

Isolasi dan Identifikasi *Orthoavulavirus javaense* Virulen pada Ayam Petelur di Pinrang, Sulawesi Selatan Berdasarkan Histopatologi dan Uji RT-PCR

*(ISOLATION AND IDENTIFICATION OF VIRULENT
ORTHOAVULAVIRUS JAVAENSE OF LAYING HENS IN PINRANG,
SOUTH SULAWESI BASED ON HISTOPATHOLOGICAL AND RT-PCR TEST)*

**Aulia Shafwana¹, Andi Magfira Satya Apada¹, Andi Muh. Ichlasul Akmal²,
Anak Agung Putu Jhoni Wahyuda³, Zainal Abidin Kholilullah³,
Baso Yusuf³, Rasdyanah³, Muhammad Mufli Nur³,
Abdul Wahid Jamaluddin⁴, Adryani Ris⁵, Fedri Rell^{1*}**

¹Laboratorium Mikrobiologi, ²Laboratorium Patologi,
³Laboratorium Kesmavet, ⁴Laboratorium Farmakologi,
Program Studi Kedokteran Hewan
Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin,
Jln. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar, Indonesia 90245;
⁵Program studi Peternakan, Fakultas Peternakan dan Perikanan,
Universitas Sulawesi Barat, Majene, Sulawesi Barat, Indonesia
*Email: fedrirell@unhas.ac.id

ABSTRACT

Orthoavulavirus Javaense causes ND which often attacks poultry farms with quite high mortality and morbidity rates. Monitoring ND in poultry is necessary to determine the disease situation on farms as an initial action in preventing and controlling cases of poultry deaths due to ND. This study aims to isolate and identify the virulent Orthoavulavirus javaense in one of the laying hen farms in Pinrang Regency, South Sulawesi, Indonesia. Samples were collected from 5 laying hens showing symptoms of torticollis. Orthoavulavirus javaense was detected using conventional reverse transcripton-polymerase chain reaction (RT-PCR) using a pair of primers the gene cleavage site of the F protein region with histopathological to determine the degree of damage. Organ samples such as brain, lungs, spleen, proventriculus and caecal tonsils were placed into collection tubes containing neutral buffered formalin (NBF) 10% for histopathological. Part of the lung organ was placed into viral transport media (VTM) for RT-PCR. The results of detection using RT-PCR method showed the presence of a 356 bp band from each sample. Histopathological showed damage to several organs such as perivascular cuffing and brain intracytoplasmic inclusion body, as well as necrosis in several organs such as the alveoli, lymphoid, proventriculus, and caecal tonsils. Based on the RT-PCR results, all five poultry samples were positive for virulent Orthoavulavirus javaense infection with varying histopathological features that showed changes characteristic of ND cases. Increased biosecurity and vaccination on the laying farm are needed to minimize the possibility of wider spread within and outside the farm.

Keywords: Orthoavulavirus javaense; Poultry; RT-PCR; Histopathology; Newcastle disease

ABSTRAK

Orthoavulavirus Javaense penyebab penyakit tetelo atau Newcastle disease (ND) yang sering menyerang peternakan unggas dengan angka mortalitas dan morbiditas yang cukup tinggi. Monitoring Penyakit tetelo (ND) pada unggas perlu dilakukan untuk mengetahui situasi penyakit di peternakan sebagai tindakan awal dalam pencegahan dan pengendalian terhadap kasus kematian unggas akibat Penyakit tetelo (ND). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi virus *Orthoavulavirus javaense* virulen pada salah satu peternakan ayam petelur di Kabupaten Pinrang, Sulawesi Selatan, Indonesia. Sampel sebanyak 5 ekor ayam petelur (*layer hen*) yang menunjukkan gejala tortikolis. Virus *Orthoavulavirus javaense* dideteksi menggunakan *reverse transcripton-polimerase chain reaction* (RT-PCR) konvensional dengan menggunakan satu pasang primer yang menangkap gen penyandi daerah pemotongan protein F dengan gambaran histopatologi untuk mengetahui derajat kerusakannya. Sampel organ berupa otak, paru-paru, limpa, *proventriculus*, dan *caeca tonsil* dimasukkan ke dalam *collection tube* berisi *neutral buffered formalin* (NBF) 10% untuk pembuatan preparat histopatologi. Sebagian organ paru-paru dimasukkan ke dalam *viral transport media* (VTM) untuk uji RT-PCR. Hasil deteksi menggunakan metode RT-PCR menunjukkan adanya pita (*band*) berukuran 356 bp dari masing-masing sampel. Gambaran histopatologi menunjukkan kerusakan pada beberapa organ seperti *perivascular cuffing* dan *intracytoplasmic inclusion body* otak, serta nekrosis di beberapa organ seperti di alveoli, limfoid, *proventrikulus*, serta di *caecal tonsil*. Berdasarkan hasil RT-PCR kelima sampel unggas positif terinfeksi virus *Orthoavulavirus javaense* yang virulen dengan gambaran histopatologi yang bervariasi yang menunjukkan perubahan yang menciri pada kasus Penyakit tetelo (ND). Peningkatan biosekuriti dan vaksinasi pada peternakan ayam petelur perlu dilakukan untuk menekan kemungkinan penyebaran yang lebih luas dalam dan keluar peternakan.

Kata-kata kunci: *Orthoavulavirus javaense*; unggas; RT-PCR; Histopatologi; penyakit tetelo Newcastle disease (ND)

PENDAHULUAN

Penyakit tetelo atau *Newcastle disease* (ND) merupakan penyakit pada unggas yang sangat menular dan tersebar di seluruh dunia, menyebabkan kerugian ekonomi yang besar pada industri perunggasan yang disebabkan oleh *Orthoavulavirus javaense* atau OAVJ (ICTV, 2022). Penyakit tetelo memiliki angka morbiditas dan angka mortalitas yang tinggi hingga mencapai 100% (Kencana *et al.*, 2019). Sesuai dampak yang ditimbulkan, penyakit tetelo atau ND merupakan salah satu penyakit unggas yang termasuk kedalam daftar A Office International des Epizooties (OIE). Penyakit tetelo atau ND menyebabkan penurunan produksi telur yang nyata dan mortalitas tinggi pada peternakan ayam petelur atau *layer* (Akbar *et al.*, 2017).

Virus *Orthoavulavirus javaense* tersebar di seluruh dunia dan bersifat endemis di Indonesia dan secara khusus di Provinsi Sulawesi Selatan (Alwi *et al.*, 2022).

Pemantauan (*monitoring*) Infeksi virus OAVJ sangat penting dilakukan sebagai tindakan awal dalam pencegahan dan pengendalian wabah tetelo serta mengetahui keberhasilan vaksinasi. Monitoring infeksi virus OAVJ dapat dilakukan dengan pemeriksaan makroskopis dan histopatologi organ serta uji *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Pengujian berbasis molekuler seperti RT-PCR memiliki sensitivitas tinggi dan selektivitas tinggi sehingga digunakan sebagai *gold standard* dalam isolasi dan identifikasi virus RNA (Rahman *et al.*, 2016). Infeksi virus penyakit tetelo dapat menyebabkan gejala dan peru-

bahan patologi yang menciri pada organ seperti tortikolis dan ptekie pada mukosa proventrikulus, sehingga pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis organ diperlukan untuk membantu meneguhkan tipe agen serta tingkat keparahan penyakit tetelo (Etriwati *et al.*, 2017).

Di Indonesia, penyakit tetelo/ND pertama kali ditemukan oleh Krenavald di Pulau Jawa pada tahun 1926. Namun, tahun 1927 Doyle berhasil mengisolasi agennya yang diambil dari Kota Newcastle, Inggris, sehingga dinamakan *Newcastle disease* atau disingkat ND (Joao *et al.*, 2022) dan sampai saat ND ini terus menyebar dan menyebabkan penyakit pada unggas di berbagai wilayah Indonesia (Susanti *et al.*, 2021; Dharmayanti *et al.*, 2024). Menurut laporan Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan (2024) terdapat sebanyak 71 kasus ND, tetapi laporan tersebut tidak mengungkapkan informasi mengenai metode pemeriksaan, apakah telah sesuai dengan *gold standard* OIE. Berdasarkan uraian tersebut, kiranya perlu dilakukan *monitoring* penyakit tetelo (ND) yang disebabkan oleh infeksi virus OAVJ melalui isolasi dan identifikasi virus berbasis molekuler dengan RT-PCR dan gambaran histopatologinya yang terjadi pada salah satu peternakan *layer* di Kabupaten Pinrang, Sulawesi Selatan. Hal ini sangat penting dilakukan agar menambah khasanah ilmiah tentang kasus ND di Kabupaten Pinrang mengingat masih kurangnya laporan ilmiah terkait penyakit tetelo dari Pinrang, Sulawesi Selatan.

METODE PENELITIAN

Koleksi Sampel

Penelitian ini merupakan deskriptif observasional yang menguraikan gambaran histopatologi, serta hasil uji RT-PCR pada ayam *layer* yang terinfeksi virus penyakit tetelo. Pembuatan preparat histopatologi dan uji RT-PCR dilakukan di Balai Besar Veteriner Maros, Sulawesi Selatan. Teknik pengumpulan sampel secara *purposive sam-*

pling. Penelitian dilakukan selama enam bulan dari bulan Mei hingga November 2024 dengan menggunakan lima ekor sampel ayam *layer* yang menunjukkan tanda klinis menderita penyakit tetelo. Pengambilan sampel histopatologi dan uji RT-PCR dilakukan dengan nekropsi yang diikuti dengan pengamatan organ-organ ayam secara makroskopis. Sampel organ berupa otak, paru-paru, limpa, *proventriculus* dan *caeca tonsil* dimasukkan ke dalam *collection tube* berisi *neutral buffered formalin* (NBF) 10% untuk pembuatan preparat histopatologi dan sampel organ berupa paru-paru dimasukkan ke dalam *viral transport media* (VTM) untuk uji RT-PCR. Prosedur pembuatan *slide* histopatologi dilakukan dengan prosedur yang sesuai dengan standar operasional Laboratorium Patologi dan Toksikologi dan uji RT-PCR sesuai dengan standar operasional Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Veteriner Maros, Sulawesi Selatan.

Pemeriksaan Makroskopis dan Histopatologi

Ayam sampel penderita penyakit tetelo sebanyak lima ekor diinspeksi dan dinekropsi untuk melihat abnormalitas yang ditimbulkan oleh infeksi OAVJ. Nekropsi dan insisi bagian tubuh ayam dilakukan secara saksama dan aseptis. Beberapa organ penting diinspeksi untuk mengetahui adanya perubahan seperti edema, vasodilatasi, eritema dan atau perdarahan. Organ-organ penting yang diperiksa secara inspeksi yakni proventrikulus, sekum, paru-paru, limpa dan otak. Selanjutnya organ-organ tersebut disiapkan untuk pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan *haematoxylin* dan *eosin* (HE). Hasilnya berupa preparat *slide* histopatologi diamati di bawah mikroskop cahaya untuk melihat perubahan mikroskopis.

Ekstraksi RNA, RT-PCR dan Visualisasi

Sampel RT-PCR dilanjutkan untuk ekstraksi dan proses amplifikasi pada mesin PCR. Ekstraksi RNA dilakukan dengan perangkat isolasi RNA (QIAamp viral RNA Mini Kit[®], Qiagen, Hilden, Jerman). Produk

hasil amplifikasi divisualisasikan menggunakan elektroforesis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan pada kelima ekor ayam layer yang digunakan dalam kasus ini menunjukkan gejala tortikolis dengan feses berwarna hijau disertai gumpalan putih.

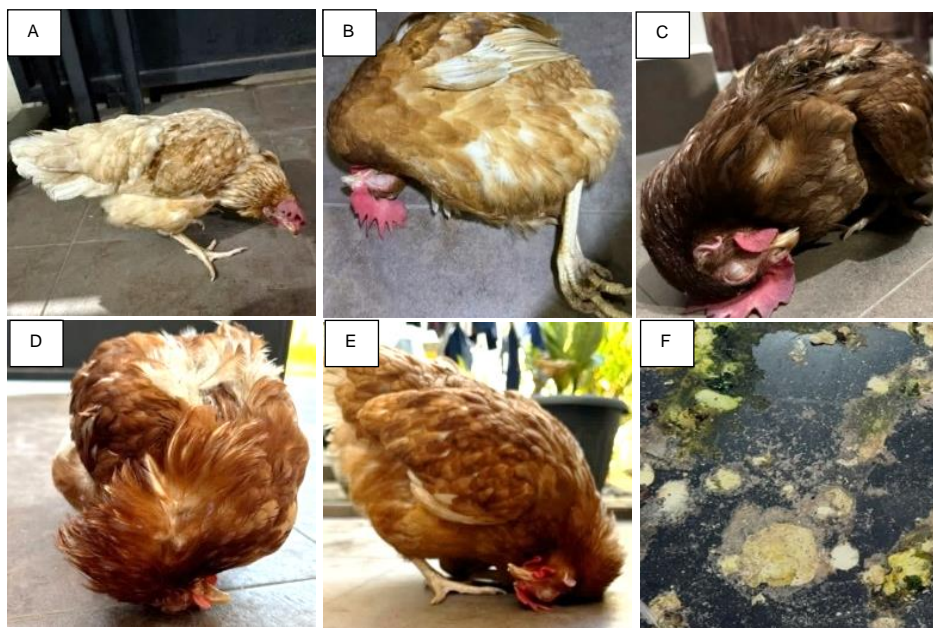
Tanda klinis yang dapat diamati yaitu adanya kelainan saraf dengan gejala tortikolis. Berdasarkan studi Daodu *et al.* (2019), ditemukan bahwa tortikolis merupakan tanda klinis utama dari strain neurotropik penyakit tetelo, yang menyerang sistem saraf pusat. Tortikolis merupakan tanda klinis infeksius yang paling sering diamati menjelang kematian pada ayam yang terinfeksi penyakit tetelo. Pada ayam penderita ND, tortikolis (Gambar 1A-E) terjadi ketika virus telah menyerang otak kecil (*cerebellum*) dan batang otak (*brain stem*), menghasilkan nodul glial multifokal dan nekrosis. Selain itu proses patologis ini juga mencakup edema *submeningeal*, infiltrasi limfositik ringan, demielinasi dan degenerasi sel-sel Purkinje di *cerebellum*. Tanda klinis lain pada feses terlihat berwarna hijau yang disertai gumpalan putih akibat adanya gangguan pencernaan yang disebabkan oleh adanya infeksi virus penyakit tetelo. Perubahan patologi pada saluran pencernaan dimanifestasikan dengan tanda klinis diare putih kehijauan (Gambar 1F). Feses yang berwarna putih kehijauan pada ayam yang terinfeksi virus penyakit tetelo menunjukkan adanya gangguan pada organ hati dan pankreas dalam memproduksi empedu dan enzim pencernaan.

Berdasarkan pemeriksaan makroskopis otak pada sampel ayam layer yang terinfeksi virus penyakit tetelo, dapat diamati bahwa terdapat perubahan patologi anatomi berupa vasodilatasi pada pembuluh darah otak. Hal seperti ini sebelumnya pernah dilaporkan oleh Nurmayani *et al.* (2023), bahwa infeksi virus penyakit tetelo memicu reaksi inflamasi di otak, sehingga menyebabkan pelepasan mediator inflamasi. Pelepasan medi-

ator inflamasi ini mengakibatkan peningkatan volume darah yang menyebabkan terjadinya vasodilatasi untuk memungkinkan lebih banyak sel-sel imun mencapai area terinfeksi. Vasodilatasi pembuluh darah dapat menyebabkan perlambatan aliran darah sehingga dapat menimbulkan kongesti. Menurut Etriwati *et al.* (2023), infeksi virus tetelo dapat menyebabkan degenerasi dan penebalan dinding pembuluh darah otak. Kehadiran virus di otak mengakibatkan kerusakan pada pembuluh darah dan neuron. Kerusakan ini kemudian memicu respons inflamasi yang dapat memperburuk kondisi ayam yang terinfeksi.

Berdasarkan pengamatan histopatologi otak pada sampel ayam layer yang terinfeksi virus penyakit tetelo dapat diamati bahwa terdapat perubahan mikroskopik berupa adanya *perivascular cuffing* (Gambar 2A) dan *intracytoplasmic inclusion body* (Gambar 2B) pada otak ayam sampel. Ditemukannya *perivascular cuffing* pada otak ayam yang terinfeksi sesuai dengan studi Etriwati *et al.* 2017, yang menjelaskan bahwa keberadaan virus penyakit tetelo di dalam otak dapat menyebabkan kerusakan pembuluh darah dan neuron yang mengakibatkan respons peradangan. Respons peradangan dimulai dengan penyebaran makrofag ke dalam *perivascular* yang kemudian disebut *perivascular cuffing*. Shafi *et al.* (2023), juga menyatakan bahwa sel-sel inflamasi dapat terakumulasi di sekitar pembuluh darah otak dan membentuk *cuff* pada peri-vaskuler. *Cuff* ini dapat diamati di meninges dan parenkim otak. Adapun *perivascular cuffing* ini merupakan temuan khas pada banyak infeksi virus, termasuk virus penyakit tetelo.

Keberadaan *intracytoplasmic inclusion body* (Gambar 2A) pada otak ayam yang terinfeksi virus penyakit tetelo menunjukkan adanya infeksi tersebut. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Shafi *et al.* (2023), bahwa *intracytoplasmic inclusion body* (Gambar 2B) dapat dideteksi pada sel-sel otak yang terinfeksi virus penyakit tetelo. *Intracytoplasmic inclusion body* merupakan



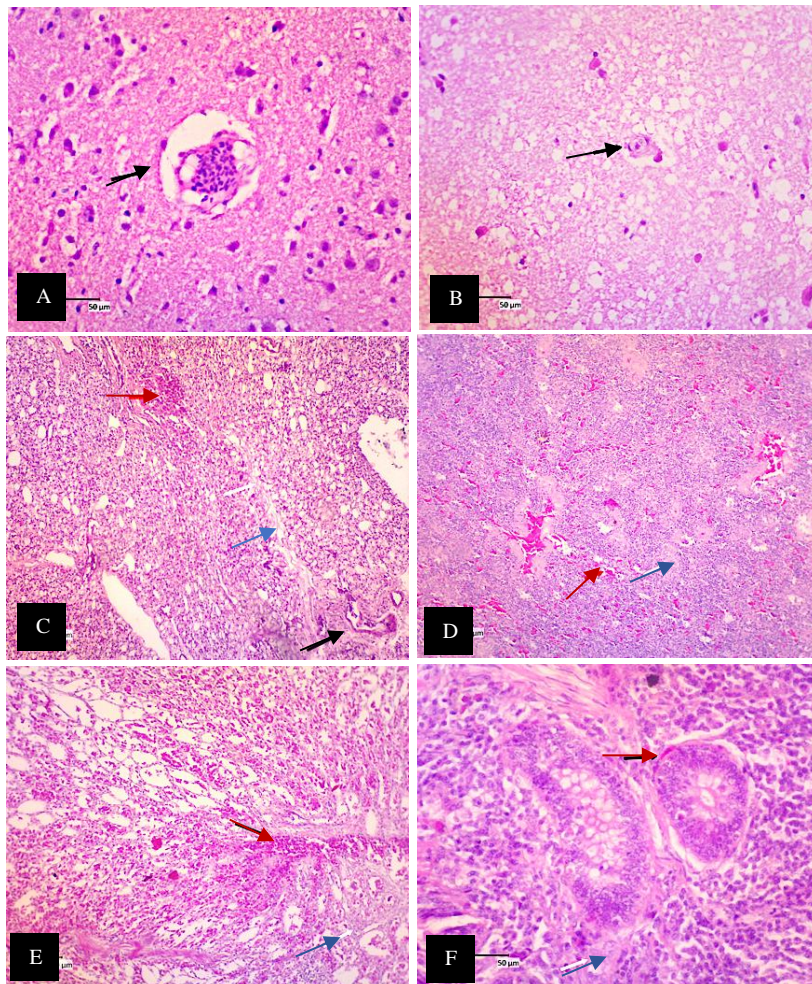
Gambar 1. Gejala dan tanda klinis. Kelima sampel menunjukkan tanda klinis kelainan saraf berupa tortikolis (A-E); dan feses kehijauan disertai gumpalan putih sering ditemui pada kasus ND (F).

agregat protein virus atau partikel virus. Dalam studi Shalaby *et al.* (2021), *intracytoplasmic inclusion body* juga ditemukan pada otak individu yang terinfeksi virus tetelo. Menurut Dolnik *et al.* (2021), selama proses infeksi, virus tetelo menginduksi pembentukan kompartemen intraseluler berbeda dan terspesialisasi yang bertujuan memfasilitasi replikasi virus. Kompartemen intra-seluler ini disebut sebagai inklusi dari virus atau *inclusion body* (IB). Infeksi oleh virus RNA untai negatif menginduksi pembentukan *inclusion body* dalam sel inang dengan memisahkan protein virus dan protein seluler untuk memungkinkan replikasi virus yang efisien. Sebagian besar *inclusion body* diinduksi oleh proses ekspresi nukleoprotein virus (N, NP) dan fosfoprotein (P), yang keduanya memiliki struktur protein khusus dan domain pengikat RNA. Struktur ini berkontribusi pada fungsi protein yang berbeda, dalam hal ini P menjaga N tetap larut setelah ekspresi untuk memungkinkan pengikatan protein N ke RNA virus.

Berdasarkan pemeriksaan makroskopis paru-paru pada sampel ayam *layer* yang

terinfeksi virus penyakit tetelo dapat diamati bahwa terdapat perubahan patologi anatomi berupa hemoragi. Hal ini selaras dengan laporan Shafi *et al.* (2023), bahwa jaringan paru-paru dapat menunjukkan adanya hemoragi. Perubahan ini sering terlihat pada kasus penyakit tetelo yang parah dan dapat melibatkan berbagai lobus paru-paru. Hal ini dapat memengaruhi pertukaran oksigen di dalam paru-paru dan mengganggu fungsi pernapasan. Menurut Kabiraj *et al.* (2020), virus penyakit tetelo menyerang sistem pernapasan ayam dengan menempel pada sel-sel saluran pernapasan. Pada tahap awal, terlihat kerusakan pada pembuluh darah seperti adanya hemoragi. Perubahan ini diikuti kerusakan pada alveolus dan infiltrasi sel-sel imun.

Berdasarkan pengamatan histopatologi paru-paru pada sampel ayam *layer* yang terinfeksi virus penyakit tetelo dapat diamati bahwa terdapat perubahan mikroskopik berupa adanya hemoragi dan nekrosis alveoli (Gambar 2C) pada semua sampel dan ditemukan *epithelial hyperplasia* pada sampel nomor satu dan nomor lima. Adanya hemo-



Gambar 2. Perubahan histopatologi yang ditemukan pada organ ayam. (A) Otak terlihat adanya vasodilatasi, *perivascular cuffing* (panah hitam). (B) *intracytoplasmic inclusion body* pada cerebrum (panah hitam). (C) Paru-paru ditemukan adanya hemoragi (panah merah), nekrosis alveoli (panah biru), dan epithelial hyperplasia (panah hitam). (D) limpa terlihat adanya necrotic limpoid (panah biru) dan hemoragi pada germinal center (panah merah). (E) Proventriculus ditemukan adanya hemoragi (panah merah) dan nekrosis pada *submucosal gland* (panah biru). (F) pada *caeca tonsil* terlihat adanya hemoragi (panah merah) dan nekrosis pada jaringan limfoid (panah biru) (HE 40X, Bar 50µm).

ragi dan *epithelial hyperplasia* pada pengamatan histopatologi paru-paru sesuai dengan studi yang dilaporkan oleh Elfatah *et al.* (2021), yang menemukan bahwa pemeriksaan histopatologi paru-paru ayam yang terinfeksi menunjukkan hemoragi dan obstruksi bronchial yang disebabkan oleh infiltrasi sel inflamasi peribronchial dengan *epithelial hyperplasia* di sekitar parabronchi. Menurut Annisa *et al.* (2024), *epithelial hyperplasia* terjadi karena adanya respons tubuh terhadap infeksi ataupun inflamasi yang ditimbulkan virus dan hemoragi terjadi akibat kerusakan

pada dinding pembuluh darah yang meningkatkan permeabilitas vaskuler, sehingga cairan dan plasma darah keluar dari pembuluh darah. Proses ini kemudian menyebabkan edema, yaitu penumpukan cairan pada suatu area. Penumpukan cairan ini mengganggu pasokan darah ke jaringan paru-paru, yang pada akhirnya menyebabkan terjadinya nekrosis di beberapa titik pada paru-paru. Berdasarkan laporan Shafi *et al.* (2023), bahwa pada pemeriksaan mikroskopis paru-paru ditemukan adanya peradangan dan kerusakan pada bronkus, bronkiolus dan

jaringan paru-paru di seki-tarnya. Bronkus dan bronkiolus yang terkena dapat menunjukkan nekrosis pada epitel bronchial dan infiltrasi sel-sel inflamasi, termasuk limfosit, sel plasma dan heterofil di sekitar pembuluh darah. Pada kasus penyakit tetelo yang parah, jaringan paru-paru dapat mengalami atelektasis dan hemoragi. Atelektasis dapat menyebabkan gangguan pertukaran gas karbondioksida dengan oksigen dan mengakibatkan disfungsi pernapasan.

Berdasarkan pemeriksaan makroskopis limpa pada sampel ayam *layer* yang terinfeksi virus penyakit tetelo dapat diamati bahwa terdapat perubahan patologi anatomi berupa atrofi dan adanya *necrotic foci*. Hal ini sesuai dengan pemeriksaan makroskopis pada limpa ayam yang terinfeksi virus penyakit tetelo menunjukkan adanya nekrosis yang ditandai dengan bintik-bintik putih (*necrotic foci*) yang tersebar di seluruh bagian limpa. Menurut Kabiraj *et al.* (2020), jumlah dan ukuran dari *focal* nekrotik akan meningkat seiring waktu. Hal ini pada akhirnya akan menyebabkan atrofi pada limpa.

Berdasarkan pengamatan histopatologi limpa pada sampel ayam *layer* yang terinfeksi virus penyakit tetelo dapat diamati bahwa terdapat perubahan mikroskopik berupa adanya deplesi limfoid dan nekrosis limfoid pada *germinal center* (Gambar 2D) pada semua sampel dan hemoragi pada sampel nomor tiga. Adanya deplesi limfoid pada pengamatan histopatologi limpa ayam yang terinfeksi virus penyakit tetelo sesuai dengan laporan Shafi *et al.* (2023), bahwa pemeriksaan histopatologis pada limpa ditemukan deplesi limfoid yang ditandai dengan penurunan jumlah limfosit pada area pulpa putih (*white pulp*) limpa. Deplesi limfoid dapat mengakibatkan hilangnya struktur normal limpa dan berpengaruh pada sistem imun dalam merespons antigen. Pemeriksaan mikroskopis limpa lebih lanjut juga ditemukan area nekrosis. Dalam hal ini, *germinal center* pada limpa mengalami perubahan akibat infeksi virus penyakit tetelo. Nofantri *et al.* (2017) menjelaskan bahwa adanya infeksi virus penyakit tetelo akan merangsang sel-sel

limfoid untuk membentuk antibodi, yang kemudian menyebabkan limfolisis pada *germinal center* dan mengakibatkan debris inti sel, sehingga pada limpa terlihat adanya nekrosis dan deplesi limfoid.

Berdasarkan pemeriksaan makroskopis *proventriculus* pada sampel ayam *layer* yang terinfeksi virus penyakit tetelo, dapat diamati bahwa terdapat perubahan patologi anatomi berupa adanya hemoragi berupa *petechiae*. Hal ini sesuai dengan laporan Naprila dan Prasetyo (2022), bahwa hemoragi dapat berupa *petechiae* yang terjadi akibat reaksi peradangan karena adanya antigen yang menyebabkan aliran darah yang berlebihan dan peradangan pada sel. Hemoragi merupakan keadaan keluarnya darah dari pembuluh darah oleh adanya proses inflamasi. Pelebaran sel endotel pada proses inflamasi meningkatkan volume darah di dalam pembuluh darah. Volume darah yang meningkat di jaringan dapat menimbulkan perdarahan. Menurut Shafi *et al.* (2023), hemoragi berupa *petechiae* dapat terjadi di permukaan atau di dalam lapisan mukosa *proventriculus*. Hemoragi ini merupakan akibat dari kerusakan pembuluh darah yang disebabkan oleh virus dan respons peradangan yang terjadi.

Berdasarkan pengamatan histopatologi *proventriculus* pada sampel ayam *layer* yang terinfeksi virus penyakit tetelo dapat diamati bahwa terdapat perubahan mikroskopik berupa adanya hemoragi dan nekrosis pada *proventricular submucosal gland* (Gambar 2E). Hal ini sesuai dengan laporan Shafi *et al.* (2023), bahwa, pemeriksaan mikroskopis *proventriculus* yang terinfeksi virus ND menunjukkan adanya nekrosis epitel, yang ditandai dengan hilangnya lapisan epitel superfisial. Hal ini dapat berkembang menjadi nekrosis yang lebih luas. Perubahan berupa adanya hemoragi juga dapat diamati. Menurut Khorajiya *et al.* (2015), lesi yang dapat ditemukan pada *proventriculus* adalah hemoragi dalam mukosa serta di daerah kelenjar *proventriculus* dan menunjukkan adanya *haemorrhagic proventriculitis*. Adanya hemoragi tersebut disebabkan

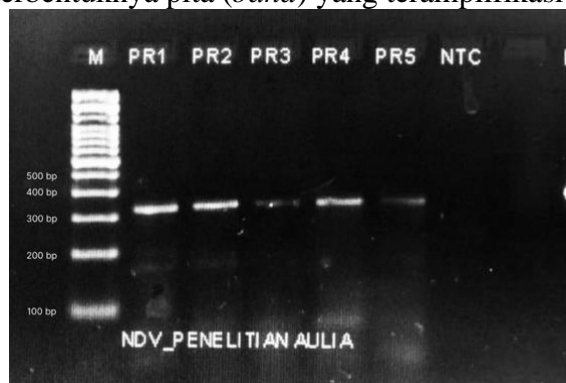
kan oleh kerusakan pada pembuluh darah pada *proventriculus* akibat infeksi virus penyakit tetelo (Etriwati *et al.*, 2023).

Berdasarkan pemeriksaan makroskopis *caeca tonsil* pada sampel ayam *layer* yang terinfeksi virus penyakit tetelo dapat diamati bahwa terdapat perubahan patologi anatomi berupa adanya hemoragi ekimosa. Virus cenderung menyerang organ limfoid, sehingga lesi dapat ditemukan pada organ limfoid seperti pada *caeca tonsil*. Pada keadaan serangan akut virus ND dapat ditemukan hemoragi yang luas dan berbatas jelas pada beberapa bagian usus atau jaringan limfoid, yaitu *caeca tonsil*. Menurut Kabiraj *et al.* (2020), *caeca tonsil* menunjukkan hemo-ragi ekimosa, yang secara bertahap akan menyatu membentuk bintik-bintik. Seiring perkembangan penyakit, lesi hemoragi akan menjadi parah dengan hemoragi yang lebih besar dan banyak pada *caeca tonsil* yang menebal, *edematous* dan inflamasi. Hemoragi berupa ekimosa terjadi akibat reaksi peradangan karena adanya antigen yang menyebabkan aliran darah yang berlebihan dan peradangan pada sel (Napriila dan Prasetyo, 2022).

Berdasarkan pengamatan histopatologi *caeca tonsil* pada sampel ayam *layer* yang terinfeksi virus penyakit tetelo dapat diamati bahwa terdapat perubahan mikroskopik berupa adanya hemoragi dan nekrosis pada jaringan *lymphoid* (Gambar 2F). Hal ini sesuai dengan laporan Kabiraj *et al.* (2020), bahwa hemoragi pada *caeca tonsil* mulai terjadi pada awal infeksi yang diikuti oleh nekrosis. Hemoragi pada *caeca tonsil* disebabkan oleh replikasi virus dan masuknya virus ND ke dalam sirkulasi sistemik melalui *caeca tonsil* setelah inokulasi virus yang menyebabkan kerusakan pembuluh darah pada *caeca tonsil* (Al-Murshedy *et al.*, 2023). Menurut Khorajiya *et al.* (2015), lesi pada *caeca tonsil* menunjukkan area nekrosis dan hemoragi multifokal serta infiltrasi sel mononuklear, terutama limfosit pada mukosa dan submukosa. Beberapa bagian juga menunjukkan deplesi limfoid dan adanya serpihan fibrin yang menggantikan sel limfoid.

Hasil uji RT-PCR memperlihatkan

terbentuknya pita (*band*) yang teramplifikasi



Gambar 3. Produk cRT-PCR. Visualisasi produk RT-PCR (356 bp) setelah elektroforesis pada gel agarosa. M = marker, PR1 = sampel 1, PR2 = sampel 2, PR3 = sampel 3, PR4 = sampel 4, PR5 = sampel 5, NTC = negative control, PC = positive control.

dengan ukuran 356 bp pada sampel yang diuji, sesuai dengan ukuran fragmen yang diharapkan (Gambar 3). Pita tersebut terletak pada posisi yang setara dengan fragmen marker berukuran 356 bp, menunjukkan bahwa amplifikasi DNA target berhasil. Hal ini sesuai dengan laporan Bhadouriya *et al.* (2018), bahwa *sequence* spesifik yang sesuai dengan primer untuk gen F diamplifikasi dengan RT-PCR ditunjukkan sebagai pita berukuran 356 bp dalam elektroforesis gel agarosa. Spesifisitas amplifikasi RT-PCR ditunjukkan dengan tidak adanya fragmen DNA pada kontrol negatif 356 bp, serta adanya fragmen DNA 356 bp pada kontrol positif. Menurut Rahman *et al.* (2016), RT-PCR telah ditetapkan sebagai metode yang digunakan untuk mengidentifikasi virus penyakit tetelo,

Uji RT-PCR dilakukan dengan menggunakan seperangkat primer oligonukleotida. Menurut Rajalakshmi (2017), fungsi dari primer adalah untuk membatasi urutan DNA yang akan direplikasi dan menghasilkan amplifikasi dengan urutan DNA tertentu. Adapun primer oligonukleotida yang digunakan, yaitu *forward* (NDVF) -5'-GCAGCTGCAGGGATTGTGGT-3' (posisi nukleotida 158-177) dan *reverse* (NDVR) -5-

TCTTGAGCAGGAGGATGTTG-3' (posisi nukleotida 493-513) sebagaimana yang dirancang oleh Nanthakumar *et al.* (2000), digunakan untuk amplifikasi ampikon 356 bp yang sesuai dengan situs aktivasi pembelahan protein F virus penyakit tetelo.

Hasil positif amplifikasi protein F pada lima sampel menunjukkan bahwa protein F memiliki peran penting dalam proses masuknya virus ke dalam sel, fusi sel dan hemolisis. Protein ini awalnya diproduksi sebagai bentuk yang tidak aktif, yaitu F0. Setelah dibelah menjadi F1 dan F2, kemudian protein F dapat membantu virus menyatu dengan membran sel. Pembelahan ini dilakukan oleh enzim protease yang ada dalam sel inang, dan tingkat kepekaan protein F terhadap berbagai enzim tersebut tergantung pada urutan asam amino pada *cleavage site*. Bagian *fusion cleavage site* (FCS) sangat berpengaruh terhadap kemampuan strain virus dalam menimbulkan penyakit. Selain itu, urutan asam amino pada protein F juga memengaruhi kemampuan virus untuk menyerang jaringan tertentu, seperti otak, paru-paru dan limpa (Zhang *et al.*, 2023). Virus penyakit tetelo virulen memiliki urutan asam amino ¹¹²R/K-R-Q-K/R-R-F¹¹, sedangkan virus avirulen memiliki urutan asam amino ¹¹²G/E-K/R-Q-G/E-R-L¹¹⁷ (Moura *et al.*, 2016; Rell *et al.*, 2021; Mao *et al.*, 2022).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan disimpulkan bahwa sampel ayam positif terinfeksi virus penyakit tetelo dengan gambaran histopatologi yang menunjukkan kerusakan pada berbagai organ-organ seperti vasodilatasi pada otak, hemoragi pada paru-paru, nekrosis dan atrofi pada limpa, *petechiae* pada *proventriculus* dan hemoragi pada *caeca tonsil*. Pengamatan histopatologi pada otak menunjukkan adanya *perivascular cuffing* dan *intracytoplasmic inclusion body*. Pengamatan histopatologi pada paru-paru menunjukkan adanya hemoragi, nekrosis alveoli, dan *epithelial hyperplasia*.

SARAN

Penelitian ini telah mengidentifikasi Penyakit tetelo (ND) berdasarkan gambaran histopatologi dan uji RT-PCR dari beberapa organ serta meneguhkan virus ND sebagai agen penyebab penyakit pada ayam *layer*. Oleh karena itu, diperlukan studi lebih lanjut untuk mengevaluasi genotip virus ND yang beredar dan titer antibody pascavaksinasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Hasanuddin, khususnya Program Studi Kedokteran Hewan, juga kepada Balai Besar Veteriner Maros yang telah banyak membantu dalam penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak terkait yang telah memberikan dukungan moril maupun materil hingga penelitian ini dapat diselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar S, Ardana IBK, Suardana IBK. 2017. Perbandingan Titer Antibodi *Newcastle Disease* pada Ayam Petelur Fase Layer I dan II. *Indonesia Medicus Veterinus* 6(4): 327–333.
- Al-Murshedy AKN, Al-Zubaidi HJ, Azhar, Alkaby A. 2023. Histopathological and Immunohistochemical Study of Newcastle Disease in Chicken in Al-Najaf Province. *Journal of Survey in Fisheries Sciences* 10(3): 14–25.
- Alwi MD, Apada AMS, Rell F, Syahid TP. 2022. Administration of Live-Attenuated Newcastle Disease (ND) Vaccines Derived from B1 and LaSota Strain and Their Effect on Broiler Antibody Titers. *Jurnal Riset Veteriner Indonesia* 6(1): 15–22.
- Annisa A, Darmawi, Balqis U, Nur Salim M, Nazarudin, Aliza D, Aisyah S, Awalluddin, Irmawati HD, Akmal M, Zahrial HT, Asmilia N. 2024. Histo-

- pathologic Features of Trachea and Lungs in Chickens with Chronic Respiratory Disease. *Jurnal Medika Veterinaria* 18(1): 52–57.
- Bhadouriya S, Kapoor S, Sharma BK, Chhabra R. 2018. Isolation and Characterization of the Newcastle Disease Virus (NDV) of Haryana Region Based on F-gene Sequence. *Journal of Animal Research* 8(6): 999–1003.
- Daodu OB, Aiyedun JO, Kadir RA, Ambali HM, Oludairo OO, Olorunshola ID, Daodu OC, Baba SS. 2019. Awareness and Antibody Detection of Newcastle Disease Virus in a Neglected Society in Nigeria. *Veterinary World* 12(1): 112–118.
- Dharmayanti NLPI, Nurjanah D, Nuradji H, Suyatno T, Indriani R. 2024. Newcastle disease virus: the past and current situation in Indonesia. *Journal of Veterinary Science* 25(1): 1–20.
- Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan. 2024. *Situasi Umum Penyakit Newcastle Disease Tahun 2019-2024*. Makassar. Pemerintah Sulawesi Selatan.
- Dolnik O, Gerresheim GK, Biedenkopf N. 2021. New Perspectives on the Biogenesis of Viral Inclusion Bodies in Negative-Sense RNA Virus Infections. *Cells* 10(6): 1–22.
- Elfatah KSA, Elabasy MA, El-Khyate F, Elmahallawy EK, Mosad SM, El-Gohary FA, Abdo W, Al-Brakati A, Seadawy MG, Tahoon AE, El-Gohary AE. 2021. Molecular Characterization of Velogenic Newcastle Disease Virus (Sub-Genotype VII. 1.1) from Wild Birds, with Assessment of Its Pathogenicity in Susceptible Chickens. *Animals* 11(2): 1–21.
- Etriwati, Agungpriyono DR, Setiyaningsih S, Darniati ADM, Erwin, Handharyani E. 2023. Comparative pathology and immunohistochemistry of Newcastle disease in domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*) and Alabio duck (*Anas platyrhynchos* Borneo). *Open Veterinary Journal* 13(4): 433–442.
- Etriwati, Ratih D, Handharyani E, Setiyaningsih S. 2017. Pathology and immunohistochemistry study of Newcastle disease field case in chicken in Indonesia. *Veterinary World* 10(9): 1066–1071.
- [ICTV] International Committee on Taxonomy of Viruses. 2022. *Current ICTV Taxonomy Release: Taxon Details*. https://Ictv.Global/Taxonomy/Taxondetails?Taxnode_id=20181591&taxon_name=Avian%20avulavirus%201.
- Joao AAPDC, Astawa INM, Adi AAAM. 2022. Seroprevalensi dan Profil Antibodi AntiVirus Newcastle Disease Pascavaksinasi pada Ayam Kampung di Kabupaten Bobonaro Timor-Leste. *Buletin Veteriner Udayana* 14(4): 425–432.
- Kabiraj CK, Mumu TT, Chowdhury EH, Islam MR, Nooruzzaman M. 2020. Sequential Pathology of a Genotype XIII Newcastle Disease Virus from Bangladesh in Chickens on Experimental Infection. *Pathogens* 9(7): 1–14.
- Kencana GAY, Kardena IM, Mahardika IGNK. 2012. Peneguhan Diagnosis Penyakit Newcastle Disease Lapang Pada Ayam Buras di Bali Menggunakan Teknik RT-PCR. *Jurnal Kedokteran Hewan* 6(1): 28–31.
- Kencana GAY, Nirhayu, Suartini IGAA. 2019. Seroprevalensi Penyakit Tetelo (Newcastle Disease) pada Ayam Buras di Kecamatan Kerambitan, Kabupaten Tabanan, Bali. *Indonesia Medicus Veterinus* 8(4): 496–501.
- Khorajiya JH, Pandey S, Ghodasara PD, Joshi BP, Prajapati KS, Ghodasara DJ, Mathakiya RA. 2015. Patho-Epidemiological Study on Genotype-XIII Newcastle Disease Virus Infection in Commercial Vaccinated Layer Farms. *Veterinary World* 8(3): 372–381.
- Mao Q, Ma S, Philip LS, Pengwei Z, Wang J, Zhang Y, Li S, Wang C. 2022. Review detection of Newcastle disease virus. *Frontiers in Veterinary Sci-*

- ence 9(1): 1–18.
- Moura VMDB, Susta L, Cardenas-Garcia S, Stanton JB, Miller PJ, Afonso CL, Brown CC. 2016. Neuropathogenic Capacity of Lentogenic, Mesogenic, and Velogenic Newcastle Disease Virus Strains in Day-Old Chickens. *Veterinary Pathology* 53(1): 53–64.
- Nanthakumar T, Kataria RS, Tiwari AK, Butchiah G, Kataria JM. 2000. Pathotyping of Newcastle Disease Viruses by RT-PCR and Restriction Enzyme Analysis. *Veterinary Research Communications* 24(4): 275–286.
- Napriila ZH, Prasetyo D. 2022. Profil titer antibodi newcastle disease dan patologi anatomi ayam *layer* di peternakan ayam perseorangan, Kambingan, Malang, Jawa Timur. *Asosiasi Rumah Sakit Hewan Indonesia Veterinary Letters* 6(3): 51–52.
- Nofantri L, Berata IK, Adi AAAM. 2017. Studi Histopatologi Limpa dan Otak Ayam Terinfeksi Penyakit Tetelo. *Indonesia Medicus Veterinus* 6(5): 417–427.
- Nurmayani S, Kencana GAY, Adi AAAM, Besung INK, Suratma NA. 2023. *Avian Influenza-H5N1 dan Newcastle Diseases* pada Ayam Petelur. *Buletin Veteriner Udayana* 15(6):1086–1097.
- Rahman M, Barman L, Chowdhury E, Islam M. 2016. Detection of Newcastle disease virus of poultry by real time reverse transcription-polymerase chain reaction. *The Bangladesh Veterinarian* 33(1): 16–22.
- Rajalakshmi S. 2017. Different Types of PCR Techniques and its Applications. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 7(3): 285–292.
- Rell F, Adi AAAM, Mahardika IGNK. 2021. Analisis Filogeni Virus *Newcastle Disease* Isolat Bali Tahun 2013 Sampai 2014 berdasarkan Sekuen Daerah Pemotongan Protein Fusion. *Buletin Veteriner Udayana* 13(1): 67–74.
- Rell F, Adi AAM, Mahardika IGNK. 2015. Virulensi Shafi M, Jan S, Basher A, Showkat AS, Shabir S, Mir MS, Kamil SA, Shah F, Mudasir S. 2023. Clinico-Pathological Assessment of Naturally Occurring Newcastle Disease in Broiler Chicken Reared in Northern Himalayas. *The Pharma Innovation Journal* 12(8): 1436–1449.
- Shalaby SM, Awadin WF, Hamed MF, El-Tholoth M, Ibrahim I, El-Shaieb AF. 2021. Pathological and Ultrastructural Characteristics of Newcastle and Pox Diseases in Naturally Infected Pigeons in Egypt. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 9(11): 1995–2004.
- Susanti WG, Wicaksono A, Basri C. 2021. Kejadian Kasus Penyakit *Newcastle* di Peternakan Ayam Buras di Kabupaten Barru. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia* 26(3): 379–385.
- Zhang D, Ding Z, Xu X. 2023. Pathologic Mechanisms of the Newcastle Disease Virus. *Viruses* 15(4): 1–18.