

## **Perbandingan Tingkat Proteksi Program Vaksinasi *Newcastle Disease* pada *Broiler***

### **Comparative Protection Level of Newcastle Disease Vaccination Program in Broiler**

**Sarwo Edy Wibowo<sup>1</sup>, Widya Asmara<sup>1</sup>, Michael Haryadi Wibowo<sup>1</sup>, Bambang Sutrisno<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Mikrobiologi, <sup>2</sup>Bagian Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan,  
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta  
Email: mhwbowo@ugm.ac.id

#### **Abstract**

Newcastle Disease (ND) is both respiratory and digestive diseases in poultry caused by avian paramyxovirus type 1 (APMV-1). Field data showed that there were still many cases of Newcastle Disease faced by farmers despite of vaccination programs had been done routinely. The aim of this research is to find out the effectiveness of some routine ND vaccination program in broiler chicken challenged either with viscerotropic velogenic Newcastle Disease (VVND) virus or virulent ND virus from field isolates. One hundred broiler chickens were divided into 4 groups of 25 each. In the Group I, vaccination was carried out at day 1 with combination of ND-IB live vaccine and ND killed vaccine, and booster at day 18 with live ND vaccine, in the Group II, chickens were vaccinated with live ND-IB vaccine at day 1 and day 18 and in the Group III, chickens were vaccinated with live ND-IB vaccine at day 1 and vaccinated with ND live vaccine at day 18. Challenge test performed in twenty broiler chickens of each group with virulent ND that has chicken lethal dose fifty (CLD<sub>50</sub>) 4,8. Virus preparation 2<sup>6</sup> and then diluted to 10<sup>-4</sup>, to obtain dilution 10000. Twenty chicken from each group were then given 0.5 cc dilution of 6 HA virulent virus at 28 days of old. Six challenged chicken from group I showed ND clinical symptom and were eventually death. This mean that the vaccine program provided 70% protection. Whereas all challenged chicken from the Groups II and III were sick, then died meaning that these vaccination programs did not give any protection at all. Based on the present study, it is concluded that the administration of ND live vaccine priming along with ND killed vaccine is needed to improve the protection against velogenic NDV.

**Key words :** Newcastle Disease, vaccine, broiler, ND clinical symptom, challenge test

## Abstrak

*Newcastle Disease* (ND) merupakan penyakit pernafasan dan pencernaan yang disebabkan oleh *Avian Paramyxovirus* tipe 1. Data lapangan menunjukkan, bahwa masih banyak kasus penyakit ND yang dihadapi peternak meskipun telah dilakukan vaksinasi rutin. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efektifitas penerapan beberapa program vaksinasi ND pada ayam *broiler* dengan parameter daya tahan ayam terhadap uji tantang dengan virus *viscerotropic velogenic Newcastle Disease* (VVND) atau virus ND virulen isolat lapangan. Ayam *broiler* dengan jumlah 100 ekor, dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing 25 ekor. Kelompok I diterapkan program vaksinasi ND-IB gabungan vaksin *live* dan ND *killed* pada umur 1 hari, dan booster umur 18 hari dengan vaksin ND *live*. Kelompok II dengan vaksin ND-IB *live* pada umur 1 hari dan 18 hari. Kelompok III dengan vaksin ND-IB *live* pada umur 1 hari dan booster umur 18 hari dengan vaksin ND *live*. Uji tantang pada semua ayam *broiler* perlakuan dilakukan dengan virus ND virulen yang memiliki *chicken lethal dose fifty* (CLD<sub>50</sub>) 4,8. Sediaan virus 2<sup>6</sup> kemudian diencerkan sampai 10<sup>-4</sup>, sehingga diperoleh pengenceran 10000. Hasil pengenceran kemudian diberikan dengan dosis 0,5 cc titer 6 HA pada ayam *broiler* umur 28 hari. Kelompok I dari 20 ekor yang diuji tantang ada 6 ekor ayam menunjukkan gejala klinis ND, bahkan kematian, Kelompok II dan III dari 20 ekor ayam yang diuji tantang ada 20 ekor mengalami sakit dan kematian. Tingkat proteksi yang ditimbulkan pada program vaksinasi Kelompok I yaitu 70%, sedangkan tingkat proteksi pada Kelompok II dan III yaitu 0%. Hasil penelitian ini menunjukkan, bahwa program vaksinasi virus ND pada Kelompok I tingkat proteksinya lebih tinggi jika dibandingkan dengan program vaksinasi ND pada Kelompok II dan III. Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan, bahwa pemberian priming vaksin ND *live* bersamaan dengan vaksin ND *killed* diperlukan untuk meningkatkan proteksi terhadap virus ND yang velogenik

**Kata kunci:** *Newcastle disease*, vaksin, *broiler*, gejala klinis ND, uji tantang

## Pendahuluan

Penyakit *Newcastle Disease* (ND) atau penyakit tetelo, merupakan penyakit unggas, khususnya ayam yang bersifat sangat menular dan akut serta menimbulkan gejala gangguan pencernaan, pernafasan dan syaraf. Penyakit tersebut disebabkan oleh *avian paramyxovirus* tipe I (APMV-I), dari genus *Avulavirus*, dan termasuk keluarga *Paramyxoviridae* (Alexander and Senne, 2008; Quinn *et al.*, 2011). Virus ND merupakan virus RNA yang mempunyai genom *single stranded* (SS) dengan polaritas negatif. *Paramyxovirus* berbentuk sangat plomorfik, yaitu antara bentuk bulat sampai bentuk filamen dan berdiameter 150-300 nm. Nuklokapsid bersimetri heliks dan dikelilingi oleh amplop yang berasal dari membran permukaan sel (Allan, 1978; MacLahlan and Dubovy, 2011).

Salah satu aktivitas biologis virus ND dapat mengagglutinasi sel darah merah semua amphibi, reptilia, manusia, tikus dan marmot. Sel darah merah sapi, kambing, domba, babi dan kuda juga dapat di agglutinasi virus ND tergantung pada strain virus (Alexander and Senne, 2008). Mekanisme terbentuknya hemagglutinasi sel darah merah oleh virus ND dengan reseptor sel disebabkan adanya ikatan antara protein hemagglutinin pada virus ND dengan reseptor yang ada dipermukaan sel darah merah, yaitu suatu mukoprotein yang terdapat pada permukaan eritrosit (MacLahlan and Dubovy, 2011).

Virus ND menurut Beard and Hanson dibagi menjadi lima berdasarkan tingkat keganasan dan gejala klinis yang ditimbulkan, yaitu: 1. Bentuk Doyle's yang bersifat akut, infeksi bersifat ganas dan mematikan yang menyerang semua kelompok umur ayam dan gejala yang ditimbulkan setelah di

nekropsis banyak ditemukan lesi hemorhagis di saluran pencernaan. Bentuk ini disebut juga sebagai *velogenic viscerotropic Newcastle Disease* (VVND), 2. Bentuk Beach's yang bersifat akut dan ganas pada ayam semua umur. Gejala yang timbul pada kasus ini adalah gangguan pernafasan dan syaraf. Bentuk ini disebut juga *velogenic neurotropic Newcastle Disease* (VNND), 3. Bentuk Beaudette's bersifat kurang patogenik. Kematian terjadi pada ayam berusia muda. Virus yang menyebabkan penyakit pada kelompok ini adalah kelompok mesogenik, 4. Bentuk Hitchner's biasanya menyebabkan infeksi pernafasan ringan atau tanpa gejala klinis. Virus yang menyebabkan penyakit pada kasus ini adalah kelompok lentogenik dan 5. Bentuk Asimtomatik-enterik terkait infeksi usus sub-klinis oleh strain lentogenik yang menyerang saluran pencernaan dengan tanda yang tidak spesifik (Tabbu, 2000; Quinn *et al.*, 2011; Alexander and Senne, 2008).

Penelitian yang dilakukan oleh Nana (2003) tentang program vaksinasi pada ayam *broiler* menunjukkan proteksi dari penggunaan vaksin *live* pada minggu pertama dan minggu kedua adalah 60%. Program vaksinasi menggunakan vaksin *live* pada minggu pertama dan vaksin *killed* pada minggu kedua menunjukkan proteksi 100%. Program vaksinasi menggunakan vaksin *live* pada minggu pertama menunjukkan tingkat proteksi sebesar 40%. Kasus penyakit ND selama periode 2009 hingga 2010 masih banyak terjadi di lapangan, meskipun ayam atau unggas telah dilakukan vaksinasi secara rutin. Hal ini dapat menimbulkan dugaan adanya perbedaan antara virus ND yang bersirkulasi di lapangan dengan virus ND vaksinasi. Hasil analisa genetik diketahui, bahwa virus ND yang berada di

lapangan ternyata berbeda pada genetiknya dengan virus ND vaksin. Perbedaan genetik ini akan berakibat pada respon antigenik (Adi *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2012). Penelitian yang dilakukan oleh Xiao (2009) dengan pemberian vaksin isolat LaSota dan isolat B1 ternyata kurang memberikan proteksi terhadap serangan penyakit ND velogenik di Indonesia.

Obat yang efektif untuk mengatasi infeksi virus ND belum ada. Tindakan utama yang dapat dikerjakan adalah mencegah munculnya penyakit tersebut dengan melakukan vaksinasi dan didukung dengan perbaikan tatalaksana pemeliharaan ayam. Penggunaan vaksin aktif dan inaktif telah secara luas diterapkan di bidang peternakan unggas. *Priming* vaksin aktif yang diberikan pada minggu pertama dan dilakukan *booster* pada minggu ketiga telah banyak digunakan di peternakan unggas di Indonesia. Demikian juga *priming* vaksin aktif yang diberikan bersama-sama dengan vaksin inaktif pada minggu pertama, kemudian di *booster* pada minggu ketiga dengan vaksin aktif. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan perlindungan pada ayam yang diberi *priming* vaksin bivalen ND-IB *live* yang bersamaan dengan vaksin ND *killed* dan pada ayam yang diberi *priming* vaksin bivalen ND-IB *live* terhadap penyakit *Newcastle Disease*.

## **Materi dan Metode**

Hewan percobaan yang dipakai dalam penelitian ini adalah ayam *broiler strain* Lohman sebanyak 100 ekor. Kandang ayam dengan semua fasilitas pemeliharaan disiapkan dan didesinfeksi. *Day old chicken* (DOC) ayam *broiler* tersebut dikelompokkan dan dikandang menjadi 4 kelompok

perlakuan dan masing-masing terdiri dari 25 ekor. Masing-masing kelompok diberi pakan dan minum secara *ad libitum*.

Untuk program vaksinasi ND digunakan program sesuai prosedur vaksinasi yang digunakan pada penelitian ini. Kelompok I sebanyak 25 ekor diberi vaksinasi dengan vaksin gabungan *Newcastle disease-infectious bronchitis* (ND-IB) *live* tetes mata dan vaksin *Newcastle disease* (ND) *killed* dilakukan dengan injeksi subkutan menggunakan injektor pada saat ayam berumur 1 hari. Pemberian vaksin ulangan (*booster*) diberikan pada umur ke-18 hari menggunakan vaksin ND *live* melalui tetes mata. Kelompok II sebanyak 25 ekor diberi vaksinasi dengan vaksin gabungan ND-IB *live* pada umur ayam 1 hari dan 18 hari melalui tetes mata. Kelompok III sebanyak 25 ekor diberi vaksinasi dengan vaksin gabungan ND-IB *live* pada umur ayam 1 hari melalui tetes mata. Pemberian vaksin ulangan (*booster*) menggunakan vaksin ND *live* dilakukan dengan tetes mata pada saat ayam berumur 18 hari.

*Virus velogenic Newcastle disease* (VVND) yang digunakan pada ujiantang adalah virus ND Layer-ND-MHW/SLTG/2010 isolat milik Dr. drh. Michael Haryadi Wibowo, MP. Isolat tersebut sebelumnya telah di karakterisasi secara molekuler terbukti sebagai virus yang virulen. Pada penelitian ini, ujiantang dikerjakan terhadap ayam broiler pada umur 28 hari dari masing-masing kelompok perlakuan dan kontrol. Virus yang digunakan pada ujiantang adalah virus isolat Salatiga yang telah di karakterisasi secara molekuler sebagai virus *velogenic* ND. Virus *velogenic* ND ini mempunyai *lethal dose* (LD<sub>50</sub>) 4,8 (Putra, 2013). Sediaan virus ND yaitu 2<sup>6</sup>HA unit kemudian diencerkan hingga 10

<sup>4</sup> HA unit sehingga diperoleh pengenceran 10000. Hasil pengenceran kemudian diberikan secara oral sebanyak 0,5 cc dari titer virus 6 HA unit. Ayam broiler yang sudah ditantang kemudian diamati gejala klinis yang timbul dan kematian ayam selama 10 hari. Ayam yang mati dilakukan pengamatan perubahan makroskopis pada organ pencernaan dan diambil sampel paru-paru dari masing-masing kelompok perlakuan untuk isolasi virus. Sampel paru-paru digerus dengan mortar sampai halus kemudian ditambahkan PBS 0,5 ml. Gerusan paru dimasukkan kedalam konikel, sentrifuse selama 10 menit untuk mendapatkan suspensi. Suspensi kemudian diinokulasikan pada telur ayam berembrio (TAB).

Propagasi virus dalam penelitian ini menggunakan telur berembrio. Virus yang telah berhasil didapat dari sampel diinokulasikan pada telur TAB ayam kampung yang berusia 11 hari. Telur diteropong untuk menentukan titik inokulasi dan kelayakan telur. Peneropongan telur paling baik dilakukan diruang gelap dengan menatap telur berembrio di depan lampu teropong yang diatur diafragma sehingga embrio terlihat dengan jelas. Telur berembrio diberi tanda pada bagian kantung udara dan letak kepala embrio dengan digunakan pensil. Telur disterilisasi dengan menggunakan etanol 70%, dan ditunggu sampai kering. Telur dilubangi pada bagian yang sebelumnya telah ditandai. Inokulasi virus dilakukan dengan menggunakan spuit 1 ml. tuberkulin sebanyak 0,2 ml pada setiap telur pada bagian kantung *chorioallantoic* dengan sudut kemiringan 45<sup>o</sup> dari horizontal dan kedalaman 1,2 cm. Setelah proses inokulasi, lubang injeksi virus di tutup dengan paraffin cair dan membiarkan mengeras selama 1

menit. Telur diletakkan ke dalam inkubator dengan suhu ruang inkubator (38-39°C) dan kelembapan 60-65 % (Burlleson *et al.*, 1992).

Uji HA lambat menurut prosedur Burlleson *et al.* (1991) sebagai dasar untuk identifikasi dan menentukan titer virus ND. Uji HA lambat dilakukan pada pelat mikro dengan dasar “U” pada suhu ruang. Uji HA dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Uji HA dikerjakan dengan mengisi sumuran ke-1 sampai ke 12 dengan 0,05 ml PBS menggunakan pipet *dropper*. Suspensi yang berupa cairan allantois dimasukkan ke dalam sumuran sebanyak 0,05 ml kemudian ditambahkan eritrosit 0,5 % pada sumuran lain tanpa diberi suspensi virus. Setelah seluruh sumuran ditambahkan dengan eritrosit, plat diketuk dengan ringan agar eritrosit dan virus dapat tercampur dengan baik. Eritrosit pada sumuran kontrol mengendap berbentuk titik merah sempurna setelah 20-30 menit. Sesaat setelah eritrosit pada sumuran kontrol mengendap, segera dilakukan pembacaan pada sumuran perlakuan virus. Interpretasi positif pada sumuran adalah terjadinya hemaglutinasi berupa agregat-agregat, sedang interpretasi negatif pada sumuran adalah tidak terjadinya titik merah tetapi bentuk yang acak warna merah atau membuat bentuk seperti donat (Killian, 2008).

Uji HI dilakukan dengan menggunakan prosedur Burlleson *et al.* (1991) yang dimodifikasi menjadi HI cepat untuk identifikasi virus ND. Uji HI cepat dilakukan pada pelat mikro dengan dasar “U” pada suhu ruang. Uji HI dilakukan sebanyak 3 kali ulangan dan menggunakan 5 sumuran. Uji HI dikerjakan dengan mengisi sumuran ke-1 sampai ke-5 pada pelat mikro dengan 0,025 ml PBS menggunakan pipet *dropper*. Sumuran ke-1 ditambahkan antiserum spesifik *Newcastle Disease*

sampai sumuran ke-3 sebanyak 0,025 ml. Sumuran ke-1 sampai sumuran ke-4 ditambahkan cairan allantois sebanyak 0,025 ml. PBS sebanyak 0,025 ml ditambahkan pada sumuran ke-5. Campuran tersebut dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit. Sumuran yang ke-5 dipakai sebagai kontrol eritrosit, kemudian di tambahkan dengan suspensi eritrosit 0,1 ml ke dalam semua sumuran. Bagian atas pelat mikro ditutup dengan segel pelat, dan ditunggu sekitar 20-30 menit sampai terbentuk titik merah pada sumuran kontrol. Sesaat setelah titik merah sumuran kontrol terbentuk, pembacaan dapat dilakukan pada seluruh sumuran. Interpretasi positif uji HI pada sumuran adalah terbentuknya titik merah sempurna, sedang interpretasi negatif uji HI adalah terjadinya hemaglutinasi dan terbentuk agregat-agregat (Pedersen, 2008).

## Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian ini (Tabel 1), penerapan beberapa program vaksinasi ND pada ayam broiler yang kemudian di ukur tingkat protektivitas dengan ujiantang, dapat diketahui bahwa kelompok satu yaitu ayam yang divaksinasi dengan vaksin awal (*priming*) ND-IB *live* tetes mata ditambah vaksin ND *killed* injeksi subkutan, dan booster ND *live* dari 20 ekor ayam yang di ujiantang pada ayam berumur 28 hari dan dilakukan pengamatan selama 10 hari, terdapat 6 ekor ayam yang menunjukkan gejala klinis seperti kelesuan, gangguan saluran pernafasan, penurunan nafsu makan, penurunan konsumsi air minum, diare kehijauan serta kematian. Kelompok dua yaitu ayam yang divaksinasi dengan vaksin awal (*priming*) dan booster menggunakan vaksin ND-IB *live* tetes mata

dari 20 ekor ayam yang di uji tantang pada umur 28 hari, terdapat 20 ekor ayam yang menunjukkan gejala klinis seperti gangguan pernafasan, diare kehijauan serta kematian. Kelompok tiga, yaitu ayam yang divaksinasi dengan vaksin awal (*priming*) ND-IB *live* dan *booster* ND *live* tetes mata dari 20 ekor ayam yang di uji tantang pada ayam berumur 28 hari, terdapat 20 ekor ayam menunjukkan gejala klinis seperti gangguan respirasi, diare kehijauan dan kematian. Tabbu (2000) menjelaskan bahwa unggas yang terinfeksi virus ND terutama dari tipe *velogenic viscerotropic* (VVND) gejala klinis yang ditimbulkan antara lain terjadi kelesuan, peningkatan frekuensi pernafasan, kehilangan nafsu makan, penurunan konsumsi air minum, kelemahan dan berakhir kematian. Adi *et al.* (2009) menjelaskan, bahwa ayam yang terinfeksi virus ND velogenik gejala klinis yang ditimbulkan dehidrasi, badan mengalami kekurusan dan diare

kehijauan yang menempel di sekitar kloaka.

Hasil penelitian ini memperlihatkan, bahwa program vaksinasi pada kelompok satu yang diberikan vaksin ND *live* ditambah dengan vaksin ND *killed* pada umur 1 hari dan dilakukan *booster* ND *live* pada umur 18 hari memberikan tingkat perlindungan yang tinggi yaitu 70% dibanding dengan program vaksinasi kelompok dua dan tiga yang diberi vaksin ND *live* pada umur 1 hari dan dilakukan *booster* pada 18 hari yaitu 0%. Uji tantang ini relevan dengan penelitian yang dilakukan oleh Tabbu (1996), bahwa ayam *broiler* yang mendapat vaksinasi dua kali vaksin *live* pada umur 4 dan 18 hari menunjukkan tingkat proteksi 80% terhadap uji tantang virus *velogenic* ND pada umur 45 hari, sedangkan hasil vaksinasi gabungan ND *live-killed* yang diberikan pada umur 4 hari dan dilakukan *booster* pada umur 18 hari menunjukkan tingkat proteksi 100%. Hal ini sejalan dengan penelitian

Tabel 1. Program vaksinasi ND serta hasil uji tantang dengan virus VVND

Hari	Kelompok Ayam			
	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV (Kontrol)
1	ND -IB <i>live</i> 1 dosis tetes mata	ND -IB <i>live</i> 1 dosis tetes mata	ND -IB <i>live</i> 1 dosis tetes mata	-
	ND <i>killed</i> dosis injeksi subkutan			
18	ND <i>live</i> 1 dosistetes mata	ND -IB <i>live</i> 1 dosis tetes mata	ND <i>live</i> 1 dosis tetes mata	-
28	Uji tantang (20 ekor)	Uji tantang (20 ekor)	Uji tantang (20 ekor)	Uji tantang (10 ekor)
Ayam mati	6	20	20	10
Proteksi	14/20*	0/20*	0/20*	0/10*

\* Jumlah ayam hidup/jumlah ayam yang ditantang

yang dilakukan Nana (2006), bahwa ayam *broiler* yang diberi vaksinasi dua kali vaksin ND *live* pada minggu pertama dan minggu kedua menunjukkan tingkat proteksi 60% terhadap uji tantang virus ND velogenik pada umur 5 minggu, sedangkan ayam broiler yang divaksin dengan vaksin ND *live* pada minggu pertama dan diberikan vaksin ND *killed* pada minggu kedua menunjukkan tingkat proteksi 100%. Penelitian tentang uji tantang pada ayam buras yang dilakukan oleh Wibowo dan Amanu (2010) menunjukkan, bahwa ayam buras yang diberi vaksin gabungan ND *live-killed* pada umur 7 hari dapat melindungi ayam hingga 100% sedangkan pada ayam yang divaksin ND *live* pada umur 7 hari dan dilakukan *booster* pada umur 21 hari tingkat proteksinya adalah 60% dari serangan *velogenic* ND mulai dari munculnya gejala klinis atau kematian. Penelitian uji tantang pada ayam petelur yang dilakukan oleh Darminto dan Ronohardjo pada tahun 1996 menunjukkan, bahwa pemberian vaksin ND *killed* pada umur 4 minggu dan dilakukan uji tantang sebanyak 4 kali, yaitu pada umur 15, 18, 20 dan 26 minggu dapat melindungi ayam dari serangan virus ND dari munculnya gejala klinis/ kematian hingga 100%. Ayam yang diberi *priming* vaksin *live*

bersamaan dengan vaksin *killed* memberi proteksi lebih tinggi dibanding ayam yang diberi *priming* vaksin *live* karena vaksin *killed* yang ini diberikan pada DOC dan tidak dipengaruhi oleh antibodi dari induk atau maternal antibodi, sedangkan vaksin *live* yang diberikan pada hari pertama kemungkinan terjadi netralisasi oleh maternal antibodi atau antibodi induk sehingga kekebalan yang terbentuk tidak mencapai maksimal (Tabbu, 2000). Virus ND velogenik memiliki protein F (fusi) yang berbeda dengan virus ND dari vaksin *live* sehingga virus ND velogenik dapat menginfeksi ayam yang sudah diberi vaksin *live* secara rutin baik vaksin *priming* atau vaksin *booster* (Xiao *et al.*, 2012; Adi *et al.*, 2009).

Ayam broiler yang mengalami kematian dilakukan nekropsi untuk mengamati perubahan makroskopis pada organ viseral serta diambil sampel organ seperti paru-paru dari tiap kelompok satu ekor. Perubahan makroskopis (Gambar 1) yang timbul setelah ayam mati antara lain terjadi nekrosis hemoragik pada proventrikulus dan usus halus. Hal ini sesuai yang dijelaskan oleh Quinn *et al* (2011) bahwa ayam yang terinfeksi virus ND strain viserotropik velogenik terjadi pendarahan pada



Gambar 1. Nekrosis hemoragik pada proventrikulus (A) dan usus halus (B)

mukosa saluran pencernaan.

Alexander and Senne (2008) menjelaskan, bahwa pada unggas yang terinfeksi virus ND terutama kasus infeksi karena VVND terjadi perubahan makroskopis yang menciri yaitu adanya nekrosis dan hemoragis pada mukosa saluran pencernaan, meliputi proventrikulus, ventrikulus dan berbagai bagian dari usus (dari duodenum sampai sekum dan usus besar). Penelitian yang dilakukan oleh Adi *et al.* (2009) menjelaskan, bahwa pada ayam kampung yang terinfeksi virus *velogenic* ND menunjukkan adanya perubahan makroskopis berupa nekrosis hemoragis pada mukosa proventrikulus dan usus halus serta air sacculitis. Perubahan makroskopik yang lain berupa atrofi limpa, bursa fabrisius, dan timus, serta ditemukan edema pada otak. Perubahan makroskopis yang terjadi pada ayam broiler merupakan cara untuk mendukung bahwabroiler yang mengalami kematian positif karena terinfeksi virus ND. Perubahan makroskopis yang ditimbulkan pada ayam broiler yang terinfeksi virus ND dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, galur dan tipe patogenik dari virus ND, jenis unggas, umur unggas, status kekebalan, faktor lingkungan, infeksi campuran dengan mikroorganisme lainnya, rute infeksi dan dosis virus (Tabbu, 2000; Alexander and Senne, 2008). Sampel organ diberi perlakuan re-isolasi dan identifikasi sebagai bukti, bahwa ayam yang kematian tersebut akibat infeksi dari virus ND.

Sampel paru-paru dari masing-masing kelompok digerus bergantian dalam mortar sampai halus kemudian ditambah PBS 0,5 mL. Gerusan paru dimasukkan kedalam konikel, sentrifuse selama 10 menit untuk mendapatkan suspensi. Suspensi kemudian di inokulasikan pada telur ayam

berembrio (TAB) dan diinkubasikan hingga embrio dalam telur mengalami kematian. Setelah embrio dalam telur tidak ada aktifitas/mati kemudian dikeluarkan dari inkubator dan didinginkan pada suhu 4 °C selama 24 jam. Telur yang telah dingin kemudian dipanen cairan allantois dan diidentifikasi. Re-identifikasi virus ND digunakan uji hemagglutinas (HA) dan uji hemagglutinas inhibisi (HI). Prinsip uji HA adalah adanya virus yang dapat menghemagglutinas sel darah merah (Beard, 1980). Pada uji HA hasil uji dari sampel kelompok kontrol dan perlakuan (Kelompok I, II, dan III) dapat mengagglutinas terhadap eritrosit ayam. Kesimpulan hasil ini adalah sampel dari kelompok kontrol dan perlakuan (Kelompok I, II, dan III) tersebut mengandung suspensi virus yang memiliki aktivitas hemagglutinas. Hasil positif dapat dilihat dengan adanya aglutinat pada dasar sumuran dan eritrosit tidak mengendap seperti kontrol negatif. Sampel virus dari kelompok kontrol dan perlakuan (Kelompok I, II, dan III) yang menunjukkan hasil positif pada uji HA kemudian diidentifikasi dengan hemagglutinas inhibisi (HI) dengan menggunakan antiserum spesifik *Newcastle disease* (ND) yang didapat dari pengambilan serum pada penelitian ini yang memiliki titer protektif terhadap ND. Sampel virus yang mampu menghemagglutinas eritrosit ayam perlu diidentifikasi lebih lanjut untuk mengetahui apakah isolat tersebut merupakan virus ND atau bukan.

Prinsip uji HI adalah adanya antibodi spesifik yang dapat menghambat agglutinas sel darah merah oleh virus (Merchant and Packer, 1961). Pada uji HI, isolat yang teramati positif HA ditetaskan ke dalam pelat mikro dan diberi serum spesifik anti ND. Campuran ini didiamkan selama 30 menit untuk

memberi kesempatan antibodi bereaksi terhadap virus (Padersen, 2008). Eritrosit ayam kemudian ditambahkan ke dalam campuran tersebut. Hemagglutinasinya virus terhadap eritrosit akan terhambat sehingga eritrosit dapat mengendap, apabila antibodi dapat mengikat virus. Sebaliknya,

jika antibodi tidak dapat mengikat virus, hemagglutinasinya akan terjadi dan ini merupakan hasil negatif. Hasil pada uji HI didapat hasil bahwa kelompok kontrol dan perlakuan (kelompok I, II dan III) merupakan infeksi dari virus *Newcastle Disease*. Hasil uji re-identifikasi dapat dilihat pada Tabel 2.

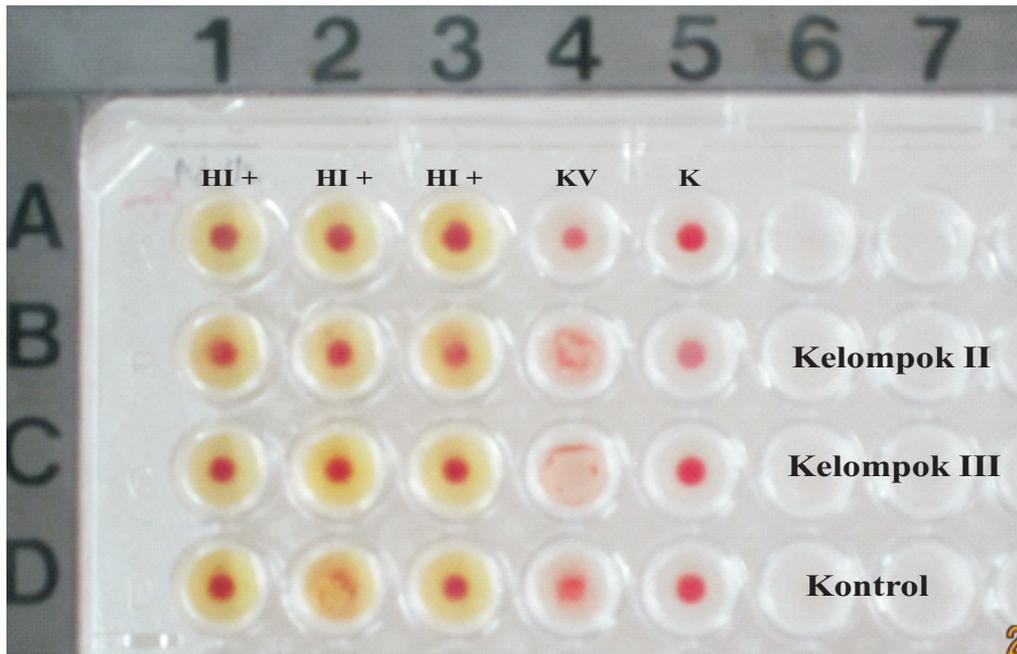
Tabel 2. Hasil re-identifikasi virus dengan uji HA dan HI dengan antiserum spesifik *Newcastle Disease*

Kelompok	Uji		Keterangan
	HA	HI	
I	+	+	ND +
II	+	+	ND +
III	+	+	ND +
Kontrol	+	+	ND +

Pada pengujian HA, ke empat sampel dapat melakukan hemagglutinasinya terhadap eritrosit ayam yang menunjukkan interpretasi positif yang ditandai terbentuknya agregat-agregat sel darah merah. Agregat-agregat sel darah merah tersebut yang menyebabkan proses pengendapan sel darah merah menjadi lebih lama dibandingkan dengan sumuran kontrol yang mempunyai isi sel darah merah dan PBS. Hemagglutinasinya terhadap sel darah merah dari ayam tidak hanya dapat dilakukan oleh virus *Newcastle disease*, tetapi beberapa mikroorganisme lain dapat pula melakukan aktifitas hemagglutinasinya. Mikroorganisme pada unggas yang dapat melakukan aktifitas hemagglutinasinya, yaitu famili *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *infectious bronchitis* (IB), mycoplasma dan adeno 127 (Quinn *et al.*, 2011)

Uji HI merupakan kebalikan dari uji HA,

dimana menghambat reaksi aglutinasi sel darah merah dengan menggunakan antiserum adalah dasar prinsip dari uji HI (Padersen, 2008). Antiserum bereaksi dengan virus mengikat epitope virus yang berfungsi untuk melakukan hemagglutinasinya. Epitop virus yang telah berikatan dengan antiserum menyebabkan epitop tidak dapat mengikat sel darah merah (Terregino and Capua, 2009). Bila antiserum tidak sesuai atau tidak spesifik dengan virus, maka hemagglutinasinya akan terjadi. Hasil penelitian uji HI terhadap empat sampel tersebut membuktikan, bahwa kematian ayam yang ditantang adalah positif disebabkan oleh virus ND. Endapan eritrosit ayam tidak terjadi pada sumuran D2 sehingga pada sumuran D2 disimpulkan HI negatif. Uji HI negatif dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor tertentu (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil uji hemagglutinasia inhibisi (HI) positif teramati adanya endapan eritrosit pada dasar sumuran (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3, D1, dan D3) dibandingkan dengan kontrol eritrosit (A5, B5, C5, dan D5), kontrol virus (KV)

Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil pada uji hemagglutinasia (HA) dan uji hemagglutinasia inhibisi (HI). Faktor-faktor tersebut adalah kontaminasi zat kimia pada bahan dan alat yang digunakan misalnya asam, adanya substansi penghambat dalam ekstrak jaringan (dalam hal ini cairan allantois), sifat sel darah merah yang berada dari individu tertentu, komponen serum yang *heat-labile*, adanya enzim dan toksin dari bakteri, ketidakcocokan spesies dengan sel darah merah dan serum yang di uji (Merchant and Parker, 1961). Faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil uji yaitu konsentrasi antigen HA yang digunakan, konsentrasi sel darah merah dalam suspensi, waktu antara pencampuran serum-antigen-eritrosit, dan temperatur saat proses pencampuran. Temperatur yang baik untuk pencampuran serum, antigen, dan eritrosit adalah pada suhu ruangan (27 °C), karena pada suhu ini aktivitas hemagglutinasia antigen

berjalan dengan stabil (Beard, 1980). Eritrosit yang didapat dari ayam yang pernah diberi preparat hormon dapat mengganggu mekanisme hemagglutinasia (Killian, 2008).

Waktu elusi merupakan lepasnya ikatan antara reseptor sel darah merah dengan hemagglutinin virus dengan bantuan neuraminidase. Protein neuraminidase berfungsi untuk merusak reseptor eritrosit sehingga tidak terjadi perlekatan ulang virus dengan sel yang sama (Alexander and Senne, 2008). Waktu elusi yang dihasilkan menunjukkan tingkat virulensi dari isolat virus. *Strain* virus yang ganas mempunyai kelebihan yaitu kemampuan hemagglutinasia yang tinggi dan mempunyai kelebihan yaitu kemampuan neuraminidase yang lemah atau lambat (Eziebe and Ndip, 2005). Aktivitas neuraminidase yang lambat menyebabkan waktu elusi menjadi lama. Pada strain virus yang lemah, kemampuan hemagglutinasinya rendah dan

kemampuan neuraminidasenya cepat. Kemampuan neuraminidase yang cepat menyebabkan pengendapan sel darah merah menjadi titik merah pada sumuran mikropelat terjadi secara cepat (Killian, 2008).

Pemberian *priming* vaksin pada umur satu hari dengan menggunakan gabungan vaksin ND *live-killed* dan dilakukan *booster* menggunakan ND *live* dapat memberikan proteksi terhadap ayam hingga 70%, sedang kanpemberian *priming* pada umur satu hari dengan vaksin ND *live* dan *booster* menggunakan ND *live* secara tetes mata tidak menimbulkan proteksi terhadap ayam broiler yang ditantang dengan virus ND velogenik yang berasal dari isolat lapangan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adi, A. A. A. M., Astawa, N. M., Putra, K. S. A., Hayashi, Y. and Matsumoto, Y. (2009) Isolation and Characterization of a Pathogenic Newcastle Disease Virus from a Natural Case in Indonesia. *J. Vet. Med. Sci.* 72. Hal. 313-319.
- Alexander, D. J. and Senne, D. A. (2008) Newcastle Disease, Other Avian Paramyxovirus, and Pneumovirus Infection. Dalam: *Disease of Poultry*, 12<sup>th</sup> Edition. Saif, Y.M. Blackwell Publishing, Iowa. Hal. 75-92.
- Allan, W. H., Lancaster, J. E. and Toth, B. (1978) Newcastle Disease Vaccine Their Production and Use. Food and Agriculture of United Nation (FAO). Rome. Hal. 1-79.
- Darminto dan Ronohardjo. P. (1996) Vaksin Newcastle Disease Inaktif Berasal dari Isolat Lokal Galur Velogenik. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 2: 42-49.
- MacLahlan, J. M., and Dubovy, J. E. (2011) Paramyxoviridae. Dalam: *Fenner's Veterinary Virology*, 4<sup>th</sup> Edition. Elsevier. Amsterdam. Hal. 299-325.
- Nana, S. (2006) Pengamatan Daya Proteksi Ayam Post Vaksinasi Newcastle Disease dengan Uji Tantang. Pusat Penelitian dan Pengembangan Ternak. Hal. 282-286.
- Putra, R. P. (2013) Penentuan Lethal Dose Fifty (LD50) virus ND isolate ND.MHW/SLTG/2010 pada Ayam Broiler. Skripsi in Prep. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Hal. 1-30.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrick, E. S., Fanning, S. and Hartigan, P. J. (2011) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Second Edition. Blackwell Science, Iowa. Hal. 884-901.
- Tabbu, C. R. (1996) Evaluasi Lapangan Vaksin Newcastle Disease Galur VG/GA pada Beberapa Peternak di Jawa. Tidak dipublikasikan. Hal. 1-20.
- Tabbu, C. R. (2000) Penyakit Ayam dan Penanggulangannya. Volume 1. Penerbit Kanisius, Yogyakarta. Hal. 164-184.
- Tarmudji (2005) Penyakit Pernafasan pada Ayam Ditinjau dari Aspek Klinik dan Patologik serta Kejadiannya di Indonesia. *Wartazoa* 15: 72-83.
- Wibowo, M. H. dan Amanu, S. (2010) Perbandingan Beberapa Program Vaksinasi Penyakit Newcastle pada Ayam Buras. *J. Sain Vet.* 28: 27-35.
- Xiao, Sa., Paldurai, A., Nayak, B., Samuel, A., Bharoto, E. E., Prajitno, T. Y., Collins, P. L. and Samal, S. K. (2012) Complete Genome Sequences of Newcastle Disease Virus Strains Circulating in Chicken Populations of Indonesia. *J. Virol.* 86: 5969-5970.