

Karakterisasi Molekuler Protein Hemagglutinin-Neuraminidase Virus *Newcastle Disease* (ND) di Surabaya Tahun 2003 dan 2016

Molecular Characterization of Hemagglutinin-Neuraminidase Protein Virus Newcastle disease (ND) in Surabaya during 2003 and 2016

Innah Wulandari^{1*}, Jola Rahmahani², Indah Rahmawati¹, Nurvita Putih¹, Aisyah Azahro¹, Kusnoto Kusnoto³, Rahayu Ernawati², Fedik Abdul Rantam²

¹Mahasiswa, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya, 60115, ²Laboratorium Virologi dan Imunologi, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya, 60115, ³Laboratorium Parasitologi, Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya, 60115.

*Corresponding author: nulis.ayo@gmail.com

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perubahan asam amino, tingkat homologi nukleotida, hubungan kekerabatan, dan prediksi epitop dari gen pengkode protein HN virus *Newcastle disease* (ND) yang di isolasi di beberapa pasar kota Surabaya. Sampel berupa swab kloaka sejumlah 37 ekor ayam serta satu kontrol positif (LaSota). Sampel inokulasi pada TAB dan diidentifikasi melalui uji HA yang dikonfirmasi dengan uji HI. Sampel positif dilakukan PCR menggunakan primer *forward* dan *reverse* dengan target 503 bp. Hasil sekuensing kemudian dianalisis. Hasil analisis menunjukkan terdapat kesamaan asam amino antara sampel dan isolat vaksin yang berpengaruh pada dekatnya hasil persentase hasil homologi dan hubungan kekerabatan antar isolat. Epitop (NGAANNSGWGAPIHDPDYIGG) memiliki sifat imunogenik terbaik yang terdapat pada semua sampel sehingga berpotensi sebagai kandidat vaksin.

Kata kunci: *Newcastle Disease*, protein HN, homologi, pohon filogenetik, epitop

Abstract

This study aimed to determine the mutation of amino acid, nucleotide homology, phylogenetic tree, epitope prediction of Hemagglutinin-Neuraminidase protein *Newcastle Disease* (ND) Virus isolated from traditional market around Surabaya. Samples were from 37 chicken with cloacal swab and one positive samples for control (LaSota). Samples were inoculated on embryonated chicken eggs and identified with HA test confirmed with HI test. Positive samples processed by PCR using forward and reverse primer with 503 bp RNA target. The PCR result then analyzed with sequencing. Result of sequencing analysis showed that there's similarity between samples amino acid and vaccine isolate its effect the percentage of nucleotide homology and phylogenetic relation between isolate. Epitope NGAANNSGWGAPIHDPDYIGG have high immunogenic value at all of isolate which good as vaccine candidate.

Keywords: *Newcastle Disease*, HN protein, nucleotide homology, phylogenetic tree, epitope

Received: 12 September 2020

Revised: 13 Oktober 2020

Accepted: 27 Maret 2021

PENDAHULUAN

Virus *Newcastle Disease* (ND) merupakan strain virulen yang disebabkan oleh *Avian Paramyxovirus* tipe 1 (APMV-1) Anggota genus *Avulavirus*, subfamili *Paramyxovirinae*, famili *Paramyxoviridae* yang diisolasi dari spesies unggas (Miller *et al.*, 2010; OIE, 2012). Memiliki pleomorfik berdiameter 100-500 nm

dan ada pula yang berbentuk filamen (Kencana dan Gusti, 2012). Virus ini memiliki tingkat kematian terhadap unggas dan burung yang tinggi sehingga menjadi salah satu virus yang menyebabkan kerugian ekonomi dalam industri unggas (Alexander, 2000).

Genom virus ND terdiri dari *single stranded* RNA yang memiliki polaritas negatif dengan panjang 15.200 nukleotida. Memiliki 6 protein



struktural yaitu Nukleoprotein (NP), *Phosphoprotein* (P), *Matrix* (M), *Fusion* (F), *Hemagglutinin-Neuraminidase* (HN) dan *Large Polymerase* (L) (Alexander, 2000). Selain itu terdapat protein non struktural lain yang dikode oleh *phosphoprotein* (P) yaitu protein V dan W (Yusoff dan Tan, 2001).

Virus ND di Indonesia bersifat endemik dan menyebar keseluruh daerah (Saepulloh & Darminto, 2005). Jawa Timur sendiri merupakan daerah kedua yang memiliki populasi ternak unggas tertinggi setelah Jawa Barat dengan jumlah populasi sebanyak 265 juta ekor (BPS, 2015). Data OIE (2015) yang diakses oleh Kurnianingtyas *et al.*, (2017), di Jawa Timur terdapat 100 hingga 1500 ekor ayam terinfeksi virus ND tiap bulan dan melonjak hingga 14.000 kasus pada Februari 2011. Kondisi pasar unggas hidup yang memiliki sanitasi buruk berkontribusi dalam penyebaran Virus ND di Indonesia. Minimnya informasi tentang asal-usul dan status kesehatan unggas menjadi salah satu penyebab. Hal ini menyebabkan mudahnya transmisi virus baik di dalam maupun diluar pasar (Kurnianingtyas *et al.*, 2017).

Infeksi virus ND masih sulit diberantas meski vaksinasi terus dilakukan untuk memberantas infeksi virus ini. Jauhnya jarak genetik dengan virus lokal secara tidak langsung berpengaruh pada tingkat keefektivan dari hasil vaksinasi dan menjadi penyebab masih merebaknya virus ND meskipun telah dilakukan vaksinasi secara lengkap dan berulang (ADHPI, 2011). Program vaksinasi ND Indonesia sendiri menggunakan vaksin lentogenik aktif seperti Strain F, B1 dan La Sota (Orsi *et al.*, 2009). Vaksin aktif-mesogenik juga digunakan seperti Komarov dan Roakin serta jenis vaksin inaktif (OIE, 2012).

Virus ND sendiri menyebar melalui saluran pernafasan dan pencernaan (Miller and Koch, 2013) dan bisa terus menginfeksi dalam jangka panjang jika kondisi lingkungannya sesuai (Davis-Fields *et al.*, 2014), hal ini disebabkan oleh virus RNA seperti virus ND sangat mudah bermutasi (Adi *et al.*, 2010). Salah satu dasarnya adalah kesalahan *copy* dari genom yang menyebabkan virus RNA banyak mengandung

mutan atau virion yang dikenal sebagai *wilden genotype* dan dapat membawa perubahan drastis saat seleksi lingkungan (Rantam, 2005).

Pengembangan vaksin dari isolat lokal sebagai *Masterseed* merupakan salah satu alternatif untuk mencegah terjadinya mutasi yang disebabkan oleh *reassortment* virus yang terjadi secara alamiah dalam kurun waktu 5 – 15 tahun yang merubah virus dari virulensi lemah menjadi lebih ganas (Pardede, 2005). Fenomena ini berkaitan dengan terjadinya kegagalan vaksinasi apabila terdapat perubahan genetik virus dalam vaksin (Mohamed *et al.*, 2011). Estimasi mutasi rata-rata 10^{-8} sampai 10^{-11} per basa per siklus replikasi sehingga akan selalu terjadi evolusi virus setiap 13 bulan yang disebabkan oleh adanya perubahan atau substitusi nukleotida sebesar 2×10^{-3} per tahun (Rantam, 2005).

Vaksin ND yang dibuat dengan pendekatan homologi dan filogenetik yang menggunakan isolat lokal dapat meningkatkan keefektifan dan kontrol genetik yang lebih baik dengan berkurangnya penularan virus ND terhadap unggas yang terinfeksi (Miller *et al.*, 2007). Virus vaksin yang homolog dengan isolat lapang dapat merangsang antibodi lebih cepat sehingga proses netralisasi virus dalam tubuh inang lebih cepat saat awal infeksi (Rell *et al.*, 2015). Vaksin berbasis epitope merupakan alternatif yang rasional untuk meningkatkan imunitas melalui seleksi epitope yang dapat merangsang respon imun (Khan, *et al.*, 2014).

Keanekaragaman dari antigenik virus bisa terjadi akibat adanya mutasi pada protein eksternal. Protein HN merupakan bagian penting dari virus ND yang merupakan protein permukaan (Hu, *et al.*, 2010). Berperan sebagai penentu virulensi dan merangsang pembentukan antibodi protektif setelah vaksinasi (Mahon *et al.*, 2008). Protein HN terdiri dari *Hemagglutinin* (HA) yang berperan dalam pelekatan partikel virus dengan reseptor pada sel target dan *Neuraminidase* (NA) yang berperan dalam pelepasan virus dari sel terinfeksi dan sebagai promoter aktivasi protein F (McGinnes & Morrison, 2006).

Penelitian mengenai peran dari protein HN telah banyak dilakukan, penemuan yang cukup kontroversial yaitu protein HN dari virus vaksin LaSota yang diinsersikan ke dalam bagian *backbone* dari *Beaudette C* menyebabkan menyebarnya virus yang memiliki sifat yang sama dengan strain alam yang virulen (Oldoni *et al.*, 2015), sebaliknya, protein HN strain LaSota yang berada pada *backbone* dari protein HN strain *Beaudette C* meningkatkan tingkat virulensi dan indeks patogenitasnya (Huang *et al.*, 2004; Wakamatsu *et al.*, 2006). *Cross* reaksi secara molekuler terhadap dua strain berbeda ini menjadi landasan bahwa perubahan karakter dari virus menjadi cacatan penting untuk mengetahui secara mendalam karakteristik dari penyebaran virus itu sendiri, khususnya virus isolat lokal (Byarugaba *et al.*, 2014).

Pasar memiliki indikasi yang sangat rentan terhadap penyebaran virus ND, termasuk pasar yang berada di kota Surabaya. Protein HN virus ND sendiri merupakan protein permukaan yang rentan akan perubahan dan mutasi, terutama perubahan cuaca dan kondisi sanitasi di pasar dapat menjadi tempat inkubasi dan perkembangan virus terutama pada rentang waktu yang berbeda. Pengetahuan tentang karakterisasi molekuler dan epitop dari protein HN virus ND yang tersebar di sekitar Kota Surabaya dapat menjadi sumber informasi dan bahan pertimbangan dalam kajian untuk kandidat vaksin selanjutnya di masa depan.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini diambil dari *swab* kloaka ayam yang diisolasi tahun 2016 yang diperoleh di beberapa pasar sekitaran kota Surabaya, antara lain dari Pasar Bratang sebanyak 4 sampel, Pasar Rungkut 8 sampel, Pasar Keputran 6 sampel, Pasar Kapasan 6 sampel, Pasar Wonokromo 4 sampel dan Sampel positif tes HA virus ND tahun 2003 koleksi laboratorium Virologi sebanyak 8 sampel yang dikoleksi dari pasar sekitar kota Surabaya. Sampel di simpan ke dalam transport media *Phosphat Buffer Saline* (PBS) yang telah

dicampur dengan antibiotik penisilin (10000 unit/ml dan streptomycin (10 mg/ml) serta antifungal Fungison (Gibco) (10 mg/ml).

Isolasi dan Identifikasi Virus

Isolasi virus dilakukan pada Telur Ayam Berembrio (TAB) umur 8-10 hari. Sampel diinokulasi pada TAB, selanjutnya TAB diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari. TAB yang mati sebelum hari ke 5 disimpan ke dalam kulkas dengan suhu 4°C sampai hari ke-5, cairan alantois dari TAB dikoleksi dan dilakukan identifikasi virus menggunakan uji HA dan dilanjutkan dengan uji HI. Identifikasi virus menggunakan uji HA mikroteknik yang dilanjutkan dengan uji HI menggunakan antiserum spesifik terhadap ND dilakukan berdasarkan standar OIE (OIE, 2012). Uji HI bertujuan untuk mengetahui titer antibodi virus ND dengan menggunakan standar titer antigen sebesar 4 HA unit.

Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA dilakukan dengan memasukkan tiap sampel yang berbentuk cairan alantois dengan menggunakan pipet ke dalam tabung eppendorf 1.5 ml sebanyak 300 µl, kemudian ditambahkan kit ekstraksi RNA *R&A-BLUE™* sebanyak 700 µl lalu di kocok kuat dengan tangan atau di *vortex* selama 1-2 menit untuk homogenisasi. Sampel ditambahkan kloroform sebanyak 200 µl lalu *vortex* selama 1 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm, dengan suhu 4°C, selama 10 menit. Setelah di sentrifugasi, fase aqua dipindahkan ke dalam tube eppendorf 1,5 ml baru, secara perlahan menggunakan pipet. Sampel kemudian ditambahkan isopropanol sebanyak 400 µl, dicampur dengan cara dipipet sebanyak 6 atau 7 kali atau bisa di *vortex* selama 1 sampai 2 detik, kemudian di sentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm, selama 10 menit pada suhu 4°C.

Supernatan sampel dibuang secara perlahan dan hati-hati untuk menyisakan RNA pada dasar tabung eppendorf. Sampel ditambahkan sebanyak 1 ml etanol 75% lalu di *vortex* selama 1 sampai 2 detik dan di sentrifugasi pada

kecepatan 10.000 rpm, selama 5 menit pada suhu 4°C. Setelah itu cairan yang ada dalam eppendorf di buang secara perlahan dengan menyisakan endapan RNA pada dasar tabung, kemudian dikering anginkan. Sampel RNA yang dikeringkan ditambahkan *Nuclease Free Water* (NFW) sebanyak 15 µl, lalu di inkubasi pada suhu 55-60°C selama 10 menit. Setelah itu, RNA di simpan pada suhu -70°C untuk menghindari kerusakan.

One Step PCR dan Elektroforesis

Amplifikasi dilakukan dengan membuat *master mix* pada *microcentrifuge tube* 0.5 ml steril dengan komponen 12.5 µl 2x *reaction mix buffer*; 1 µl *primer forward* protein HN serotipe lentogenik; 1 µl *primer reverse* protein HN serotipe lentogenik; 8.5 µl NFW; 1 µl *Superscript III*; 1 µl RNA. Primer yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tube yang berisi campuran RNA dan *master mix* diinkubasi dalam *thermal cycler* dengan *setting lid on* 95°C, *predenaturasi* 94°C, 5 menit; *denaturasi* 94°C, 1 menit; *Annealing* 55°C, 1 menit; *Extention* 68°C, 2 menit; siklus diulang kembali pada tahap *denaturasi* sebanyak 40x; *Extention prolog* 68°C, 10 menit; dan *keep* pada suhu 4°C. Hasil amplifikasi PCR dilanjutkan dengan elektroforesis menggunakan gel *Agarose* 1.5%. Mesin elektroforesis dijalankan dengan pengaturan *voltase* 100 volt, 400 mA, selama 45 menit. Hasil elektroforesis dibaca menggunakan *UV transluminator* untuk mengamati *band* DNA.

Sekuensing dan Analisis Data

Pada tahap ini dilakukan *cycle sequencing* dengan memasukkan ke dalam tube PCR ukuran 0.2 ml *big dye terminator V3.1 cycle sequencing kit* sebanyak 1,5 µl, *5x buffer cycle sequencing* 5 µl, NFW 7 µl, DNA *pure* 5 µl dan primer HN F (*Forward*) atau HN R (*Reverse*) sebanyak 1,5 µl sehingga jumlah volume menjadi 20 µl. Tahapan selanjutnya *tube* tersebut dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* dan mesin diprogram dengan settingan suhu *initial denaturation* 96°C selama 3 menit, lalu sebanyak 25 siklus pada

96°C selama 30 detik, 50°C selama 5 detik dan 60°C selama 4 menit.

Hasil *cycle sequencing* dipurifikasi menggunakan *BigDye X terminator purification kit*: *BigDye X terminator* dicampur terlebih dahulu sampai homogen sebelum digunakan, kemudian sampel hasil *cycle sequencing* ditambah dengan *X terminator* sebanyak 20 µl dan 90 µl *SAM solution* dan dimix selama 30 menit, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1.800 rpm selama 2 menit. Setelah disentrifugasi sampel dimasukkan ke mesin sekuenser *ABI 3500XL genetic analyzer*.

Analisis data dilakukan dengan cara menganalisis nukleotida hasil *sequencing* dengan analisis *alignment* menggunakan *software clustalW* yang berada dalam program *BioEdit v7.2.5*. Data hasil *alignment* sekuen, hasil dari analisis nukleotida kemudian ditranslasi menjadi asam amino menggunakan program *BioEdit v7.2.5*. Analisis Homologi dilakukan dengan menggunakan metode *Needleman-Wunsch* yang dapat diakses bebas pada website *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Analisis sel B linear epitop dilakukan dengan cara pembacaan asam amino menggunakan *software* yang berada pada situs online *IEDB Analysis Resource B Cell Epitope Prediction Tools* yang dapat diakses bebas di internet.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Identifikasi virus ND

Sampel swab kloaka ayam yang diisolasi dari beberapa pasar di kota surabaya sebanyak 37 sampel, diinokulasi pada TAB. Terdapat 10 sampel dari 37 sampel yang positif uji HA, sampel tersebut adalah ND1, ND2, ND3, ND5, ND7, ND8, ND9, SBY01, dan SBY02. Sampel uji HA kemudian dilanjutkan dengan uji HI menggunakan antiserum ND. Hasil uji HI (Tabel 2) menunjukkan bahwa sampel tersebut positif virus ND.

Elektroforesis hasil One Step PCR

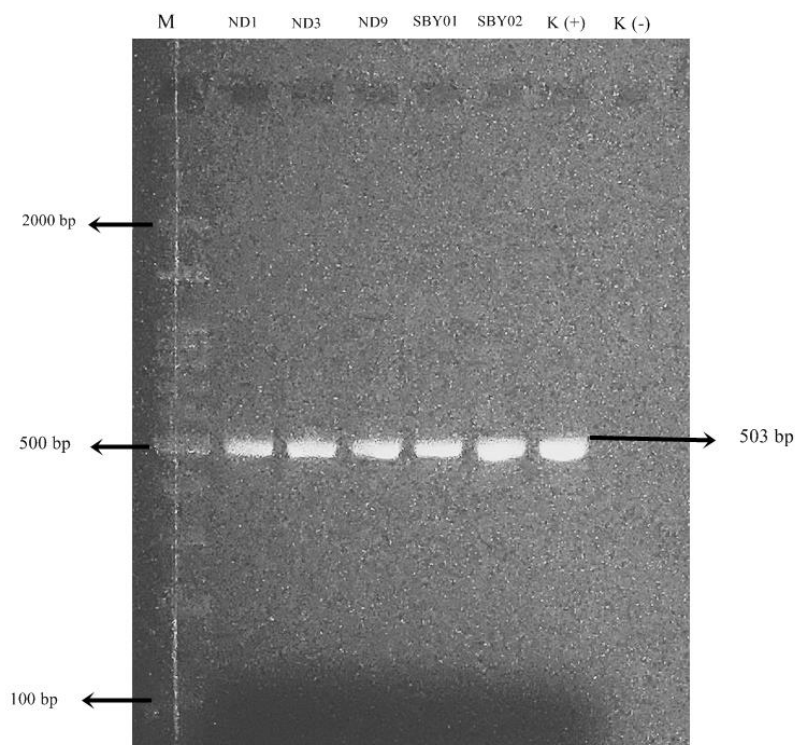
Sampel dilanjutkan ke tahap One Step PCR, sampel tersebut adalah ND1, ND2, ND3, ND5, ND7, ND8, ND9, SBY01, SBY02 dan kontrol

Tabel 1. Primer spesifik gen pengkode protein HN-lentogenik

Primer	Sekuen 5'-3'	Produk	Posisi
Forward	AGT TAG CCA AGT TGC GTT AG	503	11 - 30
Reverse	AAC CTG ATC CTG TAG TAG GC		494 - 513

Tabel 2. Hasil Uji HI sampel posotif uji HA dari cairan alantois

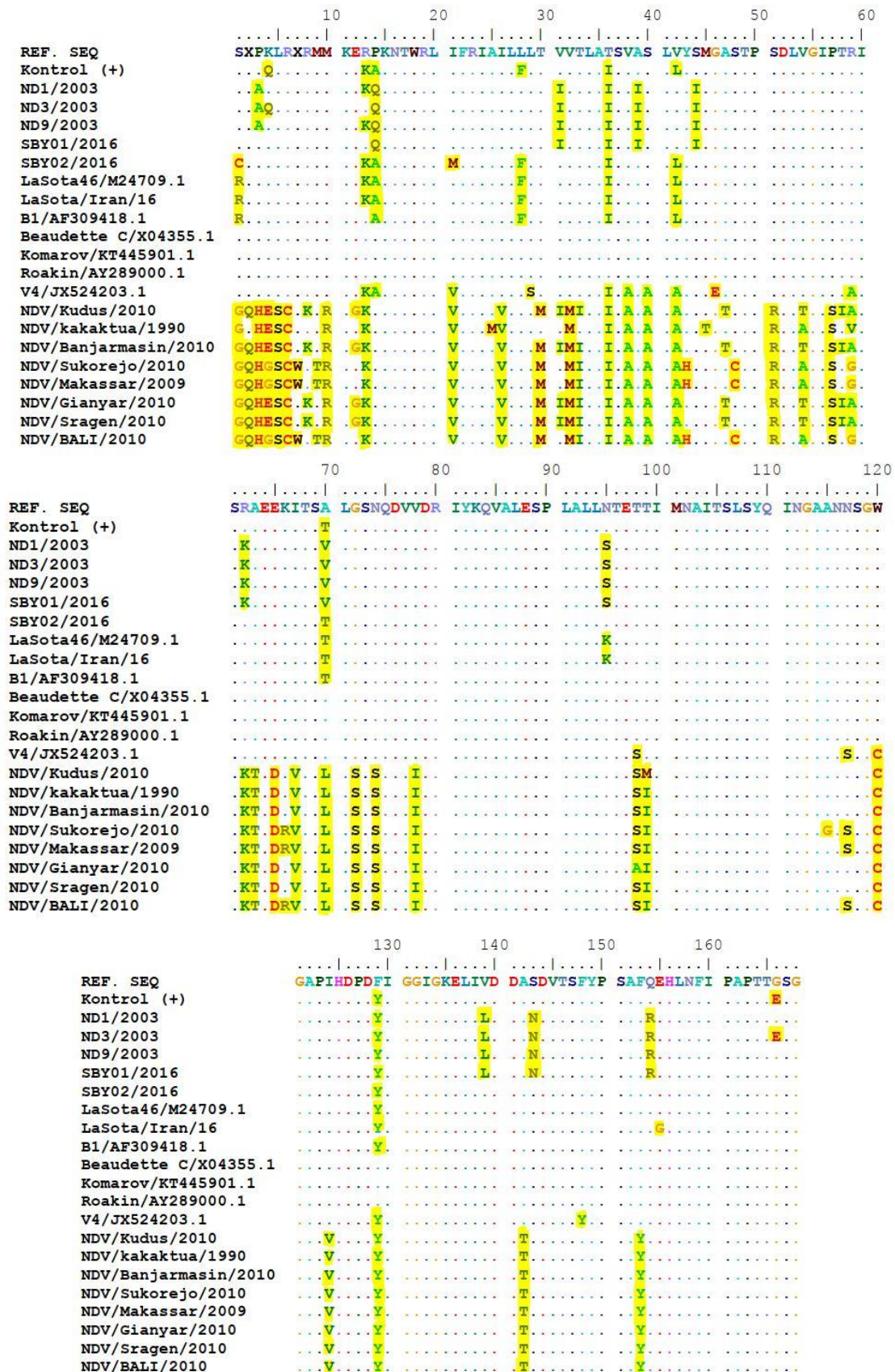
Sampel	Uji HA	Retitrasi 4 HAU	Titer As ND menggunakan Ag kontrol	Titer Uji HI
ND1	2 ⁶	2 ²		2 ⁶
ND2	2 ⁶	2 ²		2 ⁶
ND3	2 ⁹	2 ²		2 ⁶
ND5	2 ⁴	2 ²		2 ⁶
ND6	2 ⁶	2 ²		2 ⁶
ND7	2 ⁹	2 ²	2 ⁶	2 ⁶
ND8	2 ⁵	2 ²		2 ⁶
ND9	2 ⁹	2 ²		2 ⁶
SBY 1	2 ⁸	2 ²		2 ⁶
SBY2	2 ⁹	2 ²		2 ⁶
Kontrol Positif (LaSota)	2 ⁹	2 ²		2 ⁶



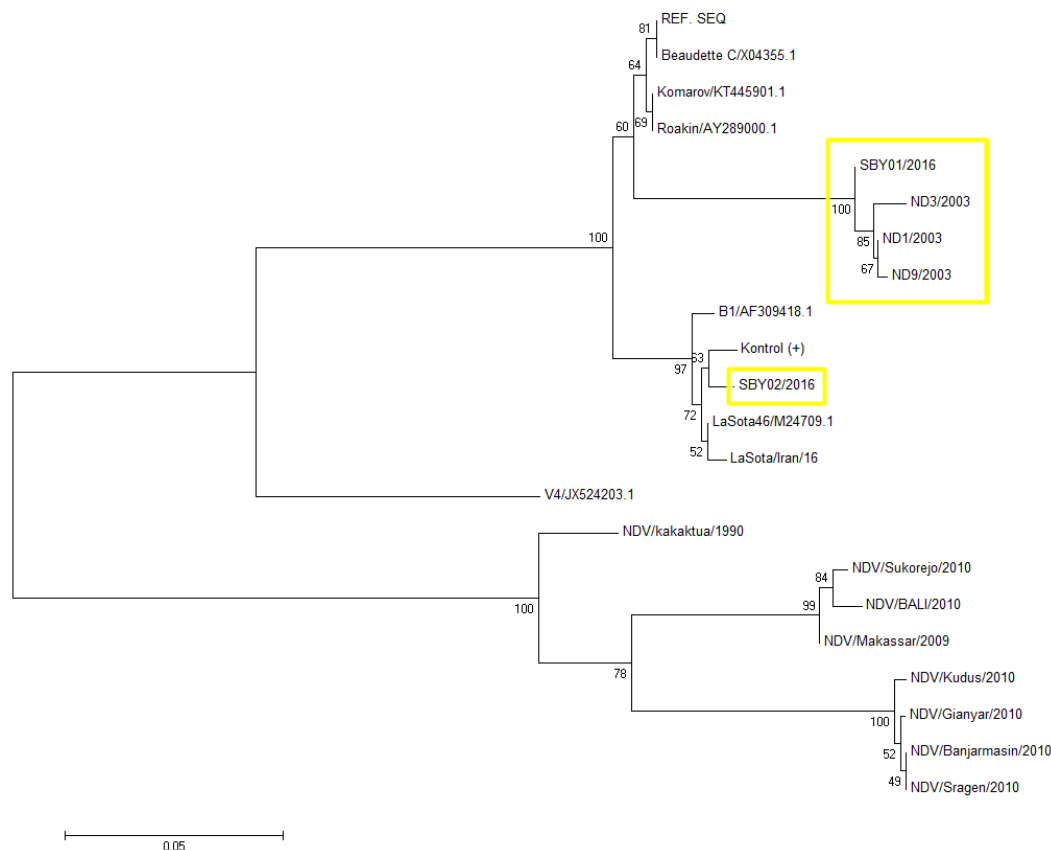
Gambar 1. Hasil elektroforesis produk PCR dengan 1.5% Agarose. Angka disebelah kiri gambar menunjukkan nilai *marker DNA ladder* 100 bp. (M) merupakan *marker DNA ladder* 100 bp, ND1, ND3, ND9, SBY01, SBY02 dan (K+) sebagai kontrol positif (LaSota) yang menunjukkan panjang pita 503 bp.

Tabel 3. Hasil analisis homologi

No	Isolat Pemanding	Skor Homologi (%)																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1.	Refseq	100																					
2.	Kontrol Positif	96	100																				
3.	ND1/2003	94	93	100																			
4.	ND3/2003	94	93	99	100																		
5.	ND9/2003	94	93	100	99	100																	
6.	SBY01/2016	95	93	99	99	99	100																
7.	SBY02/2016	96	99	93	92	93	93	100															
8.	LaSota46/M24709.1	97	99	93	93	93	94	99	100														
9.	LaSota/Iran/16	97	99	93	93	93	93	99	100	100													
10.	B1/AF309418.1	97	98	93	93	93	93	99	99	99	100												
11.	Beaudette C/X04355.1	100	96	94	94	94	95	96	97	97	97	100											
12.	Komarov/KT445901.1	100	96	94	94	94	95	96	97	97	97	100	100										
13.	Roakin/AY289000.1	100	96	94	94	94	95	96	97	97	97	100	100	100									
14.	V4/JX524203.1	88	87	84	84	84	84	87	88	88	88	88	88	88	100								
15.	NDV/Kudus/2010	78	77	77	76	77	77	77	77	77	77	77	77	77	79	100							
16.	NDV/kakaktua/1990	81	79	79	79	79	79	79	80	80	80	80	80	80	82	93	100						
17.	NDV/Banjarmasin/2010	78	77	77	76	77	77	77	77	77	77	77	77	77	79	100	93	100					
18.	NDV/Sukorejo/2010	79	78	77	76	77	77	78	78	78	78	78	78	78	79	91	91	91	100				
19.	NDV/Makassar/2009	79	78	77	77	77	77	78	78	78	78	78	78	78	80	91	91	91	99	100			
20.	NDV/Gianyar/2010	78	77	77	76	77	77	77	77	77	77	77	77	77	79	99	92	100	90	91	100		
21.	NDV/Sragen/2010	78	77	77	76	77	77	77	77	77	77	77	77	77	79	100	93	100	91	91	100	100	
22.	NDV/BALI/2010	79	78	77	76	77	77	78	78	78	78	78	78	78	80	90	91	90	99	99	90	90	100



Gambar 2. Hasil analisis asam amino protein HN virus ND.



Gambar 3. Pohon filogenetik berdasarkan susunan nukleotida gen pengkode protein HN virus ND yang dibandingkan dengan susunan nukleotida gen pengkode protein HN isolat vaksin yang digunakan di Indonesia, isolat Indonesia dan isolat lainnya yang diperoleh dari *genbank*. Cabang yang bergaris kuning merupakan isolat yang ditemukan di pasar Kota Surabaya.

Tabel 4. Variasi epitop linear sel B pada isolat yang ditemukan di Surabaya tahun 2003 dan 2016

No	Awal	Akhir	Peptida	Panjang	Log Skor
1	1	1	S	1	0.455
2	11	13	KQK	3	1.774
3	11	13	RQK	3	1.430
4	11	13	KAK	3	1.392
5	45	53	ASTPSDLVG	9	6.753
6	44	53	GASTPSDLVG	10	8.332
7	57	64	RISKAEEK	8	4.862
8	57	75	RISRAEEKITSTLGSNQDV	19	11.297
9	70	71	GS	2	0.894
10	73	75	QDV	3	1.570
11	110	130	NGAANNSGWGAPIHDPDYIGG	21	22.135
12	141	146	NDVTSF	6	4.485
13	140	146	ASDVTSF	7	4.829
Total			13		

positif (LaSota). Hasil elektroforesis dari PCR virus ND dengan primer spesifik bagian dari gen HN, F for 5' AGT TAG CCA AGT TGC

GTT AG 3' dan HN rev 5' AAC CTG ATC CTG TAG TAG GC 3' menunjukkan hasil dengan terdeteksinya fragmen DNA pada sampel

dengan panjang 503 bp yang dapat dilihat pada Gambar 1. Sampel virus ND yang terdeteksi positif region gen HN sepanjang 503 bp adalah ND1, ND3, ND9, SBY02, SBY02 dan kontrol positif (LaSota). Sampel-sampel regio gen HN sepanjang 503 bp tersebut kemudian disekuensing untuk dilakukan analisis asam amino, analisis homologi, analisis kekerabatan, dan prediksi epitop sel B.

Analisis Asam Amino Protein HN Virus ND

Hasil sekuensing nukleotida yang telah dianalisis menggunakan *software Bioedit v7.2.5* kemudian ditranslasi menjadi asam amino menggunakan *software* yang sama, satu asam amino dikode untuk tiga nukleotida sehingga 503 nukleotida setelah ditranslasi menjadi 168 asam amino. Hasil translasi asam amino sampel virus ND kemudian dilakukan *multiple alignment software ClustalW* yang terintegrasi dalam *software Bioedit* (Gambar 2).

Analisis Homologi

Analisis homologi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan 15 isolat perbandingan yang terdiri dari isolat virus vaksin dan isolat virus ND yang beredar di Indonesia. Isolat virus vaksin terdiri dari strain LaSota, B1, *Beaudette C*, Komarov, Roakin, dan V4. Sedangkan isolat virus ND yang beredar di Indonesia adalah isolat gen penyandi protein HN yang terdapat di *Genebank*.

Hasil analisis homologi menunjukkan bahwa Sampel ND1/2003, ND3/2003, ND9/2003 dan SBY01/2016 memiliki kesamaan homologi tertinggi dengan vaksin *Beaudette C*, Komarov, dan Roakin yaitu sebesar 94% - 95%, sedangkan untuk sampel SBY02/2016 memiliki homologi tertinggi dengan strain vaksin LaSota46/M24709.1, LaSota/Iran/16 dan B1/AF309418.1 yaitu sekitar 99% (Tabel 3).

Analisis Kekerabatan

Hasil analisis kekerabatan menunjukkan bahwa sampel ND1/2003, ND3/2003, ND9/2003 dan SBY01/2016 berada pada satu kluster. Sampel SBY02/2016 berada pada kluster yang sama dengan kontrol positif (LaSota), virus

vaksin LaSota46/M24709.1, LaSota/Iran/16, dan B1/AF309418.1. Hal ini berkaitan dengan kontribusi protein HN terhadap virulensi yang ditunjukkan dengan bertukarnya gen antar strain (Jin., et al., 2017). *Shedding* virus ini dikuatkan oleh penelitian Oldoni et al. (2005), penelitian tersebut menemukan bahwa protein HN dari virus lentogenik seperti LaSota diinsersi ke dalam *backbone* dari virus vaksin *Beaudette C*, menyebabkan penyebaran virus yang memiliki sifat seperti strain lokal.

Dari pohon filogenetik tersebut (Gambar 3), sampel dari kluster ND1/2003, ND3/2003, ND9/2003 dan SBY01/2016 menunjukkan kecenderungan terpisah dari kluster strain *Beaudette C*. Kluster kontrol positif (LaSota) yang menunjukkan kedekatan dengan strain virus vaksin, hal ini menunjukkan bahwa terjadi *shedding* virus pada kluster tersebut. *Shedding* virus sendiri merupakan cemaran virus dari unggas yang telah divaksin dan menyebar pada lingkungan sekitar peternakan atau lingkungan sekitar.

Analisis Epitop

Hasil dari prediksi epitop didapatkan bahwa pada sampel tahun 2003 yaitu ND1, ND3, dan ND9, terdapat beberapa kesamaan hasil prediksi epitop antara lain ASTPSDLVG, RISKAE EK, GS, QDV, NGAANNSGWGAPIHDPDYIGG dan NDVTSF. Epitop yang nilai imunogeniknya terbaik terdapat pada NGAANNSGWGAPIHDPDYIGG dengan log skor tertinggi sebesar 22.135. Hasil prediksi epitop sampel tahun 2016 yaitu sampel SBY01 dan SBY02 menunjukkan kesamaan pada epitop NGAANNSGWGAPIHDPDYIGG dengan log skor 22.135. Sehingga NGAANNSGWGAPIHDPDYIGG merupakan epitop terbaik dari sampel yang ditemukan pada tahun 2003 dan 2016 (Tabel 4). Pemilihan epitop yang memiliki sifat imunogenik tertinggi dapat digunakan sebagai bahan pengembangan vaksin yang lebih efisien, vaksin berbasis epitop memiliki kemurnian lebih tinggi sehingga lebih efisien dan dapat diproduksi dalam kapasitas yang besar (Toth, 2008).

KESIMPULAN

Penelitian ini menemukan bahwa dari 37 sampel yang ditemukan di pasar tradisional Kota Surabaya selama tahun 2003 dan 2016, terdapat 10 sampel yang positif uji HI dan 5 sampel yang positif secara uji molekuler *one step* PCR. Hasil Analisis menunjukkan, sampel ND1/2003, ND3/2003, ND9/2003 dan SBY01/2016 memiliki struktur asam amino yang hampir sama dengan tingkat homologi sebesar 94% dan 95% dengan virus vaksin *Beaudette C*, Komarov dan Roakin. Hal ini menyebabkan sampel tersebut berada di kluster yang sama dengan isolat vaksin pada pohon filogenetik.

Sedangkan SBY02/2016 memiliki struktur asam amino yang sama dengan kontrol positif dengan tingkat homologi mencapai 99% dengan LaSota dan B1, 96% dengan isolat vaksin *Beaudette C*, Komarov dan Roakin. Dalam pohon filogenetik, sampel SBY02/2016 berada satu kluster dengan kontrol positif (LaSota).

Hasil dari analisis epitop 10 sampel yang ditemukan, terdapat 13 variasi epitop dengan NGAANNSGWGAPIHDPDYIGG sebagai epitop yang memiliki nilai Log skor tertinggi sebesar 22.135 yang berada pada posisi asam amino 110 hingga 130 sehingga menjadi epitop yang potensial sebagai *seed* vaksin berbasis isolat lokal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih untuk rekan penelitian yang memberi dukungan dan bantuan selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

Alexander, D. J. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. Sci. Tech*, 19, 443–462.

ADHPI. (2011). Seminar ND Genotip 7B. <http://www.adhpi.org/seminar/seminar-ndgenotip-7b/>.

Adi, A. A. A. M., Astawa, N. M., Putra, K. S. A., Hayashi, Y., & Matsumoto, Y. (2010). Isolation and Characterization of a Pathogenic Newcastle Disease Virus from a Natural Case in Indonesia. *J. Vet. Med. Sci*, 72(3), 313-319.

BPS. (2015). Data sensus peternakan. (diunduh tanggal 25 Juli 2016). Tersedia pada: <https://www.bps.go.id/linkTableDinamis/view/id/1031>.

Byarugaba, D. K., Kizito, K. M., John, B. O., Martin, O., Agnes, W., Maxwell, O., Otim, H. K., Jessica, L. N., Angelique, T., Mathilde, C. P., & Mariette, F. D. (2014). High Pathogenicity and low genetic evolution of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle Disease Virus) isolated from live bird market in Uganda. *Virology Journal*, 11, 173.

Davis-Fields, M. K., Allison, A. B., Brown, J. R., Poulson, R. L., & Stallknecht, D. E. (2014). Effects of temperature and pH on the persistence of avian paramyxovirus-1 in water. *J. Wildl. Dis*, 50, 998–1000.

Huang, Z., Panda, A., Elankumaran, S., Govindarajan, D., Rockemann, D. D., & Samal, S. K. (2004). The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *J. Virol*, 78(8), 4176–4184.

Hu, B., Huang, Y., He, Y., Xu, C., Lu, X., & Zhang, W. (2010). Avian influenza virus and Newcastle disease virus (NDV) surveillance in commercial breeding farm in China and the characterization of class I NDV isolates. *Veterinary Microbiology*, 144, 82-86.

Jin, J. H., Cheng, J. L., He, Z. R., Ren, Y. C., Yu, X. H., Song, Y., Yang, H. M., Yang, Y. L., Liu, T., & Zhang, G. Z. (2017). Different Origin of Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase

- Protein Modulate the Replication Efficiency and Pathogenicity of the Virus. *Front. Microbiol*, 8, 1607.
- Kencana, G. A. Y., I Made, K., & I Gusti, N. K. M. (2012). Peneguhan Diagnosis Penyakit Newcastle Disease Lapang pada Ayam Buras di Bali Menggunakan Teknik RT-PCR. Fakultas Kedokteran Hewan Udayana. Denpasar. Bali.
- Khan, M. K., Shabnam, Z., Sajib, C., Rajib, C., Mohammad, M. A., Taufiqur, R. B., Muhammad, J. R., Carmen, F., Firdausi, Q., & Zeba, I. S. (2014). In silico predicted mycobacterial epitope elicits in vitro T-cell responses. *Molecular Immunology*, 61, 16–22.
- Kurnianingtyas, E., Setiyaningsih, S., & Indrawati, A. (2017). Penentuan Patotipe Molekuler Virus Newcastle Disease: Isolat Lapang di Tiga Wilayah Kabupaten Jawa Timur. *Acta Veterinaria Indonesia*, 5(1), 8–15.
- Mahon, P. J., Mirza, A. M., Musich, T. A., & Iorio, R. M. (2008). Engineered Intermonomeric Disulfide Bonds in the Globular Domain of Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein: Implications for the Mechanism of Fusion Promotion. *Journal of Virology*, 83(21), 10386–10396.
- McGinnes, L. W., & Morrison, T. G. (2006). Inhibition of Receptor Binding Stabilizes Newcastle Disease Virus HN and F Protein-Containing Complexes. *Journal of Virology*, 80(6), 2894–2903.
- Miller, P. J., Koch, G., Swayne, D. E., Glisson, J. R., McDougald, L. R., Nolan, L. K., Suarez, D. L., & Nair, V. (2013). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections; Newcastle Disease. In: Diseases of Poultry, 13th edition Wiley-Blackwell, Hoboken. New Jersey. 89-138.
- Miller, P. J., Afonso, C. L., Spackman, E., Scott, M. A., Pedersen, J. C., Senne, D. A., Brown, J. D., Fuller, C. M., Uhart, M. M., Karesh, W. B., Brown, I. H., Alexander, D. J. & Swayne, D. E. (2010). Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype-10 Detected In Rockhopper Penguins From The Falkland Islands. *Journal Virology*, 84(21), 11496–11504.
- Miller, P. J., King, D. J., Afonso, C. L., & Suarez, D. L. (2007). Antigenic Differences Among Newcastle Disease Virus Strains of Different Genotypes Used in Vaccine Formulation Affect Viral Shedding After a Virulent Challenge. *Vaccine*, 25, 7238–7246.
- Mohamed, M. H. A., Sachin, K., Anandan, P., & Samal, S. K. (2011). Sequence Analysis of Fusion Protein Gene of Newcastle Disease Virus Isolated from Outbreaks in Egypt During 2006. Virginia-Maryland Regional Collage of Veterinary Medicine, University of Maryland.
- OIE. (2012). Newcastle Disease. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.14. <http://www.oie.int/international-standart-setting/terrestrial-manual/accessonline>.
- OIE. (2015). Disease information. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail. Diakses tanggal 18 November 2015.
- Oldoni, I., Brown, C. C., King, D. J., Samal, S., & Seal, B. S. (2005). The use of in situ hybridization and immunohistochemistry to study the pathogenesis of various Newcastle disease virus strains and recombinants in embryonated chicken eggs. *Microbiology & Pathogenesis Journal*, 39, 69–75.

- Orsi, M. A., Doretto Jr., L., Reischak, D., da Silva, L.H.A., Spilki, F.R., Buzinaro, M.G., & Arns, C. W. (2009). Newcastle Disease Virus Vaccine Strains: Immunogenicity is not Influenced by ICPI. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 2, 129–133.
- Pardede, L. (2005). Strategi Pengembangan Vaksin Lokal dalam Mengendalikan dan Mencegah Penyakit pada Ayam Lokal. Prosiding Lokakarya Nasional Inovasi Teknologi Pengembangan Ayam Lokal. Puslitbang Peternakan.
- Rantam, F. A. (2005). Virologi. Surabaya, Airlangga University Press.
- Rell, F., Adi, A. A. M., I Gusti N. K. M. (2015). Virulensi Virus Newcastle Disease Isolat Lapang Berdasarkan Analisis Bioinformatika Gen Protein Hemagglutinin-Neuraminidase. *Jurnal Ilmu Kesehatan Hewan*, 3(1), 17-28.
- Saepulloh, M., & Darminto. (2005). Kuman newcastle disease pada itik dan upaya Pengendaliannya. *Wartazoa*, 15(2).
- Toth, I., Simerska, P., & Fujita, Y. (2008). Recent Advances in Design and Synthesis of Self-Adjuvanting Lipopeptide Vaccines. *Int. J. Pept. Res. Ther*, 14, 333-340.
- Wakamatsu, N., King, D. J., Seal, B. S., Samal, S. K., & Brown, C. C. (2006). The pathogenesis of Newcastle disease: a comparison of selected Newcastle disease virus wild-type strains and their infectious clones. *Virology*, 353, 333–343.
- Yusoff, K., & Tan, W. S. (2001). Newcastle Disease: Macromolecules and opportunities. *Avian Pathology*, 30, 439–455.
