

ISOLASI AVIAN REOVIRUS DARI KASUS KEKERDILAN PADA AYAM PEDAGING

(Isolation of Avian Reovirus from Stunting Syndrome Cases in Broiler)

L.PAREDE HERNOMOADI, T. SYAFRIATI, S.M.NOOR dan S.WAHYUWARDANI

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

ABSTRACT

Avian Reovirus is one of the viral infection with multi-manifestations such as arthritis, stunting and runting syndrome, respiratory distress and malabsorption syndrome. This paper reported the isolation of Avian Reovirus as a causal agent of runting and stunting syndrome in broilers. Serology test of six samples by ELISA and AGP showed cross reaction against Reovirus antibody, and others two sera from local isolates. The growth rate dropped down to 23.4% in experimental broiler by induction.

Key words: Isolation, Avian Reovirus, broiler, IRSS, ranting and stunting syndrome

ABSTRAK

Avian Reovirus merupakan salah satu genus virus dengan bermacam manifestasi penyakit seperti radang sendi (viral arthritis/tenosynovitis), gejala kerdil (runting and stunting syndrome; IRSS), gangguan pernapasan, dan gangguan pencernaan, yang dikenal dengan *malabsorption syndrome* (gangguan penyerapan makanan). Tulisan ini melaporkan isolasi Avian Reovirus secara gambaran elektron mikroskopik dan re-isolasi sebagai agen penyebab kekerdilan pada ayam broiler. Hasil serologi enam sampel yang diuji secara ELISA dan AGP menunjukkan reaksi silang dengan antibodi positif Reovirus, dan dua Antibodi dari isolat lokal. Laju hambat pertumbuhan mencapai 23,4% sewaktu dilakukan infeksi buatan pada ayam pedaging.

Kata kunci: Isolasi, Avian Reovirus, broiler, gejala kerdil IRSS, runting and stunting syndrome

PENDAHULUAN

Sindroma kekerdilan pada ayam terutama menyerang ayam pedaging yang dilaporkan pada tahun 1970an oleh HUSSAIN *et al.* (1981); PAGE *et al.*, (1982); ROBERTSON DAN WILCOX (1986); dan KOUWENHOVEN (1996), mulai menjadi masalah pada peternakan komersil skala besar maupun kecil di Indonesia dengan tingkat kejadian sekitar 20% (HAMID *et al.*, 1996). Karena banyaknya laporan kejadian kerdil di lapangan, maka penyakit yang dikenal dengan berbagai nama seperti *Infectious runting stunting syndrome* (IRSS), *malabsorption syndrome* (MAS, *pale birds* (pucat lalu mati), *helicopter disease* dan *brittle bone disease* mulai diteliti di Balitvet dengan mengarah pada agen penyebabnya yang infeksius, seperti yang pernah dilaporkan (ROSENBERGER *et al.*, 1975; ROSENBERGER *et al.*, 1991; SYAFRIATI *et al.*, 2000). Avian reovirus juga dilaporkan terdapat pada ayam normal tanpa gejala klinis (JONES, 2000), dan sangatlah penting manifestasi radang sendi (arthritis/tenosynovitis) terutama pada peternak indukan pedaging.

Hasil penelitian tahun sebelumnya menunjukkan adanya agen virus, *enterovirus-like particles* yang dapat diisolasi, namun diperkirakan kondisi lapangan sangat berpengaruh untuk menunjukkan tingkat keparahan gejala klinis kekerdilan yang lebih tinggi dibanding dengan infeksi ulang sewaktu dilakukan pada kelompok ayam pedaging di laboratorium (SYAFRIATI *et al.*, 2000).

Tulisan ini melaporkan hasil isolasi virus penyebab kekerdilan berdasarkan gejala klinis pada kelompok uji tular, reaksi uji Agar gel presipitasi (AGP), Enzyme Link Immunosorbent Assay (ELISA), immunoblotting dan konfirmasi morfologi secara mikroskop elektron dari berbagai kasus lapang di beberapa peternakan di Jawa Barat, di Jabotabek dan di Jawa Tengah.

MATERI DAN METODE

Isolasi agen

Sampel berupa organ ayam kerdil berupa pankreas, usus, thymus, hati, sumsum tulang dari kasus lapangan atau dari uji coba induksi kekerdilan pada ayam pedaging di laboratorium dibuat 20% suspensi dengan larutan penyanggah PBS (*Phosphat buffer saline*) steril (ditambah kanamycin 100 units/ml dan gentamycin 40 ug/ml). Kemudian ditambahkan serum positif titer tinggi ND dan IBD, dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit, disentrifus 3000 rpm selama 20 menit, lalu supernatan di filter dengan porus 450 nm. Supernatan diinokulasikan pada sel *CEF-SPF* (*Chicken Embryo Fibroblast*) selapis dalam flask 75 cm², diinkubasikan pada suhu 37°C, kadar CO₂ 5% selama 3-5 hari, lalu beberapa kali dilakukan *blind pasase* pada sel primer *CEF-SPF* primer. Kerusakan sel berupa CPE (*cytopathic effects*) setelah beberapa kali pasase, menyatakan adanya agen infeksius. Suspensi sel dipanen bila CPE mencapai 70%-80% ($\pm$ setelah 5 hari), dibekukan selama tiga kali, lalu di sentrifuse 4.000 g selama 30 menit, supernatan siap diinfeksi kembali pada sel primer *CEF*. Sebagai kontrol normal digunakan sel primer *CEF* yang tidak diinfeksi oleh suspensi organ.

Sel primer CEF

Sel fibroblast ayam dibuat dari embrio ayam SPF tertunas umur -10 hari, mengikuti metode standar (SCHAT DAN PURCHASE, 1998). Embrio ayam diambil secara aseptis, dicuci 2-3 kali dengan larutan penyanggah PBS (pH 7.2), di buang kaki dan kepala, lalu dipotong-potong halus, dimasukan kedalam larutan tripsin hangat 1% yang diberi batang magnet, lalu diaduk selama 10 menit. Suspensi sel fibroblast dipanen 2-3 kali pengadukan, disentrifus dengan kecepatan 1.000 rpm selama 10 menit. Sel pelet ditambahkan media penumbuh (DMEM, FBS 10%, Gentamisin 50 ug, Fungison 4 ug) dengan pengenceran 10⁵ sel/ml, lalu dimasukan 12 ml/flask 25 cm³. Flask diinkubasikan pada suhu 37°C, kadar CO₂ 5% selama 24-48 jam sampai terbentuk lapisan sel yang siap diinfeksi dengan sampel yang akan diperiksa.

Pembuatan antigen.

Supernatan dari suspensi sel yang sudah diinfeksi maupun sel kontrol *CEF* normal, dipanen bila sudah terlihat kerusakan CPE . mencapai 70%-80% ($\pm$ setelah 5 hari), dibeku-cairkan selama tiga kali, lalu di sentrifuse 4.000 g selama 30 menit. Supernatan lalu disentrifus lagi 23.000 rpm selama 2 jam. Pellet yang dikoleksi diresuspensi 1:100 volume asal dengan larutan PBS (pH 7.2), dan digunakan sebagai stok antigen pada uji ELISA maupun AGP. Pellet yang di resuspensi 1:10 volume asal, dipakai untuk memperbanyak agen virus pada ayam SPF (umur 2 minggu), dimana 4 ekor ayam/sampel direinfeksi secara cekok, setelah 4 hari inokulasi, usus dan isinya dipanen, lalu diproses seperti dijabarkan sebelumnya diatas sehingga menjadi suspensi 20%, dan disimpan di - 20°C, siap untuk dipakai.

Serum dan antigen standar

Vaksin reovirus (S1133) dipakai sebagai Ag standar (25 dosis/0,1 ml), dan juga disuntikkan pada kelinci dan ayam SPF sebanyak 25 dosis/ekor, dan disuntik ulang lagi (buster) 3x dengan ditambahkan adjuvant Freund sama banyak @0.1 ml. Serum dipanen setelah 3 minggu buster terakhir dan serum tersebut dipakai pada pengujian dengan AGP dan ELISA.

Uji imunoblotting

Stok Ag yang sudah disiapkan seperti diatas dilewatkan pada agar poliakrilamide (PAGE) reduksi 15% menurut COPELAND (1985). Sampel 2 uL yang sudah dilalukan pada Agar tersebut, dipindahkan pada membran selulose semalam, lalu direaksikan dengan serum poliklonal Rabbit anti isolat ISO (yang diencerkan 1:50 dalam larutan penyanggah TBS 0,2%) selama 1 jam sambil digoyang perlahan-lahan. Kemudian membran selulosa tersebut dicuci dengan larutan penyanggah Tris sebelum dikonjugasikan dengan Goat anti rabbit (Jackson Ltd) yang diencerkan 1:250 dalam larutan penyanggah TBS 0,2% dan digoyang selama semalam dalam larutan tersebut. Reaksi positif yang terbentuk berupa pita (ban) berwarna merah memakai substrat DAB,

Uji coba induksi kekerdilan pada ayam pedaging

Dilakukan infeksi buatan guna mempelajari kemampuan beberapa sampel tersebut dalam menginduksi sindroma kekerdilan pada 6 kelompok ayam broiler di Laboratorium, masing-masing 20 ekor/kelompok. Dipilih 5 sampel wabah lapangan daerah Bogor, Ciawi, Cigombong, Gn. Sindur, Jawa Barat; dan Kendal, Jawa Tengah, yang sudah diproses (pada cara penyiapan Antigen) di infeksi secara cekok pada kelompok ayam pedaging niaga umur 2 hari. Pengamatan dilakukan terhadap gejala klinis, berat badan, perubahan PA dan Histo pada umur 3 dan 4 minggu pasca infeksi. Pengamatan dilakukan sampai hari ke 35 terhadap bobot badan, gejala klinis dan gambaran patologi anatomis. Nekropsi dilakukan untuk mendata perubahan PA, isolasi virus, bakteri dan pengambilan sampel organ (usus dan pankreas, hati, limpa, timus dan bursa) untuk pemeriksaan Histopatologi oleh Bagian Patologi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dari bahan usus ayam dengan gejala kekerdilan menunjukkan adanya Avian Reovirus dari 5 isolat yang diperiksa ke Inggris secara mikroskop elektron (CVL, Weybridge, UK), dengan satu sampel yang berhasil di isolasi kembali agen virus (Avian Reovirus). Selain gambaran morfologi virus secara pemeriksaan mikroskop elektron, maka hasil lain yang menunjang hasil isolasi adalah terjadinya reaksi silang Ag isolat lapang dan Ab standar Reovirus penyebab tenosinovitis, sewaktu diuji dengan AGP dan uji ELISA (Tabel 1, 2 dan 3).

Tabel 1. Isolat lapang dari kasus kekerdilan pada ayam pedaging yang diperiksa secara mikroskop elektron

Kode	Asal	Jenis	Organ	Deteksi
98/620	Jabar, Gn sindur	Bro, AA	Usus	Reovirus
98/I-IV	Jateng, Kendal	Bro, loghman	Usus	Partikel virus
99/457BC	Jabar. Cigombong	Bro, Isa.	Usus, hati	Partikel virus
00/49 IE	Jabar, Ciawi	Loghman	Usus, hati	Partikel virus
00/10600	Jabar, Bogor	Bro, Cobb	Usus,hati	Partikel vims

Tabel 2. Hasil AGP beberapa antigen isolat terhadap Ab Reovirus

Antibodi	Antigen	Reaksi
Reo-S1133	98/Iso/620	+ ve
	98/I-IV	+ ve
	00/49 IE	- ve
	Reo-S1133	+ ve
	Supematan Sel	-ve

Tabel 3. Hasil reaksi ELISA beberapa Antigen dengan beberapa Antibodi

Antigen	Antibodi				Keterangan
	Reo-S1133	00/10600	00/49 IE	-ve	
Reo-S1133	++		.	.	Vaksin Reovirus (VA)*
00/10600	+++	+	-	-	Partikel vims**
00/49 IE	++	-	+	-	Partikel virus
98/I-IV	+++	+	-	-	Partikel virus
457BC	+	-	+	-	Partikel virus
98/620	+++	+	+	-	Avian Reovirus

Keterangan: * Vaksin komersil viral arthritis (tenosinovitis); Intervet; ** Dideteksi entero- virus like particles; -ve = serum asal ayam SPF

Optical density: -ve = $\leq 0.01-0.09$

$\pm = \geq 0.2$

$+= \geq 0.45$

$++ = 0.9;$

$+++ = \geq 1.2-1.6$

Hasil uji AGP menunjukkan reaksi positif dua antigen isolat lapang terhadap Ab-reoS1133 (Tabel 2). Hasil ini menunjukkan adanya reaksi silang antara Ag isolat 98/Iso/620 dan 98/I-IV dengan Ab Reo-S1133, tetapi tidak terlihat pada Ag isolat 00/49IE.

Hasil uji ELISA menunjukkan reaksi silang antara 5 Ag isolat lapang yang diperiksa dengan 3 macam Ab, yaitu Ab vaksin reovirus S1133, 00/10600 dan 00/49IE. (Tabel 3). Disamping reaksi terhadap Ab Reo-S1133, terlihat juga reaksi silang Ag 98/I-IV dan 98/620 terhadap Ab 00/10600, 457BC dan 9/620 terhadap Ab 00/49IE. Hasil ini menunjukan Ag isolat lapang mungkin mengandung enterovirus lain disamping Reovirus.

Hasil reaksi *immunoblotting* menunjukkan reaksi *pita* 5 isolat lapang terhadap Ab rabbit anti 98/620. Hasil ini menunjukkan reaksi silang antara Ab 98/620 dengan Ag 00/491E, 00/10600; 99/457BC dan 98/I-IV (Gambar 2). Terlihat *pita* berwarna merah coklat yang menunjukkan berat molekul antara 160-27 Mw, seperti yang digambarkan pada grup enterovirus lainnya (ZHANG, 1984) dan reoviridae lainnya (TANNOCK and SHAFREN, 1994).

Pada uji induksi kekerdilan dengan beberapa sampel kekerdilan dari lapangan (SYAFRIATI *et al.* 2000) terlihat laju pertumbuhan ayam pedaging yang terhambat dapat mencapai 69%. Induksi yang diberikan berupa hasil agen infeksius *enterovirus-like* yang dikombinasi dengan berbagai isolat bakteri yang diisolasi dari kasus kekerdilan tersebut menunjukkan gejala klinis yang sangat jelas disamping penghambatan berat badan seperti kasus kekerdilan di lapangan. Pada uji tular agen virus dengan kombinasi infeksi bakteri *Campylohaeter* spp (NOOR *et al.*, 2000) terlihat jelas pertumbuhan yang terlambat (stunting, 11%) dan *gejala helikopter*. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Campylohaeter* spp ikut berperan dalam menginduksi kekerdilan walaupun tidak separah infeksi kombinasi dengan bakteri umum lainnya. Gambaran perubahan PA dan histopatologi serupa dengan yang dilaporkan WAHYUWARDANI *et al.* (2000)

Isolat Avian Reovirus dari kasus kekerdilan berhasil diisolasi dari kasus kekerdilan di lapangan tahun 2000. Hasil uji laju pertumbuhan atau berat badan terhambat mencapai 23,4%, dimana lebih rendah daripada hasil uji coba yang dilakukan dengan campuran infeksi bakteri umum (SYAFRIATI *et al.*, 2000). PAGE *et al.* (1980) melaporkan kasus kekerdilan pada komersil broiler yang disebabkan oleh Avian Reovirus juga tidak terlalu tinggi, hanya berkisar 5-20%. Pada uji coba skala lab, dimana infeksi terkendali, gejala penghambatan berat badan tidak terlalu besar seperti di lapangan, disamping itu ada juga gejala pertumbuhan kaki abnormal (pengkor) yang dimungkinkan oleh penyerapan nutrisi makanan yang tidak normal akibat infeksi saluran pencernaan. Hasil penelitian ini membuktikan hal yang sama dengan hasil penelitian luar negeri dimana grup reovirus, parvoviruses dan enteroviruses sebagai agen penyebab (DECAESSTECKER *et al.*, 1986), akan tetapi uji coba menunjukan reinfeksi kombinasi enterovirus dan bakteri lebih parah daripada hanya reinfeksi oleh Reovirus. Selain itu hasil yang serupa dilaporkan oleh KOUWENHOVEN *et al.*, (1983) dimana bila induksi kekerdilan dikerjakan dengan cara inokulasi seluruh kerokan usus dan isinya (yang biasanya mengandung bakteri patogen maupun apatogen), maka gejala kekerdilan akan lebih parah dibandingkan dengan inokulasi hanya bahan Avian Reovirus atau partikel *enterovirus-like*. Walaupun terlihat menurun dibandingkan induksi dengan partikel *enterovirus-like*, agen infeksius ini masih menyebabkan kerugian ekonomi bagi peternak broiler.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil uji morfologik secara pemeriksaan mikroskop elektron, serologis AGP, ELISA dan western blotting, dapat disimpulkan bahwa kekerdilan dapat disebabkan oleh agen infeksius **Avian Reovirus** dengan manifestasi malabsorpsi. Karena banyak kombinasi faktor yang terlibat untuk mewujudkan gejala kekerdilan pada ayam broiler dibandingkan hanya satu faktor saja, perlu diselidiki lebih lanjut karakterisasi dan spesifikasi panel isolat tersebut. Kombinasi infeksi agen infeksius virus dan bakteri dapat memperparah gejala klinis kejadian kekerdilan pada broiler.

Sebagai saran, dampak pencernaan tidak sempurna terutama pada ayam muda sangat merugikan peternak ayam pedaging akibat pertumbuhan yang terhambat atau bila sembuh masih ada 5-20% ayam yang tidak tumbuh normal kembali.

Pesatnya kemajuan industri perunggasan dalam berbagai aspek, terlihat pada program pakan, manajemen praktis ataupun pada genetika ayam itu sendiri mungkin akan berpengaruh pada keseimbangan, mutasi dan sifat keganasan mikroba yang akan berdampak pada kesehatan hewan. Perubahan-perubahan seperti hal di atas dapat menyebabkan kesempatan timbulnya virus baru ataupun mutasi menjadi bersifat ganas yang menyerang saluran pencernaan. Pemikiran untuk pembuatan vaksin terhadap agen infeksius tersebut dimungkinkan sebagai pencegahan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih pada Dr. R. Gough, CVLab, Weybridge, UK atas bantuannya pada konfirmasi morfologi agen penyebab secara mikroskop elektron dan isolasi, dan juga pada sdr Kusmaedi, Suryono atas bantuan teknis yang sangat menunjang penulisan ini. Penelitian ini dibiayai oleh dana APBN 1999-2000.

DAFTAR PUSTAKA

- COPELAND R.A. 1985. Method for protein analysis. A practical Guide to Laboratory Protocols, pp: 58-71.
- DECAESSTECKER M., CHARLIER G. AND MEULEMANS. 1986. Significance of parvoviruses, entero-like viruses and reoviruses in the aetiology of the chicken malabsorption syndrome. *Avian Pathol.* 15 : 769-782.
- HAMID, H., E. MARTINDAH dan G. TJAHYOWATI. 1996. Laporan Kunjungan Tim Balitvet dan BPPH IV Yogyakarta pada Penyelidikan Kekedilan pada ayam strain Arbo Access.
- HUSSAIN M, PB SPADBROW, M MCKENZIE 1981. Avian reoviruses and avian adenoviruses isolated from diseased chickens *Aust. Vet. J* 57: 436-437.
- JONES R.C. 2000. Avian Reovirus infections. *Rev.Sci.tech.off.Int.Epiz.* 19(2); 614-625.
- KOUWENHOVEN, B. 1996. Malabsorption syndrome in broilers. *World Poultry* vol.12. no.3.
- KOUWENHOVEN, B., VERTOMMEN M.H, and GOREN E. 1996. Runting and stunting syndrome in broilers.: the disease with many names and faces. *In: The International Union of Immunological Societies Proceeding No. 66: Diseases Prevention and Control in Poultry Production.. pp 73-96. Ed by Hungerford T. G. Sydney: Univ of Sydney,*
- NOOR S.M., M. POELOENGAN., ANDRIANL, L. PAREDE., T. SYAFRIATI, S- WAHYLWARDANI, dan Y. SANI. 2000 Uji pertumbuhan *Campylobacter* spp. dari kasus kekerdilan terhadap ayam pedaging. Presiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner, Bogor, 18-19 September 2000. PusLitNak, DepTan. hal: 520-524.
- PAGE R.K, O.J. FLETCHER, G.N. ROWLAND, D. GAUDRY, P. VILLEGAS. 1982 Malabsorption syndrome in broiler chickens. *Avian disease* 26: 618-624.
- ROBERTSON, M.D. and G.E. WILCOX 1986. *Avian Reovirus. Vet. Bull:* 56: 155-174.
- ROSENBERGER, J.K, S KLOPP, R.J. ECKROADE, W.C. KRAUSS 1975. The role of the infectious bursal agent and several avian adenovirus in the hemorrhagic aplastic anemia syndrome and gangrenous dermatitis. *Avian disease* 19:717-729.
- ROSENBERGER, J.K. and N.O. OLSON 1991. Reovirus infections In: Diseases of Poultry, 9th ed. BW Calnek *et al.* eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa pp 639-647.
- SCHATK.A. and PURCHASE H.G. 1998. Laboratory Manual for Isolation and identification of Avian pathogens (1998). AAAP, Kennet Square PA.

- SYAFRIATI, T., L. PAREDE, M. POELOENGAN., S. WAHYUWARDANI dan Y. SANI. (2000) Sindroma kekerdilan pada ayam niaga pedaging. Presiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner, Bogor, 18-19 September 2000. PusLitNak, DepTan.
- TANNOCK GA. and D.R. SHAFREN. 1994. Avian Encephalitis: A review. *Avian Pathology* 23: 603-620.
- WAHYUWARDANI S, Y. SANI, L. PAREDE, T. SYAFRIATI, dan M. POELOENGAN. 2000. Gambaran patologi uji cobareinfeksi sindroma kekerdilan pada ayam pedaging. Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner, Bogor, 18-19 Sept 2000. PusLitNak, DepTan. hal: 504- 512
- ZHANG, ANGIANG. 1984. Studies on Bovine enterovirus. Thesis, Graduate School of Tropical Veterinary Science, James Cook University, Australia.



Gambar 1. Gejala klinis berupa pengkor pada ayam uji induksi kekerdilan, umur 35 hari



Gambar 2. Immunoblotting beberapa isolat dengan SDS PAGE 15% Antigen: A = 00/491E; B = 98/620; C = 10600; D = 99/45BC; E = I-IV Antibodi: sera Rabbit anti 98/620 1: 50 Conjugate: Goat anti rabbit HRPO (Jackson) 1:250.