

DOI <http://dx.doi.org/10.36722/sst.v9i1.2143>

# Gambaran Patologi Embrio Ayam yang Terinfeksi *Avian orthoreovirus* Isolat Lokal

Raditya Pradana Putra<sup>1</sup>, Sri Murtini<sup>2\*</sup>, Okti Nadia Poetri<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Ilmu Biomedis Hewan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Jl. Agatis IPB Dramaga, Bogor, 16680.

<sup>2</sup>Divisi Mikrobiologi Medik, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Jl. Agatis IPB Dramaga, Bogor, 16680.

Penulis untuk Korespondensi/E-mail: [slimurtini\\_fkh@apps.ipb.ac.id](mailto:slimurtini_fkh@apps.ipb.ac.id)

**Abstract** – *Avian orthoreovirus* (ARV) is widespread and found in almost every commercial poultry farm and other poultry species. Virus isolation from local isolates is necessary to obtain vaccine seeds that are homologous to viruses in the field. The R&D Laboratory of PT Vaksindo Satwa Nusantara successfully isolated ARV from field cases. Inoculation of SPF Embryonated Chicken Eggs (ECE) is the protocol used to evaluate virus titer, especially to calculate the antigen titer of vaccine prototype candidates. The gross pathology of chicken embryos infected with ARV to evaluate virus growth has not been widely reported. This study aims to observe the gross pathology of chicken embryos infected with ARV to measure the virus titer using infectivity test such as the embryo infectious dose 50 (EID<sub>50</sub>). The virus suspension was diluted from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-6</sup> then dilutions of 10<sup>-4</sup> to 10<sup>-6</sup> were inoculated each into five ECE. Incubated ten days and observed for embryonic death. The observations found the embryonic death on day seven. Pathological changes in the embryos are stunted, thin feather, oedema, and less allantois fluid compared to control of uninfected embryo. The results of the embryos necropsy showed cardiac necrosis, greenish liver, and gelatinous exudate in the abdominal cavity.

**Abstrak** – *Avian orthoreovirus* (ARV) tersebar luas dan ditemukan hampir di setiap peternakan unggas komersial dan spesies unggas lainnya. Isolasi virus dari isolat lokal diperlukan untuk mendapatkan bibit vaksin yang homolog dengan virus di lapangan. Laboratorium R&D, PT. Vaksindo Satwa Nusantara berhasil mengisolasi ARV dari kasus di lapangan. Inokulasi pada telur ayam berembrio (TAB) SPF merupakan protokol yang digunakan untuk mengevaluasi titer virus, khususnya untuk menghitung titer antigen dari kandidat prototipe vaksin. Gambaran patologis embrio ayam yang terinfeksi ARV untuk mengevaluasi pertumbuhan virus belum banyak dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati gambaran patologis embrio ayam yang terinfeksi ARV sehingga dapat digunakan dalam menghitung titer virus dengan uji infektivitas embrio infectious dose 50 (EID<sub>50</sub>). Suspensi virus diencerkan secara desimal dari pengenceran 10<sup>-1</sup> sampai 10<sup>-6</sup> kemudian 10<sup>-4</sup> sampai 10<sup>-6</sup> diinokulasikan masing-masing 5 butir TAB. Diinkubasi sepuluh hari dan diamati ada tidaknya kematian embrio. Hasil pengamatan menunjukkan adanya kematian embrio pada hari ke-7. Perubahan patologi embrio berupa kekerdilan, bulu tipis, oedema dan cairan allantois lebih sedikit dibandingkan telur berembrio kontrol tanpa infeksi. Hasil nekropsis embrio menunjukkan adanya nekrosis jantung, hati berwarna kehijauan dan eksudat gelatinous pada rongga abdomen.

**Keywords** - *Avian Orthoreovirus, Embryonated Chicken Eggs, Embryo Pathology, EID<sub>50</sub>*.

## PENDAHULUAN

**A***avian orthoreovirus* pertama kali diisolasi pada tahun 1954 dari saluran pernafasan unggas. Pada tahun 1957 di *West Virginia University* juga

dilaporkan agen yang diisolasi dari ayam pedaging yang menunjukkan lesi tenosinovitis namun kurang peka terhadap pengobatan antibiotik. Agen penyebab tenosinovitis yang baru ditemukan tersebut hanya bersifat patogen pada anak ayam.

Virus ini akhirnya diidentifikasi dengan menggunakan mikroskop elektron sebagai reovirus [1]. Nama reovirus diambil dari huruf R, E, dan O yang merupakan singkatan dari *respiratory enteric orphan* karena pertama kali diisolasi pada manusia tanpa adanya asosiasi dengan penyakit manapun. *Avian orthoreovirus* termasuk dalam genus Orthoreovirus, yang merupakan salah satu dari 15 genus famili Reoviridae. Penyakit unggas yang berhubungan dengan *Avian orthoreovirus* biasanya mengakibatkan kematian yang rendah namun memiliki morbiditas tinggi sehingga menimbulkan kerugian ekonomi yang tinggi juga [2].

*Avian orthoreovirus* tersebar luas dan ditemukan hampir di setiap peternakan unggas komersial dan spesies unggas lainnya. Virus ini telah diisolasi dari berbagai spesies unggas dengan berbagai kondisi patologis [3] termasuk virus arthritis/ tenosynovitis, sindrom malabsorpsi, sindrom kekerdilan, *blue wing disease*, osteoporosis, enteritis, immunosupresi, gangguan pernafasan, gangguan syaraf, dan kematian pada musim dingin pada unggas liar. Dari beberapa jumlah kondisi patologis tersebut, yang paling umum dan mudah didiagnosis adalah virus arthritis/ tenosynovitis pada ayam broiler komersial [4], penyakit enterik dan saraf pada unggas liar [5]. *Avian orthoreovirus* paling sering ditemukan pada spesies unggas yang secara klinis normal tanpa menunjukkan gejala sakit, dengan 80-90% isolat tidak patogen [6].

Banyaknya kejadian kasus penyakit yang diakibatkan oleh *Avian orthoreovirus* dapat menyebabkan kerugian ekonomi pada sektor perunggasan di Indonesia. Kerugian ekonomi yang ditimbulkan dari penyakit *Avian orthoreovirus* ini disebabkan oleh pertumbuhan dan konversi pakan yang buruk, karena ketidakmampuan unggas yang lumpuh untuk mencapai pakan, kematian karena terinjak-injak oleh unggas yang sehat dan penurunan kualitas karkas pada ayam pedaging (usia 4-6 minggu) saat pemotongan karena penampilan tidak sedap dipandang dari sendi *hock* yang mengalami lesi. Kerugian ekonomi bisa diperparah dan dapat berlangsung lama ketika flock unggas mengalami *shedding* secara vertikal. Morbiditas dapat mencapai 100%, terutama setelah terjadi infeksi dengan strain virus yang secara genetik berbeda dari strain vaksin.

Di Indonesia penyakit infeksi *Avian orthoreovirus* ini mulai dikenal pada tahun 1985, dengan ditemukannya kejadian kasus penyakit *helicopter disease* yang menimpa beberapa peternakan ayam

pedaging di Jawa Timur dan Bali, namun agen penyakit belum dapat diisolasi [7]. Kejadian yang sama pada tahun 1991 menunjukkan banyaknya kasus kelumpuhan yang menimpa ayam pedaging dan ayam petelur disertai dengan pembengkakan serta kemerahan pada sendi lutut telah dapat diisolasi [8]. Selain itu, sindrom kekerdilan akibat *Avian orthoreovirus* juga telah diisolasi pada ayam pedaging [9] dan ayam petelur [10].

Vaksin *Avian orthoreovirus* saat ini di Indonesia masih menggunakan *isolate strain* asal luar negeri. Belum tersedianya vaksin berisi bibit vaksin lokal sehingga tingkat kecocokan antibodi yang ditimbulkan oleh vaksin impor masih belum optimal. Hal ini menyebabkan pengendalian kasus penyakit akibat *Avian orthoreovirus* belum optimal. Vaksinasi akan memberikan hasil yang optimal bila strain vaksin homolog dengan virus strain lokal [11]. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran patologi embrio ayam yang diinokulasi dengan *Avian orthoreovirus isolate local* (isolat ARV VSN).

## METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Virology, Research and Diagnostic (R&D) Sub Dept. Science and Innovation (S&I) Dept. PT. Vaksindo Satwa Nusantara.

### Isolat virus

Isolat virus dengan kode isolat ARV VSN yang digunakan pada penelitian ini merupakan isolat *Avian orthoreovirus* yang diperoleh PT. Vaksindo Satwa Nusantara dari kasus lapang pada tahun 2022 di Purwakarta, Jawa Barat.

### Telur ayam berembrio (TAB)

Telur ayam berembrio (TAB) yang digunakan pada penelitian ini merupakan telur yang diperoleh dari ayam *specific pathogen free* (SPF) dari SPF Plan PT. Vaksindo Satwa Nusantara, Bogor. Telur diinkubasi sampai dengan umur 6-7 hari pada suhu 37°C dengan tingkat kelembaban 40-60% sebelum diinokulasi virus.

### Propagasi virus

Propagasi isolat ARV VSN dilakukan dengan cara inokulasi pada telur ayam berembrio (TAB) umur 6-7. Pada TAB umur 7 hari inokulasi dilakukan dengan rute kantung kuning telur (*yolksac*). Setiap TAB diinokulasi dengan 0,1 ml pengenceran suspensi virus yang sesuai dan diinkubasikan pada inkubator telur (Victoria) suhu 37°C. Observasi

dilakukan setiap hari untuk melihat adanya kematian embrio hingga umur embrio ayam 17 hari pasca inokulasi (PI). Semua kematian embrio yang terjadi dalam kurun waktu kurang dari 24 jam dianggap tidak spesifik dan dibuang.

### Kuantifikasi titer virus

Kuantifikasi titer virus dihitung menggunakan metode Spearman-Kärber untuk menghitung titer infeksi 50% atau *Embryo Infectious Dose* 50. Suspensi virus diencerkan secara desimal dari pengenceran  $10^{-1}$  -  $10^{-6}$ . Pengenceran menggunakan PBS steril, pH 7.2, dan mengandung antibiotik. Pengenceran  $10^{-4}$  ke  $10^{-6}$  diinokulasi ke TAB SPF umur 6-7 hari (5 butir telur per pengenceran, 0.1 ml/telur). Telur diinkubasi selama 10-11 hari pada suhu 37°C. Kematian embrio yang terjadi pada inokulasi TAB SPF selama kurang dari 24 jam dianggap tidak spesifik dan dibuang. Selama inkubasi 7 hari pasca inokulasi (PI), telur yang mati lebih dari 24 jam disimpan pada lemari pendingin suhu 4°C dan pada akhir masa inkubasi semua TAB SPF dikumpulkan, dan embrio dikeluarkan dan diperiksa untuk diamati gambaran patologi anatomi dari *Avian Orthoreovirus* (ARV VSN).

Titer infeksi virus ARV dihitung dengan  $EID_{50}$  (50% *embryo infectious dose*) dengan rumus perhitungan sebagai berikut.

$$EID_{50} = - [ X_o - d/2 + d \sum ri / n ] \quad (1)$$

Keterangan:

$X_o$  = log dari pengenceran tertinggi dengan semua embrio ayam positif (+) terinfeksi.

$\sum ri$  = jumlah embrio ayam positif (+) terinfeksi.

$n$  = jumlah embrio ayam yang dipakai pada setiap pengenceran.

$d$  = logaritma dari faktor pengenceran ( $d = 1$  untuk pengenceran serial 10 kali lipat).

### Analisis data

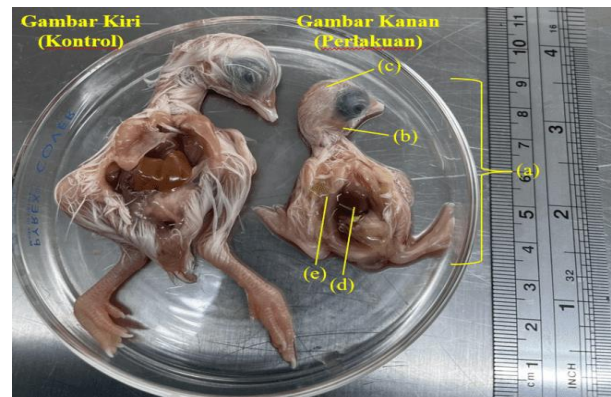
Hasil pengamatan pada telur ayam berembrio (TAB) dianalisis secara deskriptif. Hasil data penelitian ditampilkan sesuai dengan hasil pengamatan yang meliputi gambar dan tabel.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Gambaran Patologi embrio ayam

Telur ayam berembrio merupakan salah satu media yang baik untuk membiakan *Avian orthoreovirus* (ARV). Infeksi ARV pada embrio ayam menyebabkan perubahan patologi embrio berupa

oedema akibat pembendungan pada rongga abdomen dan warna kehijauan pada hati [12] [13]. Hasil pengamatan terhadap embrio ayam yang di inokulasi dengan ARV menunjukkan perubahan berupa ukuran embrio ayam kerdil (a), oedema (b), pertumbuhan bulu embrio ayam tipis (c), hati embrio ayam berwarna hijau (d) dan terdapat eksudat bergelatin (e) (Gambar 1). Hasil ini sesuai dengan pernyataan [13].

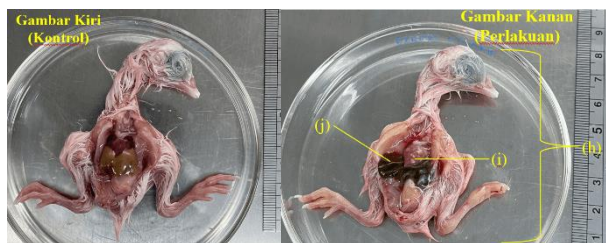


Gambar 1. Embrio ayam umur 17 hari, kontrol (kiri) dan perlakuan (kanan)

Selain itu hasil panen alantois pada telur yang diinfeksi isolat ARV VSN memiliki volume cairan yang lebih sedikit dibandingkan dengan normal. Pada embrio yang mati (f) pada hari ke-7 (Gambar 2), tampak terlihat keterlambatan perkembangan akibat infeksi virus yang mengakibatkan penutupan area abdomen tidak sempurna (g). Beberapa embrio yang diinokulasi tidak selalu mengalami semua bentuk perubahan patologi. Embrio yang diinfeksi isolat ARV VSN tidak semua mengalami kematian dan embrio tetap hidup sampai dengan inkubasi hari ke-10. Gambaran patologi embrio ayam yang telah berumur 17 hari tersebut ukurannya tampak normal dan pertumbuhan bulu yang lebat (h). Namun pada organ jantung mengalami nekrotik (i) dan hati berwarna hijau (j) (Gambar 3). Hal ini membuktikan bahwa infeksi isolat ARV VSN masih dapat menimbulkan kerusakan organ internal meskipun embrio ayam masih hidup sampai 10 hari pasca inokulasi.



Gambar 2. Embrio ayam umur 14 hari, kontrol (kiri) dan perlakuan (kanan)



Gambar 3. Embrio ayam umur 17 hari, kontrol (kiri) dan perlakuan (kanan)

### Kuantifikasi titer virus (EID<sub>50</sub>)

Titer infeksi virus dihitung berdasarkan jumlah embrio yang mengalami perubahan patologi pada setiap pengencerannya kemudian angka jumlah embrio yang terinfeksi kemudian dimasukkan ke dalam persamaan Spearman – Karber Tabel 1 [14].

Tabel 1. Observasi Patologi embrio ayam

| Isolat | Peng-<br>enceran<br>(log 10) | Jumlah mortalitas embrio hari ke- |   |   |   |   |   |    | Patologi embrio |
|--------|------------------------------|-----------------------------------|---|---|---|---|---|----|-----------------|
|        |                              | 4                                 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |                 |
| ARV    | -4                           | 0                                 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0  | 5/5             |
| VSN    | -5                           | 0                                 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0/5             |
|        | -6                           | 0                                 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0/5             |

Hasil penghitungan titer virus didapatkan nilai titer infeksi 50% adalah 10<sup>4.5</sup> EID<sub>50</sub>/0,1 ml atau adalah 10<sup>5.5</sup> EID<sub>50</sub>/ml.

### KESIMPULAN

*Avian orthoreovirus* (Isolat ARV VSN) menyebabkan terjadinya perubahan patologi embrio ayam berupa kekerdilan embrio ayam, bulu jarang, edema, nekrotik pada jantung, dan hati berwarna hijau dengan eksudat bergelatin.

Saran kegiatan penelitian ini yaitu perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui perbandingan titer virus secara TCID<sub>50</sub> melalui penentuan karakteristik efek sitopatik *Avian orthoreovirus* (isolat ARV VSN) yang dibiakkan pada kultur sel.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada PT. Vaksindo Satwa Nusantara yang telah memfasilitasi segala keperluan di laboratorium selama penelitian ini berlangsung.

### REFERENSI

- [1] L. van der Heide, 'The History of Avian Reovirus', *Avian Dis*, vol. 44, no. 3, pp. 638–641, 2000, doi: 10.2307/1593104.
- [2] J. Pitcovski and S. M. Goyal, 'Avian reovirus infections', *Diseases of Poultry*, pp. 382–400, 2020.
- [3] H. Lu, Y. Tang, P. A. Dunn, E. A. Wallner-Pendleton, L. Lin, and E. A. Knoll, 'Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011–2014', *Sci Rep*, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, 2015.
- [4] F. S. B. Kibenge and G. E. Wilcox, 'Tenosynovitis in chickens', *Veterinary Bulletin*, vol. 53, no. 5, pp. 431–444, 1983.
- [5] A. W. Kalupahana, 'Characterization of orthoreoviruses isolated from American crow (*Corvus brachyrhynchos*) winter mortality events in eastern Canada', 2017.
- [6] R. C. Jones, 'Reovirus Infections', in *Diseases of Poultry*, 2013, pp. 351–373. doi: <https://doi.org/10.1002/9781119421481.ch11>.
- [7] D. N. Dharma, P. Darmadi, K. A. P. Santhia, and I. G. Sudhana, 'Studi penyakit helikopter pada ayam pedaging', in *Pros. Seminar Peternakan dan Forum Peternak Unggas dan Aneka Ternak*. Bogor, 1985, pp. 19–20.
- [8] R. Ernawati, 'Penyakit Arthritis Pada Ayam Di Beberapa Peternakan Di Daerah Malang Dan Sekitarnya Usaha Isolasi Dan Identifikasi Agen Penyebabnya', 1993.
- [9] S. WAHYUWARDANI, H. Huminto, and L. Parede, 'Perubahan patologi secara makroskopi dan mikroskopi pada ayam pedaging yang diinfeksi reovirus isolat lokal', *JITV*, vol. 10, no. 1, 2005, Accessed: Feb. 17, 2022. [Online]. Available: <https://balitnak.litbang.pertanian.go.id/phocadownload/JITV/63-70a.pdf>.
- [10] R. Hartawan and N. L. P. I. Dharmayanti, 'Detection of Fife Virus Infections in The Layer Farm with Runting-Stunting Syndrome in Sukabumi and Tangerang Using Polymerase Chain Reaction Technique', *Jurnal Kedokteran Hewan* June, vol. 11, no. 2, pp. 65–69, 2017.
- [11] D. Qosimah, S. Murwani, and I. Amalia, *Penyakit Viral pada Unggas*. Universitas Brawijaya Press, 2017.
- [12] R. C. Jones, "Avian reovirus infections," *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, vol. 19, no. 2, hlm. 614–619, 2000.

- [13] S. M. Mansour, R. M. ElBakrey, A. Orabi, H. Ali, and A. A. Eid, '*Isolation and Detection of Avian Reovirus from Tenosynovitis and Malabsorption Affected Broiler Chickens with Involvement of Vertical Transmission*', *Journal of Virological Sciences*, vol. 4, pp. 24–32, 2018.
- [14] M. A. Ramakrishnan, '*Determination of 50% endpoint titer using a simple formula*', *World J Virol*, vol. 5, no. 2, p. 85, 2016.