

Deteksi Virus Penyakit Tetelo Isolat Lapangan dengan Metode *Nested Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction*

(DETECTION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS BY NESTED REVERSE
TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION)

Anak Agung Ayu Mirah Adi¹, Nyoman Mantik Astawa²,
Ketut Santhia Adhy Putra³, Yasunobu Matsumoto⁴

¹Laboratorium Patologi, ²Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Udayana Jl. PB Sudirman, Denpasar, Bali
Telepon: (0361) 701808; E-mail: mirahadi@plasa.com

³Laboratorium Virologi, Balai Besar Veteriner Denpasar, Jl. Raya Sesetan, Pegok, Denpasar

⁴Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,
Yayoi 1-1-1, Bunkyo, Tokyo, Japan

ABSTRACT

A study to utilize *nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) for the detection of *Newcastle disease virus* (NDV) infection was carried out. NDV isolated from an outbreak in Karangasem District of Bali, Indonesia was propagated in chicken embryos and its pathogenicity was determined by inoculation in 3 week-old chickens. Organ samples were collected from infected chickens for nested-RT-PCR. Out of several different pairs of primers designed for study, 3 pairs of primers (F4s-F6r/F5s-F5r, F8s-F10r/F8s-F8r and F12s-F14s/F13s-F13r), each of which for first-round/nested PCR, was able to amplify specific regions of NDV genome. In the first-round PCR, the PCR product of 1500 bps was not clearly visible in the agarose gel following electrophoresis. In nested PCR a PCR product of 500 bp was clearly visible on agarose gel following electrophoresis. The 3 pairs of primers appeared to be potential for an accurate and rapid detection NDV in the infected host.

Key word: Newcastle disease virus reverse transcriptase, polymerase chain reaction

PENDAHULUAN

Newcastle Disease (ND) atau juga disebut penyakit tetelo merupakan salah satu penyakit yang sangat penting pada unggas (Alexander, 2003). Penyebabnya adalah virus yang beramplop dengan genom yang terdiri atas RNA bersekat tunggal, tidak bersegmen, dan berpolaritas negatif. Genom virus ND menyandi enam protein, yakni *nukleokapsid* (NP), *Phosphoprotein* (P), *matrix* (M), *Fusion* (F), *hemagglutinin-neuraminidase* (HN), dan *RNA polymerase* (L) (De Leeuw dan Peeters, 1999). Panjang genomnya adalah 15.186 nukleotida dan merupakan kelipatan dari 6 yang khas untuk kebanyakan anggota subfamili *Paramyxovirinae* (Romer-Oberdofer, 2003).

Amplop virus ND terdiri atas dua glikoprotein, yakni HN dan F yang berperan amat penting dalam proses infeksi. Protein HN memediasi terjadinya perlekatan virus dengan

sel inang, sedangkan protein F berfungsi untuk penetrasi virus ke dalam sel inang dan berperan dalam pembentukan sinsitia pada sel yang terinfeksi (Horvath *et al.*, 1992). Penggabungan amplop virus dengan membran sel target merupakan tahapan yang paling penting dalam mekanisme infeksi virus ND, dan protein F begitu juga HN memegang peranan penting dalam proses ini. Protein HN bertanggung jawab dalam pelekatan virion ke sel target, sedangkan protein F berfungsi untuk menghancurkan sel target serta menginduksi terjadinya penggabungan membran (Reitter *et al.*, 1995).

Diagnosis penyakit ND yang akurat sangat diperlukan dalam upaya pengendalian penyakit. Diagnosis yang akurat dapat dilakukan dengan isolasi virus dalam telur ayam bertunas dan identifikasi virus dilakukan dengan uji hambatan hemagglutinasi. Namun, selain memerlukan fasilitas laboratorium yang

memadai, uji tersebut juga memerlukan waktu yang cukup lama yakni sekitar 1 minggu. Belakangan ini, metode diagnosis yang berbasis pendekatan biologi molekuler telah menjadi alternatif yang dapat diandalkan. Salah satu metode diagnosis berbasis molekuler yang dapat dikembangkan untuk melacak infeksi virus ND pada unggas terinfeksi adalah teknik *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Metode ini dapat dipakai untuk melacak asam nukleat virus ND dalam cairan *allantois* telur ayam berembrio yang terinfeksi (Jestin dan Jestin, 1991). Sensitivitas dan spesifisitas metode RT-PCR sangat bergantung pada kondisi dan susunan primer, ketepatan dalam penentuan suhu dan waktu untuk denaturasi, penempelan primer (*annealing*) dan perpanjangan rantai DNA (*extension*), konsentrasi $MgSO_4$ serta jumlah siklus pada mesin *thermocycler*. Diperlukan uji coba berkali-kali untuk mendapatkan hasil yang optimum. Salah satu masalah yang sering dihadapi dalam pengembangan metode RT-PCR adalah adanya sikuens nukleotida pada bagian gen tertentu yang sulit diamplifikasi dengan metode PCR standar (*first-round PCR*). Masalah tersebut umumnya dapat diatasi dengan metode *nested PCR*, yakni melakukan PCR ronde kedua (*second-round*) dengan menggunakan primer yang berbeda. *Nested PCR* dapat meningkatkan sensitivitas PCR sampai 100 kali jika dibandingkan dengan PCR standar (Aradaib *et al.*, 1998)

Mengingat protein HN dan F mempunyai peran yang amat penting dalam infeksi, dalam penelitian ini dipakai dua pasang primer yang dapat mengamplifikasi gen penyandi kedua protein tersebut. Sepasang primer pertama dipakai untuk PCR standar dan sepasang primer kedua dipakai untuk *nested PCR*. Dengan menggunakan dua pasang primer tersebut diharapkan dapat diketahui tingkat sensitivitas dan spesifisitas *first-round PCR* dan *nested PCR* sehingga hasilnya dapat dipakai sebagai protokol tetap untuk mendiagnosis penyakit ND secara cepat dan akurat.

METODE PENELITIAN

Isolat Virus ND

Virus yang dipakai dalam penelitian ini adalah virus ND isolat lapangan yang diisolasi dari wabah ND pada ayam di Kabupaten Karangasem, Bali, Indonesia. Patogenisitasnya diuji dengan menginfeksi virus pada ayam

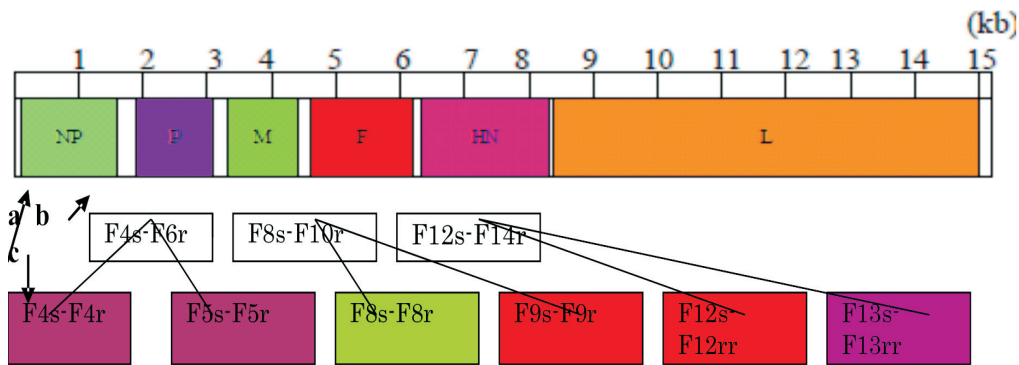
umur 3 minggu dengan dosis 10^5 *tissue culture infective dose* (TCID)₅₀ per ekor ayam secara *intraocular*. Hasil uji menunjukkan bahwa isolat tersebut termasuk virus ND tipe velogenik yang menyebabkan tingkat kematian 57% (data belum dipublikasikan). Sampel organ otak, usus halus, paru-paru, bursa fabricius, dan limpa diambil untuk uji *nested RT-PCR*.

Perancangan Primer Khas Virus ND

Dengan mengacu pada *nucleotide sequence* dari genome virus ND *strain* Lasota (*accession number*: AF 0077761) yang diakses dari *GeneBank*, sepasang primer depan (*sense primer*) dan primer belakang (*reverse primer*) dirancang untuk menghasilkan *amplicon* sepanjang 500 bp. Primer dinamai sesuai dengan urutan fragmen dari posisi nukleotida 1 sampai dengan 15.186, pada susunan nukleotida genom virus ND *strain* Lasota. Dalam penelitian ini, primer yang dipakai dalam reaksi transkripsi balik (*reverse transcription*) molekul RNA menjadi *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA) adalah 5 primer, yakni F1s, F7s, F13s, F18s, dan F25s (Tabel 1). Penggunaan kelima primer tersebut diharapkan dapat mentranskripsi balik seluruh bagian (*full-length*) molekul RNA virus ND menjadi cDNA. Untuk reaksi PCR I (*first-round PCR*), dipilih primer yang dapat mengamplifikasi daerah gen P, M, F, dan HN. Dalam hal ini dipilih 3 pasang primer depan dan belakang yang mampu mengamplifikasi 1.500 bp (Gambar 1b). Adapun untuk *nested PCR* dipilih 6 pasang primer depan dan belakang yang dapat mengamplifikasi gen P, M, F, atau HN yang menghasilkan produk sebesar 500 bp (Gambar 1c).

Ekstraksi RNA

Asam inti (RNA) virus ND diekstrak dari sampel organ ayam yang mati pascainokulasi dengan virus ND isolat lapang. Ekstraksi dilakukan dengan metode *trizol* sesuai dengan protokol yang disiapkan oleh produsen (Trizol[®]-invitrogen). Sampel jaringan dengan berat 100 mg digerus secara aseptis dalam tabung mikro. Ke dalam gerusan organ ditambahkan 750 μ l trizol. Setelah divorteks selama beberapa saat, campuran dibiarkan pada suhu kamar selama 5 menit. Ke dalam campuran kemudian ditambahkan 200 μ l kloroform, divorteks dan dibiarkan selama 15 menit. Campuran disentrifugasi selama 15 menit pada 14.000 rpm dan bagian supernatannya diambil. Ke dalam cairan supernatan selanjutnya ditambahkan



Gambar 1. Skema struktur genom virus ND dengan panjang 15,1 kb yang tersusun atas gen NP, P, M, F, HN dan L (a) ; Perkiraan posisi primer untuk PCR I (b) dan perkiraan posisi primer untuk nested (c)

500 µl isopropil alkohol dan kembali didiamkan selama 10 menit. Campuran kembali disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dan supernatan dibuang. Pelet kemudian dicuci dengan 1.000 µl alkohol 70%, dan disentrifugasi dengan kecepatan 7.500 rpm. Supernatan dibuang, RNA dikeringkan dan disuspensikan dalam aquades yang bebas dari enzim RNase (*diethyl pyro carbonat treated water*). Konsentrasi RNA dalam sampel yang didapat diukur dengan spektrofotometer dan sampel RNA selanjutnya disimpan pada suhu minus 20°C.

Reaksi Reverse Transcriptase

RNA yang diisolasi kemudian diubah menjadi cDNA (*complementary DNA*) menggunakan enzim *reverse transcriptase* dan campuran 5 jenis primer depan. Ke dalam tabung mikro ditambahkan 4 µl RT (*reverse transcription*) buffer, 2 µl dNTP 10 mM, 0,25 µl RNase inhibitor (Toyobo), 10 µl aquades, 0,25 µl *reverse transcriptase* (Rever Treace Toyobo), 2,5 µl primer (5 jenis primer depan masing-masing 0,5µl), dan 1µl sampel RNA sebagai *template*. Campuran ini kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 10 menit, pada suhu 40°C selama 60 menit, dan pada suhu 100°C selama 5 menit. Kemudian secepatnya didinginkan dengan cara dimasukkan dalam boks berisi es. Sampel cDNA yang didapat dalam reaksi ini selanjutnya diamplifikasi dengan uji PCR dan *nested PCR*.

First-round PCR dan Nested PCR

Untuk PCR tahap pertama dipilih 3 pasang primer yang akan mengamplifikasi posisi pada *genome* yang akan mewakili bagian dari gen P,

M, F, dan HN (Gambar 1b), primer yang digunakan diharapkan akan mengamplifikasi masing-masing 1.500 bp. Ke dalam masing-masing tabung PCR dimasukkan *buffer* amplifikasi (*amplification buffer*) yang terdiri atas 10 µl 2 x PCR buffer KOD FX (Toyobo Japan), 4 µl 2 mM dNTPS, 0,6 µl *primer sense*, 0,6 µl *primer reverse*, 0,4 µl enzim KOD FX (Toyobo Japan), 3,4 ml *distilled water* (DW), dan 1 µl cDNA. Untuk tabung kontrol negatif sebagai pengganti cDNA ke dalam tabung ditambahkan DW sehingga tercapai total volume 20 µl. Tabung PCR ditempatkan pada mesin *thermocycler* yang diprogram sebagai berikut: predenaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus reaksi yang urutan waktu dan suhunya sebagai berikut: denaturasi pada suhu 98°C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik, dan *extension* pada suhu 68°C selama 30 detik. Setelah itu dilanjutkan dengan *extension* pada suhu 68°C selama 7 menit dan pendinginan pada suhu 20°C.

Masing-masing 10 ml PCR *product* yang didapat kemudian dicampur dengan 2 µl 6 x *loading dye* kemudian dielektroforesis selama 25 menit dalam agarose 1% dengan *running buffer* TAE (*Tris Asetic EDTA*) 1x, kemudian divisualisasikan dengan larutan *ethidium bromide* (0,5 mg/ml). Produk PCR tahap I akan diamplifikasi dengan menggunakan sepasang primer dengan target amplifikasi lebih rendah yaitu 500 bp. Dalam penelitian ini dicobakan 6 pasang primer, perkiraan posisi dari target gen yang diamplifikasi dapat dilihat pada Gambar 1c. Komposisi campuran reaksi *nested PCR* sama dengan kondisi PCR tahap I, hanya saja yang dipakai *template* adalah 1 ml produk PCR

Tabel 1. Primer yang digunakan dalam reaksi *reverse transcriptase* (X), PCR I (⊕) dan Nested PCR (✓). Primer disusun dengan mengacu kepada gen lengkap virus ND LaSota (accession no. AF 0077761). s= sense, r =reverse

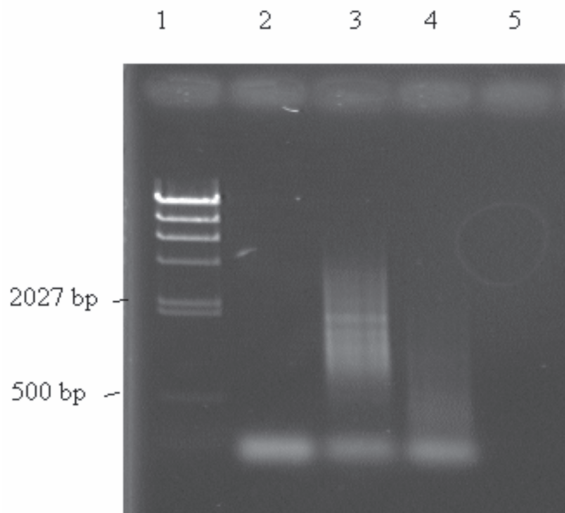
Nama fragmen dan susunan nukleotida	Keterangan
F1s:5'-acc aaa cag aga atc cgt ga-3'	X
F4s:5'-aaa ctc tgc aca ggg cac tc-3'	⊕✓
F4r:5'-ctg gat gct ccc atg ctt ct-3'	✓
F5s:5'-gca aga cca agg tgc tga gc-3'	✓
F5r:5'-tgc aca aag tct aca ggt gg-3'	✓
F6r:5'-caa ggc gct tga ttt tcc tg-3'	⊕
F7s:5'-gca agt tag atg cag ccg gg-3'	X
F8s:5'-aag aag cca ctg tcg gca tg-3'	⊕✓
F8r:5'-cag ctt gtc aaa tgt cac tt-3'	✓
F9s:5'-ctcttc ttg cat att gga ct -3'	✓
F9r:5'-gaa ggt ctg gag ccc atc tt-3'	✓
F10r:5'-ataatccgtcag tga cct ca-3'	⊕
F12s:5'-cccaaa gtg gtgacacag gt-3'	⊕✓
F12r:5'-acgatatag gta atgaga gc-3'	✓
F13s:5'-agagga aag caacagaaa ac-3'	X ✓
F13r:5'-ata aaa aag gga ggc tac ag -3'	✓
F14r:5'-ctggtg cag atg tcc gga gc-3'	⊕
F18s:5'-cct gat gaa tgt gac ttc ga-3'	X
F25s:5'-aat agc tca tat gtc gcc ac-3'	X

tahap I, serta menggunakan sepasang primer baru yang diharapkan menghasilkan 500 bp PCR *product*. Siklus reaksi pada mesin *thermocycler* sebagai berikut: Predenaturasi pada suhu 98°C selama 2 menit kemudian dilanjutkan dengan 34 siklus reaksi yang urutannya adalah: denaturasi pada suhu 98°C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 20 detik, dan *extension* pada suhu 74°C selama 30 detik. Kemudian dilanjutkan dengan *extension* pada suhu 74°C selama 7 menit dan pendinginan pada suhu 20°C. Untuk proses elektroforesis produk *nested* PCR sama dengan produk PCR tahap I, namun mengingat panjang produk yang dihasilkan adalah 500 bp maka *agarose* yang digunakan adalah *agarose* 2%. Sebagai bahan perbandingan hasil reaksi antara

nested RT-PCR dengan RT-PCR biasa maka dalam penelitian ini dilakukan pula PCR dengan menggunakan *template* 1 µl cDNA dan sepasang primer yang sama dengan primer yang digunakan dalam reaksi *nested* PCR. Komposisi campuran PCR sama dengan komposisi campuran PCR tahap I, sementara kondisi reaksi sama dengan kondisi reaksi *nested* PCR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

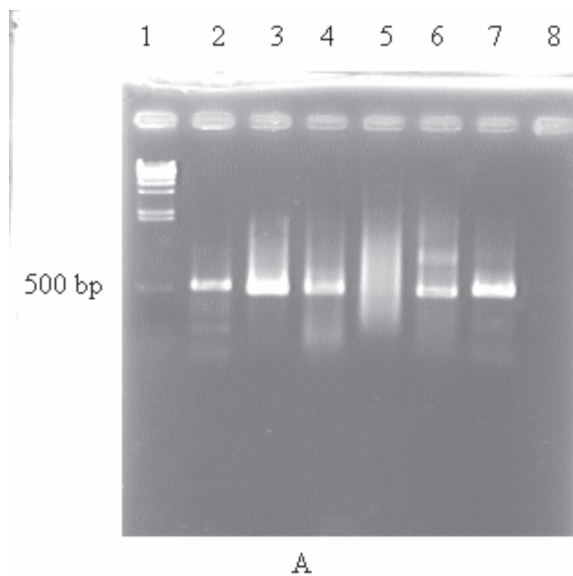
Pada PCR tahap I tidak tampak pita DNA yang diharapkan yakni 1.500 bp (Gambar 2). Hasil ini menunjukkan bahwa pada PCR tahap I, primer yang dipakai tidak dapat mengamplifikasi bagian-bagian tertentu dari gen virus ND. Ada kemungkinan bahwa gen yang



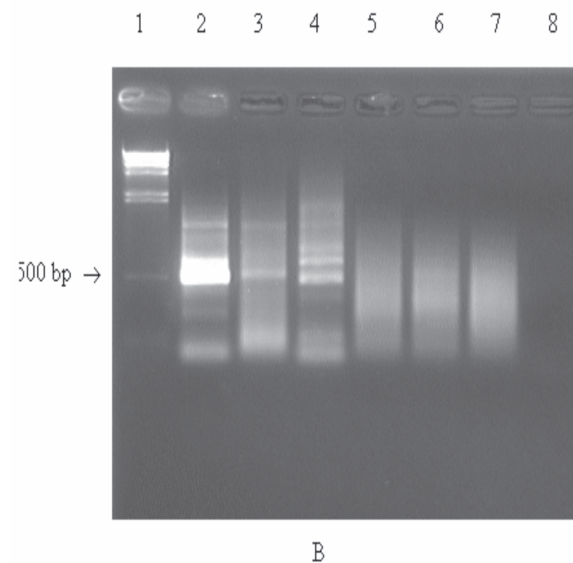
Gambar 2. Hasil amplifikasi gen virus ND pada reaksi PCR tahap I
 Keterangan: 1). Marker standar (Lambda Hind III), 2). 1 µl cDNA-F4s-F6r, 3). 1 µl cDNA, F8s-F10r, 4). 1 µl cDNA- F12s-F14r, dan 5). 1 µl DW-F4s-F6r (kontrol negatif)

diampifikasi terlalu panjang sehingga reaksi PCR tidak berjalan secara optimal. Oleh karena itu, dilakukan PCR tahap II dengan primer berbeda (*nested* RT-PCR) dengan *amplicon* yang lebih pendek (500 bp) sehingga reaksi PCR diharapkan berjalan lebih optimal.

Hasil *nested* PCR menunjukkan bahwa pita DNA khas ND dengan panjang 500 bp terlihat jelas pada gel. Ini menunjukkan bahwa pada reaksi PCR tahap I, *amplicon* dengan panjang DNA sebesar 1.500 bp sebenarnya terbentuk. Namun, karena reaksi PCR tahap I tidak berjalan optimal, DNA hasil amplifikasi jumlahnya sangat sedikit, sehingga tidak dapat divisualisasikan pada gel setelah pewarnaan dengan *ethidium bromida*. Ketika hasil PCR tahap I diampifikasi dengan berbagai pasangan primer yang berbeda dengan *amplicon* sebesar 500 bp, maka pita muncul dengan jelas. Berbagai pasangan primer yang dipakai dalam uji PCR tahap I *nested* PCR dan menghasilkan produk PCR yang sama, tetapi dengan spesifisitas yang berbeda. Untuk *nested* PCR yang menggunakan primer F4s-F4r dan F12s-F12r pita khas gen virus ND tampak jelas, tetapi



Gambar 3. Hasil *nested* PCR berupa pita spesifik dengan panjang 500 bp dapat dengan jelas dilihat, pada line no 2,3,4,6 dan 7.
 Keterangan: 1. Marker lambda hind III, 2. 1 mól cDNA, F4s-F6r/F4s-F4r, 3. 1 mól cDNA F4s-F6r/F5s-F5r, 4. 1 mól cDNA F8s-F10r/F8s-F8r, 5. 1 µl cDNA F8s-F10r/F9s-F9r, 6. 1 µl cDNA F12s-F14r/F12s-F12r, 7. 1 µl cDNA F12s-F14r/F13s-F13r dan 8 . 1 mól DW, F4s-F6r / F4s-F4r(kontrol negatif)



Gambar 4. PCR I dengan menggunakan primer untuk *nested* PCR hasilnya belum optimal.
 Keterangan: 1. Marker lambda hind III, 2. 1 µl cDNA- F4s-F4r, 3. 1 µl cDNA- F5s-F5r, 4. 1 µl cDNA- F8s-F8r, 5. 1 µl cDNA -F9s-F9r, 6. 1 µl cDNA -F12s-F12r, . 1 µl cDNA -F13s-F13r 8. 1 µl DW,-F4s-F4r (kontrol negatif)

Tabel 2. Rancangan pimer yang berpotensi untuk dipakai dalam mendeteksi gen virus ND isolat Karangasem dengan uji nested PCR

PCR tahap I	Primer untuk nested PCR	Bagian yang diamplifikasi
F4s-F6r	F5s-F5r	Gen P
F8s-F10r	F8s-F8r	Gen M
F12s-F14r	F13s-F13r	Gen HN

masih ditemukan hasil amplifikasi yang tidak spesifik. Penggunaan primer tersebut untuk mendeteksi infeksi virus ND masih perlu dikondisikan lebih lanjut sehingga diperoleh pita tunggal yang khas. Sementara itu, hasil amplifikasi menggunakan primer F9s-F9r belum didapatkan hasil yang optimal (hasil baru berupa *smear* belum berupa pita). Untuk meningkatkan spesifisitas uji *nested* PCR menggunakan primer ini mungkin perlu dilakukan reaksi PCR berikutnya dengan menurunkan target amplifikasi.

Pita sasaran dan pita yang tidak spesifik ditemukan pada *amplicon* yang menggunakan primer F4s-F4r dan F12s-F12r. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat kepekaan dan kekhasan RT-PCR tidak sama untuk semua primer di atas. *Amplicon* yang khas ND sebesar 500 bp dapat dihasilkan oleh tiga pasang primer berikut (Tabel 2).

Deteksi virus ND secara akurat dapat dilakukan dengan primer tersebut. Temuan beberapa peneliti menunjukkan bahwa kepekaan dan kekhasan PCR bergantung pada jenis primer, panjang *amplicon*, dan bagian gen yang diamplifikasi (Singh *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2005). Metode ekstraksi RNA juga mempengaruhi kepekaan uji PCR untuk virus ND (Wambura, 2006a dan b). Upaya untuk mencari primer yang khas dan dapat mengamplifikasi gen virus ND masih terus dilakukan.

Dalam penelitian ini, gen yang menjadi target amplifikasi adalah gen P, M, F, dan HN. Dari beberapa primer yang telah dicoba uji *nested* PCR dengan panjang 500 bp dapat dilakukan dengan 3 pasang primer PCR I dan primer *nested* PCR (Tabel 2). Berbagai penelitian telah mencoba berbagai rancangan primer untuk mengamplifikasi gen virus ND. Umumnya, primer yang dipakai adalah berdasarkan sikuens gen virus ND galur Lasota dan B1 yang dapat diakses dari *GeneBank* (Qin *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2006). Namun, virus

RNA seperti ND dapat bermutasi dengan cepat selama replikasi dan perkembangannya dalam tubuh inang (Domingo dan Halland, 1997), sehingga berbagai rancangan perlu dievaluasi.

Penyakit ND merupakan penyakit menular yang secara ekonomis sangat penting. Tersedianya metode diagnosis yang cepat dan akurat sangat penting dalam upaya pencegahan penyakit. Penggunaan teknik diagnosis konvensional, seperti isolasi virus pada telur ayam bertunas dan identifikasi virus dengan uji hemaglutinasi dan hambatan hemaglutinasi selain sangat *laborious* juga memerlukan waktu lama (Ali dan Reynold, 2000). Waktu yang dibutuhkan untuk mengisolasi virus dari telur ayam bertunas kurang lebih lima hari, kemudian diikuti dengan uji HA dan HI untuk identifikasi virus. Untuk menegakkan diagnosis sedikitnya diperlukan waktu 1 minggu. Selain itu, teknik isolasi virus dari telur ayam bertunas juga berbahaya mengingat di lapangan sering ditemukan infeksi campuran dengan virus *avian influenza* yang mempunyai gejala klinis sangat mirip (Marrangon dan Busani, 2006)). Teknik diagnosis infeksi virus dengan pendekatan biologi molekuler seperti uji PCR belakangan banyak dikembangkan untuk mendiagnosis infeksi virus termasuk virus ND (Smietanka *et al.*, 2006). Namun, teknik ini umumnya kurang sensitif dan tidak dapat dipakai untuk mengamplifikasi daerah-daerah tertentu dari genom virus. Ini telah terbukti dari hasil PCR tahap I yang tidak memunculkan pita yang diharapkan (Gambar 2 dan 4). Penggunaan PCR tahap II (Gambar 3) dengan primer yang berbeda (*nested* PCR) tampaknya dapat meningkatkan sensitivitas uji (Mahatmi *et al.*, 2007). Dengan metode *nested* PCR menggunakan sampel organ/jaringan terinfeksi, deteksi infeksi virus ND secara akurat dapat dilakukan dalam waktu 7 jam. Kecepatan dan keakuratannya inilah yang menyebabkan uji *nested* PCR dapat diandalkan sebagai metode diagnosis pilihan di masa yang akan datang.

SIMPULAN

Pasangan primer PCR tahap I dan *nested* PCR yang memberikan hasil yang optimal adalah F4s-F6r/F5s-F5r, F8s-F10r/F8s-F8r, dan F12s-F14r/F13s-F13r. Ketiga pasangan primer tersebut sangat berpotensi untuk digunakan dalam uji *nested* PCR untuk melacak infeksi virus ND secara cepat dan akurat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan dalam rangka program S3 di Universitas Tokyo, Jepang yang didanai oleh *Japan Society for the Promotion of Science-Ronpaku* (Dissertation PhD) Program. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih, begitu pula kepada Dirjen Dikti yang telah memfasilitasi keikutsertaan penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander DJ. 2003. New castle disease. In Saif YM, Barners HJ, Glisson JR, Padley AM, McDougald LR (Ed). *Diseases of Poultry*. 11th ed. Ames Iowa: Blackwell Pub. Pp 64-87
- Ali A, Reynold DL. 2000. A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assay for Newcastle disease virus and avian pneumovirus (Colorado strain). *Avian Dis* 44: 938-943
- Aradaib IE, Schore CE, Cullor JS, Osburn BI. 1998. A nested PCR for detection of North American Isolates of bluetongue virus based on NS1 genome sequence analysis of BTV-17. *Vet Microbiol* 59: 99-108
- De Leeuw, Ben Peeters. 1999. Complete sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol* 80: 131-136
- Dimogo E, Halland JJ. 1997. RNA virus mutation and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 51: 151-178
- Horvath CM, Paterson RG, Shaughnessy MA, Wood R, Lamb RA. 1992. Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: Factors influencing formation of syncytia. *J Gen Virol* 66: 4564-4569
- Jestin V, Jestin A. 1991. Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by invitro enzymatic amplification (PCR). *Arch Virol* 118: 151-161
- Mahatmi H, Setiyono A, Soejoedono RD, Pasaribu FH. 2007. Deteksi *Coxiella burnettii* Penyebab Q fever pada Sapi, Domba, Kambing di Bogor dan Bali. *J Vet* 8: 180-187
- Marrangon S, Busani L. 2006. The use of vaccination in poultry production. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 26: 265-274
- Reitter JN, Sergel T, Morrison TG. 1995. Mutational analysis of the Leucine Zipper motif in the Newcastle disease virus fusion protein. *J Virol* 69: 5995-6004
- Romer-Oberdorfer A, Werner O, Veits J, Mebatsion T, Mettenleiter TC. 2003. Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J Gen Virol* 84: 3121-3129
- Qin Z, Sun L, Ma B, Cui Z, Zhu Y, Katamura Y, Liu W. 2007. F gene recombination between genotype II and VII newcastle disease virus. *Virus Res* 131: 299-303
- Sigh K, Jildal N, Gupta SL, Gupta AK, Mittal D. 2005. Detection of Newcastle disease virus genome from field outbreaks in poultry by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Int J Poultry Sci* 4: 472-475
- Smientanka K, Minta Z, Domanska-Blicharz K. 2006. Detection of Newcastle disease virus in infected chicken embryos and chicken tissues by RT-PCR. *Bull Vet Pulawy* 50: 3-7
- Wambura PN. 2006^a. Impregnation and storage of Newcastle disease virus on to filter papers and detection of viral RNA by single tube RT-PCR assay. *African J Biotech* 5: 21-24
- Wambura PN. 2006^b. Use of virus suspension without RNA extraction as PCR template for detection of Newcastle disease virus. *African J Biotech* 5: 1722-1724
- Zou J, Shun SH, Yen NT, Gong ZX. 2005. Complete genome sequence and biological characterization of a novel goose paramyxovirus SF02 isolated in China. *Virus Gene* 30: 13-21.