

ISOLASI AGEN PENYEBAB MCF (MALIGNANT CATARRHAL FEVER) DARI CAIRAN SEKRESI DAN BULU DOMBA

SUDARISMAN, R. INDRIANI, ZULKIFLI, dan M. SAEPULLOH

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O. Box 151, Bogor 16114

ABSTRAK

Telah digunakan *primary cells* asal tiga ekor fetus sapi Bali untuk kebutuhan isolasi ager MCF. Ternyata yang berhasil digunakan adalah enam jenis sel, sedangkan yang lainnya mengalami degenerasi. Organ yang digunakan tersebut adalah ginjal, *testis*, *thyroid*, *turbinate* cornea, dan limpa untuk *primary cells*. Sampel yang diambil dan digunakan untuk inokulum adalah *swab* asal vagina/vulva, mata, hidung serta pangkal rambut dari domba-domba yang diduga sebagai karier MCF dengan uji PCR. Hasil yang didapat adalah telah dilakukan inokulasi pada enam jenis *primary cells*. Bahan-bahan inokulum yang didapat dari lapangan adalah sejumlah 23 buah inokulum asal *swab* hidung, mata, vagina/vulva serta bulu dan diinokulasikan pada biakan sel. Keseluruhan biakan sel yang diamati di tiap lubang plat biakan sel tidak menunjukkan adanya perubahan yang spesifik dan sebagian sampel yang telah mengalami tiga kali pasasi buta diuji dengan PCR dan ternyata dari keseluruhan sampel ada 5 sampel yang bereaksi positif dalam uji PCR. Isolat yang positif OHV-2 ini berasal dari *swab* mata dua buah, *swab* hidung satu buah dan *swab* vagina dua buah. Keseluruhan *swab* ditumbuhkan pada sel *Bovine Testis*.

Kata kunci : Agen malignant catarrhal fever, isolasi cairan sekresi bulu domba

PENDAHULUAN

Penyakit MCF merupakan penyakit viral yang fatal pada ternak sapi dan kerbau dan telah tersebar hampir di seluruh kepulauan di Indonesia (PARTADIREJA *et al.*, 1988), dan menurut Direktorat Jenderal Peternakan, merupakan salah satu dari 13 penyakit penting yang mempunyai nilai strategis dan ekonomis di Indonesia. Penyakit ini belum dapat dikendalikan secara efektif karena vaksinnya hingga saat ini di dunia belum ada yang memproduksinya. Hal ini disebabkan belum ditemukannya isolat utuh virus SA-MCF, yaitu OHV-2.

Penyakit MCF hingga saat ini masih menjadi teka teki dunia. Virus dapat dideteksi dengan bantuan PCR pada hewan klinis MCF maupun pada hewan karier (domba) (BAXTER *et al.*, 1993), akan tetapi dunia hingga saat ini belum berhasil mengisolasi agennya secara utuh. Indonesia setia tahun melaporkan kejadiannya, dan ternak sapi Bali serta kerbau merupakan ternak yang paling peka (SUDARISMAN, 1991) memberi peluang bagi kita untuk keberhasilan isolasi agen tersebut. Hingga saat ini isolasi agen penyakit telah berkali-kali dilakukan, akan tetapi tujuan isolasi dilakukan pada hewan yang peka. Ternyata hal ini menemukan jalan buntu karena virus yang didapat dari hewan peka merupakan virus yang tidak utuh (*incomplete virus*) dalam bentuk lymphoblastoid cell line (LCL) (REID *et al.*, 1989; WIYONO *et al.*, 1992).

Alternatif usaha yang dilakukan untuk tujuan isolasi agen adalah hewan karier, yaitu domba. Langkah awal telah dilakukan dengan mendeteksi agen melalui uji PCR terhadap hewan tersebut. Ternyata hampir 70% domba di Indonesia mengandung agen OHV-2 pada darahnya (WIYONO *et al.*, 1994). Pemikiran domba sebagai karier MCF untuk sapi dan kerbau mengarahkan kita pad

pertanyaan bagaimana cara hewan karier menularkan virus kepada sapi dan kerbau. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pada *peripheral blood leucocyte* (PBL) dan sekresi domba bunting serta anaknya ternyata mengandung virus OFRI-2 dengan uji PCR (BAXTER *et al.*, 1993). Pemikiran ini mengarahkan kita bahwa infeksi pada sapi dan kerbau terjadi dari domba seharusnya melalui virus yang utuh sehingga agen tersebut bisa menyeberang dan menginfeksi ternak yang peka.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi virus SA-MCF dari cairan sekresi dan folikel bulu domba yang dengan uji PCR merupakan reaktor MCF.

MATERI DAN METODE

1. *Pengambilan sampel cairan sekresi serta bulu domba di daerah endemik penyakit MCF* :: Pengambilan dilakukan dengan kunjungan tiga kali survei ke daerah endemis penyakit MCF yaitu di Kabupaten Banyuwangi Propinsi Jawa Timur. Cairan sekresi diambil dengan menggunakan kapas steril bertangkai dengan cara menyemprotkan cairan antibiotika PBS ke daerah lokasi pengambilan sebelum dilakukan pengambilan. Pengambilan dilakukan dengan cara menggosokkan kapas steril tersebut selama satu sampai dua menit. Cairan sekresi yang diambil yaitu di daerah kelopak mata, rongga hidung dan liang vagina. Kapas dimasukkan dalam tabung *ependorf* yang berisi medium transpor. Kemudian dibawa ke laboratorium dengan memasukkannya ke dalam kontainer nitrogen cair untuk digunakan sebagai bahan inokulum. Sampel bulu domba diambil dengan cara biopsi bulu dan kulitnya. Sebelumnya daerah kulit dan bulu yang akan diambil dibalut dengan alkohol 70% dan larutan betadine (Iodium). Bulu dan bagian akarnya ditarik dengan menggunakan pinset steril dan kemudian dimasukkan dalam medium transpor seperti pada pengerjaan sampel cairan sekresi. Darah domba dari sampel yang diambil disedot dengan tabung *venojet* berheparin untuk tujuan pengujian status domba yang terinfeksi oleh virus OHV-2 melalui uji PCR.
2. *Penyiapan beberapa biakan sel sekunder asal fetus sapi Bali* : Fetus dikeluarkan dari kantongnya dan diambil beberapa organ seperti *thyroid, thymus, turbinate, kidney spleen, aorta, lymphoglandulae, trachea, testis, cornea*, dan lung secara aseptik dan steril serta dari darah fetus diambil *macrophage-nya*. Untuk menghindari kontaminasi medium pertumbuhan sel diberi antibiotika dan anti jamur. Biakan sel primer dikembangkan dari masing-masing organ dengan cara tripsinasi untuk mendapatkan sel-sel tunggal. Biakan sel primer dikembangkan dalam medium DMEM (*dulbecco's minimum essential medium*) dengan tambahan 10% FCS (*foetal calf serum*). Biakan sel primer yang telah diperoleh dilakukan pasasi sehingga diperoleh biakan sel sekunder. Biakan sel sekunder ini sebagian dipasasi terus untuk digunakan dalam rangka isolasi virus agen MCF dan sebagian lagi disimpan pada kontainer nitrogen cair. Untuk tujuan inokulasi sampel pada biakan sel, biakan sel sekunder ditumbuhkan pada medium *iscove's* dengan tambahan 10% FCS serta antibiotika dan anti jamur. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C yang mengandung 5% CO₂. Pertumbuhan sel dilakukan pada plat biakan sel steril (24 lubang). Sel umur sehari yang digunakan dan telah membentuk *monolayer* penuh pada dasar plat.

Infeksi sampel cairan sekresi dan bulu domba pada biakan sel sekunder : Sampel yang didapat dari lapangan diambil dari kontainer nitrogen cair dan dilakukan *thawing and freezing* hingga tiga kali agar keseluruhan sel pecah dan virus dapat keluar dari dalam sel. Setelah itu cairan difilter dengan pori sebesar 0,30-0,45 µm. Sebanyak 0,5 ml cairan sekresi/suspensi bulu domba pada media transpor diinfeksi pada biakan sel sekunder umur sehari pada plat

biakan sel. Plat diinkubasi pada suhu 37°C yang mengandung 5% CO₂ dan diamati setiap hari terhadap adanya CPE. Pasasi buta (*blind passage*) dilakukan sebanyak tiga kali. Apabila hasil pasasi buta tidak menunjukkan adanya CPE, sel disimpan untuk, diuji terhadap adanya virus OHV-2 dengan uji PCR.

3. *Uji PCR* : Uji ini dilakukan terhadap sampel domba yang berupa sel darah putih perifer (PBL) dan dari biakan sel yang telah diinkubasi oleh cairan sekresi dan bulu domba setelah mengalami tiga kali pasasi buta. Kedua jenis sampel tersebut dilarutkan dalam lisis buffer yang kemudian dipakai sebagai sampel pada ekstraksi asam deoksiribonukleat (DNA). DNA asal sampel diekstraksi dengan menggunakan fenol-kloroform dan diendapkan dengan menggunakan etanol absolut sesuai dengan prosedur standar serta konsentrasi DNA dikuantifikasi dengan menggunakan alat spektrofotometer (SAMBROOK *et al.*, 1989). Selanjutnya dilakukan perbanyakan DNA secara *in vitro* dengan menggunakan teknik PCR (SAIKI *et al.*, 1985). Uji PCR tersebut untuk mendeteksi fragmen OHV-2 sebagai agen penyebab SA-MCF pada sampel PBL dan biakan sel yang diinfeksi oleh sekresi domba yang menggunakan sepasang *nested primer* 556/755 dan 556/555 (BAXTER *et al.*, 1993). Fragmen DNA yang spesifik untuk OHV-2 menggunakan primer tersebut menghasilkan 238 bp (pasangan basa) (BAXTER *et al.*, 1993; WIYONO *et al.*, 1994), sehingga setiap sampel yang mengandung fragmen tersebut berarti di dalam sampel PBL atau biakan sel mengandung OHV-2. Reaksi perbanyakan ini menggunakan katalisator yang tahan panas yaitu Taq DNA polimerase (SAIKI *et al.*, 1988). Hasil perbanyakan secara *in vitro* tersebut diekstraksi menggunakan kloroform dan isoamil alkohol. Akhirnya sebesar 5% dari hasil ekstraksi dianalisis langsung dengan gel agarose 1,8% yang mengandung *ethidium bromide* (SAMBROOK *et al.*, 1989) dan DNA dalam gel tersebut dilihat dengan menggunakan alat transiluminator ultra violet.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Domba yang diambil sebagai sampel adalah domba yang berasal dari kelompok domba yang diduga sebagai hewan penyebab kasus MCF pada bulan terakhir atau pun pada saat kunjungan tim ke lokasi. Domba tersebut dalam kelompoknya terdapat anak domba yang berumur dua bulan atau lebih sedikit. Domba tersebut berjarak sekitar 2-100 meter dari kasus MCF pada sapi atau pun kerbau. Hal ini dimaksudkan untuk mendapatkan kemungkinan yang lebih besar lagi terhadap adanya virus OHV-2 pada domba sebagai penyebab MCF pada sapi dan kerbau. Alasan ini pernah diutarakan oleh SUDARISMAN (1991) dalam mengamati kejadian MCF di Indonesia. Hal ini juga pernah diutarakan kejadiannya oleh WIYONO *et al.* (1994) di Indonesia dan BAXTER *et al.* (1993) di United Kingdom yang menyatakan domba-domba yang dekat dengan kasus SA-MCF banyak mengandung virus OHV-2 pada darah periferinya. Demikian pula kejadian WA-MCF, yang mana agen penyebabnya yaitu AHV-1 terdapat pada anak wildebeest dan induknya yang merupakan sumber infeksi WA-MCF pada sapi di Afrika (MUSHI *et al.*, 1980; 1981).

Pada kesempatan penelitian kali ini didapat sebanyak 231 buah sampel terdiri atas sampel *swab* hidung, mata, vagina/vulva dan folikel rambut (Tabel 1) yang didapat dari hasil tiga kali kunjungan ke daerah endemik MCF. Sampel ini didapat dari lokasi dimana ada kasus MCF pada sapi dan kerbau sampel diambil dari 59 ekor domba betina dewasa dan anaknya. Dari ke-59 ekor domba tersebut dilakukan uji PCR terhadap adanya virus OHV-2 pada PBL-nya. Tetapi hanya 58 ekor yang diuji, sedangkan untuk PBL anak domba tidak dilakukan. Ternyata hanya 10 ekor saja yang positif OHV-2 pada PBL-nya (Tabel 2). Hal ini sangat disayangkan, karena dapat

memperkecil kemungkinan keberhasilan isolasi agen penyakit OHV-2. Hasil ini tidak seperti yang diutarakan oleh WIYONO *et al.* (1994.) yang menyatakan bahwa hampir 70% domba yang diuji olehnya positif mengandung OHV-2 pada PBL-nya.

Tabel 1. Jumlah sampel yang digunakan untuk tujuan isolasi agen MCF

Kunjungan	Σ domba	Hidung	Mata	Vagina	Bulu
Pertama	22	22	22	22	20
Kedua	23	23	23	22	21
Ketiga	14	14	14	14	14
Jumlah	59	59	59	58	55

Tabel 2. Hasil uji PCR terhadap PBL domba dari tiap kunjungan

Kunjungan	Σ domba	Σ yang diuji	PCR Positif	% Positif
Pertama	22	22	3	13,63
Kedua	23	22	5	22,73
Ketiga	14	5	2	40,00
Jumlah	59	49	10	20,40

Untuk mempermudah pengerjaan di laboratorium, maka yang diinokulasikan pada biakan sel adalah sampel dari domba-domba yang positif OHV-2 pada PBL-nya. Pada kesempatan ini baru delapan ekor domba yang diuji sampelnya dan diinokulasikan pada biakan sel.

Hasil pembuatan biakan sel dari organ yang berhasil dikembangkan adalah organ *thyroid*, *thymus*, *aorta*, *turbinate*, *kidney*, *spleen*, *testis*, *lung*, *cornea*, *macrophage* dan *trachea*. Akan tetapi dalam penggunaannya hanya sel *kidney*, *thyroid*, *spleen*, *testis*, *turbinate*, *aorta* dan *cornea* saja yang dapat disiapkan untuk tujuan isolasi virus OHV-2. Hal ini disebabkan dalam perkembangannya sel dari organ-organ lain tidak dapat berkembang dengan baik (*degenerasi*).

Pada tahap pertama sebanyak 16 buah sampel yang diinokulasikan pada 6 jenis biakan sel, yaitu sel *Bovine Testis* (BTes), *Bovine kidney* (BK), *Bovine spleen* (BSp), *Bovine thyroid* (BThy), *Bovine turbinate* (BT), dan *Bovine aorta* (BAo). Keseluruhan sel tidak menunjukkan adanya perubahan berupa CPE (*cytopathic effect*). Pasasi dilakukan tiga kali dan masih belum terlihat CPE. Akhirnya sel yang tanpa CPE diuji terhadap adanya virus OHV-2 dengan uji PCR dan ternyata tidak memperlihatkan adanya virus OHV-2 pada biakan sel yang diinokulasi oleh sampel lapangan tersebut. Sedangkan 84 buah sampel lagi diinokulasikan pada sel yang tersedia, yaitu sel *cornea* (BCor) dan sel *testis* (BTes). Hal ini juga dilakukan oleh karena sel lainnya tidak berkembang dengan baik. Ternyata hingga pasasi ketiga juga belum memperlihatkan adanya CPE pada biakan sel. Sel tersebut lalu diuji terhadap adanya virus OHV-2 dengan uji PCR dan memberikan hasil bahwa biakan sel yang telah diinfeksi oleh sampel lapangan terdapat lima biakan sel asal BTes yang positif terhadap OHV-2 (Tabel 3). Sedangkan yang lainnya tidak bereaksi positif. Kelima biakan sel tersebut diinokulasi oleh bahan dari tiga sumber inokulum, yaitu (1) *swab* mata dari tiga ekor domba betina induk yang berasal dari satu desa, (2) *swab* mata dan vagina dari dua ekor domba betina induk dalam satu desa, dan (3) *swab* hidung dan vagina dari tiga ekor domba betina induk dalam satu desa. Domba dari ad. 1 diduga sebagai penular dari sapi yang mati dengan gejala MCF pada waktu 2-3 hari sebelum diambil sampelnya. Sedangkan ad 2 diduga sebagai penular dari kerbau yang dipotong karena klinis MCF pada saat diambil

sampelnya. Demikian pula ad 3 diduga sebagai penular dari kerbau yang mati oleh penyakit dengan gejala MCF pada waktu satu minggu sebelum diambil sampelnya. Keseluruhan domba domba yang menghasilkan isolat tersebut pada PBL-nya terkandung virus OHV-2 dengan uji PCR Keberhasilan isolasi virus OHV-2 pada biakan sel asal fetus sapi Bali, sebenarnya baru pertama kali ini terjadi. Walaupun baru pertama kali, biakan sel tidak menimbulkan CPE dan diuji dengan uji PCR memberikan reaksi positif.

Tabel 3. Hasil inokulasi sampel pada biakan sel untuk isolasi agen MCF yang positif mengandung OHV-2 pada uji PCR

Isolat	Asal sampel	Biakan sel	CPE
A	<i>swab</i> mata	B. Tes	-
B	<i>swab</i> mata	B. Tes	-
C	<i>swab</i> vagina	B. Tes	-
D	<i>swab</i> hidung	B. Tes	-
E	<i>swab</i> vagina	B. Tes	-

KESIMPULAN

Telah didapat 5 isolat OHV-2 dalam biakan sel Bovine Testis (BTes) asal fetus sapi Bali yang berasal dari domba yang diduga sebagai karier penyakit MCF. Adanya isolat tersebut dikukuhkan dengan uji PCR. Isolat tersebut tidak/belum menimbulkan CPE pada biakan sel walaupun telah tiga kali mengalami pasasi. Isolat tersebut berasal dari *swab* mata sebanyak dua buah, *swab* hidung satu buah dan *swab* vagina/vulva dua buah. Sementara itu *swab* asal folikel tidak satu pun yang memberikan reaksi positif dalam uji PCR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis sangat berterima kasih atas segala bantuan yang diberikan atas terlaksananya kegiatan penelitian ini. Ucapan terima kasih pertama kali kami ucapkan pada rekan di Dina Peternakan Kabupaten Banyuwangi Jawa Timur atas segala bantuannya dalam menyidik kejadian MCF di lapangan. Di samping itu ucapan terima kasih kami tujukan juga kepada para pegawai bagian Virologi Balai Penelitian Veteriner Bogor atas segala bantuannya dari mempersiapkan hingga terlaksananya penelitian ini. Terakhir kali kami ucapkan terima kasih kepada Drh. A Wiyono atas segala dukungannya pada kegiatan penelitian ini terutama dalam mendukung pelaksanaan uji PCR terhadap isolat yang ditemukan.

DAFTAR PUSTAKA

- BAXTER, S.I.F., I. POW, A. BRIDGEN, and H.W. REID. 1993. Polymerase chain reaction detection of the sheep associated agent of Malignant Catarrhal Fever. *Arch. Virol.* 132: 145-159.
- MUSHI, E.Z., P.B. ROOSITTER, L. KARSTAD, and D.M. JESSET. 1980. The demonstration of cell free Malignant Catarrhal Fever Herpesvirus in wildebeest nasal secretion. *J. Hygiene* 85: 175-179.
- MUSHI, E. Z. and F.R. RURANGIRWA. 1981. Malignant Catarrhal Fever virus shedding by infected cattle. *Bull. Anim. Health Prod. In Africa* 29:111-112.
- PARTADIREDJA, M., I.G. SUDANA, and SOESILO. 1988. Malignant Catarrhal Fever in Indonesia. In : *MCF in Livestock*. Ed. P. W. DANIELS, P. RONOARDJO, dan SUDARISMAN.

- REID, H.W.R., D. BUXTON, I. POW, and I. FINLAYSON. 1989. Isolation and characterization of lymphoblastoid cells from cattle and deer affected with sheep associated MCF. *Res. Vet. Sci.* 47: 90-96.
- SAIKI, R.K., S. SCHARF, F. FALOONA, K.S. MULLIS, G.T. HORN, and N. ARNHEIM. 1985. Enzymatic amplification of betha-globin genomic DNA sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- SAIKI, R.K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S.T. SCHARF, R. HIGUCHI, G.T. HORN, K. B. MULLIS, and H.A. ERLICH 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH, and T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning : A laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SUDARISMAN. 1991. Studi Virologi dan Beberapa Aspek Epidemiologi Malignant Catarrhal Fever (MCF) serta Isolasi Virus Asal Kasus MCF di Indonesia. Tesis. Institut Pertanian Bogor.
- WIYONO, A. dan R. DAMAYANTI. 1993. Laporan kegiatan penelitian penyakit MCF di Indonesia. Balai Penelitian Veteriner Bogor, Departemen Pertanian.
- WIYONO, A., S.I.F. BAXTER, M. SAEFULLOH, R. DAMAYANTI, P.W. DANIELS, and H.W. REID, 1994. PCR detection of Ovine Herpesvirus-2 DNA in Indonesia ruminants-normal sheep and clinical cases of Malignant Catarrhal Fever. *Vet. Microb.* 42: 45-52.
-