

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL
(PMDSU)**



**ANALISIS FILOGENETIK GEN PENGKODE PROTEIN F DAN
PREDIKSI EPITOP SEL B VIRUS *NEWCASTLE DISEASE*
ISOLAT LAPANG UGGAS AIR SEBAGAI
KANDIDAT VAKSIN**

TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh	0010035907
Prof. Dr. Rahaju Ernawati, drh., M.Sc	0003105002
Naimah Putri, drh., M.Si	061817117307

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 145/SP2H/LT/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL
(PMDSU)



KKC
KK
LP 61/19
Ran
a

ANALISIS FILOGENETIK GEN PENGKODE PROTEIN F DAN
PREDIKSI EPITOP SEL B VIRUS *NEWCASTLE DISEASE*
ISOLAT LAPANG UNGGAS AIR SEBAGAI
KANDIDAT VAKSIN

TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh	0010035907
Prof. Dr. Rahaju Ernawati, drh., M.Sc	0003105002
Naimah Putri, drh., M.Si	061817117307

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 145/SP2H/LT/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FEDIK ABDUL RANTAM

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : ANALISIS FILOGENETIK GEN PENGKODE
PROTEIN F DAN PREDIKSI EPITOP SEL B VIRUS
NEWCASTLE DISEASE ISOLAT LAPANG UNGGAS
AIR SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr. drh. FEDIK ABDUL RANTAM,
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0010035907
Jabatan Fungsional : Guru Besar
Program Studi : Vaksinologi dan Imunoterapetika
Nomor HP : 08123593245
Alamat surel (e-mail) : fed-a-r@fkh.unair.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr. drh. RAHAYU ERNAWATI M.Sc.
NIDN : 0003105002
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : Naimah Putri, drh
NIDN :
Perguruan Tinggi :

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 60,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 180,000,000



Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

(Prof. Dr. Pudji Sianto, drh., M.Kes)
NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 26 - 11 - 2018
Ketua,

(Dr. drh. FEDIK ABDUL RANTAM,)
NIP/NIK 195910031987011001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Unair

(Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D)
NIP/NIK 196705071991021001





RINGKASAN

“ANALISIS FILOGENETIK GEN PENGKODE PROTEIN F DAN PREDIKSI EPITOP SEL B VIRUS *NEWCASTLE DISEASE* ISOLAT LAPANG UNGGAS AIR SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN”

Newcastle disease (ND) merupakan penyakit yang sangat penting dalam dunia peternakan. Menurut OIE penyakit ND termasuk di dalam daftar penyakit hewan menular. Secara ekonomis ND sangat merugikan sehingga dikategorikan sebagai *Notifiable disease*. Virus ND memiliki kemampuan untuk menginfeksi hampir semua spesies unggas, baik unggas liar maupun yang sudah didomestikasi. Sampai saat ini belum ada satu daerahpun di Indonesia yang bebas dari penyakit ini meskipun telah dilakukan penanggulangan penyakit ND dengan program vaksinasi sejak tahun 1950.

Protein F memiliki sifat imunogenik yang tinggi dan menjadi target utama respon imun sehingga dapat dijadikan epitop imunogenik. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis homologi nukleotida, menjelaskan hubungan kekerabatan gen pengkode protein F virus ND dari isolat angsaa (*Cygnus olor*) melalui pohon filogenetik dan menganalisis epitop imunogenik sehingga bisa digunakan sebagai kandidat vaksin.

Sampel dalam penelitian ini adalah ND/AG1/2018, ND/AG2/2018, ND/AG3/2018 dan ND/AG4/2018 berupa swab kloaka dari beberapa wilayah di Surabaya dan Lumajang serta kontrol Positif (LaSota) dari ATCC. Sampel kemudian diisolasi pada TAB dan diidentifikasi terhadap virus *Newcastle disease* (ND) dengan uji HA yang kemudian dikonfirmasi dengan uji HI menggunakan antiserum *Newcastle disease* (ND). Sampel virus yang dipanen dari TAB dilakukan ekstraksi RNA dengan menggunakan reagen Trizol LS (Invitrogen), setelah itu dilakukan pemeriksaan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan sepasang primer *forward* dan *reverse* dengan target 699 bp. Hasil positif dari pemeriksaan RT-PCR selanjutnya disekuensing sehingga diketahui sekuen nukleotida dari masing-masing sampel. Sekuen kemudian dilakukan analisis homologi dan kekerabatan menggunakan program

BLAST *Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences* dari NCBI dan software BioEdit Ver.8 serta MEGA6. Analisis prediksi epitop sel B pada protein F menggunakan *software* online IEDB.

Hasil penelitian ini adalah didapatkannya fragmen DNA dengan panjang 699 bp dari isolat hasil amplifikasi PCR. Hasil dari analisis homologi diketahui bahwa isolat ND/AG1/2018, ND/AG2/2018 dan ND/AG3/2018 dalam penelitian ini memiliki homologi tertinggi dengan vaksin LaSota KJ563940.1 dan LaSota AY845400.2 sebesar 97% - 98% sedangkan sampel ND/AG4/2018 memiliki homologi tertinggi dengan vaksin LaSota KJ563940.1 dan LaSota AY845400.2 sebesar 94% - 95%. Hasil dari analisis kekerabatan menunjukkan bahwa isolat dalam penelitian ini menunjukkan kedekatan melalui ranting pohon filogenetik yang sama dengan isolat virus vaksin LaSota. Hasil analisis prediksi epitop menunjukkan bahwa isolat ND/AG1/2018 memiliki 9 kandidat epitop imunogenik terhadap sel B pada gen pegkode protein F, ND/AG2/2018 memiliki 12 kandidat epitop imunogenik terhadap sel B pada gen pegkode protein F, ND/AG3/2018 memiliki 9 kandidat epitop imunogenik terhadap sel B pada gen pegkode protein F dan ND/AG4/2018 memiliki 11 kandidat epitop imunogenik terhadap sel B pada gen pegkode protein F.

PRAKATA

Alhamdulillah, Puji syukur kehadiran Allah SWT dan segala rahmat-Nya, sehingga penelitian tentang Analisis Filogenetik Gen Pengkode Protein F dan Prediksi Epitop Sel B Virus *Newcastle disease* Isolat Lapang Unggas Air Sebagai Kandidat Vaksin dapat diselesaikan.

Penyakit yang disebabkan oleh virus *Newcastle disease* (ND) merupakan salah satu penyakit infeksi pada unggas yang secara ekonomis sangat merugikan. Protein F adalah salah satu protein yang terdapat pada virus ND yang memiliki sifat imunogenik yang tinggi dan menjadi target utama respon imun sehingga dapat dijadikan epitop imunogenik. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk menganalisis homologi nukleotida, menjelaskan hubungan kekerabatan gen pengkode protein F virus ND dari isolat angsa (*Cygnus olor*) melalui pohon filogenetik dan menganalisis epitop imunogenik sehingga bisa digunakan sebagai kandidat vaksin.

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna. Walaupun demikian, semoga tulisan ini dapat bermanfaat dan dapat memberikan informasi kepada masyarakat banyak.

Surabaya, 20 November 2018

Peneiti

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN.....	iii
PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	17
BAB 4 METODE PENELITIAN	18
BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	23
BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA.....	40
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN.....	47



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Daftar Primer <i>Forward</i> dan <i>Reverse</i>	21
5.1 Sampel Swab Kloaka Unggas Air.....	23
5.2 Hasil Uji HA dan HI	24
5.3 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG1/2018.	35
5.4 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG2/2018.	36
5.5 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG3/2018.	37
5.6 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG4/2018.	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Virus <i>Newcastle Disease</i> (ND).....	8
5.1 Hasil Elektroforesis.....	25
5.2 Urutan Nukleotida Gen Penyandi Protein F Virus ND.....	29
5.3 Urutan Asam Amino Gen Penyandi Protein F Virus ND	31
5.4 Pohon Filogenetik.....	33
5.5 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG1/2018	34
5.6 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG2/2018	35
5.7 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG3/2018	36
5.8 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG4/2018	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Indian Journal of Public Health Research & Development.....	47
2 Veterinary Medicine Journal, Tripoli Libya	48



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Newcastle disease (ND) disebabkan oleh virus termasuk dalam famili *Paramyxoviridae*, genus *Paramyxovirus*, berbentuk pleomorfik biasanya bulat dengan diameter 100-500 nm, namun ada pula yang berbentuk filamen (Kencana dan Gusti, 2012). Virus ini memiliki kemampuan untuk menginfeksi hampir semua spesies unggas, baik unggas liar maupun yang sudah didomestikasi. Infeksi alami telah dilaporkan pada manusia dan rodensia. Spesies selain unggas dapat terinfeksi dan berperan sebagai vektor mekanik dari ND (Ausvetplan, 2014).

Tahun 1926, penyakit ND pertama kali dilaporkan oleh Kraneveld di Jakarta (Kumar *et al.*, 2011). Sejak saat itu penyakit ND dilaporkan telah terjadi dimana-mana. Sampai saat ini belum ada satu daerahpun di Indonesia yang bebas dari penyakit ini meskipun telah dilakukan penanggulangan penyakit ND dengan program vaksinasi sejak tahun 1950 (Bahri dkk., 2005).

Kasus terbaru telah dilaporkan bahwa terjadi kematian lebih dari dua puluh ekor ayam kampung di Kota Mojokerto, Jawa Timur dengan gejala leher ayam terpuntir, terjadi kelumpuhan serta terjadi penurunan nafsu makan. Setelah dilakukan rapid tes terhadap sampel dan mendapatkan hasil yang negatif terhadap AI (*Avian influenza*) atau flu burung, tetapi positif terhadap ND (Detiknews, 2018).

Wabah ND yang terjadi di Indonesia biasanya disebabkan oleh strain velogenik type Asia yang berarti termasuk golongan virus yang bersifat akut, sangat mematikan, dan patogenisitasnya sangat tinggi. Strain ini disebut juga velogenik *viscerotropik* dengan gejala nafsu makan hilang, mencret disertai darah, lesu, sesak nafas, ngorok, bersin, batuk, paralisis parsial atau komplit, kadang terlihat gejala tortikalis. *Cross protection* yang terjadi antar strain virus ND dapat melawan tantangan virus ND lainnya, sifat inilah yang mendasari pembuatan vaksin berasal dari strain ND dengan virulensi rendah (lentogenik & mesogenik) (Miller *et al.*, 2013). Unggas liar terutama unggas air dapat menjadi reservoir dari

galur lentogenik sehingga bisa dikembangkan untuk pembuatan vaksin (OIE, 2012).

Menanggulangi kejadian penyakit ini, dilakukan program vaksinasi diantaranya menggunakan vaksin aktif maupun inaktif. Pada ayam broiler usia 0-4 hari divaksinasi dengan vaksin ND secara tetes mata atau *spray* dan dilanjutkan dengan dilakukan pengulangan menggunakan vaksin NDaktif yang diberikan melalui air minum pada usia 7 – 14 hari (Ausvetplan, 2014). Program vaksinasi ND yang dilakukan di Indonesia diantaranya menggunakan vaksin aktif-lentogenik (misalnya strain F, B1, dan La Sota) sebagai jenis vaksin yang paling umum digunakan (Orsi *et al.*, 2009). Vaksin lain yang telah dipasarkan adalah vaksin aktif-mesogenik (misalnya Komarov dan Roakin) serta vaksin inaktif (OIE, 2012).

Penggunaan vaksin di Indonesia yang tidak homolog dengan strain virus yang beredar pada wabah menyebabkan terjadi peningkatan ekskresi virus ke lingkungan oleh unggas yang terinfeksi (Miller *et al.*, 2013). Adanya perubahan genetik dari virus yang menyebabkan kegagalan vaksinasi menjadi pertimbangan dalam menggunakan vaksin komersial yang sudah ada dan mendorong untuk mempersiapkan vaksin yang lebih baru (Mohamed *et al.*, 2011; Wijayanti, 2016). Melakukan penelitian dan mengembangkan vaksin ND dengan memanfaatkan isolat lokal adalah salah satu strategi yang dilakukan untuk pengembangan vaksin ND di Indonesia menurut Bahri dkk (2005). Mengingat isolat lokal memiliki keunggulan kompetitif dan komparatif dalam mengatasi penyakit ND di Indonesia. Kelebihan lain dengan menggunakan vaksin homolog adalah dapat menahan *shedding* (cemaran virus oleh ayam yang terinfeksi) dengan lebih baik (Infomedion, 2015). Vaksin ND yang diformulasikan lebih dekat secara filogenetik dengan virus lapangan dapat memberikan kontrol yang lebih baik dengan mengurangi penularan virus ND dari unggas yang terinfeksi (Miller *et al.*, 2007).

Menggunakan teknologi rDNA, dilakukan isolasi terhadap epitop tertentu sehingga dapat menggantikan keseluruhan dalam vaksin. Oleh karena itu, vaksin

berbasis epitop merupakan salah satu alternatif yang dapat dikembangkan dan memiliki potensi besar untuk rancangan pembuatan vaksin, pencegahan penyakit, diagnosis, dan pengobatan. (Guerra *et al.*, 2015).

Genom virus ND mempunyai enam “*Open Reading Frames*” yang mengkode nucleocapsid protein (N), beberapa molekul fosfoprotein (P), *matrix* protein (M), *fusion* protein (F), tiga protein inti dan tiga protein amplop termasuk dua glikoprotein besar hemagglutinin-neuraminidase (HN) dan large RNA-directed RNA polymerase (L). Selain itu terdapat non-structural protein (V) dan second protein (W) yang dihasilkan pada saat pengubahan RNA pada proses transkripsi gen P (Oberdorfer and Werner, 1998). Dari ke enam protein tersebut hanya protein F dan HN yang mempunyai peranan dalam proses kekebalan karena dapat merangsang pembentukan antibodi protektif (Cho *et al.*, 2008).

Protein F merupakan target utama respon imun dan memiliki sifat imunogenik yang tinggi sehingga dapat dijadikan epitop imunogenik (Samal, 2012). Protein F dibentuk sebagai prekursor, F₀ dengan panjang 1792 nukleotida menyandi 553 asam amino kemudian harus membelah untuk mengaktifkan aktifitas fusi dari protein F (De Leeuw *et al.*, 2005). Sekuen asam amino dari pembelahan protein F memiliki perbedaan antara strain lentogenik, mesogenik, dan velogenik. Protein F dari *strain* lentogenik memiliki sisi pembelahan monobasik, dimana pembelahan dengan ekstra seluler protease seperti leusin yang terbatas pada jaringan tertentu, sedangkan protein F pada *strain* mesogenik dan velogenik memiliki sisi pembelahan multibasik, dimana pembelahannya dibantu oleh enzim protease seperti furin yang terdapat di berbagai jaringan inang sehingga menyebabkan infeksi sistemik (Samal, 2012).

Protein F dapat mengalami perubahan secara genetik maupun proteomik yang disebabkan oleh faktor-faktor alam maupun buatan. Faktor alam diantaranya letak geografis, temperatur/suhu, hospes/reseptor dan makanan/nutrisi. Sedangkan faktor buatan meliputi kesengajaan seperti rekombinan (*insertion* atau *deletion*). Adanya perubahan susunan genetik gen pengkode protein F virus ND mengindikasikan adanya mutasi pada gen tersebut. Mutasi menyebabkan

perubahan virus secara *genomic* yakni perubahan yang terjadi pada nukleotida DNA, hal ini akan berpengaruh pada nilai homologi maupun filogenetiknya.

Berdasarkan permasalahan tersebut perlu dilakukan penelitian untuk menganalisis tingkat homologi nukleotida gen pengkode protein F virus ND dari isolat angsa (*Cygnus olor*) dibandingkan dengan virus vaksin yang digunakan di Indonesia, menganalisis hubungan kekerabatan gen pengkode protein F virus ND dari isolat angsa (*Cygnus olor*) dengan virus vaksin yang digunakan di Indonesia serta memprediksi epitop gen pengkode protein F yang memiliki sifat imunogenik yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk pengembangan vaksin berbasis epitop.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

- 1) Berapa tingkat homologi nukleotida gen pengkode protein F virus ND dari isolat angsa (*Cygnus olor*) dibandingkan dengan virus vaksin yang digunakan di Indonesia?
- 2) Bagaimana hubungan kekerabatan gen pengkode protein F virus ND dari isolat angsa (*Cygnus olor*) dengan virus vaksin yang digunakan di Indonesia?
- 3) Bagaimana prediksi epitop imunogen gen pengkode protein F virus ND dari isolat angsa (*Cygnus olor*)?



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sejarah Penyebaran Penyakit

Newcastle Disease (ND) pertama kali diidentifikasi dan dilaporkan oleh Profesor Kranaveld yang bekerja di laboratorium yang sekarang dikenal sebagai Balai Besar Penelitian Veteriner (BBalivet) di Bogor, Jawa Barat, Indonesia pada tahun 1926. Kemudian pada tahun 1927 di Inggris terjadi wabah penyakit yang ganas pada unggas di daerah Newcastle, Upon Tyne yang diidentifikasi oleh Doyle. Karena pada saat itu kejadian wabah tersebut belum diketahui penyebabnya, maka oleh pelapor penyakit tersebut disebut sebagai ND sesuai dengan tempat pertama kali ditemukannya. Kemudian setelah tahun 1935 nama ND baru digunakan oleh Doyle (Samal, 1997). Menurut Doyle (1927) dan Levine (1964) sebelumnya penyakit yang menunjukkan gejala yang sama dengan ND yang pernah diidentifikasi pada tahun 1924 di Semenanjung Korea dan di Eropa dipertengahan tahun 1926, selanjutnya ND menyebar dengan cepat ke beberapa negara (*panzootik*).

ND di Indonesia dikenal sebagai penyakit tetelo. Penyakit ini telah menyebar ke berbagai daerah, baik di Jawa maupun diluar Jawa. Serangan ND umumnya mulai meningkat pada awal musim hujan dan mencapai puncaknya pada pertengahan musim tersebut, serta wabah biasanya terjadi pada saat peralihan dari musim hujan ke musim kemarau (Darminto, 1992).

2.2 Epidemiologi *Newcastle disease* (ND)

Ternak unggas terutama ayam senantiasa mendapat ancaman yang serius dari berbagai macam penyakit. Diantara penyakit-penyakit ayam, penyakit ND merupakan penyakit yang sangat penting di Indonesia, karena telah menyebar di seluruh Indonesia dan menimbulkan kerugian yang sangat besar. Kerugian yang diakibatkan oleh kematian ayam dan penurunan produksi telur selalu mengancam

lebih dari 200 juta ekor ayam di Indonesia, dan diperkirakan mencapai lebih dari 10 juta dolar AS jika penyakit ND tidak ditanggulangi (Rukmana, 2007).

Penyakit ND diklasifikasikan sebagai penyakit list A oleh *World Animal Health Organization (Office International des Epizooties, OIE)* karena penyakit ini merupakan penyakit dengan tingkat penularan tinggi, dengan angka mortalitas dan morbiditas yang tinggi pada burung (OIE, 2012).

Kasus ND dilaporkan terjadi secara konsisten pada semua benua di dunia (Munir *et al.*, 2012). *Panzootik* pertama kali penyakit ND dimulai di Asia yaitu Pulau Jawa, Indonesia dan di Inggris pada tahun 1926 (OIE, 2012). *Panzootik* yang kedua terjadi di Timur Tengah pada akhir 1960an dan menyebar ke negara lain. *Panzootik* ketiga yang terjadi cukup besar muncul lagi di Timur Tengah pada akhir tahun 1970an yang disebabkan oleh *strain* neurotropik virus ND, dan masuk dalam *pigeon paramyxovirus* tipe 1. Tahun 1981 virus ND mencapai Eropa dan menyebar secara cepat di seluruh dunia (Mase *et al.*, 2002). Selama tahun 2012, *outbreak* ND terjadi di Jallo Wildlife Park, Lahora, Pakistan, yang disebabkan oleh serotipe APMV 1. Dalam waktu kurang dari satu minggu virus ini menyerang hampir 190 ekor merak dengan angka kematian mencapai 100% (Munir *et al.*, 2012).

Panzootik ND pertama terjadi sebagai akibat serangan virus ND genotipe 2, 3, dan 4. *Panzootik* kedua terjadi di Timur Tengah disebabkan oleh virus *Newcastle disease* (ND) genotip 5 dan 6, sedangkan *panzootik* ketiga tahun 1970-an terjadi akibat serangan ND genotipe 7 dan 8. *Outbreak* ND akibat virus ND genotipe 7 terjadi di Indonesia pada akhir tahun 1980. Virus ND genotipe 7 merupakan virus velogenik viserotropik (Infovet, 2014). Kajian seroepidemiologi terhadap ayam petelur untuk melihat titer antibodi positif terhadap virus genotipe 7 memperlihatkan hasil bahwa, serum dari Kabupaten Lebak, Serang, Sleman, Bandung Klungkung, Cianjur dan Kabupaten Bantul positif terhadap virus ND genotipe 7 (Hidayanto dkk ., 2013).

2.3 Etiologi dan Morfologi Virus *Newcastle disease* (ND)

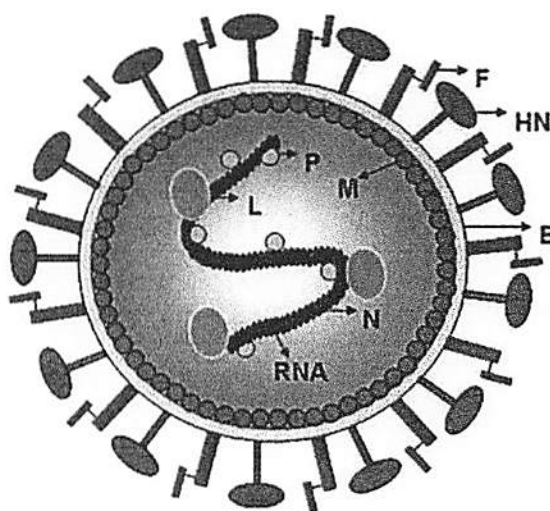
ND disebabkan oleh Avian Paramyxovirus tipe 1 (APMV-1) yang diklasifikasikan ke dalam genus Avulavirus, subfamili Paramyxovirinae, dan famili Paramyxoviridae (OIE, 2012). Avian Paramyxovirus (APMV) terdiri dari 10 serotipe yaitu APMV-1 sampai APMV-10. Virus ND berbentuk pleomorfik, biasanya berbentuk bulat dengan diameter 100-500 nm, namun ada pula yang berbentuk filamen dan beramplop.

Berdasarkan panjang genom Czeglédi *et al.* (2006) membagi virus ND menjadi 2 kelas yaitu virus kelas I terdiri dari 15.198 nukleotida dan virus kelas II terdiri dari 15.186 atau 15.192 nukleotida. Virus Kelas I sebagian besar bersifat avirulent dan dapat diisolasi dari unggas air dan burung. Virus kelas II bisa bersifat pathogen maupun apathogen, banyak dijumpai terdapat pada unggas komersial, bangsa burung dan kalkun. (Kim *et al.*, 2007).

Virus ND mempunyai enam protein mayor serta dua protein non-struktural yang menyusun genomnya. Enam protein mayor tersebut adalah *Nucleocapsid protein* (N), *Phosphoprotein protein* (P), *Matrix protein* (M), *Fusion protein* (F), *Hemagglutinin-Neuramidase protein* (HN), *Large Polymerase protein* (L) dan dua protein non-struktural yaitu protein V dan W yang dihasilkan oleh gen P selama transkripsi dari mRNA melalui proses insersi guanin. Protein ini mempunyai peran masing-masing dalam menentukan virulensi virus ND (Hewajuli dan Dharmayanti, 2011). Protein M, F, dan HN merupakan protein yang berhubungan dengan amplop virus, protein F dan HN berperan dalam proses masuk dan pelepasan virus, sedangkan protein M terkait dalam morfogenesis dan *budding* virus. Protein V berperan dalam interferon antagonis, dan protein N berfungsi untuk *encapsidates* genom RNA untuk membentuk nukleokapsid yang berfungsi sebagai template guna transkripsi dan replikasi virus, sedangkan protein P diperlukan untuk sintesis RNA (Dortmans *et al.*, 2010).

Virus ND yang ditemukan antara tahun 1930-1960 memiliki panjang genom 15.186 nt dan masuk ke dalam *genotype* I, II, III, IV, dan IX. Sedangkan yang ditemukan setelah tahun 1960 memiliki panjang genom 15.192 nt yang

masuk ke dalam *genotype* V, VI, VII, VIII, X dan XI, kecuali virus ND yang ditemukan pada tahun 1998- 2000 di Australia masuk ke dalam *genotype* II. *Genotype* VII dibagi lagi menjadi subgenotype a, b, c, d, e, f, dan g (Hidayanto dkk., 2013).



Gambar 2.1 Struktur virus *Newcastle disease* (ND) (Yusoff dan Tan, 2001).

2.4 Protein Virus *Newcastle disease* (ND)

2.4.1 Protein Nukleokapsid (N)

Nucleokapsid protein virus ND terdiri dari 489 asam amino, 1747 nukleotida dengan berat molekul 54kDa. Protein ini memiliki fungsi utama dalam *encapsidates* genom virus dalam transkripsi RNA, replikasi dan *packaging*. Protein ini juga berperan dalam menginduksi antibodi spesifik ND pada unggas (Mebatsion *et al.*, 2002).

Selama proses transkripsi dan replikasi protein N berinteraksi dengan P-L polimerase, dan akan berinteraksi dengan protein F selama virus saling berikatan. Konsentrasi intraseluler dari protein N yang tidak berikatan menjadi faktor utama yang mengontrol banyaknya transkripsi dan replikasi dari template genom (Blumberg *et al.*, 1981).

2.4.2 Protein Phosphoprotein (P)

Protein P diperlukan saat sintesis RNA (Dortmans *et al.*, 2010). Gen P dari virus ND memiliki panjang 1452 nukleotida dengan berat molekul 53-56 kDa. Gen P memproduksi dua protein tambahan yaitu protein V dan W, melalui RNA editing. Proses RNA editing adalah penambahan satu nukleotida G pada sisi editing (dekat dengan pusat *open reading frame*) yang memproduksi mRNA enkope protein V, sedangkan penambahan dua nukleotida G akan menghasilkan mRNA encode protein W (Steward *et al.*, 1993).

Protein P membentuk kompleks dengan *unassembled* protein N yang mengatur pergeseran dari transkripsi ke replikasi. Kedua amino dan karboksi-terminal dari protein P dibutuhkan untuk interaksi P-N. Domain yang berbeda dari protein P melaksanakan fungsi yang berbeda dari kompleks P-N saat berinteraksi dengan N protein selama replikasi virus. Residu *carboxyterminal* (247-291) berpartisipasi dalam P-P dan interaksi P-N (Jahanshiri *et al.*, 2005). Protein P juga memiliki peran dalam virulensi yang tergantung pada jenis sel dan strain virus ND (Dortmans *et al.*, 2010).

2.4.3 Protein Matrix (M)

Protein matrix virus ND memiliki panjang 364 asam amino, berperan dalam transport intraseluler komponen virus ND (Munir *et al.*, 2012). Protein M berhubungan dengan amplop virus dan terkait dalam morfogenesis dan *budding* virus (Dortmans *et al.*, 2010).

Protein M sangat berkembang diantara *paramyxovirus* yang terbukti dengan sedikitnya substitusi dasar *non-synonymous* dengan mutasi-mutasi dalam populasi. Temuan dapat digunakan sebagai dasar untuk mengklasifikasikan strain ND yang berbeda dan isolat dari lokasi geografis yang berbeda. Protein M juga memiliki kemungkinan dalam menjaga bentuk bulat dari nukleokapsid. Protein ini membantu dalam proses awal virus dengan berinteraksi dengan membran plasma sel hospes. Protein M memiliki sekuens lokalisasi nuklearnya sendiri dan karena itu tidak memerlukan protein virus ND lain untuk melakukan fungsi lokalisasi nuklear. Protein M sangat penting untuk perakitan virus saat suhu sensitive

mutants gagal untuk menghasilkan tingkat suhu yang diperlukan protein M di bawah suhu sub-optimal (Kumar *et al.*, 2011).

2.4.4 Protein Fusion (F)

Protein fusion (F) dari virus ND merupakan membran glikoprotein tipe I yang memediasi fusi antara amplop virus dengan membran sel inang. Aktivasi protein F akan mengawali fusi membran yang terjadi pada permukaan sel yang memiliki pH netral, kemudian virus ND bisa masuk dan menyebar pada sel inang. Protein F memiliki 553 asam amino, pembelahan protein F merupakan faktor utama dalam menentukan tingkan virulensi dari virus ND. Protein F disusun oleh faktor genom RNA 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' ujung 3' dan 5' berperan sebagai *leader* dan *trailer region*, dengan elemen *cis-acting regulatory* yang berhubungan dengan replikasi, transkripsi dan packaging dari genomik dan antigenomik RNAs. Protein F dari virus ND terdiri dari 13 residu sistein dimana 11 diantaranya merupakan residu sistein pada paramyxovirus yang lain (Samal, 2012).

Protein F dibentuk sebagai prekursor, F₀ dengan panjang 1792 nukleotida menyandi 553 asam amino kemudian harus membelah untuk mengaktifkan aktifitas fusi dari protein F. Pembelahan pada 117 asam amino menghasilkan F₂ disulfida dan F₁ polipeptida derivad dari domain amino-terminal dan carboxyl-terminal dari F₂ (De Leeuw *et al.*, 2005).

Sekuen asam amino dari pembelahan protein F memiliki perbedaan antara strain lentogenik, mesogenik, dan velogenik. Protein F dari *strain* lentogenik memiliki sisi pembelahan monobasik, dimana pembelahan dengan ekstra seluler protease yang terbatas pada jaringan tertentu, sedangkan protein F pada *strain* mesogenik dan velogenik memiliki sisi pembelahan multibasik, dimana pembelahannya dengan *ubiquitous* intra seluler protease. Secara utuh glycosylated protein F dari virus ND terdiri dari domain 470 asam amino ekstra seluler, domain transmembran dekat c-terminal, dan 29 asam amino cytoplasmic. Berat molekul dari F₀, F₁, dan F₂ secara berturut-turut adalah 66, 55, dan 12,5 kDa (Samal, 2012).

2.4.5 Protein Hemagglutinin-Neuraminidase (HN)

Panjang protein HN adalah 1998 nt dengan 557 residu asam amino dan berat molekul 74 kDa. Protein HN dari virus ND merupakan protein multifungsional. Protein ini memiliki kemampuan sebagai reseptor dan memiliki aktivitas neuraminidase (NA) yang berhubungan dengan virus yaitu dengan menghilangkan *sialic acid* dari partikel progeni virus untuk mencegah *self-agglutination* dari progeni itu sendiri. Protein HN berfungsi dalam mengenali *sialic acid* yang mengandung reseptor pada permukaan sel, berfungsi dalam meningkatkan aktifitas protein F dengan jalan membiarkan virus melakukan penetrasi pada permukaan sel (Lamb *et al.*, 2006).

Karakteristik biologi protein HN sangat baik sebagai indikator patogenisitas secara *in vivo*, dalam hal ini HN memiliki kontribusi yang penting dalam penentuan virulensi virus ND (Huang *et al.*, 2004).

2.4.6 Protein Large Polymerase (L)

Protein L adalah protein terbesar dari genom ND, Protein L terdiri dari 2204 aa dengan berat molekul 250 kDa (Lamb and Parks, 2007). Protein L mensintesis mRNA virus dan membantu dalam replikasi RNA genomik. Protein ini adalah gen terakhir yang ditranskrip selama siklus replikasi virus. Selain itu, protein L juga melakukan 5 penutupan, metilasi, dan aktivitas poli A polymerase pada mRNA yang baru terbentuk. Protein L dan P bersama-sama membentuk polimerase virus yang aktif. Kompleks nukleoprotein heliks yang terikat oleh protein N bertindak sebagai template yang diakui oleh kompleks L-P untuk membentuk kompleks polimerase aktif virus. Protein L memodulasi virulensi *Newcastle disease* (ND) menunjukkan peran potensial dalam virulensi virus dengan kemungkinan meningkatkan laju sintesis RNA virus selama replikasi (Rout and Samal, 2008).

2.4.7 Protein V dan W

Virus ND memiliki dua protein tambahan yaitu protein V dan W yang dihasilkan oleh gen P melalui RNA editing (Steward *et al.*, 1993). Derivat protein gen P merupakan amino *co-terminal*, tetapi berbeda dalam panjang karbosisil

terminus dan komposisi asam amino. Protein V pada virus ND dan paramyxovirus lainnya kaya akan *sistein* dengan regio *carboxyl-terminal* yang unik dan mengikat *zinc* (Mebatsion *et al.*, 2001).

Keberadaan protein V dan W ada pada sel yang terinfeksi tapi tidak ada pada partikel virus. Protein V dipertimbangkan sebagai faktor virulensi yang bertindak sebagai interferon sekaligus antagonis. Fungsi dari protein W pada virus ND belum diketahui secara pasti (Samal, 2012).

2.5 Replikasi Virus *Newcastle disease* (ND)

Replikasi virus ND terjadi di sitoplasma dan memiliki kemiripan dengan virus paramyxoviridae yang lain. Replikasi dari virus ND diawali dengan ikatan HN pada amplop virion pada *sialic acid* pada permukaan sel glikolipid yang diikuti dengan fusi virus ke membran sel inang. Protein F mengatur fusi amplop dengan membran plasma. RNA polimerase dibawa ke dalam sel sebagai bagian dari nukleokapsid. Transkripsi, sintesis protein dan replikasi seluruh genom terjadi pada sitoplasma sel inang. Genom dijelaskan sebagai individual messenger RNAs (mRNAs) dan template *full length* positif sense RNA. Genom baru bersama dengan protein L, N, P berbentuk nukleokapsid, yang berhubungan dengan protein M pada virus (Samal, 2012).

2.6 Epitope Sel B

Epitop sel B dapat dikategorikan menjadi dua tipe: epitop linear (*continuous*) dan epitop conformational (*discontinuous*). Epitop linear meliputi rantai samping yang berkelanjutan di dalam sekuens, sedangkan epitop conformational terdiri dari rantai samping yang terpisah tetapi memiliki tempat yang berdekatan (Zang *et al.*, 2011).

2.7 Pengendalian dan Pencegahan *Newcastle disease* (ND)

Penerapan sanitasi dan program biosekuriti yang baik merupakan satu tindakan yang penting dalam upaya pencegahan terjadinya penyakit ND dalam

suatu peternakan. Peternakan tidak boleh kontak dengan unggas dan burung liar maupun burung peliharaan. Tindakan biosekuriti termasuk didalamnya adalah sumber pakan dan air minum, meminimalkan keluar masuknya orang, desinfeksi kendaraan dan peralatan yang masuk peternakan. Keberadaan tikus dan serangga harus dikontrol. Pekerja kandang harus menghindari kontak langsung dengan unggas di luar peternakan, jika memungkinkan pekerja kandang harus mandi dan menggunakan pakaian khusus ketika mau masuk di area peternakan (Ashraf, 2014).

Usaha pencegahan dan pengendalian penyakit ND adalah dengan menggunakan vaksin, beberapa produk vaksin baik vaksin aktif maupun vaksin inaktif. Vaksinasi mampu menginduksi respon imun dalam kurun waktu tertentu selama 10-12 minggu. Monitoring terhadap titer antibodi dari peternakan yang telah divaksin dilakukan secara terus menerus dan dilakukan revaksinasi untuk menjaga agar titer antibodi ayam tetap protektif. Antibodi maternal turut berperan dalam efektivitas vaksin, antibodi maternal melindungi anak ayam dari penyakit selama satu minggu pertama (Ausvetplan, 2014).

2.8 Jenis Vaksin

2.8.1 Vaksin Konvensional

Pada dasarnya vaksin dapat dibagi menjadi dua jenis, yaitu (Suyitno, 2011) : 1) *Live attenuated* (bakteri atau virus hidup yang dilemahkan) adalah vaksin hidup *attenuated* diproduksi di laboratorium dengan cara melakukan modifikasi virus atau bakteri penyebab penyakit. Bakteri atau virus yang digunakan masih memiliki kemampuan untuk tumbuh menjadi banyak (replikasi) dan menimbulkan kekebalan tetapi tidak menyebabkan penyakit. Kelebihan dari vaksin hidup *attenuated* adalah vaksin merangsang respon seluler dan antibodi yang kuat sehingga dapat bertahan dengan hanya satu atau dua dosis pemberian, sedangkan untuk kekurangannya adalah vaksin bersifat labil, dapat mengalami kerusakan bila terkena panas atau sinar, dan dapat berubah menjadi patogen. *Strain* vaksin ND yang diproduksi sebagai vaksin aktif terdiri dari dua kelompok

yakni lentonegik vaksin seperti *Hitchner-B1*, *LaSota*, V4, NDW, I2 dan mesogenik vaksin seperti *Roakin*, *Mukteswar* dan *Komarov* (OIE, 2012); 2) *Inactivated* (bakteri, virus atau komponennya dibuat tidak aktif) adalah vaksin *inactivated* dapat terdiri dari atas seluruh bagian dari virus atau bakteri, atau komponen (fraksi) dari kedua organisme tersebut. Vaksin *inactivated* dihasilkan dengan cara membiakkan bakteri atau virus dalam media pembiakan, kemudian diinaktivasi, dan dimurnikan sehingga hanya komponen-komponen yang hanya diperlukan nantinya akan dimasukkan ke dalam vaksin. Kelebihan dari vaksin *inactivated* adalah bakteri atau virus tidak dapat mengalami mutasi menjadi bentuk yang patogen, sedangkan kekurangannya adalah selalu membutuhkan dosis multipel agar membentuk respon imun yang protektif.

2.8.2 Vaksin Berbasis Epitop

Patotipe virus ND yang menyebabkan *outbreak* pada suatu daerah dalam setiap kurun waktu tertentu terus mengalami perubahan. Mulai dari *panzootik* pertama, kedua, ketiga genotip virus penyebab ND tidak ada yang sama, jika wabah virus ND berlanjut, maka dapat timbul *panzootik* keempat dengan genotip yang semakin bervariasi. Penggunaan vaksin konvensional dengan *seed* virus yang terdahulu menjadi kurang efektif dalam menanggulangi serangan virus ND. Jackson *et al* (2006) mengatakan bahwa pengembangan vaksin berbasis epitop, yang merupakan bagian antigen yang dapat menginduksi sistem imun telah menarik perhatian para peneliti.

Keunggulan vaksin berbasis epitop meliputi tingginya spesifisitas dalam membangkitkan respon imun, kemurnian tinggi, kapasitas produksi besar, dan biaya produksi yang efektif (Toth, 2008). Vaksin berbasis epitop dengan memanfaatkan epitop *conserve* juga dapat dirancang untuk menginduksi respon imun sehingga dapat menjadi vaksin universal (Sette and Fikes, 2003). Vaksin berbasis epitop tersebut lebih aman karena tidak mengandung mikroba hidup yang dapat memperbanyak diri dan menyebabkan penyakit, serta mengurangi terjadinya autoimun (Flower, 2008). Pemanfaatan epitop protein F virus ND diharapkan

mampu menghasilkan vaksin ND universal yang dapat melindungi dari berbagai varian virus ND, meskipun virus ini rentan mengalami mutasi.

Bagian amplop dari virus ND mengandung dua transmembran yakni protein *attachment* hemagglutination-neuraminidase (HN) dan protein fusi (F) yang berbentuk seperti paku yang menonjolkan keluar pada permukaan luar virion virus. Protein HN berinteraksi dengan protein F dalam aktifitas fusi (Morrison *et al.*, 1991). Protein HN dan F merupakan protein yang penting dalam infektivitas dan patogenesis virus ND. Protein HN dan F memproduksi antibodi netralising virus dan antigen protektif. Protein F memperlihatkan kemampuan dalam meningkatkan imunitas yang protektif terhadap virus ND pada ayam (Kumar *et al.*, 2011).

Protein F bersama dengan protei HN merupakan target utama respon imun. Protein F memiliki domain *heptad repeats*, domain transmembran dan *cytoplasmic tail*, dimana ketiganya merupakan asam amino kunci yang berperan dalam proses fusi (Samal, 2012). Maka dari itu penelitian tentang protein F akan sangat bermanfaat dalam peningkatan vaksin ND.

2.9 Reverse transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Reverse transcriptase- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) merupakan metode yang digunakan untuk mengamplifikasi cDNA dari mRNA. RT-PCR digunakan untuk mendapatkan kembali dan menyalin utas 5' dan 3' dari mRNA, menghasilkan kumpulan cDNA yang banyak dari jumlah mRNA yang sangat sedikit. RT-PCR dapat dengan mudah digunakan untuk mengidentifikasi mutasi, polimorfisme dan mengukur kekuatan ekspresi gen. Konsep utama yang digarisbawahi pada teknik ini yaitu mengkonversi mRNA ke bentuk rantai tunggal untuk cetakan cDNA. Primer Oligodeoxynukleotida dihibridisasikan sehingga cDNA dapat teramplifikasi. Tergantung pada tujuan penelitian, primer untuk sintesis cDNA rantai pertama dapat disusun secara khusus untuk hibridisasi gen target atau dapat mengikat secara umum semua mRNA. Teknik RT-PCR memerlukan enzim transkriptase balik (*reverse transcriptase*). Enzim transkriptase balik adalah enzim DNA polymerase yang menggunakan molekul

RNA sebagai cetakan untuk mensintesis molekul DNA (cDNA) yang komplementer dengan molekul RNA tersebut.

2.10 Sekuening

Sekuening DNA adalah proses penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuen DNA, yang merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup. Sekuening DNA dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuennya dengan sekuen DNA lain yang sudah diketahui. Penentuan sekuen DNA berguna di dalam ilmu pengetahuan 'murni' mengenai mengapa dan bagaimana makhluk hidup dapat hidup, selain berguna dalam penerapan praktis karena DNA merupakan ciri kunci makhluk hidup. Pengetahuan akan sekuen DNA berguna untuk mengetahui sekuen asam amino yang disandikan oleh gen.



BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah menentukan urutan nukleotida dan homologi, menjelaskan hubungan kekerabatan gen pengkode protein F virus *Newcastle Disease* (ND) dari isolat angsa (*Cygnus olor*) serta menganalisis epitop imunogen sehingga bisa digunakan sebagai kandidat vaksin.

3.1.2 Tujuan Khusus

- 1) Menentukan tingkat homologi nukleotida gen pengkode protein F virus ND dari isolat angsa (*Cygnus olor*).
- 2) Menganalisis hubungan kekerabatan virus ND dari isolat angsa dengan virus vaksin yang digunakan di Indonesia (*Cygnus olor*).
- 3) Menganalisis epitop imunogen gen pengkode protein F virus ND dari isolat angsa (*Cygnus olor*).

3.2 Manfaat Penelitian

3.2.1 Manfaat Teoritis

Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah mengenai tingkat homologi nukleotida gen pengkode protein F dan mengetahui hubungan kekerabatan virus ND berdasarkan gen pengkode protein F virus ND dari isolat angsa (*Cygnus olor*) serta informasi mengenai epitop yang bersifat imunogenik.

3.2.2 Manfaat Praktis

Diharapkan penelitian ini dapat dimanfaatkan sebagai acuan dalam pengembangan industrial vaksin untuk dikembangkan sebagai dasar dalam inovasi produksi vaksin yang mampu melawan serangan ND secara lebih efektif.

UNIVERSITAS AIRLANGGA
PERPUSTAKAAN
Jl. M. YUSUF KAHAR
SAKRA, SURABAYA



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan dengan dua tahap. Tahap pertama pengambilan sampel dan tahap kedua pengujian sampel. Pengambilan sampel dilakukan di lapangan. Pemeriksaan sampel dilaksanakan di Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan *Stem Cell Research and Development Center (SCR&DC)* Universitas Airlangga, Surabaya.

4.2 Metode Penelitian

4.2.1 Pengambilan Sampel Penelitian

Sampel diambil dari swab kloaka unggas air yang disertai dengan kotoran. Sampel disimpan di dalam larutan isotonik *Phosphate buffered saline (PBS)*, pH 7.0 – 7.4 yang mengandung antibiotik dan antifungal. Antibiotik dipakai adalah penisilin (10000 unit/ml); streptomycin (10mg/ml). Antifungal yang digunakan adalah fungison (10mg/ml). Suspensi diproses sesegera mungkin setelah inkubasi selama 1-2 jam pada suhu kamar, atau dapat disimpan pada suhu 4°C selama maksimal 4 hari. (OIE, 2012).

4.2.2 Isolasi Virus

Isolasi virus menggunakan telur ayam berembrio (TAB) *specific antibody negative (SAN)* yang berumur 8-10 hari. Cairan yang telah disentrifus pada kecepatan 1500 rpm selama 15 menit, diinokulasikan pada cairan alantois TAB masing-masing sebanyak 0,2 ml dan diinkubasi pada suhu 35°C – 37°C selama 5 hari. Monitoring keadaan embrio pada TAB dilakukan setiap hari dengan melakukan *candling* pada masing-masing TAB. TAB yang mengandung embrio mati disimpan dalam lemari pendingin 4°C sampai hari ke-5 inkubasi untuk selanjutnya cairan alantois dipanen, sedangkan TAB yang embrionya masih hidup sampai hari ke-5 inkubasi, TAB disimpan semalaman pada lemari pendingin

(Ernawati dkk., 2013). Cairan alantois dipanen dari TAB kemudian dilakukan identifikasi virus.

4.2.3 Identifikasi Virus

4.2.3.1 Uji Hemaglutinasi (HA)

Identifikasi virus dilakukan dengan uji HA. Uji HA digunakan untuk mengetahui titer antigen dalam cairan alantois yang dipanen dari TAB yang telah diinokulasi.

Cara kerja uji HA adalah dengan mengisi sumuran *microplate* dengan 25 μ L PZ mulai dari sumuran 1 – 12 pada baris A – B (2 kali ulangan) menggunakan *multichannel pipet* 25 μ L. Dilanjutkan dengan mengisi sumuran 1 baris A dan B dengan antigen dari cairan alantois yang dipanen sebanyak 25 μ L dengan *multipipet* 25 μ L. Antigen dan PZ selanjutnya dicampurkan dengan *multichannel pipet* 25 μ L pada sumuran 1, kemudian dipindahkan ke sumuran 2 demikian seterusnya sampai sumuran ke 11, sedangkan sumuran 12 digunakan sebagai kontrol eritrosit (tanpa antigen). Semua sumuran diisi dengan 50 μ L eritrosit ayam 0,5%. *Microplate* kemudian digoyangkan dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit atau sampai eritrosit pada sumuran kontrol mengendap sempurna, kemudian dibaca titernya. Reaksi positif ditandai dengan adanya butiran – butiran halus pada campuran tersebut. Kebalikan dari pengenceran tertinggi yang masih dapat menghemaglutinasi sel darah merah merupakan titer virus *Newcastle disease* (ND) (Pembacaan titer sebaiknya dibandingkan dengan kontrol eritrosit) (Ernawati dkk, 2013).

Interpretasi hasil uji HA sebagai berikut : hemaglutinasi sempurna (100%) adalah hemaglutinasi terlihat jelas berupa lapisan eritrosit secara merata pada sumuran dan penjernihan dari cairan bagian atas tanpa terjadinya pengendapan eritrosit berbentuk titik di tengah sumuran. Titer antigen adalah jumlah terkecil dari pengenceran tertinggi yang masih mampu menunjukkan reaksi hemaglutinasi (Ernawati dkk, 2013).

4.2.3.2 Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI)

Uji HI bertujuan untuk mengkonfirmasi virus *Newcastle disease* (ND) menggunakan *microplate* dengan 96 sumuran. Proses tersebut dilakukan dengan 2 kali ulangan. Sebanyak 25 μ L PZ dimasukkan ke dalam sumuran ke-1 sampai ke-12. Sumuran pertama diisi dengan anti serum *Newcastle disease* (ND) 25 μ L kemudian diencerkan secara berseri. Selanjutnya masing-masing sumuran ditambahkan dengan 25 μ L suspensi antigen *Newcastle disease* (ND) sampel 4 HAU mulai dari sumuran 1 sampai 11. Sumuran nomer 12 hanya diisi dengan PZ sebanyak 25 μ L. Tahapan berikutnya adalah digoyang selama 30 detik, selanjutnya *microplate* ditempatkan pada suhu kamar selama 30 menit kemudian ditambahkan eritrosit ayam 0,5% ke dalam sumuran ke-1 sampai ke-12 sebanyak 50 μ L lalu digoyang kembali selama 30 detik. *Microplate* ditempatkan pada suhu kamar selama 30 menit. Hasil positif ditandai dengan terjadinya hambatan hemaglutinasi berupa pengendapan sel darah merah di dasar sumuran *microplate* (Ernawati dkk, 2013).

4.2.4. Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

4.2.4.1 Ekstraksi RNA

Sampel yang menunjukkan hasil positif pada uji HA yang telah dikonfirmasi dengan uji HI selanjutnya dilakukan ekstraksi RNA. Ekstraksi RNA dilakukan dengan cara mengambil 600 μ L cairan alantois lalu diletakkan ke dalam *microtube* 1,5 ml dan ditambahkan trizol sebanyak 600 μ L, kemudian dikocok kuat dengan tangan untuk homogenisasi, lalu ditambahkan 200 μ L kloroform, dikocok lagi lalu diinkubasikan pada suhu ruang selama 10 menit. *Microtube* disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pada lapisan *aquafase* diambil dan dipindahkan ke dalam *microtube* baru, lalu ditambahkan isopropanol 400 μ L, dikocok dengan vortex dan selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah inkubasi disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C kemudian supernatan dibuang dengan hati-hati agar pelet tidak sampai ikut terbang, pencucian dilakukan menggunakan etanol 75% masing-masing sebanyak 1000

μL . *Microtube* dikocok dengan vortex kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 9.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C . Supernatan dibuang dengan hati-hati agar pelet tidak ikut terbang, lalu dikering-anginkan dalam *laminar flow*. Penambahan *nuclease free water* sebanyak 30 μL yang sudah diinkubasi pada suhu 55° - 60°C dilakukan ketika tube sudah kering namun pelet tidak sampai kering. Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 55° - 60°C dan disimpan dalam lemari pendingin suhu -80°C (Qiagen, 2011).

4.2.4.2 Amplifikasi

Setelah dilakukan ekstraksi RNA tahap berikutnya adalah amplifikasi. Primer yang digunakan untuk amplifikasi sesuai Tabel 4.1

Tabel 4.1 Daftar Primer *Forward* dan *Reverse* pada Deteksi Virus *Newcastle disease* (ND) Berdasarkan Gen *Fusion* (F) (Rantam, 2008).

Primer	Sekuen 5'-3'	Produk	Posisi
Forward	GAC CGC TGA CCA CGA GGT TA	699 bp	4306-4326
Reverse	AGT CGG AGG ATG TTG GCA GC		4981-5005

Proses amplifikasi dimulai dengan membuat *master mix* pada *microcentrifuge tube* 0.5 ml steril dengan komponen 12.5 μL 2x *RT Mix*, 1 μL *primer forward*, 1 μL *primer reverse*, 1 μL *superscript III*, 7.5 μL *NFW* dan 2 μL RNA sehingga total didapatkan 25 μL . *Tube* yang sudah berisi campuran cDNA dan *master mix* diinkubasi dalam *thermal cycler* dengan setting *lid on* 95°C , *predenaturasi* 94°C , selama 10 menit; *denaturasi* 94°C , selama 1 menit; *annealing* 57°C , selama 1 menit; *extention* 72°C , selama 10 menit; dan *keep* pada suhu 4°C .

4.2.4.3. Visualisasi Hasil Amplifikasi

Produk hasil amplifikasi selanjutnya divisualisasikan dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel agarose 1,5% yang mengandung ethium bromide dengan menggunakan buffer TBE. Marker yang digunakan 100bp DNA *leader*. Tahap elektroforesis dilakukan pada 100 volt selama kurang lebih 20-30 menit. Selanjutnya untuk visualisasi dengan UV-transluminator pada panjang gelombang 302 nm (Nawan, 2012).

4.2.5 Sekuensing

4.2.5.1 Purifikasi Hasil PCR

Produk PCR yang dihasilkan harus dipurifikasi terlebih dahulu untuk persiapan sekuensing. Fragmen DNA hasil PCR dipurifikasi dengan menggunakan *Low melting Agarose* yang mengandung ethidium bromide dilihat pada *UV short wave*. *Band* yang diinginkan diambil dengan pemotongan menggunakan cutter. Setelah dipotong, DNA tersebut diproses sesuai petunjuk pada *QIAquick Gel extraction Kit* (Qiagen). DNA yang sudah murni selanjutnya digunakan untuk bahan sekuensing DNA (Qiagen, 2011).

4.2.5.2 Sekuensing cDNA

Sekuensing nukleotida ini dilakukan tiga tahap, tahap pertama adalah melakukan tahap labelling yaitu DNA yang sudah murni dilabel dengan *Big Dye Terminator* kit versi 3.1 Penambahan reagen ini bertujuan untuk memberikan fluoresensi yang digunakan untuk membedakan urutan nukleotida. Pada tahap ini mesin *thermocycler* diprogram dalam keadaan suhu *initial denaturation* 96 °C selama 1 menit, kemudian sebanyak 5 siklus pada suhu 96 °C selama 10 detik, 50 °C selama 5 detik dan 60 °C selama 4 menit. Tahap kedua yaitu melakukan purifikasi cycle sequencing menggunakan *Big Dye X Terminator* yang bertujuan untuk memurnikan nukleotida dan menghilangkan *Big Dye Label* yang tersisa. Setelah itu, tahap terakhir yaitu melakukan sekuensing dengan menggunakan mesin sekuenser ABI 310 xL GENETIC ANALYSER (Applied Biosystems, Inc).

4.2.6. Analisis Data Molekuler dan Prediksi Epitop

Nukleotida hasil sekuensing yang diperoleh dilakukan *alignment* menggunakan *software* ClustalW yang ada dalam *software* BioEdit ver. 8.0, selanjutnya ditranslasi ke asam amino menggunakan *software* BioEdit ver. 8.0. Prediksi epitop protein F dilakukan melalui program *online B Cell Epitope Prediction Tools* yang dapat diakses dengan bebas menggunakan internet browser.





BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Hasil Yang Dicapai

5.1.1 Isolasi Virus *Newcastle disease* (ND)

Sampel yang diperoleh berupa swab kloaka unggas air diambil di beberapa tempat seperti Mulyorejo Surabaya, Kenjeran Surabaya, Pacar Kembang Surabaya dan Rowokangkung Lumajang dapat dilihat pada Tabel 5.1. Semua sampel kemudian diinokulasi pada cairan alantois TAB SAN umur 8-10 hari selama 5 hari dan diamati setiap 24 jam, kemudian dilakukan pengamatan terhadap waktu kematian TAB.

Tabel 5.1 Sampel Swab Kloaka Unggas Air

No	Lokasi	Unggas Air			Total
		Angsa	Mentok	Itik	
1	Mulyorejo, Surabaya		1		1
		4			4
				5	5
2	Rowokangkung, Lumajang		22		22
		4			4
3	Pacar Kembang, Surabaya	10			10
				9	9
4	Kenjeran, Surabaya		10		10
		6			6
	Total	24	33	14	71

Sebanyak 71 sampel swab kloaka dari unggas air diinokulasikan pada TAB SAN. Swab kloaka unggas air dilakukan karena virus ND diketahui dapat ditularkan melalui alat pencernaan dan pernafasan (OIE, 2012).

5.1.2 Identifikasi Virus *Newcastle disease* (ND)

Pengamatan (*candling*) dilakukan selama 5 hari dan dilanjutkan dengan uji HA. Hasil uji HA yang positif dilakukan pemanenan virus dari cairan alantois. Uji HA prinsipnya adalah mendeteksi keberadaan hemaglutinin pada amplop virus yang mampu mengaglutinasi eritrosit ayam (Alexander *et al.*, 2004). Total 71 sampel yang diuji, ada 6 sampel yang menunjukkan hasil positif HA, yakni

sampel AG1, AG2, AG3, AG4 dan Mentok Kenjeran 4 serta kontrol positif (LaSota).

Sampel dengan uji HA positif dilanjutkan dengan uji HI. Uji HI didasarkan pada prinsip bahwa hemaglutin pada amplop virus dapat mengaglutinasi eritrosit ayam dan hal ini dapat dihambat oleh antibodi spesifik. Hambatan aglutinasi terjadi secara sempurna terhadap antigen 4 HA unit (FAO, 2004). Identifikasi HI menggunakan antiserum ND. Hasil uji HA dan HI dari cairan alantois yang dipanen terlihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil Uji HA dan HI dari Cairan Alantois yang Diinokulasi Virus ND

Sampel	Titer Uji HA	Retitrasi 4 HAU	Titer As ND menggunakan Ag kontrol	Titer Uji HI
AG1	2 ⁸	2 ²	2 ⁶	2 ⁶
AG2	2 ⁹	2 ²		2 ⁶
AG3	2 ⁷	2 ²		2 ⁶
AG4	2 ⁸	2 ²		2 ⁶
MK4	2 ⁷	2 ²		-
Kontrol positif (Lasota)	2 ⁸	2 ²		2 ⁶

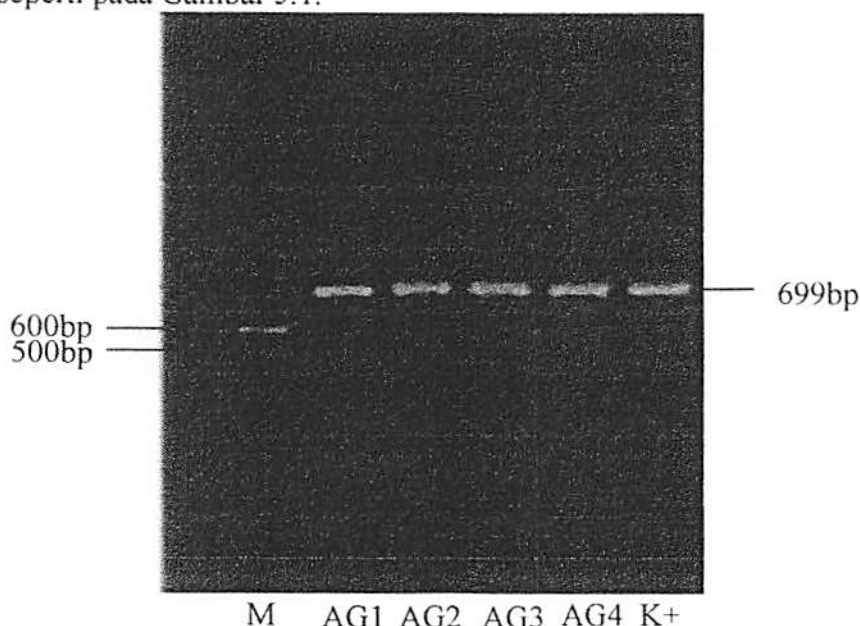
Pada identifikasi virus, titer HI dianggap positif apabila titer HI dari serum menggunakan antigen sampel yang telah diinokulasikan pada cairan alantois kurang lebih akan sama dengan titer HI dari serum dengan menggunakan antigen kontrol. Sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat yang diuji tersebut adalah virus ND (Capua and Terregino, 2009).

Pertumbuhan virus ND dalam cairan alantois diketahui dengan uji HA yakni untuk melihat kemampuan hemaglutinasi eritrosit pada amplop virus yang mampu mengaglutinasi eritrosit ayam (Alexander *et al.*, 2004). Terdapat lima sampel (AG1, AG2, AG3, AG4, Mentok Kenjeran 4) dari 71 sampel lapangan yang diuji menunjukkan hasil uji HA yang positif. Sampel dengan uji HA positif dikonfirmasi dengan uji HI (hemagglutinin inhibisi) menggunakan antiserum ND yang didapat dari PUSVETMA. Uji HI didasarkan pada prinsip bahwa hemagglutinin pada amplop virus dapat mengaglutinasi eritrosit ayam, dan hal ini dapat dihambat oleh antibodi spesifik. Hambatan aglutinasi terjadi secara sempurna terhadap antigen 4 HA Unit.

Hemagglutinin virus ND dapat berikatan secara spesifik dengan asam sialat pada reseptor permukaan sel yang peka dan memfasilitasi proses infeksi. Menurut Aris dkk. (2013), reseptor yang peka ini juga dimiliki oleh sel darah merah (eritrosit) ayam. Hemagglutinasinya ditunjukkan pada eritrosit ayam yang dicampur dengan virus ND dalam proporsi yang seimbang. Fenomena hemagglutinasinya tersebut dapat dihambat dengan antibodi spesifik terhadap *hemagglutinin* virus ND. Kemampuan ini digunakan sebagai dasar untuk indentifikasi virus ND yang biasa disebut uji HI (hambatan hemagglutinasinya).

5.1.3 *Reverse Transkriptase - Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Uji RT-PCR menggunakan primer pada tabel 4.1 dari *whole genom* virus ND dengan produk PCR 699 bp. Hasil PCR tampak adanya pita DNA pada 5 sampel yang diuji, pita DNA divisualisasikan melalui proses elektroforesis sebagaimana terlihat pada Gambar 5.1. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa sampel-sampel yang diuji dengan primer *forward* dan *reverse* ditemukan keberadaan fragmen DNA yang terlihat dengan adanya pita DNA dengan panjang 699 bp seperti pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Hasil elektroforesis produk PCR dengan 1.5% *Agarose*. Angka di sebelah kiri gambar menunjukkan nilai *marker DNA ladder* 100 bp. M adalah *marker DNA ladder* 100 bp, K+ adalah kontrol positif, AG1, AG2, AG3, AG4 dan kontrol positif (LaSota) menunjukkan panjang pita 699 bp.

Sampel yang dilanjutkan hingga ke tahap RT-PCR adalah sampel AG1, AG2, AG3, AG4 dan kontrol positif (LaSota). Hasil elektroforesis PCR virus ND dengan menggunakan primer spesifik menunjukkan hasil yang baik dengan dibuktikan terdeteksinya fragmen berupa DNA pada sampel dengan panjang 699 bp yang dapat dilihat pada gambar 5.1. Region gen sepanjang 699 basa nukleotida ini dilakukan analisis asam amino, analisis homologi nukleotida, prediksi epitop sel B dan analisis filogenetik.

5.1.4 Sekuensing

Produk PCR yang didapatkan dari sampel AG1, AG2, AG3, AG4 dan kontrol positif (LaSota) dipurifikasi dengan menggunakan *QIAquick gel extraction kit* untuk selanjutnya dilakukan sekuensing.

5.1.4.1 Hasil Sekuen Nukleotida Virus Newcastle disease (ND)

Hasil PCR selanjutnya disekuensing dengan menggunakan ABI 310xL *Genetic Analyzer* sehingga dapat diketahui susunan nukleotida dari virus ND yang diuji. Nukleotida hasil sekuensing selanjutnya dianalisis menggunakan *software* BioEdit ver 8.0 untuk melakukan *multiple alignment* menggunakan *software* ClustalW yang ada dalam *software* BioEdit Ver 8.0 selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 5.2

	10	20	30	40	50	60
REFSEQ	GACCGCTGAC	CACGAGGTTA	CCTCTACTAA	GCTGGAGGAG	GGGCACACCT	TTGCCAATA
LaSota K+C.....C.....A.....C.....C.....C.....
ND/AG1/2018C.....C.....A.....C.....C.....C.....
ND/AG2/2018C.....C.....A.....C.....C.....C.....
ND/AG3/2018C.....C.....T.....C.....C.....C.....
ND/AG4/2018C.....C.....C.....C.....C.....C.....
Kumarov/KT445901C.....C.....C.....C.....C.....C.....
Beaudatte C/3N872154.1C.....C.....C.....C.....C.....C.....
B1/AF309416.1	.C..T.CAGG	TT..G.....C.....C.....C.....C.....
V4/AY225110.1	.C..T.CAGG	TT..G.....C.....C.....C.....C.....
LaSota/JF956510.1C.....C.....C.....C.....C.....C.....
LaSota/K0563940.1C.....C.....C.....C.....C.....C.....
LaSota/49845400.1C.....C.....C.....C.....C.....C.....
V4/JN574203.1C.....C.....C.....C.....C.....C.....
NDV/Sukrejo/2010C.....C.....C.....C.....C.....C.....
NDV/Cocokto/1990C.....C.....C.....C.....C.....C.....
NDV/Banjarmasin/2010C.....C.....C.....C.....C.....C.....
NDV/MsPasar/2009C.....C.....C.....C.....C.....C.....
NDV/Gilang/2010C.....C.....C.....C.....C.....C.....
NDV/Kudus/2010C.....C.....C.....C.....C.....C.....
NDV/Sragen/2010C.....C.....C.....C.....C.....C.....
NDV/Bali/2007C.....C.....C.....C.....C.....C.....
	70	80	90	100	110	120
REFSEQ	CAATCCTTTT	ANGAAATAAG	CTGCCTTCTC	TGAGATTGCG	CTCCGCCAC	TCACCCAGAG
LaSota K+AG.....T.....T.....A.....T.....T.....
ND/AG1/2018CAAT.....TGAGA.....A.....TG.....T.....T.....
ND/AG2/2018AA.....AT.....G.....A.....GA.....T.....
ND/AG3/2018AA.....G.....A.....TA.....T.....T.....
ND/AG4/2018AA.....G.....A.....A.....T.....T.....
Kumarov/KT445901T.....T.....T.....T.....T.....T.....
Beaudatte C/3N872154.1T.....T.....T.....T.....T.....T.....
B1/AF309416.1T.....T.....T.....T.....T.....T.....
V4/AY225110.1T.....T.....T.....T.....T.....T.....

LaSota/JF950510.1	AG.....	T
LaSota/KJ563940.1	AG.....	T
LaSota/AY845400.2	AG.....	T
V4/JX524203.1	AG.....	T
NDV/Sukorejo/2010	A.....	C.....	A.....	A.....	A.....
NDV/Cocokto/1990	A.....	C.....	A.....	A.....	A.....
NDV/Banjarmasin/2010	A.....	C.....	A.....	A.....	A.....
NDV/Makasar/2009	A.....	C.....	A.....	A.....	A.....
NDV/Glanjar/2010	A.....	C.....	A.....	A.....	A.....
NDV/Kudus/2010	A.....	C.....	A.....	A.....	A.....
NDV/Sragen/2010	A.....	C.....	A.....	A.....	A.....
NDV/Bali/2007	A.....	C.....	A.....	A.....	A.....
	130	140	150	160	170	180
REFSEQ	CATCAGACA	CCAAAACCTA	ATCTGCTTG	ATTATTACA	GTTAGTTAC	CTGCTATCA
LaSota F+	A.....
NDV/AG1/2018	A.....
NDV/AG2/2018	A.....
NDV/AG3/2018	A.....
NDV/AG4/2018	A.....
Kumarov/KT445901	A.....
Beaudatte C/JN872154.1	A.....
B1/AF309418.1	A.....	C.....
V4/AY225110.1	A.....	C.....
LaSota/JF950510.1	A.....
LaSota/KJ563940.1	A.....
LaSota/AY845400.2	A.....
V4/JX524203.1	A.....
NDV/Sukorejo/2010	A.....	A.....	C.....	G.....
NDV/Cocokto/1990	A.....	A.....	C.....	G.....
NDV/Banjarmasin/2010	A.....	A.....	C.....	G.....
NDV/Makasar/2009	A.....	A.....	C.....	G.....
NDV/Glanjar/2010	A.....	A.....	C.....	G.....
NDV/Kudus/2010	A.....	A.....	C.....	G.....
NDV/Sragen/2010	A.....	A.....	C.....	G.....
NDV/Bali/2007	A.....	A.....	C.....	G.....
	190	200	210	220	230	240
REFSEQ	AATTAGAAA	AACACGGTA	GAAGATCTG	GATCCCGTT	GCCGCTTCT	AGGTCAAGA
LaSota F+
NDV/AG1/2018	CC.....	C.....
NDV/AG2/2018	CC.....	C.....
NDV/AG3/2018	CC.....	C.....
NDV/AG4/2018	CC.....	C.....
Kumarov/KT445901	CC.....	C.....
Beaudatte C/JN872154.1	CC.....	C.....
B1/AF309418.1	CC.....	C.....
V4/AY225110.1	CC.....	C.....
LaSota/JF950510.1	CC.....	C.....
LaSota/KJ563940.1	CC.....	C.....
LaSota/AY845400.2	CC.....	C.....
V4/JX524203.1	CC.....	C.....
NDV/Sukorejo/2010	CC.....	C.....
NDV/Cocokto/1990	CC.....	C.....
NDV/Banjarmasin/2010	CC.....	C.....
NDV/Makasar/2009	CC.....	C.....
NDV/Glanjar/2010	CC.....	C.....
NDV/Kudus/2010	CC.....	C.....
NDV/Sragen/2010	CC.....	C.....
NDV/Bali/2007	CC.....	C.....
	250	260	270	280	290	300
REFSEQ	TGGCCCCAG	ACCTTCACC	AGAACCCTA	CACCTATGAT	GCTGACTGC	CGGTCCGC
LaSota F+
NDV/AG1/2018	A.....	T.....
NDV/AG2/2018	A.....	T.....
NDV/AG3/2018	A.....	T.....
NDV/AG4/2018	A.....	T.....
Kumarov/KT445901	A.....	T.....
Beaudatte C/JN872154.1	A.....	T.....
B1/AF309418.1	A.....	T.....
V4/AY225110.1	A.....	T.....
LaSota/JF950510.1	A.....	T.....
LaSota/KJ563940.1	A.....	T.....
LaSota/AY845400.2	A.....	T.....
V4/JX524203.1	A.....	T.....
NDV/Sukorejo/2010	A.....	T.....
NDV/Cocokto/1990	A.....	T.....
NDV/Banjarmasin/2010	A.....	T.....
NDV/Makasar/2009	A.....	T.....
NDV/Glanjar/2010	A.....	T.....
NDV/Kudus/2010	A.....	T.....
NDV/Sragen/2010	A.....	T.....
NDV/Bali/2007	A.....	T.....
	310	320	330	340	350	360
REFSEQ	TGGTACTGAG	TTCATCTGT	CCGGCAACT	CCATTGATG	CAGGCTTCT	CGGGCTGCA
LaSota F+
NDV/AG1/2018
NDV/AG2/2018
NDV/AG3/2018
NDV/AG4/2018

Komarov/KT445901
Beaudatte C/JN872154.1
B1/AF309418.1T.....T.....A.....
V4/AY225110.1A.....
LaSota/JF950510.1A.....
LaSota/KJ563940.1A.....
LaSota/AY845400.2A.....
V4/JX524203.1C.....G.....A.C.G.G.....C.....A.....
NDV/Sukorejo/2010G.....
NDV/Cocokto/1990
NDV/Banjarmasin/2010
NDV/Makassar/2009G.....
NDV/Glanjar/2010
NDV/Kudus/2010
NDV/Sragen/2010
NDV/Bali/2007
370.....380.....390.....400.....410.....
REFSEQ	GAATTTGGT	AACAGGAGAC	AAGGCATCA	ACATTACAC	CTCATCCCA
LaSota K+ACAGGATCAA
ND/AG1/2018C.....A.....
ND/AG2/2018C.....A.....
ND/AG3/2018C.....A.....
ND/AG4/2018C.....A.....
Komarov/KT445901
Beaudatte C/JN872154.1A.T.....G.....
B1/AF309418.1A.....
V4/AY225110.1C.....
LaSota/JF950510.1C.....
LaSota/KJ563940.1C.....
LaSota/AY845400.2C.....
V4/JX524203.1G.....A.....
NDV/Sukorejo/2010A.....
NDV/Cocokto/1990T.....
NDV/Banjarmasin/2010A.....
NDV/Makassar/2009T.....
NDV/Glanjar/2010T.C.....
NDV/Kudus/2010A.....
NDV/Sragen/2010
NDV/Bali/2007
420.....430.....440.....450.....460.....
REFSEQ	TCATAGTAA	GCTCCTCCA	AACCTGCCA	AGGATAGGA	GGCATGTGG
LaSota K+G.....T.....AAAGCCCCCT
ND/AG1/2018G.....T.....
ND/AG2/2018G.....T.....
ND/AG3/2018G.....T.....
ND/AG4/2018G.....T.....
Komarov/KT445901
Beaudatte C/JN872154.1
B1/AF309418.1G.....T.....
V4/AY225110.1G.....T.....
LaSota/JF950510.1G.....T.....
LaSota/KJ563940.1G.....T.....
LaSota/AY845400.2G.....T.....
V4/JX524203.1A.C.....T.A.....T.A.....A.....G.....
NDV/Sukorejo/2010C.....G.....A.....A.....
NDV/Cocokto/1990C.....T.G.....A.....A.....
NDV/Banjarmasin/2010T.G.....A.....
NDV/Makassar/2009G.....A.....
NDV/Glanjar/2010C.....A.....
NDV/Kudus/2010C.....A.....
NDV/Sragen/2010C.....
NDV/Bali/2007
470.....480.....490.....500.....510.....
REFSEQ	TGGATGCATA	CAACAGGACA	TTGACCACTT	TGCTCACCC	CCTTGTGAC
LaSota F+TCTATCCGZA
ND/AG1/2018
ND/AG2/2018
ND/AG3/2018
ND/AG4/2018
Komarov/KT445901
Beaudatte C/JN872154.1
B1/AF309418.1
V4/AY225110.1
LaSota/JF950510.1
LaSota/KJ563940.1
LaSota/AY845400.2
V4/JX524203.1G.....T.....
NDV/Sukorejo/2010A.....T.T.A.....C.....T.C.....C.T.....
NDV/Cocokto/1990A.G.....T.....C.....T.C.....C.T.....
NDV/Banjarmasin/2010A.G.....C.....C.....T.....
NDV/Makassar/2009A.A.....T.T.....C.....C.T.....
NDV/Glanjar/2010A.....A.....C.....
NDV/Kudus/2010A.....A.....C.....
NDV/Sragen/2010T.C.....T.C.....
NDV/Bali/2007G.....C.....C.....
520.....530.....540.....550.....560.....
REFSEQ	GGATACAGA	GTCTGTAACT	ACATCTGGAG	GGAGGAGACA	GAAACCCCTT
LaSota R+G.....G.....GAAACCCCTT

ND/AG1/2018G.....G.....GGG...C...T.....
ND/AG2/2018G.....G.....GGG...C.....
ND/AG3/2018G.....G.....GGG...C.....
ND/AG4/2018G.....G.....GGG...C.....
Komarov/KT445901G.....G.....GGG...C.....
Beaudatte C/JN872154.1G.....G.....GGG...C.....
B1/AF309418.1G.....G.....GGG...C.....
V4/AY225110.1G.....G.....GGG...C.....
LaSota/JF950510.1G.....G.....GGG...C...T...
LaSota/KJ563940.1G.....G.....GGG...C.....
LaSota/AY845400.2G.....G.....GGG...C.....
V4/JX524203.1G...C...G...C...AG...A...GG...TC...
NDV/Sukorejo/2010	A...C...G...C...G...G...T...T...
NDV/Cocackto/1990	A...T...G...A...G...A...G...
NDV/Banjarmasin/2010	...C...G...C...G...C...A...G...
NDV/Makasar/2009	...C...C...T...A...G...T...T...
NDV/Gianjar/2010	...G...G...C...C...A...T...G...
NDV/Kudus/2010	...G...C...G...C...A...T...G...
NDV/Sragen/2010	A...G...G...C...AA...T...G...
NDV/Bali/2007	A...G...G...C...AA...T...G...
	610 620 630 640 650 660
REFSEQ	TTATTGGCGG TGTGGCTCTT GGGGTTGCAG CTGCTGCACA AATAACAGCG GCCGCAGCTC
LaSota K+C.....A.....
ND/AG1/2018T.....CC.....CTGG...AGA...GG...C...T
ND/AG2/2018CC.....CT...G...A...GG.....
ND/AG3/2018AGCCTG...A...A...A...G.....
ND/AG4/2018	...ATT...TA...ATAG...AT...C...CA...A...AA...GG.....
Komarov/KT445901G.....C.....
Beaudatte C/JN872154.1G.....C.....
B1/AF309418.1C.....C.....
V4/AY225110.1C.....C.....
LaSota/JF950510.1C.....C.....
LaSota/KJ563940.1C.....C.....
LaSota/AY845400.2C.....C.....
V4/JX524203.1	...C...T...A...C...C...G...A...T...G...
NDV/Sukorejo/2010	...C...C...A...A...G...A...G...
NDV/Cocackto/1990	...A...G...A...G...A...G...
NDV/Banjarmasin/2010	...A...C...G...G...T...T...
NDV/Makasar/2009	...C...A...G...T...T...
NDV/Gianjar/2010	...A...C...G...A...T...T...
NDV/Kudus/2010	...A...C...G...T...T...
NDV/Sragen/2010	...A...C...G...T...T...
NDV/Bali/2007	...C...A...T...T...
	670 680 690 700
REFSEQ	TGATACAAGC CAAACAAAAT GCTGCCAACA TCCTCCGACT
LaSota K+
ND/AG1/2018	CT...T...G.....
ND/AG2/2018	.A...T...G.....
ND/AG3/2018	.A...C...G.....
ND/AG4/2018	AA...T...TGCG.....
Komarov/KT445901
Beaudatte C/JN872154.1	...T...C...AA.....
B1/AF309418.1
V4/AY225110.1
LaSota/JF950510.1
LaSota/KJ563940.1
LaSota/AY845400.2
V4/JX524203.1	...T...A...G...
NDV/Sukorejo/2010	.A...C...G...
NDV/Cocackto/1990	.A...C...G...
NDV/Banjarmasin/2010	.A...C...G...
NDV/Makasar/2009	.A...C...G...
NDV/Gianjar/2010	.A...C...G...
NDV/Kudus/2010	.A...C...G...
NDV/Sragen/2010	.A...C...G...
NDV/Bali/2007	.A...C...G...

Gambar 5.2 Urutan nukleotida gen pengkode protein F virus *Newcastle disease* (ND)

5.1.4.2 Hasil Asam Amino Virus *Newcastle disease* (ND)

Nukleotida hasil sekuensing dianalisis menjadi asam amino menggunakan *software* BioEdit Ver. 8.0 dengan cara melakukan translasi tiap sampel virus ND yang disajikan pada Gambar 5.3 Satu asam amino dikode oleh tiga nukleotida, sehingga panjang nukleotida 699 nukleotida ketika ditranslasi menjadi asam

amino memiliki 233 asam amino. Urutan asam amino hasil translasi tiap sampel dilanjutkan dengan *alignment* dengan menggunakan *software ClustalW* yang terintegrasi dalam *software BioEdit* dan hasilnya ditampilkan pada Gambar 5.3

	10	20	30	40	50	60
REFSEQ	DRRPRGYLYY	AGBGAHLCOI	QSFLEISCVL	LDCAPPTHPE	HRDTKNSVL	IIYSVPTCLS
LaSota K+P.....S.....D.....D.....D.....D.....
LaSota/JF950510.1P.....S.....D.....D.....D.....D.....
ND/AG1/2018H.....N.....QF.....R.M.....D.....D.....
ND/AG2/2018H.....H.....I.GR.....D.....D.....D.....
ND/AG3/2018H.....P.....H.....GI.....D.....D.....
ND/AG4/2018P.....N.....G.....D.....D.....D.....
Komarov KT445901P.....D.....D.....D.....D.....D.....
B1 AF309418.1	ALQV.....P.....D.....D.....P.....P.....
Beaudatte C JN872154.1	ALQV.....P.....D.....D.....P.....P.....
V4 AY225110.1P.....S.....D.....D.....D.....D.....
LaSota KJ563940.1P.....S.....D.....D.....D.....D.....
V4 JX524203.1P.....S.....D.....D.....D.....D.....
LaSota AY845400.2H.....I.....D.....K.....K.....A.....
NDV/Sukorejo/2010H.....I.....D.....K.....N.K.....A.....
NDV/Cocackto/1990H.....I.....D.....K.....K.....L.....
NDV/Banjarmasin/2010K.....K.....K.....K.....K.....K.....
NDV/Makasar/2009K.....K.....K.....K.....K.....K.....
NDV/Gianjar/2010K.....K.....K.....K.....K.....K.....
NDV/Kudus/2010K.....K.....K.....K.....K.....K.....
NDV/Sragen/2010H.....I.....D.....K.....K.....A.....
NDV/Bali/2007H.....I.....D.....K.....K.....A.....
	70	80	90	100	110	120
REFSEQ	MGRPSTQIP	APMLTIRVA	LVLSCICPAP	SIDGRPLAA	GIVVTGDKAV	NIYTSSQTS
LaSota K+P.....T.....V.....D.....D.....D.....
LaSota/JF950510.1P.....T.....V.....D.....D.....D.....
ND/AG1/2018P.....T.....V.....D.....D.....D.....
ND/AG2/2018P.....T.....V.....D.....D.....D.....
ND/AG3/2018P.....T.....V.....D.....D.....D.....
ND/AG4/2018P.....T.....V.....D.....D.....D.....
KOMAROV KT445901P.....T.....V.....D.....D.....D.....
B1 AF309418.1P.....F.....V.....X.....F.....F.....
Beaudatte C JN872154.1P.....V.....V.....D.....F.....C.....
V4 AY225110.1P.....S.....D.....D.....D.....D.....
LaSota KJ563940.1S.....RI.....V.L.....V.M.....A.....V.TS.....
V4 JX524203.1S.....RI.....V.L.....V.M.....A.....V.TS.....
LaSota AY845400.2V.....V.....V.....V.....V.....R.....
NDV/Sukorejo/2010V.....V.....V.....V.....V.....R.....
NDV/Cocackto/1990V.....V.....V.....V.....V.....R.....
NDV/Banjarmasin/2010V.....V.....V.....V.....V.....R.....
NDV/Makasar/2009V.....V.....V.....V.....V.....R.....
NDV/Gianjar/2010V.....V.....V.....V.....V.....R.....
NDV/Kudus/2010V.....V.....V.....V.....V.....R.....
NDV/Sragen/2010P.....P.....P.....P.....P.....P.....
NDV/Bali/2007P.....P.....P.....P.....P.....P.....
	130	140	150	160	170	180
REFSEQ	IIVKLLP	NLP	KKRCACAKAP	LDANNRLIT	LLTPLGDSIR	RIQESVITSG
LaSota K+I.....V.....K.....L.....L.....G.....
LaSota/JF950510.1I.....V.....K.....L.....L.....G.....
ND/AG1/2018I.....V.....K.....L.....L.....G.....
ND/AG2/2018I.....V.....K.....L.....L.....G.....
ND/AG3/2018I.....V.....K.....L.....L.....G.....
ND/AG4/2018I.....V.....K.....L.....L.....G.....
KOMAROV KT445901I.....V.....K.....L.....L.....G.....
B1 AF309418.1I.....V.....K.....L.....L.....G.....
Beaudatte C JN872154.1S.....S.....S.....S.....S.....S.....
V4 AY225110.1I.....M.....E.....B.....K.....K.....
LaSota KJ563940.1I.....M.....E.....B.....K.....K.....
V4 JX524203.1I.....M.....E.....B.....K.....K.....
LaSota AY845400.2I.....K.....S.....C.....K.....R.....
NDV/Sukorejo/2010I.....K.....S.....C.....K.....R.....
NDV/Cocackto/1990I.....K.....S.....C.....K.....R.....
NDV/Banjarmasin/2010I.....K.....S.....C.....K.....R.....
NDV/Makasar/2009I.....K.....S.....C.....K.....R.....
NDV/Gianjar/2010I.....K.....S.....C.....K.....R.....
NDV/Kudus/2010I.....K.....S.....C.....K.....R.....
NDV/Sragen/2010I.....K.....S.....C.....K.....R.....
NDV/Bali/2007I.....K.....S.....C.....K.....R.....
	190	200	210	220	230	
REFSEQ	GYSLCLHLE	GGDRHALLAP	LLAVWLLGLQ	LLHKCRPOL	KYRPHQCP	SSD
LaSota K+G.....G.....V.....P.....G.....D.....
LaSota/JF950510.1G.....G.....V.....P.....G.....D.....
ND/AG1/2018G.....G.....V.....P.....G.....D.....
ND/AG2/2018G.....G.....V.....P.....G.....D.....
ND/AG3/2018G.....G.....V.....P.....G.....D.....
ND/AG4/2018G.....G.....V.....P.....G.....D.....
Komarov KT445901G.....G.....V.....P.....G.....D.....
B1 AF309418.1G.....G.....V.....P.....G.....D.....

Beaudatte C JN672154.1FN....Q.....
V4 AY225110.1G.....P.....
Lasota KT563940.1G.....P.....
V4 JX524203.1PRP. E.N.DV.....SV...S...P...R...Q...R...I.....Y...G
Lasota AY845400.2G.....P.....
NDV/Sukorejo/2010	RS.OP.PR.....G...V...S.SE...QR.....TR.....
NDV/Coccacto/1990	RF.G...R.....QR.....TR.....
NDV/Banjarnasin/2010	...S...R.PRP.....S...R...R.....T.....
NDV/Makassar/2009	...S...P.....G...V...S...E.....TR.....
NDV/Gianjar/2010	...GR...P.....S...R...Q.....T.....
NDV/Kudus/2010	...G...PRP...E.....V.....S...R.....T.....
NDV/Sragen/2010	R...M.RP...E.....S...R.....T.....
NDV/Bali/2007	R.....L...S...Q.....T.....

Gambar 5.3 Urutan asam amino gen pengkode protein F virus

Newcastle disease (ND).

Huruf-huruf hasil translasi dari nukleotida adalah simbol dari *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*. A adalah Alanine, C adalah Cysteine, D adalah Aspartic Acid, E adalah Glutamin Acid, F adalah Phenilalanine, G adalah Glycine, H adalah Histidine, I adalah Isoleucine, K adalah Lysine, L adalah Leucine, M adalah metionine, N adalah Asparagine, P adalah Proline, Q adalah glutamine, R adalah Arginine, S adalah Serine, T adalah Thronine, V adalah Valine, W adalah Tryptophan, dan Y adalah Tyrosine. LaSota/JF950510.1 merupakan pembanding untuk patotipe lentogenik dan Komarov/KT445901.1 merupakan pembanding untuk patotipe mesogenik.

Sekuen asam amino yang didapatkan dilakukan *multiple alignment* bersama dengan isolat lain yang berasal dari *GenBank*, kemudian dianalisis pada *region cleavage site*.

Virus lentogenik memiliki motif *single basic amino acid* pada *F cleavage site* 112G/E-K/R-G-G/E-R116 dan L (Leucine) pada residu 117 serta dapat dibelah oleh enzim protease seperti tripsin yang dapat ditemukan pada saluran pencernaan dan pernafasan (Choi *et al.*, 2010). Patotipe mesogenik dan velogenik memiliki motif *multiple basic amino acid* (arginine atau lysine) pada *F cleavage site* 112R/K-R-Q/K/R-K/R-R116 dan F (phenylalanine) pada residu 117 (Meulemans *et al.*, 2002).

Berdasarkan susunan *cleavage site* asam amino protein F menunjukkan bahwa sampel ND/AG1/2018, ND/AG2/2018, ND/AG3/2018, ND/AG4/2018, dan isolat positif LaSota memiliki kesamaan susunan *cleavage site* dengan patotipe lentogenik yaitu dengan motif *cleavage site* berupa 112G-R-Q-G-R116 dan L (leucine) pada residu 117.

5.1.4.3 Hasil Homologi Nukleotida

Susunan nukleotida gen pengkode protein F dari sampel ND/AG1/2018, ND/AG2/2018, ND/AG3/2018, ND/AG4/2018, dan kontrol positif (LaSota) dihomologikan dengan susunan nukleotida gen pengkode protein F dari isolat virus vaksin ND yang beredar di Indonesia yang didapatkan dari GenBank.

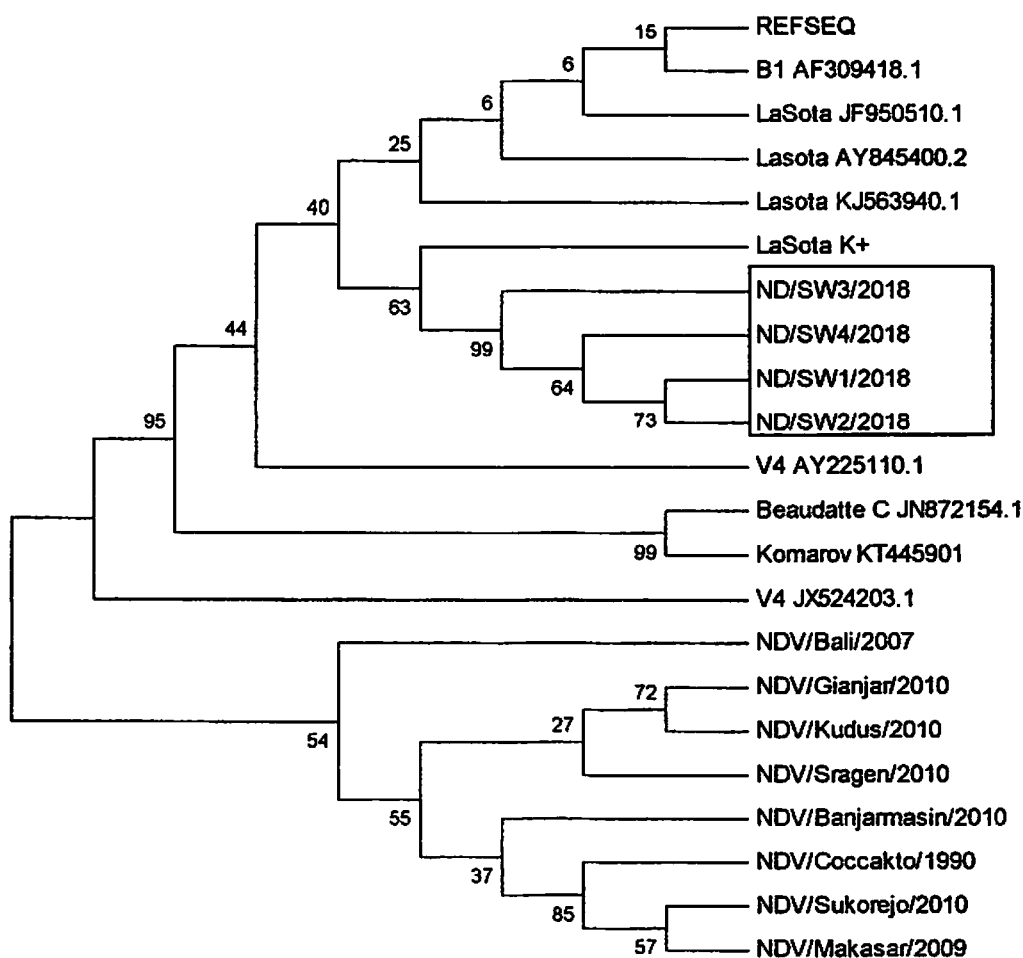
Hasil analisis homologi sekuen gen pengkode protein F isolat ND/AG1/2018 dengan LaSota JF950510.1 sebesar 96%, dengan Komarov KT445901 sebesar 93%, dengan B1 AF309418.1 sebesar 95%, dengan Beaudette C JN872154. sebesar 91%, dengan V4 AY225110.1 sebesar 96%, dengan LaSota KJ563940.1 sebesar 97%, dengan V4 JX524203.1 sebesar 84%, dan dengan LaSota AY845400.2 sebesar 97%. Hasil analisis homologi sekuen gen pengkode protein F isolat ND/SW2/2018 dengan LaSota JF950510.1 sebesar 97%, dengan Komarov KT445901 sebesar 94%, dengan B1 AF309418.1 sebesar 97%, dengan Beaudette C JN872154. sebesar 93%, dengan V4 AY225110.1 sebesar 98%, dengan LaSota KJ563940.1 sebesar 98%, dengan V4 JX524203.1 sebesar 85%, dan dengan LaSota AY845400.2 sebesar 98%. Hasil analisis homologi sekuen gen pengkode protein F isolat ND/SW3/2018 dengan LaSota JF950510.1 sebesar 97%, dengan Komarov KT445901 sebesar 94%, dengan B1 AF309418.1 sebesar 96%, dengan Beaudette C JN872154. sebesar 93%, dengan V4 AY225110.1 sebesar 97%, dengan LaSota KJ563940.1 sebesar 97%, dengan V4 JX524203.1 sebesar 86%, dan dengan LaSota AY845400.2 sebesar 97%. Hasil analisis homologi sekuen gen pengkode protein F isolat ND/SW4/2018 dengan LaSota JF950510.1 sebesar 95%, dengan Komarov KT445901 sebesar 92%, dengan B1 AF309418.1 sebesar 93%, dengan Beaudette C JN872154. sebesar 89%, dengan V4 AY225110.1 sebesar 84%, dengan LaSota KJ563940.1 sebesar 94%, dengan V4 JX524203.1 sebesar 83%, dan dengan LaSota AY845400.2 sebesar 94%.

Isolat ND/AG1/2018, ND/AG2/2018 dan ND/AG3/2018 dalam penelitian ini memiliki homologi tertinggi dengan vaksin LaSota KJ563940.1 dan LaSota AY845400.2 sebesar 97% - 98% sedangkan isolat ND/AG4/2018 memiliki

homologi tertinggi dengan vaksin LaSota KJ563940.1 dan LaSota AY845400.2 sebesar 94%.

5.1.4.4 Hasil Analisis Kekerabatan (Filogenetik)

Hubungan kekerabatan gen pengkode protein F virus ND dari sampel ND/AG1/2018, ND/AG2/2018, ND/AG3/2018, ND/AG4/2018, dan kontrol positif (LaSota) dengan gen pengkode protein F virus vaksin ND yang digunakan di Indonesia dan virus ND lainnya dari GenBank, digambarkan dengan pohon filogenetik menggunakan program MEGA6. Gambar pohon filogenetik dapat dilihat pada Gambar 5.4.



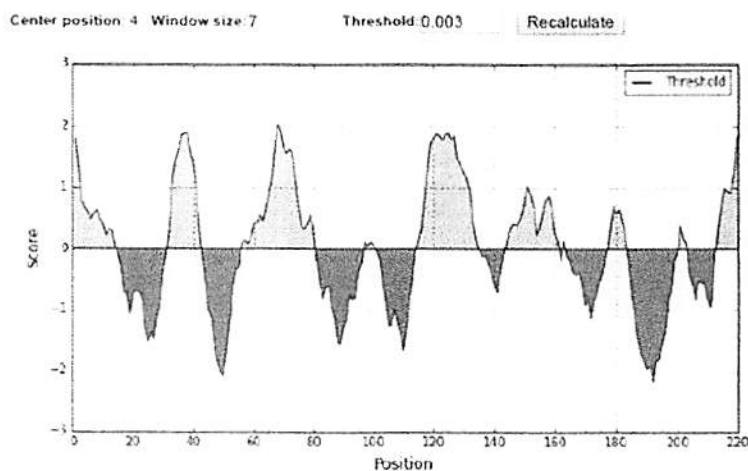
Gambar 5.4 Pohon filogenetik berdasarkan susunan nukleotida gen pengkode protein F virus *Newcastle disease* (ND) yang dibandingkan dengan susunan nukleotida gen pengkode protein F isolat virus vaksin *Newcastle disease* (ND) yang digunakan di Indonesia dan virus lainnya yang didapatkan dari data Genbank.

Hasil analisis kekerabatan menunjukkan bahwa isolat ND/AG1/2018, ND/AG2/2018, ND/AG3/2018, dan ND/AG4/2018 asal Lumajang dan Kenjeran melalui ranting pohon filogenetik berhubungan dekat dengan isolat yang termasuk dalam kelas II yaitu dengan virus vaksin yang beredar di Indonesia. Strain La Sota, V4, B1, Komarov dan Beaudette C digunakan sebagai strain vaksin aktif Indonesia pada umumnya. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan virus vaksin strain lentogenik dan mesogenik yang beredar di area Surabaya dan Lumajang, dan kemungkinan dikarenakan *shedding* virus, yakni pelepasan atau cecaran virus dari ayam yang telah divaksin pada peternakan ke lingkungan sekitar.

5.1.4.5 Prediksi Epitop Sel-B Gen Pengkode Pritein F virus *Newcastle disease* (ND)

Hasil sekuen nukleotida gen pengkode protein F dari virus ND yang telah didapatkan selanjutnya ditranslasi menjadi sekuen asam amino melalui *software* BioEdit versi 8.0. Prediksi epitop imunogenik pada gen pengkode protein F dilakukan menggunakan *software* online Epitope Prediction Tools/EIDB dengan metode *Bepipred Linear Epitope Prediction* yang dapat dilihat pada beberapa Gambar dan Tabel di bawah.

Gambar 5.5 dan Tabel 5.3 menunjukkan prediksi epitop imunogenik terhadap sel-B dari sekuen asam amino ND/AG1/2018. Terdapat 9 epitop dari susunan asam amino isolat ND/AG1/2018 berdasarkan afinitas epitopnya terhadap sel B.



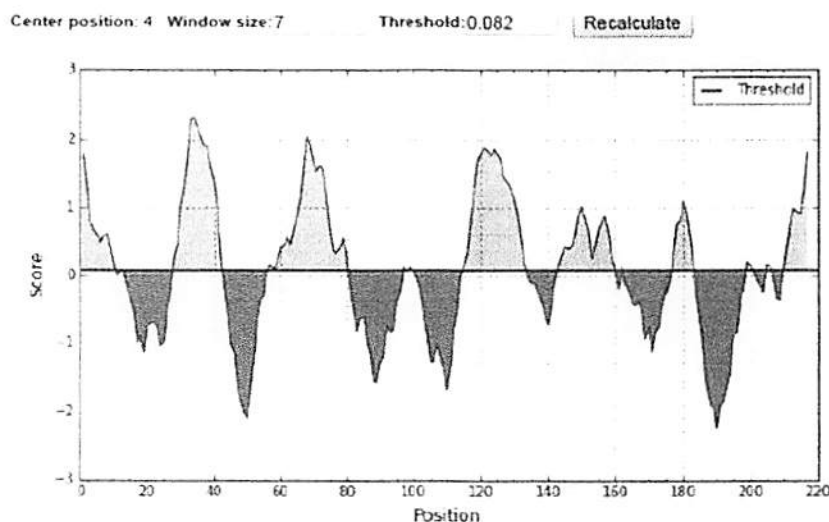
Gambar 5.5 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG1/2018

Keterangan : Area kuning di atas *threshold* (garis merah) diusulkan menjadi bagian dari epitop imunogenik terhadap sel B. Area hijau tidak diusulkan.

Tabel 5.3 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG1/2018

No	Awa l	Akhir	Peptida	Panjang	Log skor
1	1	14	DRPRGYLHAGEGAN	14	8,922
2	32	42	PPTHPDHHTK	11	14,82
3	56	80	SKKHGKILDPGWRPPGARWAPD LLP	25	21,333
4	97	100	VRQT	4	0,406
5	114	134	LQETKPSTYTPHPRQDQSLSS	21	25,87
6	144	161	HVRKPPWMHTTGHPLCSP	18	10,127
7	163	163	L	1	-
8	178	183	GGDRGA	6	3,008
9	201	203	KLE	3	0,671
Total			9		

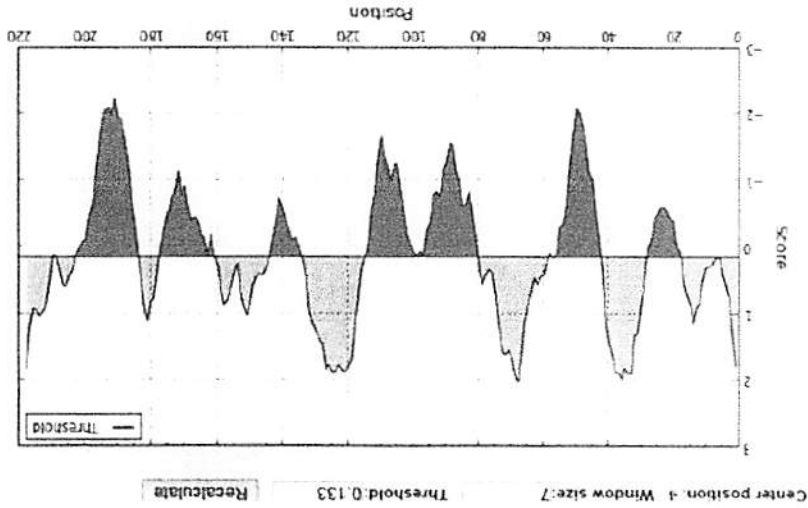
Gambar 5.6 dan Tabel 5.3 menunjukkan prediksi epitop imunogenik terhadap sel-B dari sekuen asam amino ND/AG2/2018. Terdapat 12 epitop dari susunan asam amino isolat ND/AG2/2018 berdasarkan afinitas epitopnya terhadap sel B.



Gambar 5.6 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG2/2018

Keterangan : Area kuning di atas *threshold* (garis merah) diusulkan menjadi bagian dari epitop imunogenik terhadap sel B. Area hijau tidak diusulkan.

Gambar 5.7 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG3/2018
 Keterangan : Area kuning di atas *threshold* (garis merah) diusulkan menjadi bagian dari epitop imunogenik terhadap sel B. Area hijau tidak diusulkan.



Gambar 5.7 dan Tabel 5.5 menunjukkan prediksi epitop imunogenik terhadap sel-B dari sekuen asam amino ND/AG3/2018. Terdapat 9 epitop dari susunan asam amino isolat ND/AG3/2018 berdasarkan afinitas epitopnya terhadap sel B.

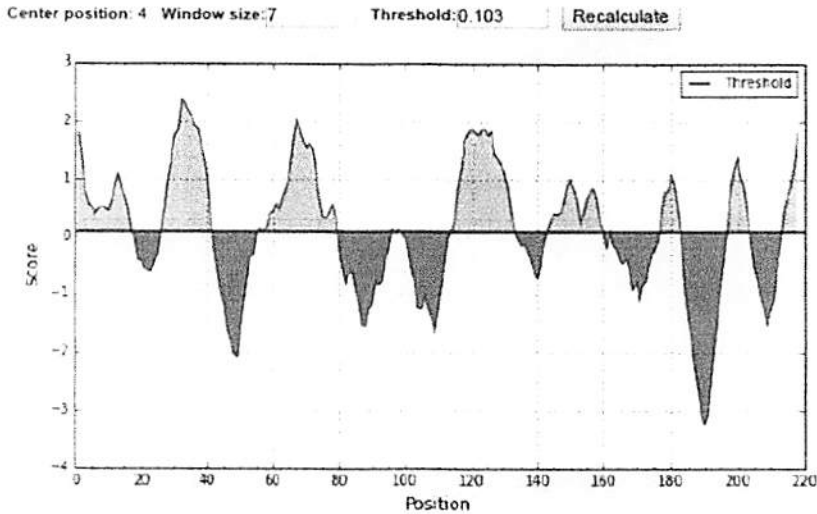
No	Awal	Akhir	Peptida		Panjang	Log skor
1	1	10	DRPRGYLHAG	G	10	7,685
2	12	12			1	0,083
3	28	42	IDGRPPTHPPDHHDTK		15	22,192
4	56	80	SKKHGKILDPGWRPPGARWAP	DLP	25	21,333
5	97	97		V	1	0,145
6	99	99		Q	1	0,128
7	114	133	QETKPSYTPHPRQDSLS		19	23,949
8	143	160	HVRKPPWMHTTGHP LCSP		18	9,993
9	162	162		L	1	0,131
10	177	182	GGDRG		6	4,544
11	199	201		KLE	3	0,461
12	205	206		LY	2	0,32
Total			12			

Tabel 5.4 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG2/2018

Tabel 5.5 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG3/2018

No	Awal	Akhir	Peptida	Panjang	Log skor
1	1	17	DRPRGYLHYAGEGAHPC	17	11,745
2	29	42	DGIPPTHDPDHDTK	14	19,902
3	57	57	K	1	0,168
4	58	79	HGKILDPGWRPPGARWAPDLL P	22	28,98
5	97	97	V	1	0,145
6	114	133	QETKPSTYTPHPRQDQSLSS	20	25,895
7	144	161	HVRKPPWMHTTGHPLCSP	18	12,603
8	178	183	GGDRGA	6	4,544
9	204	208	RQLYT	5	1,732
Total			9		

Gambar 5.8 dan Tabel 5.6 menunjukkan prediksi epitop imunogenik terhadap sel-B dari sekuen asam amino ND/AG4/2018. Terdapat 11 epitop dari susunan asam amino isolat ND/AG4/2018 berdasarkan afinitas epitopnya terhadap sel B.



Gambar 5.8 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG4/2018

Keterangan : Area kuning di atas *threshold* (garis merah) diusulkan menjadi bagian dari epitop imunogenik terhadap sel B. Area hijau tidak diusulkan.

Tabel 5.6 Prediksi epitop sel-B dari sekuen asam amino isolat ND/AG4/2018

No	Awal	Akhir	Peptida	Panjang	Log skor
1	1	16	DRPRGYLYAGEGAHPC	16	11,084

2	26	41	NLDGAPPTHDPDHHDTK	16	24,178
3	56	56	K	1	0,168
4	58	79	HGKILDPGWRPPGARWAPDLL P	22	17,783
5	96	96	V	1	0,145
6	98	98	Q	1	0,128
7	114	133	QETKPSTYTPHPRQDQSLSS	20	24,008
8	143	160	HVRKPPWMHTTGHPLCSP	18	9,996
9	162	162	L	1	0,131
10	177	182	GGDRGA	6	4,481
11	197	203	PHKKKKG	7	6,107
Total			11		

Pendekatan bioinformatik yang dilakukan untuk mengetahui prediksi epitop imunogenik terhadap sel-B melalui *software* online Epitope Prediction Tools/EIDB dengan metode *Bepipred Linear Epitope Prediction* menyatakan terdapat 9 kandidat epitop imunogenik terhadap sel-B pada gen pengkode protein F dari isolat ND/AG1/2018, 12 kandidat dari isolat ND/AG2/2018, 9 kandidat dari isolat ND/AG3/2018 dan 11 kandidat dari isolat ND/AG4/2018.

Epitop imunogenik terhadap sel-B dapat dikategorikan menjadi dua tipe yaitu epitop *linear (continuous)* dan epitop *conformational (discontinuous)*. Epitop *linear* meliputi rantai samping yang berkelanjutan di dalam sekuen, sedangkan epitop *conformational* terdiri dari rantai samping yang terpisah tetapi memiliki tempat yang berdekatan (Zhang *et al.*, 2011).

Hasil prediksi didapatkan bahwa terdapat 1 epitop imunogenik yang identik antara isolat ND/AG1/2018 dengan isolat ND/AG2/2018 yaitu SKKHGKILDPGWRPPGARWAPDLLP, antara isolat ND/AG2/2018, isolat ND/SW3/2018 dan isolat ND/AG4/2018 terdapat 1 epitop imunogenik yang identik yaitu QETKPSTYTPHPRQDQSLSS, antara isolat ND/AG2/2018 dan isolat ND/AG3/2018 terdapat 1 epitop imunogenik yang identik yaitu HGKILDPGWRPPGARWAPDLLP. Isolat ND/AG2/2018 memiliki jumlah epitop imunogenik yang lebih banyak dibanding isolat lainnya yakni ada 12 kandidat epitop imunogenik, sebagaimana terlihat pada Tabel 5.4 yaitu DRPRGYLHAG, G, IDGRPPTHDPDHHDTK, SKKHGKILDPGWRPPGARWAP

DLLP, V, Q, QETKPSTYTPHPRQDQSLSS, HVRKPPWMHTTGHPLCSP, L, GGDRGA, KLE dan LY.

Berdasarkan angka log skor pada Tabel 5.3, epitop imunogenik LQETKPSTYTPHPRQDQSLSS isolat ND/AG1/2018 memiliki log skor paling tinggi yaitu 25,87. Epitop imunogenik QETKPSTYTPHPRQDQSLSS isolat ND/AG2/2018 pada Tabel 5.4 memiliki log skor paling tinggi yaitu 23,949. Epitop imunogenik QETKPSTYTPHPRQDQSLSS isolat ND/AG3/2018 pada Tabel 5.5 memiliki log skor paling tinggi yaitu 25,895 dan epitop imunogenik NLDGAPPTHDPDHDTK isolat ND/AG4/2018 pada Tabel 5.6 memiliki log skor paling tinggi yaitu 24,178. Angka log skor menunjukkan bahwa hasil prediksi epitop dengan log skor yang tinggi memiliki sifat imunogenik yang baik (Toth, 2008).

Selain dapat mengetahui epitop pada protein yang bertanggung jawab dalam memicu respon imun tubuh, identifikasi dan analisis epitop yang memiliki sifat imunogenik yang tinggi dapat digunakan untuk pengembangan vaksin berbasis epitop. Vaksin berbasis epitop menawarkan berbagai keunggulan seperti kemurnian yang tinggi, kapasitas produksi vaksin yang besar, dan dapat diproduksi secara efisien (Toth, 2008). Vaksin berbasis epitop dengan memanfaatkan epitop *conserve* juga dapat dirancang untuk menginduksi respon imun sehingga dapat menjadi vaksin universal (Sette and Fikes, 2003).

5.2 Luaran Yang Dicapai

5.2.1 Jurnal Internasional : Analysis of Homology and Phylogenetic Genes Encoding Fusion (F) Protein of Newcastle disease Virus (NDV) Isolated Swan (*Cygnus olor*). Indian Journal of Public Health Research & Development (Dalam proses penerbitan, bukti terlampir).

5.2.2. Jurnal Internasional : Pathotyping and Profil Gen Encoding Fusion (F) Protein Newcastle disease Virus (NDV) From Waterfowl Field Isolate By RT-PCR. Veterinary Medicine Journal, Tripoli Libya (Dalam proses submit, bukti terlampir).





BAB 6

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

- 6.1 Melakukan Kloning dan Ekspresi Gen Pengkode Protein F Vius ND**
- 6.2 Melakukan Uji Imunogenitas**





BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

- 1) Isolat ND/AG1/2018, ND/AG2/2018, ND/AG3/2018 dan ND/AG4/2018 menunjukkan tingkat homologi sebesar 94-98% dengan isolat virus vaksin LaSota AY845400.2.
- 2) Hasil analisis kekerabatan, sampel Isolat ND/AG1/2018, ND/AG2/2018, ND/AG3/2018 dan ND/AG4/2018 memiliki hubungan kekerabatan dengan isolat virus vaksin LaSota.
- 3) Epitop HGKILDPGWRPPGARWAPDLLP dari sampel ND/AG3/2018 lebih berpeluang sebagai kandidat epitop imunogenik berdasarkan prediksi epitop sel B yaitu memiliki nilai log skor paling tinggi sebesar 28,98.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, maka saran yang diajukan adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan sekuen *complete* gen protein F untuk mengetahui prediksi epitop yang lebih lengkap dari protein F virus *Newcastle disease* (ND) isolat angsa (*Cygnus olor*) sebagai kandidat vaksin.

UNIVERSITAS AIRLANGGA
PERPUSTAKAAN
Jl. M. YUSUF KHAN
SAKRA, SURABAYA



DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J., J.G. Bell, and Alders, R.G. 2004. A Technology Review: Newcastle Disease, with Special Emphasis on Its Effect on Village Chickens. Food and Agriculture Organization on The United Nations. Rome.
- Aris, H., D. Kristiawan, S.H. Irianingsih dan D.W. Yudianingtyas. 2013. Amplifikasi Gen Penyandi Protein Fusion Virus Tetelo dari Spesimen Lapangan dengan Metode *OneStep* RT-PCR. Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta, Laboratorium Virologi dan Serologi, Balai Besar Veteriner Wates, Jogjakarta, Laboratorium Virologi dan Bioteknologi, Balai Besar Veteriner Maros, Sulawesi Selatan. *Jurnal Veteriner* September 2013 ISSN : 1411-8327 Vol. 14 No. 3: 387-393.
- Ashraf, A and M.S. Shah. 2014. Newcastle Disease. Present Status and Future Challenges for Developing Countries Departement of Wild Life and Fisheries, Government Collage University. Faisalabad. Pakistan.
- Ausvetplan (Australian Veterinary Emergency Plan) 2014. Disease Strategy Newcastle Disease-Version 3.2 Animal Health Australia. Australia.
- Bahri, S., E. Masbulan, A. Nurhadi, A. Kusumaningsih, dan E. Martindah. 2005. Studi Kebijakan Mengoptimalkan Sumber Daya Dalam Negeri dalam Memenuhi Kebutuhan Vaksin dan Bahan Biologis Veteriner Lain di Indonesia. *Prosiding Hasil-hasil Penelitian Bagian Proyek Rekayasa Teknologi Peternakan ARMP-II Tahun 1999/2000*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Bogor. hlm. 441-455.
- Blumberg, B.M., M. Leppert and D. Kolakofsky. 1981. Interaction of VSV Leader RNA and Nucleocapsid Protein May Control VSV Genome Replication Cell. 23, 837-845.
- Capua, I and J.D. Alexander. 2009. Avian Influenza and Newcastle Disease. Italia. Springer-Verlag.
- Cho, S.H., H.J. Kwon., T.E. Kim., J.H. Kim., H.S. Yoo., M.H. Park., S.J. Kim. 2008. Characterization of a recombinant Newcastle disease Virus vaccine strain. *Clin Vaccine Immunol.* 15(10): 1572-1579. DOI: 10.1128/CVI.00156-08.

- Choi, K.S., E.K. Lee., W.J. Jeon and J.H Kwon. 2010. Antigenic and Immunogenic Investigation of the Virulence Motif of the Newcastle Disease Virus Fusion Protein. *J. Vet. Sci.*, 11 (3): 205–211.
- Czegledi, A., D. Ujvari., E. Somogyi., E. Wehmann., O. Werne and B. Lomnicz. 2006. Third Genome Size Category of Avian Paramyxovirus Serotype 1 (Newcastle Disease Virus) and Evolutionary Implications. *Virus Res.* 2006. Sep;120(1-2): 36-48.
- De Leeuw, O.S., G. Koch., L. Hartog., N. Ravenshorst and B.P Peeters. 2005. Virulence of Newcastle Disease Virus is Determined by The Cleavage Site of The Fusion Protein and by Both The Stem Region and Globular Head of The Haemagglutinin-Neuraminidase Protein. *The Journal of General Virology* 86. 1759-1769.
- DetiksNews. 2018. Matinya Puluhan Ekor Ayam di Mojokerto Karena Penyakit Newcastle (diakses Februari 2018).
- Darminto. 1992. Laboratory trials of heat adapted V4 vaccine strains of Newcastle Disease virus in simple feed delivery for vaccination of village chickens. In: *Newcastle Disease in Village Chickens*. P.B. Spradbrow (Ed). ACIAR Proc. No. 39: 86-91.
- Dortmans, J.C.F.M., P.J.M. Rottier., G. Koch and B.P.H. Peetersi. 2010. The Viral Replication Complex is Associated with the Virulence of Newcastle Disease Virus. Central Veterinary Institute of Wageningen UR, Lelystad, Netherlands.
- Ernawati, R., A.P. Raharjo., N. Sianita., J. Rahmani., F.A. Rantam dan Suwarno. 2013. Petunjuk Praktikum Pemeriksaan Virologik dan Serologik. Laboratorium Virologi dan Imunologi Departemen Mikrobiologi Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 25-35.
- Flower, D.R. 2008. *Bioinformatics for Vaccinology, Vaccine*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester. UK.
- Guerra, R.E.S., R.N. Gomez., D.O.G. Alonso and S.R. Mendoza. 2015. An Overview of Bioinformatics Tools for Epitope Prediction: Implications on Vaccine Development. Mexico. *Journal of Biomedical Informatics* 405–414.
- Hewajuli, D.A dan N.L.P.I. Dharmayanti. 2011. Patogenitas Virus Newcastle Disease pada Ayam. *Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE. Martadinata No. 30, Bogor 16114*.

- Hidayanto, N.K., Emilia., Y. Yupiana dan Y. Suryati, Y. 2013. Seroepidemiologi Pasca Vaksinasi Newcastle Disease (ND) dengan 2 Strain Antigen. Unit Uji Virologi Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor 16340.
- Huang, Z., P. Aruna., S. Elankumaran., G. Dhanasekaran.,D.D. Rockemann and S.K. Samal. 2004. The Hemagglutinin-Neuraminidase Protein of Newcastle Disease Virus Determines Tropism and Virulence. *J. Virol.* 2004, 78(8). 4176. DOI: 10.1128/JVI.78.8.4176-4184.
- Infonet edisi Juli 2014. Ketika ND Genotipe 7 Menjadi Sorotan Utama. www.majalahinfonet.com. Diakses 25 Agustus 2017.
- Info Medion Edisi April 2015. Memadukan Langkah Pengendalian ND. <http://info.medion.co.id>. Diakses tanggal 30 Agustus 2017.
- Jackson, D.C., B. Chua and W. Zeng. 2006. Totally Synthetic Peptide-based Vaccines that Target Dendritic Cells and Induce Potent Antibody or CTL Responses. *Int. Congr. Ser* 1289: 311-316.
- Jahanshiri, F., M. Eshaghi and K. Yusoff. 2005. Identification of Phosphoprotein: Phosphoprotein and Phosphoprotein-nucleocapsid Protein Interaction Domain of The Newcastle Disease Virus. *Arch. Virol.* 150 (3), 611–618.
- Kencana, G. A. Y., K. I Made dan N.K.M. I Gusti. 2012. Peneguhan Diagnosis Penyakit Newcastle Disease Lapang pada Ayam Buras di Bali Menggunakan Teknik RT-PCR. Fakultas Kedokteran Hewan Udayana. Denpasar. Bali.
- Kim, L. M., D. J. King., P. E. Curry., D. L. Suarez., D. E. Swayne., D. E. Stallknecht., R. D. Slemons., J. C. Pederson., D. A. Senne., K. Winker and C. L. Afonso. 2007. Phylogenetic diversity among low virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *Journal of Virology* 81, 12641-12653.
- Kumar, S., N. Baibaswasta., L.C. Peter and S.K. Samal. 2011. Paramyxovirus Type 3 Vector in Chickens by Using a Recombinant Avian F and HN Proteins in Protective Immunity Evaluation of the Newcastle Disease Virus. Virginia Maryland Regional Collage of Veterinary Medicine. University of Maryland.

- Lamb, R.A., R.G. Paterson and T.S. Jardetzky. 2006. Paramyxovirus Membrane Fusion: Lessons From the F and HN Atomic Structures. *Virology* 344, 30-37.
- Lamb, R. and G. Parks. 2007. Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1449–1496.
- Mase, M., K. Imai., Y. Sanada., N. Sanada., N. Yuasa., T. Imada., K. Tsukamoto, and S. Yamaguchi. 2002. Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Genotypes Isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 40 (10): 3826-3830.
- Mebatsion, T., S. Versteegen., L.T.C. de Vaan., A. Romer-Oberdorfer and C.C. Schrier. 2001. A Recombinant Newcastle Disease Virus with Low – Level V Protein Expression is Immunogenic and Lacks Pathogenicity for Chicken Embryos. *Journal of Virology* 65, 420-428.
- Mebatsion, T., M.J.M. Koolen., L.T.C. de Vaan., N. de Haas., M. Braber., A. Romer-Oberdorfer., P. Elzen and Marel, P. 2002. Newcastle Disease Virus (NDV) Marker Vaccine: An Immunodominant Epitope on the Nucleoprotein Gene of NDV can be Deleted or Replaced by a Foreign Epitope. Departement of Virology, Intervet International B. V., 5830 AA Boxmeer, The Netherlands.
- Meulemans, G., T.P. Van der Berg., M. Decaesstacker and M. Boschmans. 2002. Evolution of Pigeons Newcastle Disease Virus Strains. *Avian Pathology*. 2002 Oct;31(5): 515-519.
- Miller PJ, D.J. King., C.L. Afonso and D.L. Suarez. 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.
- Miller, P.J., C.L. Afonso., J.E. Attrache., K.M. Dorsey, K., S.C. Courtney., Z. Guo and D.R. Kapczynski, D. R. 2013. Effects of Newcastle Disease Virus Vaccine Antibodies on the Shedding and Transmission of Challenge Viruses. *Developmental and Comparative Immunology* 41: 505–513.
- Mohamed, M.H.A., K. Sachin., P. Anandan and S.K. Samal. 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.

- Morrison, T., C. McQuain and McGinnes, T. 1991. Complementation Between Avirulent Newcastle Disease Virus and a Fusion Protein Gene Expressed from a Retrovirus Vector: Requirements for Membrane Fusion. *J. Virol.* 65: 813-822.
- Munir, M., A. Muhammad., T.K. Muhammad., Z. Siamak and B. Mikael. 2012. Genomic and Biological Characterization of a Velogenic Newcastle Disease Virus Isolated from a Healthy Backyard Poultry Flock in 2010. Division of Virology, Departement of Biomedical Science and Veterinary Public Helath, Swedish University of Agricultural Sciences. Sweden.
- Nawan. 2012. Frekuensi Antibodi Anti Virus Hepatitis E (VHE) Positif dan Deteksi Virus Hepatitis E pada Babi dan Manusia di Palangkaraya. Kalimantan Tengah [Tesis]. Program Pascasarjana, Fakultas Ilmu Kedokteran Tropis. Universitas Airlangga. Surabaya.
- OIE (Office International des Epizooties). 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/access-online>.
- Orsi, M.A., L. Doretto Jr, D. Reischak, L.H.A. da Silva, F.R. Spilki, M.G. Buzinaro and C.W. Arns. 2009. Newcastle Disease Virus Vaccine Strains: Immunogenicity is not Influenced by ICPI. *Brazilian Journal of Poultry Science.* Vol 2. 129–133.
- Rantam, F.A. 2008. Virology Molekuler. A lecture material. Faculty of Veterinary Medicine. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Rout, S.N. and S.K. Samal. 2008. The Large Polymerase Protein is Associated With The Virulence of Newcastle Disease Virus. *J. Virol.* 82 (16), 7828–7836.
- Rukmana, R. 2007. Ayam Buras. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Samal, S.K. 2012. Role of Fusion Protein in Newcastle Disease Virus Pathogenesis. Faculty of the Graduate School of the University of Maryland. University of Maryland.
- Sette, A and J. Fikes. 2003. Epitope-based Vaccines: An Update on Epitope Identification, Vaccine Design and Delivery. *Curr. Opin. Immunol* 15: 461-470.



Indian Journal of Public Health Research & Development

Institute of Medico-Legal Publications

501, Manisha Building, 75-76, Nehru Place, New Delhi-110019, India
Tel.: +91-9971888542 • Email: editor.ijphrd@gmail.com • Website: www.impl.in

No4058/IJPHRD/2018

21-09-2018

To

Naimah Putri

Master student of Vaccinology and Immunotherapeutics,
Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Mulyorejo, Kampus
C Unair, Surabaya, 60115, Indonesia;

Dear author/s

I have pleasure to inform you that your following Original Article has been accepted for publication in
Indian Journal of Public Health Research and Development

**ANALYSIS OF HOMOLOGY AND PHYLOGENETIC GENES ENCODING FUSION (F)
PROTEIN OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NDV)
ISOLATED SWAN (*CYGNUS OLOR*)**

Naimah Putri¹, Rahaju Ernawati², Suwarno², Kusnoto³, Wiwick Tyasningsih⁴ and Fedik Abdul
Rantam^{2,5}

1. Master student of Vaccinology and Immunotherapeutics, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Mulyorejo, Kampus C Unair, Surabaya, 60115, Indonesia;
2. Laboratory of Virology and Immunology Department Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Mulyorejo, Kampus C Unair, Surabaya, 60115, Indonesia;
3. Laboratory of Parasitology Department Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Mulyorejo, Kampus C Unair, Surabaya, 60115, Indonesia;
4. Laboratory of Bacteriology and Micology Department Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Mulyorejo, Kampus C Unair, Surabaya, 60115, Indonesia;
5. Stem Cell Research and Development Center, Universitas Airlangga

Corresponding author: Fedik Abdul Rantam, email : fedik-a-r@fkh.unair.ac.id

It will be published in Volume 11, No.3, March 2020 issue. It is further mentioned for your information that our journal is a double blind peer reviewed indexed international journal. It is covered by Index Copernicus (Poland), Indian Citation index, Google Scholar, CINAHL, EBSCOhost (USA), EMBASE (Scopus) and many other international databases. The journal is now part of CSIR, DST and UGC consortia. The Journal is index with Scopus and fulfills MCI Criteria as per MCI circular dated 03/09/2015.

With regards

Yours sincerely,

Prof R K Sharma

Editor



OPEN VETERINARY JOURNAL

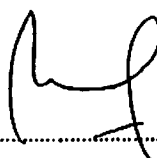
Manuscript Submission Form

This form must be signed by the Corresponding Author or the Author Presenting the Paper in the 2nd Veterinary Medicine International Conference, in order for the paper to be included in the Supplement Issue of the Open Veterinary Journal in 2018.

Manuscript Title: PATHOTYPING AND PROFILE GEN ENCODING FUSION (F) PROTEIN
NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NDV) FROM WATER FOWL FIELD ISOLATE
By RT - PCR

Statement of Originality and Authorship

- I approve the submission of the above mentioned manuscript to the Open Veterinary Journal through the 2nd Veterinary Medicine International Conference Organizers.
- I attest that each author included in the article has made a scientific contribution to the study.
- I confirm that the manuscript has not previously been published.
- I confirm that the manuscript is not submitted or under consideration for publication elsewhere.
- I accept responsibility for the scientific integrity of the work described in this manuscript and ethical approval was obtained for work involving the use of animals.
- I confirm that this manuscript is original, and it contains no fabrications, fraud, or plagiarism.
- If the manuscript is accepted, all authors agree to automatically transfer the copyright of the article to the publisher of Open Veterinary Journal through the 2nd Veterinary Medicine International Conference Organizers.

Corresponding Author's Name: Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh Signature: 
 Date: 06 / 06 / 2018