

Telur Entok Berembrio Sebagai Media Propagasi Virus *Egg Drop Syndrome*

^{1*}Ni Wayan Intan Martinez, ²Gusti Ayu Yuniati Kencana, ³I Nyoman Suartha,
⁴Arini Nurhandayani

¹Mahasiswa Program Studi Magister Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,

²Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar, Bali Indonesia.

³Laboratorium Penyakit Dalam Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Denpasar, Bali Indonesia.

⁴PT Sanbio Laboratories, Wanaherang, Gunung Putri, Bogor, Jawa Barat

*Penulis koresponden: inthan.martinez@yahoo.com

Abstrak *Egg Drop Syndrome* (EDS) adalah penyakit virus unggas penyebab penurunan produksi dan kualitas telur. Untuk mencegah EDS dengan vaksinasi. Selama ini virus EDS diperbanyak pada telur bebek berembrio sebagai media propagasi virus untuk *seed* vaksin. Namun sering terkendala karena telur bebek berembrio sulit didapat dan fertilitasnya rendah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi telur entok berembrio (TEB) sebagai media propagasi virus EDS. Parameter uji berdasarkan titer HA, PCR dan stabilitas virus. Penentuan stabilitas virus dilakukan dengan pengujian HA pasca inaktivasi dengan formalin 0,1% (v/v). Sebanyak 25 butir telur entok berembrio berumur 11 hari digunakan sampel penelitian. Antigen virus EDS diencerkan 10 kali menjadi titer 2⁴ sampai 2⁰ HAU, selanjutnya pengenceran 2⁴ sampai 2⁰ HA masing-masing diinokulasikan pada lima butir telur. Telur diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari dan di-*candling* setiap hari. Hari ke-5 pasca inokulasi, semua telur dikeluarkan dari inkubator lalu dimasukkan *cool room* selama 24 jam sebelum dipanen. Cairan allantois hasil panen dikarakterisasi dengan uji hemaglutinasi, uji *Polymerase Chain Reaction*. Antigen virus EDS diinaktivasi dengan formalin 0,1% (v/v) lalu diuji stabilitasnya dengan uji hemaglutinasi. Rataan titer HA virus EDS sebesar 6.08 ± 2.88 HA Unit. Uji stabilitas menunjukkan tidak ada perubahan rata-rata titer HA pasca inaktivasi. Produk PCR virus EDS memiliki panjang DNA 460 bp. Disimpulkan telur entok berembrio dapat digunakan sebagai media propagasi virus EDS karena menghasilkan antigen virus dengan titer HA yang tinggi dan stabil pascainaktivasi formalin 0,1% (v/v).

Kata Kunci: *Egg Drop Syndrome*, EID-50, propagasi, telur entok berembrio.

I. PENDAHULUAN

Egg Drop Syndrome (EDS) merupakan salah satu penyakit hewan menular strategis (PHMS) di Indonesia yang menyebabkan kerugian ekonomis pada peternak [1]. Penyakit EDS disebabkan oleh *Duck Adenovirus 1* (DadV-1). Secara klinis penyakit EDS menunjukkan penurunan produksi telur disertai abnormalitas cangkang telur berupa cangkang lunak, tipis, atau tanpa cangkang, terkadang disertai adanya perubahan warna cangkang telur menjadi lebih pucat [2].

Pengendalian penyakit EDS telah dilakukan dengan upaya vaksinasi, namun masih sering dilaporkan kejadian kasus di beberapa daerah di Indonesia [3]. Upaya pengembangan vaksin terus dilakukan guna meningkatkan kualitas vaksin untuk mendapatkan daya proteksi yang baik terhadap virus EDS. Dalam upaya pengembangan vaksin EDS secara komersial, diperlukan media propagasi untuk mendapatkan kuantitas dan kualitas virus yang tinggi. Propagasi virus EDS dilakukan dengan menggunakan telur berembrio (*in ovo*) [4]. Penggunaan telur berembrio untuk isolasi dan propagasi virus memiliki beberapa keunggulan dibandingkan pengujian *in vitro*. Penggunaan telur berembrio tidak memerlukan media dan kondisi laboratorium yang rumit, biaya yang dibutuhkan relatif lebih murah.

Telur berembrio yang umum digunakan dalam propagasi virus EDS adalah telur bebek berembrio (TBB) dan telur angsa berembrio [2]. Namun TBB dianggap kurang ekonomis dan praktis karena sulit didapatkan dan fertilitasnya sering rendah [5]. Sehingga diperlukan sumber telur berembrio dari unggas lainnya sebagai media propagasi virus untuk menjamin tersedianya pasokan antigen vaksin sebagai bahan biologis utama vaksin [6]. Dalam laporan kasus [7], telur entok berembrio (TEB) dapat menghasilkan titer hemagglutinasi (HA) virus EDS yang. Hal tersebut mengindikasikan telur entok memiliki potensi yang baik sebagai media propagasi virus EDS.

Hingga saat ini belum ada penelitian tentang penggunaan telur entok berembrio sebagai media propagasi virus EDS. Penelitian ini ingin mengetahui kualitas virus EDS hasil propagasi pada telur entok berembrio berdasarkan karakterisasinya untuk menyiapkan antigen virus vaksin. Tujuan penelitian ini adalah menentukan media propagasi virus EDS dan karakterisasi berdasarkan atas titer HA, *egg infective dose 50%*, PCR serta stabilitas titer HA pasca inaktivasi dengan formalin 0,1% dalam larutan cairan alantois (%v/v).

II. METODE DAN PROSEDUR

Isolasi Virus Egg Drop Syndrome

Isolat virus EDS merupakan isolat dari PT. Sanbio Laboratories berasal dari bebek dengan titer HA 2^8 HAU dan $10^{6.1}$ EID₅₀/0.1ml. Isolasi virus dilakukan pada TEB umur 11 hari. Telur entok diinokulasi isolate EDS dengan 5 dosis inokulum berbeda (2^4 , 2^3 , 2^2 , 2^1 dan 2^0) masing masing 0,1ml pada ruang allantois. Cairan allantois dalam telur dipanen setelah 24 jam menggunakan spuit ukuran 10 ml [8].

Uji Hemaglutinasi (HA) Virus Egg Drop Syndrome

Pengujian HA dilakukan pada cairan allantois yang telah dipanen. Prosedur uji HA dilakukan berdasarkan metode [8] sebagai berikut. Sebanyak 25 μ l PBS diisi pada lubang plat mikro menggunakan *microdropper*. Suspensi antigen yang akan diuji diisi pada lubang pertama dan diencerkan seri kelipatan dua mulai lubang kedua sampai lubang kesebelas dengan pengencer mikro. Ditambahkan 25 μ l PBS ke semua lubang (1-12) dan diaduk dengan pengocok mikro. Kemudian ditambahkan ke semua lubang sebanyak 25 μ l suspensi sel darah merah 1% dan ayak kembali selama 3 detik. Diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam dan di amati. Reaksi positif ditandai dengan adanya bentukan kristal pada sumuran plat mikro [8].

Polimerase Chain Reaction

Isolat virus EDS dari cairan allantois diekstraksi dengan reagent Trizol®. Amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan dengan enzim SuperScript TM III onestep RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Primer *forward* menggunakan EDH4F (TTCTGTCAACCGATAAAGGT) dan primer *backward* EDSH5R (AGTTATTCCAAATGGGCAT). Pengujian PCR dilakukan pada mesin *thermocycler*.

Uji PCR dilanjutkan dengan uji elektroforesis. Pengujian elektroforesis dilakukan menggunakan agarose 1% ditambah dengan *gell red* sebanyak 5 μ l dan dilarutkan kedalam *Tris-acetate-EDTA* (TAE). Visualisasi DNA dilakukan dengan *transluminator ultraviolet* (UV) serta hasilnya didokumentasikan dengan kamera.

Inaktivasi virus egg drop syndrome dengan formalin 0,1%

Inaktivasi virus dilakukan dengan penambahan formalin 10% hingga konsentrasi akhir formalin 0,1% dalam cairan allantois (v/v). Larutan selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam diatas *magnetic stirrer*. Setelah diinkubasi virus yang telah diinaktivasi selanjutnya diuji Hemagglutinasi untuk mengetahui titer HA setelah inaktivasi [8].

Analisis Data

Analisis data hasil pengamatan terhadap titer HA virus EDS dilakukan dengan menggunakan ANOVA (*Analysis Of Variance*), perbandingan titer HA pasca inaktivasi diuji dengan Uji T- berpasangan menggunakan aplikasi SPSS 2.9 *for windows*. Hasil uji PCR dilakukann secara deskriptif. Penelitian ini dilaksanakan di Departement *Research and Development* PT. Sanbio Laboratories, Kab. Bogor, Jawa Barat.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Rata-rata titer HA pada cairan allantois TEB disajikan pada Tabel 1. Titer HA telur entok berembrio memiliki rata-rata sebesar 6.08 ± 2.88 . Rata-rata titer HA tertinggi terdapat pada konsentrasi inokulum 2^4 sebesar 8.20 ± 2.28 . Berdasarkan Tabel 1. Rataan titer HA pada TEB menunjukkan bahwa TEB memiliki kualitas yang baik sebagai media propagasi pertumbuhan virus EDS. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian terdahul yang juga berhasil menumbuhkan virus EDS yang diisolasi dari bebek terinfeksi pada TEB dengan menghasilkan titer HA yang tinggi [7]. Belakangan ini juga dilaporkan dari Cina bahwa strain virus EDS terbaru (TZ193) diketahui mempunyai daya infeksi yang lebih tinggi pada entok dibandingkan unggas lainnya [9]. Kasus lain dilaporkan terjadi pada entok dengan tingkat keparahan yang bervariasi. Ada kemungkinan telah terjadi perubahan patogenisitas pada entok dari laporan sebelumnya [10]. Hal ini mengindikasikan bahwa virus EDS pada entok lebih sensitif dibandingkan unggas lain sehingga virus mudah beradaptasi pada entok, begitupula pada telur entok berembrio.

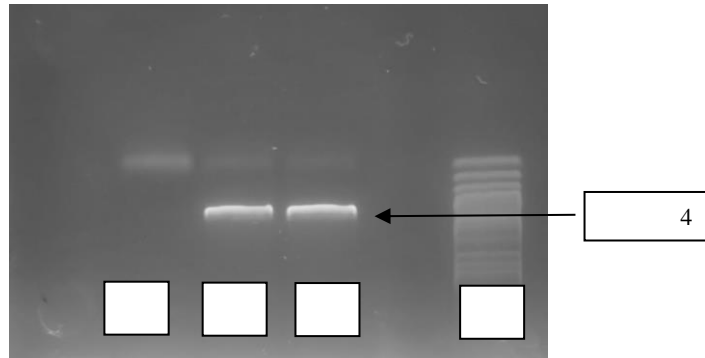
Tabel 1. Rataan titer HA virus EDS pada TEB setiap konsentrasi inokulum ($\bar{x} \pm SD$).

Konsentrasi Inokulum (HAU)	Rata-rata titer HA (log ₂) virus EDS pada telur entok ($\bar{x} \pm SD$) Telur Entok Berembrio (TEB)
2^4	8.20 ± 2.28^a

2^3	7.20 ± 1.08^a
2^2	6.40 ± 3.84^a
2^1	5.80 ± 3.76^a
2^0	2.80 ± 3.42^b
$(\bar{x} \pm SD)$	6.08 ± 2.88^a

Keterangan : \bar{x} = Rata-rata titer HA (log2); SD = Standar Deviasi; Superskrip dengan huruf yang berbeda pada satu kolom dan baris menunjukkan perbedaan yang nyata.

Deteksi molekuler dengan PCR berhasil mengamplifikasi 460 bp fragmen genom virus EDS pada cairan allantois dari telur entok. Hasil Elektroforesis ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis cairan allantois telur entok

Keterangan: M: Marker; 1: Cairan allantois telur Entok; 2: Kontrol Positif, 3: Kontrol Negatif.

Uji molekuler seperti PCR menambah nilai kualitas virus EDS yang dipropagasi secara *in vivo*. Hasil Uji PCR virus dari cairan alantosis menunjukkan hasil spesifik amplifikasi gen EDS dengan Panjang DNA 460 bp, menyerupai EDS Medan menandakan TEB dapat mempropagasi EDS secara efisien [3]. Perbandingan titer HA pasca inaktivasi dengan formalin 0,1%v/v ditabulasi pada Tabel 2. Titer HA pasca inaktivasi menunjukkan hasil yang bervariasi. Penurunan titer HA pada TEB terjadi sebanyak 1 log pada konsentrasi inokulum 2^4 dan 2^1 . Terjadi peningkatan titer HA pada konsentrasi inokulum, 2^2 . Berdasarkan hasil uji T Berpasangan, perbandingan titer HA pasca inaktivasi tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa titer HA pada telur entok dan telur bebek stabil pasca inaktivasi.

Tabel 2. Perbandingan titer HA pasca inaktivasi dengan formalin 0,1%v/v

Konsentrasi Inokulum (HAU)	Titer HA Sebelum dan Setelah Inaktivasi	
	Sebelum	Sesudah
2^4	2^{8*}	2^7
2^3	2^{7b}	2^7
2^2	2^{7a}	2^8
2^1	2^{7*}	2^6
2^0	2^{5a}	2^6
Rata-Rata	$2^{6,8}$	$2^{6,8}$

Keterangan: *: Terjadi penurunan titer HA sebanyak 1 log; **: Terjadi penurunan titer HA sebanyak 2 log; a: terjadi peningkatan titer HA sebanyak 1 log; b: Tidak ada perubahan titer HA pasca inaktivasi.

Kualitas virus EDS yang dipropagasi dapat dilihat pada uji *in vitro* dengan stabilitas titer HA yang tinggi pasca inaktivasi. Tabel 2 menunjukkan rata-rata titer HA pada TEB tetap stabil. Hal tersebut ditandai dengan tidak ada perubahan titer HA sebelum dan sesudah inaktivasi. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya [11]. Pemberian vaksin EDS inaktif memberikan kekebalan yang lebih lama dibandingkan vaksin EDS *live attenuated* [17].

Peningkatan titer HA pasca inaktivasi pada konsentrasi inokulum 2^2 terjadi sebesar 1 log. Hal ini dapat terjadi akibat sampel virus yang berupa cairan allantois mengandung senyawa protein non-virus yang mengikat partikel virus dan berinteraksi dengan formalin. Pada pengujian HA setelah inaktivasi, terjadi peningkatan jumlah virion yang bebas dari ikatan protein asal cairan allantois sehingga terjadi kenaikan titer virus [12].

IV. KESIMPULAN

Disimpulkan bahwa telur entok berembrio menghasilkan titer HA yang tinggi dan stabil sehingga dapat digunakan sebagai media propagasi virus EDS dalam upaya pengembangan vaksin dan diagnosis penyakit EDS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada PT. Sanbio Laboratories atas fasilitas penelitiannya. Terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana atas ijin dan rekomendasi penelitian di PT. Sanbio Laboratories.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kementerian Pertanian (Kementan). 2013. Keputusan Menteri Pertanian No.4026/Kpts/OT.140/4/2013. Tentang Penetapan Jenis Penyakit Hewan Menular Strategis, Jakarta.
- [2] Hafez, HM. 2011. Adenoviruses Infections With Special Attention To Inclusion Body Hepatitis/Hydropericardium Syndrome And Egg Drop Syndrome. *Pak Vet J.* 2011;31(2):85–92.
- [3] Kencana, GAY. Suartha, IN. Nurhandayani, A. dan Syamsidar. 2017 The characteristic of egg drop syndrome virus of Medan isolate. *J. Vet. Med. Anim. Sci.*, 1(1): 15-19.
- [4] Fitrawati, F. Wibowo, MH. Amanu, S. Sutrisno, B. 2015 Isolasi dan Identifikasi Egg Drop Syndrome Virus dengan Uji Hemaglutinasi dan Hemaglutinasi Inhibisi. *Jurnal Sains Vet.* Vol 33 (1): 59-68
- [5] Rashid A, Khan SH, Abbas G, Amer MY, Khan MJA, Iftikhar N. 2013. Effect of egg weight on hatchability and hatchling weight in Fayoumi, Desi and Crossbred (Rhode Island Red X Fayoumi) chickens. *Vet World.* 6:592-595.
- [6] Jordan, I. John, K. Höwing, K. Lohr, V. Penzes, Z. Gubucz-Sombor, E. Sandig, V. 2016. Continuous cell lines from the Muscovy duck as potential replacement for primary cells in the production of avian vaccines. *Avian Pathology*, 45(2), 137–155.
- [7] Ivanics, É. Palya, V. Glávits, R. Dán. Ádám. Pálfi, V. Révész, T. and Benkö, M. 2001. The role of egg drop syndrome virus in acute respiratory disease of goslings. *Avian Pathology*, 30(3), 201–208.
- [8] OIE World Organisation for Animal Health. 2017. Avian influenza (infection with avian influenza viruses). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017* [Internet].: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/ahm/2.03.04_AI.
- [9] Xinjin Shi, Xinyu Zhang, Haiwei Sun, Changqing Wei, Yingnan Liu, Jiguan Luo, Xuebo Wang, Zongyan Chen, and Hongjun Chen. 2022. Isolation and pathogenic characterization of duck adenovirus 3 mutant circulating in China. *Poultry Science*, 101(1), 101564.
- [10] Fu, G. Chen, H. Huang, Y. Cheng, L. Fu, Q. Shi, S. Lin, J. 2013. Full Genome Sequence of Egg Drop Syndrome Virus Strain FJ12025 Isolated from Muscovy Duckling. *Genome Announcements*, 1(4). doi:10.1128/genomea.00623-13
- [11] Genzel, Y. Reichl, U. 2009. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:1681–92. <http://dx.doi.org/10.1586/erv.09.128>.
- [12] Sanders B, Koldijk M, Schuitemaker H. Inactivated Viral Vaccines. *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control.* 2014 Nov 28:45–80. doi: 10.1007/978-3-662-45024-6_2. PMID: PMC7189890.