

## Patogenitas Isolat Lokal Virus BHV-1 sebagai Penyebab *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR) pada Sapi Bali

RINI DAMAYANTI dan SUDARISMAN

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 23 Maret 2005)

### ABSTRACT

DAMAYANTI, R. and SUDARISMAN. 2005. Pathogenicity of local isolate virus BHV-1 as the aetiological agent of Infectious Bovine Rhinotracheitis in Bali Cattle. *JITV* 10(3): 227-235.

Infectious Bovine Rhinotracheitis is a disease of cattle characterised by clinical signs of the upper respiratory tract, reproductive tract and nervous system. A study to define the pathogenicity of four BHV-1 local isolates has been conducted. Fourteen Bali cattle that were free of BHV-1 has been selected and divided into four treatment groups. Each group of three was infected with virus isolate I, II, III and IV respectively with approximately a dose of  $10^8$ TCID<sub>50</sub>/10 ml and two cattle were used as control animals. Isolate I and III were originated from semen from IBR positive bulls number G 867 and G 148 respectively whereas isolate II was collected from vaginal mucosa and isolate IV was from nasal mucosa of IBR positive cattle treated with dexamethasone. Clinical response, gross-pathological and histopathological changes were observed. Immunohistochemical staining was applied to detect the antigen in tissue section. The results show that the BHV-1 local isolates could produce IBR syndrome namely fever and changes in the respiratory and reproductive tracts even though the clinical responses seemed to be disappeared by 21 days PI. Grossly there were hyperaemic nasal and vaginal mucosa and pneumonia whereas histologically there were non suppurative rhinitis, tracheitis, pneumonia and vulvovaginitis. Immunohistochemically the antigen was detected in the nasal concha and trachea. Dexamethasone treatment at 60-64 days PI could produce less severe clinical features and the second necropsy at 69 days PI also results in less severe pathological responses. The findings also suggest that the pathogenicity of BHV-1 local isolates were as follows: isolates I, II, IV and III.

**Key Words:** Pathogenicity, BHV-1, Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), Bali Cattle

### ABSTRAK

DAMAYANTI, R. dan SUDARISMAN. 2005. Patogenitas isolat lokal virus BHV-1 sebagai penyebab *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR) pada Sapi Bali. *JITV* 10(3): 227-235.

Penyakit IBR merupakan penyakit pada sapi dengan gangguan pernapasan, reproduksi dan syaraf. Suatu penelitian untuk mengetahui patogenitas isolat lapang BHV-1 telah dilakukan. Empat belas ekor sapi Bali yang bebas dari infeksi virus BHV-1 dibagi atas empat kelompok perlakuan (tiap grup terdiri dari tiga ekor sapi), masing-masing kelompok diinfeksi dengan isolat I, II, III dan IV dengan dosis rata-rata  $10^8$ TCID<sub>50</sub>/10 ml secara intravena sedangkan dua ekor sapi dipergunakan sebagai hewan kontrol. Isolat I dan III masing-masing berasal dari semen sapi jantan G 867 dan G 148 yang positif terinfeksi IBR sedangkan isolat II berasal dari mukosa vagina dan isolat IV berasal dari mukosa hidung sapi yang positif terinfeksi IBR dan dibuat dalam kondisi stres dengan cara pemberian deksametason. Respon klinis, gambaran pasca mati dan kelainan histopatologis diamati. Selain itu pewarnaan imunohistokimia juga dilakukan untuk mendeteksi antigen BHV-1 pada organ. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat BHV-1 dapat menimbulkan respon klinis IBR berupa demam, gangguan respirasi dan reproduksi walaupun manifestasinya menghilang 21 hari PI. Secara patologi anatomis, sapi yang tidak diberi deksametason tersebut mengalami hiperemis pada mukosa *nasal concha* dan mukosa vagina serta pneumonia dan secara histopatologis sapi menderita rhinitis, trakheitis, pneumonia dan vulvovaginitis yang bersifat non supuratif. Dengan teknik pewarnaan imunohistokimia antigen dapat dideteksi pada *nasal concha* dan trakea. Pemberian deksametason pada 60-64 hari PI ternyata dapat menimbulkan gejala klinis dan patologi IBR namun dengan derajat keparahan yang lebih ringan. Dari hasil pengamatan terlihat bahwa urutan patogenitas isolat lapang BHV-1 adalah sebagai berikut: isolat I, II, IV dan III.

**Kata Kunci:** Patogenitas, BHV-1, *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR), Sapi Bali

### PENDAHULUAN

*Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR) adalah penyakit menular pada sapi dan kerbau yang disebabkan oleh *Bovine herpesvirus-1* (BHV-1) dengan gangguan pernafasan, gejala syaraf dan gangguan

reproduksi merupakan gejala klinis yang utama dengan sindroma berupa demam, rhinotrakheitis, konjungtivitis, dan vulvovaginitis atau sindroma lain berupa enteritis dan ensefalitis (GIBBS dan RWEYEMAMU, 1977). Penularan dapat terjadi melalui perkawinan alam atau inseminasi buatan (IB) (VAN OIRSCHOT *et al.*, 1993).

Manifestasi penyakit IBR dapat bersifat fatal, ringan maupun subklinis, tergantung dari galur (strain) virus, kepekaan hewan dan faktor lingkungan (DUNGWORTH, 1985).

Galur BHV-1 dapat dibagi atas beberapa genotipe yang masing-masing dapat mempengaruhi respon klinis dan patologis IBR. Galur virus yang paling patogen biasanya dipakai untuk ujiantang dalam studi patogenitas isolat, sedangkan untuk biang vaksin dipilih isolat yang paling rendah virulensinya tetapi mempunyai respon imunogenik yang tinggi (KAASHOEK *et al.*, 1996). Virus BHV-1 dapat bersifat laten dan usaha isolasi virusnya dapat dilakukan dengan pemberian kortikosteroid dosis tinggi, misalnya deksametason untuk reaktivasi virus (BLOOD dan RADOSTITS, 1989).

Diagnosis terhadap IBR biasanya dilakukan dengan isolasi virus karena sensitivitasnya yang tinggi, tetapi uji serologis seperti uji serum neutralisasi (SN), fiksasi komplemen (CF), imunoperoksidase dan imuno fluoresen tidak langsung (IIF) sering dilakukan (EDWARD *et al.*, 1983). Keberadaan penyakit IBR di Indonesia telah dilaporkan melalui uji serologis (MARFIATININGSIH, 1982; WIYONO *et al.*, 1989; SUDARISMAN, 1992).

Usaha untuk mendeteksi BHV-1 pada semen sapi yang digunakan untuk IB dan *swab* (sediaan ulas) dari mukosa organ hewan yang terserang hanya dilakukan dengan cara isolasi virus. Hal ini menimbulkan banyak hambatan dan membutuhkan waktu cukup lama. Selain itu, teknik pewarnaan imunohistokimia (IHK) juga dilakukan untuk mendeteksi antigen pada organ hewan yang terinfeksi BHV-1. Isolasi virus IBR di Indonesia diperoleh dari kasus hewan yang mengalami stres buatan dan dari semen hewan asal Balai Inseminasi Buatan (BIB) telah berhasil dilakukan (SUDARISMAN, 1992) akan tetapi uji patogenitas untuk dipelajari sifat-sifatnya belum diuji. Keganasan isolat dapat dilihat dari respon klinis, patologi anatomis, histopatologis dan sebaran antigen BHV-1 pada organ yang terinfeksi.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji patogenitas isolat lapang BHV-1 dalam menimbulkan penyakit IBR secara klinis dan patologis pada sejumlah sapi Bali. Diharapkan studi ini dapat dipakai juga sebagai dasar pertimbangan dalam pemilihan jenis isolat untuk pembuatan bahan baku vaksin IBR dengan menggunakan isolat lokal Indonesia.

## MATERI DAN METODE

### Virus IBR

Empat isolat virus IBR yang telah teridentifikasi (SUDARISMAN, 1992) terdiri dari: isolat I dan III yang berasal dari semen sapi jantan G 867 dan G 148 yang menunjukkan gejala klinis IBR dan dinyatakan positif

mengandung virus IBR (SUDARISMAN, 1992); isolat II yang berasal dari mukosa vagina dan isolat IV yang berasal dari mukosa hidung sapi yang positif IBR yang dibuat dalam kondisi stres dengan pemberian deksametason (dosis 2 mg/ml sebanyak 10 ml per ekor secara intra-muskular) (SUDARISMAN, 1992). Keempat isolat tersebut ditumbuhkan pada biakan sel *Mardin Darby Bovine Kidney* (MDBK) dalam media M-199 yang berisi Penisilin dan Streptomisin masing-masing 100 Unit dan 100 µg per ml media dan 2% *foetal calf serum* (FCS). Isolat virus tersebut dipropagasi dalam *roller bottle* pada suhu 37°C dan diamati selama 3 hari sehingga *cytopathic effect* (CPE) mencapai 100%. Virus hasil propagasi disimpan pada suhu -70°C. Sebelum diinokulasikan pada hewan percobaan virus dihitung konsentrasinya berdasarkan TCID<sub>50</sub> (KAASHOEK *et al.*, 1996). Titer yang diperoleh adalah sebagai berikut: isolat I, 10<sup>8.3</sup> TCID<sub>50</sub>/10 ml, isolat II, 10<sup>8.1</sup> TCID<sub>50</sub>/100 ml, isolat III, 10<sup>8.8</sup> TCID<sub>50</sub>/1 ml dan isolat IV, 10<sup>8.8</sup> TCID<sub>50</sub>/100 ml.

### Hewan percobaan

Hewan yang dipergunakan dalam pengamatan ini adalah hewan yang tidak mengandung antibodi terhadap BHV-1 dalam tubuhnya. Untuk itu dilakukan uji SNT selama dua kali berturut-turut dengan selang waktu satu minggu pada sapi Bali dewasa di Lampung dan terseleksi 17 ekor sapi jantan dan betina yang bebas BHV-1 kemudian dibeli. Namun sebelum infeksi dilakukan, tiga ekor sapi terserang *Malignant Catarrhal Fever* (MCF) (DAMAYANTI dan WIYONO, 2005) sehingga sapi yang tersisa tinggal 14 ekor yang dapat digunakan sebagai hewan percobaan.

### Uji patogenitas

Dari 14 ekor sapi Bali yang dipergunakan, 12 ekor diinfeksi dan dibagi dalam empat kelompok untuk diinfeksi sementara dua ekor sisanya untuk kontrol. Masing-masing kelompok terdiri dari tiga ekor yang masing-masing diinfeksi dengan isolat I, II, III dan IV dengan dosis rata-rata 10<sup>8</sup>TCID<sub>50</sub>/10 ml secara intra-vena. Jumlah inokulum disesuaikan menurut metode yang dipakai oleh KAASHOEK *et al.* (1996), yaitu 10<sup>8</sup>TCID<sub>50</sub>/10 ml.

Pengamatan klinis dilakukan setiap hari setelah hewan diinfeksi hingga gejala klinis menghilang atau sampai hewan dinekropsi. Pengamatan yang dilakukan berupa pengukuran suhu badan, frekuensi pernafasan/menit, keadaan mukosa hidung, mukosa vulva dan gejala klinis lain yang muncul. Pada hari ke enam pasca infeksi (PI) empat ekor sapi (satu ekor sapi dari tiap grup perlakuan) dan satu ekor sapi kontrol dinekropsi. Untuk menimbulkan stres buatan ROCK *et al.* (1992) menyarankan untuk menyuntik hewan yang

diinfeksi IBR dengan deksametason. Sebanyak empat ekor sapi (satu ekor sapi untuk masing-masing perlakuan) pada 60-64 hari PI diberi deksametason 2 mg/ml (R/Dexadreson, Intervet, The Netherland) dengan dosis 10 ml, secara intra-muskular selama lima hari berturut-turut untuk menimbulkan stres buatan (WISEMAN *et al.*, 1978). Sebanyak tiga ekor sapi menunjukkan gejala klinis IBR lima hari setelah pemberian deksametason sehingga pada hari ke 69 PI, ketiga sapi tersebut dan satu sapi kontrol dinekropsi. Sisa sapi yang tidak menunjukkan kelainan klinis IBR diamati sampai tiga bulan PI.

#### **Pemeriksaan patologi anatomis (PA) dan Pemeriksaan histopatologi (HP)**

Pengamatan patologi anatomis dan histopatologis dilakukan apabila hewan dinekropsi. Jenis sampel yang dikoleksi berupa: *swab* mukosa hidung dan vagina, organ limfoglandula, cuping hidung, nasal *concha*, trakhea, paru-paru, hati, limpa, usus, ginjal, testis, penis, vagina, uterus. Organ difiksasi dalam larutan *neutral buffer formaline* (NBF) 10%. Untuk pemeriksaan histopatologi (HP) dan imunohistokimia (IHK) organ yang telah difiksasi dalam larutan NBF 10% diproses sebagai blok parafin, dipotong setebal 3-4  $\mu$ m dan diwarnai dengan hematoksilin dan eosin (H&E) sesuai prosedur standar (DRURY dan WALLINGTON, 1980). Pemeriksaan histopatologi dilakukan secara deskriptif dengan bantuan mikroskop untuk menentukan derajat keparahan lesi.

#### **Produksi serum hiperimun pada kelinci**

Antigen yang disiapkan untuk mengimunisasi kelinci berupa *crude antigen* dari isolat III yang sudah diinaktivasi dengan formalin 0,1%. Sepuluh ekor kelinci diimunisasi dengan isolat tersebut ( $10^{8,8}$  TCID<sub>50</sub>/1 ml) + 1 ml *Freund's complete adjuvant* secara intra muskular. Empat minggu kemudian diulang dengan isolat yang sama tetapi dengan *Freund's incomplete adjuvant* secara intra muskular. *Booster* ke tiga hanya dilakukan dengan isolat tersebut (tanpa *adjuvant*) secara intra vena. Panen I baru dapat dilakukan 10-14 hari setelah *booster* ketiga tersebut. Titer antibodi akan diuji dengan SN, dan setelah titer mencapai  $10^5$  TCID<sub>50</sub> maka serum dipanen dan dipakai pada pewarnaan imunohistokimia.

#### **Pewarnaan imunohistokimia untuk mendeteksi BHV-1**

Pewarnaan imunohistokimia yang dipakai yaitu metode avidin biotin peroksidase kompleks (ABC) yang tekniknya diadaptasi dari hasil penelitian HSU *et al.*

(1981). Pada uji ini dipakai kit komersial (LSAB-2 *System peroxidase universal kit*, DAKO, No. K 0672, Denmark). Dengan teknik ini antigen BHV-1 dapat dideteksi pada jaringan organ. Antigen akan direaksikan dengan *primary antibody* terhadap BHV-1 yang merupakan antisera hiperimun kelinci produksi Balitvet. Selain itu juga dicoba *primary antibody* berupa antibodi monoklonal yang diperoleh dari *Veterinary Infectious Disease Organisation* (VIDO), University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.

Blok parafin yang berisi jaringan organ sapi yang diduga mengandung virus BHV-1 dipotong 3-4 $\mu$ m dan direkatkan pada preparat yang sudah diberi *Poly-L-lysine* 0,05% sebagai perekat. Preparat dideparafinisasi sesuai metode standar dan siap untuk diwarnai. Preparat direndam dalam larutan tripsin 0,1% dalam larutan kalsium klorid 0,1% selama 20 menit pada suhu 37°C untuk selanjutnya dibilas dengan larutan *Posphate Buffered Saline* (PBS) pH 7.4. Antisera kelinci produksi Balitvet diaplikasikan dengan konsentrasi 1:400 dan 1:800 dalam larutan PBS diinkubasikan selama 60 menit (khusus untuk pelarut antibodi dipakai PBS yang berisi serbuk susu skim 0,1%). Selain antisera poliklonal produksi Balitvet tersebut, dicoba pula antibodi monoklonal dari VIDO, Canada dengan konsentrasi 1:400 dan 1:800. Setelah itu preparat dibilas dengan PBS tiga kali, kemudian aktifitas enzim peroksidase endogen dihambat dengan pemberian hidrogen peroksidase 3% dalam akuades selama 20 menit, kemudian preparat dibilas dengan PBS sebanyak tiga kali.

Selanjutnya, preparat diberi antibodi sekunder yang sudah dilabel dengan biotin/*biotylated secondary antibody* yang diperoleh dari kit komersial (DAKO, Denmark) dan diinkubasikan selama 30 menit lalu dibilas dengan PBS sebanyak tiga kali. Setelah itu streptavidin peroksidase (berupa reagen kompleks streptavidin-biotin dan enzim horseradish peroksidase) yang terdapat pada kit (DAKO, Denmark) diaplikasikan selama 30 menit dan preparat dibilas PBS sebanyak tiga kali. Untuk memvisualisasikan antigen yang terdapat pada preparat, ditambahkan substrat *Amino Ethyl Carbazole/AEC* (DAKO, Denmark) selama lima menit dan dipakai larutan hematoksilin yang berwarna biru sebagai *counterstain*. Hasil dinyatakan positif apabila terdapat warna coklat (latar belakang berwarna biru hematoksilin) dan negatif jika warna coklat tidak dapat dideteksi sehingga preparat hanya tampak berwarna biru saja. Jumlah antigen pada organ dinyatakan banyak (+++) jika terdapat lebih dari 20 sel yang berwarna coklat per satu lapang pandang mikroskop (10 x 20), sedang (++) jika jumlah sel 10-20 dan sedikit (+) jika jumlah sel kurang dari 10.

## HASIL

### Pengamatan klinis

Respon klinis pada sapi yang diinfeksi dengan isolat I berupa demam tinggi (+++) sampai 41,5°C bermula pada hari ke satu PI dan berlangsung selama sembilan hari PI. Selain itu hiperemi mukosa hidung dan vulva dengan derajat parah (+++) yang disertai dengan eksudat serous/mukous yang terlihat dengan jelas pada 4-21 hari PI. Sedangkan eksudat serous yang berasal dari mata tampak pada hari ke enam sampai 14 hari PI. Peningkatan frekuensi pernapasan (*hiperпноe*) terutama terjadi pada saat hewan demam. Semua gejala klinis pada penelitian ini juga terjadi pada sapi yang diinfeksi dengan isolat II, III dan IV namun bervariasi pada derajat keparahan dan lamanya gejala klinis berlangsung (Tabel 1). Gejala klinis tersebut hanya dapat terdeteksi sampai hari ke-21 PI dan setelah masa tersebut gejala klinis menghilang. Tabel 1 menunjukkan bahwa urutan patogenitas isolat (dari yang terparah) adalah sebagai berikut: isolat I, II, IV dan III.

Pada Tabel 1 juga dapat dilihat bahwa kelompok hewan yang diberi deksametason selama lima hari berturut-turut pada 60-64 hari PI, tiga ekor sapi mulai menunjukkan gejala klinis dua hari setelah pemberian deksametason dihentikan. Sapi yang disuntik dengan isolat I dan deksametason mengalami demam (39,8-40,1°C) selama tiga hari disertai petekhi parah (+++) pada mukosa vulva. Sapi yang disuntik dengan isolat II dan deksametason mengalami demam selama 3 hari dan petekhi sedang (++) pada mukosa vulva. Sapi yang disuntik dengan isolat III dan deksametason tidak menunjukkan demam atau gejala klinis lainnya (-). Sapi yang disuntik isolat IV dan deksametason juga mengalami demam tetapi tanpa gejala klinis lain (+). Hasil pengamatan tersebut menunjukkan bahwa gejala klinis pada hewan yang diinfeksi dengan isolat virus IBR lalu diberi deksametason juga menghasilkan urutan patogenitas isolat sebagai berikut (dari yang terparah): I, II, IV dan III. Ketiga ekor hewan dengan klinis IBR tersebut dan satu ekor hewan kontrol kemudian dinekropsi pada 69 hari PI (satu ekor yang diinfeksi dengan isolat III dan deksametason tidak mengalami demam sehingga tidak dinekropsi). Hewan lain yang tersisa tidak menunjukkan kelainan klinis IBR sampai waktu pengamatan dihentikan (tiga bulan PI).

### Pengamatan patologi anatomi (PA)

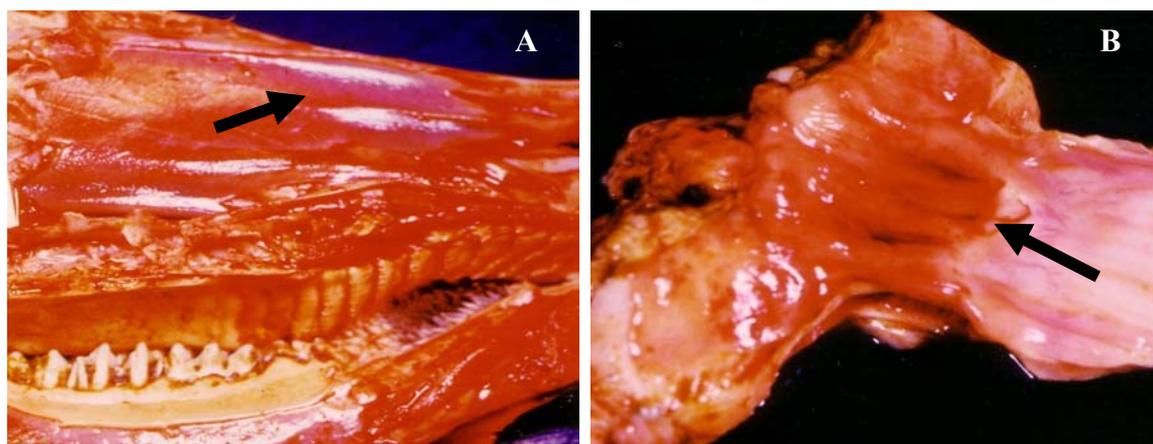
Perubahan PA yang dideteksi berupa perdarahan mukosa *nasal concha* (Gambar 1A) dan perdarahan mukosa vulva dan vagina (Gambar 1B), hiperemi mukosa trakhea, pneumonia dan petekhi pada usus halus dan usus besar. Pada sapi yang disuntik dengan isolat I, perdarahan pada *nasal concha* dan mukosa

hidung tergolong parah (+++), sedangkan lesi pada trakhea tergolong ringan (+), paru-paru dan usus lesi tergolong sedang (++) dan saluran reproduksi tergolong lesi ringan sampai sedang (+/++) (Tabel 2). Sapi yang disuntik dengan isolat II, III dan IV menghasilkan lesi serupa namun dengan derajat lesi yang bervariasi (Tabel 2). Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa urutan keparahan lesi (dari yang terparah) yaitu: sapi yang disuntik dengan isolat I, II, IV dan III.

**Tabel 1.** Derajat keparahan klinis pada sapi Bali yang diinfeksi dengan isolat lapang BHV-1

No Hewan	Perlakuan	Gejala klinis	Keterangan
515 Bt	Isolat I	+++ (1-6 hari PI)	Dinekropsi 6 hari PI
496 Bt	Isolat II	++ (3-6 hari PI)	Dinekropsi 6 hari PI
490 Jt	Isolat III	+ (3-4 hari PI)	Dinekropsi 6 hari PI
488 Jt	Isolat IV	++ (4-6 hari PI)	Dinekropsi 6 hari PI
Kontrol	-	-	Dinekropsi 6 hari PI
514 Bt	Isolat I dan Deksa	+++ (1-21 hari PI dan 67-69 hari PI)	Dinekropsi 69 hari PI
495 Jt	Isolat II dan Deksa	++ (3-21 hari PI dan 67-69 hari PI)	Dinekropsi 69 hari PI
520 Bt	Isolat IV dan Deksa	++ (4-18 hari PI dan 68-69 hari PI)	Dinekropsi 69 hari PI
Kontrol	-	-	Dinekropsi 69 hari PI
517 Jt	Isolat III dan Deksa	+ (3-20 hari PI)	Diamati sampai 3 bulan PI
489 Bt	Isolat I	+++ (1-21 hari PI)	Diamati sampai 3 bulan PI
499 Bt	Isolat II	++ (3-21 hari PI)	Diamati sampai 3 bulan PI
491 Bt	Isolat III	+ (3-20 hr PI)	Diamati sampai 3 bulan PI
487 Jt	Isolat IV	++ (4-16 hari PI)	Diamati sampai 3 bulan PI

(-): tidak ada gejala klinis; (+): gejala klinis ringan; (++) : gejala klinis sedang; (+++): gejala klinis parah; (Bt): betina; (Jt): jantan  
 Gejala klinis : demam, hiperemi mukosa hidung dan vulva, lakrimasi, gangguan respirasi  
 Isolat I :  $10^{8,3}$  TCID<sub>50</sub>/10 ml (Semen sapi No: BG 8702, klinis IBR)  
 Isolat II :  $10^{8,1}$  TCID<sub>50</sub>/100 ml (*Swab* vagina sapi, klinis IBR dan deksametason)  
 Isolat III :  $10^{8,8}$  TCID<sub>50</sub>/1 ml (Semen sapi No: 148903, klinis IBR)  
 Isolat IV :  $10^{8,8}$  TCID<sub>50</sub>/100 ml (*Swab* hidung sapi klinis IBR dan deksametason)  
 Deksa : Deksametason



**Gambar 1.** A. Perdarahan mukosa *nasal concha* pada sapi Bali yang diinfeksi dengan isolat BHV-1; B. Perdarahan mukosa vulva dan vagina pada sapi Bali yang diinfeksi dengan isolat BHV-1. Pewarnaan H & E, 10 x 10

**Tabel 2.** Derajat keparahan PA pada sapi Bali yang diinfeksi dengan isolat lapang BHV-1

No Hewan	Perlakuan	Derajat lesi PA						
		<i>Concha</i>	Mokusa hidung	Trakhea	Paru paru	Usus	Mukosa vagina	Uterus
515 Bt	Isolat I	+++	+++	+	++	++	++	+
496 Bt	Isolat II	++	+++	+	++	++	+++	-
490 Jt	Isolat III	+	++	+	+	-	TS	TS
488 Jt	Isolat IV	++	++	+	+	+	TS	TS
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-
514 Bt	Isolat I dan Deksa	++	-	-	-	-	+	-
495 Jt	Isolat II dan Deksa	++	-	-	+	-	TS	TS
520 Bt	Isolat IV dan Deksa	++	-	-	-	-	-	-
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): tidak ada lesi; (+): lesi ringan; (++) : lesi sedang; (+++) : lesi parah; (TS): tidak ada sampel; (Bt): betina; (Jt): jantan  
 Isolat I :  $10^{8,3}$  TCID<sub>50</sub>/10 ml (Semen sapi No: BG 8702, klinis IBR)  
 Isolat II :  $10^{8,1}$  TCID<sub>50</sub>/100 ml (*Swab* vagina sapi, klinis IBR dan deksametason)  
 Isolat III :  $10^{8,8}$  TCID<sub>50</sub>/1 ml (Semen sapi No: 148903, klinis IBR)  
 Isolat IV :  $10^{8,8}$  TCID<sub>50</sub>/100 ml (*Swab* hidung sapi klinis IBR dan deksametason)  
 Hewan 1 s/d 4 dinekropsi 6 hari PI  
 Hewan 5 s/d 7 dinekropsi 69 hari PI (deksametason diberikan 60 s/d 64 hari PI)

Pada kelompok yang diberi deksametason lesi PA hanya terlihat pada *nasal concha* dengan derajat keparahan sedang (++) pada kelompok yang diinfeksi dengan isolat I, II dan IV dan pneumonia ringan (+) pada sapi yang disuntik dengan isolat II. Kelompok sapi yang diinfeksi dengan isolat III tidak dinekropsi karena tidak menampakkan gejala klinis dan setelah pengamatan selama tiga bulan sapi tetap tidak memperlihatkan kelainan klinis. Kelainan PA (setelah pemberian deksametason) yang utama hanya berupa perdarahan *nasal concha* dan pneumonia sehingga respon ini lebih ringan daripada gambaran PA pada enam hari PI (tanpa deksametason).

**Hasil pemeriksaan histopatologi (HP)**

Hasil pemeriksaan HP menunjukkan rhinitis non-supuratif, trakheitis, pneumonia interstitial, enteritis dan vulvovaginitis dengan derajat keparahan lesi bervariasi seperti tertuang pada Tabel 3. Pada sapi yang disuntik dengan isolat I peradangan non supuratif pada *nasal concha* tergolong parah (+++) sedangkan lesi pada mukosa hidung, paru-paru, usus, mukosa vagina dan uterus lesi tergolong sedang (++) dan lesi pada trakhea tergolong ringan (+). Sapi yang disuntik dengan isolat II dan IV juga memberikan lesi HP serupa namun dengan tingkat keparahan lebih ringan (Tabel 3). Sapi yang diinfeksi dengan isolat III menunjukkan lesi HP paling

ringan (+) karena lesi hanya ditemukan pada *nasal concha*, mukosa hidung dan trakhea.

Dari tabel tersebut tampak bahwa jenis lesi HP dan derajat keparahannya merupakan manifestasi dari lesi PA. Dalam penelitian ini tampak bahwa lesi HP nya sesuai dengan lesi PA nya, dimana urutan derajat kepekaan lesinya (dari yang terparah) adalah sebagai berikut: kelompok yang diinfeksi dengan isolat I, II, IV dan III. Pada sapi yang diinfeksi lalu diberi deksametason maka secara HP hanya ditemui lesi sedang (++) pada *nasal concha* pada sapi yang diinfeksi dengan isolat I, II dan IV. Lesi ringan (+) dijumpai pada

mukosa hidung pada sapi yang diinfeksi dengan isolat IV dan lesi ringan (+) pada paru-paru sapi yang diinfeksi dengan isolat I dan II. Perlu ditambahkan bahwa pada mukosa *nasal concha* hewan no 520 yang diinfeksi dengan isolat IV dan dinekropsi tiga hari setelah pemberian deksametason dihentikan, maka secara HP ditemukan badan inklusi intra-nuklear (*intra nuclear inclusion bodies*) yang bersifat patognomonik untuk IBR. Gambar 2A dan 2B masing-masing menunjukkan penebalan mukosa *nasal concha* dimana pada sel epitelnya dapat dideteksi badan inklusi yang berlokasi pada daerah intra-nuklear.

**Tabel 3.** Derajat keparahan lesi HP pada sapi Bali yang diinfeksi dengan isolat lapang BHV-1

No Hewan	Perlakuan	Derajat lesi HP						
		<i>Concha</i>	Mokusa hidung	Trakhea	Paru paru	Usus	Mukosa vagina	Uterus
515 Bt	Isolat I	+++	+++	+	++	++	++	++
496 Bt	Isolat II	++	+++	+	++	+++	+++	-
490 Jt	Isolat III	+	++	+	-	-	-	-
488 Jt	Isolat IV	++	++	+	+	+	TS	TS
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-
514 Bt	Isolat I dan Deksa	++	-	-	+	-	-	-
495 Jt	Isolat II dan Deksa	++	-	-	+	-	TS	TS
520 Bt	Isolat IV dan Deksa	++	+	-	-	-	-	-
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): tidak ada lesi; (+): lesi ringan; (++): lesi sedang; (+++): lesi parah; (TS): tidak ada sampel; (Bt): betina; (Jt): jantan

Isolat I :  $10^{8,3}$  TCID<sub>50</sub>/10 ml (Semen sapi No: BG 8702, klinis IBR)

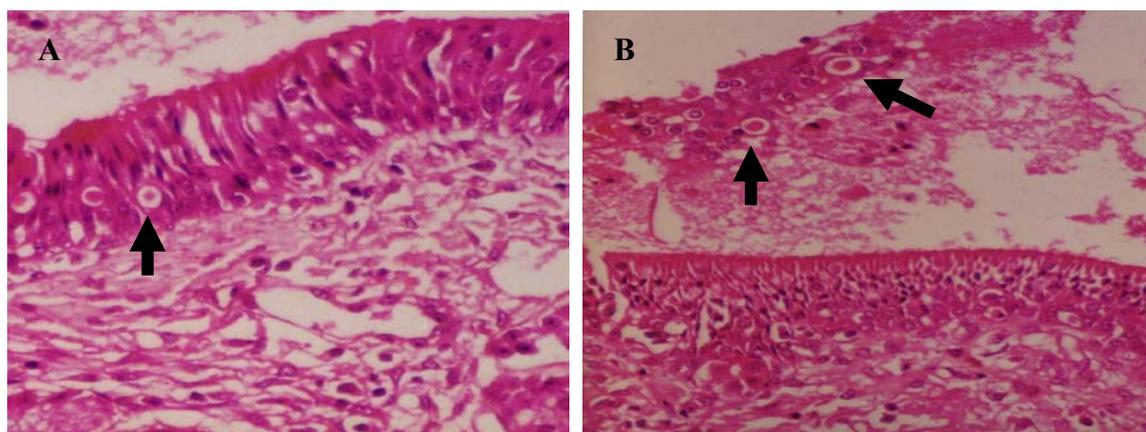
Isolat II :  $10^{8,1}$  TCID<sub>50</sub>/100 ml (*Swab* vagina sapi, klinis IBR dan deksametason)

Isolat III :  $10^{8,8}$  TCID<sub>50</sub>/1 ml (Semen sapi No: 148903, klinis IBR)

Isolat IV :  $10^{8,8}$  TCID<sub>50</sub>/100 ml (*Swab* hidung sapi klinis IBR dan deksametason)

Hewan 1 s/d 4 dinekropsi 6 hari PI

Hewan 5 s/d 7 dinekropsi 69 hari PI (deksametason diberikan 60 s/d 64 hari PI)



**Gambar 2.** A. Penebalan lapisan mukosa *nasal concha* dan badan inklusi pada sapi Bali yang diinfeksi dengan isolat BHV-1; B. Badan inklusi pada reruntuhan sel yang berupa eksudat pada mukosa *nasal concha* pada sapi Bali yang diinfeksi dengan isolat BHV-1. Pewarnaan H & E, 10 x 10

### Distribusi antigen BHV-1 dengan teknik imunohistokimia

Pewarnaan imunohistokimia menunjukkan bahwa distribusi antigen hanya dapat dideteksi pada sel epitel mukosa dan epitel kelenjar pada *nasal concha* (Gambar 3) dan trakhea. Antigen tidak ditemukan selain pada kedua organ tersebut di atas. Antigen dapat dideteksi pada kedua organ tersebut pada sapi yang diinfeksi dengan isolat I, II, III dan IV, baik pada sapi yang dinekropsi pada enam hari PI maupun 69 PI. Jumlah antigen yang dideteksi pada organ tersebut sesuai dengan urutan patogenitas isolat. Sapi yang disuntik isolat I memberikan jumlah antigen yang banyak (+++), isolat II dan IV dengan jumlah antigen sedang (++) isolat III dengan jumlah antigen sedikit (+). Penggunaan antisera BHV-1, baik produksi Balitvet maupun antibodi monoklonal dari VIDO, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada, memberikan hasil yang sama (pada pengenceran 1:400-1:800), namun antibodi monoklonal memberikan *background staining* lebih bersih.

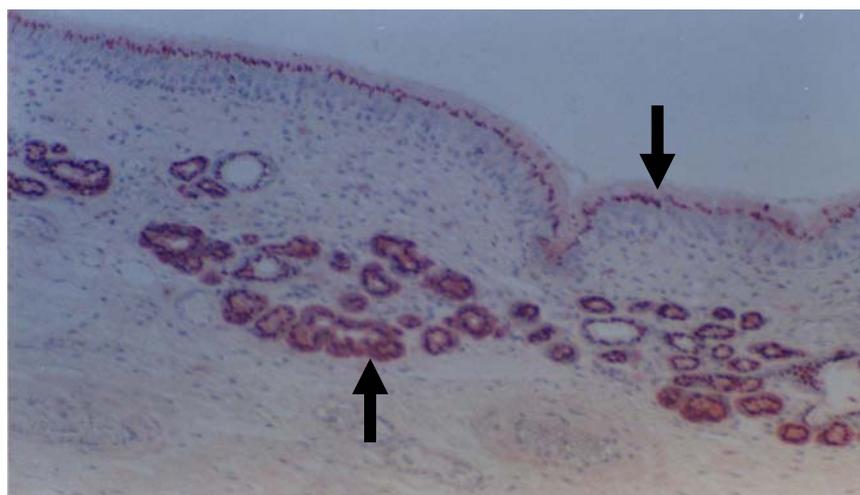
### PEMBAHASAN

Penyakit IBR bersifat akut dan sangat menular yang mengakibatkan menurunnya nafsu makan, kenaikan suhu badan sampai 41°C (GIBBS dan RWEYEMAMU, 1977) dan biasanya suhu meningkat pada tiga sampai empat hari PI dan berakhir pada 15 hari PI pada infeksi buatan (HALLORAN *et al.*, 1991). Menurut MC. KERCHER *et al.* (1970) infeksi buatan secara intra vena menyebabkan demam pada dua atau tiga hari PI dan berlanjut hingga enam hari PI. SUDARISMAN (2001)

menambahkan bahwa pada hewan kontrol yang diberi perlakuan tanpa vaksinasi IBR apabila diuji tantang dengan virus IBR asal isolat lapang akan memperlihatkan demam mulai hari ke tiga sampai ke sembilan PI. Selain itu pada penelitian ini gejala syaraf berupa meningoensefalitis juga tidak dijumpai.

Hasil penelitian terhadap uji tantang dengan isolat lapang BHV-1 pada hewan biasanya memperlihatkan peningkatan suhu, lesi pada mukosa hidung, hipersekresi cairan hidung, hiperlakrimasi, konjungtivitis, trakheitis dan peningkatan frekuensi pernapasan (*hiperpnoe*) (FRERICHS *et al.*, 1982). Hal ini berbeda dengan kejadian klinis pada infeksi alami seperti diutarakan oleh SAXEGAARD (1970) dan KAHRS (1977) yaitu yang berupa gangguan saluran pernafasan, konjungtivitis, vulvovaginitis, keguguran, balanoposteititis, meningoensefalitis, gangguan saluran pencernaan dan infeksi sistemik. Demikian pula JONES (2000) menerangkan bahwa sapi yang terserang BHV-1 akan mengakibatkan gangguan pernafasan kompleks, gangguan penglihatan, keguguran dan terkadang mengalami ensefalitis yang berakibat fatal. Pada sapi perah keguguran yang terjadi dapat juga berarti kematian janin karena terjadi pada umur kebuntingan 42-260 hari (PETER, 2000).

Pemberian deksametason pada dua bulan PI ternyata dapat menimbulkan respon klinis, PA dan HP spesifik IBR, walaupun manifestasi penyakit dan distribusi lesinya tidak separah dan seluas seperti pada saat enam hari PI. Pemberian deksametason dosis tinggi ini menurut KAASHOEK *et al.* (1996) hanya berguna untuk reaktivasi virus (untuk keperluan isolasi virus) tetapi tidak dapat menimbulkan respon klinis dan patologis kecuali demam. Hasil penelitian ROCK *et al.* (1992)



**Gambar 3.** Antigen BHV-1 (warna coklat) pada sel epitel lapisan mukosa dan epitel kelenjar pada *nasal concha* pada sapi Bali yang diinfeksi dengan isolat BHV-1. Pewarnaan Imunohistokimia, 10 x 10

terhadap sapi yang terinfeksi IBR dan diberi deksametason menunjukkan 80% dari sapi tersebut virus BHV-1 dapat diisolasi. Pada penelitian ini sisa hewan yang diinfeksi dan tidak diberi deksametason (empat ekor) sampai tiga bulan PI ternyata tetap dalam keadaan sehat secara klinis. Badan inklusi yang diamati pada penelitian ini bersifat patognomonik dan disebut dengan *Classical Cowdry Type A*, tetapi hal ini sangat sulit ditemukan dan hanya muncul lebih kurang 48-72 jam paska infeksi (ALLAN *et al.*, 1980; DUNGWORTH, 1985).

Hasil deteksi antigen secara imunohistokimiawi pada penelitian ini menguatkan hipotesa bahwa mukosa *nasal concha* dan trakhea merupakan organ target dari isolat BHV-1. Hal ini dapat dipakai untuk konfirmasi diagnosis IBR pada hewan yang mati/dinekropsi dan dicurigai terinfeksi IBR. Konfirmasi diagnosis dengan pewarnaan konvensional hematoksilin dan eosin (H dan E) sulit disimpulkan karena badan inklusi IBR yang patognomonis hanya muncul dua sampai tiga hari PI (DUNGWORTH, 1985) sehingga jika infeksi sudah melebihi masa tersebut badan inklusi tidak muncul dan diagnosis terabaikan.

Secara umum, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa urutan patogenitas isolat adalah sebagai berikut: isolat I, II, IV dan III (Tabel 1, 2 dan 3). Respon klinis, PA dan HP yang ditemukan pada penelitian ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh penelitian terdahulu (GIBBS dan RWEYEMAMU, 1977; WISEMAN *et al.*, 1978; BLOOD dan RADOSTITS, 1989). Dari perolehan data tersebut maka hasil studi patogenitas virus IBR tersebut dapat dipakai sebagai pertimbangan dan acuan apabila di kemudian hari isolat tersebut akan dipakai sebagai bahan baku vaksin dan disarankan berasal dari isolat yang memiliki daya proteksi (imunogenik) tinggi (SUDARISMAN, 2001).

### KESIMPULAN

Berdasarkan kelainan klinis dan patologis pada penelitian ini, maka urutan patogenitas isolat lapang BHV-1 adalah sebagai berikut: isolat I, II, IV dan III. Isolat I dan III masing-masing berasal dari semen sapi jantan G 867 dan G 148 yang positif terinfeksi IBR sedangkan isolat II berasal dari mukosa vagina dan isolat IV berasal dari mukosa hidung sapi yang positif terserang IBR dan dibuat dalam kondisi stres dengan cara pemberian deksametason. Selain itu sudah terbukti bahwa isolat lapang BHV-1 dapat menimbulkan penyakit IBR secara klinis, PA dan HP, meskipun respon klinis tersebut menghilang pada hari ke-21 PI. Antigen dapat dideteksi pada mukosa *nasal concha* dan trakhea dengan pewarnaan imunohistokimia. Deteksi antigen BHV-1 dengan teknik ini juga direkomendasikan oleh OIE (1996) karena lokasi antigen BHV-1 dapat dideteksi dengan jelas pada

jaringan organ dan bahwa penggunaan antibodi monoklonal akan meningkatkan spesifisitas teknik tersebut.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr L.A. Babiuk, *Veterinary Infectious Disease Organisation*, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada atas pemberian antibodi monoklonal terhadap virus BHV-1. Selain itu kepada seluruh teknisi di bagian Virologi dan Patologi juga diucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya untuk bantuan yang diberikan selama penelitian berlangsung.

### DAFTAR PUSTAKA

- ALLAN, E.M., H.M. PIRIE, P.M. MSOLLA, I.E. SELMAN and A. WISEMAN. 1980. The pathological features of severe cases of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Rec.* 107: 441-445.
- BLOOD, D.C. and O.M. RADOSTITS. 1989. *Veterinary Medicine*. 7<sup>th</sup> Ed. Bailliere Tindall. London. pp. 899-906.
- DAMAYANTI, R. dan A. WIYONO. 2005. Infeksi alami *malignant catarrhal fever* pada sapi Bali: Sebuah studi kasus. *JITV* 10: 150-159.
- DRURY, R.A.B. and E.A. WALLINGTON. 1980. *Carleton's Histological Technique*. Oxford University. pp. 36-56, 125-150.
- DUNGWORTH, D.R. 1985. The respiratory system. *In: Pathology of Domestic Animals*. K.V.F. JUBB, P.C. KENNEDY and N. PALMER. (Eds.). 3<sup>rd</sup> Ed. Academic Press Inc. London. pp. 425-426.
- EDWARD, S., D. CHASEY and H. WHITE. 1983. Experimental infectious bovine rhinotracheitis: Comparison of four antigen detection methods. *Res. Vet. Sci.* 34: 42-45.
- FRERICHS, G.N., S.B. WOODS, M.H. LUCAS and J.J. SANDS. 1982. Safety and efficacy of live and inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *Vet. Rec.* 111: 116-122.
- GIBBS, E.P.J. and RWEYEMAMU. 1977. Bovine herpesvirus. Part I. Bovine Herpesvirus 1. *Vet. Bull.* 47: 317-343.
- HALLORAN, M.E., M. HARBER, I.M. LONGINI JR and J. STRUCHINER. 1991. Direct and indirect effects in vaccines efficacy and vaccine effectiveness. *Am. J. Epid.* 133: 323-331.
- HSU, S.M. RAINE and FRANGER. 1981. The use of anti-avidin antibody and avidin-biotin peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am. J. Clin. Pathol.* 75: 816-821.
- JONES, C. 2000. Probing the genetics behind herpes virus's silent threat. <http://ard.un.edu/in/0300/genetics.html> [2 Desember 2002].

- KAASHOEK, M.J., P.J. STRAVER, E.M.A. VAN ROOY, J. QUACK and J.T. VAN OIRSCHOT. 1996. Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1. strain: Clinical and virological aspects. *Vet. Rec.* 139: 416-421.
- KAHRS, R.F. 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: A review and up to date. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171: 1055-1064.
- MARFIATININGSIH, S. 1982. Diagnosa infectious bovine rhinotracheitis-like disease pada sapi Bali di Lampung Tengah. Laporan Tahunan Balai Penyidikan Penyakit Hewan 1976-1981. Direktorat Kesehatan Hewan, Departemen Pertanian.
- MC. KERCHER, D.G., B. BIBRACK and W.P.C. RICHARDS. 1970. Effects of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the central nervous system of cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 156: 1460-1467.
- OIE. 1996. Office International des Epizooties. Manual Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 3<sup>rd</sup>. Ed. OIE, Paris, France. pp. 281-290.
- PETER, A.T. 2000. Abortion in dairy cows: New insights and economic impact. <http://www.afns.ualberta.ca/hosted/wed2000/wcd2000/proceeding/Chapter19.htm> [2 Desember 2002].
- ROCK, D., J. LOCKENSGARD, T. LEWIS and G. KUTISH. 1992. Characterisation of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpes virus 1. *J. Virol.* 66: 2484-2490.
- SAXEGAARD, F. 1970. Infectious bovine rhinotracheitis infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus infection of cattle with particular reference to genital infections. *Vet. Bull.* 40: 605-611.
- SUDARISMAN. 1992. Studi epidemiologi dan isolasi agen penyakit infectious bovine rhinotracheitis pada sapi perah di Indonesia. Laporan hasil penelitian 1992-1993. Balai Penelitian Veteriner. Puslitbangtan. Departemen Pertanian.
- SUDARISMAN. 2001. Respon klinis sapi Bali yang divaksin terhadap uji tantang dengan Bovine Herpes Virus-1 isolat lokal. *JITV* 6: 205-212.
- VAN OIRSCHOT, J.T., P.J. STRAVER, J.A.H. VAN LIESHOUT, J. QUACK, F. WESTERBRINK and A.C.A. VAN EXSEL. 1993. A sub clinical infections of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet. Rec.* 132: 32-35.
- WISEMAN, A., P.M. MSOLLA, I.E. SELMAN, E.M. ALLAN, H.J.C. CORNWELL, H.M. PIRIE and W.S. IMRAY. 1978. An acute severe outbreak of infectious bovine rhinotracheitis: Clinical, epidemiological, microbiological and pathological aspects. *Vet. Rec.* 103: 391-397.
- WIYONO, A., P. RONOARDJO, R.J. GRAYDON and P.W. DANIELS. 1989. Diare ganas sapi: I. Kejadian penyakit pada sapi Bali bibit asal Sulawesi Selatan yang baru tiba di Kalimantan Barat. *Penyakit Hewan* 38: 77-83.