

Karakteristik Molekuler Virus *Avian Orthoavulavirus 1* Genotipe VII yang Diisolasi dari Tabanan Bali

(*MOLECULAR CHARACTERISTIC OF AVIAN ORTHOAVULAVIRUS 1 GENOTYPE VII ISOLATED FROM TABANAN BALI*)

Anak Agung Ayu Mirah Adi^{1*}, Nyoman Mantik Astawa²
I Nengah Wandia³, I Gusti Agung Arta Putra⁴, Ida Bagus Oka Winaya¹,
Anak Agung Keswari Krisnandika⁵, Anak Agung Gede Oka Wijaya⁶

¹Laboratory of Veterinary Pathology, ²Laboratory of Veterinary Virology, ³Laboratory of Veterinary Anatomy, ⁶Undergraduate student,

Faculty of Veterinary Medicine,

⁴Laboratory of Anatomy and Physiology

Faculty of Animal Husbandry,

⁵Faculty of Agriculture Udayana University,

Jln. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali 80232, Indonesia.

*Email: aaa_mirahadi@unud.ac.id

Abstrak

Penyakit tetelo atau Newacastle disease (ND) merupakan salah satu penyakit unggas yang sangat merugikan, endemis di Indonesia dan berbagai belahan dunia. Penyebabnya adalah virus ND atau Avian orthoavulavirus 1 (AOAV-1). Virus ini merupakan virus RNA yang luas variasi genetiknya. Berdasarkan panjang genomnya dapat diklasifikasikan menjadi AOAV-1 Kelas I dan Kelas II. Virus kelas I umumnya avirulen sedangkan Kelas II ada yang virulen dan avirulen, saat ini sudah ada 18 genotipe virus kelas II. Untuk mengetahui karakteristik molekuler AOAV-1 yang saat ini beredar di lapangan, maka dilakukan isolasi dan identifikasi virus dari ayam petelur yang mati diduga karena penyakit tetelo dari daerah Tabanan Bali pada tahun 2017. Virus yang berhasil diisolasi selanjutnya disebut Tabanan 1/ARP/2017. Reaksi RT-PCR satu tahap dilakukan untuk mengamplifikasi fragmen gen NP, F dan HN dari virus dengan menggunakan tiga pasang primer spesifik AOAV-1. Sekuen nukleotida yang didapat kemudian digunakan dalam analisis filogenetik. Untuk analisis filogenetik beberapa strain AOAV-1 dari kelas II perwakilan genotipe I–VII serta satu strain dari Kelas I diakses dari GenBank. Dari analisis sekuen nukleotida gen F didapatkan bahwa Tabanan 1/ARP/2017 merupakan virus genotipe VII dengan urutan asam amino pada situs pembelahan protein F-nya adalah ¹¹²R-R-Q-K-R-F¹¹⁷, tipikal strain virulen. Analisis filogenetik menggunakan sekuen nukleotida gen NP dan HN juga memosisikan isolat ini pada genotipe VII. Pada tingkat nukleotida jarak genetik dengan isolat virulen yang diisolasi tahun 2007 dan 2010 adalah 8,26% dan 1,08% sedangkan di tingkat asam amino adalah 5,26 % dan 0,64%. Pada protein F ditemukan mutasi pada asam amino diposisi 107 dan 108.

Kata-kata kunci: AOAV-1; mutasi; RT-PCR, tetelo

Abstract

Newcastle disease (ND) is a very harmful avian disease, endemic in Indonesia and various parts of the world. The causative agent is ND virus or Avian orthoavulavirus 1 (AOAV-1). This virus is an RNA virus with wide genetic variation. Based on the genome length, it can be classified into AOAV-1 Class I and II. Class I are generally avirulent whereas Class II are consist of both virulent and avirulent viruses, currently there are 18 genotypes of the class II. To find out the molecular characteristics of AOAV-1 currently circulating in the field, isolation and identification of viruses from laying hens that was suspected ND from Tabanan Bali in 2017, was performed. The isolated viruses hereafter named as Tabanan1/ARP / 2017. A one-step RT-PCR reaction was carried out to amplify NP, F and HN gene fragments from the virus using three specific pairs of AOAV-1 primers. The obtained nucleotide sequences are then used in phylogenetic analysis. For phylogenetic analysis several strains of AOAV-1 from class II representing genotype I-VII as well as one strain from Class I were accessed from GenBank. From the analysis of the F

gene nucleotide sequences, it was found that Tabanan 1 / ARP / 2017 is a genotype VII virus with an amino acid sequence at the F protein cleavage site is ¹¹²R-R-Q-K-R-F¹¹⁷, a typical virulent strain. Phylogenetic analysis using nucleotide sequences NP and HN genes also positioned this isolate in genotype VII. At the nucleotide level, genetic distance with virulent isolates that was isolated in 2007 and 2010 were 8.26% and 1.08% while at the amino acid level were 5.26% and 0.64%. There were found mutations in amino acids at positions 107 and 108 of F protein.

Key words: AOA-1; mutation; ND; RT-PCR

PENDAHULUAN

Penyakit tetelo yang dikenal dengan nama *Newcastle Disease* (ND) endemis di Indonesia dan berbagai belahan dunia, penyakit ini disebabkan oleh virus ND atau disebut juga *Avian orthoavulavirus 1* (AOAV-1). Virus ND dulunya dikenal sebagai *avian avulavirus 1* juga umum disebut sebagai *avian paramyxovirus 1* (APMV-1) namun saat ini berdasarkan taksonomi terbaru virus ini disebut sebagai AOA-1 (Amarasinghe *et al.*, 2019), yang termasuk dalam genus *orthoavulavirus* sub family *avulavirinae* dan famili *Paramyxo-viridae*.

Virus ini sangat luas variasi genetiknya, berdasarkan panjang genom dapat diklasifikasikan menjadi dua kelas yakni kelas I yang memiliki panjang genom 15.198 dan kelas II memiliki panjang genom 15.186 dan 15.192. Kelas I umumnya merupakan virus avirulen yang ditemukan pada unggas liar, kelas II terdiri dari virus virulen dan avirulen yang dapat ditemukan pada unggas liar maupun domestik (Kabilov *et al.*, 2016). Virus ND atau AOA-1 merupakan virus RNA yang mempunyai genom berserat tunggal (*single stranded*) dengan polaritas negatif, serta beramplop dengan genom yang mengkode 6 protein struktural yakni: *nucleoprotein (NP)*, *phosphoprotein (P)*, *matrix protein (M)*, *fusion protein (F)*, *hemagglutinin-neuraminidase (HN)* dan *large polymerase protein (L)* (Lamb dan Parks, 2007). Berdasarkan karakteristik urutan nukelotida (nt) gen F Sampai saat ini ada 18 genotipe virus AOA-1 kelas II namun hanya genotipe VII yang dominan bersirkulasi di berbagai belahan dunia (Miller *et al.*, 2009), termasuk Bali-Indonesia (Adi *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2012).

Protein F dan HN terdapat pada amplop dan 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 AOA-1 dan protein F dan 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 (de Leeuw *et al.*, 2003; Reitter *et al.*, 1995). Protein F dan HN merupakan dua protein penting penentu keaganasan (Panda *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2017), protein NP memiliki sifat imunogenisitas sangat tinggi sehingga digunakan sebagai antigen untuk uji serologik (Fan *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2014; Gaikwad *et al.*, 2019). Mengingat pentingnya fungsi protein NP, F dan HN tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik molekuler dari isolat NDV/Tabanan-1/2017, dengan menganalisis sekuen gen NP, F dan HN. Sehingga didapatkan isolat yang nantinya dapat digunakan untuk rujukan penelitian lebih lanjut.

METODE PENELITIAN

Koleksi Sampel, Isolasi dan Propagasi Virus

Sampel jaringan otak, paru-paru, proventrikulus, usus halus, limpa dan organ reproduksi diambil dari ayam yang mati diduga akibat penyakit ND pada sebuah peternakan ayam petelur di Tabanan Bali. Sebelum mati ayam menunjukkan gejala klinis berupa torticollis, gangguan pernapasan, diare dan penurunan produksi telur. Morbiditas dan mortalitas 20% dan 18%. Sampel jaringan diproses lebih lanjut sesuai dengan protokol standar untuk isolasi dan propagasi dan identifikasi virus ND (OIE, 2018). *Ribonucleic acid* (RNA) virus diisolasi dari cairan allantois.

Isolasi RNA Virus dan Reaksi Transkripsi Balik (RT-PCR)

Asam inti (RNA) virus AOA-1 diekstrak dari cairan alantois, dengan metode Trizol dengan tahapan sebagai berikut: cairan allantois ditambahkan Trizol dengan perbandingan 1:3,

campuran didiamkan pada suhu kamar selama 5 menit, kemudian ditambahkan 200 µl kloroform, setelah divorteks, didiamkan selama 15 menit dilanjutkan dengan pemusingan selama 15 menit pada 14.000 rpm dan bagian supernatannya diambil. Cairan supernatan selanjutnya ditambahkan 500 µl isoprofil alkohol dan kembali didiamkan selama 10 menit. Campuran kembali dipusing dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dan supernatannya dibuang. Pelet kemudian dicuci dengan 1.000 µl alkohol 70%, dan dipusing dengan kecepatan 7.500 rpm. Supernatan dibuang, RNA dikeringkan dan disuspensikan dalam akuades yang bebas dari enzim RNase (*diethyl pyro carbonat treated water*) (Adi *et al.*, 2010; Adi *et al.*, 2011). Reaksi transkripsi balik satu tahap (*One step RT-PCR*), untuk mengubah RNA virus menjadi cDNA dilaksanakan dengan SuperScriptTM III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Adapun komposisi reaksi RT-PCR, sebagai berikut: R-mix (dNTP, MgSO4 dan bufer) 5 µL, primer depan dan primer belakang 0,6 µL, SuperScriptTM III One-Step RT-PCR System with Platinum® Tag DNA Polymerase (Invitrogen) 0,25 µl, aquabides 2,55 µl dan virus RNA 1 µL. Siklus reaksi pada mesin *thermocycler* seperti yang dilakukan sebelumnya oleh Putra *et al.*, (2016). Adapun primer yang

digunakan adalah tiga pasang primer spesifik AOA-1, yakni S 5'-¹⁰⁰¹atgaagcagctcatgcgtt¹⁰²⁰-3' dan R5'-¹⁵⁸⁰agtcggtgtcg ttatcttgg¹⁵⁶¹-3' yang digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen NP (Adi *et al.*, 2011), S5'-⁴⁴⁹⁶acacgggtagaaga gtccggac⁴⁵¹⁷-3' dan R5'-⁵⁵⁵⁶cagtatgaggtgtcaa gctctt⁵⁵³⁵-3' digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen F. Sementara itu untuk mengamplifikasi fragmen gen HN digunakan primer S5'-⁶⁹⁹⁹cagagatcactcacattcat⁷⁰¹⁸-3' dan R 5'-⁷⁵⁶⁰gcctaaggatgttgacact⁷⁵⁴¹-3'. Produk RT-PCR yang didapat selanjutnya dicampur dengan *loading dye*, kemudian dielektroforesis pada *agarose 2%* selama 25 menit dengan running buffer TAE (*Tris Asetic EDTA*) satu kali, kemudian divisualisasikan dengan larutan *ethidium bromide* (0,5 mg/mL)

Sekuensing dan Analisis Filogenetik

Produk PCR dikirim ke Macrogen Korea untuk dimurnikan dan sekaligus disekuensing dari dua arah (arah depan dan belakang). Sekuen kemudian disejajarkan dan dianalisis dengan BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Analisis filogenetik berdasarkan sekuen nukleotida yang diperoleh dengan menjajarkan dengan sekuen nukleotida gen NP, F dan HN representasi NDV strain virulen dan avirulen dari genotipe I dan II serta menggunakan outgroup isolat AOA-1 dari kelas I (Tabel 1) yang diakses dari *gene*

Tabel 1. Isolat AOA-1 perwakilan genotipe I-VII pada kelas II dan satu *outgroup* dari kelas I yang digunakan dalam analisis filogenetik.

No	Isolat	No asesi Gen Bank	G	No	Isolat	No asesi Gen Bank	G
1	DER49	DQ097393	*	20	KBNP-4152	DQ 839397	VII
2	Ulster/67	AY562991	I	21	JX2/99	AF458014	VII
3	Aust/98-1252	AY935493	I	22	SWS/03	DQ227254	VII
4	Aust/98-1154	AY935491	I	23	YG/03	DQ858357	VII
5	Aust/98-1254	AY935494	I	24	SRZ03	EU167540	VII
6	Australia/I-2	AY935500	I	25	NA-1	DQ659677	VII
7	B1/47	AF309418	II	26	Guangxi11/03	DQ485231	VII
8	Texas GB/48	GU978777	II	27	SGM/01	DQ227248	VII
9	LaSota/46	AF077761	II	28	SF/02	DQ363535	VII
10	JS9/05/Go	FJ430160	III	29	Sterna/01	AY865652	VII
11	Mukteswar	EF201805	III	30	Sweden/97	AY865652	VII
12	Italien/44	EU293914	IV	31	Banjarmasin 010/10	HQ697254	VII
13	Herts/33	AY741404	IV	32	Cockatoo/90	AB605247	VII
14	Anhinga	EF065682	V	33	Gianyar 013/10	HQ697257	VII
15	US(CA)211472/02	AY562987	V	34	Kudus 017/10	HQ697259	VII
16	US/Largo/71	AY562990	VI	35	Kudus 018/10	HQ697260	VII
17	Dove/2736/00	AY562989	VI	36	Sragen 014/10	HQ697258)	VII
18	IT-227/82	AJ880277	VI	37	Sukeredjo 09/10	HQ697255	VII
19	Fontana/72	AY562988	VI	38	Bali 1/07	AB605247	VII

Keterangan : G = Genotipe, * *outgroup*.

Bank. Urutan nukleotida dijajarkan dengan metode Clustal W. Jarak evolusioner dihitung menggunakan *Model the Maximum Composite Likelihood*, pohon filogenetik dikonstruksi dengan metode *neighbor-joining* dengan 1000 *bootstrap* menggunakan perangkat lunak MEGA 7.0. (Kumar *et al.*, 2016). Urutan nukleotida fragmen gen F diterjemahkan ke urutan asam amino untuk menentukan patotipe virus secara molekuler.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dan identifikasi virus dari organ ayam yang mati dengan gejala tetelo yang berasal dari peternakan ayam di Tabanan–Bali, adalah virus AOAV 1 yang kemudian diberi nama Tabanan 1/ARP/2017, karena diisolasi pada tahun 2017 dari ayam ras petelur (ARP). Susunan nukleotida ketiga fragmen gen yang diteliti sudah didaftarkan pada GenBank dengan no assesasi berturut turut sebagai berikut: NP (MH215999), F (MH215997) dan HN (MH215998).

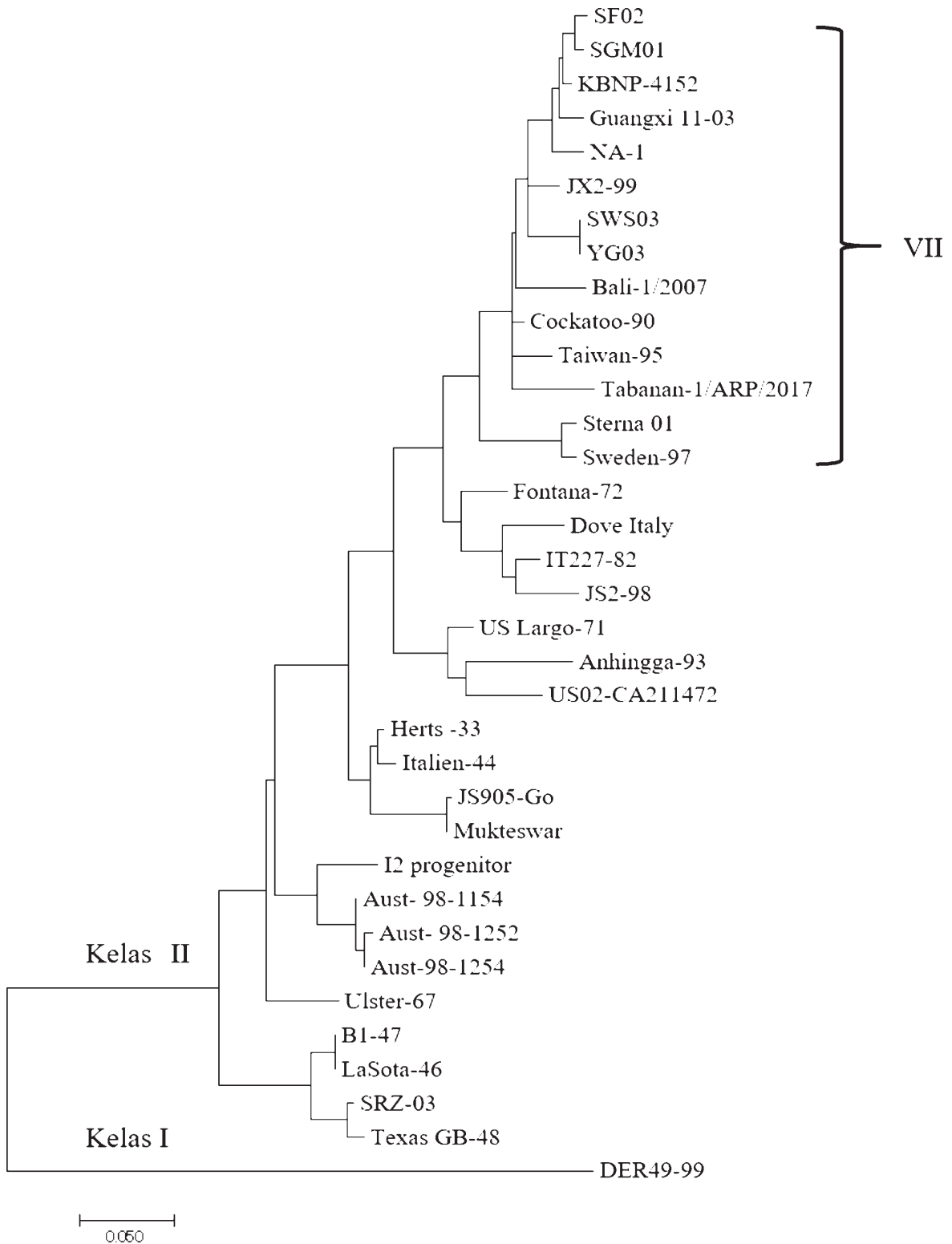
Dari hasil analisis filogenetik didapatkan bahwa isolat Tabanan 1/ARP/17 berada dalam satu *clade* dengan isolat sejenis yang diisolasi dari berbagai negara pada tahun tahun sebelumnya (Gambar 1) sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat ini termasuk dalam genotipe VII. Virus AOAV-1 genotipe VII merupakan genotip yang paling dominan penyebarannya di seluruh dunia termasuk Indonesia (Adi *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2012)

Virus ND genotipe VII semuanya adalah virus virulen, berbeda halnya dengan virus yang tergolong kedalam genotipe II, walaupun sama sama dalam satu genotipe namun virulensinya bisa berbeda, seperti virus LaSota yang merupakan virus avirulen dan Texas GB merupakan virus yang virulen. Secara molekuler yang menentukan virulensi adalah susunan asam amino pada *F gen cleavage site*, virus virulen memiliki motif asam amino sebagai berikut; ¹¹²R/K-R-Q/K/R-K/R-R-F¹¹⁷ (OIE, 2018). Dari hasil analisis asam amino didapatkan bahwa Tabanan 1/ARP/17 memiliki motif asam amino *F gen cleavage site* adalah ¹¹²R-R-Q-K-R-F¹¹⁷, motif ini sejenis dengan virus virulen lainnya yang diisolasi di Indonesia pada tahun tahun sebelumnya (Gambar 2b). Dari analisis filogenetik fragmen gen F pada posisi sepanjang 469 nt, didapatkan bahwa isolat ini jarak genetiknya dengan Bali-1/07 yang diisolasi dari Karangasem

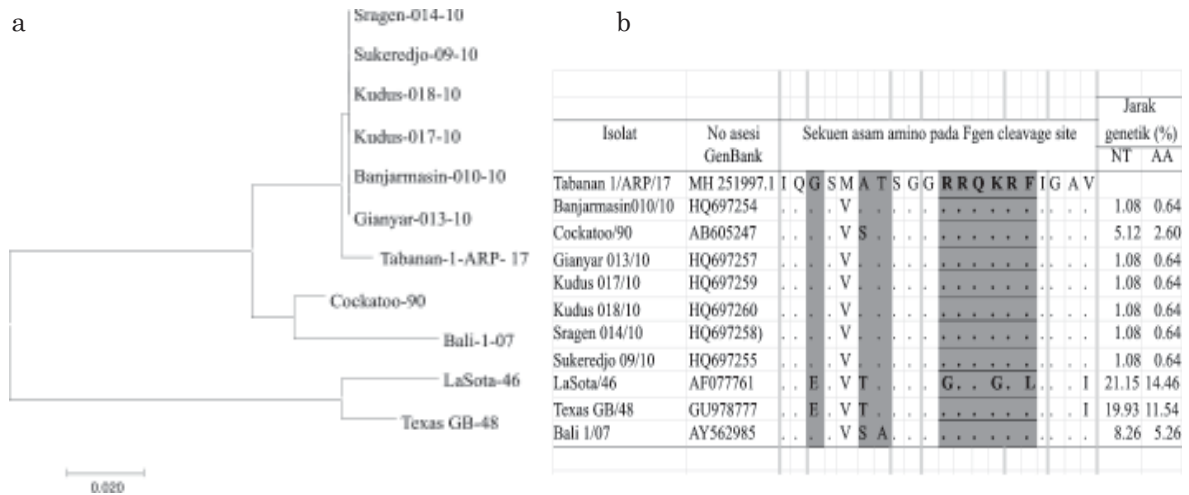
Bali 10 tahun lebih dahulu (Adi *et al.*, 2010) sebanyak 8,26% sedangkan terhadap isolat lain yang diisolasi dari beberapa wilayah di Indonesia tujuh tahun lebih dahulu oleh Xiao *et al.*, (2012) sebesar 1,08% (Gambar 2a dan 2b). Apakah perbedaan jarak genetik ini ada hubungannya dengan waktu, masih perlu diteliti lebih lanjut. Namun yang pasti adanya mutasi dua buah asam amino pada posisi 107 dan 108 erat hubungannya dengan tahun isolasi (Gambar 2b).

Jarak genetik berdasarkan susunan nukleotida secara konsisten selalu lebih tinggi dibandingkan dengan jarak genetik berdasarkan asam amino, hal ini merupakan fenomena umum akibat adanya *silent mutation* dari genom virus RNA (Duffy, 2018). Dari beberapa strain AOAV-1 yang dianalisis dalam penelitian ini (Gambar 2b) mutasi terjadi pada asam amino di posisi 107 dan 108. Pada Bali1/07 asam amino pada posisi 107 dan 108 adalah Alanine (A) dan Serine (S) sedangkan pada Tabanan 1/ARP/07 dan semua isolat Indonesia yang dianalisis (Gambar 2b) pada posisi tersebut diisi oleh asam amino A dan threonine (T). Kecepatan mutasi pada genom virus RNA yang menyebabkan cepatnya muncul genotipe baru pada virus RNA (Vignuzzi *et al.*, 2006). Adanya mutasi dua buah asam amino pada posisi 107 dan 108 erat hubungannya dengan tahun isolasi (Gambar 2b) nampaknya juga memperkuat dugaan munculnya genotipe baru akibat mutasi genom.

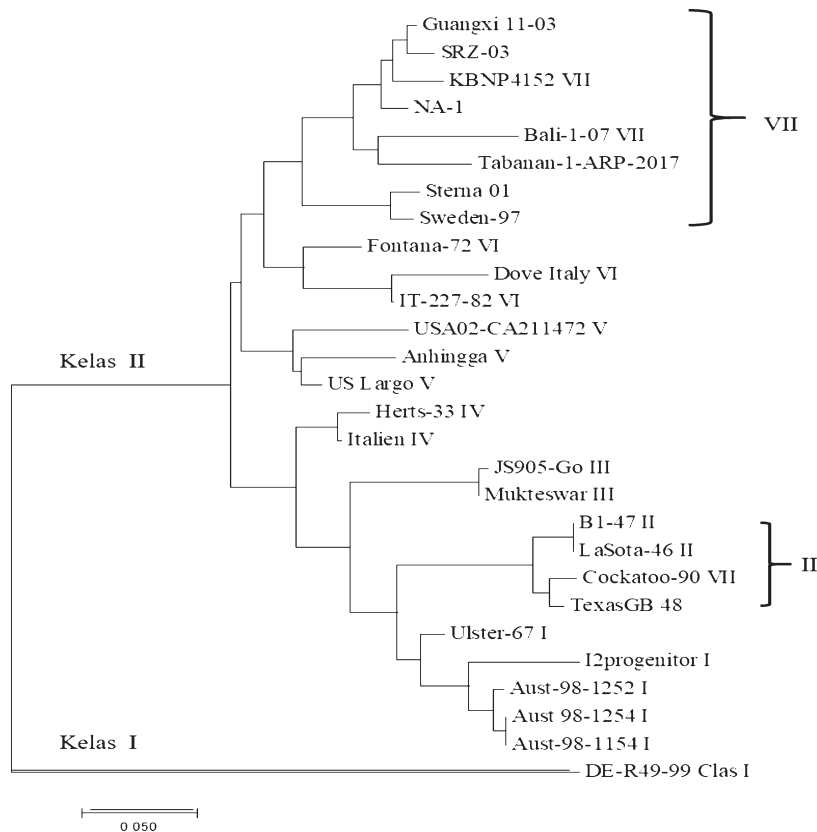
Pohon filogenetik dengan menggunakan sekuen nukleotida fragmen gen F, NP dan HN dari Tabanan 1/ARP/17, tetap memposisikan isolat ini di genotipe VII pada kelas II (Gambar 1, 3 dan 4) ini menandakan bahwa tidak ada rekombinasi dari gen isolat Tabanan 1/ARP/2017 sepanjang fragmen gen yang dianalisis. Berbeda halnya dengan Cockatoo/90, pada analisis gen NP satu *sub clade* dengan isolate genotipe II (Gambar 1). Walaupun isolate Cockatoo/90 ini tergolong kedalam genotipe VII dan bersifat virulen dg *F gene cleavage site* motif virulen (Gambar 2 a dan 2b). Rupanya pergeseran dari *subclade* ini akibat ada rekombinasi alami pada gen NP dari isolate Cockatoo/90. Beberapa kejadian rekombinasi gen secara alami umum ditemukan (Chong *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010), dari analisis sekuen beberapa isolat dunia yang digunakan dalam analisis filogenetik selain ditemukan rekombinan pada gen NP dari Cockatoo/90 juga ditemukan rekombinasi pada SRZ03, yakni pada gen F nya, dimana pada analisis filogenetik virus ini menjadi genotipe II (Gambar 3) .



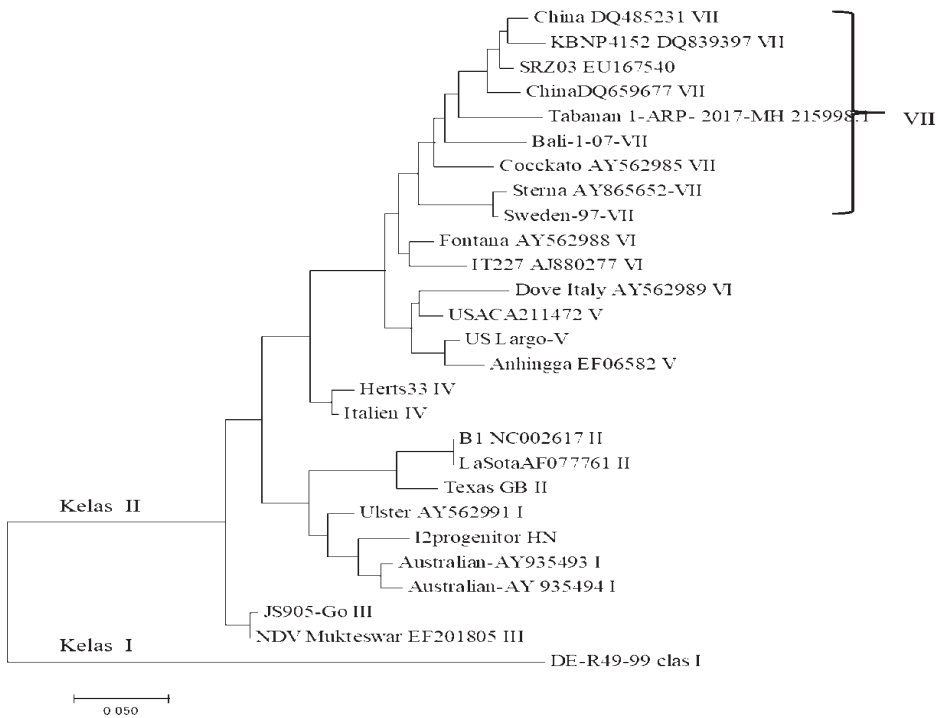
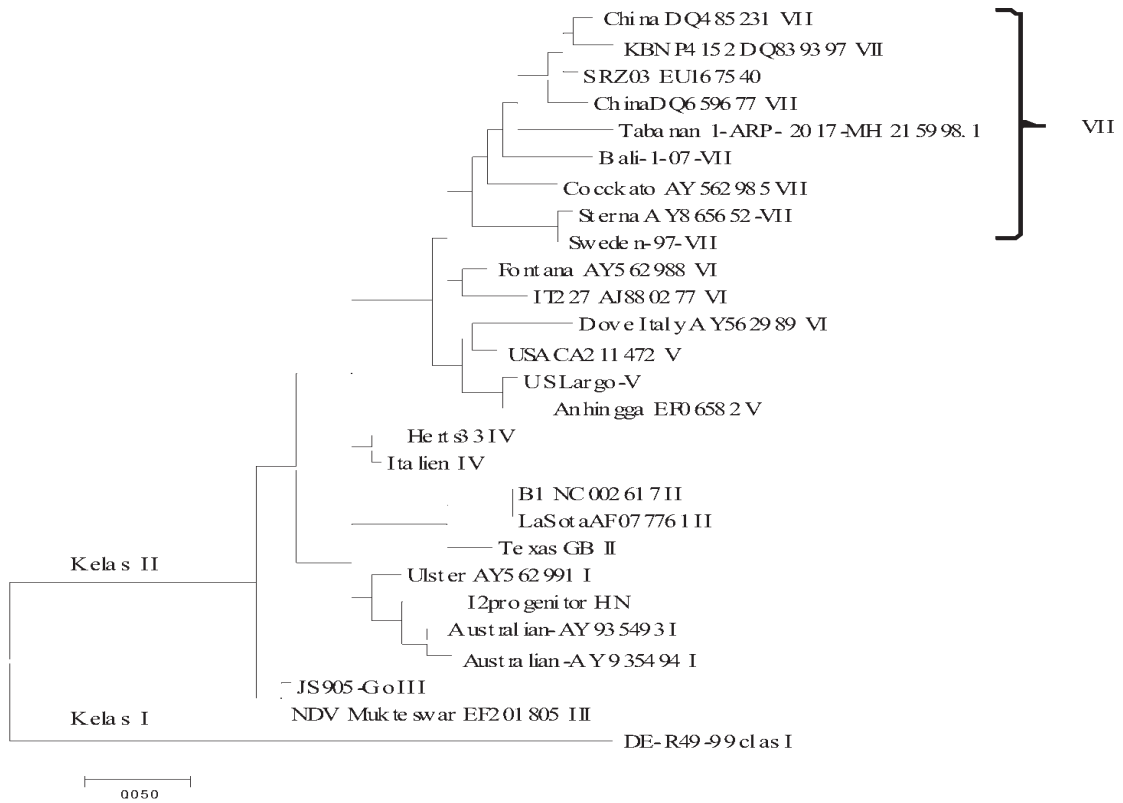
Gambar 1: Pohon filogenetik isolat Tabanan 1-/ARP/ 2017 dengan perwakilan NDV kelas I dan kelas II, membuktikan isolat ini tergolong kedalam genotipe VII. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen parsial gen F (469 nt). Analisis dilakukan menggunakan metode *Maximum Composite Likelihood* di MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) dengan 1.000 *bootstraps*.



Gambar 2a. Pohon filogenetik isolat Tabanan 1/ARP/2017 berdasarkan sequeen nukleotida gen F (469 nt) dibandingkan dengan isolat virulen genotype VII asal Indonesia. Analisis dengan metode *the Maximum Composite Likelihood* pada MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) dengan 1.000 *bootstraps*.
 Gambar 2b. Motif asam amino pada *F gen cleavage site* isolat Tabanan 1/ARP/17 adalah ¹¹²R-R-Q-K-R-F¹¹⁷. Jarak genetik berdasarkan susunan nukleotida lebih tinggi dibandingkan dengan berdasarkan asam amino. *Keterangan : -Tanda titik (dot), mengindikasikan asam amino tersebut sama dengan asam amino di atasnya



Gambar 3: Hubungan filogenetik Tabanan 1/ARP/2017 dengan perwakilan NDV Kelas I dan Kelas II berdasarkan gen NP(507 nt). Sejarah evolusi disimpulkan menggunakan metode *Neighbor-Joining*. Analisis menggunakan metode *Maximum Composite Likelihood* di MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) dengan 1.000 *bootstraps*.



Gambar 4: Hubungan filogenetik Tabanan 1/ARP/2017 berdasarkan fragmen gen HN (507nt) dengan perwakilan AOA 1 Kelas I dan Kelas II. Sejarah evolusi disimpulkan menggunakan metode *Neighbor-Joining*. Analisis dilakukan menggunakan metode *Maximum Composite Likelihood* di MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) dengan 1.000 *bootstraps*

Pola pengelompokan *filogenetic tree* berdasarkan sequen NP, F dan HN selalu menempatkan Tabanan 1/ARP/2017 di posisi genotipe VII pada kelas II dan (Gambar 1, 3 dan 4). Walaupun pengelompokan genotipe umumnya menggunakan sequen gen F, namun dengan adanya insidensi rekombinasi gen antar genotipe (Chong *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2010), maka konfirmasi genotipe dengan membuat analisis filogenetik menggunakan fragmen gen selain gen F nampaknya diperlukan. Genotipe VII adalah salah satu genotipe yang secara global tersebar luas jika dibandingkan dengan genotipe XI, XIII, XIV, XVI, XVII, dan XVIII (Dimitrov *et al.*, 2016). Genotipe VII pertama kali diisolasi pada awal 1990-an di Italia, Spanyol, Belanda, Belgia dan Jerman, strain virus tersebut juga secara genetis paling mirip dengan virus NDV dari Indonesia pada akhir 1980-an (Lomniczi *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2012).

Isolat Tabanan 1/ARP/2017 diisolasi dari ayam petelur yang menunjukkan gejala klinis pernafasan, pencernaan dan penurunan produksi telur. Uji biologis pada pada embrio menunjukkan perubahan nekrosis yang parah pada usus halus dan paru, serta gangguan sirkulasi pada berbagai organ. Pada kondisi laboratorium antibodi yang muncul pasca vaksinasi dengan vaksin LaSota hidup dapat mencegah ayam terinfeksi virus ini (Adi *et al.*, 2019). Hal ini sejalan dengan laporan dari peneliti sebelumnya yang menyatakan bahwa program vaksinasi menggunakan vaksin asal virus Genotipe II yang tepat sebenarnya secara umum efektif untuk mengatasi infeksi virus lapang dari genotipe VII (Martinez *et al.*, 2018).

SIMPULAN

Virus AOAV-1 yang diisolasi dari ayam petelur di daerah Tabanan Bali, kemudian disebut sebagai isolat Tabanan 1/ARP/17 merupakan strain virulen dari genotipe VII dengan motif asam amino ¹¹²R-R-Q-K-R-F¹¹⁷. Pada tingkat nukleotida jarak genetik dengan isolat virulen yang diisolasi tahun 2007 dan 2010 adalah 8,26% dan 1,08% sedangkan di tingkat asam amino adalah 5,26 % dan 0,64%. Pada protein F ditemukan mutasi pada asam amino di posisi 107 dan 108. Tidak ditemukan rekombinasi gen sepanjang sekuen gen NP, F dan HN yang dianalisis.

SARAN

Evaluasi karakteristik molekuler virus AOAV-1 yang beredar di lapangan secara berkala perlu dilakukan untuk mengantisipasi munculnya strain yang tidak dapat dinetralisir oleh vaksin yang ada saat ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini sebagian didanai oleh Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana melalui pendanaan Penelitian Grup Riset Udayana (PGRU) dengan nomor kontrak:1214 / UN14.2.9 / LT / 2019 tanggal 02 Mei 2019. Oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih kepada jajaran pimpinan FKH, LPPM dan UNUD.

DAFTAR PUSTAKA

- Adi AAAM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi Y, Matsutomo Y. 2010. Isolation and Characterization of Pathogenic Newcastle disease virus from a Nature Case in Indonesia. *J Vet Med Sci* 72(3): 313-319.
- Adi AAAM, Kardena IM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi Y, Matsutomo Y. 2011. Cloning, sequencing and phylogenetic analysis of Nucleocapsid Protein gene of NDV Bali-1/07(Indonesian). *J Veteriner* 12(3): 173-179
- Adi AAAM, Astawa I NM, Putra IGAA. 2019. The efficacy of BEI-inactivated vaccines of Gianyar-1/AK/2014 virulent strain in protecting chickens against Tabanan-1/ARP/2017 virulent NDV isolate. *Vet World* 12(6): 758-764.
- Amarasinghe GK, Ayllón MA, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Blasdel KR, Briese T, Brown PA, Bukreyev A, Balkema-Buschmann A. 2019. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. *Arch Virol* 164(7): 1967–1980.
- Chong YL, Pandhi A, Hudson PJ, Poss M. 2010. The effect of vaccination on the evolution dynamics of avian paramyxovirus-1. *PLoS Pathog* 6(4): e1000872. doi:10.1371/journal.ppat.1000872.
- de Leeuw OS, Hartog L, Koch G, Peeters, B. 2003. Effect of fusion protein cleavage site

- mutations on virulence of Newcastle disease virus: non-virulent cleavage site mutants revert to virulence after one passage in chicken brain. *J Gen Virol* 84: 475-484.
- Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL. 2016. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infect Genet Evol* 39: 22–34.
- Duffy S. 2018. Why are RNA virus mutation rates so damn high?. *PLoS Biol.* 16(8):e3000003. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000003>
- Fan W, Xu Y, Zhang P, Chen P, Zhu Y, Cheng Z, Zhao X, Liu Y, Liu J. 2017. Analysis of molecular evolution of nucleocapsid protein in Newcastle disease virus. *Oncotarget* 8(57): 97127-97136. doi: 10.18632/oncotarget.21373.
- Gaikwad SS, Lee HJ, Kim JY, Choi KS. 2019. Expression and serological application of recombinant epitope-repeat protein carrying an immunodominant epitope of Newcastle disease virus nucleoprotein. *Clin Exp Vaccine Res*: 27-34. doi: 10.7774/cevr.2019.8.1.27.
- 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.
- Jin JH, Cheng JL, He ZR, Ren YC, Yu XH, Song Y, Yang HM, Yang YL, Liu T, Zhang GZ. 2017. Different Origins of Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein Modulate the Replication Efficiency and Pathogenicity of the Virus. *Front Microbiol* 23(8): 1607. doi: 10.3389/fmicb.2017.01607.
- Kabilov MR, Alikina TY, Yurchenko KS, Glushchenko AV, Gunbin KV, Shestopalov AM, Gubanov NV. 2016. Complete genome sequences of two Newcastle disease virus strains isolated from a wild duck and a pigeon in Russia. *Genome Announc* 4: e01348–16. doi 10.1128/genomeA.01348-16.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. for bigger datasets. *Mol Biol Evolution* 33: 1870-1874.
- Lamb RA, Parks GD. 2007. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology* 5. Philadelphia: Wolters Kluwer-Lippincott Williams & Wilkins. Hlm. 1449–1496.
- Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, Ballagi-Pordany A, Kaleta EF, Werner O, Meulemans G, Jorgensen OH, Mante AP, Gielkens ALJ, Capua I Damoser J. 1998. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch Virol* 143: 49-64.
- Martinez JCS, Chou WK, Berghman LR, Carey JB. 2018. Evaluation of the effect of live LaSota Newcastle disease virus vaccine as primary immunization on immune development in broilers. *Poult Sci* 97: 455–462.
- Miller PJ, Kim LM, Ip HS, Afonso CL. 2009. Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. *Virology* 391: 64-72. doi: 10.1016/j.virol.2009.05.033
- OIE (Organization of International Epizootic). 2018. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial Animals: Newcastle disease (Infection with Newcastle disease virus). Ch. 3.3.14. Office International des Epizooties, Paris. P964-983. Available at https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf. Last accessed on 09-05-2019
- 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.
- Panda A, Huang Z, Elankumaran S, Rockemann DD, Samal SK. 2004. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microb Pathog* 36: 1–10.
- Putra IGAA, Adi AAAM, Astawa INM. 2016. Variasi Genetik Gen Penyandi Protein Fusi dari Avian Paramyxovirus Tipe I di Bali. *J Veteriner* 17(2) : 211-217.
- Silva KR, Goncalves MC, Oliveira ES, Fernando FS, Montassier MD, Fernandes CC, Tamanine MD, Borzi MM, Santos RM, Mendonca AD, Reischak D, Paulillo AC,

- Montassier HJ. 2014. Cloning and Expression of the Nucleoprotein Gene (NP) of Newcastle Disease Virus (NDV) in *Escherichia coli* for Immunodiagnosis Application. *Int J Poult Sci* 13: 473–479.
- Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature*. 439(7074): 344–348.
- Xiao S, Paldurai A, Nayak B, Samuel A, Bharoto EE, Prajitno TY, Collins PL, Samal SK. 2012. Complete genome sequences of Newcastle disease virus strains circulating in chicken populations of Indonesia. *J Virol* 86 (10): 5969-5970. doi: 10.1128/JVI.00546-12.
- Zhang R, Wang X, Su J, Zhao J, Zhang G. 2010. Isolation and analysis of two naturally-occurring multi-recombination Newcastle disease viruses in China. *Virus Res* 151: 45-53.