

PENEGUHAN DIAGNOSIS PENYAKIT *NEWCASTLE DISEASE* LAPANG PADA AYAM BURAS DI BALI MENGGUNAKAN TEKNIK RT-PCR

Diagnosis Confirmation of Newcastle Disease on Native Chicken in Bali Using RT-PCR Method

Gusti Ayu Yuniati Kencana¹, I Made Kardena², dan I Gusti Ngurah Kade Mahardika³

¹Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar

²Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar

³Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar

E-mail: yuniatikencana@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mendiagnosis kasus *newcastle disease* (ND) lapangan pada ayam bukan ras yang bersifat akut melalui hasil pemeriksaan di Laboratorium Patologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana tahun 2008-2009. Sebanyak sepuluh ekor sampel ayam buras telah diperiksa. Gejala klinis yang teramati meliputi: anoreksia, lesu, bersin, batuk, dan diare putih kehijauan dengan diagnosis sementara sebagai penyakit ND yang bersifat akut. Sampel diambil dari organ yang mengalami perubahan patognomonis seperti pada proventrikulus, ventrikulus, seka tonsil, paru-paru dan otak. Perbanyakkan virus menggunakan telur ayam bertunas (TAB) umur 10 hari melalui ruang alantois dan diinkubasikan pada inkubator telur suhu 37° C selama 3 hari. Koleksi cairan alantois dilakukan pada hari ke-3, selanjutnya diidentifikasi dengan uji serologi hemaglutinasi (*Haemagglutination-Inhibition Test/HA/HI*) dengan teknik mikrotiter baku dan dikonfirmasi dengan uji *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) menggunakan primer FNDIFP (5'-CCCCGTTGGAGGCATAC-3') dan FNDIBP (5'-TGTTGGCAGCATTTTGATTG-3'). Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua sampel kasus ayam bukan ras yang diperiksa positif terinfeksi oleh virus penyakit ND akut. Kajian ini mengindikasikan bahwa penyakit ND di Bali masih bersifat endemis.

Kata kunci: ND, uji RT-PCR, ayam bukan ras, Bali

ABSTRACT

This study aims to describe acute field newcastle disease (ND) cases examined at Pathology Laboratory and Biomedical Laboratory Faculty of Veterinary Medicine Udayana University within 2008-2009. Ten native chickens have been examined and the clinical symptoms found were anorexia, lethargy, sneezing, coughing, and greenish white diarrhea. Samples were collected from organs that showed typical signs such as proventriculus, ventrikulus, caecal tonsils, lungs, and brain. Multiplication of the virus was done in alantoic cavity of 10 days old embryonated chicken eggs then incubated at 37° C for 3 days. Alantoic fluid was harvested three days after incubation. VND was identified by Haemagglutination-inhibition Test (HI) with standard micro titer technique and confirmed by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) using FNDIFP (5'-CCCCGTTGGAGGCATAC-3') and FNDIBP primers (5'-TGTTGGCAGCATTTTGATTG-3'). Results showed that all samples were infected by Newcastle Disease virus. This study indicates that VND is endemic in Bali.

Key words: ND, RT-PCR, native chicken, Bali

PENDAHULUAN

Newcastle disease (ND) merupakan penyakit menular yang sangat merugikan peternak ayam. Di Indonesia penyakit ND dikenal pula dengan sebutan penyakit *tetelo*, sedangkan di Bali lebih dikenal dengan istilah penyakit *gerubug*. Kejadian penyakit bersifat akut sampai kronis, dapat menyerang semua jenis unggas terutama ayam, baik ayam ras maupun ayam bukan ras (buras). Oleh karena itu kasus ND merupakan ancaman serius bagi industri peternakan di Indonesia (Santhia, 2003; Tabbu, 2000).

Penyakit ND disebabkan oleh *Avian Paramyxovirus type-1* (APMV-1), genus *Avulavirus* famili *Paramyxoviridae*, merupakan virus RNA dengan genom serat tunggal (*single stranded/ss*) dan berpolaritas negatif. Famili *Paramyxoviridae* berbentuk pleomorfik, biasanya berbentuk bulat dengan diameter 100-500 nm, namun ada pula yang berbentuk filamen, dan beramplop. Ada sembilan *serotype* dari avian *Paramyxovirus* yaitu APMV-1 sampai APMV-9 (OIE, 2002).

Berdasarkan atas virulensinya, virus ND (VND) dikelompokkan menjadi tiga *patotype* yaitu: lentogenik adalah *strain* virus yang kurang virulen, mesogenik merupakan *strain* virus dengan virulensi sedang, dan velogenik adalah *strain* virus ganas. *Strain* velogenik dibedakan lagi menjadi bentuk neurotrofik dengan gejala gangguan saraf dan kelainan pada sistem pernafasan, dan bentuk viserotrofik yang ditandai dengan kelainan pada sistem pencernaan (Aldous dan Alexander, 2001).

Kerugian akibat penyakit ND disebabkan karena angka kesakitan (morbiditas) maupun angka kematian (mortalitas) pada ternak unggas yang sangat tinggi. Mortalitas maupun morbiditas dapat mencapai 50-100% akibat infeksi VND *strain* velogenik terutama pada kelompok ayam yang peka, 50% pada *strain* mesogenik, dan 30% pada infeksi virus *strain* velogenik (Tabbu, 2000).

Penularan VND dapat terjadi secara langsung antar ayam dalam satu kelompok ternak tertular. Sumber virus biasanya berasal dari ekskreta ayam terinfeksi baik melalui pakan, air minum, lendir, feses, maupun

udara yang tercemar virus, peralatan, dan pekerja kandang. Patogenisitas VND dipengaruhi oleh galur virus, rute infeksi, umur ayam, lingkungan, dan status kebal ayam saat terinfeksi virus. Selama sakit, ayam mengeluarkan virus dalam jumlah besar melalui feses (Alexander, 2001).

Masa inkubasi dan gejala klinis penyakit ND pada ayam bervariasi, tergantung pada *strain* virus dan status kebal ayam saat terinfeksi. Pada infeksi virus *strain* lentogenik, penyakit bersifat subklinis, atau ditandai dengan gangguan respirasi yang bersifat ringan seperti bersin dan keluar leleran dari hidung. Infeksi virus *strain* mesogenik bersifat akut ditandai dengan gangguan respirasi dan kelainan saraf. Gejala klinis pada ayam ditandai dengan penurunan nafsu makan, jengger dan pial sianosis, pembengkakan di daerah kepala, bersin, batuk, ngorok, dan diare putih kehijauan. Infeksi virus *strain* velogenik bersifat fatal, seringkali diikuti dengan angka kematian yang tinggi. Gejala tersebut sangat bervariasi, diawali dengan konjungtivitis, diare serta diikuti dengan gejala saraf seperti tremor, tortikolis, atau kelumpuhan pada leher dan sayap (Ghiamirad *et al.*, 2010).

Perubahan patologi anatomi yang patognomonis pada penyakit ND ditandai dengan *ptechie* pada proventrikulus, ventrikulus, usus, seka tonsil, trakea, dan paru-paru (Kencana dan Kardena, 2011). Diagnosis sementara penyakit ND berdasarkan atas pemeriksaan epidemiologi, gejala klinis, dan perubahan patologi anatomi yang patognomonis. Peneguhan diagnosis berdasarkan atas hasil isolasi dan identifikasi virus (Alexander, 2001).

Penelitian ini bertujuan meneguhkan diagnosis penyakit ND akut dari kasus lapang pada ayam buras berdasarkan atas hasil isolasi dan identifikasi virus yang dikonfirmasi dengan uji serologi Haemaglutinasi (HA/HI) menggunakan teknik mikrotiter baku dan uji *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) (WHO, 2002). Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada peternak dan pengambil kebijakan dalam mengatasi kerugian akibat penyakit ND pada peternakan rakyat.

MATERI DAN METODE

Sebanyak sepuluh ekor ayam buras umur 1,5-4 bulan digunakan sebagai sampel penelitian. Ayam tersebut berasal dari kasus lapang yang dikirim ke Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar selama periode tahun 2008-2009. Diagnosis sementara penyakit ND didasarkan atas gejala klinis dan perubahan patologi anatomi yang bersifat patognomonis (Kencana dan Kardena, 2011).

Pemeriksaan dilanjutkan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar. Sampel diambil dari organ-organ yang mengalami perubahan meliputi: proventrikulus, ventrikulus, usus, seka tonsil, paru-paru, dan otak. Semua sampel digerus untuk dijadikan suspensi dengan

konsentrasi 10% dalam larutan *phosphat buffered saline* (PBS) steril, ditambah antibiotik dan disuntikkan pada ruang alantois telur ayam bertunas (TAB) umur 9 hari. Telur diinkubasikan pada inkubator suhu 37° C selama 2-3 hari. Cairan alantois dikoleksi dan digunakan sebagai sumber antigen. Konfirmasi virus dilakukan dengan serum ND standar menggunakan uji hemaglutinasi (HA) dan uji hambatan hemaglutinasi (HI) teknik mikrotiter prosedur baku (OIE, 2002).

Uji Hemaglutinasi dengan Teknik Mikrotiter

Uji hemaglutinasi dengan teknik mikrotiter diawali dengan menambahkan masing-masing 0,025 ml PBS pada setiap sumuran plat mikro menggunakan mikro pipet kecuali pada sumuran pertama. Sebanyak 0,025 ml cairan alantois yang diuji ditambahkan pada sumuran pertama dan kedua. Pengenceran seri berkelipatan dua dilakukan mulai dari sumuran ke-2 sampai ke-11 dengan menggunakan pengencer mikro. Sumuran plat mikro ke-1 sampai ke-12 selanjutnya ditambahkan dengan 0,025 ml PBS. Sebanyak 0,05 ml sel darah merah unggas 0,5% ditambahkan ke dalam setiap sumuran plat mikro dan dicampur menggunakan pengayak mikro selama 30 detik. Reaksi positif ditandai dengan adanya bentukan kristal pada campuran tersebut. Kebalikan dari pengenceran tertinggi yang masih dapat menghemaglutinasi sel darah merah adalah merupakan titer virus ND.

Uji Hambatan Hemaglutinasi

Uji HI bertujuan untuk mengkonfirmasi virus ND menggunakan plat mikro berbentuk U dengan 96 sumuran. Proses tersebut dilakukan dengan 2 kali ulangan berdasarkan prosedur baku (OIE, 2009). Sebanyak 0,025 ml PBS diteteskan ke dalam sumuran ke-2 sampai ke-12. Sumuran pertama dan kedua diisi dengan serum standar ND kemudian diencerkan secara berseri kelipatan dua mulai dari sumuran ke-2 sampai ke-11 dengan pengencer mikro. Masing-masing sumuran plat mikro ditambahkan dengan 0,025 ml suspensi antigen ND 4 unit HA mulai dari sumuran nomor 1 sampai nomor 11. Sumuran nomor 12 hanya diisi dengan PBS sebanyak 0,025 ml. Tahapan berikutnya adalah dilakukan pengayakan selama 30 detik, selanjutnya plat mikro ditempatkan pada suhu kamar selama 30 menit. Suspensi sel darah merah konsentrasi 0,5% ditambahkan ke dalam sumuran ke-1 sampai ke-12 sebanyak 0,05 ml lalu diayak kembali selama 30 detik. Plat mikro ditempatkan pada suhu kamar dan diamati setiap 15 menit. Hasil positif ditandai dengan terjadinya hambatan hemaglutinasi berupa pengendapan sel darah merah di dasar sumuran plat mikro.

Uji RT-PCR

Amplifikasi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan enzim *SuperScriptTM III onestep RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Siklus RT-PCR dilakukan dengan kondisi 50° C selama 1 jam, 95° C selama 7 menit, 94° C selama

45 detik, 52° C selama 45 detik, dan *elongasi* pada suhu 72° C selama 1 menit 30 detik disebut satu siklus. Siklus pertama diulang kembali sebanyak 44 kali. Tahap penyempurnaan kerja enzim dilakukan pada suhu 72° C selama 5 menit untuk memperoleh fragmen yang sempurna. Sekuens primer yang digunakan FNDIFP (5'-CCCCGTTGGAGGCATAC-3') dan FNDIBP (5'-TGTTGGCAGCATTTTGATTG-3'). Pengamatan hasil PCR dilanjutkan dengan melakukan elektroforesis. Sepuluh persen dari produk PCR ditambahkan *loading dye* (*bromphenol-blue* dan *cyline cyanol*) sebanyak 1 µl, dan selanjutnya dielektroforesis pada gel konsentrasi 1% (1 gram *agarose* dalam 100 ml TAE) yang ditambahkan *etidium bromide* sebanyak 2,5 µl bersama 100-bp *ladder* (Invitrogen) sebagai *marker*. Visualisasi DNA menggunakan *transluminator ultraviolet* (UV) dan hasilnya didokumentasikan dengan kamera dan film polaroid (OIE, 2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 10 sampel kasus lapang ayam buras yang dijadikan bahan penelitian telah dinyatakan positif ND dengan uji RT-PCR (Gambar 1). Tiga sampel telah diperiksa pada tahun 2008 dan tujuh sampel lainnya diperiksa pada tahun 2009. Secara terinci sebaran data kasus ND lapang asal ayam buras selama periode tahun 2008-2009 disajikan pada Tabel 1.

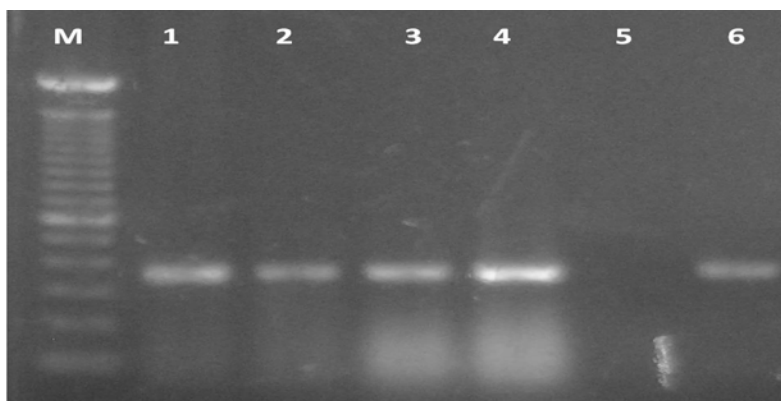
Hasil isolasi pada TAB menunjukkan adanya pertumbuhan virus yang ditandai dengan kematian embrio pada hari ketiga disertai dengan perdarahan dan gangguan pertumbuhan (embrio kerdil). Cairan alantois TAB selanjutnya diidentifikasi dengan uji serologi HA/HI, sebagian menunjukkan hasil positif. Konfirmasi lebih lanjut terhadap hasil uji HA/HI yang negatif menggunakan uji RT-PCR, ternyata hasilnya positif. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa virus tersebut merupakan virus ND lapang yang bersifat velogenik (data tidak ditunjukkan).

Virus famili Paramyxoviridae mempunyai sifat dapat mengaglutinasi sel darah merah unggas. Proses hemaglutinasi terjadi akibat aktivitas hemaglutinin yang terdapat pada amplop virus tersebut. Aktivitas

hemaglutinasi berlangsung maksimal selama satu jam karena dipengaruhi oleh kerja enzim *neuraminidase* yang merusak ikatan pada reseptor eritrosit dengan hemaglutinin dari virus famili Paramyxoviridae. Pada uji RT-PCR, genomik RNA virus ND diisolasi dari sampel dengan digesti proteinase K, diikuti dengan ekstraksi menggunakan trizol (Invitrogen), kemudian dielektroforesis untuk mengetahui panjang produk basa dari gen yang diuji. Uji RT-PCR tidak bersifat spesifik karena dapat digunakan untuk menguji semua antigen, namun uji tersebut bersifat sangat sensitif karena hanya memerlukan sampel antigen yang sedikit. Uji RT-PCR mempunyai sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan uji HA/HI.

Beberapa penelitian tentang vaksinasi penyakit ND dengan program vaksinasi yang berbeda telah dilakukan (Lima *et al.*, 2004; Al-Zubeedy, 2009) namun penyakit ND tetap bertahan sampai saat ini. Kasus penyakit ND yang disebabkan oleh virus patogen dari *strain* velogenik telah dilaporkan di Indonesia (Adi *et al.*, 2010). Pada penelitian ini semua sampel berasal dari kasus lapangan yang dilaporkan mempunyai riwayat masa inkubasi antara 2-4 hari. Masa inkubasi kasus yang singkat tersebut digolongkan sebagai penyakit ND yang bersifat akut, terlebih lagi kasus ND ditemukan pada ayam buras yang pada umumnya bersifat lebih kebal terhadap penyakit ND dibandingkan dengan ayam ras. Meskipun demikian, dari anamnesa pada kasus infeksi penyakit ND yang menyerang ayam muda umur 1-5 bulan rata-rata kematiannya mencapai 50-60% (Adi *et al.*, 2010).

Kejadian penyakit ND di Bali bersifat endemik karena ditemukan pada peternakan ayam buras yang umumnya merupakan peternakan rakyat. Pencegahan penyakit ND harus dilakukan dengan program vaksinasi dan sanitasi yang baik pada ayam buras. Vaksinasi diberikan pada umur 4 hari melalui tetes mata, umur 21 hari melalui tetes mata atau suntikan, umur 3 bulan melalui tetes mata atau suntikan, dan diulang kembali setiap 3 bulan sesuai prosedur dari pabrik obat (Zainudin dan Wibawan, 2009). Vaksin galur B1 dan LaSota telah terbukti merangsang timbulnya tanggapan kebal humoral yang baik pada



Gambar 1. Hasil RT-PCR deteksi virus ND dari ayam buras (Jalur M adalah 100-bp Ladder (Invitrogen). Lajur 1-4 adalah isolat ND dari kasus ayam buras; Lajur 5 adalah kontrol negatif dari cairan alantois telur yang tak terinfeksi; lajur 6 adalah kontrol positif dari RNA vaksin LaSota).

Tabel 1. Data kasus ND lapang pada ayam bukan ras periode tahun 2008-2009

Protokol Kasus	Asal	Jenis Kelamin	Umur (bulan)	Uji HA/HI	Uji RT-PCR
171/N/08	Mengwi, Badung	Jantan	4	+/-	+
216/N/08	Penebel, Tabanan	Betina	2	+/-	+
215/N/08	Penebel, Tabanan	Betina	2	+/+	+
241/N/09	Mengwi, Badung	Betina	2,5	+/-	+
242/N/09	Bangli	Betina	3	+/+	+
246/N/09	Mengwi, Badung	Jantan	5	+/+	+
247/N/09	Mengwi, Badung	Jantan	1,5	+/+	+
251/N/09	Mengwi, Badung	Betina	3	+/+	+
256/N/09	Mengwi, Badung	Jantan	2	+/+	+
257/N/09	Karang Asem	Jantan	3	-/-	+

+/- : Hasil positif/negatif

unggas (Schmidt *et al.*, 2008). Pemeliharaan ayam buras secara bebas cenderung meningkatkan peluang untuk kontak dengan ternak unggas lain yang berpotensi besar dalam penyebaran penyakit ND. Sanitasi lingkungan dan cara pemeliharaan ayam buras dengan sistem dikandangkan meskipun dengan kandang jaring sangat bermanfaat dalam mengurangi kasus ND pada ternak unggas.

Diagnosis secara molekular menggunakan teknik RT-PCR dan sekuensing dapat mendeteksi virus secara cepat dan akurat. Virus ND patogen mempunyai sekuens ¹¹²R/K-R-Q-R/K-R¹¹⁶ dengan C terminal dari protein F2 dan F (fenilalanin) yang merupakan residu pada posisi 117, sedangkan virus yang kurang patogen mempunyai sekuens ¹¹²G/E-K/R-Q-G/E-R¹¹⁶ dengan L (leusin) pada posisi 117 (OIE, 2002). Hasil sekuensing isolat kasus ND lapangan kemudian dianalisis dengan Mega 4.0, maka gambaran *phylogenetic tree* akan menjawab kejadian penyakit ND yang bersifat endemik di Indonesia.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil uji serologi HA/HI yang telah dikonfirmasi dengan uji RT-PCR maka semua sampel ayam buras yang diteliti adalah positif terinfeksi oleh virus penyakit ND. Kajian ini menegaskan bahwa kejadian penyakit ND di Bali masih bersifat endemis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan hasil identifikasi kasus lapangan yang masuk ke Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, yang dikaji secara terpadu oleh empat laboratorium. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih atas kerja sama segenap sejawat yang tergabung dalam pengelola Program Profesi Dokter Hewan khususnya pengelola Koasistensi Diagnostik Laboratorik (Kodil).

DAFTAR PUSTAKA

- Adi, A.A.A., M. Astawa, N.M. Putra, K.S.A. Hayashi, and Y. Matsumoto. 2010. Isolation and characterization of a pathogenic newcastle disease virus from a natural case in Indonesia. **J. Vet. Med. Sci.** 72(3):313-319.
- Aldous, E.W. and D.J. Alexander. 2001. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type1). **Avian Pathol.** 30:117-128.
- Alexander, D.J. 2001. Newcastle disease: The Gordon Memorial Lecture. **Br. Poult. Sci.** 42:5-22.
- Al-Zubeedy, A.Z. 2009. Immune respons in day old broiler chicks vaccinated against Newcastle disease virus. **Iraqi J.Vet. Sci.** 23(2):143-146.
- Ghiamirad, M., A. Pourbakhsh, H. Keyvanfar, Momayaz, S. Charkhar, and A. Ashtari. 2010. Isolation and characterization of Newcastle disease virus from ostriches in Iran. **African J. of Microbiology Research** 4(23):2492-2497.
- Kencana, G.A.Y. and I.M. Kardena. 2011. Gross pathological observation of acute Newcastle disease in domestic chicken. **Prosiding Seminar Internasional Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia (PERMI) dan International Union of Microbiological Societies (IUMS)**. Denpasar, 22-24 Juni 2011.
- Lima, F.S., E. Santin, A.C. Paulillo, L.D. Junior, V.M.B. de Moraes, N.M.Q. Gama, and R.P.S. Iturino. 2004. Evaluation of different programs of Newcastle disease vaccination in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **International J. Poultry Science** 3(5):354-356.
- Santhia, K. 2003. Strategi diagnosa dan penanggulangan Newcastle disease. **Prosiding Seminar Regional Perunggasan**. Universitas Udayana. Denpasar, 6 Oktober 2003.
- Scmidt E.M.D.S., A.C. Pulillo, L.F. Caron, T.F. Fisho, M.Agustin, H.L.B.Ventura, and R.L. Dtrich. 2008. Evaluation of experimental vaccination against Newcastle disease and the blood proteinogram in ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus*) during breeding season. **Int. J. of Poultry Science** 7(7):661-664.
- Tabbu, C.R. 2000. **Penyakit Ayam dan Penanggulangannya: Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral**. Kanisius, Yogyakarta.
- The Center for Food Security and Public Health. 2008. **Newcastle Disease: Avian Paramyxovirus-1 Infection, Goose Paramyxovirus Infection**. Iowa State University, Iowa.
- OIE. 2002. Newcastle disease. http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_A160.htm.
- Zainudin, D. dan I.W.T. Wibawan. 2009. Biosekuriti dan manajemen penyakit ayam lokal. <http://www.scribd.com/doc/16985320/biosekuriti-ayam-lokal>.