

BAB 2

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

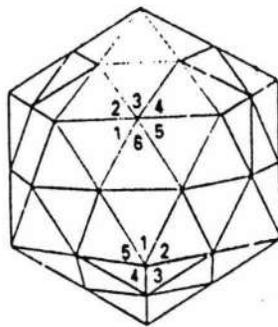
2.1. Virus *Egg Drop Syndrome 1976* (EDS'76)

EDS'76 termasuk famili *Adenoviridae*, genus *Aviadenovirus* yang tidak mempunyai spesifik antigen, spesies *Duct Adenovirus*. Isolasi dari *adenovirus* dan partikel yang menyerupai *adenovirus* pada vertebrata lain telah dilaporkan, tetapi belum dibuat klasifikasi secara formal. Serotipe dari *adenovirus* ditentukan dengan uji serum netralisasi (SN) pada biakan jaringan dengan menggunakan antisera hewan. Dalam uji tersebut, serotipe satu dengan serotipe *adenovirus* yang lain tidak diperbolehkan adanya reaksi silang (ratio titer homolog atau heterolognya tidak boleh lebih dari 16 dalam dua arah). Bila terdapat titer antara 8 - 16 dalam dua arah, serotipe dapat ditentukan bila tidak terjadi reaksi silang menurut uji hambatan hemaglutinasi (*Haemagglutination Inhibition* = HI test), atau harus ada perbedaan yang jelas pada sifat biophysik/biokimia DNA dari masing-masing *adenovirus* (Wigand et al., 1982). Variasi galur dalam serotipe ditentukan dengan analisa restriksi DNA (Wadell, 1984). Secara morfologi, replikasi dan susunan kimia, EDS'76 digolongkan sebagai *adenovirus* tetapi tidak mempunyai kelompok antigen dari *avian adenovirus* (McFerran et al., 1978^a yang dikutip oleh McFerran (1997). Adair et al. (1979) yang dikutip oleh McFerran (1997) juga menunjukkan tidak adanya reaksi silang antara EDS'76 dengan 11 prototipe *avian adenovirus* dan dua prototipe *adenovirus* kalkun dengan menggunakan uji SN dan uji HI. Menurut Darbyshire et al. (1981^a) yang dikutip oleh McFerran (1997) hanya dikenal satu serotipe.

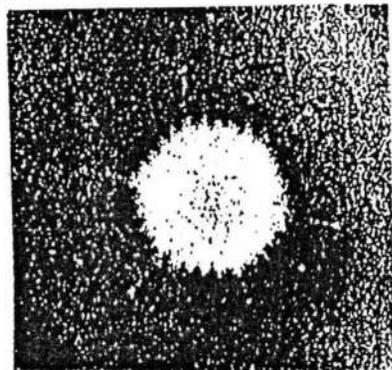
adenovirus yaitu EDS'76.

Virus EDS'76 menurut susunan kimianya terdiri dari DNA dan mempunyai 13 struktur polipeptida. Paling sedikit tujuh dari polipeptida ini ada kaitannya dengan polipeptida dari *avian adenovirus* tipe 1 (Phelps) (Tood and McNulty, 1978; Adair et al., 1979^b; Yamaguchi et al., 1981^a yang dikutip oleh McFerran, 1997)

Ukuran EDS'76 berkisar antara 76 nm (McFerran et al., 1978^b) sampai dengan 80 nm dengan variasi lima nm (Kraf et al., 1979) yang dikutip oleh McFerran (1997). Virion ini tidak berkapsul, berbentuk ikosahedral (gambar 1) dengan permukaan segitiga dan pada sudutnya terdapat enam kapsomere dengan satu *fiber* ukuran 25 nm yang diprojektikan dari tiap *vertex* atau ujung (gambar 2).



Gambar 1. Bentuk Skematis Icosahedral *Adenovirus* (Lodish et al., 1995.)



Gambar 2. *Adenovirus* Dengan Serabut (*Fiber*) Pada Tiap *Vertex* (Lodish et al., 1995. Gambar Dari Valentine dan Robley)

Virus bereplikasi pada nukleus, sama seperti pada sub kelompok I *avian adenovirus*, dan pada *adenovirus* manusia tipe V (Boyer et al., 1959; Adair, 1978; Adair et al., 1979^b yang dikutip oleh McFerran, 1997). Inklusi intranukleus dapat dilihat dengan pewarnaan *Hematoxilin* dan *Eosin* dalam biakan jaringan yang terinfeksi (Adair et al., 1979 yang dikutip oleh McFerran, 1997) dan dalam sel epitel *uterus*, *isthmus* dan *vagina* pada ayam percobaan yang terinfeksi (Taniguchi et al., 1981). Pada potongan tipis partikel virus kelihatan jelas dalam nukleus seperti *adenovirus* yang lain (Adair et al., 1979^b yang dikutip oleh McFerran, 1997)

Virus EDS⁷⁶ diketahui mempunyai daya tahan terhadap kloroform, eter; pH 3 - 10; tetap hidup pada pemanasan 56⁰C selama tiga jam; inaktif pada pemanasan 60⁰C selama tiga jam dan tetap stabil pada monovalen kation tetapi tidak pada divalen (Adair et al., 1979^b; Meulemans et al., 1979; Yamaguchi et al., 1981^a yang dikutip oleh McFerran, 1997). *Hemagglutinin* sangat stabil namun rusak pada suhu 70⁰C selama 30 menit dan tetap aktif dalam waktu lama pada suhu 4⁰C (McFerran, 1997). Swain et al., (1992) meneliti isolat EDS⁷⁶ yang diisolasi dari kumpulan ayam petelur yang mengalami penurunan produksi, ternyata tahan terhadap pemanasan 56⁰C, Eter, Kloroform, pH 3 dan tripsin, tetapi tidak tahan dengan formalin 3%. Inaktivasinya tidak stabil dengan adanya 1 M MgCl₂. Zsak et al., (1982), dalam percobaannya menggunakan formalin 0,2 % untuk inaktivasi EDS⁷⁶ galur B8/78. Ram Kumar et al., (1991), menemukan isolat EDS⁷⁶ (EDSV IV KI/AD-86, EDSV-01/AD-86 dan EDSV-20/AD-86) yang diisolasi dari feces sekawanan

burung yang sedang bertelur, ternyata tetap menunjukkan aktifitas hemaglutinasi (HA) setelah diberi perlakuan dengan 10% kloroform, dan tidak kehilangan infektifitasnya. Virus dapat melalui membran filter dengan ukuran 100 nm atau lebih dan tetap stabil pada pH asam (3) dan temperatur 56°C selama 30 menit. Rozhdestvenskii, (1984), dalam penelitiannya mendapatkan bahwa virus yang dipropagasi dari embrio bebek dinaktifkan pada temperatur $60 - 70^{\circ}\text{C}$ dalam waktu 10-40 menit, dengan penambahan formalin 0,05 - 1 % selama 24 - 48 jam dan *ethyleneimine* 0,01 - 0,013% selama 3 - 72 jam pada 37°C . Penggunaan *ethyleneimine* 0,2 % selama 3 jam merupakan metoda paling baik untuk mempertahankan aktifitas HA yang stabil. LU, et al., (1985), dalam percobaannya mendapatkan bahwa antigen hemaglutinasi yang dipersiapkan dari embrio bebek dan dinaktifkan dengan formalin 0,2 %, tetap mempunyai titer yang stabil, paling tidak untuk jangka waktu satu tahun pada temperatur penyimpanan 4°C .

2.2. Media Pertumbuhan Virus

Pengembangan virus EDS'76 dengan menggunakan berbagai media telah banyak diteliti untuk tujuan diagnosa, uji serologis maupun produksi vaksin. Menurut Adair et al. 1979^{a)} yang dikutip oleh McFerran (1997), indikator yang paling sensitif untuk mendeteksi virus yaitu TBB atau Telur angsa bertunas (TGB) dari kelompok bebas EDS'76 dan biakan sel dari bebek atau angsa. Apabila tidak tersedia sel dari media tersebut, dapat digunakan *Chicken Embryo Lever* (CEL). CEL ini ternyata lebih sensitif dari *Chicken Kidney*

Cell (CKC), sedangkan *Chicken Embryo Fibroblast* (CEF) tidak sensitif dan TAB tidak sesuai untuk pertumbuhan virus. Keuntungan penggunaan biakan sel embrio bebek atau angsa dan TBB atau TGB yaitu di samping lebih sensitif, beberapa virus tidak dapat tumbuh dalam media ini. Selanjutnya Adair et al. (1979^b) yang dikutip oleh McFerran (1997) mengemukakan bahwa EDS'76 paling baik tumbuh pada ginjal itik, hati embrio itik, sel fibroblas itik, sel hati ayam; kurang baik pada sel ginjal ayam; sedikit tumbuh pada kalkun dan tidak ada perkembangan pada sel mamalia. Zsak et al. (1981) mengemukakan bahwa EDS'76 tumbuh dengan titer tinggi pada biakan sel angsa. Menurut Yamaguchi et al. (1981^a) yang dikutip oleh McFerran (1997), EDS'76 galur JPA 1 tumbuh subur dan mencapai puncak pertumbuhan bila ditanam pada CEL dari pada bila ditanam pada CKC yang dibuktikan terhadap infektifitas dan produksi hemaglutininnya. Virus intraseluler dan ekstraseluler mulai meningkat secara logaritmis antara 16 - 18 jam setelah infeksi dan berturut-turut mencapai titer $10^{9,2}$ dan $10^{8,5}$ PFU/ml pada 48 jam setelah infeksi. Hemaglutinin intraseluler mulai muncul setelah 18 jam dan mencapai puncak (10.240 HA) pada 48 jam, sedang ekstraseluler hemaglutinin mulai muncul pada 72 jam setelah infeksi. Intensitas fluoresensi antigen intranukleus mulai kelihatan dari 16 jam setelah infeksi. Peneliti lain menyebutkan bahwa pertumbuhan virus sangat tinggi pada telur bebek bertunas dan telur angsa bertunas dengan titer 1/16.000 sampai 1/32.000 dan tidak ada pertumbuhan pada telur ayam bertunas (Adair et al., 1979^b) dan Zsak et al., 1992 yang dikutip oleh McFerran,



1997). Tsai et al. (1983), melaporkan bahwa EDS'76 galur TN bila ditanam pada *Duct Embryo Lever* (DEL) dan diinkubasikan pada temperatur 37⁰C, menunjukkan titer HI 64, 128 dan dua kali lebih tinggi dari pada bila ditanam pada *Duct Embryo Fibroblast* (DEF), *Goose Embryo Fibroblast* (GEF), *Duct Kidney Cell* (DKC). Virus dalam nukleus DEL terlihat pertama kali dengan FAT pada 19 jam setelah infeksi. Kultur virus pada DEF yang dieramkan pada temperatur 40⁰C menghasilkan puncak pertumbuhan lebih dini, tetapi titer virus kurang persisten dibanding pada virus yang dieramkan pada temperatur 37⁰C. Kumar et al., (1985) mendapatkan bahwa isolasi EDS'76 dari sampel feces dapat diadaptasikan dengan mudah pada DEF, sedang aktifitas HA dideteksi pertama kali pada hari ke enam setelah infeksi dan mencapai puncak pada hari ke 11 setelah infeksi. Swain et al., (1993) membuktikan bahwa EDS'76 paling baik tumbuh pada CEL primer, kurang baik pada DEL, DEF dan CEK. Sitopatogenik efek dari CEL ditandai dengan adanya sel besar dan refraktil dan terlepas dari permukaan gelas. Inklusi bodi intranukleus eosinofil dideteksi antara 24 - 48 jam setelah infeksi. Tidak ada multiplikasi pada *Quail Embryo Fibroblast* (QEF) primer, CEF atau sel mamalia seperti *African Green Monkey Kidney* (Vero), *Baby Hamster Kidney* (BHK) dan *Mardin Darby Bovine Kidney* (MDBK). Pertumbuhan virus maksimal dicapai pada embrio bebek dengan titer HI paling tinggi pada alantoisnya, diikuti oleh membran *chorio allantois*, kulit, dan organ dalam. Pada embrio burung puyuh tidak menunjukkan adanya perkembangan virus.

2.3. Serologi

Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI) adalah satu-satunya pilihan untuk mempelajari virus ini. Antigen dapat disiapkan dari TBB atau biakan sel. Titer HA yang tinggi diperoleh bila menggunakan TBB, namun bisa lebih tinggi (ratusan) bila diinokulasikan pada chicken embryo liver. Uji HI yang tepat yaitu dengan menggunakan antigen empat HA unit. Pengenceran mulai 1 : 4 dengan 0.5 % sel darah merah ayam. Virus akan mengaglutinasi sel darah merah ayam, angsa, dan bebek tetapi tidak pada mamalia. Bila hemaglutinin non spesifik terdapat dalam serum, dapat dihilangkan dengan 10 % sel darah merah yang homolog. Untuk uji Serum Netralisasi (SN) digunakan *Tissue Culture Infection Dose 50* (TCID)₅₀ selama satu jam pada temperatur 37⁰C dan biakan jaringan ayam atau bebek sebagai indikator yang sensitif dan spesifik. Pada biakan jaringan Ayam sering membantu dalam pembacaan bila dilakukan uji hemaglutinasi dari supernatannya dari pada melihat sitopatologik efeknya. Uji SN hanya diperlukan untuk menguatkan hasil uji HI yang meragukan atau menyimpang dari biasa seperti pada program eradikasi atau deteksi antibodi HI pada spesies baru. Uji *Indirect Fluorescent Antibodi* (IFA) setidaknya sama sensitifnya dengan Uji HI. Uji *Double Immunodifussion* (DID) juga telah digunakan tetapi kemungkinan kurang sensitif dibanding uji HI (Darbyshire dan Peter, 1980 yang dikutip oleh McFerran, 1997). Banyak kelompok burung yang tidak menunjukkan antibodi selama masa pertumbuhan dan hanya jelas kelihatan langsung mengikuti perubahan telur. Oleh karena itu uji negatif serologis tidak memberikan jaminan bahwa burung

bebas infeksi. Namun bila ditemukan adanya penurunan produksi dari sebagian besar kawanan burung, hampir semua burung menunjukkan adanya titer antibodi dalam tubuhnya. Kemungkinan penyebabnya adalah virus tersebut menunggu saat yang tepat untuk merefleksikan kemampuannya menyebar secara lateral. Dalam keadaan ini harus hati-hati memilih sampel, karena ada kemungkinan kesalahan hasil negatif akan ditemukan. Dalam suatu percobaan, antibodi dapat dideteksi dengan uji IFA dan HI dalam selang waktu 5 - 6 hari setelah infeksi. Sedangkan pada uji SN dan DID, antibodi terlihat setelah selang waktu 6 - 9 hari. Antibodi mencapai puncaknya kurang lebih 4 - 5 minggu. Uji imunopresipitasi (DID) jarang digunakan dibanding dengan yang lain. Didapatkan data bahwa burung masih mengeluarkan virus dalam keadaan antibodi tinggi pada uji HI, tetapi sebaliknya ada beberapa yang walaupun terdeteksi mengeluarkan virus, gagal mengembangkan antibodi (Cook dan Darbyshire, 1981 yang dikutip McFerran, 1997). Antibodi diturunkan melalui yolk sac (kantong kuning) telur yang pada saat itu induknya mempunyai titer antibodi tinggi terhadap uji HI ($\text{GMT } 8 - 9 \log 2$). Antibodi ini mempunyai *half life* 3 hari. Produksi antibodi secara aktif tidak distimulasi sampai ayam berumur antara 4 - 5 minggu sedangkan maternal antibodi hampir tidak terdeteksi (Darbyshire dan Peter, 1980 yang dikutip oleh McFerran, 1997). Tidak diketahui apakah ayam tersebut tidak mempunyai respon terhadap infeksi atau ayam menjadi karier.

Untuk menentukan adanya virus EDS'76, tidak cukup hanya dengan melihat kematian embrio dan adanya sitopatogenik efek, tetapi harus memeriksa alantois dan supernatan dari biakan sel dengan eritrosit 0.8 % untuk mengetahui adanya hemagglutinin. Alternatif lain yaitu uji imunofluoresensi dengan menggunakan antiserum terhadap EDS'76 yang dilabel. Uji ini dapat digunakan untuk mendeteksi pertumbuhan virus dalam sel. Konjugat antiserum yang digunakan tersebut di atas tidak sesuai bila dipakai untuk mendeteksi *adenovirus* konvensional. Bila TBB digunakan untuk propagasi virus, minimum diperlukan dua kali pasase dan apabila digunakan sel ayam sekitar 2 - 5 pasase. Namun demikian, pasase yang berkali-kali akan menyebabkan pertumbuhan virus menjadi jelek, yaitu pada waktu isolasi virus yang pertama pada sel ayam. Hal ini antara lain disebabkan pengeluaran virus dari ayam tidak tentu atau sering kandungan titer virus yang dikeluarkan rendah (McFerran, 1997).

Asi et al. (1989), mendapatkan bahwa 390 ayam petelur dalam kelompok A yang mempunyai titer tinggi terhadap ND (8.6 - 15,0) log 2; EDS'76 (10.0 - 12., 3) log 2 dan IB (8,2 - 9,6) log 2, mempunyai total protein serum, albumin dan globulin berturut-turut, 5,18 + 0,7; 3,92 + 0,41; dan 1,26 + 22 g/ dl. Kejadian ini pada 151 ayam kelompok B mempunyai titer lebih rendah yaitu ND (4,8 - 7.10) log 2; EDS (3,5 - 4,8) log 2 ; IB (2,7 - 4,7) log 2 dan kandungan protein masing-masing 4,9 + 0,66; 3,88 + 0,41 dan 1,10 + 0,22 g /dl.

Shakya et al. (1991), mengemukakan bahwa adanya reaksi

silang pada uji HI dari tiga strain EDS'76 yaitu galur 127 (reference strain), galur JBP (Pune str) galur SPC (Bungalore) menyebabkan ke tiga strain tersebut sulit / tidak dapat dibedakan. Hubungan antigen juga diperlihatkan dalam *Agar Gel Precipitation* (AGP) dan *immunolectrophoreses*. Adanya garis presipitasi yang spesifik dari salah satu strain dan tidak berhubungan dengan strain yang lainnya, mengindikasikan bahwa mereka tidak homolog.

Xu et al. (1992), dalam mendeteksi antibodi EDS'76 mendapatkan bahwa titer antibodi pada uji HI dan uji AGP mempunyai korelasi yaitu titer HI 1 : 1024 sampai 1 : 2048 setara dengan titer AGP 1 : 32 sampai 1 : 64 dan titer HI 1 : 64 setara dengan titer AGP 1 : 2 sampai 1 : 4.

Jian Ming et al. (1993), mengemukakan bahwa metoda ELISA untuk mendeteksi EDS'76 pada ayam broiler dengan menggunakan *membran selulose nitrit* sebagai *carier solid phase*, ternyata sensitif, spesifik dan reproduktif. Hasil paling baik bila menggunakan satu unit antigen dan 1 : 1000 antibodi. Metoda ELISA ini lebih baik dari uji HI.

Singh et al. (1995), melaporkan (diperkirakan merupakan laporan yang pertama kali) adanya sero prevalensi EDS'76 yang dilakukan pada ayam petelur di Binhar, India. 296 serum sampel dari 17 kelompok ayam yang diuji dengan HA cepat, 50 serum (16,78 %) menunjukkan positif adanya antibodi EDS'76 yang terjadi pada semua kelompok dengan distribusi titer antibodi HA 10 - 34,78 %. Prevalensi HI paling tinggi terdapat pada kelompok umur 13 - 16 minggu dan paling rendah pada kelompok umur 25 - 28 minggu.

Titer HI bervariasi antara 1 : 4 sampai 1 : 64.

Tropical Animal Health and Production., (1995), dalam abstraknya menyebutkan bahwa 114 atau 32,9 % dari 347 serum sampel yang diambil dari 22 kelompok broiler di Binhar, India, positif mengandung antibodi EDS'76 dengan uji HI. Titer HI yang diperoleh antara 2 - 9 log₂ dengan *Geometric Mean Titer* (GMT) 3,9 log₂. 82,5 % serum memperlihatkan titer HI antara 22 - 25 dan rata-rata 23 dan semua kelompok ada yang mengandung antibodi, sedangkan prevalensi tiap kelompok terhadap titer antibodi HI adalah 13,3% sampai 46,6 %.

2.4. Tanggap Kebal Terhadap Vaksin EDS'76

Vaksin *oil adjuvant* inaktif telah banyak ditemukan yaitu pada burung umur 14 - 16 minggu. Pada burung yang baru menerima vaksinasi pertama kali akan mencapai titer HI log 8 - 9, sedangkan pada kelompok yang telah terkena infeksi sebelumnya dapat mencapai titer log 12 - 14 (Baxendale et al., 1981; Cook dan Darbyshire, 1981 yang dikutip oleh McFerran, 1997). Namun demikian, menurut pengalaman di lapangan, diperkirakan bahwa titer vaksin tidak selalu tinggi atau seragam. Vaksin akan memberikan daya tahan yang baik terhadap penyakit secara klinis dan menurunkan jumlah virus yang diekskresikan.

Lu et al. (1985), melaporkan bahwa ayam-ayam petelur dan bebek yang diberi vaksin EDS'76 *oil adjuvant* dengan inaktifan formalin 0,2 % mempunyai daya tahan yang lebih baik dibandingkan

dengan vaksin yang menggunakan ALOH sebagai adjuvan.

Ramires et al. (1987), membuktikan bahwa vaksin EDS'76 strain HPI dalam bentuk emulsi tunggal dan multi emulsi, menunjukkan respon serologi sama dengan vaksin emulsi komersial, sedangkan vaksin yang menggunakan aluminium adsorpsi menimbulkan antibodi yang lebih rendah secara menyolok.

Rhee et al. (1987), melakukan vaksinasi pada ayam umur enam minggu dengan vaksin *oil adjuvant* kombinasi ND, EDS'76, IBD inaktif yang sebelumnya telah divaksin dengan vaksin aktif dari tiga macam virus tersebut dan diaplikasikan dengan berbagai macam dosis. Ayam yang divaksin dengan 0,5 ml mempunyai tingkat antibodi yang memuaskan terhadap virus ND, EDS'76 dan IBD dibandingkan dengan ayam kontrol. Namun ditemukan adanya perdarahan dan pengumpulan seperti nanah pada sisi sekitar tempat suntikan, bahkan ditemukan juga pada ayam yang disuntik dengan dosis terendah 0,25 ml. Data juga menunjukkan bahwa kekebalan yang ditimbulkan pada ayam komersial adalah enam bulan.

Kozlina et al. (1990), membandingkan vaksin ganda (polyvirol 3) ND, EDS'76 dan IB dengan vaksin tunggalnya. Percobaan dibagi dalam empat kelompok yaitu kelompok yang mendapatkan vaksin ganda; vaksin ND; vaksin EDS; dan vaksin IB. Tiap kelompok terdiri dari 20 ekor ayam petelur umur 18 minggu yang telah mendapatkan vaksinasi aktif (ND, EDS, IB). Hasil percobaan menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan titer antibodi yang berarti dari tiap kelompok dalam waktu lebih dari 30 minggu dan semua ayam yang mendapatkan vaksinasi ND baik tunggal maupun ganda

tetap hidup setelah ditantang dengan virus ND ganas.

Standarisasi uji HI telah dilakukan terhadap vaksin EDS'76 dan penentuan daya tahan antibodi pada ayam petelur. Dalam percobaan ini, ayam petelur umur 16 minggu disuntik dengan vaksin ND inaktif dan EDS'76 intra muskuler, dan sebagai kontrol ayam disuntik dengan vaksin ND saja. Untuk mengetahui titer antibodi digunakan uji HI dengan antigen EDS'76 galur BC14. Ayam dibagi dalam tujuh kelompok masing-masing 25 ekor dan kontrol lima ekor. kemudian ditantang dengan EDS'76 galur BC 14 pada minggu ke 20, 27, 34, 41, 48, 55, dan 62. Hasil yang didapat yaitu bahwa ayam yang divaksin dan mempunyai titer $0,5 \log 2$ ternyata memproduksi telur dengan kulit tipis atau tanpa kulit, namun kualitas telur kembali normal setelah 18 sampai 20 hari pasca tantang. Ayam yang mempunyai titer $6 \log 2$ lebih resisten terhadap tantangan (Asi dan Lyisan, 1990).