

Penelitian

Penentuan Patotipe Molekuler Virus Newcastle Disease: Isolat Lapang di Tiga Wilayah Kabupaten Jawa Timur

(Molecular Pathotype Determination of Newcastle Disease Virus:
Field Isolate in Three Districts of East Java)

Erin Kurnianingtyas^{1*}, Surachmi Setyaningsih², Agustin Indrawati²

¹Program Studi Mikrobiologi Medik, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor 16680 Indonesia

*Penulis untuk korespondensi: erinkurnianingtyas@gmail.com

Diterima 19 Agustus 2016, Disetujui 25 November 2016

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah mengkaji keberadaan dan karakteristik molekuler virus *Newcastle disease* (VND) di tiga wilayah Kabupaten di Jawa Timur. Sampel usapan kloaka diambil dari 289 ekor unggas (262 ekor ayam dan 27 ekor bebek) pekarangan, pedagang di pasar unggas hidup, peternak, dan pengepul di wilayah Kabupaten Probolinggo, Situbondo, dan Bondowoso. Sampel usap kloaka ditumbuhkan pada telur ayam berembrio (TAB) dan deteksi virus dengan *Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (rRT-PCR) *matrix* (M). Patogenisitas virus ditentukan melalui rRT-PCR *Fusion* (F) dan sekuen gen F. Sejumlah delapan isolat lapang VND yang didapat, semuanya mempunyai afinitas lebih tinggi dengan serum Komarov dibandingkan dengan B1. Hal tersebut sesuai dengan reaksi positif yang ditunjukkan oleh rRT-PCR F. Analisis sekuen nukleotida menegaskan adanya motif asam amino *multibasic* pada *cleavage site* protein F, terbukti dari enam isolat asal ayam dan satu isolat asal bebek memiliki motif ¹¹²RRQKRF¹¹⁷, sedangkan satu isolat asal bebek lainnya mempunyai motif¹¹²RRRKRF¹¹⁷.

Kata kunci: virus *Newcastle disease*, rRT-PCR, fusi, matrik, multibasik

ABSTRACT

The purpose of this study were to assess the presence and molecular characteristics of *Newcastle disease virus* (NDV) in three districts of East Java. Two hundred eighty nine of cloacal swab samples were taken of birds (262 of chickens and 27 of ducks) backyards, farms, collection facilities, and live bird markets in the districts of Probolinggo, Situbondo, and Bondowoso. The virus was grown in embryonated chicken eggs (ECE) and virus detected by *Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (rRT-PCR) *matrix* (M). Pathogenicity was determined by rRT-PCR *Fusion* (F) and F gene sequencing. All of eight NDV isolates obtained in this study had higher affinity toward Komarov compared to B1 sera, which further supported by positive rRT-PCR F. Nucleotide sequence analysis confirmed the presence of the multibasic amino acid motif of the F protein cleavage site; six isolates of chicken origin and one isolate of duck have ¹¹²RRQKRF¹¹⁷ motif, whereas the other duck isolate showed ¹¹²RRRKRF¹¹⁷ motif.

Keywords: *Newcastle disease virus*, rRT-PCR, fusion, matrix, multibasic

PENDAHULUAN

Usaha perunggasan merupakan bidang yang paling diminati di Indonesia, terutama di pulau Jawa. Nilai ekonomis dan teknik dalam beternak unggas yang relatif mudah, merupakan alasan masyarakat Indonesia secara umum memilih untuk beternak unggas. Dalam pengembangan usaha peternakan unggas banyak ditemukan beberapa kendala yang mengancam produktivitas, diantaranya yang paling fatal adalah serangan wabah penyakit menular (Tarmudji, 2005). Satu diantara penyakit yang paling umum menyerang unggas adalah virus Newcastle disease.

Virus Newcastle disease (VND) tergolong dalam Avian paramyxovirus serotipe 1, dan terbagi menjadi kelas I dan kelas II. Virus ND memiliki enam gen utama yang mengkode protein struktural 3' -NP-P-M-F-HN-L-5' dan dua protein non struktural W dan V (Gambar 1) (Huang *et al.*, 2003). Protein M (Matrik) terletak pada permukaan bagian dalam dari virus yang berfungsi sebagai perakitan virus yang berinteraksi dengan protein nukleokapsid. Protein F (Fusi) berfungsi sebagai perantara fusi dari virus ke sel (Yusoff dan Tan, 2001). Strain virus yang bersifat avirulen dan virulen dapat dibedakan dari sekuen motif cleavage site pada protein F. Strain virus yang avirulen (lentogenik) memiliki asam amino monobasik pada protein F yaitu 112 G-R/K-Q-G-R↓L117 dan strain virus virulen (mesogenik dan velogenik) memiliki asam amino multibasik pada protein F yaitu 112R/G/K-R-Q/K-K/R-R↓F117 (Dortman *et al.*, 2011).



Gambar 1 Struktur genom virus *Newcastle disease* (Huang *et al.*, 2003)

Wabah *Newcastle disease* (ND) pertama kali terjadi di Jawa, Indonesia dan Newcastle Upon Tyne, Inggris yang dilaporkan sekitar pertengahan tahun 1920 (Dortmans *et al.*, 2011). Data yang dilaporkan oleh OIE (2015) tentang kejadian ND di Bali, Indonesia pada tahun 2007, sekitar 1500 hingga 8000 ekor ayam terinfeksi ND setiap bulannya, sedangkan kasus di Jawa Timur dilaporkan sekitar 100 sampai 1500 ekor unggas terinfeksi ND tiap bulannya dan melonjak menjadi 14000 kasus pada Februari 2011. Beberapa laporan mengenai isolat yang berhasil dikoleksi di Indonesia yaitu, tahun 2009 isolat tersebut bernama NDV/Bali-1/07 yang merupakan isolat strain velogenik dengan indeks patogenisitas

mean death time (MDT) 54 jam (Adi *et al.*, 2010), tahun 2013 kode isolat II dan XIII tergolong strain mesogenik kode VIII merupakan strain lentogenik dan TW strain velogenik yang semuanya berasal dari Tangerang (Emilia, 2015). Panus *et al.*, (2015) berhasil mengisolasi 3 isolat mesogenik dan 15 isolat velogenik diperoleh dari Kabupaten Subang. Darniati (2014) juga mendapatkan isolat velogenik lebih banyak daripada isolat mesogenik maupun lentogenik.

Jawa Timur merupakan wilayah kedua setelah Jawa Barat yang memiliki populasi ternak unggas terbanyak dengan total populasi 265 juta ekor (BPS, 2015). Kabupaten Probolinggo, Situbondo, dan Bondowoso di Jawa Timur, secara umum memiliki sistem pemeliharaan unggas secara backyard atau dikenal sebagai peternakan sektor empat dengan penanganan biosecurity yang sangat lemah. Ketiga kabupaten tersebut juga didominasi oleh pasar unggas hidup yang dinilai kurang higienis. Kondisi pasar unggas hidup berkontribusi dalam penyebaran penyakit *Newcastle*, karena hampir semua pasar unggas hidup di Indonesia tidak memiliki sanitasi yang maksimal sehingga kemungkinan adanya kontaminasi cukup tinggi. Unggas yang diperdagangkan pada pasar unggas hidup juga tidak didukung dengan informasi yang jelas tentang asal usul unggas dan status kesehatannya yang berkontribusi terhadap penyebaran penyakit ND. Oleh karena itu, unggas yang terinfeksi dalam pasar unggas maupun dari luar pasar mampu mentransmisikan penyakit dengan mudah. Susta *et al.*, (2014) menemukan beberapa isolat positif yang berasal dari pasar unggas hidup dan peternakan tanpa gejala klinis (asimtomatis).

Informasi terkait peredaran infeksi VND pada unggas di kabupaten Probolinggo, Situbondo, dan Bondowoso tersebut belum pernah dilaporkan secara ilmiah. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi, mengisolasi, dan mengarakterisasi patotipe VND di tiga wilayah Kabupaten tersebut. Data yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi untuk pengendalian penyakit di wilayah tersebut.

BAHAN DAN METODE

Sampel usapan kloaka diambil dari 129 ayam kampung, 77 ayam pedaging, 40 ayam bangkok, 10 ayam arab, empat ekor ayam petelur, dua ekor ayam ketawa, 20 itik, dan tujuh ekor entok. Pengambilan sampel penelitian dilakukan di pekarangan, pengepul, peternak, dan pasar unggas dari Kabupaten Probolinggo, Situbondo, dan Bondowoso.

Tabel 1 Data sampel asal usapan kloaka di wilayah Jawa Timur

NO	KABUPATEN	KECAMATAN	Nama Isolat	Unggas	Jumlah Sampel
1	SITUBONDO	Situbondo	IDNSIT	Ayam broiler	7
				Mentok	7
				Ayam kampung	10
		Asembagus	IDNABG	Ayam arab	10
				Ayam broiler	10
				Ayam kampung	10
				Bebek	10
		Kapongan	IDNKAP	Ayam kampung	3
				Ayam kampung	6
		Panji	IDNPJI	Ayam broiler	10
				Ayam ketawa	2
				Ayam kampung	10
				Ayam bangkok	10
				Ayam kampung	10
				Ayam bangkok	10
		Pancarukan	IDNPRN	Bebek	10
				Ayam broiler	10
				Ayam broiler	10
		Mangaran	IDNMGR	Ayam kampung	6
				Ayam broiler	10
Ayam bangkok	10				
Arjasa	IDNARS	Ayam broiler	10		
Bungatan	IDNBUN	Ayam kampung	6		
Kendit	IDNKEN	Ayam kampung	8		
		Ayam bangkok	10		
		Ayam petelur	4		
2	BONDOWOSO	Prajekan	IDNPRJ	Ayam broiler	10
		Wonosari	IDNWON	Ayam kampung	11
		Grujugan	IDNDDP	Ayam kampung	11
3	PROBOLINGGO	Kraksan	IDNSMP	Ayam kampung	10
		Gending	IDNGEN	Bebek	10
JUMLAH				Ayam kampung	7
					289

Peralatan yang digunakan cotton swab, mikropipet, mikrotips, spuit 1 cc, spuit 5 cc, plat mikrotitrasi 96 sumuran, freezer, refrigerator, sentrifus, vortex, inkubator, dan BSC level 2 (*Biosafety cabinet*). Bahan yang digunakan telur ayam berembrio (TAB) *specific pathogen free* (SPF), *penicillin*, *streptomycin*, alkohol, red blood cell (RBC) ayam, *Phosphat buffer saline* (PBS), dan media transport *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB). Pengambilan sampel swab kloaka menggunakan cotton swab kemudian dimasukkan pada tabung 2 ml yang telah berisi media BHIB dan ditransportasikan dalam rantai dingin (antara 4 sampai 8 °C) sampai saat akan dilakukan pengujian. *Pooling* dilakukan dengan setiap *pool* terdiri 5-7 individu (100 µl per individu) berdasarkan asal pengambilan dan jenis sampel, sehingga didapatkan total isolat *pool* sebanyak 56 *pool*.

Isolasi virus dilakukan dengan menginokulasi sampel *pool* yang telah ditambahkan 10000 IU/ml penisilin dan 10 mg/ml streptomisin pada TAB

SPF berumur 9 hari melalui ruang alantois. Telur ayam berembrio diinkubasi selama 4 hingga 7 hari pada suhu 37 °C (OIE, 2012). Pengamatan dilakukan setiap 8 jam dan TAB yang mati disimpan di dalam refrigerator. Cairan alantois dipanen dan diuji ada tidaknya aktivitas virus dengan uji HA, HI dan rRT-PCR gen M sebagai peneguhan awal bahwa virus yang terisolasi adalah VND. Sampel *pool* yang terdeteksi positif dengan PCR selanjutnya dilakukan pengujian kembali pada sampel usap kloaka secara individu berdasarkan sampel *pool* positif.

Uji Haemagglutination (HA) dan uji Haemagglutination Inhibition (HI) berdasarkan OIE (2012). Isolasi RNA virus dari sampel swab kloaka menggunakan *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* sesuai dengan prosedur standar dari Roche®. Amplifikasi *real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (rRT-PCR) menggunakan Ag-Path ID TM One Step RT-PCR kit dari Ambion®.

Protokol primer dan probe yang digunakan pada

penelitian ini yaitu untuk matriks (primer *forward* M+4100 5'- AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3', probe M+41695' FAMTTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC [BHQ-3]', reverse M-4220 5' CCTGAGGAGAGGCATTT-GCT A-3' dan *fusion* (primer *forward* F+48295'GGTG AGTCTATCCGGARGATACAAG-3', probe F+4894 5' FAM AAGCGTTTCTGT CTCCTTCTCCA[BHQ-3]', reverse F+4939 5'AGC TGTTGCAACCCAAG-3') (Wise et al., 2004; Pedersen, 2005). Masing-masing primer, tahapan RT selama 30 menit pada 50 °C dilanjutkan dengan 95 °C selama 15 menit. Siklus PCR yang digunakan sebanyak 40 siklus yaitu terdiri dari denaturasi selama 10 detik pada 94 °C, annealing selama 30 detik pada 52 °C dan extension selama 10 detik pada 72 °C. Primer gen F memiliki waktu annealing optimal 30 detik pada 58 °C.

Isolat positif berdasarkan rRT-PCR diamplifikasi menggunakan primer *forward* 4100 '5-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3' dan reverse 5090 '5-TCATTAACAAAYTGCTGCATCTTCCCWAC-3' (Wise et al., 2004; Kim et al., 2007). Produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1 % pada tegangan 120 V selama 35 menit. Pita ampikon berada pada 990 *basepair* (bp) dan dipurifikasi dengan QIAquick gel extraction kit sesuai dengan prosedur yang direkomendasikan. Ampikon murni disekuensing berdasarkan metode sanger menggunakan BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific).

Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisa secara deskriptif berupa tabel dan gambar berdasarkan uji HI, hasil rRT-PCR yang ditunjukkan menggunakan Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system software dan motif *cleavage site* menggunakan Bioedit version 7.2.5.

HASIL

Sampel usap kloaka sebanyak 289 dibuat menjadi 56 sampel *pool* dan didapatkan 6 sampel *pool* positif mengakibatkan kematian pada TAB yang mengindikasikan adanya infeksi agen infeksius. Cairan alantois dari enam sampel *pool* dikoleksi, kemudian dilakukan pengujian HA dan dideteksi dengan rRT-PCR gen M. Keenam sampel *pool* tersebut menunjukkan positif HA dan amplifikasi menggunakan gen M.

Keenam sampel *pool* yang terdeteksi positif VND dengan primer matriks dilakukan penanaman kembali pada keenam sampel *pool* tersebut pada TAB secara individu dengan total terakhir isolat yang didapatkan dengan menunjukkan positif HA dan kematian embrio adalah 8 isolat. Delapan isolat positif yang menyebabkan kematian pada embrio dan positif HA dilanjutkan dengan uji HI, rRT-PCR dan sekuensing.

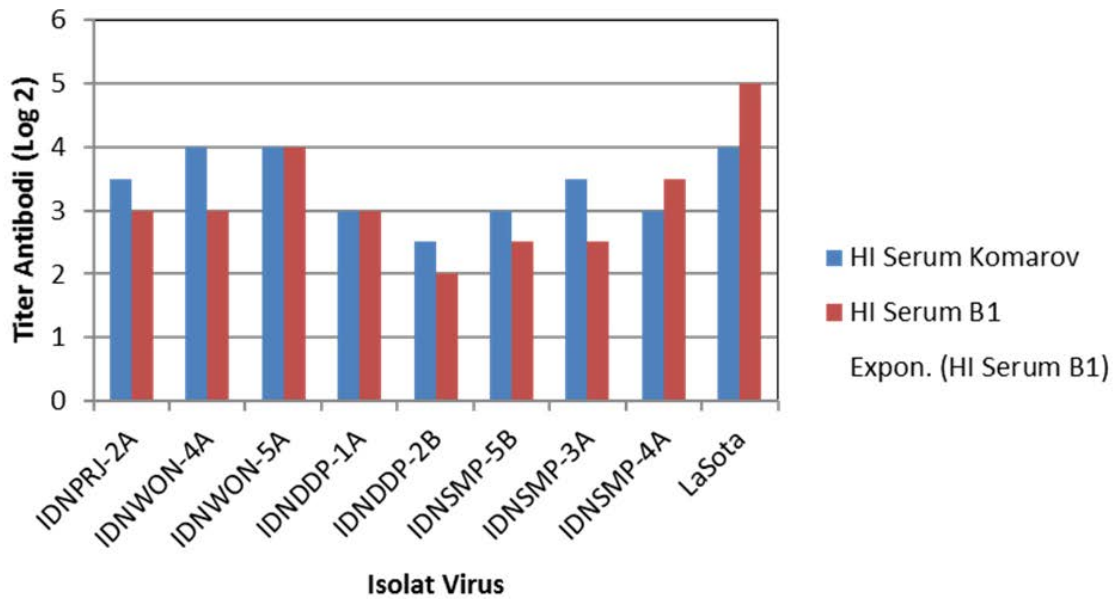
Peneguhan dari kematian embrio selanjutnya diuji menggunakan rRT-PCR gen M dan F. Kedelapan isolat terbukti positif teramplifikasi menggunakan gen M dan dilanjutkan dengan pengujian menggunakan gen F sebagai penentuan patotipe dari virus isolat tersebut, dengan menggunakan probe yang mengindikasikan virus bersifat virulen (Tabel 2) (mesogenik dan velogenik) (Wise et al., 2004).

Delapan isolat tersebut menunjukkan positif amplifikasi gen F. Hasil positif delapan isolat tersebut dilanjutkan dengan pengujian HI dan sekuensing untuk mengetahui konfirmasi secara pasti bahwa virus tersebut bersifat virulen.

Hasil yang diperoleh dari uji HI dengan antiserum Komarov berkisar antara 3 Log₂ hingga 4 Log₂, sedangkan untuk antiserum B1 menunjukkan variasi lebih rendah yaitu berkisar antara 2 Log₂ hingga 4 Log₂ (Gambar 2). Uji HI dengan antiserum B1 menunjukkan reaksi yang lebih beragam daripada antiserum Komarov, akan tetapi afinitas lebih

Tabel 2 Hasil Deteksi VND dengan rRT-PCR

Kota/Kab	Kec	Nama isolat	Lokasi	Unggas	Positif M (CT)	Positif F (CT)
Bondowoso	Prajekan	IDNPRJ-2A	Pasar	Ayam kampung	26.79	33.75
		Wonosari	IDNWON-4A	Pasar	Ayam kampung	19.33
		IDNWON-5A	Pasar	Ayam kampung	26.02	36.39
	Grujugan	IDNDDP-1A	Pasar	Ayam kampung	27.92	33.15
		IDNDDP-2B	Pasar	Ayam kampung	19.93	33.99
Probolinggo	Semampir	IDNSMP-5B	Pasar	Ayam kampung	25.84	34.86
		IDNSMP-3A	Pasar	Bebek	20.16	33.60
		IDNSMP-4A	Pasar	Bebek	18.69	29.32



Gambar 2 Perbandingan titer HI pada sampel menggunakan antiserum standar Komarov dan B1

tinggi mengarah pada antiserum Komarov. Afinitas lebih tinggi pada antiserum Komarov didukung dengan hasil positif pada perlakuan rRT-PCR gen F yang mengindikasikan bahwa semua isolat termasuk dalam virus bersifat virulen.

Hasil sekuensing asam amino dari delapan isolat dibandingkan dengan database virus ND yang terdapat pada Genbank (NCBI). Hasil motif *cleavage site* protein F, delapan isolat teridentifikasi sebagai VND bersifat virulen. Motif asam amino yang ditunjukkan yaitu tujuh isolat memiliki motif ¹¹²RRQKRF¹¹⁷ dan satu isolat dengan motif ¹¹²RRRKRF¹¹⁷. Satu isolat yang memiliki motif sekuens *cleavage site* yang berbeda berasal dari bebek yang diasumsikan bahwa virus ini mengalami mutasi atau perubahan satu basa nukleotida mampu mengubah motif asam amino yang dihasilkan (Gambar 3).

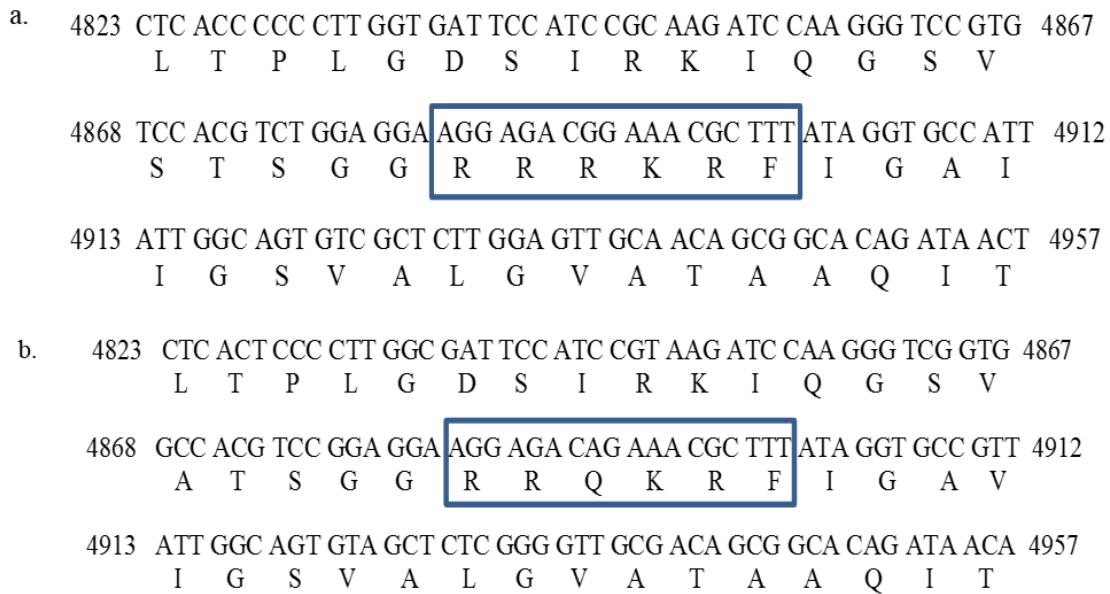
PEMBAHASAN

Embrio yang mengalami kematian akibat infeksi VND memiliki warna kemerahan diseluruh tubuhnya, berbeda dengan embrio yang normal tanpa adanya infeksi. Hal ini sesuai dengan penelitian Khorajiya et al. (2015) pada embrio yang diinfeksi dengan isolat VND, akan menimbulkan lesi *haemorrhagic* hampir diseluruh permukaan tubuh, terutama pada bagian kepala.

Penentuan patotipe dilakukan pada 8 isolat individu positif VND rRT-PCR gen M dengan menggunakan rRT-PCR gen F (Tabel 2). Amplifikasi seluruh isolat tersebut dengan menggunakan set primer

dan probe gen F (Wise et al., 2004) menunjukkan hasil positif sehingga kedelapan isolat tersebut termasuk dalam VND virulen. Protein M (Matrik) terletak pada permukaan bagian dalam dari virus yang berfungsi sebagai perakitan virus yang berinteraksi dengan protein nukleokapsid. Protein F (Fusi) berfungsi sebagai perantara fusi dari virus ke sel (Yusoff dan Tan, 2001). Secara umum penentuan patotipe secara molekuler pada VND dilakukan pada gen F, karena pada gen ini terdapat prekursor *cleavage* yang berperan pada sifat patogenisitas dari VND tersebut. Virus lentogenik memiliki aa *monobasic* pada C-terminus dari protein F2 dan leusin di N-terminus protein F1, dan pembelahannya secara ekstraseluler oleh *trypsin-like protease* yang ditemukan pada saluran pernafasan dan usus. Strain mesogenik dan velogenik memiliki motif asam amino multi-basic di C-terminus protein F2 dan fenilalanin pada N-terminus dari protein F1, dapat membelah secara intraseluler oleh *ubiquitous furin-like protease* (Ogasawara et al., 1992).

Kisaran hasil uji HI dari delapan isolat menunjukkan bahwa virus memiliki reaksi positif dengan antiserum Komarov lebih tinggi dibandingkan dengan antiserum B1, hal ini sesuai dengan hasil positif pada perlakuan rRT-PCR dengan menggunakan primer *Fusion*. Uji HI digunakan untuk mendeteksi ada tidaknya virus ND dengan menggunakan serum spesifik berdasarkan (OIE 2012). Menurut Numan et al., (2005) hasil uji HI dengan menunjukkan titer sebesar 1:4, maka diindikasikan bahwa unggas positif terserang virus, akan tetapi jika jumlah



Gambar 3 Sekuen asam amino dan nukleotida pada cleavage site protein F. a). Motif asam amino ¹¹²RRRKRF¹¹⁷ ditemukan pada 1 isolat IDNSMP-4A b). Motif asam amino ¹¹²RRQKRF¹¹⁷ pada 7 isolat lainnya

titer berada dibawah 1:4 maka dianggap sebagai nilai yang tidak spesifik. Variasi genetik epitop protein HN dari VND dapat diketahui dengan uji HI. Variabilitas dari antigenik virus bisa terjadi akibat adanya mutasi pada protein eksternal. Penelitian sebelumnya oleh Hu *et al.* (2010) bahwa adanya mutasi pada asam amino 347 protein HN menghasilkan tingkat kereaktifan yang berbeda terhadap MAb. Protein HN merupakan bagian penting dari VND yang merupakan protein permukaan virus tersebut, sehingga patogenisitas VND tidak hanya dilihat dari protein F.

Sekuensing dilakukan pada kedelapan sampel untuk melihat asam amino *cleavage site* gen F. Sekuen asam amino pada daerah *cleavage site* akan menentukan suatu isolat tersebut termasuk kelompok virus virulen atau avirulen. Motif *cleavage site* asam amino digunakan sebagai konfirmasi dari dua uji yang telah dilakukan sebelumnya. Delapan isolat menunjukkan teridentifikasi sebagai VND virulen. Menurut Farkas *et al.* (2009) sifat virus ND dibedakan menjadi dua yaitu virulen dan avirulen. Virus yang bersifat virulen memiliki setidaknya tiga asam amino lisin dan arginin antara posisi 113 dan 116 pada terminus C (motif *cleavage site*¹¹²R/K-R-Q-R/K-F¹¹⁷) dan fenilalanin (F) pada terminus N. Strain virus yang avirulen hanya memiliki sedikit asam amino *basic* pada terminus C dan leusin (L) pada posisi 117 (motif *cleavage site*¹¹²G/E-K/R-Q-G/E-R-L¹¹⁷).

Perbandingan tipe patogenisitas berdasarkan rRT-PCR gen F, uji HI, dan motif *cleavage site* menunjukkan hasil yang seragam dengan semua isolat teridentifikasi sebagai VND virulen. Motif *cleavage*

site menegaskan adanya motif asam amino *multi-basic* pada *cleavage site* protein F, tetapi isolat IDNSMP-4A memiliki motif yang berbeda dengan isolat lainnya. Motif *cleavage site* isolat IDNSMP-4A pernah ditemukan pada penelitian sebelumnya oleh Xie *et al.* (2012) pada bangau di Cina dan dinyatakan sebagai virus velogenik. Perubahan satu basa nukleotida mampu mengubah motif asam amino yang dihasilkan (Gambar 3). Perubahan asam amino yang disebabkan adanya mutasi biasanya dikaitkan dengan banyaknya keragaman genotipe pada virus tersebut. Snoeck *et al.* (2013) menunjukkan keragaman genetik dari virus ND yang bersirkulasi di daerah Afrika Tengah dan Barat dengan ditemukannya strain baru dari virus ND tersebut dan diklasifikasikan menjadi tiga genotipe yaitu XIV, XVII, dan XVIII. Jumlah asam amino yang lebih banyak pada protein F dan HN sehingga mempengaruhi struktur dari kedua protein tersebut, interaksi dan perubahan konformasi dari protein F saat proses fusi.

Virus ND ditemukan di dua kabupaten yaitu Probolinggo dan Bondowoso. Virus ditemukan pada sampel yang diambil dari pasar unggas hidup namun tidak menunjukkan gejala klinis penyakit ND. Transmisi virus akan mudah menyebar dengan cepat dari unggas sakit ke unggas sehat disekitarnya. Solomon *et al.* (2012) menemukan kesamaan secara genetik antara isolat yang diperoleh dari pasar unggas, pekarangan, dan peternakan. Aktivitas pengenalan unggas baru ke daerah baru (dari pasar ke pekarangan, maupun dari pekarangan ke pasar) merupakan salah satu faktor transmisi virus ND selain faktor kandang yang kotor dan tidak

beraturan. Pasar tradisional menjual unggas hidup yang didatangkan dari berbagai daerah tanpa diketahui kondisi kesehatannya, hal ini sesuai dengan pernyataan Hines dan Miller (2012) bahwa pasar unggas hidup tradisional dapat berkontribusi sebagai sumber dalam penyebaran virus. Kedelapan isolat positif diambil dari pasar unggas hidup dengan tidak menunjukkan gejala klinis, hal ini sesuai dengan isolat positif yang berhasil diisolasi dari pasar unggas hidup dan peternakan unggas oleh Susta et al. (2014) dengan beberapa kasus tidak menunjukkan gejala klinis.

Delapan isolat virus ND berhasil diisolasi dari enam ekor ayam kampung dan dua ekor bebek yang dijual di pasar unggas hidup tradisional; lima dari Kabupaten Bondowoso dan tiga termasuk isolat bebek dari Kabupaten Probolinggo. Berdasarkan rRT-PCR F dan uji HI, delapan isolat teridentifikasi sebagai VND virulen yang menunjukkan reaksi positif mengarah pada antiserum Komarov dan positif rRT-PCR gen F. Motif cleavage site menunjukkan enam isolat asal ayam dan satu isolat bebek memiliki motif ¹¹²RRQKRF¹¹⁷, sedangkan satu isolat asal bebek lainnya mempunyai motif ¹¹²RRRKRF¹¹⁷.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”

DAFTAR PUSTAKA

- Adi AAAM, Kardena IM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi Y, Matsumoto Y. 2011. Kloning, sekue-ncing, dan analisis filogenetik gen nukleokapsid protein virus tetelo isolat Bali-1/07. *Jurnal Veteriner* 12: 173-179.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2015. Data sensus peternakan [Internet]. [diunduh tanggal 25 Juli 2016]. Tersedia pada: <https://www.bps.go.id/linkTableDinamis/view/id/1031>.
- Darniati. 2014. Deteksi molekuler dan keragaman virus Newcastle disease pada ayam kampung di wilayah Aceh Tesis S2. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Dortmans J CFM, Koch G, Rottier PJM, dan Peeters BPH. 2011. Virulence of Newcastle disease virus: What is known so far?. *Veterinary Research* 42: 122.
- Emilia. 2013. Isolasi dan karakterisasi biologik virus Newcastle disease (VND). Tesis S2. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Farkas T, Szekely E, Belak S, Kiss I. 2009. Real-Time PCR-based pathotyping of Newcastle disease virus by use of TaqMan minor groove binder probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 2114-2123.
- Hines NL, Miller CL. 2012. Avian paramyxovirus serotype-1: A review of disease distribution, clinical symptoms, and laboratory diagnostics. *Veterinary Medicine International*. 2012:17.
- Hu S, Wang T, Liu Y, Meng C, Wang X, Wu Y, Liu X. 2010. Identification of a variable epitope on the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein. *Veterinary Microbiologi*. 140: 92-97.
- Huang Z, Krishnamurthy, Panda A, Samal SK. 2003. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and function as an alpha interferon antagonist. *Journal of Virology* 77: 8676-8685.
- Kim L M, King D J, Suarez D L, Wong C W, Afonso C L. 2007. Characterization of class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using Real-Time Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 55: 1310-1314.
- Khorajiya JH, Sunanda P, Priya DG, Joshi BP, PrapajatiKS, GhodasaraDJ, MathakiyaRA. 2015. Patho-epidemiological study on genotype-XIII Newcastle disease virus infection in commercial vaccinated layer farms. *Veterinary World* 8: 372-381.
- Numan M, Zahoor MA, Khan HA, Siddique M. 2005. Serologic status of Newcastle disease in broilers and layers in faisalabad and surrounding districts. *Pakistan Veterinary Journal* 25(2):55-58.
- [OIE] Office International des Epizooties. 2015. Disease information [Internet]. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail. Diakses tanggal 18 November 2015.
- [OIE] Office International des Epizooties. 2012. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial Animal (mammals, birds, bees). France. Paris
- Ogasawara T, Gotoh B, Suzuki H, Asaka J, Shimokata K, Rott R, Nagai Y. 1992. Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *The Embo Journal*. 11: 467-472.
- Panus A, Setyaningsih S, Mayasari NLPI. 2015. Newcastle disease virus infection study on duck and chicken in Subang district. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 20: 134-147.

- Pedersen JC. National Veterinary Services Laboratories. 2005. Real-time RT-PCR for detection of virulent Newcastle disease virus in clinical samples. USDA APHIS, ed. AVPRO1505.03. Ames, IA. USA
- Snoeck CJ, Ademola AO, Ammanuel C, Bello RA, Mbah PO, Adeniyi T A, Giscard FK, Emmanuel N, Alain LF, MullerCP. 2013. High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in west and central Africa: cocirculation of genotype XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 2250-2260.
- Susta L, Jones MEB, Cattoli G, Garcia S C, Miller PJ, Brown CC, Afonso CL. 2014. Pathologic characterization of genotypes XIV and XVII Newcastle disease viruses and efficacy of classical vaccination on specific pathogen-free birds. *Veterinary Pathology* 52: 120-121.
- Solomon P, Abolnik C, Joannis TM, Bisschop S. 2012. Virulent Newcastle disease virus in Nigeria: identification of a new clade of sub-lineage 5f from livebird markets. *Virus Genes* 44: 98-103.
- Tarmudji. 2005. Penyakit pernafasan pada ayam, ditinjau dari aspek klinik dan patologi serta kejadiannya di Indonesia. *Wartazoa* 15: 72-83.
- Wise MG, Suarez DL, Seal BS, Pedersen JC, Senne DA, King DJ, Kapczynski SR, Spackman E. 2004. Development of a real-time reverse transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 329-338.
- Xie Z, Xie L, Chen A, Liu J, Pang Y, Deng X, Xie Z, Fan Q. 2012. Complete genome sequence analysis of a Newcastle disease virus isolated from a wild egret. *Journal of Virology*. 86: 13854-13855.
- Yusoff K, Tan WS. 2001. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathology* 30: 439-455.