

## PENEGUHAN DIAGNOSA DENGAN TEKNIK *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) DAN SEKUENSING DNA TERHADAP TEMUAN PATOLOGI *INCLUSION BODY HEPATITIS* (IBH) PADA KASUS KEMATIAN BROILER DI KABUPATEN KULON PROGO, YOGYAKARTA

Zaza Famia<sup>1</sup>, Dewi Pratamasari<sup>1</sup>, Hendra Wibawa<sup>1</sup>, Dwi Sulistyorini<sup>2</sup>, Bagoes Poernadjaja<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Balai Besar Veteriner Wates

<sup>2</sup> Pos Kesehatan Hewan Kecamatan Galur, Dinas Pertanian dan Pangan Kabupaten Kulon Progo  
E-mail: miroroh@yahoo.co.id; drhzazafamia2@gmail.com

### ABSTRAK

Penyakit *Inclusion Body Hepatitis* (IBH) disebabkan oleh infeksi *Fowl adenovirus* (FAdVs). Virus ini masuk dalam kelompok *Avian Adenovirus I* (AAV-I) yang memiliki 12 serotype (1-11) dan 5 spesies group (A-E). Telah dilaporkan kasus kematian di atas 10% di salah satu peternakan unggas ayam pedaging (broiler) di Kecamatan Galur, Kabupaten Kulon Progo, Yogyakarta pada bulan April Tahun 2018. FAdVs diduga sebagai salah satu agen penyakit yang menyebabkan kasus kematian pada broiler disertai perubahan anatomi jaringan terutama pembesaran hati dan ciri patologis *inclusion body hepatitis* (IBH) sehingga sering disebut sebagai virus IBH. Dugaan ini berdasarkan keterangan peternak, pengamatan gejala klinis dan penilaian pola kematian oleh dokter hewan dinas, serta hasil pemeriksaan patologi anatomi dan histopatologi di Laboratorium Patologi, BBVet Wates. Namun, data dan hasil pengamatan/pemeriksaan ini perlu dikonfirmasi dengan pengujian yang lebih mendekati ketepatan diagnosa, salah satunya dengan uji biologi molekuler *polymerase chain reaction* (PCR). Teknik PCR dengan menggunakan primer-primer spesifik yang digunakan untuk deteksi gen penyandi antigen permukaan (*Hexon*) dari FAdVs. Sampel yang diuji berasal dari kiriman petugas Pos Kesehatan Hewan (Poskeswan) Galur dari Dinas Pertanian dan Pangan Kabupaten Kulon Progo. Sampel yang dikirim berupa organ/jaringan dari ayam broiler yang menderita sakit atau baru saja mati, antara lain organ: hati, proventriculus, gizzard, ginjal, dan usus yang diambil dari kasus kematian unggas broiler di Desa Banaran, Kecamatan Galur. Hasil pengujian PCR dari organ-organ tersebut menunjukkan produk amplifikasi dari primer-primer *Hexon* yaitu pita/band DNA spesifik dengan panjang kurang lebih 897-bp. Produk PCR berhasil disekuensing dan hasil blast analysis menunjukkan **positif FAdV Group E Serotype 8b**. Hasil ini meneguhkan pemeriksaan sebelumnya yang telah mendeskripsikan perubahan anatomi dan histologi (patologi dan histopatologi) organ hati yang mencirikan penyakit IBH.

Kata kunci: *Inclusion Body Hepatitis* (IBH), *Fowl adenovirus* (FAdVs), *Polymerase Chain Reaction* (PCR), DNA sekuensing,

### PENDAHULUAN

Penyakit unggas merupakan salah satu faktor yang penting dalam sektor perunggasan. Perkembangan penyakit unggas di lapangan cukup bervariasi dan dapat memberikan dampak yang buruk terhadap sektor perunggasan. Beberapa tahun terakhir telah terjadi kasus kematian tinggi pada unggas broiler yang diduga disebabkan oleh infeksi *fowl adenovirus* (FAdVs) yang menyebabkan penyakit IBH (*Inclusion Body Hepatitis*). Virus ini masuk dalam kelompok *Avian Adenovirus I* (AAV-I) yang memiliki 12 serotype (1-11) dan 5 spesies group (A-E). Sebagian besar kasus IBH disebabkan oleh FAdV Serotype 2, 9, 11 (Group D) dan Serotype 8a dan 8b (Group E). Unggas yang rentan terhadap penyakit IBH adalah unggas ayam muda (4-8 minggu), kalkun, itik, angsa dan puyuh. Pada broiler, kasus dapat terjadi pada umur 2-4 minggu (Monleon, 2014).

Patologi anatomi pada hati menunjukkan perdarahan ptechiae, hati membesar, pucat kekuningan dan rapuh. Secara mikroskopik pada sel hati terdapat benda inklusi intranuklear yang dapat bersifat eosinofilik atau basofilik dan solid (Randall, 1985). Penyakit IBH pertama kali muncul di USA pada tahun 1963. Setelah itu banyak kasus IBH terjadi di berbagai negara (Rahimi and Haghghi, 2015; Akoso, 1993). Di Indonesia sendiri pertama kali dilaporkan di Jawa (Kabupaten Semarang) dan DKI Jakarta pada tahun 1985 (Akoso, 1993).

Balai Besar Veteriner Wates menerima sampel yang berasal dari kasus kematian di salah satu peternakan unggas ayam pedaging (broiler) di Kecamatan Galur, Kabupaten Kulon Progo, Yogyakarta pada bulan April Tahun 2018 (No. Contoh 04180627). FAdVs diduga sebagai salah satu agen penyakit yang menyebabkan kasus kematian pada broiler disertai perubahan anatomi jaringan terutama pembesaran hati dan ciri patologis IBH. Dugaan ini berdasarkan keterangan peternak, pengamatan gejala klinis dan penilaian pola kematian oleh dokter hewan dinas/swasta, serta hasil pemeriksaan patologi anatomi dan histopatologi di Laboratorium Patologi, BBVet Wates (Pratamasari, 2018). Namun, data dan hasil pengamatan/pemeriksaan ini perlu dikonfirmasi dengan pengujian yang lebih mendekati ketepatan diagnosa, salah satunya dengan uji biologi molekuler *polymerase chain reaction* (PCR) dengan primer-primer spesifik untuk deteksi dan identifikasi virus virus IBH. Pada bulan April 2019 produk hasil uji PCR No. Contoh 04180627 selanjutnya dilakukan identifikasi lebih lanjut untuk *genetic grouping* dengan teknik sekuensing DNA. Walaupun bersifat uji konfirmasi, di dalam laporan ini dipaparkan secara *Lab-Field Report*, sehingga dalam laporan ini dilengkapi data-data lapangan dan hasil uji laboratorium untuk penegakan diagnosa kasus.

## TUJUAN

Penelitian ini bertujuan untuk peneguhan diagnosa pada dugaan kasus IBH setelah dilakukan pemeriksaan patologi anatomi dan histopatologi di Laboratorium Patologi, BBVet Wates dengan menggunakan teknik PCR dan sekuensing DNA.

## MATERI DAN METODE

### Materi

Materi pengujian berupa sampel organ ayam (No. Contoh Sampel: 04180627) yang berasal dari surveilans pasif kiriman dari peternakan ayam komersial (ayam broiler) di Desa Banaran, Kecamatan Galur, Provinsi Yogyakarta. Ayam dinekropsi dilapangan kemudian diambil organnya (hati, proventriculus, gizzard, ginjal, dan usus) dan dikirim oleh petugas Pos Kesehatan Hewan (Poskeswan) Galur dari Dinas Pertanian dan Pangan Kabupaten Kulon Progo ke laboratorium BBVet Wates untuk pemeriksaan histopatologi dan uji konfirmasi PCR IBH.

## Pengolahan Lapangan

Data dan informasi dari lapangan dimasukkan ke dalam form penerimaan contoh, kemudian dimasukkan ke dalam sistem terpadu penerimaan, pengujian dan penjawaban sampel (Si-Lab), dan untuk selanjutnya sampel-sampel dikirim ke beberapa laboratorium pengujian

## Metode

Metode pengujian menggunakan teknik *end-point* PCR dengan tahapan ekstraksi DNA/RNA dimana pada tahap ini dikerjakan di BSC class II laboratorium Bioteknologi dengan cara kerja sesuai prosedur Viral Nucleic Acid Kit II (Geneaid. Cat No. VR050 ). Sampel organ di gerus dan dipool. DNA hasil ekstraksi langsung digunakan untuk pengujian PCR. Tahap mastermix menggunakan prosedur HotStarTaq master mix kit (Qiagen cat no. 203443). Adapun primer yang digunakan yaitu Primer Forward Hexon A (5'-CAARTTCAGRCAGACGGT-3') dan Primer Reverse Hexon B (5'-TAGTGATGMCGSGACATCAT-3') (Meulemans *et al.*, 2001)

Kondisi siklus PCR berdasarkan Meulemans *et al.*, (2001) dengan modifikasi yang dilakukan di BBVet Wates (Drh. Hendra Wibawa, PhD, komunikasi personal) sebagai berikut: denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari 94°C 1 menit, annealing 60°C 1 menit dan ekstensi 72°C 30 detik, diakhiri dengan ekstensi DNA 72°C selama 2 menit. Produk hasil PCR untuk selanjutnya divisualisasikan di dalam 2% agarose. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya band yang berwarna biru dengan ukuran produk yang sesuai yaitu adalah 897 bp (Meulemans *et al.*, 2001). Selanjutnya, produk DNA dilakukan sekuensing menggunakan primer-primer yang sama seperti yang digunakan untuk PCR. Hasil sekuensing selanjutnya dianalisa dengan BLAST untuk melihat homologi susunan DNA dengan rujukan global di dalam GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kasus Penyakit dan Kematian

Berdasarkan informasi dan data yang diperoleh di bagian penerimaan contoh Laboratorium Epidemiologi BBVet Wates, kasus kematian terjadi pada peternakan unggas broiler milik Bp. Suharno yang berlokasi di Dusun Trisik, Desa Banaran, Kecamatan Galur, Kabupaten Kulon Progo pada bulan April 2018. Tanda klinis yang terlihat adalah ayam depresi, tidak mau makan, demam, abdomen bengkak kebiruan dan kematian. Tanda klinis pertama terlihat pada tanggal 7 April 2018 atau saat ayam berumur 18 hari. Populasi awal broiler adalah 2000 ekor.

Kerangka waktu kejadian penyakit dan kematian adalah sebagai berikut:

Aktivitas/ Umur Ayam	Kematian (ekor)
DOC datang / 1 hari	0
18 hari (07/04/2018)	75
19 hari (08/04/2018)	35
20 hari (09/04/2018)	Tidak ada catatan
21 hari (10/04/2018)	75 ekor
22 hari (11/04/2018)	40 ekor
23 hari (12/04/2018)	Tidak ada catatan
24 hari (12/04/2018): Sampel dikirim ke BBVet Wates	Tidak ada catatan

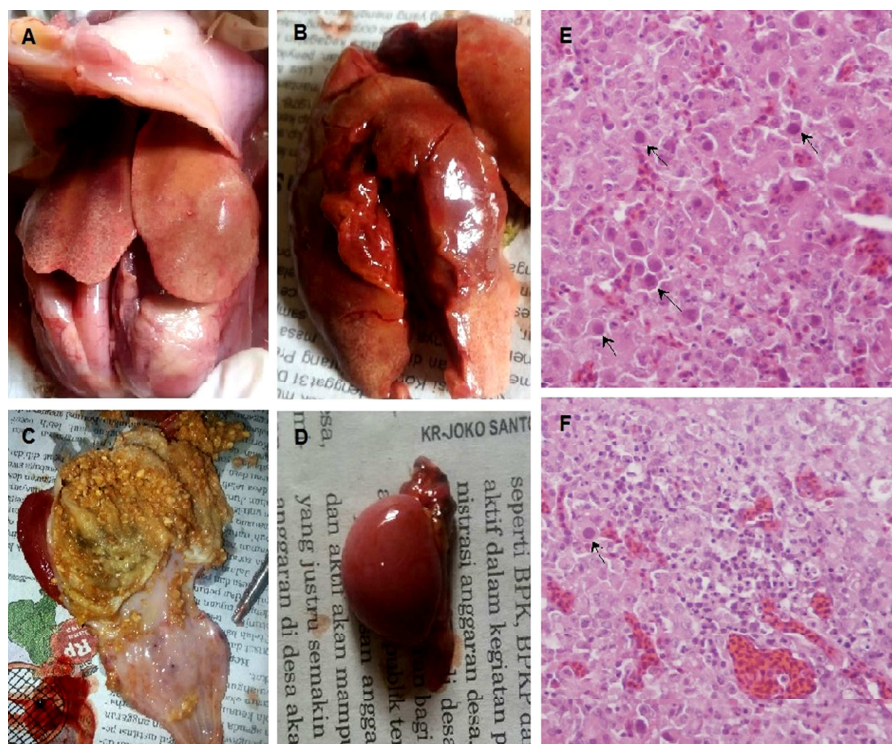
Berdasarkan keterangan peternak, ayam mendapatkan vaksinasi ND dan IB pada umur 4 hari. Sumber air berasal dari sumur, pakan berasal dari pabrik (pakan jadi), peternakan memiliki pagar dan tidak berlokasi di dekat dengan aliran air/sungai dan berjarak sekitar 3 KM dari tempat pemotongan unggas. Peternak pernah berkunjung ke peternakan lain yang berjarak 30 meter dari lokasi peternakannya. Peternak kurang memperhatikan aspek-aspek biosekuriti peternakan. Hal ini berdasarkan informasi dan data yang diperoleh pada form penerimaan contoh antara lain bahwa peternak:

- Jarang atau tidak pernah melakukan semprot kandang dengan desinfektan
- Akses pengunjung ke kandang/peternakan tidak dibatasi
- Tidak ada tindakan karantina terhadap unggas baru/sakit
- Pernah mengunjungi peternakan lain yang terjadi kasus penyakit yang sama sebelumnya.

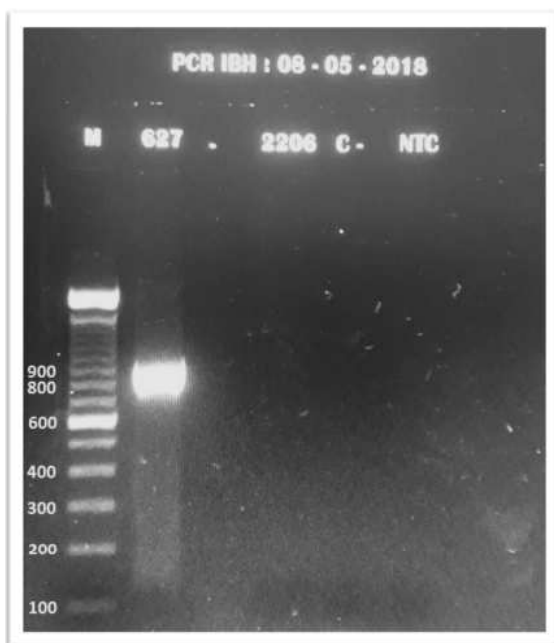
### **Peneguhan Diagnosa Patologis dengan Teknik PCR dan Sekuensing DNA**

Uji PCR pada sampel No. 04180627 dilakukan untuk meneguhkan diagnosa dugaan infeksi FAdVs yang menyebabkan perubahan anatomi organ hati dan adanya temuan dengan ciri IBH secara histopatologi. Sampel yang diterima dari petugas Poskeswan galur, ciri organ yang terinfeksi yang nampak paling jelas adalah adanya perubahan anatomi pada organ hati. Hati terlihat membengkak/membesar, lebih pucat, rapuh dan nampak adanya pendarahan titik (*petechiae*) yang menyebar (Gambar 1A-1B). Tidak nampak jelas apakah ada kerusakan jaringan pada gizzard karena tertutup makanan), tetapi spot-spot kecil pendarahan pada proventriculus ditemukan (Gambar 1C) dan limpa nampak lebih pucat (Gambar 1D). Organ-organ yang menunjukkan perubahan patologi anatomi yang menciri, terutama hati, selanjutnya dilakukan pemeriksaan histopatologi di Laboratorium Patologi BBVet Wates untuk mendeteksi secara mikroskopis ada tidaknya abnormalitas jaringan. Hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan adanya benda inklusi di dalam inti sel hati (*hepatocyte*) pada jaringan yang menunjukkan peradangan (Gambar 1E-1F) dimana fenomena ini dikenal

dengan istilah *inclusion body hepatitis* (IBH). Menurut Dinev (2014) dan Randall (1985) perubahan patologi anatomi pada hati menunjukkan perdarahan ptechiae, hati membesar, pucat kekuningan dan rapuh. Secara mikroskopik pada sel hati terdapat benda inklusi intranuklear yang dapat bersifat eosinofilik atau basofilik dan solid dimana secara mikroskopis ditemukan adanya benda inklusi intranuklear yang bersifat eosinofilik dengan *halo* disepertar nucleus, multifokal nekrotik hepatitis dan dapat disertai perdarahan hemoragik (Pratamasari, 2018). Lesi nekrosis pada hati dapat disebabkan oleh infeksi penyakit viral (Jubb, Kennedy, and Nigel, 1985). Sampel No. 04180627 menunjukkan perubahan anatomi organ hati dan adanya temuan dengan ciri IBH secara histopatologi di Laboratorium Patologi BBVet Wates maka dilanjutkan pengujian PCR di laboratorium Bioteknologi BBVet Wates.



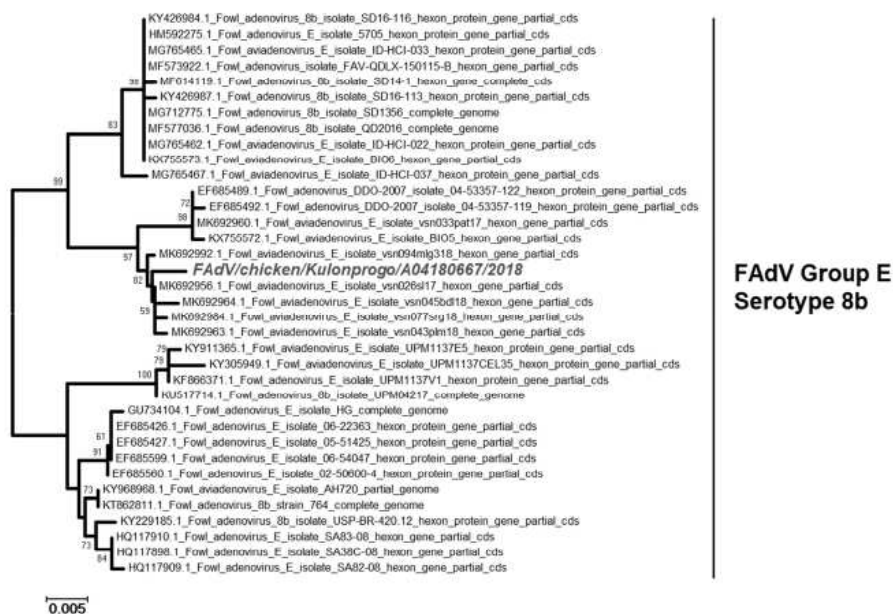
Gambar 1. Perubahan anatomi dan patologi organ visceral dan jaringan dari sampel (No.Sampel 04190627) yang diduga akibat infeksi virus IBH pada kasus kematian ayam broiler di Desa Banaran, Kecamatan Galur, Kabupaten Kulon Progo pada Bulan April 2018. Organ hati nampak lebih pucat dan terlihat bintik-bintik pendarahan (A) dan terjadi pembengkakan/pembesaran yang bersifat rapuh (B). Ditemukan spot/bintik pendarahan pada proventriculus (C) dan kepucatan pada organ limpa (D). Inklusi intranukleous (tanda panah pada E dan F) ditemukan disekitar lesi peradangan (F).



Gambar 2. Hasil PCR sampel-sampel diduga IBH. Keterangan: M (Marker DNA), 627 (No. Contoh 04180627), 628 (No. Contoh 04172206), C - (Kontrol Negatif), NTC (non template control).

Pada pengujian PCR, primer-primer spesifik yang digunakan adalah untuk deteksi gen penyandi antigen permukaan (*Hexon*) dari FAdVs dengan menggunakan kondisi reaksi PCR sebagaimana telah dipublikasi sebelumnya (Meulemans *et al.*, 2001). Hasil PCR dari Sampel 627 (No. Contoh 04180627) menunjukkan produk amplifikasi dari primer-primer Hexon yaitu pita/*band* DNA spesifik dengan panjang kurang lebih 897-bp (Gambar 2) sebagaimana yang telah dibuktikan sebelumnya dalam literatur (Meulemans *et al.*, 2001).

Dalam Gambar 2 juga ditunjukkan hasil PCR dari Sampel 2206 (No. Contoh 04172206), namun menunjukkan hasil negatif dimana pita DNA spesifik 897-bp tidak terdeteksi. Perbedaan hasil ini dapat dipengaruhi oleh sumber ekstraksi DNA yang berbeda terhadap dua sampel tersebut dimana sumber ekstraksi Sampel 627 berasal dari organ segar (organ hati yang menunjukkan pembengkakan/ peradangan dan organ visceral seperti proventriculus, gizzard, ginjal, dan usus), sedangkan sumber ekstraksi sampel 2206 berasal dari jaringan hati yang telah difiksasi dengan formalin yang mungkin dapat menyebabkan kerusakan DNA sehingga terjadi permasalahan/hambatan dalam reaksi PCR. Hasil PCR di atas mengkonfirmasi hasil pengujian histopatologi yang menunjukkan adanya temuan patologi yang menunjukkan adanya pembengkakan dan peradangan hati serta adanya *intranuclear inclusion body*.



Gambar 3. Pohon Filogenetik berdasarkan gen Hexon IBH sepanjang 897 bp untuk penentuan kelompok genetik FAdV

Produk hasil uji PCR no Sampel 627 (No. Contoh 04180627) selanjutnya dilakukan identifikasi lebih lanjut oleh staff laboratorium Bioteknologi BBVet Wates (drh Hendra Wibawa, Ph.D) untuk *genetic grouping* dengan teknik sekuensing DNA pada bulan April 2019. Hasil sekuensing DNA dilanjutkan analisis BLAST dan phylogenetic menunjukkan positif FAdV Group E Serotipe 8b.

Di Iran telah terisolasi FAdV group E serotipe 8b dari kasus IBH pada *farm* broiler dan *breeder* selama kurun waktu 2013 – 2016 (Morshed *et al.*, 2017). Di Malaysia ditemukan juga FAdV grub E serotipe 8b pada bulan Desember 2015 pada ayam broiler (Norina *et al.*, 2016).

## KESIMPULAN DAN SARAN

Teknik PCR dapat mendeteksi adanya infeksi *fowl adenovirus* (FAdV) dari kasus IBH pada peternakan broiler di Desa Banaran, Kecamatan Galur, Kulon Progo. Hasil ini meneguhkan pemeriksaan sebelumnya yang telah mendiskripsikan perubahan anatomi dan histologi (patologi dan histopatologi) organ hati yang mencirikan penyakit IBH. Hasil dengan teknik sekuensing DNA menunjukkan sampel virus IBH yang telah teridentifikasi dengan teknik PCR terkonfirmasi FAdV Group E Serotipe 8b. Oleh karena itu informasi ini dapat digunakan untuk pemangku kepentingan dipusat sebagai bahan kebijakan terkait

pembuatan vaksin IBH. Lemahnya biosekuriti peternakan diduga memperbesar derajat keparahan dan penularan penyakit sehingga terjadi kematian tinggi di atas 10% dalam waktu 3-5 hari, sehingga disarankan perlu peningkatan biosekuriti di peternakan.

### KETERBATASAN

Keterbatasan penelitian adalah data dan informasi peternak yang tidak lengkap sehingga informasi epidemiologi penyakit tidak lengkap untuk menggambarkan besaran kasus dan tingkat keparahan penyakit. Namun, hal ini bukan menjadi tujuan penelitian ini karena output dari penelitian adalah peneguhan diagnosa penyakit untuk mengkonfirmasi kasus kematian ayam broiler yang diduga disebabkan oleh infeksi virus IBH.

### DAFTAR PUSTAKA

- Akoso, BT. 1993. *Manual Kesehatan Unggas. Panduan bagi petugas teknis, penyuluh dan peternak*. Penerbit Kanisius. Cetakan pertama: Hal. 68 – 70.
- Dinev Ivan, 2014. *Diseases of Poultry: A Colour Atlas*. The PoultrySite – Poultry News, Health, Welfare, Diseases, Markets and Economics 5m Publishing, Benchmark House, England.
- Jubb KVF, Kennedy Peter C, Palmer Nige., 1985. *Pathology of Domestic Animals*. Third Edition. Academic Press. London. P.255
- Kumar S, Stecher GLiM. Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35:1547-1549.
- Meulemans G, Boschmans M van den Berg TP, Decaesstecker M. 2001. *Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses*. *Avian Pathology*, 30: 655-660.
- Monleon R. 2014. Serological Monitoring of Fowl Adenovirus.
- Morshed R, Hosseini H, Langeroudi AG, Fard MHB, Charkhkar S. 2017. Fowl Adenoviruses D and E Cause Inclusion Body Hepatitis Outbreaks in Broiler and Broiler Breeder Pullet Flocks. *Avian Disease*, 61(2):2005-210.



- Norina L, Norsharina AI, Nurnadiah AH, Redzuan, Ardy, Ismaliza N, 2015. Avian Adenovirus Isolated From Broiler Affected with Inclusion Body Hepatitis. *Malaysian Journal of Veterinary Research*. 7 (2):121-126
- Pratamasari D, Kumorowati E, Nurani S, Sutopo. 2018. Temuan penyakit *Inclusion Body Hepatitis* pada sampel surveilans pasif kasus kematian tinggi unggas broiler di wilayah kerja Balai Besar Veteriner Wates Yogyakarta. Presentasi Seminar Nasional Rapat Teknis dan Pertemuan Ilmiah Tahun 2018. Yogyakarta, Indonesia.
- Rahimi M, Haghighi ZMS. 2015. *Adenovirus-like inclusion body hepatitis in a flock of broiler chickens in Kermanshah province Iran*. *Veterinary Research Forum*. 2015 Winter; 6(1):95-98.
- Randall CJ. 1985. *A Colour Atlas of Diseases of the Domestic Fowl and Turkey*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Veterinary Laboratory, Eskgrove Lasswade, Midlithian, Scotland, Wolfe Medical Publications Ltd.