

DETEKSI MOLEKULER DAN KERAGAMAN VIRUS *NEWCASTLE DISEASE* PADA AYAM KAMPUNG DI WILAYAH ACEH

Molecular Detection and Diversity of Newcastle Disease Virus Isolates from Native Chickens in Aceh

Darniati¹, Surachmi Setyaningsih², dan Agustin Indrawati³

¹Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

³Laboratorium Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

E-mail: darni_jpn@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan virus *Newcastle disease* (VND) dan mengkaji keragaman dari virus terisolasi. Sampel penelitian berupa usapan kloaka dan orofaring dari 177 ekor ayam kampung yang diambil dari unggas pekarangan dan pasar unggas di 12 kecamatan dalam wilayah Kabupaten Aceh Besar dan Kota Banda Aceh. Penapisan virus dilakukan pada sampel *pool* dengan *real-time reverse transcription-polymerase chain reaction* (rRT-PCR) dengan target gen matriks. Inokulasi 309 sampel representasi 157 ayam asal *pool* positif matriks pada telur ayam berembrio *spesifik pathogen free* (SPF) menghasilkan 69 isolat yang berasal dari 51 ekor ayam. Sebagian besar (45,09%) ayam mengeluarkan virus melalui orofaring, 25,39% melalui kloaka dan orofaring, serta 19,61% melalui kloaka. Karakterisasi keragaman isolat dilakukan dengan uji *hemagglutination inhibition* (HI) menggunakan serum Komarov dan Hitchner B1, rRT-PCR gen fusi dan uji elusi. Adanya keragaman epitop permukaan virus ditunjukkan dengan titer HI yang bervariasi antar isolat, perbedaan mencapai 4 log dengan serum Komarov, dan 3 log dengan B1. Sebagian besar isolat mempunyai afinitas yang lebih tinggi terhadap serum Komarov yang mengindikasikan kecenderungan kepada galur virulen. Penentuan patogenisitas menggunakan rRT-PCR menunjukkan 73,95% isolat termasuk ke dalam galur virulen (mesogenik/velogenik), sementara dari uji elusi menunjukkan 72,46% isolat termasuk galur velogenik, 20,29% mesogenik dan 7,25% dari galur lentogenik.

Kata kunci: *Newcastle disease*, rRT-PCR, virulensi, keragaman *antigenic*

ABSTRACT

The aims of this research were to detect the presence and examine the diversity of *Newcastle disease virus* (NDV) isolates. The samples were cloacal and oropharynx swabs taken from 177 native chickens from backyard farms and life birds markets in 12 subdistricts in Aceh Besar district and Banda Aceh city. Screening was done by *real-time reverse transcription-polymerase chain reaction* (rRT-PCR) to detect matrix gene in pooled samples. SPF egg inoculation of 3099 samples representing 157 chickens from matrix positive yielded 69 isolates originated from 51 individual chickens. Majority (45.09%) of the chickens shed the virus via oropharynx, 25.39% via cloaca and oropharynx, and 19.61% through cloaca. Characterization of viral isolates performed by the *hemagglutination inhibition* (HI) test using Komarov and Hitchner B1 antisera, fusion rRT-PCR and elution test. The existence of surface epitop diversity was indicated by HI titer variation among isolates; up to 3 log or 4 log differences with B1 and Komarov, respectively, was achieved. Most of isolates had higher affinity to Komarov antibody indicating a tendency toward virulent strain. Pathogenicity determination using fusion rRT-PCR showed 73.95% of isolates belonging to the virulent strain (mesogenic/velogenic), while the elution time demonstrated 72.46% of isolates were grouped to velogenic strain, 20.29% mesogenic and 7.25% lentogenic strains.

Key words: *Newcastle disease*, rRT-PCR, virulence, *antigenic diversity*

PENDAHULUAN

Virus *Newcastle disease* (VND) termasuk ke dalam famili *Paramyxoviridae*, genus *Avulavirus*, memiliki 10 serogroup, yaitu *avian paramyxovirus* (APMV)-1 sampai APMV-10. Virus ND digolongkan ke dalam serogroup APMV-1 dan merupakan virus paling patogen pada unggas (Alexander dan Senne, 2008; OIE, 2012). Walaupun mempunyai satu serotipe, VND dapat dibagi menjadi 4 patotipe berdasarkan gejala klinis penyakit pada ayam, yaitu tipe *viscerotropic velogenic* menyebabkan infeksi akut yang parah dengan gejala lesi hemoragi pada organ pencernaan, tipe *neurotropic velogenic* dengan gejala gangguan pernafasan dan saraf, tipe *mesogenic* yang kurang patogen dan biasanya menimbulkan gangguan pada hewan muda, dan tipe *lentogenic* dengan gejala pernafasan ringan. Kedua tipe terakhir sering dijadikan sebagai bahan pembuatan vaksin dan tipe *asymptomatic enteric* yang disebabkan

oleh infeksi sub klinis galur lentogenik (Alexander dan Senne, 2008).

Virus ND merupakan virus *ribonucleic acid* (RNA), memiliki amplop, berbentuk pleomorfik dengan diameter 13-18 nm. Genom tidak bersegmen, berutas tunggal (*single stranded*), dan berpolaritas negatif (Alexander, 2000; Mohamamadamin dan Qubih, 2011). Berdasarkan kandungan nukleotida genom, VND dikelompokkan menjadi kelas I yang terdiri atas 15.198 nukleotida dan kelas II yang memiliki 15.186 atau 15.192 nukleotida. Virus virulen yang sering ditemukan pada ayam, burung peliharaan, dan unggas air dikelompokkan ke dalam kelas II (Dortmans *et al.*, 2011). Genom VND memiliki enam *open reading frames* (ORF) yang mengkode *nucleocapsid protein* (NP), *fosfoprotein* (P), *matrix protein* (M), *fusion protein* (F), *hemagglutinin-neuraminidase* (HN) dan *large RNA-directed RNA polymerase* (L) (Oberdorfer dan Werner, 1998; Adi *et al.*, 2010).

Karakteristik biologis Paramyxovirus ditentukan berdasarkan aktivitas hemagglutinin, neuraminidase, hemolisis dan fusi sel. Kemampuan VND mengaglutinasi eritrosit disebabkan oleh ikatan hemagglutinin pada reseptor permukaan sel. Hambatan aglutinasi oleh antiserum spesifik dapat digunakan untuk mengidentifikasi virus. Enzim neuraminidase berperan untuk melepaskan progeni virus dari permukaan sel dan mencegah *reattachment* sehingga dapat menginfeksi sel-sel baru. Aktivitas neuraminidase akan menghambat kerja hemagglutinin untuk menempel pada sel inang dengan menghilangkan reseptor *sialic acid* (Rout, 2007). Perlekatan VND pada reseptor diikuti dengan fusi membran virus pada membran sel. Reaksi fusi dapat menyebabkan penggabungan dua atau lebih sel inang hingga membentuk *syncytia* ketika partikel virus membentuk tunas pada sel. Dinding eritrosit yang kaku akan lisis ketika virus keluar dari sel (Alexander dan Senne, 2008).

Tingkat virulensi berhubungan dengan tropisme jaringan dan sistem kekebalan inang. Spesies inang, status imun, umur, lingkungan, ko-infeksi dengan organisme lain, dosis virus, dan jalur paparan juga dapat memengaruhi keparahan penyakit (Umali *et al.*, 2013). Faktor yang menentukan tingkat virulensi antar galur antara lain terletak pada kecepatan multiplikasi virus, semakin cepat virus bereplikasi akan semakin ganas. Selama proses replikasi, protein fusi virus (*precursor F glycoprotein*, F0) akan terpecah menjadi F1 dan F2 yang memperantarai fusi virus dengan membran sel inang (Rout, 2007). Protein F0 pada galur virulen dapat terpecah oleh kebanyakan protease inang yang terdapat di semua jaringan, sehingga dapat menyebar dengan cepat dan meluas dalam tubuh inang, sedangkan protein F0 pada galur avirulen dapat membelah dalam sel yang mengandung "*trypsin-like enzyme*" dan hanya terdapat mukosa saluran pencernaan dan respirasi. Hal ini menunjukkan bahwa variasi antara galur virulen dan avirulen disebabkan adanya perbedaan urutan nukleotida pada daerah pembelahan protein F0 (Alexander, 2000).

Penyakit ND memiliki angka morbiditas dan mortalitas yang sangat tinggi dan dapat mencapai 100% akibat infeksi galur velogenik terutama pada kelompok ayam yang peka, 50% pada galur mesogenik, dan mencapai 30% pada infeksi virus galur *lentogenik* (Tabbu, 2003). Rata-rata morbiditas dan mortalitas ND dalam suatu flock ayam bervariasi antara 90-100% (Haque *et al.*, 2010). Virus ND virulen menimbulkan dampak yang sangat merugikan bagi dunia perunggasan di berbagai belahan dunia. Meskipun vaksinasi rutin diberikan pada ayam tetapi infeksi tetap terjadi dan menjadi masalah besar dalam industri peternakan unggas.

Teknik molekuler seperti *real-time reverse transcription polimerase chain reaction* (rRT-PCR) telah dikembangkan sebagai uji cepat untuk penegakan diagnosis ND melalui deteksi materi genetika virus. Desain primer dan *probe* spesifik matriks APMV-I dapat mendeteksi semua galur APMV-I, sedangkan

kombinasi primer dan *probe* dengan target gen *fusion* hanya mendeteksi galur VND virulen mencakup galur mesogenik dan velogenik (NVSL, 2005; Kim *et al.*, 2007). Pengujian tingkat patogenitas dan virulensi VND juga dapat dilakukan dengan uji *mean death time* (MDT), uji *intravenous pathogenicity index* (IVPI) dan *intracerebral pathogenicity index* (ICPI), uji *cytopathic effect* (CPE), uji elusi dan uji termostabilitas protein HA, yang berguna untuk karakterisasi dan pengelompokan virus ke dalam galur tertentu (Alexander dan Senne, 2008; Fazel *et al.*, 2012).

Penyakit ND menjadi perhatian utama pemerintah di Kabupaten Aceh Besar selain *Avian Influenza*. Selama tahun 2011, hampir seluruh kecamatan dalam wilayah Aceh Besar dilaporkan mengalami wabah ND dengan rata-rata 100 kasus di tiap kecamatan. Usaha penanggulangan dilakukan dengan melaksanakan vaksinasi dan pengawasan lalu lintas unggas dari daerah-daerah yang diduga tercemar penyakit ND (DISNAK, 2012). Diagnosis penyakit umumnya dilakukan berdasarkan gejala klinis dan patologis. Sampai saat ini belum ada upaya deteksi dan isolasi VND yang bersirkulasi di wilayah Aceh, sehingga penelitian ini dirancang untuk mendeteksi VND khususnya pada ayam kampung, menentukan rute ekskresi, mengisolasi serta mengkaji keragaman karakter isolat virus.

MATERI DAN METODE

Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa usapan kloaka dan orofaring yang diambil dari 177 ayam kampung yang dipelihara masyarakat dengan cara diumbar dan pedagang unggas keliling yang berjualan di pasar unggas. Pengambilan sampel kloaka dan orofaring diulas dengan *cotton swab* steril dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi media *brain heart infusion broth* (BHIB). Sampel *swab* kloaka dan orofaring dilakukan *pooling* 5-7 individu berdasarkan jenis, asal dan waktu pengambilan sampel.

Isolasi Virus RNA

Virus RNA diisolasi dari sampel kloaka dan orofaring menggunakan *high pure viral nucleic acid kit* mengikuti prosedur standar dari Roche®.

Uji *Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction* (rRT-PCR)

Amplifikasi rRT-PCR menggunakan *Ag-Path ID TM One-Step RT-PCR kit* dari Ambion®. Primer dan *probe* yang digunakan ditampilkan pada Tabel 1 mengacu kepada Wise *et al.* (2004). Hasil rRT-PCR dianalisis menggunakan *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system software*.

Isolasi Virus pada Telur Ayam Berembrio (TAB)

Isolasi virus dilakukan terhadap sampel individual kloaka dan orofaring yang positif terhadap matriks dengan rRT-PCR. Inokulum disiapkan dengan

mencampurkan tiap-tiap sampel dengan penisilin-streptomisin (9:1), kemudian 0,2 ml campuran diinokulasikan pada telur ayam berembrio (TAB) *specific pathogen free* (SPF) melalui ruang alantois (*allantoic cavity*). Telur yang telah diinokulasi kemudian diinkubasikan suhu 37° C dengan kelembaban 60- 65% dan diobservasi selama 4-7 hari pada (OIE, 2012). Cairan alantois dipanen dan diuji keberadaan aktivitas virus dengan uji *hemagglutination* (HA). Sampel yang telah menunjukkan adanya aktivitas virus pada uji HA dikonfirmasi sebagai VND dengan rRT-PCR matriks.

Uji Hemagglutination (HA) dan Hemagglutination Inhibition (HI)

Pengujian HA dan HI terhadap virus terisolasi dilakukan sesuai prosedur yang disarankan oleh OIE (2012).

Uji Elusi

Patogenitas atau virulensi virus ND dapat dilihat dari kemampuan virus melepaskan kembali eritrosit ayam oleh enzim neuraminidase. Uji elusi dilakukan sesuai Ezeibe dan Ndip (2005), yaitu dengan memasukkan 50 µl *phosphate buffered saline* (PBS) pada pelat mikro dari sumuran 1-12. Sebanyak 50 µl antigen ditambahkan pada sumuran pertama dan dihomogenkan dengan kelipatan dua sampai ke

sumuran 12. *Red blood cell* (RBC) 0,6% sebanyak 50 µl dimasukkan ke tiap sumuran, digoyang perlahan dan ditempatkan pada suhu ruang. Perhitungan waktu elusi dimulai setelah reaksi aglutinasi terjadi dengan sempurna (30-40 menit, atau setelah eritrosit pada sumuran kontrol turun ke dasar pelat). Pengamatan waktu elusi dilakukan pada sumuran terakhir yang masih menunjukkan reaksi aglutinasi sampai virus melepaskan RBC yang ditunjukkan dengan turunnya RBC membentuk “*tear drop*”.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi dan Isolasi Virus Newcastle Disease

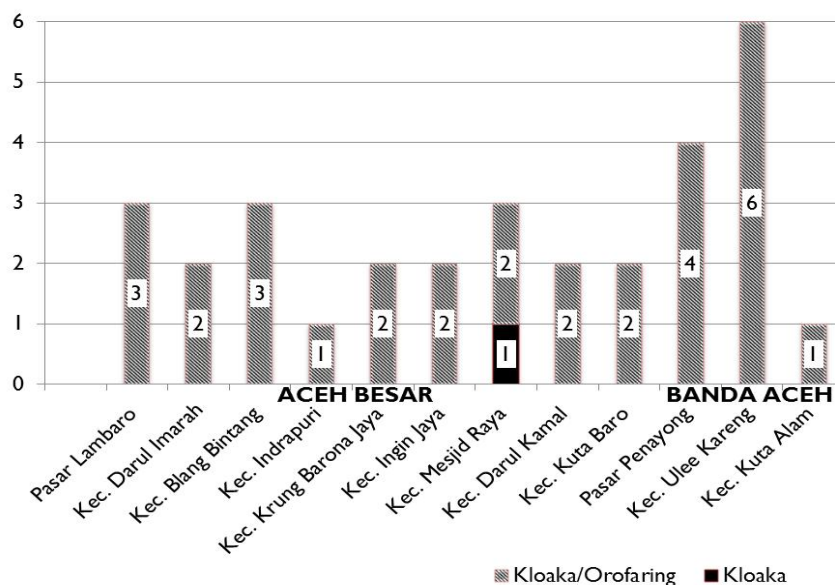
Pengujian dengan rRT-PCR matriks menunjukkan 31 *pool* kloaka positif dan 30 *pool* orofaring positif yang merupakan representasi dari 27 *pool* individu (77,14%) yang menyebar di semua lokasi pengambilan di Kabupaten Aceh Besar dan Kota Banda Aceh (Gambar 1).

Sebanyak 269 sampel yang terdiri atas 137 usap kloaka dan 132 usap orofaring asal *pool* positif ditanam pada TAB SPF dan menghasilkan 69 isolat VND yang berasal dari 51 ekor ayam. Adanya infeksi VND virulen pada TAB menyebabkan kematian embrio dengan gejala perdarahan dan gangguan pertumbuhan. Virulensi virus juga dapat dilihat dari waktu munculnya kematian embrio; virus yang mampu mematikan

Tabel 1. Pasangan primer dan *probe* untuk mendeteksi virus *Newcastle disease* (VND) dengan rRT-PCR

Gen target	Primer/ <i>probe</i> genom target	Urutan
APMV-1 M (Matriks)	M+4100 <i>forward</i>	5'- AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3'
	M+4169 <i>Probe</i> matriks	5' FAM TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC[BHQ]-3'
	M-4220 <i>reverse</i>	5' CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA-3'
VND virulen F (<i>Fusion</i>)	F+4829 <i>forward</i>	5'- GGTGAGTCTATCCGGARGATAACAAG-3'
	F+4894 <i>Probe 1 (virulent fusion)</i>	5' FAM AAGCGTTTCTGTCTCCTTCCTCCA[BHQ-3]'
	F+4939 <i>reverse</i>	5' AGCTGTTGCAACCCAAG-3'

APMV-1= *avian paramyxovirus*



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel dan sampel *pool* positif gen matriks

embrio dalam waktu <60 jam setelah inokulasi digolongkan ke dalam galur velogenik, jika kematian embrio terjadi antara 60-90 jam termasuk ke dalam galur mesogenik dan virus yang mematikan embrio dalam waktu >90 jam termasuk dalam galur lentogenik (Cattoli *et al.*, 2011).

Sebanyak 23 ekor (45,09%) mengeluarkan virus melalui orofaring, 10 ekor (19,61%) melalui kloaka dan 18 ekor (25,39%) mengeluarkan virus melalui kloaka dan orofaring. Selama infeksi, virus bereplikasi di tempat *portal of entry* (saluran respirasi/pencernaan), namun galur velogenik dan mesogenik dapat dilepaskan ke pembuluh darah dan bereplikasi pada organ-organ visceral. Virus yang bereplikasi di saluran pencernaan akan dikeluarkan melalui kloaka (Tabbu, 2003; Alexander dan Senne, 2008). Infeksi galur velogenik menyebabkan lesi pada otak, hemoragi dan nekrosis saluran intestinal, respirasi dan seka tonsil. Hemoragi juga ditemukan pada tembolok, jantung, kulit, dan kelopak mata. Kerusakan organ limfoid dan hiperplasia pada hati. Organ terinfeksi dapat digunakan untuk mengisolasi virus tetapi intestinal dan orofaring merupakan organ yang paling banyak mengandung virus (Cattoli *et al.*, 2011; Hines dan Miller, 2012).

Virus yang diekskresikan oleh unggas terinfeksi dapat mencemari lingkungan, pakan, air, peralatan kandang dalam bentuk droplet, debu atau partikel lain. Ekskresi melalui pernafasan akan mempercepat sirkulasi karena virus dapat ditransmisikan lewat. Alexander dan Senne (2008) menyatakan transmisi VND yang paling besar terjadi melalui aerosol atau

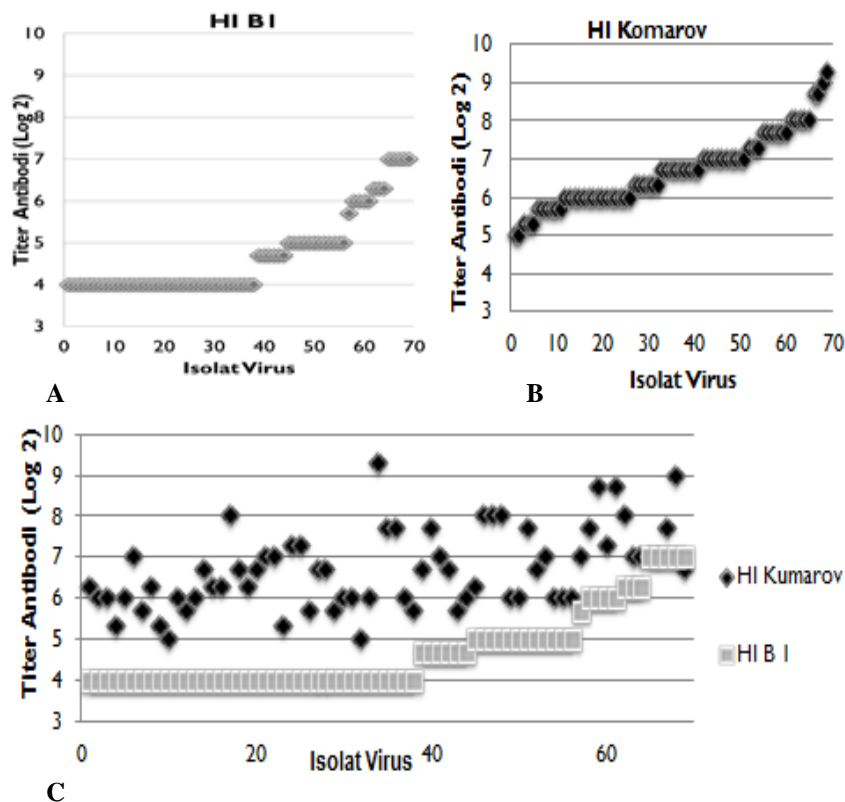
droplet yang dikeluarkan oleh unggas yang sensitif. Hal ini menjadi dasar dipergunakannya vaksinasi dengan cara penyemprotan.

Keragaman Antigenic Virus Newcastle Disease

Serum poliklonal spesifik VND yang homolog dengan virus akan menghambat reaksi aglutinasi. Uji HI menggunakan serum Hitchner BI dan Komarov, menunjukkan adanya perbedaan afinitas serum terhadap virus (Gambar 2).

Uji dengan serum B1 memberikan variasi titer antibodi mencapai 3 log (4 Log₂ sampai 7 Log₂) sedangkan pada serum Komarov menunjukkan perbedaan yang lebih tinggi, yaitu 4 log (5 Log₂ sampai 9 Log₂). Perbedaan *antigenic* diantara galur-galur virus terletak pada epitop hemaglutinin yang mampu dikenali oleh antibodi spesifik (Spalatin *et al.*, 1970; Alexander dan Senne, 2008). Ibu *et al.* (2008) mendeteksi keragaman *antigenic* 13 isolat lapang dengan reaksi silang antibodi dan mendapatkan 89,74% isolat memiliki reaksi heterolog, reaksi isolat lapang dengan antiserum LaSota menunjukkan reaksi heterolog 76,92%.

Variasi antigenisitas VND juga dapat dideteksi dengan menggunakan antibodi monoklonal (ABM) dan digunakan untuk mengelompokkan VND ke dalam sub tipe *antigenic*. Yongolo *et al.* (2006) menggunakan ABM universal spesifik APMV-1 untuk memisahkan 33 isolat dari 5 group *antigenic* (Group A dan B: velogenik, EL: mirip LaSota, EB: mirip B: group G: lentogenik) menjadi 14 *sub-cluster antigenic*.



Gambar 2. Uji HI isolat terisolasi menggunakan serum Komarov dan B1. Titer HI terhadap berbagai isolat VND bervariasi mencapai 5 Log (A) dan 4 Log (B). Variasi afinitas serum referensi terhadap virus yang di uji (C)

Ditemukan ada 5 *sub-cluster* asal daerah yang berbeda memiliki kemiripan *antigenic* 100%, yang mengindikasikan adanya penyebaran virus dari sumber yang sama sementara 9 *sub-cluster* lain dengan kemiripan 100% asal daerah yang sama menunjukkan bahwa ND persisten di wilayah tersebut. Selanjutnya Kim *et al.* (2011) menggunakan 9 ABM untuk mengkaji 58 isolat VND dan mengelompokkannya ke dalam 7 grup yang dikaitkan dengan kelas virus.

Menurut Miller *et al.* (2013) titer antibodi yang tinggi dapat terjadi jika serum dengan virus homolog. Serum yang homolog akan memiliki afinitas yang lebih tinggi dengan pada epitop permukaan virus sehingga lebih optimal dalam menghambat aktivitas aglutinasi. Vaksinasi ayam dengan galur yang berbeda dengan virus yang beredar tidak akan melindungi ayam dari infeksi VND dan mengakibatkan kegagalan vaksinasi (Sa'idu, 2008).

Deteksi Virulensi dan Keragaman secara Molekuler dengan rRT-PCR Fusion

Uji 69 isolat dengan target gen matriks menunjukkan hasil positif tetapi hanya diperoleh 52 isolat (73,91%) yang positif pada gen F. Variasi genetika dari gen F menyebabkan rRT-PCR tidak dapat membedakan patotipe virus. Variasi nukleotida yang tinggi pada gen F bertanggung jawab pada ketidakcocokan antara oligonukleotida (primer dan *probe*) dengan asam amino pada RNA VND (Cattoli *et al.*, 2011).

Deteksi Virulensi dengan Uji Elusi

Berdasarkan waktu elusi, 5 (7,25%) isolat virus dikelompokkan ke dalam galur lentogenik, 14 (20,29%) isolat mesogenik, dan 50 (72,46%) isolat velogenik. Stabilitas hemaglutinat antar VND bervariasi sesuai patotipenya. Isolat lentogenik menunjukkan waktu elusi 20-42 menit, mesogenik 43-81, dan velogenik 81 menit sampai lebih dari 24 jam, hal ini sesuai dengan penelitian Ezeibe dan Ndip (2005) dan Spalatin *et al.* (1970). Uji elusi berguna dalam melakukan karakterisasi virus ND isolat lapang.

Aktivitas enzim neuraminidase berhubungan dengan aktivitas hemaglutinin dalam menentukan patogenisitas virus. Neuraminidase akan menghilangkan residu *sialic acid* pada progeni virus untuk mencegah *reattachment* dan *self-agregation*. Aktivitas neuraminidase yang singkat akan mempercepat perlekatan *sialic acid* pada reseptor sel baru melalui aktivitas hemaglutinin. Secara *in vitro*, aktivitas hemaglutinasi berlangsung maksimal selama satu jam sampai seluruh RBC dilepaskan dan mengendap pada dasar sumuran pelat (Ezeibe dan Ndip, 2005).

Efisiensi uji rRT-PCR F dapat dikonfirmasi dengan uji elusi, isolat mesogenik dan velogenik umumnya dapat terdeteksi dengan rRT-PCR (Tabel 2). Hal ini sesuai dengan penelitian Cattoli *et al.* (2011) yang menyatakan uji rRT-PCR memiliki korelasi dengan pengujian secara *in vivo* dan pengurutan. Tiga isolat lentogenik berdasarkan uji elusi tetapi dapat terdeteksi pada gen F dan menyebabkan kematian pada embrio

ayam. Temperatur dapat memengaruhi waktu elusi sehingga untuk melakukan karakterisasi VND harus dilakukan pada suhu yang stabil (Ezeibe dan Ndip, 2005).

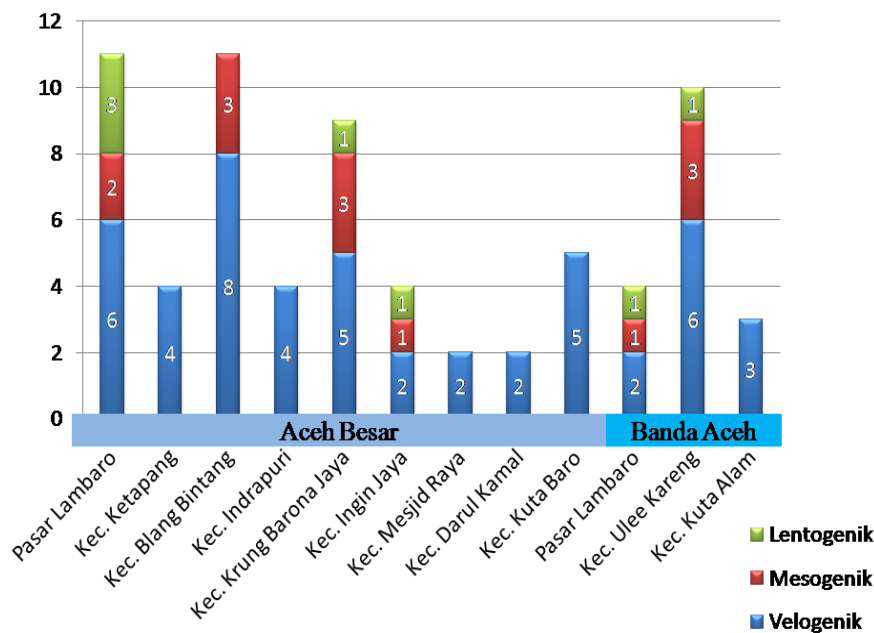
Tabel 2. Pengelompokan virus berdasarkan tingkat patogenitas dengan uji elusi dan deteksi dengan rRT-PCR fusi

	Galur virus	PCR		Total
		Positif (velo/mesogenik)	Negatif (lentogenik)	
Elusi	Lentogenik (20-43 menit)	3	2	5
	Mesogenik (44-83 menit)	9	5	14
	Velogenik (84 menit-24 jam)	39	11	50
Total		51	18	69

Sheffield *et al.* (1954) menyatakan, efisiensi uji elusi sangat tergantung pada derajat kejenuhan reseptor sel (eritrosit) yang mampu diikat oleh virus. Jika terlalu banyak sel, akan meninggalkan banyak reseptor bebas yang tidak mampu diikat sehingga terlihat seperti reaksi pelepasan sel oleh virus dan hal ini akan mengurangi efisiensi uji elusi. Perbedaan karakter ini juga dapat terjadi akibat adanya mutasi dari virus. Variasi patotipe isolat pernah dilaporkan oleh Emilia (2013) yang menemukan virus dari galur lentogenik namun mampu menimbulkan efek sitopatik pada biakan sel walaupun dengan derajat ringan, sementara berdasarkan uji HI dan netralisasi virus menunjukkan kecenderungan terhadap galur mesogenik dan velogenik. Kajian mutasi NDV oleh Gould *et al.* (2003) menunjukkan bahwa virus virulen kelas II genotipe 1a yang menyebabkan wabah tahun 1998-2000 di Australia sangat mirip dengan virus lokal virulensi rendah yang bersirkulasi.

Lima isolat mesogenik dan 11 isolat lentogenik tetapi tidak terdeteksi pada rRT-PCR. Isolat dari galur mesogenik pada uji elusi tetapi negatif PCR F mampu mematikan embrio dalam waktu 60-90 jam dan uji HI mengarah kepada VND virulen. Isolat velogenik mampu mematikan embrio dalam waktu <60 jam dan memiliki titer HI yang tinggi dengan serum Komarov. Virus ND yang bersifat virulen tetapi tidak terdeteksi pada rRT-PCR F bisa terjadi jika terdapat ketidakcocokan antara primer dan *probe* yang digunakan dengan RNA virus. Ketidaksesuaian primer oligonukleotida menyebabkan tidak terjadi hibridisasi antara primer/*probe* dengan RNA virus sehingga tidak terbaca pada rRT-PCR *system software*. Ketidakcocokan ini bisa disebabkan oleh mutasi atau perubahan asam amino pada gen F (Wise *et al.*, 2004).

Pengujian patogenitas secara *in vitro* dapat memunculkan beberapa permasalahan sehingga diperlukan beberapa pengujian patotipe untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat, diantaranya uji ICPI dan uji IVPI dilakukan pada anak ayam umur 6 minggu. Uji ICPI dan IVPI menggunakan sistem skoring untuk mengevaluasi tingkat morbiditas atau mortalitas pada ayam. (Dortmans *et al.*, 2011; OIE,



Gambar 3. Sebaran virus *Newcastle diseases* di wilayah Aceh. Virus *Newcastle diseases* terisolasi pada semua area sampling, memiliki antigenisitas yang beragam dan lebih dominan pada galur virulen

2012). Virulensi VND juga dapat diketahui dengan melihat urutan asam amino isolat terisolasi. Urutan asam amino pada daerah pembelahan (*cleavage site*) protein F merupakan penentu virulensi pada virus ND. Virus-virus lentogenik mempunyai motif asam amino *monobasic* pada F *cleavage site* ₁₁₂G/E-K/R-Q-G/E-R₁₁₆ dan L (*leucine*) pada residu 117 dan terpecah secara ekstraselular oleh enzim protease seperti tripsin yang ditemukan pada saluran pernafasan dan pencernaan, sedangkan galur virus mesogenik dan velogenik mempunyai motif asam amino *multibasic* pada F *cleavage site* ₁₁₂R/K-R-Q/K/R-K/R-R₁₁₆ dan F (*phenylalanine*) pada residu 117 dan dapat dibelah secara intraseluler oleh enzim protease seperti furin yang terdapat di berbagai jaringan sel inang, sehingga mengakibatkan infeksi sistemik yang fatal (OIE, 2012).

Deteksi Penyebaran VND di Wilayah Aceh

Hasil penelitian menunjukkan penyakit ND masih endemis di wilayah Aceh. Virus ND berhasil diisolasi dari seluruh area pengambilan sampel dan didominasi oleh galur virulen dengan antigenisitas yang beragam (Gambar 3). Tingginya kasus ND di Aceh dapat disebabkan oleh sistem pemeliharaan dan pemasaran unggas yang tidak tepat. Ayam kampung dipelihara dengan cara diumbar di pekarangan dan tidak jarang unggas air seperti itik dan entog dipelihara bercampur dengan ayam dalam satu kandang. Pemasaran unggas hidup dilakukan antar warga, dijual ke pasar atau kepada pedagang unggas keliling yang membeli dan menjual unggas dari masyarakat dengan menggunakan kendaraan bermotor. Sistem pemeliharaan dan pemasaran tersebut akan mempermudah terjadinya penularan penyakit karena tingginya kontak, baik

langsung maupun tidak langsung, antar unggas serta dapat memperluas sirkulasi virus di lapangan. Sirkulasi unggas yang tidak efisien akan meningkatkan risiko terjadi pertukaran antar patotipe VND di area peternakan rakyat. Munculnya keragaman virus dapat menyebabkan kegagalan vaksinasi sehingga diperlukan pemilihan galur vaksin yang tepat untuk menanggulangi infeksi VND. Penggunaan vaksin yang tidak homolog dengan galur yang beredar akan meningkatkan ekskresi virus ke lingkungan oleh unggas terinfeksi (Miller *et al.*, 2013).

KESIMPULAN

Penyakit ND masih endemik di Aceh dan virus yang bersirkulasi di seluruh Kota Banda Aceh dan Aceh Besar memiliki karakter yang beragam, baik patogenisitas maupun antigenisitasnya. Virulensi VND dapat dideteksi dengan metode molekuler rRT-PCR dan tingkat patogenitas dapat ditentukan dengan melihat waktu elusi dan kematian embrio. Keragaman isolat VND akan memengaruhi keberhasilan vaksinasi karena perlindungan yang optimal dapat diperoleh jika vaksin yang digunakan mampu menggertak antibodi homolog dengan galur virus lapang yang beredar. Hasil penelitian ini dapat menjadi pertimbangan pemerintah dalam menentukan sistem pemeliharaan dan vaksin yang tepat untuk pengendalian infeksi VND pada ayam kampung.

DAFTAR PUSTAKA

Adi, A.A.A.M., N.M. Astawa, K.S.A. Putra, Y. Hayashi, and Y. Mastumoto. 2010. Isolation and characterization of a pathogenic Newcastle disease virus from a natural case in Indonesia. *J. Vet. Med. Sci.* 72(3):313-319.

- Alexander, D.J. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxovirus. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.** 19(2): 443-462.
- Alexander, D.J. and D.A. Senne. 2008. Newcastle Disease. Other Avian Paramyxovirus and Pneumovirus Infections: Newcastle Disease. In **Disease of Poultry**. Saif, Y. (Ed.). 12nd ed. Iowa State University Iowa, US.
- Cattoli, G., L. Susta, C. Terregino, and C. Brown. 2011. Newcastle disease: A review of field recognition and current methods of laboratory detection. **J. Vet. Diag. Invest.** 23(4):637-656.
- DISNAK. 2012. **Laporan Tahunan Dinas Peternakan Tahun 2011**. DISNAK. Aceh Besar (ID), Dinas Peternakan Kabupaten Aceh Besar. Jantho.
- Dortmans, J.C., G. Koch, P.J. Rottier, and B.P. Peeters. 2011. Virulence of Newcastle disease virus: What is known so far? **Vet. Res.** 42:122.
- Emilia. 2013. Isolasi dan karakterisasi biologik virus newcastle disease (NDV). **Tesis**. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ezeibe, M.C.O. and E.T. Ndip. 2005. Red blood cell elution time of Newcastle disease virus. **J. Vet. Sci.** 6(4): 287-288.
- Fazel, P.D., S. Khoobyar, M.J. Mehrabanpour, and A. Rahimian. 2012. Isolation and differentiation of virulent and non virulent strain of Newcastle disease virus by polimerase chain reaction from commercial broiler chicken flocks in Shiraz-Iran. **Int. J. Anim. Veter. Adv.** 4(6):389-393.
- Gould, A.R., E. Hansson, K. Selleck, J.A. Kattenbelt, M. Mackenzie, and A.J. Della-Porta. 2003. Newcastle disease virus fusion and haemagglutinin-neuraminidase gene motifs as markers for viral lineage. **Avian Pathol.** 32(4):361-373.
- Haque, M.H., M.T. Hossain, M.T. Islam, M.A. Zinnah, M.S.R. Khan, and M.A. Islam. 2010. Isolation and detection of Newcastle disease virus from field outbreaks in broiler and layer chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Bangl. J. Vet. Med.** 8(2):87-92.
- Hines, N.L. and C.L. Miller. 2012. Avian paramyxovirus serotype-1: A review of disease distribution, clinical symptoms, and laboratory diagnostics. **Vet. Med. Int.** 2012:708216.
- Ibu, J.O., J.O.A. Okoye, D. Eze, F.O. Fasina, E.P. Aba-Adulugba, A.S. Abechi, and Y.T. Woma. 2008. Antigenic relatedness among newcastle disease virus isolates from Nigerian feral birds and the La sota strain. **J. Arc. Vet. Sci.** 13(2):79-84.
- Kim, L.M., D.J. King, D.L. Suarez, C.W. Wong, and C.L. Afonso. 2007. Characterization of class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using real-time reverse transcription-PCR. **J. Clin. Microbiol.** 45(4):1310-1314.
- Kim, S.H., M. Subbiah, A.S. Samuel, P.L. Collins, and S.K. Kamal. 2011. Roles of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins in replication, tropism, and pathogenicity of avian paramyxoviruses. **J Virol.** 85(17):8582.
- Miller, P.J., C.L. Afonso, J. El-Attrache, K.M. Dorsey, S.C. Courtney, Z. Guo, and D.R. Kapczynski. 2013. Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. **Developmental & Comparative Immunology.** 41(4):505-513.
- Mohammadamin, O.G. and T.S. Qubih. 2011. Histopathology of virulent Newcastle disease virus in immune broiler chickens treated with IMBO[®]. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences.** 25(1):9-13.
- NVSL. 2005. Real-time RT-PCR for Detection of Virulent Newcastle Disease Virus in Clinical Samples Testing Protocol. NVSL, United State. <http://www.cfsph.iastate.edu/HPAI/resources/Labs/AVPRO1505.03.pdf>.
- Oberdorfer, A. and O. Werner. 1998. Newcastle disease virus: Detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity. **Avian Pathol.** 27(3):237-243.
- OIE. 2012. Terrestrial Manual Newcastle disease. OIE. http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf.
- Rout, S.N. 2007. The role of Newcastle Disease Virus Internal Protein in Pathogenesis. **Desertation**. University of Maryland. Maryland (US).
- Sa'idu, L. and P. Abdu. 2008. Outbreak of Viscerotropic Velogenic form of Newcastle disease in vaccinated six-weeks-old pullets. **Sokoto J. Vet. Sci.** 7(1):37-40.
- Sheffield, F.W., W. Smith, and G. Beyavin. 1954. Purification of influenza virus by red-cell adsorption and elution. **Br. J. Exp. Pathol.** 35(3):214-222.
- Spalatin, J., R.P. Hanson, and P.D. Beard. 1970. Haemagglutinin-elution patterns as a marker in characterizing Newcastle disease virus. **Avian Dis.** 14:542-549.
- Tabbu, C.R. 2003. **Penyakit Ayam dan Penanggulangannya**. Kanisius Yogyakarta.
- Umali, D.V., H. Ito, T. Suzuki, K. Shiota, H. Katoh, and T. Ito. 2013. Molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from vaccinated commercial poultry farms in non-epidemic areas of Japan. **Virol. J.** 10:330.
- Wise, M.G., D.L. Suarez, B.S. Seal, J.C. Pedersen, D.A. Senne, D.J. King, D.R. Kapczynski, and E. Spackman. 2004. Development of real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.** 42(1):329-338.
- Yongolo, M.G.S., A.P. Muhairwa, D.J. Alexander, K.J. Handberg, R.J. Manvell, and U.M. Minga. 2006. Antigenic Diversity and Similarity of Newcastle Disease Viruses Isolated from Unvaccinated Free-Range Rural Chickens Characterised by Polyvalent dnd Monoclonal Antibodies. **Livestock Research for Rural Development**. <http://www.lrrd.org/lrrd18/10/yong18146.htm>.