

Penelitian

Penentuan Patogenesitas Molekuler Virus Newcastle Disease yang Diisolasi dari Ayam Komersial Tahun 2013-2016

(Molecular Detection of Pathogenicity Character of Newcastle Disease Virus Isolated from Poultry Commercial Farm during 2013-2016)

Sarwo Edy Wibowo¹, Michael Haryadi Wibowo^{2*}, dan Bambang Sutrisno³

¹Mahasiswa S-2 Sain Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Bagian Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

*Penulis untuk korespondensi: mhwibowo@ugm.ac.id

Diterima 8 Desember 2016, Disetujui 13 Maret 2017

ABSTRAK

Newcastle Disease (ND) atau yang dikenal dengan “Tetelo” masih menjadi masalah di peternakan unggas komersil, meskipun telah dilakukan vaksinasi ND secara rutin, namun wabah ND masih tetap terjadi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui patogenesitas molekuler dan genotipe virus ND berdasarkan analisis sekuen fragmen gen F, serta melihat hubungan kekerabatan antara isolat dalam penelitian dengan isolat ND di Indonesia sebelumnya serta strain vaksin pada peternakan ayam yang menerapkan vaksinasi ND secara berkala. Penelitian ini menggunakan primer yang didesain dengan konsensus fragmen gen F dari GenBank dan desain dengan aplikasi amplifX pada posisi 91-800 nt dengan panjang 710bp. Urutan basa pada primer kemudian di cek dengan BLAST primer dan di uji spesifisitas dengan beberapa virus penyakit unggas yaitu vaksin infectious bronchitis (IB) 120, virus vaksin infectious laryngotracheitis (ILT), virus vaksin avian influenza (AI), dan virus vaksin infectious bursal disease (IBD). Delapan sampel paru diperoleh dari delapan peternakan ayam komersial di Yogyakarta, Semarang, Jakarta, Magelang dan Muntilan. Tiga sampel diisolasi pada telur ayam berembrio dan diidentifikasi menggunakan uji HA dan HI. Lima sampel lain dilakukan ekstraksi secara langsung dari gerusan organ paru. Sampel diidentifikasi dengan metode reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) untuk mendeteksi gen F menggunakan primer forward 5' TCT CTT GAT GGC AGC CCT CTT G '3 dan reverse 5' CCG CTA CCG ATT AAT GAG CTG AGT'3 dengan panjang produk 710 bp. Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh sampel positif virus ND. Analisis hasil sekuen dengan menggunakan perangkat lunak MEGA v.7 didapatkan susunan asam amino penyusun cleavage site ¹¹²RRQKR↓F¹¹⁷ dan ¹¹²RRRKR↓F¹¹⁷ yang menunjukkan bahwa virus ND tersebut digolongkan strain velogenik. Berdasarkan analisis pohon filogenetik isolat ND-Layer/GK-SR1/2013, ND-Lay/Pullet-80/ 27/16 (N), ND-Bro/Lingga 2L/24/2 (N), dan ND-Lay/Smg-P/2015 merupakan genotip VIII, sedangkan 3 isolat ND yaitu ND-Bro/Yog-P/2015, JKT/P1/2016 (Jakarta), dan JKT/P2/2016 (Jakarta) merupakan ND genotip VIIIh. Jarak genetik isolat yang diteliti dengan virus ND Indonesia yang pernah dilaporkan sebelumnya pada fragmen gen F posisi 91-798 berkisar 0,4 – 9,6 % dengan tingkat homologi mencapai 90,4 – 99,5%.

Kata kunci: Newcastle Disease (ND), gen F, sekuen, pohon filogenetik

ABSTRACT

Newcastle Disease (ND) or known as Tetelo was still major problem among poultry industry, despite of routine vaccination, ND outbreaks were continued to occurred. The study was retrospective study which was designed to molecular characterization of F gene fragment in particular to determine molecular pathogenicity and genotype identification of ND virus isolated from well vaccinated farm in Indonesia from 2013-2016. Molecular detection of targeted gene were used a pair specific primers which were designed using AmplifX and BLAST program. Specificity of the primer was determined to amplify NDV control positive and poultry viruses vaccine e.g. infectious bronchitis vaccine (IB) 120, infectious laryngotracheitis vaccine (ILT),

avian influenza vaccine (AI), and infectious bursal disease vaccine (IBD). Eight samples were obtained from several well vaccinated farms in Yogyakarta, Semarang, Jakarta, Magelang and Muntilan. Three of 8 samples were isolated into chicken embryonated egg while 5 samples of the rest were directly extracted its RNA. Screening of virus growth in chorioalantoic fluid were done using HA/HI test and all sample considered positive to that test were then extracted for RNA collection according to manufacture instruction and further amplification of together F gene. All of RT-PCR positive product were sent to be sequenced. Sequence were analysed by MEGA v7 program, included multiple alignment, deductive amino acid prediction, pairwise distance and phylogenetic tree analyses. Based on the data obtained from specificity test indicated that the primer designed was specific to ND virus. The amplification of F gene fragment showed clear band without any extra band with a 710 bp product size. All of RNA sample obtained from chorioallantoic fluid and directly from lung sample could be detected and identified using RT-PCR of ND virus. Sequence analyse of F gene fragment amino acid position 112-117 of all isolate viruses showed a motive belong to velogenic strain ND virus. Phylogenetic analysis shown that viruses in this study created 2 cluster of viruses that indicated to genotype VIIh and VIIi. Pairwise distance calculation indicated that F gene fragment in this study showed a homology among ND virus disposed in GenBank was 90-99,5% but compare to that of vaccine strain was 83,9-85%.

Keywords: Newcastle Disease, F gene, sequence, phylogenetic tree

PENDAHULUAN

Penyakit *Newcastle disease* (ND) merupakan penyakit yang menyerang saluran pernafasan dan pencernaan pada unggas yang disebabkan oleh virus *avian paramyxovirus* tipe 1 (APM-1) pertama kali ditemukan di Pulau Jawa pada tahun 1926 dan merupakan virus paling patogen pada unggas (Quinn *et al.*, 2011; Alexander and Senne, 2008). Penyakit ini masih menjadi permasalahan penting karena merupakan salah satu penyakit yang menimbulkan kerugian ekonomi pada industri peternakan unggas baik di Indonesia maupun di dunia (Tabbu, 2000; Robinson, 1961; Hodder *et al.*, 1994), meskipun vaksinasi rutin diberikan pada ayam tetapi infeksi virus ND pada ayam tetap terjadi. Penyakit ND memiliki angka morbiditas dan mortalitas yang sangat tinggi dan dapat mencapai 100% akibat infeksi galur velogenik terutama pada kelompok ayam peka, morbiditas 50% pada galur mesogenik, dan morbiditas mencapai 30% pada infeksi galur lentogenik (Tabbu, 2000). Rata-rata morbiditas dan mortalitas ND dalam suatu flock ayam bervariasi antara 90-100% (Haque *et al.*, 2010).

Virus ND merupakan virus *ribonucleic acid* (RNA), memiliki amplop, memiliki bentuk pleomorfik dengan diameter 13-18 nm. Genom tidak bersegmen, berutas tunggal (*single stranded*), dan berpolaritas negatif (Alexander, 2000; Mohammadamin dan Qubih, 2011). Berdasarkan jumlah kandungan nukleotida genom, virus ND dikelompokkan menjadi kelas I yang terdiri atas 15.198 nukleotida dan kelas II yang memiliki 15.186 atau 15.192 nukleotida (Czeglédi *et*

al., 2006; Khrisnamurthy and Samal, 1998). Virus virulen yang sering ditemukan pada ayam, burung peliharaan, dan unggas air dikelompokkan dalam kelas II (Dortmans *et al.*, 2011). Genom virus ND memiliki enam *open reading frame* yang mengkode *nucleocapsid protein* (NP), *phosphoprotein* (P), *matrix protein* (M), *fusion protein* (F), *hemagglutinin-neuraminidase* (HN), dan *large RNA-directed RNA polymerase* (L) (Oberdorfer and Werner, 1998; Adi *et al.*, 2010).

Sampai saat ini penyakit ND tetap endemik di banyak negara (OIE, 2012), termasuk di antaranya di Indonesia dengan kejadian penyakit yang terus berlangsung sepanjang tahun (Kencana *et al.*, 2012). Selain menghambat produksi peternakan, kerugian lain yang ditimbulkan oleh penyakit ND adalah biaya penanganan yang sangat besar terutama untuk melakukan tindakan biosekuriti dan sanitasi terhadap lingkungan yang telah tercemar virus (Sudarisman, 2009). Salah satu tindakan yang diharapkan mampu melindungi ayam dari penyakit ND adalah melalui vaksinasi (Paniago, 2007). Vaksin ND telah banyak ditemukan dan digunakan sebagai pencegahan terhadap penyakit akan tetapi ND belum dapat diatasi dengan baik sampai saat ini. Penerapan program vaksinasi terhadap virus ND juga telah dilakukan secara rutin disetiap peternakan ayam komersial, tetapi masih banyak kasus ayam komersial yang terinfeksi virus ND. Namun demikian sampai saat ini wabah ND tetap menjadi masalah yang serius industri peternakan ayam (Xiao *et al.*, 2012). Hal ini karena perbedaan genotipe virus vaksin yang

digunakan untuk vaksinasi dengan virus yang berada di lapangan tidak memberikan kekebalan yang optimal (Kim et al., 2013). Gejala klinis yang muncul dari ayam yang terinfeksi virus ND dari peternakan ayam komersial pada umumnya yaitu kematian dan tortikolis. Virus ND yang menginfeksi ayam dipeternakan komersial perlu dilakukan karakterisasi, sehingga diketahui jenis virus ND yang menyerang pada ayam komersial merupakan virus yang avirulen atau virulen. Penentuan patogenesis gen F dilakukan dalam penelitian ini sehingga diharapkan dapat memberi informasi patogenesis molekuler virus ND isolat lapangan dari peternakan ayam komersial yang melakukan vaksinasi secara rutin. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui patogenesis molekuler dan genotipe virus ND berdasarkan konsensus sekuen fragmen gen F dari virus yang teridentifikasi positif virus ND pada peternakan ayam komersial yang menerapkan program vaksinasi dengan baik. Analisis molekuler yang dilakukan bertujuan untuk memberi informasi genetik terkait virus ND dan dapat dijadikan acuan terhadap strategi pencegahan, pemberantasan dan pengendalian penyakit ND pada peternakan yang sudah melaksanakan vaksinasi secara berkala.

BAHAN DAN METODE

Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel kasus ND yang diperoleh dari peternakan ayam komersial. Sampel lapangan ini koleksi Dr. drh. M. Haryadi Wibowo dari beberapa daerah yang

diperiksa ke Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan UGM, Yogyakarta. Sampel yang diperoleh sebanyak 8 sampel dari beberapa daerah yang terjadi wabah pada ayam yang disebabkan oleh virus ND (Tabel 1).

Isolasi Virus pada Telur Ayam Berembrio (TAB)

Isolasi virus dilakukan terhadap 3 sampel paru dengan kode sampel yaitu ND-Layer/GK-SR1/2013, ND-Lay/Pullet-80/ 27/16 (N), dan ND-Bro/Lingga 2L/24/2 (N). Inokulum disiapkan dengan mencampur tiap-tiap sampel gerusan dengan penisilin-streptomisin 100 IU/ml, kemudian 0,2 ml campuran diinokulasikan pada telur ayam berembrio (TAB) *specific pathogen free* (SPF) umur 11 hari melalui ruang alantois. Telur yang telah diinokulasi kemudian diinkubasikan suhu 37 °C dengan kelembaban 60-65% dan diobservasi selama 4-7 hari (OIE, 2012). Cairan alantois dipanen dan diuji keberadaan aktivitas virus dengan uji *hemaglutinasi* (HA). Sampel yang menunjukkan adanya aktivitas virus terhadap uji HA kemudian dilanjutkan dengan uji *hemaglutinasi inhibisi* (HI) dengan serum spesifik anti-virus ND sebagai konfirmasi sebelum dilanjutkan untuk uji RT-PCR. Pengujian HA dan HI terhadap virus terisolasi dilakukan sesuai prosedur yang disarankan oleh OIE (2012). Sampel lain tidak dilakukan isolasi karena keterbatasan TAB SPF.

Isolasi RNA Virus

Isolasi RNA virus dari gerusan organ paru dan cairan korioalantois hasil dari isolasi yang menunjukkan hasil positif uji HA dan HI spesifik terhadap virus ND menggunakan *purelink viral RNA/DNA minikit* (Invitrogen, USA) mengikuti prosedur standar dari Invitrogen™.

Tabel 1 Daftar sampel yang dilakukan pengujian

No	Jenis/Kode Sampel	Asal Sampel	Tahun	Jenis Ayam
1	ND-Layer/GK-SR1/2013	Gunungkidul	2013	Layer
2	ND-Lay/Pullet-80/ 27/16 (N)	Magelang	2013	Layer
3	ND-Bro/Lingga 2L/24/2 (N)	Muntilan	2014	Broiler
4	ND-Lay/Smg-P/2015	Semarang	2015	Layer
5	ND-Bro/Yog-P/2015	Yogyakarta	2015	Broiler
6	JKT/P1/2016 (Jakarta)	Jakarta	2016	Layer
7	JKT/P2/2016 (Jakarta)	Jakarta	2016	Layer
8	JKT/P3/2016 (Jakarta)	Jakarta	2016	Layer

Primer

Primer untuk amplifikasi gen F didesain menggunakan AmplifX. Primer didesain menggunakan sekuen nukleotida gen F virus ND Makasar dari GenBank dengan kode *accession number* HQ697256. Sebelum primer didesain, dilakukan *alignment* gen F menggunakan aplikasi MEGA 7 dari beberapa sekuen dari GenBank, yaitu sekuen dari virus ND Bali/020/10 (HQ697261.1), Kudus/017/10 (HQ697259.1), Kudus/018/10 (HQ697260.1), Sragen/014/10 (HQ697258.1), Gianyar/013/10 (HQ697257.1), Makasar/003/09 (HQ697256.1), Sukorejo/019/10 (HQ697256.1), dan Banjarmasin/010/10 (HQ697254.1). Fungsi *alignment* terhadap beberapa sekuen di atas berfungsi untuk melihat bagian *conserved region* dari gen F agar primer yang didesain dapat mengamplifikasi semua virus ND. Penentuan posisi primer berdasarkan daerah yang mencakup *cleavage site* dari gen F yaitu posisi 336-351 nukleotida atau 112-117 asam amino serta daerah yang *conserved* dari beberapa sekuen gen F virus ND di atas. Sekuen nukleotida primer yang diperoleh adalah 5' TCT CTT GAT GGC AGG CCT CTT G'3 (forward) dan 5' CCG CTA CCG ATT AAT GAG CTG AGT'3 (reverse). Primer tersebut mengamplifikasi gen F pada posisi 91-800 dengan panjang target amplifikasi 710bp. Primer diuji spesifisitas secara *in silico* menggunakan Primer BLAST dari *national center for biotechnology information* (NCBI) untuk memastikan primer spesifik pada virus ND. Virus yang digunakan untuk uji spesifisitas primer yaitu virus vaksin *infectious bronchitis* (IB) 120, virus vaksin *infectious laryngotracheitis* (ILT), virus vaksin *avian influenza* (AI), dan virus vaksin *infectious bursal disease* (IBD).

Amplifikasi fragmen gen F

Sintesis cDNA dari fragmen gen F menggunakan kit *SuperScript III RT* (Invitrogen, USA), mengikuti petunjuk pabrik. Mesin yang digunakan untuk RT-PCR yaitu GeneAmp[®] PCR Applied Bio System 2400 dengan siklus sebagai berikut: cDNA (suhu 50°C selama 30 menit) sebanyak 1 siklus; *pre-denaturation* (suhu 95 °C selama 2 menit) sebanyak 1 siklus; *denaturation* (suhu 95°C selama 15 detik), *annealing* (suhu 59°C selama 30 detik), *extension* (suhu 68°C selama 60 detik) sebanyak 35 siklus; *post-extension* (suhu 72°C selama 5 menit) sebanyak

1 siklus; *hold* (suhu 4°C selama ∞). Hasil RT-PCR dielektroforesis 1,5% dengan pewarnaan *Florosafe DNA Stain*. Gel produk amplifikasi RT-PCR divisualisasi di atas UV *transilluminator* dan hasilnya didokumentasikan dengan kamera. Analisis hasil amplifikasi berdasarkan ukuran masing-masing fragmen atau pita DNA dibandingkan dengan posisi pita *marker*. Produk PCR selanjutnya di sekuensing di Laboratorium FIRT BASE (Singapura). Data hasil sekuensing berbentuk elektroferogram dan *ABI file*.

Analisis sekuen dan filogenetik

Analisis data hasil sekuensing menggunakan perangkat lunak *molecular evolution genetics analysis* (MEGA) versi 7. Data yang diperoleh dilakukan *multiple alignment* dengan metode *clustal W*. Nilai jarak genetik diperoleh dengan metode *p-distance* untuk mendapatkan jumlah nukleotida dan asam amino yang mengalami perubahan (Timura *et al.*, 2007; Dharmayanti, 2011). Data pembandingan untuk analisis *multiple alignment* dan jarak genetik menggunakan sekuen gen F virus ND dari GenBank yang pernah dilaporkan di Indonesia sebelumnya *cockatoo/indonesia/90* (AY562985), *cockatoo/Indonesia/87* (KF767104), Banjarmasin/2010 (HQ697254), Gianyar/2010 (HQ697257), Sragen/2010 (HQ697258), Kudus/2010 (HQ697259), Sukorejo/2010 (HQ697255), Bali 2010 (HQ697261), dan Makassar/2009 (HQ697256). Analisis pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor-Joining* (Timura *et al.*, 2004; Dharmayanti, 2011). Presentase replikasi pohon filogenetik yang membentuk percabangan diuji menggunakan tes *bootstrap* dari 1000 replikasi. Data pembandingan diambil dari sekuen isolat virus ND yang ada di *national center for biotechnology information* (NCBI). Data sekuen isolat virus ND pembandingan yang diperoleh dari NCBI dapat dilihat pada Tabel 2.

HASIL

Uji Spesifisitas Primer Gen F

Uji spesifisitas terhadap primer FBW yang didesain untuk mengamplifikasi gen F pada posisi 91-800 nukleotida, dengan target amplifikasi 710bp. Uji spesifisitas primer

Tabel 2 Daftar isolat virus ND dari GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)

No	Isolat	Tahun	Negara	Accession number
1	Cockatoo/Indonesia/1988/87	1987	Indonesia	KF767104
2	Ulster/67	1989	N. Ireland	M24694
3	cockatoo/Indonesia/14698/90	1990	Indonesia	AY288998
4	Aus 32-III	1993	Australia	M24700
5	Miyadera	1994	Japan	M24701
6	JKT1997	1997	Indonesia	JX393313
7	chicken/Sweden/97	1997	Swedia	GU585905
8	APMV-1/chicken/Australia/9809-19-1107/1998	1998	Australia	GU332645
9	D26/72	1999	Jepang	M24692
10	GB_1168/84	2000	Inggris	AF109885
11	B1_isolate_Takaaki	2001	USA	AF375823
12	Sterna/Astr/2755/2001	2001	Australia	AY865652
13	TW/2000	2001	Taiwan	AF358786
14	Ch/2000	2001	China	AF358788
15	FJ-1/85	2003	China	AF458009
16	F48E9	2004	China	AY508514
17	pigeon/US/TX3503/2004	2004	USA	EU477190
18	La Sota	2005	USA	M24696
19	Herts/33	2005	UK	AY741404
20	China	2007	China	EU315123
21	Italien	2007	Italy	EU293914
22	248_VB	2007	Belgia	EF026584
23	Bali-1/07	2007	Indonesia	AB605247
24	shog	2008	China	GU124591
25	Malaysia/5091-633/2009	2009	Malaysia	JQ697740
26	1.3	2009	Belgia	EF026583
27	APMV1/Broiler/PA/USA/0901/2009	2009	USA	JX901372
28	chicken/bali/020/10	2010	Indonesia	HQ697261
29	chicken/Makassar/003/09	2010	Indonesia	HQ697256
30	chicken/Sukorejo/019/10	2010	Indonesia	HQ697255
31	chicken/Banjarmasin/010/10	2010	Indonesia	HQ697254
32	chicken/Gianyar/013/10	2010	Indonesia	HQ697257
33	chicken/Kudus/017/10	2010	Indonesia	HQ697259
34	chicken/Sragen/014/10	2010	Indonesia	HQ697258
35	GD09-1	2011	China	HQ717357
36	Muscovy_duck/China(Fujian)/FP1/02	2011	China	FJ872531
37	NDV_V4	2012	Australia	JX524203
38	V4 Queensland	2012	Australia	M24693
39	Ch/SD01/13	2013	China	KF055273
40	QH1	2013	China	FJ751918

dilakukan dengan beberapa virus vaksin unggas yaitu: virus vaksin *infectious bronchitis* (IB) 120, virus vaksin *infectious laryngotracheitis* (ILT), virus vaksin *avian influenza* (AI), dan virus vaksin *infectious bursal disease* (IBD). Hasil amplifikasi dari semua sampel menunjukkan

pita DNA pada posisi 710 bp sesuai dengan besaran produk PCR gen F (Virus ND) dan tidak menunjukkan hasil positif terhadap virus IBD, IB, ILT dan AI (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa primer tersebut spesifik terhadap virus ND.

Isolasi dan Identifikasi Virus ND

Isolasi dilakukan pada 3 sampel organ paru dengan kode yaitu ND-Layer/GK-SR1/2013, ND-Lay/Pullet-80/ 27/16 (N), dan ND-Bro/Lingga 2L/24/2 (N). Isolasi dilakukan pada telur ayam berembrio (TAB) *specific pathogen free* (SPF) umur 11 hari. Tiga isolat virus ND di atas menyebabkan kematian embrio ayam selama kurang lebih 28 jam.

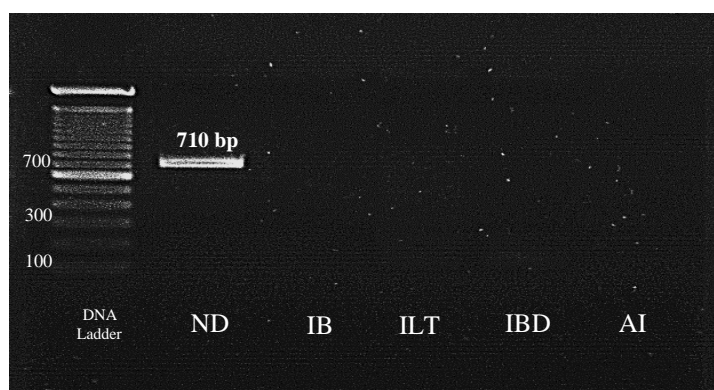
Lesi makroskopis yang terjadi pada embrio ayam umur 11 hari yang diinfeksi virus ND dari 3 isolat di atas menunjukkan lesi yang sama yaitu hemorhagi kulit. Lesi makroskopis akibat virus ND yang bersifat patogen pada penelitian ini tidak menunjukkan lesi yang spesifik karena beberapa penyakit pada unggas lain juga menunjukkan perubahan yang sama pada embrio ayam. Cairan korioalantois yang diperoleh dari isolasi selanjutnya diidentifikasi dengan uji HA, HI dan RT-PCR (Tabel 3). Hasil dari uji HA menunjukkan hasil positif, kemudian dilanjutkan dengan uji HI menggunakan serum spesifik anti ND menunjukkan hasil positif. Hasil cairan korioalantois yang positif uji HI kemudian di uji RT-PCR. Uji HA positif ditunjukkan dengan adanya agregat dari sel darah merah yang menyebabkan pengendapan sel darah merah lebih lama, karena sel darah merah berikatan dengan virus ND.

Lima lainnya yaitu ND-Lay/Smg-P/2015, ND-Bro/Yog-P/2015, JKT/P1/2016 (Jakarta), JKT/P2/2016 (Jakarta) dan JKT/P3/2016 (Jakarta) dilakukan uji identifikasi secara langsung dari gerusan organ pulmo dengan uji RT-PCR. Lima sampel tersebut tidak dilakukan isolasi karena keterbatasan telur berembrio. Hasil isolasi dan identifikasi virus di laborator-

um Mikrobiologi FKH UGM menunjukkan positif ND pada 3 sampel yang dilakukan isolasi (Tabel 3.). Hasil elektroforesis menunjukkan adanya pita DNA sejajar dengan kontrol positif pada posisi 710 bp (Gambar 2). Hal ini menunjukkan semua sampel yang diteliti tersebut dinyatakan positif ND secara molekuler. Hasil sampel yang positif RT-PCR kemudian disekuensing. Hasil sekuen yang dapat digunakan untuk dianalisis hanya 7 dari 8 sampel yang disekuensing. Hal ini terjadi karena hasil sekuen sampel nomor 8 tidak optimal untuk dilakukan analisis.

Analisis Sekuen Fragmen Gen F virus ND pada nukleotida 91-798

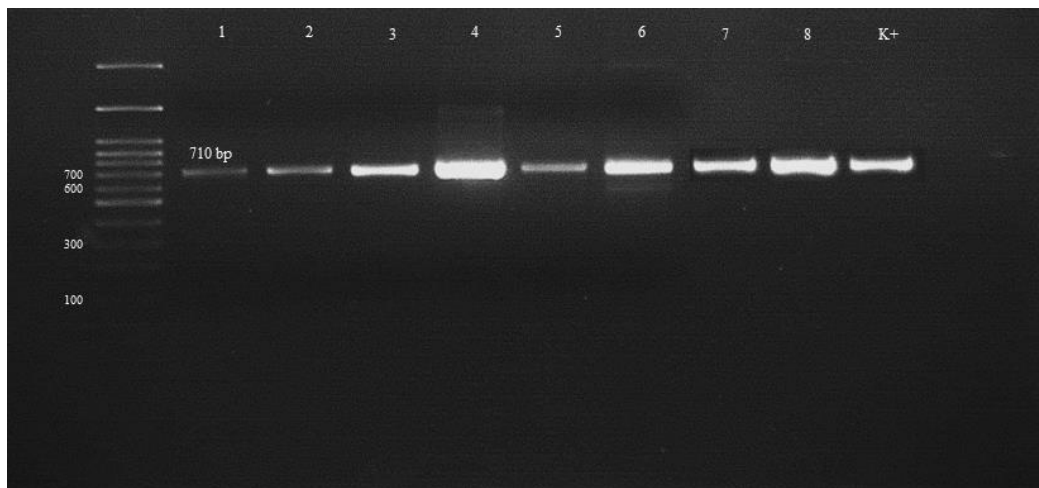
Data asam amino yang mengalami perubahan ditampilkan pada Tabel 4. Virus ND nomor 15 (ND-Bro/Lingga 2L/24/2 (N)) terjadi perubahan asam amino D³³ ke E³³, kemudian G³⁴ berubah ke C³⁴. Virus ND nomor 18 (JKT/P1/2016) dan 19 (JKT/P2/2016) terjadi perubahan asam amino G⁴⁶ ke R⁴⁶. Virus ND nomor 16 (ND-Bro/Yog-P/2015) terjadi perubahan pada A⁴⁹ ke T⁴⁹. Virus ND nomor 14 terjadi perubahan asam amino G¹¹¹ menjadi R¹¹¹. Perubahan asam amino S¹⁷⁶ ke A¹⁷⁶ dan I²⁶⁴ ke S²⁶⁴ terjadi pada sampel nomor 17 (ND-Lay/Smg-P/2015). Virus ND yang diteliti nomor 13 (ND-Layer/GK-SR1/2013), 14 (ND-Lay/Pullet-80/ 27/16 (N)), 15 (ND-Bro/Lingga 2L/24/2 (N)) dan 16 (ND-Bro/Yog-P/2015) memiliki pola urutan yang mirip dengan isolat ND dari GenBank nomor 5 (chicken/Banjarmasin/010/10), 6 (chicken/Gianyar/013/10), 7 (chicken/ Kudus/017/10), dan 9 (chicken/Sragen/ 014/10).



Gambar 1 Elektroforesis hasil amplifikasi uji spesifisitas primer FBW dengan panjang amplicon 710 bp terhadap beberapa virus yang menyerang unggas pada agarose 1,5 %

Tabel 3 Data riwayat isolat virus ND yang di isolasi dari beberapa daerah di Pulau Jawa pada tahun 2013-2016

No	Jenis/Kode Sampel	Asal Sampel	Tahun	Jenis Ayam	Status Vaksinasi	Gejala Klinis Spesifik	Hasil Uji ND		
							HA	HI	RT-PCR
1	ND-Layer/GK-SR1/2013	Gunungkidul	2013	Layer	16 minggu, revaksinasi: 1,5 bulan	Drop produksi, kematian tinggi	+	+	+
2	ND-Lay/Pullet-80/ 27/16 (N)	Magelang	2013	Layer	4, 21, 56 (hari)	Tortikolis, kematian tinggi	+	+	+
3	ND-Bro/Lingga 2L/24/2 (N)	Muntilan	2014	Broiler	4, 21(hari)	Tortikolis, kematian tinggi	+	+	+
4	ND-Lay/Smg-P/2015	Semarang	2015	Layer	15 minggu, revaksinasi: 1,5 bulan	Kematian tinggi	Tidak dilakukan		+
5	ND-Bro/Yog-P/2015	Yogyakarta	2015	Broiler	4 (hari)	Kematian tinggi	Tidak dilakukan		+
6	JKT/P1/2016 (Jakarta)	Jakarta	2016	Layer	16 minggu, revaksinasi: 1,5 bulan	Kematian tinggi, tortikolis, drop produksi	Tidak dilakukan		+
7	JKT/P2/2016 (Jakarta)	Jakarta	2016	Layer	16 minggu, revaksinasi: 1,5 bulan	Kematian tinggi, tortikolis, drop produksi	Tidak dilakukan		+
8	JKT/P3/2016 (Jakarta)	Jakarta	2016	layer	16 minggu, revaksinasi: 1,5 bulan	Kematian tinggi, tortikolis, drop produksi	Tidak dilakukan		+



Gambar 2. Elektroforesis hasil amplifikasi gen F dengan primer FBW dengan panjang amplicon 710 bp. Keterangan: 1) ND-Layer/GK-SR1/2013; 2) ND-Lay/Pullet-80/ 27/16 (N); 3) ND-Bro/Lingga 2L/24/2 (N); 4) ND-Lay/Smg-P/2015; 5) ND-Bro/Yog-P/2015; 6) JKT/P1/2016 (Jakarta); 7) JKT/P2/2016 (Jakarta); 8) JKT/P3/2016 (Jakarta); K+) Vaksin ND. DNA ladder 100 bp.

Isolat tersebut memiliki V⁵², D⁷², dan A¹⁰⁷ yang berbeda dengan isolat ND lainnya.

Isolat ND yang diteliti nomor 16 (ND-Bro/Yog-P/2015), 18 (JKT/P1/2016) dan 19 (JKT/P2/2016) memiliki kemiripan pada asam amino dengan isolat dari GenBank nomor 4 (chicken/bali/020/10), 8 (chicken/ Makassar/003/09), dan 10 (chicken/Sukorejo/019/10). Perbedaan asam amino Cockatoo/Indonesia/1988/87 terletak pada posisi R⁷⁸, R¹¹⁴, dan N¹⁷⁰. Pada isolat nomor 16 (ND-Bro/Yog-P/2015) terjadi perubahan asam amino

A⁴⁹ ke T⁴⁹, V¹⁷⁹ ke I¹⁷⁹, T²³¹ ke N²³¹ dan I²⁶⁴ ke S²⁶⁴. Perubahan asam amino G⁴⁶ ke R⁴⁶, M⁶⁷ ke I⁶⁷, K⁷¹ ke E⁷¹, G²⁴⁴ ke S²⁴⁴ pada isolat nomor 18 (JKT/P1/2016) dan 19 (JKT/P2/2016). Isolat ND pada nomor 19 (JKT/P2/2016) terjadi beberapa perubahan asam amino T¹⁰⁸ ke A¹⁰⁸ dan I²⁶⁴ ke T²⁶⁴. Urutan asam amino isolat ND dalam penelitian berbeda dengan isolat ND *Strain La Sota* (DQ195265). Virus ND *stain La Sota* yang diambil dari GenBank merupakan genotip II. Perbedaan dengan isolat penelitian ini berupa L⁶⁹, D⁸², R¹⁰¹, E¹⁰⁴, T¹⁰⁷, G¹¹², K¹⁴⁵, A¹⁷⁶, K¹⁹², Q¹⁹⁵, A²⁰³, F²³⁰, N²³¹, dan K²³². *Strain La Sota* memiliki

Tabel 4 Perubahan asam amino pada gen F virus ND posisi 33-265

No Isolat	33	34	46	49	52	69	71	72	78	82	101	104	107	108	111	112	114	115	117	121	124	132	145	170	176	179	192	195	199	203	230	231	232	235	244	264	265		
1 Cockatoo/Indonesia/1988/87	D	G	G	A	I	M	K	E	K	E	K	G	S	T	G	R	Q	K	F	V	S	A	N	D	S	V	N	R	C	T	L	T	Q	V	G	I	S		
2 cockatoo/Indonesia/14698/9	D	I	.	G
3 NDV/Bali-1/07	D	A	N	I	.	G
4 chicken/bali/020/10	D	R	R	.	.	I	N	I	.	G
5 chicken/Banjarmasin/010/10	.	.	.	V	.	.	D	A	I	.	G
6 chicken/Ganyar/013/10	.	.	.	V	.	.	D	A	I	.	G
7 chicken/Kudus/017/10	.	.	.	V	.	.	D	A	I	.	G
8 chicken/Makassar/003/09	D	R	R	.	.	I	N	I	.	G
9 chicken/Sragen/014/10	.	.	.	V	.	.	D	A	I	.	G
10 chicken/Sukorejo/019/10	D	R	R	.	.	I	N	I	.	G
11 JKT1997	D	.	.	R	I	.	G
12 LaSota	.	.	.	L	.	.	D	.	D	R	E	T	.	.	G	.	G	L	I	G	P	K	.	A	.	K	Q	W	A	F	N	K	I	G	
13 ND-Layer/GK-SR1/2013	.	.	.	V	.	.	D	A	I	.	G
14 ND-Lay/Pullet-80/27/16(N)	.	.	.	V	.	.	D	A	.	R	I	.	G
15 ND-Bro/Lingga 2L/24/2(N)	E	C	.	.	V	.	D	A	I	.	G
16 ND-Bro/Yog-P/2015	.	.	T	.	.	.	D	R	I	N	.	I	N	.	I	S	G
17 ND-Lay/Smg-P/2015	.	.	.	V	.	.	D	A	A	I	S	G
18 JKT/P1/2016 (Jakarta)	.	R	.	.	I	E	D	R	R	.	.	I	N	I	S	G	
19 JKT/P2/2016 (Jakarta)	.	R	.	.	I	E	D	R	.	.	.	A	.	.	R	.	.	I	N	I	S	T	G

urutan asam amino pada daerah *cleavage site* ¹¹²GRQGR↓L¹¹⁷ (Tabel 4).

Analisis Cleavage Site Gen F

Analisis urutan asam amino pada *cleavage site* isolat asal dari Jakarta, Gunungkidul, Magelang, Muntilan, Semarang, dan Yogyakarta tahun 2013-2016 dengan isolat yang berasal dari GenBank dihasilkan adanya perbedaan susunan asam amino penyusunnya. Virus ND yang diisolasi dari burung kakatua tahun 1990 (AY562985) memiliki susunan pada *cleavage site* dengan pola ¹¹²RRQKR↓F¹¹⁷. Sebanyak 5 sampel penelitian yang berasal dari Gunungkidul, Magelang, Muntilan, Semarang, dan Yogyakarta mempunyai persamaan susunan asam amino dengan isolat ND dari burung kakatua tersebut. Substitusi terjadi pada asam amino ke 114 dari Glutamin (Q) ke Arginin (R) pada 2 isolat yang berasal dari Jakarta dengan pola pada *cleavage site* ¹¹²RRRKR↓F¹¹⁷. Pola *cleavage site* gen F dapat dilihat pada Tabel 5.

Hasil analisis gen F pada *cleavage site* dari seluruh sampel dari beberapa daerah terbagi menjadi dalam dua pola yaitu ¹¹²RRQKR↓F¹¹⁷ (empat asam amino basa) dan ¹¹²RRRKR↓F¹¹⁷ (lima asam amino basa). Urutan tersebut

menunjukkan bahwa isolat tersebut adalah ND yang bersifat patogenik dan memiliki *cleavage site* sangat berbeda dengan virus ND yang kurang patogen. Isolat tersebut sangat berbeda dengan dengan vaksin ND Strain La Sota yang digunakan peternak. Strain La Sota yang memiliki urutan asam amino pada *cleavage site* ¹¹²GRQGR↓L¹¹⁷ merupakan virus ND lentogenik.

Analisis Genotip Virus ND

Analisis filogenetik 7 sampel yang berasal dari Magelang, Muntilan, Gunungkidul, Semarang, Yogyakarta, dan Jakarta dibandingkan dengan sekuen isolat Virus ND yang berasal dari GenBank. Data isolat ND dari GenBank dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil analisis filogenetik dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan *phylogenetic tree*, sebanyak 4 isolat virus ND yaitu ND-Layer/GK-SR1/2013, ND-Lay/Pullet-80/27/16 (N), ND-Bro/Lingga 2L/24/2 (N), dan ND-Lay/Smg-P/2015 merupakan genotip VIII, sedangkan 3 isolat virus ND yaitu ND-Bro/Yog-P/2015, JKT/P1/2016 (Jakarta), dan JKT/P2/2016 (Jakarta) merupakan ND genotip VIIh. Isolat virus ND dalam penelitian ini memiliki kekerabatan yang dekat secara genetik dengan virus ND asal Indonesia yang pernah diisolasi di Bali,

Tabel 5 Susunan residu asam amino penyusun *cleavage site*

No	Kode Sampel	Asal	Tahun	<i>Cleavage site</i> (112-117)
1	Cockatoo/Indonesia/1988/87	Indonesia	1987	RRQKR↓F
2	cockatoo/Indonesia/14698/90	Indonesia	1990	RRQKR↓F
3	NDV/Bali-1/07	Bali	2007	RRQKR↓F
4	chicken/bali/020/10	Bali	2010	RRRKR↓F
5	chicken/Banjarmasin/010/10	Banjarmasin	2010	RRQKR↓F
6	chicken/Gianyar/013/10	Gianyar	2010	RRQKR↓F
7	chicken/Kudus/017/10	Kudus	2010	RRQKR↓F
8	chicken/Makassar/003/09	Makassar	2010	RRRKR↓F
9	chicken/Sragen/014/10	Sragen	2010	RRQKR↓F
10	chicken/Sukorejo/019/10	Sukorejo	2010	RRRKR↓F
11	JKT1997	Indonesia	1997	RRQKR↓F
12	LaSota	USA	2005	GRQGR↓L
13	ND-Layer/GK-SR1/2013	Gunungkidul	2013	RRQKR↓F
14	ND-Lay/Pullet-80/ 27/16 (N)	Magelang	2013	RRQKR↓F
15	ND-Bro/Lingga 2L/24/2 (N)	Muntilan	2014	RRQKR↓F
16	ND-Bro/Yog-P/2015	Semarang	2015	RRQKR↓F
17	ND-Lay/Smg-P/2015	Yogyakarta	2015	RRQKR↓F
18	JKT/P1/2016 (Jakarta)	Jakarta	2016	RRRKR↓F
19	JKT/P2/2016 (Jakarta)	Jakarta	2016	RRRKR↓F

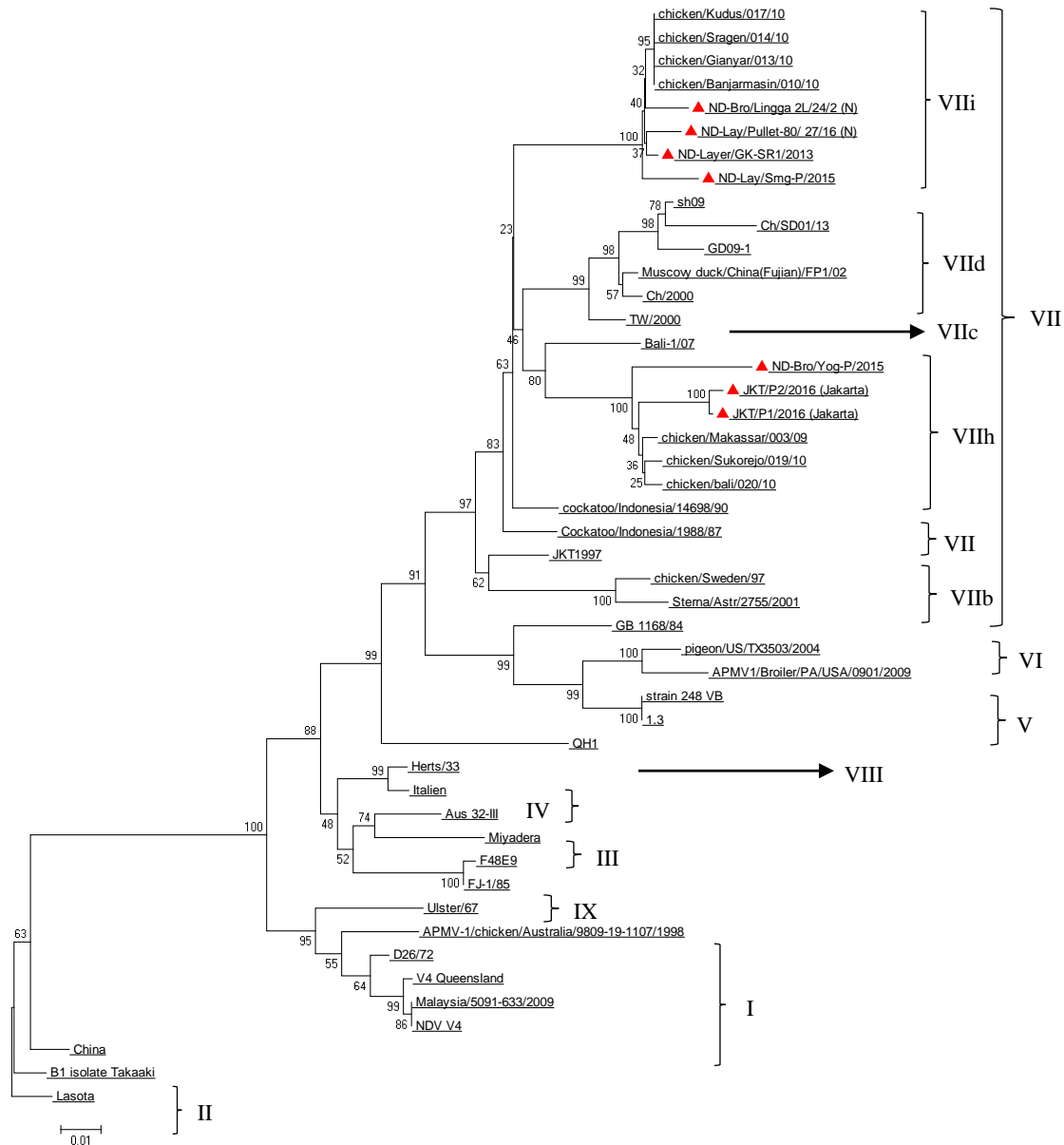
Sukorejo, Banjarmasin, Kudus, Makasar, Gianyar, Sragen dan telah dikarakterisasi pada penelitian terdahulu. Isolat virus ND dalam penelitian ini memiliki perbedaan secara genetik dengan strain virus vaksin ND *La Sota* yang termasuk dalam genotip II. Hal ini menunjukkan bahwa penyebab wabah ND pada peternakan ayam komersil, bukan disebabkan oleh virus vaksin melainkan oleh virus ND genotipe VII dan VIII.

Homologi dan Jarak Genetik antar Isolat pada Gen F

Hasil *alignment* urutan nukleotida gen F isolat ND di Indonesia yang terdaftar di GenBank dengan isolat virus ND yang digunakan dalam penelitian ini tahun 2013-2016 diperoleh jarak genetik dan nilai homologi antar isolat tersebut. Nilai jarak genetik antar isolat diperoleh nilai 0,4 % pada isolat nomor 19 (JKT/P2/2016 (Jakarta)) – 9,6 % pada isolat virus ND nomor 16 (ND-Bro/Yog-P/2015) yang dapat dilihat pada Tabel 6. Nilai homologi antar isolat yaitu antara 90,4-99,5 % isolat yang digunakan dalam penelitian ini masih mempunyai nilai homologi yang besar dengan isolat ND Indonesia terdahulu. Jarak genetik virus ND yang digunakan dalam penelitian ini dibandingkan dengan virus

vaksin *Strain La Sota* memiliki nilai 15,0 -16,1 % dengan persentase kemiripan/ homologi secara genetik sebesar 83,9- 85,0 %.

Virus yang menginfeksi ayam komersial dalam penelitian ini merupakan virus ND genotipe VII. Virus ND isolat nomor 13 (ND-Layer/GK-SR1/2013), 14 (ND-Lay/Pullet-80/ 27/16 (N)), 15 (ND-Bro/Lingga 2L/24/2 (N)), dan 17 (ND-Lay/Smg-P/2015) memiliki epitop netralisasi *conserve* dan sesuai dengan virus ND *Strain La Sota*, sedangkan virus ND isolat nomor 16 (ND-Bro/Yog-P/2015), 18 (JKT/P1/2016 (Jakarta)) dan 19 (JKT/P2/2016 (Jakarta)) menunjukkan adanya perubahan pada epitop netralisasi. Ayam komersial dalam penelitian ini yang terinfeksi virus ND genotipe VII tersebut adalah ayam yang telah divaksinasi dengan vaksin ND *Strain La Sota*. Data dalam penelitian ini menunjukkan adanya perubahan pada epitop netralisasi yaitu pada asam amino K⁷⁸ menjadi R⁷⁸ (Tabel 4) dan D¹⁷⁰ menjadi N¹⁷⁰ (Tabel 5). Perubahan asam amino pada epitop netralisasi tersebut terjadi pada virus ND yang menginfeksi ayam komersial nomor 16 (ND-Bro/Yog-P/2015), 18 (JKT/P1/2016 (Jakarta)) dan 19 (JKT/P2/2016 (Jakarta)).



Gambar 6 Pohon filogenetik dari parsial gen F virus ND yang dianalisis. Bagian gen fusi 91-798 dianalisis menggunakan MEGA v7. Analisa menggunakan *neighbor-joining* dengan *bootstrap* 1000 dan model *kimura 2-parameter*. “▲”: isolat penelitian

PEMBAHASAN

Kejadian ND di Indonesia terjadi sepanjang tahun (Kencana *et al.*, 2012). Deteksi virus ND perlu dilakukan dengan cepat dan akurat. Berkembangnya teknologi untuk deteksi virus ND dilapangan dapat dilakukan dengan metode RT-PCR. Aplikasi deteksi virus ND menggunakan metode RT-PCR memerlukan primer yang spesifik dari virus tersebut. Primer yang didesain untuk mengamplifikasi gen F dari ND dapat digunakan untuk deteksi keberadaan virus ND dari sampel (otak, trakea, paru, dan

usap kloaka) tanpa di isolasi (Singh *et al.*, 2005; Lien *et al.*, 2007).

Virus ND velogenik menyebabkan kematian pada embrio ayam dalam waktu kurang dari 60 jam setelah inokulasi (Alexander and Senne, 2008). Lesi makroskopis akibat virus ND yang bersifat patogen pada penelitian ini tidak menunjukkan lesi yang spesifik terinfeksi virus ND karena beberapa penyakit pada unggas lain juga menunjukkan perubahan yang sama pada embrio ayam. Wibowo *et al.*, (2006) menemukan bahwa infeksi virus AI dapat menyebabkan perubahan pada embrio ayam

Tabel 6 Jarak genetik virus ND antara isolat yang diteliti dengan isolat Indonesia sebelumnya serta isolat vaksin

No Isolat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1 Cockatoo/Indonesia/1988/87																			
2 cockatoo/Indonesia/14698/90	0.025																		
3 NDV/Bali-1/07	0.049	0.047																	
4 chicken/bali/020/10	0.051	0.045	0.049																
5 chicken/Banjarmasin/010/10	0.049	0.044	0.062	0.068															
6 chicken/Gianyar/013/10	0.049	0.044	0.062	0.068	0.000														
7 chicken/Kudus/017/10	0.049	0.044	0.062	0.068	0.000	0.000													
8 chicken/Makassar/003/09	0.048	0.045	0.047	0.008	0.068	0.068	0.068												
9 chicken/Sragen/014/10	0.049	0.044	0.062	0.068	0.000	0.000	0.000	0.068											
10 chicken/Sukorejo/019/10	0.051	0.048	0.049	0.008	0.068	0.068	0.068	0.008	0.068										
11 JKT1997	0.030	0.037	0.059	0.066	0.059	0.059	0.059	0.064	0.059	0.066									
12 LaSota	0.130	0.138	0.155	0.147	0.151	0.151	0.151	0.151	0.151	0.150	0.137								
13 ND-Layer/GK-SR1/2013	0.049	0.047	0.062	0.068	0.006	0.006	0.065	0.006	0.065	0.062	0.150								
14 ND-Lay/Pullet-80/_27/16_(N)	0.054	0.054	0.069	0.069	0.011	0.011	0.011	0.072	0.011	0.072	0.065	0.150	0.011						
15 ND-Bro/Lingga_2L/24/2_(N)	0.056	0.052	0.068	0.073	0.013	0.013	0.013	0.073	0.013	0.073	0.064	0.154	0.014	0.020					
16 ND-Bro/Yog-P/2015	0.071	0.069	0.073	0.035	0.090	0.090	0.090	0.038	0.090	0.032	0.088	0.155	0.088	0.092	0.096				
17 ND-Lay/Smg-P/2015	0.059	0.055	0.071	0.076	0.017	0.017	0.017	0.076	0.017	0.076	0.071	0.157	0.017	0.023	0.025	0.090			
18 JKT/P1/2016_(Jakarta)	0.059	0.061	0.059	0.024	0.081	0.081	0.081	0.024	0.081	0.021	0.076	0.160	0.078	0.082	0.086	0.048	0.081		
19 JKT/P2/2016_(Jakarta)	0.061	0.062	0.058	0.025	0.085	0.085	0.085	0.025	0.085	0.025	0.078	0.161	0.082	0.086	0.090	0.049	0.082	0.004	

berusia 9-11 hari, yaitu embrio kerdil, hemoragi pada seluruh bagian tubuh, dan kerontokan bulu embrio. Kekerdilan juga dapat terjadi pada embrio ayam yang diinfeksi oleh virus IB dan ILT (Cavanagh and Gelb, 2008; Garcia and Guy, 2008). Pada embrio ayam yang diinfeksi oleh virus IBD lesi makroskopis yang teramati berupa edema pada bagian abdomen, kongesti dan hemoragi pada kulit (Eterradossi and Saif, 2008).

Amplifikasi gen F dapat digunakan dalam identifikasi virus ND. Gen F berperan dalam menentukan patotipe virus ND sehingga banyak digunakan sebagai target amplifikasi untuk identifikasi secara molekuler (Ke et al., 2001; Alexander, 2011; Kencana et al., 2012). Gen F digunakan sebagai target amplifikasi dalam identifikasi karena gen F merupakan penentu patogenesitas secara pendekatan molekuler. Kajian virus ND secara molekuler menggunakan primer yang mengamplifikasi gen F di Indonesia telah banyak dilaporkan. Beberapa penelitian terdahulu telah mempelajari tentang karakter genetik virus ND asal ayam kampung di Aceh (Darniati et al., 2015), virus ND yang diisolasi pada saat wabah ND di lapangan (Adi et al., 2010), serta karakter genetik virus ND genotipe VII isolat Indonesia (Dharmayanti et al., 2014).

Hasil analisis urutan basa nukleotida menunjukkan bahwa semua isolat ND dalam penelitian ini termasuk ke dalam kelompok genotip VII dan secara genetik masih sama dengan virus yang telah dilaporkan sebelumnya oleh Xiao et al., (2012). Karakter

genetik isolat virus ND dalam penelitian ini sangat berbeda dengan virus ND *Strain La Sota* yang merupakan strain virus ND yang digunakan sebagai bibit vaksin. Vaksin ND yang teregistrasi dan umum digunakan oleh peternak ayam di Indonesia adalah vaksin ND *La Sota*. Virus ND *La Sota* merupakan strain lentogenik dan termasuk dalam genotip II (Alexander, 1998; Aldous et al., 2003; OIE, 2012), sedangkan virus ND pada penelitian ini memiliki pola basa K¹⁰¹ dan V¹²¹ yang merupakan ciri khas dari genotip VII (Yang et al., 1999).

Menurut OIE (2012), strain dengan pola urutan asam amino pada *cleavage site* yang memiliki minimal tiga asam amino basa termasuk dalam strain velogenik. Susunan asam amino pada *cleavage site* virus yang bersifat patogenik terhadap ayam adalah ¹¹²R/K-R-Q/K/R-K/R-R-F¹¹⁷ dan Fenilalanin (F) pada urutan asam amino ke 117 (OIE, 2012; Miller et al., 2015). Isolat tersebut sangat berbeda dengan dengan vaksin ND *Strain La Sota* yang digunakan peternak. *Strain La Sota* yang memiliki urutan asam amino pada *cleavage site* ¹¹²GRQGR↓L¹¹⁷ merupakan virus ND lentogenik. Virus ND strain lentogenik dan kurang patogen memiliki pola ¹¹²G/E-K/R-Q-G/E-R-L¹¹⁷ dengan Leusin (L) pada posisi 117 (Hao et al., 2014; Farooq et al., 2014; OIE, 2012).

Analisa filogenetik dari semua isolat virus ND dalam penelitian menunjukkan kesamaan secara genetik dengan virus ND yang menyebabkan wabah ND di Bali pada tahun 2007 (Adi et al., 2010), di Sukorejo, Sragen, Kudus, Banjarmasin, Makassar, dan Gianyar

(Xiao *et al.*, 2012) serta di negara-negara di Asia seperti Taiwan (Ke *et al.*, 2001; Lien *et al.*, 2007; Ke *et al.*, 2010), China (Liu *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010) yang merupakan genotip VII. Berdasarkan pohon filogenetik dan data yang diperoleh dari GenBank virus ND cockatoo/Indonesia/14698/90 (AY562985) adalah genotip VII, sedangkan isolat ND asal Jakarta yang diisolasi pada tahun 1997 (JX393313) merupakan virus ND genotip VIIb. Isolat ND asal Bali tahun 2007 (AB605274), Bali tahun 2010 (HQ697261), Makassar (HQ697256), dan Sukorejo (HQ697255) termasuk dalam VIIh, sedangkan isolat Kudus (HQ697259), Gianyar (HQ697257), Banjarmasin (HQ697254) dan Sragen (HQ697258) merupakan genotip VIII (Xiao *et al.*, 2010; Milleret *et al.*, 2015). Semua isolat virus ND isolat tersebut sangat berbeda secara genetik dengan virus ND *Strain La Sota* yang termasuk dalam genotip II. Virus ND *Strain La Sota* digunakan sebagai virus vaksin ND di Indonesia. Hal ini membuktikan bahwa wabah penyakit ND pada peternakan ayam komersial yang terjadi di beberapa daerah pada penelitian ini bukan disebabkan oleh virus vaksin ND melainkan virus ND genotipe VII. Adi *et al.*, (2010) dan Xiao *et al.*, (2012) pada penelitian terdahulu, pernah melaporkan bahwa penyebab wabah penyakit ND pada peternakan ayam komersial adalah virus ND genotype VII.

Nilai jarak genetik dan homologi antar isolat yang telah dilaporkan oleh Xiao *et al.*, (2012) pada isolat asal Indonesia yang termasuk dalam genotipe VII memiliki jarak genetik 0 - 7 % dan nilai homologi antara 96-100 %. Jarak genetik dan nilai homologi antar isolat yang dilakukan oleh Angeliya (2014) pada isolat ND asal wilayah kerja BPPV Regional III Lampung yaitu 0 - 8,6 % dan 91,4 - 100 %. Nilai jarak genetik virus ND yang digunakan dalam penelitian ini dibandingkan dengan *Strain La Sota* yang dipakai sebagai vaksin pada ayam komersial di Indonesia memiliki nilai 15,0 - 16,1 % dan nilai homologi yaitu 83,9 - 85,0 %. Hal ini menunjukkan bahwa isolat virus ND dalam penelitian ini berbeda dengan strain vaksin yang digunakan oleh peternak. Virus ND *Strain La Sota* berbeda dengan virus yang bersirkulasi di Indonesia (Xiao *et al.*, 2012), Korea (Kwon *et al.*, 2003), China (Liu *et al.*, 2008) dan Taiwan (Lien *et al.*, 2007).

Variasi asam amino tersebut dimungkinkan dapat meningkatkan antigenisitas karena tidak sesuai dengan epitop netralisasi yang dimiliki virus ND *Strain La Sota* yang digunakan sebagai strain vaksin pada peternakan ayam komersial tersebut. Perubahan asam amino pada epitop netralisasi ini dapat mempengaruhi antigenisitas dari virus tersebut (Sudarisman, 2009; Cho *et al.*, 2008). Hal serupa juga pernah dilaporkan pada wabah ND di Taiwan tahun 2002-2008, dimana terjadi perubahan antigenisitas dan patogenisitas virus ND penyebab wabah akibat adanya perubahan pada epitop netralisasinya (Ke *et al.*, 2010).

Keberhasilan vaksinasi dipengaruhi oleh cara pemberian dan dosis vaksin yang tepat (Dortmans *et al.*, 2012) tetapi kesesuaian epitop netralisasi juga berpengaruh dalam pembentukan respon imun yang terbentuk untuk menetralsasi virus yang menginfeksi ayam tersebut (Yusoff *et al.*, 1989; Ke *et al.*, 2010). Epitop netralisasi dapat merangsang pembentukan antibodi yang dapat menetralsasi virus tersebut. Kesesuaian epitop netralisasi strain vaksin dengan strain isolat lapangan memegang peranan penting dalam keberhasilan vaksinasi, karena antibodi yang terbentuk diharapkan dapat menetralsasi virus lapangan yang menginfeksi ayam tersebut dan tidak mengakibatkan munculnya gejala klinis serta kematian (Ke *et al.*, 2010).

Vaksin ND *La Sota* dapat memberikan perlindungan dari infeksi lapangan virus ND genotipe VII, tetapi beberapa penelitian melaporkan bahwa virus yang menyebabkan wabah penyakit ND adalah genotip VIId yang memiliki epitop netralisasi yang sama dengan strain vaksin *La Sota*. Wabah penyakit ND di Taiwan (Lien *et al.*, 2007), di China (Rui *et al.*, 2010), di Indonesia (Xiao *et al.*, 2012) terjadi pada peternakan komersial yang dilakukan vaksinasi secara intensif. Menurut Miller *et al.*, (2007) bahwa vaksinasi dengan vaksin homolog dapat meningkatkan respon imun yang terbentuk dan mengurangi terjadinya *shading* virus dibandingkan dengan vaksin heterolog.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa virus ND yang diisolasi dari peternakan ayam komersial yang telah menerapkan vaksinasi ND secara rutin memiliki motif ¹¹²RRQKR↓F¹¹⁷ dan ¹¹²RRRKR↓F¹¹⁷ yang merupakan virus ND dengan patogenisitas tinggi. Isolat virus ND-Layer/GK-SR1/2013, ND-Lay/Pullet-80/27/16 (N),

ND-Bro/Lingga 2L/24/2 (N), dan ND-Lay/Smg-P/2015 termasuk genotip VIII, sedangkan 3 isolat ND lainnya yaitu ND-Bro/Yog-P/2015, JKT/P1/2016 (Jakarta), dan JKT/P2/2016 (Jakarta) termasuk ND genotip VIIH berdasarkan analisis filogenetik. Jarak genetik isolat virus ND dalam penelitian ini dibandingkan dengan isolat virus ND asal Indonesia sebelumnya pada fragmen Gen F posisi 91-798 adalah sebesar 0,4-9,6% dengan nilai homologi 90,4-99,5 %, sedangkan apabila dibandingkan dengan virus vaksin ND strain La Sota memiliki jarak genetik sebesar 15-16% dengan nilai homologi 83,9-85%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Biosafety Engagement Program, Agricultural Research Service of United State Development Agency, America yang mendanai penelitian dengan nomor kontrak: ARS-USDA, CDRF Project 60072/2014.

"Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini".

DAFTAR PUSTAKA

- Adi AAAM, Astawa N, Putra K, Hayashi Y, and Matsumoto Y. 2013. Molecular Characterization of The Complete Genom of A Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease Virus Bali-1/07. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB605247.
- Adi AAAM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi Y, and Matsumoto Y. 2010. Isolation and Characterization of a Pathogenic Newcastle Disease Virus from a Natural Case in Indonesia. *The Journal of Veterinary Medical Science* 72(3): 313-319
- Aldous EW, Mynn JK, Banks J, and Alexander DJ. 2003. A Molecular Epidemiological Study of Avian Paramyxovirus Type 1 (Newcastle Disease Virus) Isolats by Phylogenetic of A Partial Nucleotide Sequence of the Fusion Protein Gene. *Avian Pathology* (3) 32: 239-257
- Alexander DJ and Senne DA. 2008. Newcastle Disease, Other Avian Paramyxovirus, and Pneumovirus Infection. In: Syaif YM, Fadly AM, Glysson JR, Mc Douggald LB, Nolan LK, and Swyne DE. *Disease of Poultry*, 12th Edition. Blackwell Publishing, Iowa. p75-92
- Alexander DJ. 1998. Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM (Eds.). *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. American Association of Avian Pathologists. 4th edition. Kennett Square. p156-163
- Alexander DJ. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxovirus. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) (REV SCI TECH OIE)* 19(2): 443-462.
- Alexander DJ. 2011. Newcastle Disease in the European Union 2000-2009. *Avian Pathology* 40(6): 547-558
- Angeliya L. 2014. Analisis Phylogenetic Tree dan Consensus Sequen Virus Newcastle Disease Isolat Asal Wilayah Kerja Balai Veteriner Lampung Tahun 2010-2013. Tesis S2. Sain Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. p27-52.
- Cavanagh and Gelb. 2008. Infectious Bronchitis. In: Syaif YM, Fadly AM, Glysson JR, Mc Douggald LB, Nolan LK, and Swyne DE. *Disease of Poultry*, 12th Edition. Blackwell Publishing, Iowa. p177-136.
- Cho SH, Kwon HJ, Kim TE, Kim JH, Yoo HS and Kim SJ. 2008. Variation of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase linear epitope. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(4): 1541 - 1544.
- Czeglédi A, Ujvári D, Somogyi E, Wehmann E, Werner O, Lomniczi B. 2006. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research* 120:36-48
- Darniati, Setyaningsih S, dan Indrawati A. 2015. Deteksi Molekuler dan Keragaman Virus Newcastle Disease pada Ayam Kampung di Wilayah Aceh. *Jurnal Kedokteran Hewan* 9(2): 178-184
- Dharmayanti I, Hartawan R, Hewajuli DA, and Indriani R. 2014. Phylogenetic analysis of Gentye VII of Newcastle Disease Virus in Indonesia. *African Journal of Microbiology Research* 8(13):1368-1374
- Dharmayanti NLP. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Ber-

- dasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa* 21(1): 1-10
- Dormants JCFM, Rottier PJM, Koch G, and Peeters BPH. 2011. Passaging of a Newcastle Disease Virus Pigeon Variant in Chickens Results in Selection of Viruses Mutations in the Polymerase Complex Enhancing Virus Replication and Virulence. *Journal General of Virology* 92: 336-345
- Dortmans JC, Peeters BP, Koch G. 2012. Newcastle Disease virus outbreaks: vaccine mismatch or inadequate application. *Veterinary Microbiology* 160, p17-22.
- Etteradossi and Saif YM. 2008. Infectious Bursal Disease. In: Syaif YM, Fadly AM, Glysson JR, Mc. Dougald LB, Nolan LK, and Swyne DE. *Disease of Poultry*, 12th Edition. Blackwell Publishing, Iowa. p185-208.
- Farooq M, Saliha U, Munir M, Khan QM. 2014. Biological and Genotypic Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated from Disease Outbreaks in Commercial Poultry Farms in Northern Punjab, Pakistan. *Virology Report* 3: 30-3
- Garcia and Guy. 2008. Laringotracheitis. In: Syaif YM, Fadly AM, Glysson JR, Mc. Dougald LB, Nolan LK, and Swyne DE. *Disease of Poultry*, 12th Edition. Blackwell Publishing, Iowa. p137-152
- Hao H, Chen S, Wu P, Wang J, Duan X, Wang X, Yang Z. 2014. Genomic Characterization of Two Virulent Newcastle Disease Viruses Isolated from Crested Ibis (*Nipponia nippon*) in China. *Gene* 553(2): 84-89.
- Haque MH, Hossain MT, Islam MT, Zinnah MA, Khan MSR, and Islam MA. 2010. Isolation and detection of Newcastle disease virus from field outbreaks in broiler and layer chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* 8(2):87-92.
- Hodder AN, Liu ZY, Selleck PW, Corino GL, Shiell BJ, Grix DC, Morrow CJ, and Gorman JJ. 1994. Characterization of Field Isolat of Newcastle Disease Virus Using Antipeptide Antibodies. *Avian Disease* 38: 103-118
- Ke MG, Liu JH, Lin YM, Chen HJ, Tsai SS, and Chang CP. 2001. Molecular Characterization of Newcastle Disease Viruses Isolated from Recent Outbreaks in Taiwan. *Journal of virological method* 97: 1-11
- Ke MG, Yu SW, Ho CH, Chu PY, Ke LY, Lin KH, Tsai YC, Liu HJ, and Lin MY, 2010. Characterization of Newly Emerging Newcastle Disease Viruses during 2002-2008 in Taiwan. *Virus Research* 147: 247-257.
- Kencana GAY, Kardena IM, Mahardika IG. 2012. Peneguhan diagnosis penyakit Newcastle Disease lapang pada ayam buras di Bali menggunakan teknik RT-PCR. *Jurnal Kedokteran Hewan* 6 (1): 28-31.
- Kim SH, Wanasen N, Palduri A, Xiao S, Collins PL, Samal SK. 2013. Newcastle Disease Virus Fusion Protein Is the Major Contributor to Protective Immunity of Genotype-Matched Vaccine. *Plos One* 8 (8): 1-10.
- Krishnamurthy S, and Samal SK. 1998. Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *The Journal of General Virology* 79, 2419-2424.
- Kwon HJ, Cho SH, Ahn YJ, Saeo SH, Choi KS, and Kim SJ. 2003. Molecular Epidemiology of Newcastle Disease in Republic Korea. *Veterinary Microbiology* 95: 39-48
- Lien YY, Lee JW, Su HY, Tsai HJ, Tsai MC, Hsieh CY, and Tsai SS. 2007. Phylogenetic characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan during 2003-2006. *Veterinary Microbiology* 123: 194-2002
- Liu H, Wang Z, Wu Y, Sun C, Zheng D, Xu T, and Li J. 2008. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Viruses Isolates from The Mainland China. *Veterinary Science* 85: 612-616.
- Miller PJ, Haddas R, Simanov L, Lublin A, Rehmani SF, Wajid A, Bibi T, Khan TA, Yaqub T, Setiyaningsih S, Alfonso CL. 2015. Identification of new sub-genotypes of virulent Newcastle disease virus with potential panzootic features. *Infection, Genetic, and Evolution* 29: 216-229.
- Miller PJ, King DJ, Alfonso CL, and Suarez DL. 2007. Antigenic Differences Among Newcastle Disease Virus Strain of Different Genotypes Used in Vaccine Formulation Affect Viral Shedding After A Virulent Challenge. *Vaccine* 25: 7238-7246
- Mohammadamin OG, and Qubih TS. 2011. Histopathology of virulent Newcastle disease virus in immune broiler chickens treated with IMBO®. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 25(1):9-13.
- Oberdorfer A and Werner O. 1998. Newcastle

- disease virus: Detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity. *Avian Pathology* 27(3):237-243.
- Office International des Epizooties (OIE). 2012. Newcastle Disease. Manual Standards for Diagnostic Test and Vaccine. p576-589
- Paniago M. 2007. Vaccination Against Newcastle Disease in the Hatcheries. *Ceva Animal Health Asia*. Selangor. www.thepoultry-site.com
- Qin ZM, Tan LT, Xu HY, Ma BC, Wang YL, Yuan XY, and Liu WJ. 2008. Pathotypical Characterization and Molecular Epidemiology of Newcastle Disease Virus Isolates from Different Host in China from 1996-2005. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 601-611.
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Second Edition. Blackwell Science, Iowa. p884-901
- Robinson L. 1961. *Modern Poultry Husbandry*. Cosby Lockwood Ltd. London. p694-701
- Rui Z, Yu SW, Ho CH, Chu PY, Ke LY, Lin KH, Tsai YC, Liu HJ, and Lin MY. 2010. Phylogenetic Characterization of Newcastle Disease Virus Isolates in the Mainland of China during 2001-2009. *Veterinary Microbiology* 141: 246-257.
- Singh K, Jindal N, Gupta SL, and Mittal D. 2005. Detection of Newcastle Disease Virus Genome from the Field Outbreaks in Poultry by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Poultry Science* 4(7), 472-475.
- Sudarisman. 2009. Pengaruh Perkembangan Sistem Produksi Ayam terhadap Perubahan Genetik dan Biologi Virus Newcastle Disease. *Wartazoa*. 9 (3).
- Tabbu CR. 1996. Dampak Ekonomis Dari Penyakit Unggas. *Pros. Temu Ilmiah Hasil Penelitian Peternakan, Ciawi-Bogor*, 9-11 Januari 1996. Badan Litbang Pertanian.
- Tabbu CR. 2000. *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya*. Volume 1. Penerbit Kanisius, Yogyakarta. p164-184
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11030– 11035
- Wibowo MH, Asmara W, dan Tabbu CR. 2006. Isolasi dan Identifikasi Serologis Virus Avian Influenza dari Sampel Unggas yang Diperoleh di D.I. Yogyakarta dan Jawa Tengah. *Journal Sains Veteriner* 24: 77-83.
- Xiao S, Paldurai A, Nayak B, Samuel A, Bharoto, AE, Prajitno TY, Collins PL, Samal SK. 2012. Complete genome sequences of Newcastle Disease virus strains circulating in chicken populations of Indonesia. *Journal of Virology* 86(10):5969-5970.
- Yang CY, Shieh HK, Lin YL, and Chang PC. 1999. Newcastle Disease Virus Isolated from Recent Outbreaks in Taiwan Phylogenetically Related to Viruses (Genotype VII) from Recent Outbreaks in Western Europe. *Avian Disease* 43(1): 125-130
- Yusoff K, Nesbit M, McCartney H, Meulemans G, Alexander DJ, Collins MS, Emmerson PT, and Samson ACR. 1989. Location of Neutralizing Epitopes on the Fusion Protein of Newcastle Disease Virus Strain Beaudette C. *Journal of General Virology* 70: 3105-3109.