

Karakterisasi Molekuler dan Biologis Virus *Fowl Adenovirus* yang Diisolasi dari Peternakan Ayam Komersial

(*MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF FOWL
ADENOVIRUS ISOLATED FROM COMMERCIAL CHICKEN FARMS*)

**Aditya Ahkami Pratomo¹, Ifah Khairunnizak¹,
Arini Nurhandayani¹, Michael Haryadi Wibowo²**

¹PT. Sanbio Laboratories,

Desa Wanaherang, Kecamatan Gunung Putri,
Kabupaten Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16965

²Departemen Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
Jl. Fauna, No 3, Karangmalang, Yogyakarta, Indonesia 55281
Telp.: 0274-560862. Email: mhwibowo@ugm.ac.id

ABSTRACT

Fowl Adenovirus (FAdV) is a virus that causes disease in poultry with characteristics such as inclusions body found in organ lesions, especially the liver. The disease causes economic losses, in the form of chicken deaths and immunosuppression effects. Since 2018, outbreaks of FAdV or known as inclusion body hepatitis (IBH) have been reported in broiler farms, in several provinces in Indonesia. This study aims to isolate, and characterize molecularly, and biologically of embryonic chicken eggs and liver cell cultures of chicken embryos. Liver samples, bursa fabricius, and spleen were obtained from 23 commercial chicken farms in Indonesia that were diagnosed with IBH disease from 2018-2020. Molecular detection was carried out by polymerase chain reaction (PCR) technique, using hexon gene-specific primers. The amplification result was positive, then sequencing was performed. Isolation was carried out using embryonic chicken eggs (ECE) specific pathogen free (SPF) and chicken embryo liver (CEL) cell cultures. Detection and molecular characterization showed that all FAdV isolated from poultry obtained from cases diagnosed with IBH disease confirmed as FAdV genotype E, including strain FAdV-8b. Isolation on TAB showed embryonic bleeding lesions and swelling of the liver. Propagation of the FADV isolate using chicken embryo liver cell culture, showed cytopathic lesions that could be observed in the first passage, in the form of swelling and rounding of infected cells. IBH disease outbreaks in commercial chickens in this study, confirmed the cause is FAdV genotype E, which is included in serotype 8b. FAdV virus isolated on SPF TAB showed embryonic bleeding lesions and hepatitis. FAdV virus isolated in this study was assessed as pathogenic in SPF chicken embryos.

Keywords: hexon; amplification; embryonic lesion; cytopathic lesion

ABSTRAK

Fowl Adenovirus (FAdV) adalah virus penyebab penyakit unggas dengan lesi karakteristik benda inklusi yang ditemukan pada lesi organ, terutama organ hati. Penyakit tersebut menyebabkan kerugian ekonomi, berupa kematian ayam dan efek immunosupresi. Sejak tahun 2018, wabah FAdV atau dikenal sebagai penyakit *inclusion body hepatitis* (IBH) dilaporkan terjadi pada peternakan ayam broiler, di beberapa provinsi di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi, karakterisasi molekuler dan biologis pada telur ayam berembrio dan kultur sel hati embrio ayam. Sampel hati, bursa fabricius, dan limpa diperoleh dari 23 peternakan ayam komersial di Indonesia, yang terdiagnosis penyakit IBH sejak tahun 2018-2020. Deteksi molekuler dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR), menggunakan primer spesifik gen hexon. Hasil amplifikasi positif, selanjutnya dilakukan sekuensing. Isolasi dilakukan dengan menggunakan telur ayam berembrio (TAB) *specific pathogen free* (SPF) dan kultur sel hati embrio ayam. Deteksi dan karakterisasi molekuler menunjukkan bahwa semua FAdV

yang diisolasi dari peternakan unggas yang diperoleh dari kasus terdiagnosa penyakit IBH, dapat dikonfirmasi penyebabnya sebagai FAdV genotipe E, yang termasuk strain FAdV-8b. Isolasi pada TAB menunjukkan lesi perdarahan embrio dan pembengkakan pada organ hati. Propagasi isolat FAdV tersebut menggunakan kultur sel hati embrio ayam, menunjukkan lesi sitopatik yang telah dapat teramati pada pasase pertama, berupa pembengkakan dan pembulatan sel yang terinfeksi. Wabah penyakit IBH pada ayam komersial dalam penelitian ini, dikonfirmasi penyebabnya adalah FAdV genotipe E, yang termasuk dalam serotipe 8b. Virus FAdV yang diisolasi pada TAB SPF menunjukkan lesi perdarahan embrio dan hepatitis. Virus FAdV yang diisolasi pada penelitian ini dinilai patogen pada embrio ayam SPF.

Kata-kata kunci: hexon; amplifikasi; lesi embrio; lesi sitopatik

PENDAHULUAN

Fowl Aviadenovirus (FAdV) merupakan anggota dari Grup I, *Aviadenovirus* yang mempunyai inang pada ayam. Dalam Grup I tersebut, virus *Aviadenovirus* diberikan nama sesuai inangnya, yaitu: *Goose Aviadenovirus*, *Turkey Aviadenovirus*, *Pigeon Aviadenovirus*, dan *Duck Aviadenovirus* (Hess, 2000; Hafes, 2011). Menurut Hess (2021) *Aviadenovirus* diklasifikasikan ke dalam lima spesies, yaitu A, B, C, D dan E. Berdasarkan studi netralisasi silang FAdV juga diklasifikasi ke dalam 12 serotipe (Hess, 2000). Dewasa ini klasifikasi juga ditentukan berdasarkan data sekuens gen *hexon loop-1* sebagai dasar pembagian *genotype* FAdV (Marek *et al.*, 2010).

Aviadenovirus merupakan virus DNA, dengan genom linier, tidak bersegmen dan tidak beramplop. Genom virus mengkode 40 protein. Protein struktural *capsid* mempunyai tiga jenis protein utama, yaitu: hexon, penton basa dan fiber. Protein penton basa dan fiber berperan penting dalam proses infeksi, sedangkan protein hexon berperan penting dalam respons imun yang sifatnya netralisasi (Hess, 2021; Russell, 2009), di samping itu, protein hexon juga penting dalam diagnostik karena menjadi target deteksi dalam identifikasi molekuler dan *genotype* FAdV (Hess, 2000; Marek *et al.*, 2010).

Manifestasi klinis infeksi FAdV pada ayam teramati bervariasi. Menurut Matos *et al.* (2016), kepekaan FAdV pada ayam dipengaruhi oleh faktor genetik. Pada uji *in vivo* yang menggunakan ayam *specific pathogen free* (SPF), ayam pedaging/*broiler* menunjukkan kepekaan lebih tinggi dari pada ayam petelur/*layer* SPF. Sejauh ini dilaporkan infeksi FAdV mampu menimbulkan gejala klinis yang sifatnya karakteristik yang dikelompokkan menjadi tiga, yaitu *inclusion body hepatitis* (IBH) (Schachner *et al.*, 2018). Secara klinis hati mengalami kebengkakan, pucat dengan *multifocal* nekrosis. Pada umumnya IBH

tersebut disebabkan oleh FAdV-2 dan FAdV-11 (dari spesies FAdV D) dan FAdV-8a dan 8b (dari spesies FAdV E) (Schachner *et al.*, 2018). Karakteristik lesi yang lain adalah adanya lesi *gizzard erosion* (GE), yang pada umumnya disebabkan oleh serotipe-1 (Grafl *et al.*, 2017) dan FAdV-8a juga dilaporkan dapat menyebabkan lesi GE di Iran (Mirzazadeh *et al.*, 2016), di samping itu, lesi yang khas pada kasus FAdV adalah ditemukannya *hidropericardium*, yang selanjutnya penyakit IBH yang disertai lesi hidroperikarditis tersebut dikenal sebagai *Hepatitis Hidropericard Syndrome* (HHS). Pada umumnya HHS disebabkan oleh FAdV serotipe 4 (Nie *et al.*, 2016; Hussain *et al.*, 2012, Pan *et al.*, 2017). Dampak infeksi FAdV telah mampu menyebabkan kerugian ekonomi yang tinggi di peternakan ayam, baik karena kematian unggas, karakter immunosupresif, morbiditas, serta penurunan produktivitas ayam.

Di Indonesia kasus infeksi FAdV telah dilaporkan terjadi di lapangan sejak tahun 2017. Namun demikian, identifikasi kasus tersebut baru dilakukan terhadap sampel yang dikoleksi sejak awal tahun 2018 (Wibowo *et al.*, 2019). Data karakterisasi gen fragmen hexon menunjukkan bahwa kasus penyebab IBH di Indonesia termasuk ke dalam spesies FAdV-D dan E. Silaen *et al.* (2019) melaporkan kasus IBH di Indonesia disebabkan oleh spesies FAdV D dan E, serotipe-2 dan 8a.

Data *scientific* keberadaan IBH di Indonesia masih sangat terbatas, oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk dapat melakukan isolasi dan identifikasi FAdV dari sampel terdiagnosis IBH, di samping itu, penelitian ini bertujuan melakukan adaptasi FAdV yang terisolasi ke dalam media kultur hati ayam dan telur ayam berembrio. Data karakter pertumbuhan FAdV pada kedua media kultur tersebut menjadi penting dalam pengembangan vaksin FAdV di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Preparasi Sampel

Sampel berupa lima organ hati didiagnosis penyakit IBH dari lima peternakan ayam petelur dan pedaging di beberapa daerah di Pulau Jawa dan Sumatra yang dikoleksi oleh Laboratorium Riset dan Pengembangan PT. Sanbio Laboratories sejak tahun 2018-2020 (Tabel-1). Masing-masing organ hati dari tiap peternakan yang berbeda dipotong dan digerus menggunakan *mortar* sampai halus kemudian ditampung dalam tabung 50 mL steril (Corning Incorporated) dan dibuat suspensi 20% dengan menggunakan *phosphate buffer saline*/PBS yang mengandung penisilin (100 U/mL) dan streptomisin (100 µg/mL). Selanjutnya suspensi tersebut dihomogenkan menggunakan *vortex*. Suspensi yang telah homogen disentrifugasi (*Refrigerated Centrifuge Thermo Scientific*) pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan disaring melalui *syringe filter* 0,2 µm (Corning Incorporated) dan disimpan pada *ultralow freezer* -80 °C sampai digunakan, kembali untuk diproses pada kegiatan selanjutnya.

Ekstraksi DNA dan Amplifikasi Fragmen Gen Hexon

Ekstraksi DNA dilakukan terhadap supernatan organ hati yang telah dibuat

suspensi pada tahap preparasi sampel. Isolasi DNA virus IBH dilakukan dengan menggunakan *TRI Reagent™ Solution* (Invitrogen) sesuai instruksi prosedur. Suspensi RNA yang diperoleh, dipersiapkan sebagai *template* pada reaksi *Polymerase Chain Reaction*/PCR.

Amplifikasi dilakukan dengan metode RT-PCR. Reaksi dilakukan dengan kit *Superscript III one-step-RT-PCR with platinum Taq* (Invitrogen). Amplifikasi gen hexon dilakukan dengan primer, Hexon A (5-CAARTTCAGRCA GACGGT-3) dan hexon B (5-TAGTGATGMCGS GACATCAT-3), yang didesain oleh Meulemans *et al.* (2001) dengan produk amplifikasi sebesar 880 bp. Reaksi amplifikasi PCR dilakukan dalam komposisi sebanyak 10 µL yang mengandung 1 µL DNA template, 5 µL *Superscript III one-step-RT-PCR with platinum Taq* (Invitrogen), 0,6 µL primer forward, 0,6 µL primer reverse, 0,25 µL enzim *Superscript III one-step-RT-PCR with platinum Taq* (Invitrogen), dan 2,55 µL RNase free water (Invitrogen). Amplifikasi dilakukan dengan ketentuan pra-denaturasi 94°C selama 45 detik, diikuti dengan 39 siklus *annealing* 52°C selama 45 detik, ekstensi 72°C selama 60 detik, dan diakhiri dengan penambahan final ekstensi 72°C selama 5 menit.

Produk PCR divisualisasi dengan metode elektroforesis menggunakan gel agarose (vivantis) 1% dan pewarnaan *ethidium bromide*. Pita

Tabel 1. Daftar asal sampel yang digunakan dalam penelitian ini.

No	Kode Sampel	Asal Sampel	Perubahan patologi makroskopis	Tahun Koleksi Sampel
1	IBH/ <i>Chicken</i> / <i>South</i> _ Sumatra/IBH-1/ SBO/2018	Sumatra Selatan	Hati pucat dan menguning	2018
2	IBH/ <i>Chicken</i> / <i>North</i> _ Sumatra/IBH-11/ SBO/2019	Sumatra Utara	Hati pucat menghitam dan pen- darahan, ginjal dan limpa meradang, <i>rempela/gizzard</i> erosi	2019
3	IBH/ <i>Chicken</i> /Batam/ IBH-13/SBO/2019	Batam	Hati pucat, ginjal dan limfa bengkak, radang usus dan secatonsil, hidroperi- kardium jantung	2019
4	IBH/ <i>Chicken</i> / <i>North</i> _ Sumatra/IBH-16/ SBO/2019	Sumatra Utara	Hati pucat nekrotik dan meradang, jantung hidroperi- kardium, ginjal dan limpa meradang	2019
5	IBH/ <i>Chicken</i> / <i>West</i> _ <i>Java</i> /IBH-22/SBO/ 2020	Jawa Barat	Hati bengkak pucat dan rapuh, ginjal bengkak, limpa radang, <i>rempela/gizzard</i> erosi, bursa radang	2020

DNA yang teramplifikasi diamati di dalam ruang gelap menggunakan *Ultra Violet translu-minator*, untuk selanjutnya didoku-mentasi.

Sekuensing Isolat

Amplikon hasil PCR kemudian dipurifikasi menggunakan *CleanSweep PCR Purification Reagent* (Applied Biosystems) sesuai dengan instruksi prosedur. Hasil purifikasi dilanjutkan pada proses sekuensing. Proses sekuensing dilakukan dengan membuat "*Sequence Mixing*", yaitu 4 μ L *Big Dye Cycle Sequencing*, primer (*Forward* dan *Backward*) masing-masing 0,6 μ L, 5x *sequencing buffer* 4 μ L, *nuclease free water* 10,4 μ L, dan sampel RNA 1 μ L. Primer yang digunakan sesuai dengan primer yang dipakai dalam amplifikasi RT-PCR. Amplifikasi sekuensing dilakukan dengan ketentuan *initial denaturation* 96°C selama 60 detik, diikuti dengan 25 siklus denaturasi pada 96°C selama 10 detik, diikuti dengan *annealing* 50°C selama 5 detik, ekstensi 60°C selama 4 menit, dan diakhiri dengan penambahan final *extensi* 72°C selama 5 menit. Amplifikasi *cycle sequencing* dilakukan sesuai dengan instruksi prosedur dari *Big Dye v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem).

Isolasi Virus FAdV pada TAB SPF

Sampel suspensi organ hati yang positif dari RT-PCR positif gen hexon selanjutnya diproses untuk isolasi virus menggunakan telur ayam berembrio (TAB) *specific pathogen free* (SPF) umur 10 hari. Sampel suspensi diinokulasikan sebanyak 0,1 mL dengan rute *chorioallontoic membrane* (CAM) ke dalam lima butir TAB SPF per sampel (Abghour *et al.*, 2021). Lima butir telur lainnya diinokulasi dengan PBS dan digunakan sebagai kontrol negatif. Semua embrio yang mati setelah 48 jam pascainokulasi, serta semua yang bertahan sampai waktu akhir inkubasi, dilihat embrionya dan dinekropsi untuk melihat organ hatinya. Bagian CAM embrio yang terinfeksi dipanen dan dihomogenisasi hingga 20% (w/v) dalam larutan PBS (pH 7,0-7,4), dan diklarifikasi dengan sentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian difilter dengan menggunakan *syringe filter* 0,45 μ m (Corning) dan dikoleksi untuk dikonfirmasi adanya pertumbuhan virus FAdV dengan metode PCR.

Propagasi Virus FAdV pada Kultur Sel Hati Embrio Ayam

Isolat FAdV yang berhasil tumbuh di dalam

TAB SPF yang dikonfirmasi oleh pengujian PCR, kemudian dikultur ke dalam media teknik kultur jaringan *tissue culture chicken embryo liver* (CEL) sel. Kultur CEL dibuat dari embrio ayam SPF berumur 13-15 hari sesuai prosedur standar. *Minimum eagle medium* / atau MEM (Sigma Aldrich) yang dilengkapi dengan 10% *fetal bovine serum* (Biosera), penisilin (100 U/mL) dan streptomisin (100 μ g/mL) digunakan untuk media pertumbuhan kultur CEL. Monolayer dari kultur CEL dapat terbentuk setelah 24 jam inkubasi pada 37°C dengan kadar CO₂ sebesar 5% (Junnu *et al.*, 2015).

Kultur CEL yang sudah terbentuk *monolayer* dicuci dengan PBS. Sebanyak 0,5 mL homogenat CAM yang berhasil ditumbuhkan dengan virus FAdV dan dikonfirmasi adanya pertumbuhan virus FAdV dengan metode PCR, diinokulasi ke dalam kultur sel yang sudah *monolayer*. Kultur sel yang berisi inokulum dan kultur sel yang tidak diinokulasi inokulum (digunakan sebagai kontrol), diinkubasi pada 37°C dengan kadar CO₂ 5%. Kultur sel diamati setiap harinya dengan mikroskop cahaya untuk melihat adanya *cytopathic effect* (CPE) setiap hari selama 3-4 hari masa inkubasi. Sel yang sudah terbentuk CPE sekitar 80%, siap dipanen dengan metode *freeze-thawing* dengan tiga siklus pembekuan dan pencairan, kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan disaring melalui *syringe filter* 0,22 μ m (Corning Incorporated) dan disimpan pada *ultralow freezer* -80 °C sampai digunakan kembali untuk pasase selanjutnya (Junnu *et al.*, 2015). Sebanyak tiga kali pasase dilakukan dalam penelitian ini.

Uji Kandungan Virus dengan Metode Kultur Sel

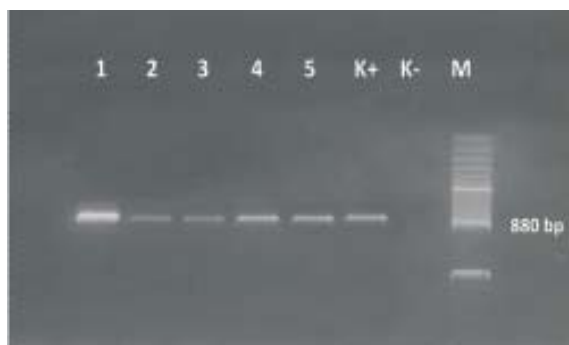
Isolat yang dikultur dengan sel CEL diuji kandungan virusnya tiap pasase dengan menggunakan TCID₅₀ (Reed dan Muench, 1938). Pengenceran virus 10 kali lipat dibuat dalam *maintenance media*/MM dari 10¹ hingga 10¹⁰. Sel CEL disiapkan dan diinokulasikan ke dalam 96-sumuran/*well tissue culture plate*. Sebanyak 100 μ L dari setiap pengenceran virus diinokulasi secara berurutan dalam 10 sumuran baris pertama. Dan dua sumuran terakhir digunakan sebagai kontrol positif dan negatif. *Plate* yang sudah diinokulasi dengan pengenceran virus beserta sel CEL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ 5% selama lima hari inkubasi. Adanya CPE diamati setiap hari di bawah mikroskop cahaya (Junnu *et al.*, 2015).

Analisis Data

Hasil elektroforegram diverifikasi dan dianalisis dengan menggunakan *software* MEGA 6.06. Hasil sekuens nukleotida disejajarkan, dibandingkan, dan dianalisis dengan *software* MEGA 6.06 beserta gen data sekuens virus FAdV menggunakan pencarian BLAST yang ada pada *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sekuens yang didapat dari hasil pencarian BLAST juga diikutsertakan untuk pembuatan pohon filogenetik. Sekuens hasil pencarian BLAST yang diikutsertakan dipilih berdasarkan nilai *Query cover* dan *Identity value* yang tertinggi. Pembuatan pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan *software* MEGA 6.06. Seluruh data yang diperoleh dari hasil penelitian ini ditampilkan dalam bentuk gambar dan tabel untuk dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi molekuler sampel organ hati dari ayam komersial yang dikoleksi pada tahun 2018-2020 yang terdiagnosis gejala IBH dilakukan dengan amplifikasi fragmen gen hexon menggunakan primer spesifik. Senyawa DNA diekstraksi dari setiap sampel dan diuji lebih lanjut menggunakan PCR untuk keberadaan gen hexon. Hasil PCR pada fragmen gen hexon adalah sebanyak lima isolat yang diperiksa teridentifikasi positif PCR dengan produk ampikon sebesar 880 pb. pita DNA tunggal sesuai target amplifikasi, pita DNA jelas dan tebal, sebagaimana dapat diamati pada Gambar-1. Hasil ini menegaskan adanya gen hexon yang



Gambar 1. Hasil *polymerase chain reaction* (PCR) dari gen hexon sampel *inclusion body hepatitis* (IBH); M: *GeneRuler* 100 pb DNA Ladder, Baris 1-5: sampel uji IBH, K+: kontrol positif, K-: kontrol negatif.

spesifik ditemukan pada FAdV yang berupa gen penyandi antigen permukaan (Abghour *et al.*, 2021).

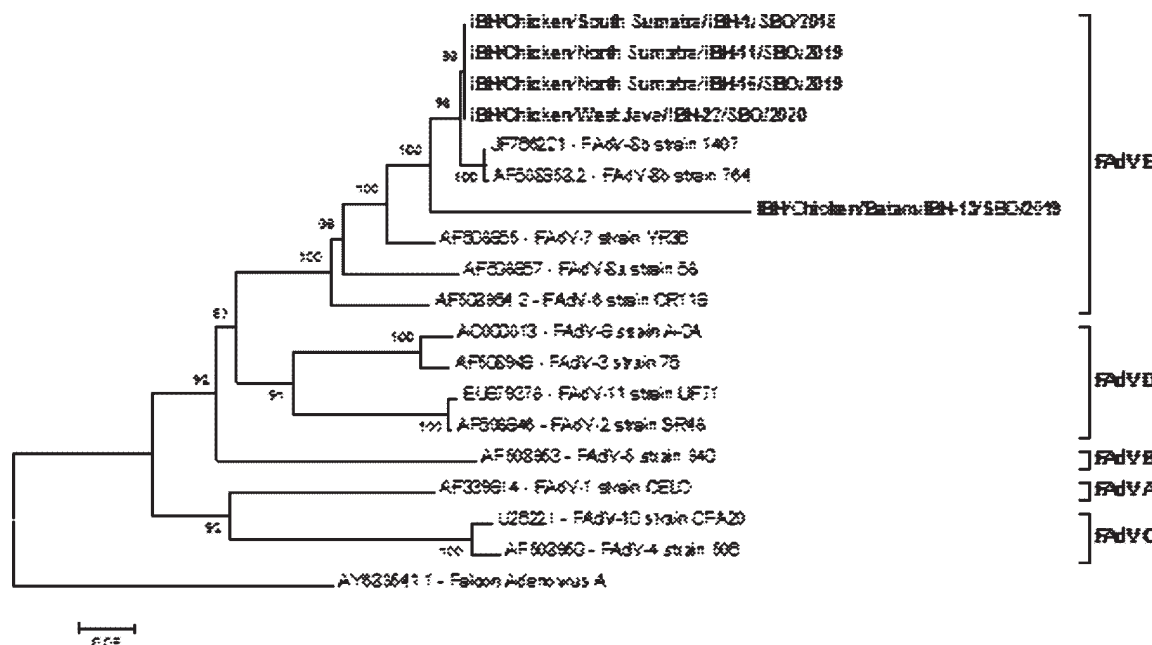
Analisis homologi dilakukan dengan *pairwise alignment* yang membandingkan urutan nukleotida dari fragmen gen hexon dari isolat dalam penelitian ini dengan isolat lain yang tersedia di *Genebank*. Lima isolat yang berhasil disekuensing dalam penelitian ini memiliki homologi berkisar 97-99% pada tiap isolat. Dari hasil homologi tiap isolate tersebut, kami menyimpulkan bahwa FAdV berhasil kami isolasi pada beberapa daerah di Indonesia adalah jenis yang sama. Hasil analisis filogenetik fragmen gen hexon dari FAdV yang berhasil terdeteksi yaitu kelima isolat memiliki homologi sekitar 96-97% dengan isolat referensi FAdV-E serotype 8b strain 1407 (nomor akses JF766221) dan juga memiliki homologi sekitar 96-97% dengan isolat referensi FAdV-E serotype 8b strain 764 (nomor akses AF508958.2). Oleh karena itu, FAdV berhasil diisolasi berada dalam satu kelompok dengan isolat referensi yang termasuk kedalam FAdV-E serotipe 8b (Gambar-2). Serta homologi FAdV dari spesies yang berbeda menunjukkan persentase homologi yang berbeda dengan isolat FAdV pada studi kali ini yang ditunjukkan pada Tabel-2.

Sebanyak lima isolat PCR positif FAdV tersebut, selanjutnya dilakukan sekuensing untuk mendapatkan data nukleotida gen target. Analisis filogenetik dilakukan dengan membandingkan data gen hexon isolat virus FAdV yang dikoleksi dari *Genebank* dengan nomer akses yang dapat diamati pada gambar pohon kekerabatan (Gambar 2). Hasil konstruksi pohon kekerabatan fragmen gen hexon virus FAdV yang diteliti diketahui sebagai FAdV serotipe 8b, yang merupakan spesies Fowl Adenovirus E.

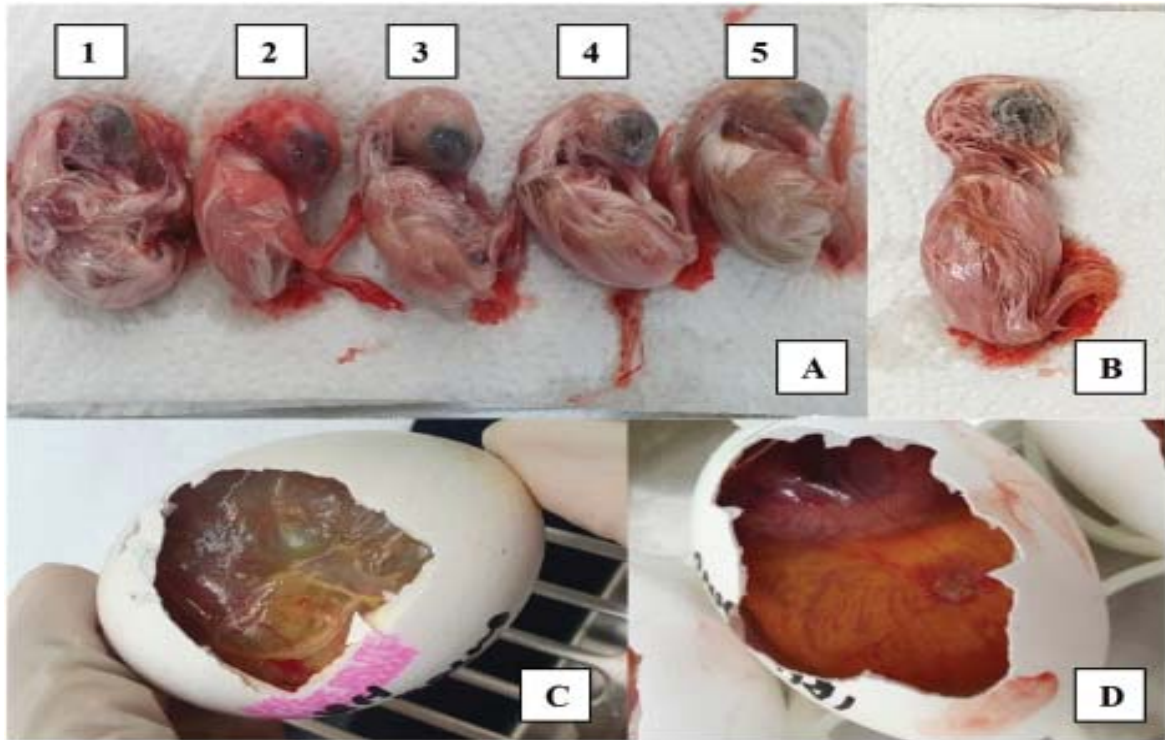
Menurut laporan Zdravec *et al.* (2013), bahwa salah satu agen penyebab penyakit IBH paling umum yang ada di dunia adalah tipe FAdV-E 8b. Data penelitian ini relevan dengan laporan kasus IBH pertama di Indonesia yang dilaporkan Wibowo *et al.* (2019) pada kasus yang terjadi pada ayam petelur, pedaging dan *breeder* komersial di Indonesia di tahun 2018 sampai 2019, dinyatakan sebagai FAdV-D dan FAdV-E. Menurut Silaen *et al.* (2020) yang melaporkan kasus IBH yang terjadi di Banten disebabkan oleh FAdV-D serotipe-2 dan FAdV-E serotipe 8b. Data tersebut diperluas oleh temuan Prajitno *et al.* (2019) bahwa kasus IBH di Indonesia disebabkan tidak hanya oleh serotipe 8b, tetapi

Tabel 2. Homologi isolat *Fowl Adenovirus* (FAdV) pada penelitian ini dengan isolat referensi.

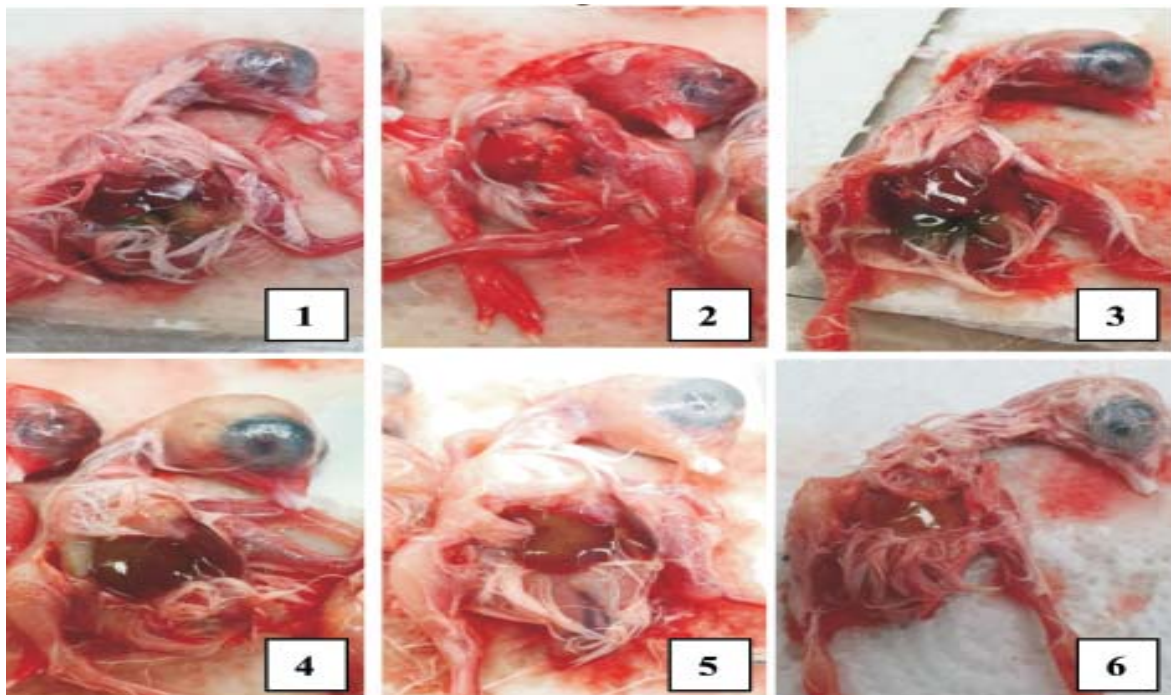
Virus strain	Virus spesies	Nomor akses genebank	Homologi (%)				
			(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
FAdV-1 strain CELO	FAdV A	AF339914	67.2	67.4	67	67.4	67.4
FAdV-5 strain 340	FAdV B	AF508953	74.8	74.4	72.1	74.4	74.8
FAdV-10 strain CFA20	FAdV C	U26221	39.5	39.5	38.1	39.5	39.2
FAdV-4 strain 506	FAdV C	AF508950	39.5	39.6	38.3	39.6	39.3
FAdV-9 strain A-2A	FAdV D	AC000013	73.2	72.9	72.3	72.9	73.2
FAdV-3 strain 75	FAdV D	AF508949	73.5	72.8	72.5	72.8	73.5
FAdV-11 strain UF71	FAdV D	EU979378	75	75.4	74.6	75.4	75
FAdV-2 strain SR48	FAdV D	AF508946	75.2	75.4	74	75.4	75.6
FAdV-6 strain CR119	FAdV E	AF508954.2	88.5	88.5	87.2	88.5	88.5
FAdV-8a strain 58	FAdV E	AF508957	88.9	89.3	88.3	89.3	88.9
FAdV-7 strain YR36	FAdV E	AF508955	96	96.2	94.7	96.2	95.9
FAdV-8b strain 764	FAdV E	AF508958.2	97.9	97.7	96.2	97.7	97.8
FAdV-8b strain 1407	FAdV E	JF766221	97.9	97.7	97.1	97.7	97.9
IBH/Chicken/South_Sumatra/IBH-1/SBO/2018 (1)	FAdV E	-	-	99.1	97.8	99.1	98.2
IBH/Chicken/North_Sumatra/IBH-11/SBO/2019 (2)	FAdV E	-	99.1	-	98	99.6	98.7
IBH/Chicken/Batam/IBH-13/SBO/2019 (3)	FAdV E	-	97.8	98	-	98.1	97.7
IBH/Chicken/North_Sumatra/IBH-16/SBO/2019 (4)	FAdV E	-	99.1	99.6	98.1	-	98.7
IBH/Chicken/West_Java/IBH-22/SBO/2020 (5)	FAdV E	-	98.2	98.7	97.7	98.7	-



Gambar 2. Pohon filogenetik berdasarkan urutan nukleotida fragmen gen hexon dengan amplicon 880 pb. dari isolat lapang dan sekuens referensi dari *genebank*. Lima isolat dalam penelitian ini ditandai dengan huruf tebal, sedangkan isolat lain tersedia di *genebank* dengan nomor akses terlampir.



Gambar 3. Hasil inokulasi virus *inclusion body hepatitis* (IBH) pada embrio ayam SPF pada 5 hari pasca inokulasi. Gambar A merupakan embrio yang diinokulasi sampel lapang dengan konfirmasi positif PCR IBH, No 1: IBH-1, No 2: IBH-11, No 3: IBH-13, No 4: IBH-16, No 5: IBH 22. Gambar B berupa embrio ayam kontrol. Gambar C berupa CAM yang diinokulasi oleh isolate FAdV. Gambar D berupa CAM kontrol dan tampak normal.



Gambar 4. Lesi patologis organ hati pada embrio ayam *specific pathogenic free* (SPF). (No 1: IBH-1, No 2: IBH-11, No 3: IBH-13, No 4: IBH-16, No 5: IBH 22. No 6: ayam kontrol).

juga serotipe 8b, dan 11. Data kasus yang terjadi di Indonesia sesuai dengan laporan Abghour *et al.* (2019) bahwa sebagian besar wabah IBH yang paling sering dilaporkan terjadi di beberapa negara adalah disebabkan oleh spesies FAdV-D atau FAdV-E, serotipe 2, 11, 8a dan 8b.

Semua isolat positif PCR diinokulasikan ke dalam embrio SPF via CAM. Embrio yang diinokulasi dengan isolate positif IBH menunjukkan perubahan fisik embrio seperti *curling* dan *dwarfing* (No 1, 3, 4, dan 5) dan kemerahan pada embrio (No 1 dan 2), pengamatan embrio ayam menunjukkan pertumbuhan yang tidak sempurna dibandingkan dengan embrio kontrol (Gambar-3A dan 3B). Kematian embrio ditemukan pada embrio yang diinokulasi dengan sampel IBH-11 pada hari ke-4 pascainokulasi dan sampel IBH-1 pada hari ke-5 pascainokulasi, pada embrio yang diinokulasi dengan sampel IBH-13, IBH-16, dan IBH-22 tidak mengalami kematian sampai akhir waktu inkubasi. CAM yang diinokulasi dengan isolat FAdV terlihat buram, hemoragik dan mengalami penebalan (Gambar-3C). Temuan tersebut sejalan dengan penelitian yang dilaporkan oleh Abghour *et al.* (2021), sedangkan pada CAM embrio kontrol terlihat normal (Gambar-3D).

Lesi patologis yang umumnya terlihat adalah pembengkakan organ hati dengan warna kuning kecokelatan. Pada embrio yang diinokulasi dengan isolat IBH-1 dan IBH-13 ditemukan pembengkakan pada organ hati, walaupun tidak ditemukan nekrosis fokal pada organ hati. Kemudian pada embrio yang diinokulasi dengan isolat IBH-16 dan IBH-22 ditemukan pembengkakan hati ada adanya *focus necrotik* yang berwarna kuning kecokelatan pada organ hati. Pada embrio yang diinokulasi dengan IBH-13 menunjukkan lesi hemoragi pada organ hati dan tidak ada lesi yang ditemukan pada embrio kontrol (Gambar-4).

Pada penelitian ini, embrio yang diinokulasi dengan isolat virus IBH menyebabkan pembengkakan hati dengan disertai nekrosis fokal berwarna kuning kecokelatan serta adanya hemoragi. Hasil ini mirip dengan yang dilaporkan oleh Silaen *et al.* (2020) dan Abghour *et al.*, (2019) bahwa embrio ayam yang diinfeksi sampel gerusan hati yang dikoleksi dari ayam didiagnosis IBH, menyebabkan lesi embrio terlihat pucat hingga kekuningan, bengkak, rapuh, dan mengalami hemoragi.

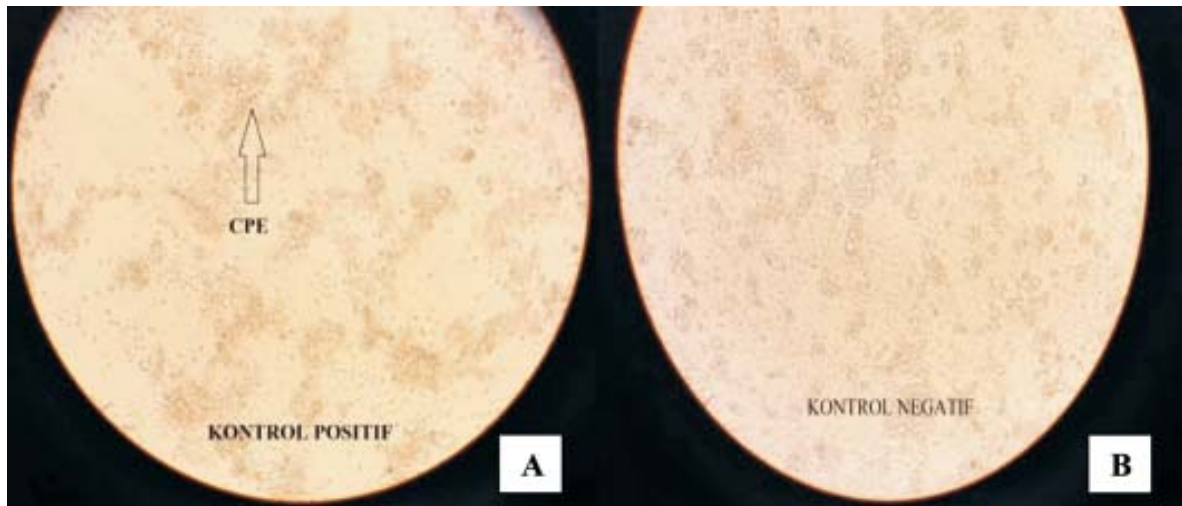
Menurut Marteens *et al.* (2014) embrio

ayam yang diinfeksi virus FAdV tipe 2 dan 8b, menyebabkan lesi patologis seperti: hepatomegali, cholestasis, hepatitis. Lesi juga teramati pada limpa/*lien* terjadi splenomegali, ginjal dan dinding rempela/*gizzard* terjadi petekchie atau perdarahan titik. Peneliti lain melaporkan kerapuhan pada organ hati yang disertai nekrosis multifokal (Pan *et al.*, 2017). Menurut Alemnesh *et al.* (2012), replikasi FAdV utamanya terjadi pada CAM dan meluas melalui proses viremia dan mencapai organ hati. Replikasi virus pada hati tersebut menyebabkan kerusakan seluler yang bersifat masif dan nekrosis sel hati. Lisis sel menyebabkan virus menyebar ke sel-sel yang berdekatan dan terjadi viremia kedua ke organ lain yang peka. Konfirmasi positif pertumbuhan virus FAdV pada CAM dideteksi dengan uji PCR dan terkonfirmasi positif, sebagaimana hasil uji pada deteksi FAdV pada organ hati.

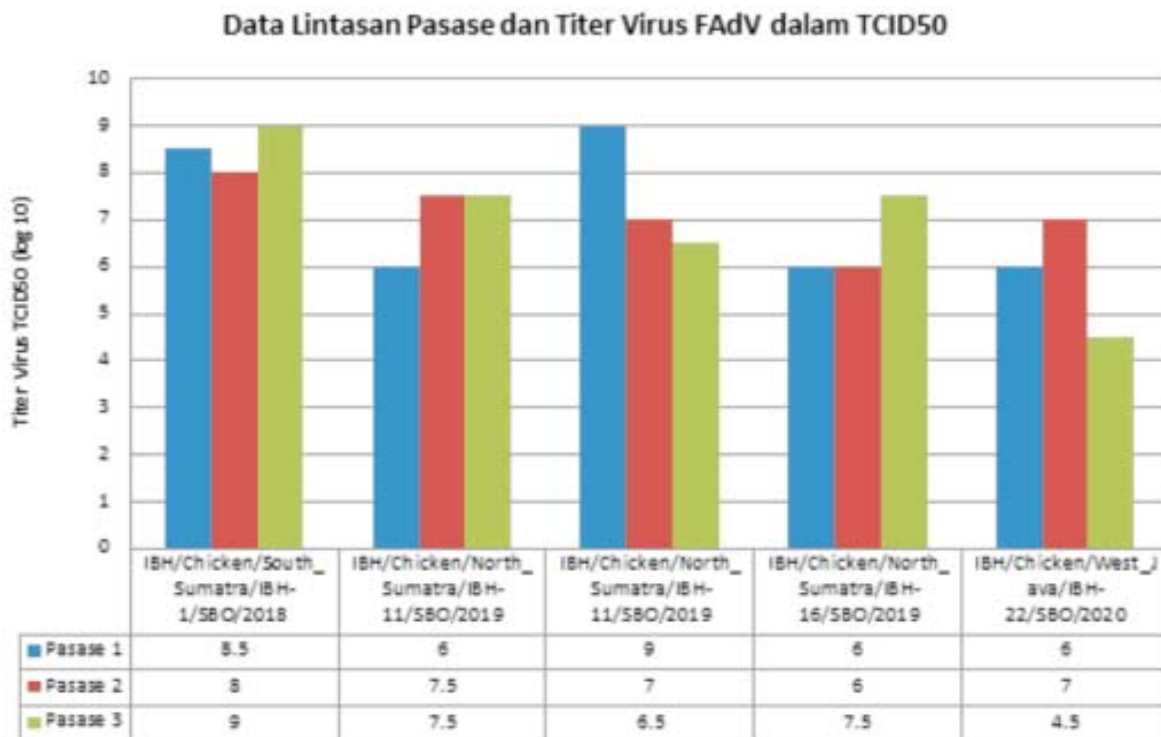
Kelima isolat positif IBH asal suspense CAM kemudian diinokulasikan dengan metode *biakan jaringan* sel CEL dan ke dalam TAB SPF. Sel yang terinfeksi isolat IBH menunjukkan efek sitopatik (CPE) berupa pembulatan, penggumpalan, degenerasi, dan pelepasan sel dari sel CEL *monolayer*. Gangguan CPE pertama kali diobservasi muncul pada 48-72 jam pascainokulasi pada pasase pertama. Kelainan CPE yang teramati berupa penggumpalan dan pelepasan sel dari media pertumbuhan. Sel mulai banyak yang terlepas pada 72-96 jam pascainokulasi. Pada pasase kedua dan seterusnya, CPE mulai muncul dan teramati pada 24-48 jam pascainokulasi. Hal ini menandakan bahwa isolat IBH mulai teradaptasi pada sel CEL. Sementara itu, tidak ditemukan CPE pada kelompok sel kontrol (Gambar-5). Hal ini sejalan dengan penelitian Soumyalekshmi *et al.* (2019) bahwa CPE terbentuk pada 48-72 jam pascainokulasi pada pertama kali pasase di CEL, kemudian CPE muncul dan teramati lebih cepat yaitu 24-48 jam pascainokulasi pada pasase ketiga dan seterusnya.

Sebanyak tiga kali pasase dilakukan dengan metode *tissue culture* untuk mengetahui kestabilan hasil atenuasi virus FAdV di sel CEL. Kemudian dilakukan juga uji kandungan virus dengan menggunakan TCID50. Didapatkan hasil bahwa isolat IBH-1 memiliki titer yang cukup stabil dan lebih tinggi dibandingkan dengan isolat IBH lainnya. Data lintasan pasase dan titer virus disajikan pada Gambar 6.

Virus FAdV juga dapat diisolasi dalam



Gambar 5. Hasil inokulasi *Fowl Adenovirus* (FAdV) pada sel CEL pada 48 jam pasca inokulasi. Gambar A berupa sel yang diinokulasi sampel lapang dengan konfirmasi positif *polymerase chain reaction* (PCR) gen hexon, terbentuk *cytopathic effect* (CPE) berupa sel yang menggumpal. Gambar B berupa sel kontrol yang tidak terbentuk CPE.



Gambar 6. Data lintasan pasase pada media sel hati embrio ayam *SpecificPathogenic Free* (SPF) beserta titer virus pada tiap pasase.

kultur sel *chicken embryo fibroblast* (CEF) yang diinokulasi dari sumber homogenat jaringan hati. Efek sitopatik (CPE) mulai dapat diamati pada pasase kedua ketika ditanam pada kultur sel-sel CEF (Abghour *et al.*, 2019). Dalam penelitian ini, lesi CPE sudah dapat teramati

pada pasase pertama. Lesi tersebut berupa pembulatan, penggumpalan, degenerasi, dan pelepasan sel dari sel CEL *monolayer*. Berbeda dengan laporan Sharif *et al.* (2020) bahwa FAdV ditumbuhkan pada sel vero teramati vakuolisasi dan pelepasan sel setelah 72 jam inkubasi.

SIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa kasus yang didiagnosis penyakit IBH pada ayam komersial dalam penelitian ini dapat dikonfirmasi penyebabnya adalah FAdV-E, termasuk dalam serotipe 8b. FAdV dan dapat diisolasi pada TAB SPF dengan lesi yang teramati adalah perdarahan embrio dan hepatitis. Pasase pada CEL menyebabkan lesi CPE yaitu pembulatan, penggumpalan, degenerasi, dan pelepasan sel yang teramati 48-72 jam setelah inokulasi. Di antara lima isolat yang dipasase sebanyak tiga kali, sampel IBH/*Chicken/South_Sumatra/IBH-1/SBO/2018* memnunjukkan titer terbaik, yaitu 10^9 TCID₅₀.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait dengan kestabilan pasase, baik itu pada media TAB SPF maupun dengan kultur sel hati. Kemudian diuji titer kandungan virus dan dibandingkan isolat mana yang lebih memperlihatkan kestabilan pertumbuhan virusnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada drh. Arini Nurhandayani, MM. selaku Factory Manager di PT. Sanbio Laboratories dan Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada yang telah memfasilitasi penulis sejauh ini dari awal penelitian sampai pada tahap akhir pembuatan artikel jurnal dengan baik dan benar. Serta Laboratorium Riset dan Pengembangan PT. Sanbio Laboratories atas fasilitas yang diberikan sehingga penelitian dapat selesai pada waktunya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abghour S, Zro K, Mouahid M, Tahiri F, Tarta M, Berrada J, Kichou F. 2019. Isolation and characterization of fowl aviadenovirus serotype 11 from chickens with inclusion body hepatitis in Morocco. *PLoS ONE* 14(12): e0227004.
- Abghour S, Zro K, Mouahid M, Berrada J, Kichou F. 2021. Pathogenicity of fowl Adenovirus serotype 11 in specific pathogen free chicken embryos. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* p-ISSN: 2028-991X.
- Grafl B, Garcia-Rueda C, Cargill P, Wood A, Schock A, Liebhart D, Schachner A, Hess M. 2017. Fowl Aviadenovirus Serotype 1 Confirmed as The Aetiological Agent of Gizzard Erosions in Replacement Pullets and Layer Flocks in Great Britain by Laboratory and in Vivo Study. *Avian Pathol.*47 (1): 63-72.
- Hafez HM. 2011. Avian Adenoviruses Infection with Special Attention to Inclusion Body Hepatitis/Hydropericardium Syndrom and Egg Drop Syndrome. *Pakistan Vet J* 31(2): 85-92.
- Hess M. 2000. Detection and Differentiation of Avian Adenoviruses a Review. *Avian Pathol* 29: 196-206.
- Hess M. 2021. Aviadenoviruses. Dalam: *Diseases of Poultry*, Swayne DE., Boulianne M, Logue CM, Mc Dougald LR, Nair V, Suarez D L (Eds). 14th. Ed. Wiley Blackwell, New Jersey: Hlm. 322-331.
- Hussein I, Mahmood MS, Arshad MI, Akthar M, Mahmood F, Rafique A. 2012. Immune Dysfunction in Broiler Chickens Experimentally Inoculated with Fowl Adenovirus Serotype-4 Associated with Inclusion Body Hepatitis Hydropericardium Syndrome. *Turkiye .J Vet Anim Sci* 36 (3): 223-230.
- Junnu S, Lertwatcharasarakul P, Jala S, Phattanakulanan S, Monkong A, Kulprasertsri S, Thivalai C, Chakritbudsabong W, Chaichoun K, Songserm T. 2015. An Inactivated Vaccine for Prevention and Control of Inclusion Body Hepatitis in Broiler Breeders. *Thai J Vet Med* 45(1): 55-62.
- Marek A, Gunes A, Schulz E, Hess M. 2010. Classification of Fowl Adenoviruses by Use of Phylogenetic Analysis and High-Resolution Melting-Curve Analysis of The Hexon L1 Gene Region. *J Virol Methods* 170: 411-417.
- Matos M, Grafl B, Liebhart D, Hess M. 2016. The Outcome of Experimentally Induced Inclusion Body Hepatitis by Fowl Aviadenoviruses is Crucial Influenced by

- Genetic Background of the Host. *Vet Res* 47: 69. DOI 10.1186/s13567-016-0350-0.
- Meulemans G, Boschmans M, Berg TP, Decaesstecker M. 2001. Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathol* 30(6): 655-660.
- Mirzazadeh A, Asasi K, Schachner A, Mosleh N, Liebhardt D, Hess M, Graft B. 2019. Gizzard Erosion Associated with Fowl Adenovirus Infection in Slaughtered Broiler Chicken in Iran. *Avian Dis* 63: 568-576.
- Niczyporuk JS, Samorek-Salamonowicz E, Czekaj H. 2013. Analysis of adenovirus strains isolated from poultry in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy* 57: 305-310.
- Niu H, Sun W, Zhang G, Du Y, Wang Sun H, Xiao Y, Liu S. 2016. Hydropericardium Syndrome Outbreak Caused by Fowl Adenovirus Serotype 4 in China in 2015. *J of Gen Virol* 97: 2684-2690.
- Pan Q, Liu L, Gao Y, Liu C, Qi X, Zhang Y, Wang Y, Li K, Gao L, Wang X, Cui H. 2017. Characterization of a Hiervirulent Fowl Adenovirus 4 with the Novel Genotype Newly Prevalent in China and Establishment of Reproduction Infection Model of Hydropericardium Syndrome in Chicken. *Poultry Science* 96: 1581-1588.
- Prajitno TY, Putra K, Wisaksana IWY, Herliana I. 2019. The rise of fowl adenovirus-associated diseases in Asia. *International Hatchery Practice* 33: 7.
- Russell WC. 2009. Adenoviruses: Update on Structure and Function. *J of Gen Virol* 90: 1-20.
- Silaen OSM, Murtini S, Pamungkas J, Nugroho CMH. 2020. Isolation and Molecular Characterization of Fowl Aviadenovirus Associated with Inclusion Body Hepatitis from Poultry in Banten and West Java, Indonesia. *Vet. World*. 13(9): 1940-1946.
- Schachner A, Matos M, Graft B, Hess M. 2018. Fowl Adenovirus-induced Diseases and Strategy for Their Control-A Review on the Current Global Situation. *Avian Pathol* 47(2): 111-126.
- Shah MS, Ashraf A, Khan MI, Habib M, Chughtai MI, Qureshi JA. 2017. Fowl Adenovirus: History, Emergence, Biology and Development of a Vaccine Against Hydropericardium Syndrome. *Arch Virol* DOI 10.1007/s00705-017-3313-5.
- Wibowo MH, Sahesty A, Mahardika BK, Purwanto B, Lestariningsih CL, Suardana IBK, Winaya IBO, Irine I, Suryanggono J, Jonas M, Murwijati T, Mahardika GN. 2019. Epizootiology, Cinical Signs, and Phylogenetic Analysis of Fowl Adenovirus in Chicken Farms in Indonesia from 2018 to 2019. *Avian Dis* 63: 619-624.