakamura K, Ito M, Nakamura T, Yamamoto Y, Yamada M, Mase M, Imai K. 2013. Pathogenesis of Newcastle Disease in Vaccinated Chickens : Pathogenicity of Isolated Virus and Vaccine Effect on Challenge of Its Virus. *Journal of Veterinary Medicine Science* 76: 31-36.
- Office Internationale des Epizooties (OIE). 2012. *OIE Terrestrial Manual 2012, Newcastle Disease (Infection with Newcastle Disease Virus)*. Hlm. 555-574.

- Pantin-Jackwood MJ, Stephens CB, Bertan K, Swayne DE, Spackman E. 2017. The Pathogenesis of H7N8 Low and Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses from the United States 2016 Outbreak in Chickens, Turkeys and Mallards. *PloS One* 12: 1-21.
- Putra HH, Wibowo MH, Untari T, Kurniasih. 2012. Studi Lesi Makroskopis dan Mikroskopis Embrio Ayam yang Diinfeksi Virus Newcastle Disease Isolat Lapang yang Virulen. *Jurnal Sain Veteriner* 30: 57- 67.
- Rwuaan JS, Rekwot PI, Omontese BO. 2012. Effect of A Velogenic Newcastle Disease Virus on Body and Organ Weights of Vaccinated Shika Brown Cocks. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences* 10: 7-12.
- Schmidt RE, Reavill DR, Phalen DN. 2015. *Pathology of Pets and Aviary Birds*, 2nd Ed. Iowa. John Wiley and Sons Inc. Hlm. 223
- Selim K, Arafa AS, Hussein AH, El-Sanousi AA. 2013. Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Viruses Isolated from Broiler and Layer Chicken Farms in Egypt during 2012. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 1: 102-108.
- Shafer A. 2006. Avian Influenza Agar Gel Immunodiffusion Test to Detect Serum Antibodies to Type A Influenza Virus. *High Pathogenic Avian Influenza (HPAI) Diagnostic Training Course*. 1-12.
- Susanto E, Suliswanto. 2013. Pengaruh Berat Telur terhadap Daya Tetas Telur Ayam Kampung. *Jurnal Ternak* 4: 27-30.
- Susta L, Miller P, Alfonso C, Brown C. 2010. Clinicopathological characterization in poultry of three strains of Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks. *Veterinary Pathology* 48: 349-360
- Susta L, Hamal KR, Miller PJ, Garcia SC, Brown CC, Pedersen JC, Gongora V, Afonso CL. 2014. Separate Evolution of Virulent Newcastle Disease Viruses from Mexico and Central America. *Journal of Clinical Microbiology* 52: 1382-1390.
- Thayer SG, Beard CW. 2008. Serologic Procedures. In: Zavala LD, Swayne DE, Glisson JE, Pearson JE, Reed WM, Jackwood MW, Woolcock PR. *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, 5th Ed. Wisconsin. Omni Press. Hlm. 223-225.
- Turgeon ML. 2014. *Immunology & Serology in Laboratory Medicine*, 6th Ed. Missouri. Elsevier. Hlm.143.
- Wibowo MH, Asmara W. 2002. Isolasi dan Propagasi Agen Penyebab Penyakit dari Kasus Terdiagnosa Penyakit Infectious Laryngotracheitis (ILT) pada Telur Ayam Berembrio. *Jurnal Sain Veteriner* 20: 52-57.
- Wibowo MH, Fadiar R, Anggoro D, Artanto S, Amanu S, Wahyuni AETH. 2015. Deteksi Molekuler Virus Infectious Bursal Disease pada Sampel Bursa Fabricius yang Diperoleh dari Ayam Terdiagnosa Penyakit IBD. *Jurnal Sain Veteriner* 33: 156-166.
- Wibowo MH, Tabbu CR. 2006. Isolasi dan Identifikasi Serologis Virus Avian Influenza dari Sampel Unggal yang Diperoleh di D.I. Yogyakarta dan Jawa Tengah. *Jurnal Sain Veteriner* 24: 77-83.