

Amplifikasi Gen Penyandi Protein Fusion Virus Tetelo dari Spesimen Lapangan dengan Metode *OneStep* RT-PCR.

*(AMPLIFICATION OF FUSION PROTEIN ENCODING GENE OF NEWCASTLE DISEASE
VIRUS FROM FIELD SPECIMENS BY ONESTEP RT-PCR METHOD)*

**Aris Haryanto¹, David Kristiawan¹,
Sri Handayani Irianingsih², Dini Wahyu Yudianingtyas³**

¹Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
Jln. Fauna 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281.
Telp. 0274-560865, Email: arisharyanto@yahoo.com

²Laboratorium Virologi dan Serologi,
Balai Besar Veteriner Wates, Yogyakarta.

³Laboratorium Virologi dan Bioteknologi,
Balai Besar Veteriner Maros, Sulawesi Selatan.

ABSTRAK

Virus tetelo atau *Newcastle Disease* (ND) termasuk dalam famili *Paramyxoviridae* yang mempunyai genom RNA beruntai tunggal dan merupakan virus beramplop. Pada amplop virus tetelo terdapat dua protein utama, yaitu protein *Haemagglutinin/ Neuraminidase* (H/N) dan protein *Fusion* (F). Metode diagnosis molekuler berbasis *OneStep* RT-PCR merupakan metode diagnosis yang umum digunakan untuk mendiagnosis penyakit tetelo pada unggas. Pada penelitian ini diagnosis penyakit tetelo dilakukan dengan mengamplifikasi gen penyandi protein F virus tetelo langsung dari spesimen lapangan tanpa melalui proses inokulasi dan propagasi virus tetelo pada telur ayam berembrio (TAB). Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan diagnosa cepat tetelo langsung dari spesimen lapangan berdasarkan hasil amplifikasi gen penyandi protein F dengan metode *OneStep* RT-PCR, sehingga dari hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk membantu proses identifikasi virus tetelo langsung dari spesimen lapangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 15 sampel virus yang isolasi dari *swab trachea* unggas yang secara klinis menunjukkan gejala terinfeksi virus tetelo sebanyak 12 sampel atau 80% dari sampel uji terbukti positif terinfeksi virus tetelo yang ditunjukkan dengan fragmen DNA hasil amplifikasi sebesar 362 bp. Metode *OneStep* RT-PCR merupakan metode diagnosis yang cepat dan efektif dalam mendiagnosis penyakit tetelo menggunakan spesimen lapangan.

Kata kunci: virus tetelo, gen F, spesimen lapangan, RT-PCR.

ABSTRACT

Tetelo or Newcastle Disease (ND) virus is belong to the family *Paramyxoviridae*, which has a single stranded RNA (ss RNA) genome and it has viral envelope. The viral envelope consists of two major proteins, namely *Haemagglutinin/Neuraminidase* (H/N) and *Fusion* (F) protein. Molecular diagnostic methods *OneStep* RT-PCR is a commonly diagnostic tool that used to diagnose of Tetelo in poultry. In this study the diagnosis of Tetelo is accomplished by amplification of F protein encoding gene of Tetelo virus directly from field specimens without inoculation and propagation of Tetelo virus into embryonated chicken eggs. The objective of this study is to conduct rapid diagnosis of Tetelo virus directly from the field specimens based on the amplification of the F gene by a *OneStep* RT-PCR method, so that the results of this study can be used to assist in the identification of Tetelo virus directly from the field specimens. The results showed that from the 15 samples of virus which isolated from tracheal swabs of clinical poultry showing symptoms of Tetelo virus infection, a total of 12 samples from 15 tested sampels (80%) are positive tested for Tetelo virus infection. They were indicated by the amplification product of DNA fragments in size of 362 bp. *OneStep* RT-PCR is a method for rapid and effective diagnosis which can be used to diagnose of Tetelo virus directly from field specimens.

Keywords: Tetelo virus, F gene, field specimen, RT-PCR.

PENDAHULUAN

Penyakit tetelo atau *Newcastle Disease* (ND) merupakan penyakit virus pada unggas yang disebabkan oleh *Avian Paramyxovirus* tipe 1 (APMV-1) dan merupakan serotipe dari genus *Avulavirus* yang termasuk ke dalam famili *Paramyxoviridae*. Kejadian penyakit tetelo dilaporkan pertama kali pada tahun 1926 di Jawa (Indonesia) dan Newcastle (Inggris). Pada tahun 2002, penyakit tetelo telah menyerang Negara bagian California di United State of America (USA) dan menyebabkan sekitar empat juta unggas dimusnahkan (Steneroden, 2004).

Virus penyebab penyakit tetelo termasuk dalam ordo *Mononegavirales* yang mempunyai tiga famili virus, yaitu: *Bornaviridae*, *Filoviridae*, dan *Paramyxoviridae*. Famili *Paramyxoviridae* memiliki dua subfamili yaitu *Paramyxovirinae* dan *Pneumovirinae* (Knipe dan Peter, 2007). Genom virus tetelo merupakan *single-stranded* RNA (ssRNA) dengan *negative-sense* yang terdiri dari 15.186 nukleotida. Virus tetelo termasuk dalam genus *Avulavirus* memiliki *viral envelope* dengan diameter 100-500 nm (Mayo, 2002, Samal, 2011)). Genom virus terdiri dari 6 gen yang menyandi protein nucleocapsid (NP), Phosphoprotein (P), protein Matriks (M) dan protein Fusion (F), protein Haemagglutinin-Neuraminidase (H/N) yang berfungsi untuk *attachment* dan protein polymerase besar (Large) atau L (Chambers *et al.*, 1986). Pada genom virus ini juga terdapat dua protein tambahan yaitu protein V dan W yang berasal dari gen P yang mengalami proses editing RNA (Steward *et al.*, 1993).

Virus tetelo dapat dikelompokkan menjadi lima tipe berdasarkan perubahan patologis dan gejala klinis yang ditunjukkan oleh unggas yang terinfeksi, yaitu *viscerotropic velogenic*, *neurotropic velogenic*, *mesogenic*, *lentogenic* dan *asymptomatic enteric* (OIE, 2009). Virus tetelo mempunyai dua protein utama yang terdapat pada *envelope*, yaitu protein yang berfungsi untuk *attachment* virus, yang terdiri dari protein fusi *hemagglutinin/neuramidase* dan protein *fusion* (F). *Hemagglutinin* merupakan protein untuk menempel dan mengikat reseptor pada bagian luar membran sel inang, termasuk juga pada membran luar sel darah merah. *Neuramidase* merupakan protein aktif yang merupakan enzim untuk pelepasan virus tetelo dari membran luar sel inang setelah selesai menginfeksi. Protein F pada virus tetelo berfungsi untuk proses penyatuan *envelope*

virus dengan membran sel hospes sebagai target infeksi dan replikasi virus (Grimes, 2002).

Metode diagnosis penyakit tetelo yang umum digunakan adalah dengan mengisolasi virus dari spesimen unggas yang terinfeksi pada telur ayam berembrio (TAB). Cairan allantois hasil panen selanjutnya diuji dengan *Haemagglutination Activity* (HA) dan *Haemagglutination Inhibition* (HI). Namun demikian, kedua metode tersebut membutuhkan waktu yang lama dan lambat dalam memperoleh hasil. Metode diagnosis tetelo lain yang biasa dilakukan adalah dengan *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* atau ELISA (OIE, 2009). Metode diagnosis tetelo dengan ELISA memang lebih cepat dalam memperoleh hasil, akan tetapi tingkat sensitifitas dan keakuratannya lebih rendah dari pada metode kultur virus tetelo pada TAB (Payungporn *et al.*, 2004). Sementara itu, metode diagnosis virus tetelo dengan teknik *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) pada saat ini dirasa jauh lebih baik dan lebih akurat, meskipun metode ini dilakukan melalui proses amplifikasi yang memerlukan enzim *reverse transcriptase* (RT) dan *taq polymerase*. Enzim RT merupakan enzim DNA polimerase yang menggunakan molekul RNA sebagai *template* (cetakan) untuk proses sintesis molekul *complementary DNA* (cDNA) yang komplementer dengan molekul RNA tersebut. Enzim RT yang biasa digunakan antara lain *mesophilic viral reverse transcriptase* (RTase) yang terdapat pada virus *avian myoblastosis* (AMV) maupun oleh *virus moloney murine leukemia* (M-MuLV) dan Tth DNA polymerase (Yuwono, 2006).

Virus tetelo yang termasuk dalam famili *paramyxoviridae* akan menginisiasi infeksi melalui proses penempelan (*attachment*) pada reseptor sel inangnya sehingga menyebabkan proses fusi antara membran virus dengan membran plasma sel inang. Virus tetelo menyandi dua glikoprotein transmembran yang akan membantu dalam proses infeksi melalui tahap penempelan dan proses fusi. Glikoprotein tersebut dikenal sebagai protein fusion atau protein F (Lamb dan Kolakofsky, 2001).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan diagnosis cepat penyakit tetelo yang menggunakan spesimen lapangan berdasarkan hasil amplifikasi gen penyandi protein F dengan metode *OneStep* RT-PCR. Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu proses identifikasi virus tetelo langsung dari spesimen lapangan.

METODE PENELITIAN

Bahan utama penelitian ini adalah delapan sampel ulas trachea unggas yang berasal dari pasar Terban di Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY) yang telah dikoleksi oleh Balai Besar Veteriner (BB Vet) Wates dan tujuh sampel ulas trakhea dari BB Vet Maros di Makassar Propinsi Sulawesi Selatan. Bahan penelitian yang lain adalah kit ekstraksi RNA (QIAamp Viral RNA Kit, catalog no: 52906) dan *One Step* RT-PCR Kit (QIAGEN catalog no: 210212), *RNase-free water*, gel agarose *ultrapure TM agarose 16500-100* (Invitrogen), *ultra pure 10x TAE buffer* (INVITROGEN, catalog no: 15558-042), *SYBR Safe DNA Gel Stain 533102*, *DNA Ladder*, *DNA Marker 100 Kb*, *aqudes* dan sepasang primer spesifik untuk mengamplifikasi gen penyandi protein F virus tetelo dengan urutan sekuen nukleotida seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah pinset, tabung *ependorf* steril 1,5 ml dan 0,5 ml, tip pipet ukuran 10 il, 100 il, 200 il, dan 1000 il (*Ep t.i.p.s dualfilter* dan *art molecular bioproduct*), 1 set mikropipet, rak tabung *ependorf*, cetakan gel (*tray*), sisir pembentuk sumuran (*well-forming combs*), *power supply*, *UV Transilluminator UVT-20 M*, *vortex mixer*, *spin down*, timbangan elektrik, *aluminium foil*, botol kaca, gelas beker, labu erlenmeyer 100 ml, *microwave oven*, *freezer (-20 °C)*, *masker*, sarung tangan (*latex gloves*) dan kamera digital.

Koleksi Sampel Virus Tetelo

Sampel virus tetelo dalam penelitian ini diperoleh dari isolat virus yang dikoleksi oleh BBVet Wates dan BBVet Maros pada tahun 2010. Semua sampel ulas trakhea dimasukkan ke dalam media transpor virus yang berisi glukosa 100% sebanyak 0,1 ml, *phenol red* 0,4% sebanyak 0,1 ml, *Penicillin-Streptomycin* 40.000 IUP sebanyak 2,5 ml, *Gentamycin* 50 µg/ml sebanyak 0,5 ml, *Bovine Serum* sebanyak 1 ml untuk 100 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dengan pH 7,0. Komposisi media transpor virus ini sesuai dengan yang direkomendasikan oleh

Australian Animal Health Laboratory (AAHL, 2004). Sebanyak 8 sampel virus tetelo yang digunakan merupakan koleksi BB Vet Wates (sampel nomor 1-8) dan 7 sampel virus tetelo merupakan koleksi BBVet Maros di Propinsi Sulawesi 9-15). Sampel-sampel lapangan yang digunakan pada penelitian ini secara detail disajikan pada Tabel 2.

Keseluruhan proses optimasi dan amplifikasi dengan metode RT-PCR dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Metode diagnosa *OneStep* RT-PCR ini digunakan untuk mengamplifikasi gen F virus tetelo.

Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA dari sampel lapangan dilakukan dengan menggunakan *QIAamp Viral RNA Kit* (*QIAGEN*), sesuai dengan prosedur standar yang direkomendasikan. Sebanyak 30 µL total RNA dari tiap-tiap sampel diperoleh dari hasil ekstraksi tersebut, selanjutnya digunakan sebagai *template* untuk proses amplifikasi RT-PCR.

Amplifikasi DNA secara OneStep RT-PCR pada Gen F Virus Tetelo

Primer yang digunakan dalam tahap *OneStep Simplex* RT-PCR ini adalah primer AAHL *sense* dan AAHL *antisense* dengan konsentrasi masing-masing primer sebanyak 20 pmol/µl. Komponen RT-PCR antara lain sampel RNA hasil ekstraksi isolat virus sebanyak masing-masing 10 µl, sepasang primer gen F (primer AAHL *sense* dan AAHL *antisense*) sebanyak 10 µl, dan *OneStep RT-PCR Enzyme Mix* yang mengandung *QIAGEN products Omniscript Reverse Transcriptase*, *Sensiscript Reverse Transcriptase*, dan *HotStarTaq DNA Polymerase*, serta menggunakan *QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 5x*, *dNTP Mix 10 mM*, *RNase-free wáter* dengan volume akhir 25 µl. Tahapan amplifikasi *OneStep* RT-PCR diawali dengan satu siklus *reverse transcription* pada suhu 48°C selama 30 menit dan diikuti oleh satu siklus *initial denaturation* pada suhu 95°C

Tabel 1. Sekuen nukleotida primer gen F virus tetelo (Viljoen *et al.*, 2005)

| Gene Target | Sequence Primer | P Produk PCR |
|-------------|--|--------------|
| F | AAHL sense : 5' – TTG ATG GCA GGC CTC TTG C – 3' AAHL antisense : 5' – GGA GGA TGT TGG CAG CAT T – 3' | 362 bp |

Tabel 2. Data isolat virus tetelo dari BBVet Wates dan BB Vet Maros yang digunakan pada penelitian

| No | Kode Sampel | Spesimen | Asal Sampel | Asal Hewan |
|----|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 1 | TB 06 AK | Ulas Trakea | Terban, DIY | Ayam Kampung |
| 2 | TB 07 AK | Ulas Trakea | Terban, DIY | Ayam Kampung |
| 3 | TB 08 AK | Ulas Trakea | Terban, DIY | Ayam Kampung |
| 4 | TB 09 AK | Ulas Trakea | Terban, DIY | Ayam Kampung |
| 5 | TB 10 EN | Ulas Trakea | Terban, DIY | Enthog |
| 6 | TB 13 BR | Ulas Trakea | Terban, DIY | Ayam Kampung |
| 7 | TB 21 AK | Ulas Trakea | Terban, DIY | Ayam Kampung |
| 8 | TB 22 AK | Ulas Trakea | Terban, DIY | Ayam Kampung |
| 9 | MRS 105 | Ulas Trakea | Maros Sulsel | Ayam |
| 10 | MRS 344 | Ulas Trakea | Maros Sulsel | Ayam |
| 11 | ND 353 | Ulas Trakea | Maros Sulsel | Ayam |
| 12 | ND 359 | Ulas Trakea | Maros Sulsel | Ayam |
| 13 | ND 375 | Ulas Trakea | Maros Sulsel | Ayam |
| 14 | ND 403 | Ulas Trakea | Maros Sulsel | Ayam |
| 15 | ND 514 | Ulas Trakea | Maros Sulsel | Ayam |

selama 15 menit. Tahapan amplifikasi PCR terdiri dari 30 siklus dan tiga tahapan dimulai dengan tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik diteruskan dengan tahap *annealing* pada suhu 53°C selama satu menit, dan tahap terakhir yaitu tahap *extension* pada suhu 72°C selama satu menit. Tahapan selanjutnya adalah *final extension* pada suhu 72°C selama 10 menit dan berakhir dengan proses pendinginan (*hold*) pada suhu 4°C. Produk hasil *OneStep Simplex* RT-PCR kemudian disimpan dalam *freezer* bersuhu -20°C untuk selanjutnya dipisahkan melalui tahap elektroforesis dalam gel agarose.

Elektroforesis Produk *OneStep* RT-PCR Gen F Virus Tetelo

Visualisasi produk RT-PCR dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarose 1% berdasarkan metode yang digunakan oleh Sambrook *et al.*, (1989) dengan pewarnaan menggunakan *Sbyr Safe* dan dalam buffer TAE 0,5x. Setelah semua sampel produk RT-PCR dan marker DNA *Ladder* dimasukkan dalam sumuran gel, tangki elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* dan *apparatus* elektroforesis dijalankan selama 60 menit pada tegangan listrik sebesar 50 volt. Produk RT-PCR divisualisasikan dalam kamar gelap melalui *UV Transilluminator*.

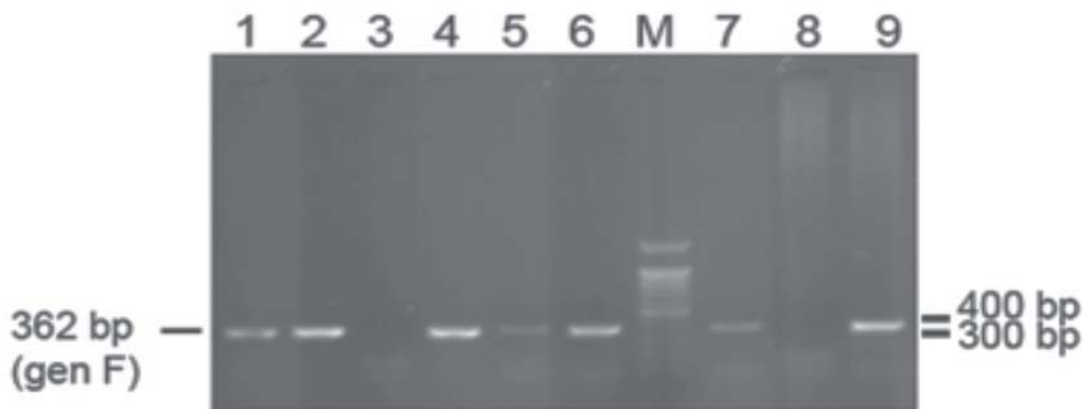
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil optimasi amplifikasi gen penyandi protein F dari delapan sampel isolat virus tetelo yang

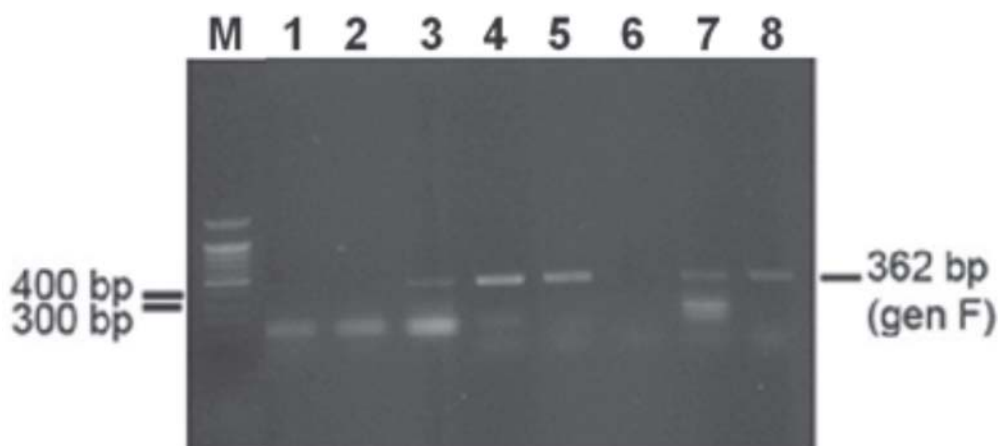
berasal dari ulas trakea unggas dari Pasar Terban DIY yang sudah dikoleksi oleh BB Vet Wates secara detail disajikan pada Gambar 1.

Berdasarkan hasil elektroforesis pada Gambar 1 dari kedelapan sampel dan 1 kontrol positif menunjukkan bahwa hasil amplifikasi gen F pada virus tetelo akan memberikan hasil positif berupa pita DNA hasil RT-PCR sebesar 362 bp yang terlihat pada sumuran no 1, 2, 4, 5, 6 dan 7, sedangkan sampel pada sumuran no 3 dan 8 menunjukkan hasil amplifikasi negatif. Hal ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Viljoen *et al.*, (2005). Hasil negatif pada sumuran no 3 dan 8 mengindikasikan bahwa sampel tersebut tidak mengandung virus tetelo. Untuk mendapatkan hasil RT-PCR yang optimal maka *template* DNA yang digunakan sebagai cetakan, sebaiknya berjumlah antara 10⁵-10⁶ molekul karena keberhasilan suatu proses PCR dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya dNTP, oligonukleotida primer, DNA *template*, komposisi larutan *buffer*, jumlah siklus reaksi, enzim yang digunakan, faktor teknis, dan non-teknis (Yuwono, 2006).

Gen F pada virus ND menyandi protein F yang berperan untuk memperantarai proses fusi antara protein virus dengan protein sel inangnya melalui inisiasi pelipatan protein yang membentuk protein prefusi metastabil trimerik yang dipicu oleh perubahan konformasi protein postfusi trimerik. Hal ini yang menyebabkan proses refolding protein F melepaskan energy pada membran fusi (Lamb dan Jardetzky, 2007). Protein F yang berperan dalam memperantarai



Gambar 1. Hasil optimasi RT-PCR gen F virus ND dari 8 sampel asal BB Vet Wates. Hasil positif ditunjukkan dengan band DNA sebesar 362 bp. Lajur 1 – 8 merupakan sampel virus ND dari spesimen lapangan, lajur 9 merupakan kontrol positif virus ND dan M merupakan marker DNA Ladder 100 bp.



Gambar 2. Hasil amplifikasi gen F virus ND asal BB Vet Maros. Hasil positif ditunjukkan dengan band DNA sebesar 362 bp. M merupakan marker DNA Ladder 100 bp, Lajur 1 – 3 dan 5-8 merupakan sampel virus ND dari spesimen lapangan, lajur 4 merupakan kontrol positif virus ND.

fusi antara amplop virus tetelo dan membran seluler sel inang disintesis sebagai protein prekursor F0. Protein ini hanya bersifat fusogenik apabila terpotong pada ikatan disulfidanya menjadi polipeptida F1 dan F2. Sebenarnya proses pemotongan tersebut tidak sepenuhnya cukup untuk menyebabkan proses fusi, akan tetapi masih diperlukan peranan protein virus yang lain dalam membantu proses fusi tersebut. Protein H/N pada virus tetelo diperlukan dalam membantu protein F untuk terjadinya proses fusi (Deng *et al.*, 1997). Konsensus sekuens daerah *cleavage site* pada protein F virus tetelo strain velogenik dan mesogenik adalah 112-(R/K)RQ(R/K)RF-117. Sementara konsensus sekuens daerah *cleavage site* pada protein F virus

tetelo strain lentogenik adalah 112-(G/E)(K/R)Q(G/E)RL-117. Perbedaan pada daerah *cleavage site* pada strain virus tetelo ini menyebabkan perbedaan substrat untuk jenis protease seluler yang berbeda (Kawahara *et al.*, 1992; Sakaguchi *et al.*, 1991). Protein F pada virus tetelo strain lentogenik hanya dapat dipotong oleh enzim trypsin-like yang terdapat pada organ respirasi dan intestinal, sedangkan protein F virus tetelo yang virulen yaitu strain velogenitk dan mesogenik dapat dipotong oleh berbagai protease yang terdapat pada semua sel dan jaringan, sehingga konsekuensinya infeksi oleh virus tetelo yang virulen menyebabkan infeksi sistemik yang bersifat fatal (Garten *et al.*, 1980).

Proses amplifikasi gen F virus tetelo juga dilakukan untuk tujuh sampel koleksi BB Vet Maros yang berasal dari ulas trakhea ayam. Sampel-sampel tersebut telah dinyatakan positif tetelo dengan uji HA dan HI, namun data hasil kedua uji tidak disajikan. Hasil elektroforesis produk RT-PCR dari sampel sampel tersebut disajikan pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan bahwa hasil positif berupa band DNA hasil RT-PCR sebesar 362 bp yang terlihat pada sumuran no 3, 5, 7 dan 8, sedangkan sampel pada sumuran no 1, 2 dan 6 menunjukkan hasil amplifikasi negatif yang mengindikasikan bahwa sampel tersebut tidak mengandung virus tetelo. Sumuran no 4 merupakan kontrol positif virus tetelo. Metode diagnosis cepat dengan RT-PCR dapat diterapkan baik secara konvensional maupun non konvensional dengan menggabungkan dengan beberapa metode diagnosis cepat yang lain. Penggunaan metode RT-PCR secara konvensional mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan metode non konvensional. Viljoen *et al.*, (2005) menyatakan bahwa spesifisitas diagnosis virus tetelo dengan metode RT-PCR dapat mencapai 100% sedangkan sensitivitasnya sebesar 96%. Sensitivitas tersebut diperoleh dari perbandingan hasil diagnosis dengan metode RT-PCR dan metode isolasi virus menggunakan TAB, sehingga dapat dikatakan bahwa metode RT-PCR lebih cepat dan efisien. Hal tersebut didasarkan pada perbandingan rentang waktu dalam memperoleh hasil uji diagnostik antara RT-PCR dengan kultur virus dalam TAB. Kultur virus tetelo yang didapatkan dari inokulasi virus ke dalam TAB membutuhkan waktu yang relatif lama yaitu 4-7 hari (OIE, 2009). Oleh karena itu metode RT-PCR ini tepat digunakan untuk identifikasi virus tetelo dengan proses diagnosis yang cepat dan tidak membutuhkan waktu yang lama sehingga diagnosis penyakit tetelo segera dapat diteguhkan.

Berbasis penelitian secara molekuler patogenisitas virus tetelo ditentukan oleh sekuens asam amino pada bagian *cleavage site* protein F seperti yang sudah dilaporkan oleh OIE (2009). Virulensi virus tetelo ini disebabkan karena terdapat tiga asam amino yang bersifat basa yaitu lisin (K) atau arginin (R) yang terdapat pada daerah *cleavage site* pada residu asam amino ke-113 – 116 pada bagian C terminus protein F (Sakaguchi *et al.*, 1989).

Protein F pada virus tetelo akan secara langsung memperantarai fusi membran. Beberapa virus pada famili *paramyxoviridae* juga menyandi protein *small hydrophobic* (SH) yang juga berfungsi untuk membantu proses fusi pada membran sel inang (Lamb and Kolakofsky, 2001., Ito *et al.*, 2000., Sergel *et al.*, 2000., Techaarpornkul *et al.*, 2001).

SIMPULAN

Metode *OneStep* RT-PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen F virus tetelo yang dikoleksi langsung dari spesimen lapangan berupa *swab trachea* dari berbagai jenis unggas. Sampel virus yang diisolasi dari *swab trachea* unggas yang secara klinis menunjukkan gejala terinfeksi virus tetelo, sebagian besar terbukti positif terinfeksi virus tetelo. *OneStep* RT-PCR merupakan metode diagnosis yang cepat dan efektif untuk mendiagnosis penyakit tetelo pada unggas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates di Yogyakarta dan Kepala BB Vet Maros di Sulawesi Selatan atas sumbangan isolatnya, Kementan Republik Indonesia serta Kepala Bagian Biokimia, Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada (FKH-UGM) atas ijin penggunaan fasilitas laboratoriumnya. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada drh. Loka Setia, M.Sc. yang telah membantu untuk koleksi sampel di lapangan. Penulis juga menyampaikan ucapan terimakasih kepada Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM), UGM, Yogyakarta. Penelitian ini didanai oleh Proyek Penelitian Multi Tahun Hibah Bersaing XVII (TA 2009-2010) UGM, Yogyakarta. dan Hibah Kompetitif Sesuai Strategi Nasional (TA 2009-2010) DP2M DIKTI Kemendiknas Republik Indonesia

DAFTAR PUSTAKA

AAHL. 2004. *Molecular Diagnostic Test Available at Australia Animal Health Laboratory (AAHL)*. www.csiro.au.

- Chambers P, Millar NS, Bingham RW, Emmerson, PT. 1986. Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the haemagglutinin- neuraminidase and the large protein. *J Gen Virol* 67: 475–486.
- Deng R, Mirza AM, Mahon PJ, Iorio RM. 1997. Functional chimeric HN glycoproteins derived from Newcastle disease virus and human parainfluenza virus-3. *Arch Virol* 13, S115–S130.
- Garten W, Berk W, Nagai Y, Rott R, Klenk HD. 1980. Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: effects on pathogenicity. *J Gen Virol* 50, 135–147.
- Grimes SE. 2002. *A Basic Laboratory Manual for the Small-Scale Production dan Testing of I-2 Newcastle Disease Vaccine*. Thailand: FAO-APHCA dan RAP Publication.
- Ito M, Nishio M, Komada H, Ito Y, Tsurudome M. 2000. An amino acid in the heptad repeat 1 domain is important for the haemagglutinin-neuraminidase-independent fusing activity of simian virus 5 fusion protein. *J Gen Virol* 81: 719–727.
- Kawahara N, Yang XZ, Sakaguchi T, Kiyotani K, Nagai Y, Yoshida T. 1992. Distribution and substrate specificity of intracellular proteolytic processing enzyme(s) for paramyxovirus fusion glycoproteins. *J Gen Virol* 73, 583–590.
- Knipe DM, Peter H. 2007. *Fields Virology*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins.
- Lamb RA, Kolakofsky D. in: D.M. Knipe, P.M. Howley (Eds.), *Fields Virology*, 3rd ed., vol. 1, Lippincott-Williams and Wilkins, Philadelphia. 2001, pp. 1305–1340.
- Lamb RA, Jardetzky TS. 2007. Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr Opin Struct Biol* 17: 427–436.
- Mayo MA (2002b) A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* 147: 1655–1656.
- Office International des Epizooties (OIE). 2009. *Newcastle Disease*. OIE Terrestrial Manual. www.oie.int.
- Payungporn S, Piraya P, Salin C, Apiradee T, Juthatip K, Kanisak O, Alongkorn A, Yong P. 2004. Single-Step Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Influenza A Virus Subtype H5N1 Detection. *Viral Immunol* 17:588-593.
- Sakaguchi T, Toyoda T, Gotoh B, Inocencio NM, Kuma K, Miyata T, Negai Y. 1989. Newcastle disease virus evolution I. multiple lineages defined by sequence variability of the haemagglutinin-neuraminidase gene. *J Virol* 169: 260-272.
- Sakaguchi T, Matsuda Y, Kiyokage R, Kawahara N, Kiyotani K, Katunuma N, Nagai Y, Yoshida T. 1991. Identification of endoprotease activity in the trans Golgi membranes of rat liver cells that specifically processes in vitro the fusion glycoprotein precursor of virulent Newcastle disease virus. *Virology* 184, 504–512.
- Samal S. 2011. *Newcastle Disease Virus*. USA : University of Maryland.
http://www.webconferences.com/nihoba/ppt/Newcastle%20Disease%20Virus_Samal.pdf
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2nd. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sergel T, McGinnes L, Morrison T. 2000. A single amino acid change in the newcastledisease virus fusion protein alters the requirement for HN protein in fusion. *J Virol* 74. 5101–5107.
- Steneroden K. 2004. *Newcastle Disease*. Iowa USA: Center Food Security dan Public Health Iowa State University.
- Steward M, Vipond IB, Millar NS, Emmerson PT. 1993. RNA editing in newcastle disease virus. *J Gen Virol* 74: 2539–2547.
- Techaarpornkul S, Barretto N, Peeples ME. 2001. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol* 75: 6825–6834.
- Viljoen G J, Louis HN, John RC. 2005. *Molecular Diagnostic PCR Hand Book*. Springer : IAEA-FAO (Fiat-Panis).
- Yuwono T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta. Penerbit Dani