

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

Kke  
KK  
LP 63/19  
Nid  
k



KONSTRUKSI *SEED* VAKSIN BIVALEN VIRUS INFLUENZA  
MELALUI METODE *KNOCKOUT* MENGGUNAKAN VIRUS  
*NEWCASTLE DISEASE* DAN FLU BURUNG H5N1 DI INDONESIA

TAHUN KE -1 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. Dr. CHAIRUL A. NIDOM, drh., M.S.  
Dr. KUNCORO P. SANTOSO, drh., M.Kes.  
ARIF NUR MUHAMMAD ANSORI, S.Si.

0008035803  
0015106601  
061714453008

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



HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Konstruksi Seed Vaksin Bivalen Virus Influenza melalui Metode Knockout menggunakan Virus Newcastle Disease dan Flu Burung H5N1 di Indonesia

**Peneliti/Pelaksana**

Nama Lengkap : Dr. Dr. drh. CHAIRUL ANWAR NIDOM, M.Si  
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
 NIDN : 0008035803  
 Jabatan Fungsional : Guru Besar  
 Program Studi : Sains Veteriner  
 Nomor HP : 0811372683  
 Alamat surel (e-mail) : nidomca@unair.ac.id

**Anggota (1)**

Nama Lengkap : Dr. drh. KUNCORO PUGUH SANTOSO M.Kes  
 NIDN : 0015106601  
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga


**Anggota (2)**

Nama Lengkap : Arif Nur Muhammad Ansori, S.Si.  
 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



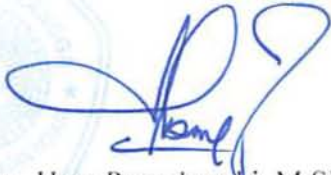
Mengetahui,  
 Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

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

Kota Surabaya, 27 - 11 - 2018

  
 (Dr. Dr. drh. CHAIRUL ANWAR NIDOM,  
 M.Si)  
 NIP/NIK 195803081984031003

Menyetujui,  
 Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi

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





## RINGKASAN

Virus flu burung H5N1 merupakan virus zoonosis yang dikhawatirkan menjadi penyebab pandemi penyakit influenza yang baru dengan korban yang tinggi. Ini disebabkan oleh sifat patogenitas virus yang tinggi ketika menginfeksi inang, transmisinya yang aerosol dan kemampuan melakukan mutasi yang memungkinkan timbulnya subtipe baru pada populasi yang *naïve*. Belum ada bukti bahwa virus Flu Burung ini telah menginfeksi antar manusia, sehingga pengendalian pada hewan lebih diutamakan. Salah satu upaya untuk mencegah kejadian tersebut adalah melalui program vaksinasi. Kesiapsiagaan terhadap ancaman pandemi diwujudkan dengan membuat dan menyiapkan seed vaksin terhadap virus flu burung H5N1. Selain itu, *Newcastle disease* (ND) merupakan penyakit strategis yang menimbulkan kerugian yang tinggi pada ekonomi peternakan unggas. Selama ini vaksinasi pada unggas yang dilakukan bersifat monovalen, sehingga mengakibatkan biaya operasional peternakan yang tinggi, karena harus melakukan vaksinasi dua macam penyakit. Dengan demikian, solusi yang efektif saat ini adalah perbaikan konstruksi dari monovalen menjadi bi-tri valen. Vaksin konvensional H5N1 yang ada merupakan seed vaksin yang berasal dari virus Flu Burung yang *highly pathogenic avian influenza* (HPAI). Metode yang bisa digunakan adalah melalui penggunaan teknologi *reverse genetic* dalam menghasilkan *seed* vaksin terhadap virus H5N1, yang bersifat *low pathogenic*. Selanjutnya digabungkan dengan bagian virus ND yang imunogenik pada virus flu tersebut.

Salah satu metode dalam penggabungan ke dua virus flu burung dan ND - yang saat ini dikembangkan adalah teknologi *knockout* (KO). Metode ini merupakan suatu metode yang dirancang untuk menghasilkan seed vaksin dengan fenotipe yang dirancang di awal dan memiliki valensi lebih dari satu. Tahapan awal dalam menghasilkan seed vaksin dengan metode KO adalah pembentukan plasmid KO, yang terdiri dari: (1) tahapan penghilangan ORF (*open reading frame*) dan urutan penyandi dari gen PB2 virus influenza yang digunakan sebagai *backbone* virus KO; (2) tahapan digesti gen PB2 dan gen *insert* (dalam hal ini gen HA virus flu burung H5N1 serta fragmen gen F dari virus ND isolat Indonesia, untuk menghasilkan protein permukaan HA dan ND sebagai antigen seed vaksin) oleh enzim restriksi; (3) insersi dan ligasi segmen gen insert yang akan diekspresikan pada gen PB2 dan plasmid ekspresi vRNA yakni pPol1; (4) transformasi pada bakteri *E. coli*; serta (5) analisis bioinformatik plasmid KO.

Gen HA yang di insersikan pada penelitian ini adalah gen HA dari virus flu burung H5N1 dan fragmen gen F dari virus ND yang diisolasi dari unggas di Indonesia, juga diinsersikan pada kerangka dasar virus flu. Gen HA ini telah dilakukan mutagenesis pada *multibasic amino acid* di daerah *cleavage site* menjadi *low pathogenic* (Reviany *et al.*, 2017), sedangkan fragmen gen virus ND telah diuji serologis dan filogenetika molekuler terhadap virus ND yang berkembang di Indonesia. Pada penelitian ini, dilakukan identifikasi molekuler terhadap virus ND sebagai kandidat *seed* vaksin bivalen untuk tahapan awal dari keseluruhan tahap penelitian.

Kata Kunci: H5N1, *Newcastle Disease*, Teknologi *Knockout*, Vaksin



## PRAKATA

Assalamu`alaikum warahmatullahi wabarakatuh. Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, karunia, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian tahun pertama program Pendidikan Magister Menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) Batch III berjudul “**Konstruksi *Seed* Vaksin Bivalen Virus Influenza melalui Metode *Knockout* Menggunakan Virus *Newcastle Disease* dan Flu Burung H5N1 di Indonesia**” dengan lancar. Penelitian ini merupakan penelitian tahun pertama dari keseluruhan tiga tahun penelitian. Penulis menyadari banyak kekurangan dalam penyusunan laporan ini, sehingga memerlukan perbaikan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Penulis berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membaca.

Surabaya, 29 November 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	1
HALAMAN PENGESAHAN	2
RINGKASAN	3
PRAKATA	4
DAFTAR ISI	5
DAFTAR TABEL	7
DAFTAR GAMBAR	8
BAB 1. PENDAHULUAN	9
1.1 Latar Belakang	9
1.2 Rumusan Masalah	11
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	13
2.1 Sejarah Penyakit <i>Newcastle Disease</i>	13
2.2 Etiologi Virus <i>Newcastle Disease</i>	13
2.3 Replikasi dan Patogenesitas Virus <i>Newcastle Disease</i>	14
2.4 Sifat Virus <i>Newcastle Disease</i>	15
2.5 Galur Virus <i>Newcastle Disease</i>	16
2.6 Epidemiologi Virus <i>Newcastle Disease</i>	16
2.7 Vaksinasi terhadap Virus <i>Newcastle Disease</i>	18
2.8 Vaksin dengan Valensi Lebih dari Satu	19
2.9 Vaksin Virus <i>Knockout</i>	21
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT	23
3.1 Tujuan Penelitian	23
3.2 Manfaat Penelitian	23
BAB 4 METODE PENELITIAN	24
4.1 Jenis Penelitian	24
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	24
4.3 Bahan dan Instrumen Penelitian	24
4.4 Metode Penelitian	25
4.5 Kerangka Operasional Penelitian	29

<b>BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI</b>	<b>30</b>
5.1 Inokulasi Sampel Virus ND	30
5.2 Uji Haemagglutination (HA)	30
5.3 Ekstraksi RNA Virus ND	33
5.4 Pengukuran Konsentrasi RNA Virus ND	34
5.5 Sintesis cDNA Virus ND dengan One Step RT-PCR	34
<b>BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA</b>	<b>36</b>
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>37</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>38</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Daftar Primer <i>Forward</i> dan <i>Reverse</i> pada Deteksi Virus ND berdasarkan Gen <i>Fusion</i> (F)	27
Tabel 5.1	Hasil Uji HA Sampel Virus ND	31

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Analisis filogenetik virus ND yang diisolasi dari berbagai negara	18
Gambar 5.1 Proses inokulasi virus pada TAB	30
Gambar 5.2 Hasil uji HA yang telah dilakukan	33
Gambar 5.3 Proses ekstraksi RNA virus ND	34
Gambar 5.4 Elektroforesis untuk deteksi genom virus ND hasil amplifikasi dengan primer MSF1 dan MSF2	35



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Penyakit tetelo atau *Newcastle disease* (ND) disebabkan oleh galur virulen dari *avian paramyxovirus virus serotype 1* (APMV-1) yang juga dikenal sebagai virus Newcastle disease. Infeksi oleh virus ND yang virulen dikaitkan dengan gejala klinis neurologis, pernapasan, paralisis, dan mortalitas tinggi pada unggas, termasuk ayam. Penyakit ND menyebabkan kerugian ekonomi karena kematian, morbiditas, retardasi pertumbuhan, dan penurunan produksi telur, serta kerugian yang terkait dengan reaksi pasca vaksinasi (Xiang *et al.*, 2017).

Penyakit ND telah mengakibatkan kerugian yang sangat besar dalam industri unggas di seluruh dunia, terutama di negara-negara berkembang termasuk Indonesia (Miller *et al.*, 2010). Selain itu, sejak 2003 hingga saat ini unggas Indonesia terserang penyakit baru yang lebih mematikan dan menular kepada manusia yaitu virus *avian influenza* (AI) (Nidom *et al.*, 2012). Pengendalian kedua virus tersebut yaitu virus ND dan AI dilakukan melalui program vaksinasi.

Virus ND adalah virus yang berbentuk pleomorfik dengan diameter sekitar 200-300 nm. Virus ND memiliki serotipe tunggal (APMV-1) dan memiliki ukuran genom sekitar 15,2 kb yang tidak tersegmentasi, berantai tunggal, genom RNA *negative-sense* yang menyandikan nukleokapsid protein (NP), fosfoprotein (P), *matrix protein* (M), *fusion protein* (F), protein hemagglutinin-neuraminidase (HN), RNA-*dependent* RNA *polymerases* atau RdRps (L), serta dua tambahan protein nonstruktural, V dan W, yang dihasilkan oleh proses RNA *editing* dari gen P (Ganar *et al.*, 2014; Xiang *et al.*, 2017). Dari sejumlah protein tersebut hanya protein F dan HN yang mempunyai peranan dalam proses kekebalan karena dapat merangsang pembentukan antibodi protektif. Protein F merupakan target utama respon imun dan memiliki sifat imunogenik yang tinggi (Choi *et al.*, 2010).

Penyakit ND ditularkan melalui kontak langsung dengan unggas yang terinfeksi atau karier, melalui kontak dengan sekresi dan ekskresi unggas yang terinfeksi, serta melalui udara (Li *et al.*, 2009). Kutu, hewan pengerat, serangga, dan anjing juga dapat berperan sebagai vektor mekanik virus ND dari feses yang terinfeksi. Virus ND mampu

menginfeksi hampir semua spesies unggas, baik unggas liar maupun yang sudah didomestikasi. Selain menginfeksi unggas, infeksi alami virus ND juga ditemukan pada babi, domba, dan cerpelai, bahkan ada laporan kasus pada manusia (Yune and Abdela, 2017).

Penyakit ND merupakan penyakit yang sangat penting dalam dunia peternakan yang dikategorikan oleh OIE sebagai *notifiable disease*. Infeksi virus ND selain dapat menyebabkan angka kematian mencapai 100%, juga dapat memberi dampak yang hebat bagi sektor ekonomi sehingga menimbulkan terjadinya pembatasan perdagangan internasional pada produk unggas dan embargo pada area atau negara yang mengalami wabah ND (Capua and Alexander, 2009; Cornax *et al.*, 2012).

*Outbreak* dari ND telah dilaporkan diberbagai negara di dunia, seperti Jepang (Mase *et al.*, 2002), Timor Lesté (Serrão *et al.*, 2012), Yordania (Ababneh *et al.*, 2012), Pakistan (Farooq *et al.*, 2014), India (Nath and Kumar, 2017), Mesir (Ewies *et al.*, 2017), Israel (Wiseman *et al.*, 2018), dan juga di Indonesia (Xiao *et al.*, 2012; Panus *et al.*, 2015; Putri *et al.*, 2017). Hal ini memberikan dampak yang besar pada peternakan unggas khususnya di negara berkembang. Disisi lain, industri unggas adalah penyumbang utama terhadap pasokan pangan global. Daging unggas dan telur adalah sumber protein hewani yang paling ekonomis yang tersedia di seluruh dunia. Pada tahun 2013, Amerika Serikat menduduki peringkat pertama sebagai penghasil daging unggas. Selain itu di Asia, Indonesia menduduki peringkat keempat setelah Cina, India, dan Iran (Wahyono and Utami, 2018).

Penyakit AI di Indonesia terutama disebabkan oleh virus AI subtipe H5N1 adalah penyebab penyakit yang paling merugikan dalam sektor ekonomi. Oleh karena itu, akibat dari signifikannya kerugian yang didapat, banyak upaya dan sumber daya diinvestasikan dalam pencegahan dan pengendalian terhadap virus ND dan AI (Miller *et al.*, 2015), salah satunya adalah program vaksinasi.

Saat ini, berbagai vaksin aktif dan inaktif untuk virus ND, serta hanya vaksin inaktif untuk beberapa serotipe virus AI, telah tersedia untuk digunakan (Kapczynski *et al.*, 2013). Penggunaan vaksin bivalen ditujukan untuk menghasilkan respon antibodi terhadap dua antigen yang berbeda dalam satu suntikan. Umumnya vaksin bivalen ini memerlukan sumber dan proses penyediaan dua buah antigen. Teknologi ini memerlukan dua macam biaya yaitu pengadaan antigen untuk vaksin AI dan ND.

Kesulitan lain dalam mengembangkan vaksin untuk memberikan hasil yang lebih baik terkait imunogenisitas, perlindungan silang terhadap galur heterogen, biaya yang lebih murah, cakupan yang luas, masa simpan yang lama, dan pengiriman yang efisien. Virus AI dan ND merupakan virus RNA yang mudah terjadi perubahan dan pergeseran antigenik dalam gen H dan N dari virus AI, vaksin tersebut dapat kehilangan keampuhannya. Masalah ini terutama menjadi perhatian untuk virus *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) (Kawaoka and Neumann, 2012). Vaksin virus ND juga dapat menghadapi masalah yang besar yang diakibatkan oleh keragaman gen fusi, yang diekspresikan dalam 16 genotipe virus yang berbeda dengan beberapa keragaman antigenik (Miller *et al.*, 2013).

Upaya terkini yang bisa dilakukan adalah dengan menggunakan teknologi *reverse genetic* terutama untuk mengubah sifat ganas dari suatu virus (Nidom *et al.*, 2017). Sedangkan untuk penerapan efisiensi dalam pembuatan vaksin bivalen dilakukan melalui teknologi *knockout* (KO) dengan dasar tubuh (*backbone*) virus influenza, dimana teknik ini didesain agar satu virus direkayasa untuk bisa membawa dua (bivalen) atau tiga (trivalen) protein antigen (Uraki *et al.*, 2015). Keuntungan dan kelebihan dari teknologi KO ini adalah virus seed vaksin yang dihasilkan dapat sekaligus membawa dua atau tiga antigen sekaligus dan dapat digunakan untuk menjawab persoalan efisiensi biaya serta waktu, seperti yang dihadapi pada produksi vaksin secara tradisional (Wong and Webby, 2013).

Berdasarkan permasalahan tersebut perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui tingkat homologi nukleotida gen penyandi protein F virus ND dari ayam isolat lapang dibandingkan dengan virus vaksin lentogenik yang digunakan di Indonesia, menganalisis hubungan kekerabatan gen penyandi protein F virus ND dari ayam isolat lapang dengan virus vaksin lentogenik yang digunakan di Indonesia dan virus ND lainnya pada GenBank<sup>®</sup>. Untuk selanjutnya, dapat dimanfaatkan sebagai acuan untuk pengembangan dasar kandidat seed vaksin bivalen dengan H5N1 menggunakan teknologi KO pada industri vaksin dalam inovasi produk vaksin yang mampu melawan serangan ND dan H5N1 secara lebih efektif.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Berapa tingkat homologi nukleotida gen penyandi protein F virus ND dari ayam isolat lapang dibandingkan dengan virus vaksin lentogenik yang digunakan di Indonesia?
2. Bagaimana hubungan kekerabatan gen penyandi protein F virus ND dari ayam isolat lapang dengan virus vaksin lentogenik yang digunakan di Indonesia dan virus ND lainnya pada GenBank<sup>®</sup>?

|

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Sejarah Penyakit *Newcastle Disease*

*Newcastle disease* (ND) adalah penyakit virus yang sangat menular dari spesies unggas. Infeksi ND telah dilaporkan dari berbagai jenis burung dengan berbagai tingkat kerentanan (Ganar *et al.*, 2014). Kraneveld (1926) menyebutkan bahwa penyakit ND pertama kali dilaporkan di Indonesia pada tahun 1926, tepatnya di Pulau Jawa. Setelah itu, Doyle (1927) melaporkan pada tahun 1927 di Inggris terjadi wabah penyakit yang ganas pada unggas di daerah New Castle upon Tyne (Newcastle). Samal (1997) menyebutkan jika setelah tahun 1935, nama *Newcastle disease* digunakan oleh Doyle. Selain itu, Doyle (1997) melaporkan jika penyakit yang menunjukkan gejala yang sama dengan ND sebelumnya pernah diidentifikasi pada tahun 1924 di Semenanjung Korea, selanjutnya ND menyebar dengan cepat ke beberapa negara. Ganar *et al.* (2014) menyebutkan ND juga disebut penyakit Ranikhet di India. Penyakit ND adalah ancaman global dan endemik di banyak bagian dunia yang sedang berkembang. Panus *et al.* (2015) menyebutkan jika *Newcastle disease* di Indonesia telah menyebar ke berbagai daerah, termasuk di Pulau Jawa. Selain itu, serangan ND umumnya mulai meningkat pada awal musim hujan dan terus meningkat hingga mencapai puncak pada pertengahan musim hujan. Selain itu, wabah biasanya terjadi pada saat peralihan dari musim hujan ke musim kemarau.

#### 2.2 Etiologi Virus *Newcastle Disease*

Doyle pada tahun 1927 pertama kali mengidentifikasi bahwa ND disebabkan oleh virus yang dapat difilter yang berbeda dari penyakit unggas yang kemudian dinamakan sebagai virus ND (Doyle, 1927). Virus ND diklasifikasikan sebagai anggota dari genus *Avulavirus* di subfamili *Paramyxovirinae* dan famili *Paramyxoviridae*. Genus *Avulavirus* dibagi menjadi sembilan serotipe berdasarkan uji *hemagglutination inhibition* dan uji *neuraminidase inhibition*. Virus ND termasuk ke dalam serotipe 1 dari *avian paramyxovirus* (Lamb and Parks, 2007). Virus ini relatif stabil pada alam bahkan pada suhu sub-optimal dan rentang pH yang luas, namun telah diamati bahwa

virus ND menjadi tidak stabil pada suhu 56 °C. Virus ND juga sensitif terhadap detergen, pelarut lipid, formaldehid, dan bahan oksidator (Ganar *et al.*, 2014).

Virus ND memiliki serotipe tunggal (APMV-1) dan memiliki ukuran genom sekitar 15.2 kb yang tidak tersegmentasi, beruntai tunggal, genom RNA *negative-sense* yang menyandikan nukleokapsid protein (NP), fosfoprotein (P), *matrix protein* (M), *fusion protein* (F), protein hemagglutinin-neuraminidase (HN), RNA-dependent RNA polymerases atau RdRps (L), serta dua tambahan protein nonstruktural, V dan W, yang dihasilkan oleh proses RNA *editing* dari gen P (Ganar *et al.*, 2014; Xiang *et al.*, 2017). Dari sejumlah protein tersebut hanya protein F dan HN yang mempunyai peranan dalam proses kekebalan karena dapat merangsang pembentukan antibodi protektif. Protein F merupakan target utama respon imun dan memiliki sifat imunogenik yang tinggi (Choi *et al.*, 2010). Selain itu, bertanggung jawab untuk penempelan virus dan fusi ke membran sel inang. Spike F dan HN memiliki panjang sekitar 8 nm dan masing-masing sebagai trimer dan tetramer (Lamb and Parks, 2007).

Galur virus ND yang diisolasi dari berbagai belahan dunia dikelompokkan ke dalam tiga kelompok ukuran genom, yaitu 15.186 nt yang ditemukan sekitar tahun 1930-1960 serta mencakup genotipe I, II, III, dan IV; 15.192 nt pada isolat yang ditemukan setelah tahun 1960 serta mencakup genotipe V, VI, VII, VIII, X-XVIII; dan 15.198 nt pada galur avirulen dari Jerman. Semua isolat virus ND mengikuti "*rule of six*" yang berarti bahwa replikasi virus paling efektif ketika urutan nukleotida di genom berada dalam kelipatan enam mulai nukleosapsid (N) mengikat protein secara efektif dengan enam nukleotida (Gambar 2.2). Enkapsidasi 6 nukleotida terakhir pada promoter ujung 3' oleh protein N tunggal penting untuk inisiasi replikasi genom *paramyxovirus* oleh polimerase virus (Ganar *et al.*, 2014).

### 2.3 Replikasi dan Patogenesitas Virus *Newcastle Disease*

Virus ND menyerang sel epitel pernapasan dengan mengikat pada senyawa yang mengandung asam sialat seperti gangliosida dan reseptor N-glikoprotein oleh glikoprotein permukaannya. Infeksi virus ND terjadi terutama melalui cara dimana envelope virus bergabung dengan membran sel inang. Selain itu, infeksi juga dapat terjadi oleh reseptor *mediated endocytosis* dan kadang-kadang melalui *caveolae-dependent endocytosis*. Setelah masuk ke dalam sitoplasma sel inang, genom RNA



*negative-sense* ditranskripsi menjadi *positive-sense* yang kemudian ditranslasi menjadi protein virus. Transkripsi dimulai pada 3' dan mensintesis mRNA gen individu mulai dari *gene-start* ke urutan *gene-end*. Reinisiasi transkripsi ke gen hilir di situs *gene-start* tidak seragam, yang mengarah ke gradien populasi mRNA yang menurun sesuai dengan jarak dari 3' akhir genom virus. Protein N, P, dan L sangat penting untuk perakitan nukleokapsid. *Positive-sense* RNA kemudian digunakan sebagai *template* untuk sintesis RNA genomik *negative-sense*. Perakitan dan *budding* virus ND dewasa tergantung pada protein M dan lipid yang ada di membran sel. Infektivitas virus ND tergantung pada pembelahan prekursor protein F0 ke F1-F2 subunit. Urutan asam amino dari situs pembelahan protein F dengan demikian postulasikan sebagai penentu utama infeksi. Protein HN dengan pengenalan reseptor dan aktivitas neuraminidase dari virus menentukan dan juga berkontribusi terhadap virulensi virus ND. Selain itu, telah ditemukan bahwa protein F dan HN dalam virus ND adalah penentu virulensi virus ND pada ayam dan makrofag yang terinfeksi. Virus ND juga patogen bagi manusia dan dapat menyebabkan konjungtivitis jika terkena mata (Ganar *et al.*, 2014).

#### 2.4 Sifat Virus Newcastle Disease

Sifat-sifat virus ND penting untuk diketahui guna menentukan model atau cara-cara pencegahan dan penanganan vaksin. Sifat virus ND antara lain mampu menggumpalkan eritrosit karena hemaglutinin virus berinteraksi dengan permukaan eritrosit. Selain itu, jika dipapar dengan sinar ultra violet, virus ND akan mati. Sifat lainnya adalah rentan terhadap zat-zat kimia dan mudah mati dalam keadaan sekitar yang tidak stabil. Disisi lain, desinfektan yang peka untuk virus ND adalah NaOH 2%, formalin (1-2%), lysol 3%, alkohol 95%, dan fumigasi dengan kalium permanganat. Pada suhu 100 °C selama 1 menit, aktivitas virus ND akan hilang serta beberapa bulan pada suhu 37 °C. Virus ND stabil pada pH 3-11. Virus ND dapat bereplikasi pada beberapa kultur sel, misalnya pada sel *chicken embryo fibroblast* (CEF), *chicken embryo liver* (CEL), sel *chicken embryo kidney* (CEK), sel *African green monkey kidney* (Vero), sel *chicken embryo related* (CER), dan *avian myogenic* (QMS) (Terregino and Capua, 2009).

## 2.5 Galur Virus *Newcaastle Disease*

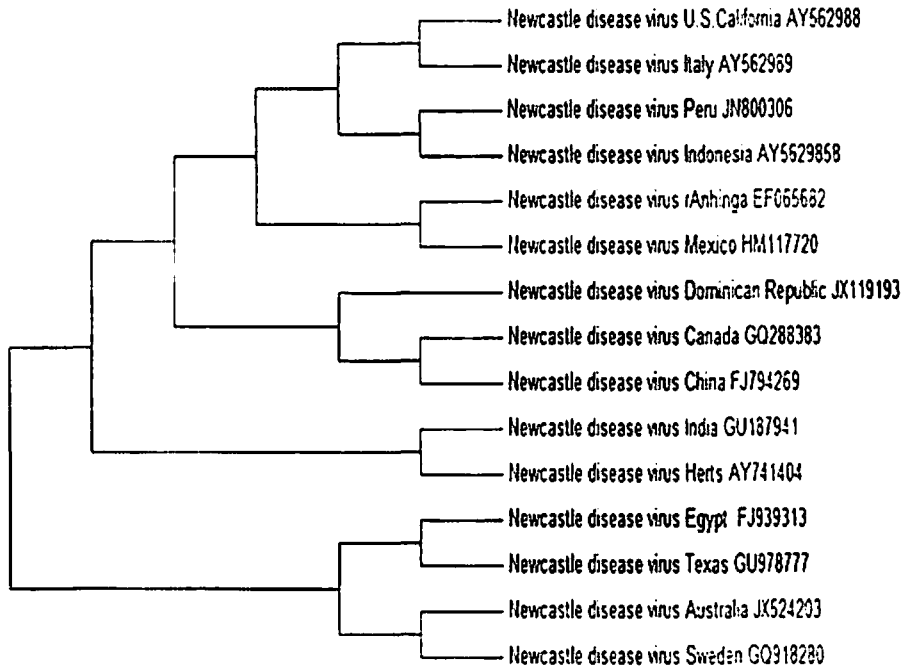
World Organisation for Animal Health (OIE) (2012) membagi galur virus ND menjadi lima patotipe berdasarkan gejala klinis yang ditimbulkan pada unggas yang terinfeksi sebagai berikut, yaitu enterik asimtomatik yang merupakan infeksi enterik subklinik tanpa adanya gejala yang jelas; lentogenik yang ditandai dengan infeksi pernapasan ringan; mesogenik yang ditandai dengan gejala neurologis yang jarang dan gangguan pernapasan dengan angka mortalitas yang berhubungan dengan usia unggas yang rentan (unggas muda lebih rentan); viserotropik velogenik yang menyebabkan pendarahan dan lesi pada saluran pencernaan serta merupakan virus yang memiliki patogenesis tinggi; dan neurotropik velogenik yang menyebabkan angka mortalitas tinggi dengan diikuti gejala gangguan sistem saraf dan pernapasan.

## 2.6 Epidemiologi Virus *Newcastle Disease*

Virus ND galur virulen endemik pada unggas di sebagian besar Asia, Afrika, dan beberapa negara di Amerika Utara dan Selatan. Negara-negara lain, termasuk Amerika Serikat dan Kanada, bebas dari galur pada unggas dan mempertahankan status itu dengan pembatasan impor dan pemberantasan dengan menghancurkan unggas yang terinfeksi. Kormoran, merpati, dan burung bayan impor lebih sering terinfeksi virus ND dan juga merupakan sumber infeksi virus ND pada unggas. Virus ND galur virulen rendah memiliki prevalensi pada unggas dan burung liar, terutama unggas air. Infeksi unggas domestik dengan virus IoND memberikan kontribusi untuk menurunkan produktivitas. Virus ND infeksi untuk hampir semua spesies unggas, baik domestik maupun liar. Ayam sangat rentan terhadap infeksi virus ND, termasuk varian merpati APMV-1. Virus ND lebih tahan terhadap suhu tinggi bila dibandingkan dengan sebagian besar paramyxovirus. Hal ini tetap menular di sumsum tulang dan otot ayam yang disembelih setidaknya enam bulan pada -20 °C dan hingga empat bulan dalam suhu refrigerator dan juga virus menular dapat bertahan selama berbulan-bulan pada suhu kamar di telur yang dihasilkan oleh ayam yang terinfeksi dan selama lebih dari setahun pada 4 °C. Prevalensi ND lebih tinggi pada musim kemarau dibandingkan musim hujan (Abdisa and Tagesu, 2017).

Jenis virus ND yang baru diisolasi terus menerus dilaporkan dari seluruh dunia. Baru-baru ini, wabah virus ND telah dilaporkan dari Vietnam, Indonesia, Malaysia, dan

Kamboja (Choi *et al.*, 2014). Pada tahun 2013, 96 wabah NDV dilaporkan pada unggas dari Kamerun, Republik Afrika Tengah, Pantai Gading, dan Nigeria. Pada tahun 2011, wabah virus ND velogenik dilaporkan dari Israel di burung hantu dan pinguin Afrika. Terlepas dari wabah rutin, ketidakmampuan vaksinasi juga telah dilaporkan menyebabkan munculnya galur virus ND baru. Di Amerika Serikat, virus ND (juga disebut virus ND eksotis) isolat dilaporkan dari kormoran dan camar di negara bagian Minnesota, Massachusetts, Maine, New Hampshire, dan Maryland. Keberhasilan virus ND mewabah juga dilaporkan dari benua Eropa dan Cina (Xie *et al.*, 2012). Analisis filogenetik virus ND yang diisolasi dari berbagai belahan dunia tidak dapat memberi kita gambaran yang jelas tentang bagaimana melintasi penghalang topografi. Namun, galur virus ND virulen yang diisolasi dari Texas menunjukkan identitas yang tinggi pada genom mereka dengan galur dari zona iklim panas menunjukkan prevalensi galur yang sangat ganas di daerah-daerah tersebut (Gambar 2.1). Galur virus ND yang diisolasi dari Mesir dan Afrika Tengah menunjukkan identitas yang tinggi pada genom mereka dengan galur virulen seperti Fontana dan Texas GB yang menunjukkan patotipe virulennya. Menariknya, isolasi virus ND dilaporkan dari kolam nyamuk di Jakarta (Forrester *et al.*, 2013). Meskipun Australia telah bebas dari wabah virus ND dari tahun 1932 hingga 1998, beberapa wabah dilaporkan dari New South Wales dari tahun 1998 hingga 2002. Kehadiran virus ND juga telah dilaporkan dari populasi burung liar. Selain itu, virus ND telah diisolasi dari spesies non-unggas seperti babi, domba, dan cerpelai (Zhao *et al.*, 2017).



Gambar 2.1 Analisis filogenetik virus ND yang diisolasi dari berbagai negara (Ganar *et al.*, 2014).

## 2.7 Vaksinasi terhadap Virus *Newcastle Disease*

Vaksinasi adalah metode pengendalian dan pencegahan penyakit baru yang paling penting. Saat ini, vaksin inaktif dan aktif untuk virus ND tersedia di seluruh dunia. Selain itu, terdapat juga thermostable vaccine yang secara khusus dikembangkan untuk digunakan pada ayam kampung. Berbagai rute dapat digunakan untuk pemberian vaksin aktif dan jadwal dari menetas sampai tumbuh. Vaksin emulsi minyak virus inaktif diberikan sebelum dimulainya produksi telur. Vaksin virus lentogenik umumnya direkomendasikan dalam air minum, dengan tetes mata, oleh aerosol atau intranasal. Vaksin menggunakan galur V4 tahan panas telah dikembangkan untuk memberi makan ayam kampung di berbagai negara yang memiliki produksi unggas tinggi. Meskipun vaksinasi yang tepat melindungi unggas dari penyakit klinis tetapi tidak mencegah replikasi virus dan shedding, yang menghasilkan sumber infeksi (Markos and Abdela, 2016).

Vaksin aktif: vaksin aktif relatif murah, dijual dalam bentuk kering beku, mudah dikelola, dan dapat digunakan untuk vaksinasi masal. Hal ini telah dibagi ke dalam kelompok mesogenik dan lentogenik dengan cara yang lebih disukai yaitu pemberian

tetes mata, pemasangan intranasal paruh, atau mencelupkan untuk vaksin lentogenik sementara vaksin mesogenik memerlukan suntikan intramuskular. Pemberian melalui air minum dan aerosol juga dapat digunakan. Di sebagian besar negara, vaksin Hitchner BI dan LaSota digunakan dan berasal dari virus ND galur mesogenik. Beberapa vaksin mesogenik dapat menyebabkan penyakit; terutama pada unggas muda, terutama jika ada infeksi ganda dengan organisme yang memperburuk kondisi (Yune and Abdela, 2017).

Vaksin inaktif: vaksin inaktif dapat digunakan pada situasi yang tidak cocok untuk vaksin aktif dan menyebabkan tingkat antibodi protektif yang tinggi selama jangka waktu yang panjang. Vaksin-vaksin ini dihasilkan dari cairan alantois infeksi dari virus ND virulen yang dipapar dengan  $\beta$ -propiolactone atau formalin untuk membunuh virus dan kemudian dicampur dengan adjuvan. Vaksin dapat diberikan melalui injeksi subkutan atau intramuskular (Yune and Abdela, 2017).

Program vaksinasi: program vaksinasi memengaruhi durasi imunitas. Salah satu pertimbangan paling penting yang mempengaruhi program vaksinasi adalah tingkat maternal immunity pada ayam muda, yang dapat bervariasi dari batch ke batch, peternakan ke peternakan, dan di antara ayam individu. Untuk alasan ini, salah satu dari beberapa strategi digunakan (Yune and Abdela, 2017).

## 2.8 Vaksin dengan Valensi Lebih dari Satu

Vaksin virus dengan valensi lebih dari satu dapat ditemukan pada vaksin konvensional. Namun, pembuatan vaksin dengan valensi antigen yang lebih dari 1 jenis pada metode konvensional, menggunakan metode yang laborous, dimana masing-masing seed dipersiapkan tersendiri untuk selanjutnya dicampur pada saat formulasi (Wong and Webby, 2013). Virus ND adalah kandidat vektor vaksin yang menarik untuk pemanfaatan pada manusia dan hewan (Samal, 2011). Hal ini menyajikan kandidat yang menjanjikan untuk desain rasional vaksin aktif dan vektor vaksin karena sifat modular transkripsi, frekuensi rekombinasi minimum, dan tidak adanya fase DNA selama replikasi.

Genom virus ND cukup mudah dimanipulasi menggunakan teknologi reverse genetic (Liu *et al.*, 2017). Vaksin aktif dan vaksin bivalen secara ekonomi sangat populer untuk industri unggas. Galur lentogenik virus ND tampaknya merupakan

vaksin yang baik. Baik virus aktif dan rekombinan dieksplorasi sebagai vaksin dan vektor vaksin dengan berbagai tingkat keberhasilan. Virus ND rekombinan yang mengekspresikan protein asing dieksplorasi sebagai vektor virus oleh banyak ilmuwan di seluruh dunia. Sifat berikut mungkin dapat dikaitkan untuk kesesuaian virus ND sebagai vektor virus (Ganar *et al.*, 2014), yaitu (1) virus ND tumbuh dengan titer tinggi dalam TAB, kultur sel, dan saluran pernapasan spesies unggas dan non-unggas; (2) infeksi virus ND secara alami melalui saluran pernapasan dan ini berguna untuk mengantarkan antigen protektif yang berasal dari patogen pernapasan. Selain itu, virus ND menginduksi respon imun lokal dan sistemik; (3) virus ND memunculkan respon imun humoral dan seluler; (4) virus ND memiliki genom modular dengan hanya enam gen esensial dan dua gen aksesori yang mudah direkayasa; (5) virus ND tidak berintegrasi dengan genom inang karena bereplikasi dalam sitoplasma inang dan menunjukkan rekombinasi genetik terkecil; dan (6) virus ND rekombinan yang mengekspresikan antigen asing menunjukkan ekspresi protein asing yang cukup tinggi dan stabil setelah banyak bagian baik *in vitro* dan *in vivo*.

Untuk konstruksi vektor vaksin, gen asing harus diapit oleh gene-start dan gene-end urutan virus ND spesifik di persimpangan gen atau urutan intergenik tanpa mengganggu *rule of six*. Tingkat ekspresi gen asing ditemukan lebih dalam kasus penyisipannya di 3' akhir genom. Virus ND rekombinan dapat bertindak sebagai vektor vaksin potensial untuk manusia. Virus ND menawarkan kandidat vaksin yang penting dalam hal keamanan, efektivitas, dan efektivitas biaya. Sejumlah vaksin berbasis virus ND dihasilkan untuk menyelesaikan masalah berbagai infeksi virus pada manusia. Virus ND rekombinan memberikan respon imunogenik terhadap tantangan antigenik yang berbeda seperti hemagglutinin protein (HA) virus influenza manusia, gag protein dari HIV dan SIV, glikoprotein HIV, F glikoprotein dari *human respiratory syncytial virus*, protein HN dari *human parainfluenza virus 3*, dan *spike glycoprotein* dari SARS-CoV (Samal, 2011).

Selain itu, virus ND bertindak sebagai vektor vaksin yang sangat baik untuk patogen hewan dan berhasil dipasarkan. Virus ND rekombinan mengekspresikan protein VP2 yang digunakan sebagai vaksin bivalen terhadap virus ND dan virus IBD pada ayam. Virus ND rekombinan mengekspresikan protein HA dari H5N1 dan virus influenza H7N7 melindungi terhadap virus ND dan infeksi virus influenza pada ayam. Virus ND



rekombinan yang mengekspresikan glikoprotein gN dan gG dari virus *Rift Valley fever* (RVF) terbukti melindungi tikus dan anak domba, melawan infeksi virus dengan memunculkan respon antibodi yang efektif. Virus ND rekombinan yang mengekspresikan gD glikoprotein secara parsial melindungi sapi terhadap infeksi virus herpes sapi. Dalam penelitian lain, Virus ND rekombinan yang mengekspresikan protein G dan F dari virus Nipah menginduksi respon antibodi penetral pada tikus dan babi. Banyak penelitian telah dilakukan di seluruh dunia untuk meningkatkan efisiensi vaksin virus ND. Telah ditunjukkan bahwa virus ND rekombinan mengekspresikan protein HA H5N1 pada bebek menunjukkan perlindungan steril dengan tidak adanya antibodi yang diturunkan secara maternal (Ferreira *et al.*, 2012).

## 2.9 Vaksin Virus *Knockout*

Teknologi virus *knockout* (KO) adalah suatu metode dimana satu subtype virus direkayasa untuk bisa membawa dua (bivalen) atau tiga (trivalen) protein antigen virus. Hasilnya nanti adalah ekspresi lebih atau sama dengan dua antigen. Vaksin ini juga menggunakan propagasi berbasis kultur sel yang dapat mengatasi risiko yang berhubungan dengan alergi komponen telur dan keterbatasan pasokan TAB pada kondisi pandemik (Murakami *et al.*, 2012). Metode ini dapat digunakan untuk menjawab persoalan efisiensi biaya dan waktu dalam pembuatan vaksin sistem konvensional. Keuntungan dari metode proses produksi ini dalam satu propagasi virus vaksin dengan teknologi KO, dapat sekaligus membawa dua atau tiga antigen sekaligus. Keunggulan lainnya dari metode ini diantaranya dihasilkannya titer antibodi yang tinggi meski hanya satu kali pemberian, proteksi sempurna pada uji tantang yang dilakukan pada hewan coba serta antigenisitas virus yang tidak berubah karena dipasase di kultur sel dan tidak di TAB. Dalam skala produksi, oleh karena pasase vaksin ini dilakukan di lini sel, sehingga dapat dilakukan scale up sesuai kebutuhan (Kobayashi *et al.*, 2013).

Teknologi KO bisa melalui cara dengan menghilangkan sebagian dari gen untuk digantikan posisinya dengan gen-gen yang dikehendaki. Tahapan ini adalah tahap yang paling krusial dalam teknologi ini. Bagian dari gen yang dihilangkan merupakan bagian dari urutan penyandi untuk kemudian digantikan dengan urutan penyandi dari gen yang

dikehendaki ataupun urutan penyandi dari patogen lain seperti bakteri (Murakami *et al.*, 2012).

Teknologi KO merupakan salah satu metode yang digunakan pada teknologi *reverse genetic*. Pada virus influenza misalnya, teknologi ini awalnya dikembangkan dari studi mengenai *genome packaging* dari virus influenza oleh kelompok penelitian yang dipimpin oleh Profesor Yoshihiro Kawaoka dari Institute of Medical Science, The University of Tokyo (IMSUT), Jepang. Kelompok penelitian ini menyisipkan gen *green fluorescence protein* (GFP) pada daerah urutan penyandi dari gen PB2 dan NS. Dalam perkembangannya, metode ini bisa digunakan sebagai landasan untuk membuat seed vaksin multivalen dengan menyisipkan gen patogen yang kita inginkan dalam urutan gen penyandi PB2 atau non struktural dari virus master donor PR8 (Ozawa *et al.*, 2011). Selain itu, Qurnianingsih (2018) telah melakukan desain seed vaksin bivalen virus influenza A melalui teknologi KO dengan menggunakan virus H1N1 dan H5N1 (flu burung) isolat manusia di Indonesia.

Secara umum, tahapan dari pembuatan *seed* vaksin bivalen dengan teknologi KO terdiri dari (1) tahapan awal adalah desain atau penyiapan plasmid KO, (2) tahapan kedua adalah transfeksi plasmid KO dan plasmid lain yang diperlukan pada kultur sel 293T yakni plasmid untuk sintesis RNA virus dan plasmid untuk ekspresi protein kompleks polimerase, (3) tahapan ketiga adalah propagasi pada kultur sel yang dilanjutkan dengan (4) tahapan lanjut yakni uji stabilitas molekuler, uji imunogenisitas dan uji patogenisitas yang dilakukan pada kultur sel maupun hewan coba (Ui *et al.*, 2017).

## BAB 3

## TUJUAN DAN MANFAAT

**3.1 Tujuan Penelitian****3.1.1 Tujuan Jangka Panjang**

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat homologi nukleotida gen penyandi protein F virus ND dari ayam isolat lapang dibandingkan dengan virus vaksin lentogenik yang digunakan di Indonesia, menganalisis hubungan kekerabatan gen penyandi protein F virus ND dari ayam isolat lapang dengan virus vaksin lentogenik yang digunakan di Indonesia dan virus ND lainnya pada *GenBank*<sup>®</sup>. Untuk selanjutnya, dapat dimanfaatkan sebagai acuan untuk pengembangan dasar kandidat *seed* vaksin bivalen dengan H5N1 menggunakan teknologi KO pada industri vaksin dalam inovasi produk vaksin yang mampu melawan serangan ND dan H5N1 secara lebih efektif.

**3.1.2 Tujuan Khusus**

- Menentukan urutan nukleotida gen penyandi protein F virus ND dari ayam isolat lapang.
- Menganalisis susunan filogenetik virus ND dari ayam isolat lapang.

**3.2 Manfaat Penelitian****3.2.1 Manfaat Teoritis**

Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah mengenai urutan nukleotida gen penyandi protein F dan informasi mengenai hubungan kekerabatan virus ND berdasarkan gen penyandi protein F virus ND dari ayam isolat lapang sebagai kandidat *seed* vaksin bivalen dengan H5N1 menggunakan teknologi KO.

**3.2.2 Manfaat Praktis**

Penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai acuan untuk pengembangan dasar kandidat *seed* vaksin bivalen dengan H5N1 menggunakan teknologi KO pada industri vaksin dalam inovasi produk vaksin yang mampu melawan serangan ND dan H5N1 secara lebih efektif.



## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif menggunakan rancangan penelitian eksploratif.

### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dengan dua tahap. Tahap pertama pengambilan sampel dan tahap kedua pengujian sampel. Penelitian dilakukan mulai April 2018. Pengambilan sampel dilakukan di peternakan ayam. Pemeriksaan molekuler sampel, uji PCR, serta sekuensing DNA dilakukan di Laboratorium Vaksinologi, Professor Nidom Foundation (PNF), Surabaya.

### 4.3 Bahan dan Instrumen Penelitian

#### Bahan Penelitian

Isolasi virus menggunakan telur ayam berembrio (TAB) spesifik antibodi negatif (SAN) berumur 8-10 hari, antibiotik (penicillin-streptomycin, Sigma), antifungi, media *transport brain heart infusion broth*, dan alkohol. Uji *Haemagglutination* (HA) dan *Haemagglutination Inhibition* (HI) menggunakan *phosphat buffer saline* (PBS) pH 7.2, dan eritrosit ayam. Primer reverse dan forward, serta perangkat untuk ekstraksi RNA dari *Roche High Pure Viral Nucleic Acid kit* (Roche Molecular Systems, Inc.).

#### Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *microtube* (Eppendorf®), *multichannel pipette* (Eppendorf®), BD BBL™ CultureSwab™ (Becton, Dickinson and Company), *yellow tips* (Tarson), *white tips* (Tarson), *blue tips* (Corning®), tabung *venoject*, mikropipet (Eppendorf®), *96-well microplate* (Applied Biosystems™), *centrifuge* (myFuge™), pelubang telur, rak telur, lampu *candling*, inkubator telur, rak tabung, spuit tuberculin (OneMed), pipet 10 mL (Falcon®), *thermal cycler* PCR (Applied Biosystems™), perangkat elektroforesis (Bio-Rad Laboratories), 3130 xL Applied Biosystems® Genetic Analyzers (Applied Biosystems™), refrigerator, *vortex* (Vortex-Genie™ 2), dan *biosafety cabinet* kelas 2 (Biobase®).

## 4.4 Metode Penelitian

### Pengambilan Sampel Penelitian

Sampel diambil dari swab kloaka ayam di peternakan. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara diulas menggunakan BD BBL™ CultureSwab™. Tabung diberi kode berdasarkan jenis, asal, dan tanggal pengambilan sampel. Sampel ditransportasikan dalam rantai dingin (4-8 °C) dan dibawa ke laboratorium untuk disimpan pada deep freezer (-80 °C) sampai saat akan dilakukan pengujian.

### Isolasi Virus *Newcastle Disease*

Isolasi virus menggunakan TAB SAN yang berumur 8-10 hari. Proses sentrifugasi dilakukan pada 1500 rpm selama 15 menit, diinokulasikan pada cairan alantois TAB masing-masing sebanyak 0.2 mL dan dilakukan inkubasi TAB dilakukan selama 5 hari pada suhu 37 °C (OIE 2012). Pengamatan dilakukan setiap 8 jam untuk setiap TAB dan untuk TAB yang mati disimpan di dalam refrigerator. Sedangkan, jika TAB yang embrionya masih hidup sampai hari ke-5 inkubasi, maka TAB disimpan semalaman pada refrigerator. Cairan alantois dipanen dari TAB kemudian dilakukan uji ada tidaknya aktivitas virus dengan uji HA dan RT-PCR sebagai penegakkan bahwa virus yang terisolasi adalah virus ND.

### Identifikasi Virus *Newcastle Disease*

#### Uji Hemaglutinasi (HA)

Larutan PBS sebanyak 25 µL dimasukkan ke dalam setiap sumuran. Sumuran pertama diisi 25 µL sampel cairan alantois yang telah dipanen. Kemudian dilakukan pengenceran hingga sumuran ke-11 dan ditambahkan kembali PBS 25 µL pada setiap sumuran. Eritrosit 1% sebanyak 25 µL ditambahkan pada setiap sumuran. Selanjutnya dihomogenkan secara perlahan yang kemudian diinkubasi selama 40 menit pada suhu ruang. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya aglutinasi dari sel darah merah pada dasar sumuran plat yang terlihat seperti pasir (OIE, 2012).

#### Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI)

Sebanyak 25 µL PBS dimasukkan ke dalam tiap sumuran plat mikrotiter. Sumuran pertama dimasukkan 25 µL serum standar. Kemudian dilakukan pengenceran menggunakan multichannel pipette (Eppendorf®). Selanjutnya ditambahkan cairan alantois 4 HAU ke setiap sumuran sebanyak 25 µL dan di inkubasi selama 30 menit. Suspensi sel darah merah 1 % sebanyak 25 µL ditambahkan ke dalam semua sumuran dan

digoyang secara perlahan yang selanjutnya ditempatkan pada suhu ruang. Reaksi dibaca setelah 30 sampai 60 menit, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya tear drop pada saat plat dimiringkan (OIE, 2012).

#### **Ekstraksi RNA Virus *Newcastle Disease***

Ekstraksi RNA virus ND dilakukan di *biosafety cabinet* kelas 2 (Biobase®). Isolasi RNA virus dari sampel menggunakan *Roche High Pure Viral Nucleic Acid kit* (Roche Molecular Systems, Inc.). Sampel swab kloaka sebanyak 200 µL terlebih dahulu dipersiapkan pada *microtube* (Eppendorf®) sebanyak 2 mL yang kemudian ditambahkan *working solution* 200 µL dan 50 µL *proteinase K*. Sampel diinkubasi pada suhu 72 °C selama 10 menit dan dilanjutkan dengan penambahan 100 µL *binding buffer*, kemudian dihomogenkan. Suspensi dipindahkan pada *High pure filter tube* kemudian disentrifugasi selama 1 menit 8000 g. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 500 µL *inhibitor removal buffer*, dan disentrifugasi selama 1 menit 8000 g. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 450 µL *wash buffer* dan disentrifugasi selama 1 menit 8000 g (supernatan dibuang dan ulangi). Supernatan dibuang kemudian disentrifugasi selama 10 detik 13000 g. *Filter tube* dipindahkan ke *microtube* baru dan ditambahkan 50 µL *elution buffer* selanjutnya diinkubasi selama 10 menit. Tahap terakhir dilakukan sentrifugasi 8000 g selama 1 menit. RNA yang berhasil diisolasi kemudian disimpan dalam *freezer* -80 °C sampai saat akan dilakukan pengujian.

#### **Pengukuran Konsentrasi RNA Virus *Newcastle Disease***

Konsentrasi RNA diukur untuk memastikan *template* untuk RT-PCR telah cukup. Pertama, dimasukkan 200 µL *Quant-iT™ Working Solution* (*Quant-iT™ RNA Assay Kit*, Invitrogen) pada *Qubit™ Assay Tubes* (Invitrogen). Lalu, 2 µL RNA dimasukkan ke dalam tube tersebut. Campuran ini diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Setelah itu, diproses untuk mengukur konsentrasi RNA menggunakan *Qubit™ Fluorometer* (Invitrogen). Sampel RNA yang telah dideteksi oleh fluorometer diproses untuk RT-PCR.

#### **Sintesis cDNA Virus *Newcastle Disease* dengan *One Step* RT-PCR**

*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dilakukan untuk mengamplifikasi genom RNA virus ND. Hal ini penting karena RNA harus diubah terlebih dahulu menjadi DNA oleh metode *reverse transcriptase* sebelum diamplifikasi di PCR. *One Step* RT-PCR dilakukan di *biosafety cabinet* kelas 2 (Biobase®). 24 µL RT-PCR *master mix* (*Superscript™ III One-Step RT-PCR System* dengan *Platinum™ Taq*



DNA Polymerase, Invitrogen) dimasukkan pada microtube 100  $\mu$ L. Lalu, ditambahkan 1  $\mu$ L RNA. Tube dimasukkan ke thermal cycler PCR (Applied Biosystems™). Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen penyandi protein F virus ND disajikan pada tabel 4.1. Reaksi PCR untuk mengamplifikasi DNA yaitu menggunakan hasil cDNA virus ND dengan metode PCR.

Thermal cycler PCR diatur dengan pre-denaturation selama 10 menit dengan suhu 94 °C, denaturation selama 1 menit dengan suhu 94 °C, annealing selama 1 menit dengan suhu 56 °C, extension selama 2 menit dengan suhu 72 °C, dan perpanjangan extension selama 10 menit dengan suhu 72 °C. Siklus PCR ini berulang selama 40 kali. Produk dari PCR (amplikon) disimpan pada suhu 4 °C. Produk PCR tersebut diproses berikutnya untuk elektroforesis untuk mendeteksi genom virus ND yang telah diamplifikasi.

Tabel 4.1 Daftar Primer *Forward* dan *Reverse* pada Deteksi Virus ND berdasarkan Gen *Fusion (F)* (Farooq *et al.*, 2014).

MFS1/MSF2		
<i>Forward</i>		
GAC CGC TGA CCA CGA GGI TA	~700 bp	4306-4326
<i>Reverse</i>		
AGI CGG AGG ATG TIG GCA GC		4981-5005

### Elektroforesis Gel

Elektroforesis gel digunakan untuk visualisasi hasil dari produk PCR. 1,5% gel agarosa dimasukkan ke dalam perangkat elektroforesis (Bio-Rad Laboratories). Selanjutnya, 7  $\mu$ L BlueJuice (10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen) diletakkan di parafilm, lalu 1  $\mu$ L amplikon ditambahkan. Berikutnya, campuran tersebut dimasukkan ke dalam well gel agarosa. Sebanyak 8  $\mu$ L 100 bp DNA ladder digunakan sebagai marker (GL NEON) dimasukkan ke well gel agarosa. Marker ditempatkan pada well nomor 1, lalu sampel ditempatkan di well berikutnya. Perangkat elektroforesis dijalankan pada 100 V, 400 mA selama 40 menit. Hasil dari elektroforesis divisualisasikan dengan menggunakan Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories).

### Sekuensing cDNA Virus *Newcastle Disease*

Sekuensing adalah metode untuk mengetahui tipe nukleotida yang tersusun pada genom yang teramplifikasi (produk PCR). Produk PCR dipurifikasi dengan QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen). Setelah proses purifikasi, dilakukan pelabelan menggunakan BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™). Lalu dilakukan penambahan sebanyak 5 µL BigDye® Terminator 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems™). Selanjutnya, ditambahkan 5 µL ampikon yang telah dipurifikasi, 1.5 µL primer forward dan reverse dimasukkan, dan 7 µL Nuclease Free Water (Promega). Proses berikutnya adalah memasukkan kedalam thermal cycler (Applied Biosystems 3130X Genetic Analyzer, Applied Biosystems™). Thermal cycler tersebut diprogram dengan suhu 96 °C untuk proses *heating* pada *microtube* selama 3 menit, lalu 96 °C selama 10 detik, 50 °C selama 5 detik, 60 °C selama 1 menit. Siklus ini berulang selama 25 kali. Langkah terakhir adalah dengan suhu 4 °C hingga sampel siap dipresipitasi. Presipitasi dilakukan dengan menggunakan 100 µL dari 100% konsentrasi alkohol untuk setiap tabung.

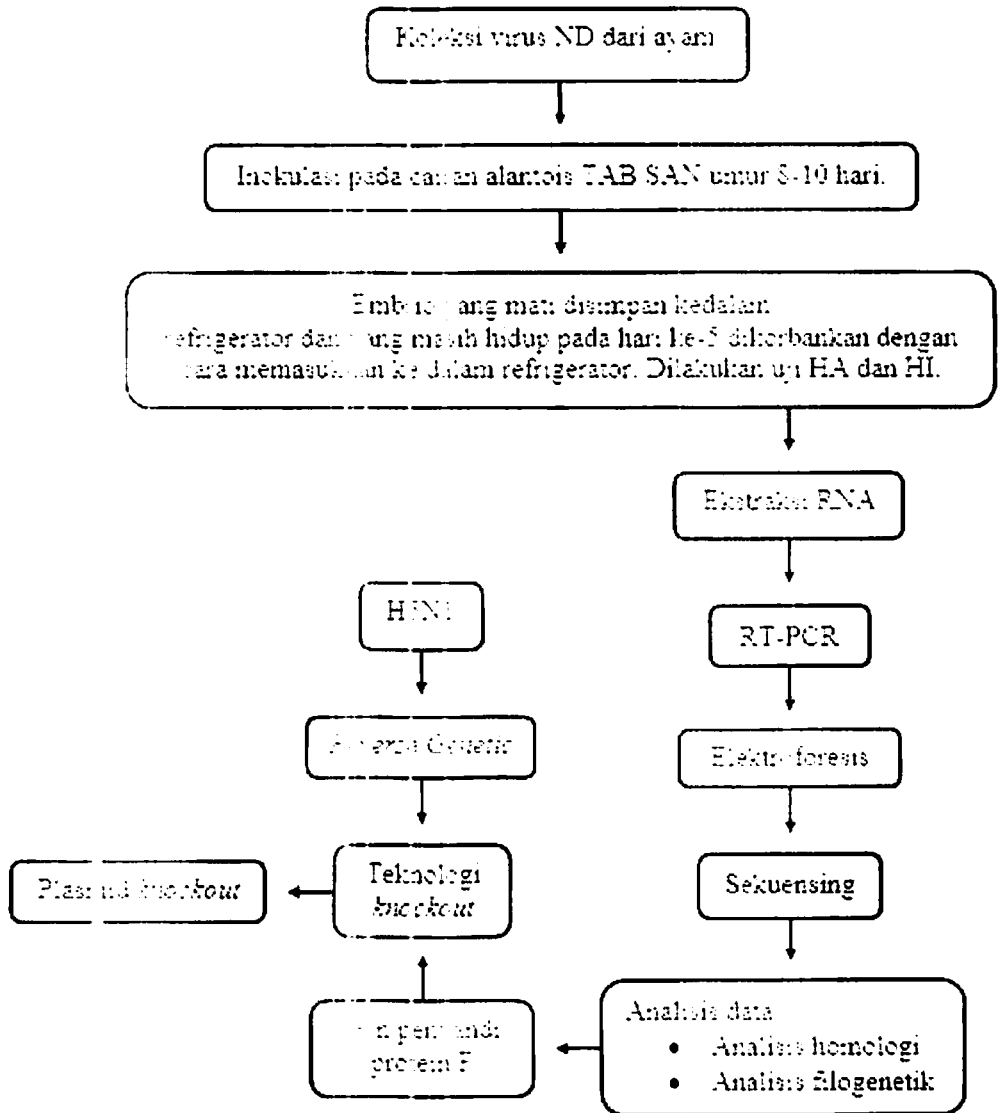
### Analisis Data Molekuler

Analisis molekuler adalah metode yang melakukan kombinasi dan perbandingan urutan nukleotida yang telah dibaca oleh *thermal cycler*. Urutan nukleotida dianalisis dengan perangkat lunak *Biological Sequence Alignment Editor* (BioEdit) versi 8.0 dan *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 6.0. Proses *alignment* dilakukan menggunakan ClustalW yang tersedia di BioEdit versi 8.0.

### Penyiapan Plasmid *Knockout*

Virus H5N1 pada penelitian ini telah dilakukan rekayasa melalui teknologi *reverse genetic* oleh riset sebelumnya (Nidom *et al.*, 2017). Virus tersebut awalnya adalah *highly pathogenic avian influenza* (HPAI), lalu diubah menjadi *low pathogenicity avian influenza* (LPAI) dengan teknologi *reverse genetic*. Berikutnya adalah tahapan penghilangan *open reading frame* (ORI) dan urutan gen penyandi dari gen PB2 virus H5N1 yang digunakan sebagai *backbone* virus KO. Tahapan digesti gen PB2 dan gen insert (gen penyandi protein F virus ND) oleh enzim restriksi. Selanjutnya, insersi dan ligasi segmen gen insert yang akan diekspresikan pada gen PB2 dan plasmid ekspresi RNA virus, yakni p301.

4.5 Kerangka Operasional Penelitian



## BAB 5

## HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

## 5.1 Inokulasi Sampel Virus ND

Sampel yang telah didapatkan pada penelitian ini, dilakukan inokulasi pada telur ayam berembrio (TAB). Tujuan dari inokulasi virus pada TAB adalah untuk memperbanyak virus ND yang telah didapatkan.



Gambar 5.1 Proses inokulasi virus ND pada TAB.

## 5.2 Uji Haemagglutination (HA)

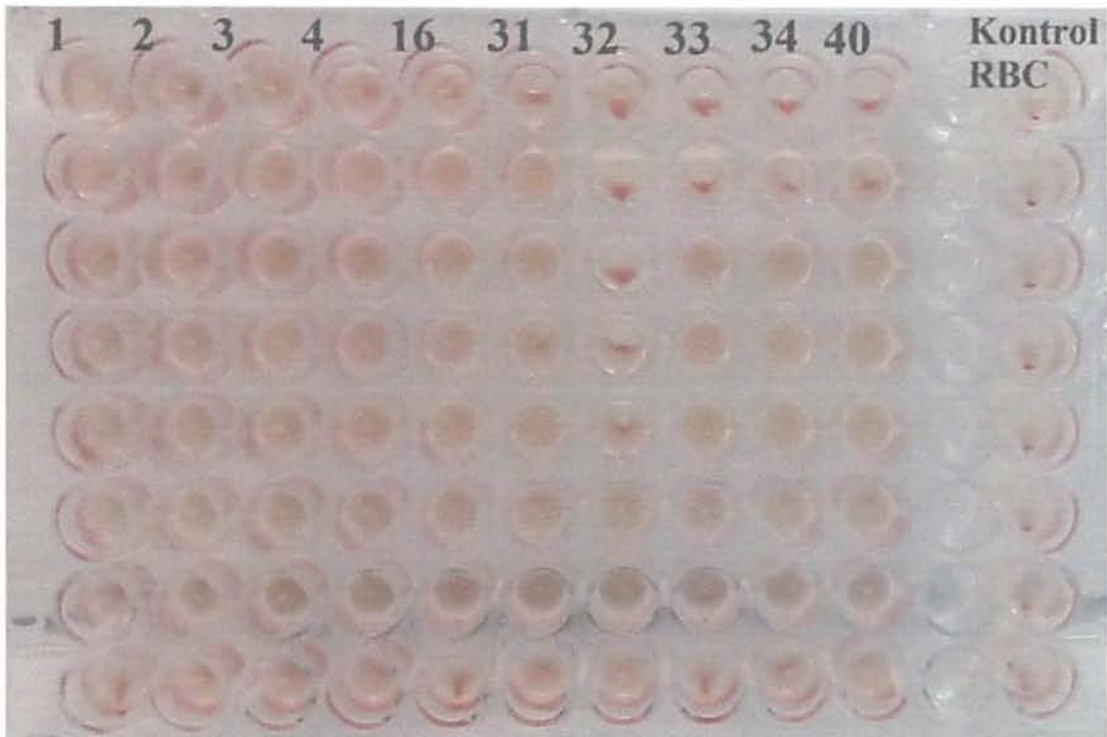
Hasil positif pada uji ini adalah ditunjukkan dengan adanya aglutinasi dari sel darah merah pada dasar sumuran plat yang terlihat seperti pasir. Uji HA digunakan untuk mengukur titer virus/antigen secara kuantitas. Virus yang bisa dilakukan uji HA hanya virus yang dapat mengaglutinasi sel darah merah seperti virus ND. Prinsip uji HA adalah terjadinya ikatan antara virus/antigen dengan sel darah merah yang ditandai dengan adanya agglutinasi (butiran seperti pasir). Pembentukan agglutinasi ini disebabkan karena adanya ikatan virus/antigen dengan sel darah merah. Titer virus/antigen dapat diketahui dengan melihat adanya agglutisai di dasar lubang dari microplate pada lubang terakhir/pengenceran tertinggi, misal terjadinya agglutinasi sampai lubang ke 8, maka titer virus/antigen tersebut adalah  $\log 2^8$ , sementara untuk *well* yang negatif (tidak adanya virus/antigen) apabila *microplate* dimiringkan 45 derajat sel darah merah akan turun.

Nomor Sampel	Hasil Uji HA (Titer)
1	23
2	21
3	25
4	21
5	24
6	24
7	23
8	21
9	24
10	24
11	24
12	25
13	24
14	25
15	23
16	25
17	25
18	24
19	23
20	24
21	21
22	21
23	24
24	22
25	21
26	21
27	24
28	21
29	24
30	25

Tabel 5.1 Hasil Uji HA Sampel Virus X

31	$2^7$
32	$2^{14}$
33	$2^7$
34	$2^{12}$
35	$2^{13}$
36	$2^{13}$
37	$2^{12}$
38	$2^{12}$
39	$2^{12}$
40	$2^9$
41	$2^{12}$
42	$2^4$
43	$2^{12}$
44	$2^{12}$
45	$2^{11}$
46	$2^{11}$
47	$2^{12}$
48	$2^9$
49	$2^{10}$
50	$2^{12}$
51	-
	(negatif)
52	-
	(negatif)
53	$2^1$
54	$2^2$
55	$2^2$
56	$2^3$
57	$2^2$
58	$2^2$
59	$2^2$
60	$2^1$





Gambar 5.2 Hasil uji HA dari sampel virus ND.

### 5.3 Ekstraksi RNA Virus ND

Ekstraksi RNA virus ND dilakukan di *biosafety cabinet* kelas 2 (Biobase<sup>®</sup>). Isolasi RNA virus dari sampel menggunakan QIAamp Viral RNA Mini Kit. Sampel sebanyak 140  $\mu\text{L}$  terlebih dahulu dipersiapkan pada *microtube* (Eppendorf<sup>®</sup>) sebanyak 2 mL yang kemudian ditambahkan working solution 200  $\mu\text{L}$  dan 50  $\mu\text{L}$  proteinase K. Sampel diinkubasi pada suhu 72  $^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit dan dilanjutkan dengan penambahan 100  $\mu\text{L}$  *binding buffer*, kemudian dihomogenkan. Suspensi dipindahkan pada *high pure filter tube* kemudian disentrifugasi selama 1 menit 8000 g. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  inhibitor removal buffer, dan disentrifugasi selama 1 menit 8000 g. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 450  $\mu\text{L}$  wash buffer dan disentrifugasi selama 1 menit 8000 g (supernatan dibuang dan ulangi). Supernatan dibuang kemudian disentrifugasi selama 10 detik 13000 g. *Filter tube* dipindahkan ke *microtube* baru dan ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  elution buffer selanjutnya di inkubasi selama 10 menit. Tahap terakhir

dilakukan sentrifugasi 8000 g selama 1 menit. RNA virus yang berhasil diisolasi kemudian disimpan dalam *freezer* -80 °C sampai saat akan dilakukan pengujian.



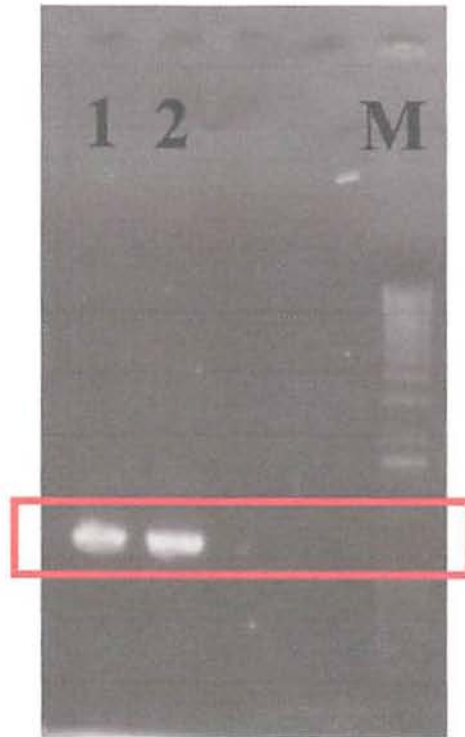
Gambar 5.3 Proses ekstraksi RNA virus ND.

#### 5.4 Pengukuran Konsentrasi RNA Virus ND

Konsentrasi RNA diukur untuk memastikan *template* untuk RT-PCR telah cukup. Pertama, dimasukkan 200  $\mu$ L Quant-iT™ Working Solution (Quant-iT™ RNA Assay Kit, Invitrogen) pada Qubit™ Assay Tubes (Invitrogen). Lalu, 2  $\mu$ L RNA dimasukkan ke dalam tube tersebut. Campuran ini diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Setelah itu, diproses untuk mengukur konsentrasi RNA menggunakan Qubit™ Fluorometer (Invitrogen). Sampel RNA yang telah dideteksi oleh fluorometer diproses untuk *one step* RT-PCR.

#### 5.5 Sintesis cDNA Virus ND dengan *One Step* RT-PCR

*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dilakukan untuk mengamplifikasi genom RNA virus ND. Hal ini penting karena RNA harus diubah terlebih dahulu menjadi DNA oleh metode *reverse transcriptase* sebelum diamplifikasi di PCR. *One Step* RT-PCR dilakukan di *biosafety cabinet* kelas 2 (Biobase®). Produk PCR tersebut diproses berikutnya untuk elektroforesis untuk mendeteksi genom virus ND yang telah diamplifikasi.



Gambar 5.4 Elektroforesis untuk deteksi genom virus ND hasil amplifikasi dengan primer MSF1 dan MSF2. Target *band* berukuran sekitar 700 bp (warna merah). M adalah *marker*. Nomor 1 dan 2 adalah sampel virus ND.

- Rencana tahapan pada penelitian ini yang akan dilakukan selanjutnya adalah:
1. Sekuensing cDNA Virus ND
  2. Analisis Homologi Virus ND
  3. Analisis Filogenetika Molekul Virus ND
  4. Melakukan Penyisipan Plasmid *Knockout*

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

BAB 6



## BAB 7

## KESIMPULAN DAN SARAN

## 7.1 KESIMPULAN

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah telah didapatkan isolat-isolat virus ND yang telah dilakukan inokulasi pada telur ayam berembrio (TAB), untuk selanjutnya dilakukan karakterisasi secara molekuler dan berikutnya dapat dimanfaatkan sebagai acuan untuk pengembangan dasar kandidat *seed* vaksin bivalen dengan H5N1 menggunakan teknologi KO pada industri vaksin dalam inovasi produk vaksin yang mampu melawan serangan ND dan H5N1 secara lebih efektif.

## 7.2 SARAN

Saran dari penelitian ini adalah perlu adanya hasil dari inokulasi virus ND pada TAB SPF (*specific pathogen free*) dan sel kultur.



## DAFTAR PUSTAKA

- Ababneh, M.M., A.E. Dalab, S.R. Alsaad, M.B. Al-Zghoul and M.Q. Al-Natour. 2012. Molecular Characterization of a Recent Newcastle Disease Virus Outbreak in Jordan. *Res Vet Sci*. 93(3): 1512-4.
- Abdisa, T. and T. Tagesu. 2017. Review on Newcastle Disease of Poultry and Its Public Health Importance. *J Vet Sci Technol*. 8: 441.
- 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.
- Doyle, T. 1927. A Hitherto Unrecorded Disease of Fowls due to Filter Passing Virus. *J. Comp. Pathol. Therap*. 40: 144-169.
- Ewies, S.S., S. Ali, S.M. Tamam and H.M. Madbouly. 2017. Molecular Characterization of Newcastle Disease Virus (Genotype VII) from Broiler Chickens in Egypt. *Beni-Seuf Univ. J. Appl. Sci*. 6(3): 232-237.
- Farooq, M., U. Saliha, M. Munir and Q.M. Khan. 2014. Biological and Genotypic Characterization of the Newcastle Disease Virus Isolated from Disease Outbreaks in Commercial Poultry Farms in Northern Punjab, Pakistan. *Virology Rep*. 3-4: 30-39.
- Ferreira, H.L., J.F. Pirlot, F. Reynard, T. van den Berg, M. Bublot and B. Lambrecht. 2012. Immune Responses and Protection against H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Induced by the Newcastle Disease Virus H5 Vaccine in Ducks. *Avian Dis*. 56(4 Suppl.): 940-948.
- Forrester, N.L., S.G. Widen, T.G. Wood, A.P. Travassos da Rosa, T.G. Ksiazek, N. Vasilakis and R.B. Tesh. 2013. Identification of a New Newcastle Disease Virus Isolate from Indonesia Represents an Ancestral Lineage of Class II Genotype XIII. *Virus Genes*. 47(1): 168-172.
- Ganar, K., M. Das, S. Sinha and S. Kumar. 2014. Newcastle Disease Virus: Current Status and Our Understanding. *Virus Res*. 184: 71-81.
- Kapczynski, D.R., C.L. Afonso and P.J. Miller. 2013. Immune Responses of Poultry to Newcastle Disease Virus. *Dev Comp Immunol*. 41(3): 447-453.
- Kawaoka, Y. and G. Neumann. 2012. Influenza Viruses: an Introduction. *Methods Mol Biol*. 865: 1-9.

- Kobayashi, H., K. Iwatsuki-Horimoto, M. Kiso, R. Uraki, Y. Ichiko, T. Takimoto and Y. Kawaoka. 2013. A Replication-incompetent Influenza Virus Bearing the HN Glycoprotein of Human Parainfluenza Virus as a Bivalent Vaccine. *Vaccine*. 31(52): 6239-46.
- Kraneveld, F. 1926. Over een in Ned-Indie heerschende Ziete onder het pluimves. *Ned. Indisch Bl. Diergeneesk.* 38: 448-450.
- Lamb, R. and G. Parks. 2007. Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D.M., P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, S.E. Straus. (Eds.) *Fields Virology*. 5th. ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 1449-1496.
- Li, X., Y. Qiu, A. Yu, T. Chai, X. Zhang, J. Liu, D. Wang, H. Wang, Z. Wang and C. Song. 2009. Degenerate Primers based RT-PCR for Rapid Detection and Differentiation of Airborne Chicken Newcastle Disease Virus in Chicken Houses. *J Virol Methods*. 158: 1-5.
- Liu, H., R.S. de Almeida, P. Gil and E. Albina. 2017. Comparison of The Efficiency of Different Newcastle Disease Virus Reverse Genetics Systems. *J Virol Methods*. 249: 111-116.
- Markos, T. and N. Abdela. 2016. Epidemiology and Economic Importance of Pullorum Disease in Poultry: A Review. *Glob Vet.* 17: 228-237.
- 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.
- Miller, P.J., C.L. Afonso, J. El Attrache, K.M. Dorsey, S.C. Courtney, Z. Guo and D.R. Kapczynski. 2013. Effects of Newcastle Disease Virus Vaccine Antibodies on the Shedding and Transmission of Challenge Viruses. *Dev. Comp. Immunol.* 41: 505-513.
- Miller, P.J., E.L. Decanini and C.L. Afonso. 2010. Newcastle Disease: Evolution of Genotypes and The Related Diagnostic Challenges. *Infect. Genet. Evol.* 10: 26-35.
- Miller, P.J., K.M. Dimitrov, D. Williams-Coplin, M.P. Peterson, M.J. Pantin-Jackwood, D.E. Swayne, D.L. Suarez and C.L. Afonso, C.L. 2015. International Biological

- Engagement Programs Facilitate Newcastle Disease Epidemiological Studies. *Front. Public Health*. 3: 235.
- Murakami, S., T. Horimoto, M. Ito, R. Takano, H. Katsura, M. Shimojima and Y. Kawaoka. 2012. Enhanced Growth of Influenza Vaccine Seed Viruses in Vero Cells Mediated by Broadening the Optimal pH Range for Virus Membrane Fusion. *J Virol*. 86(3): 1405-1410.
- Nath, B. and S. Kumar. 2017. Emerging Variant of Genotype XIII Newcastle Disease Virus from Northeast India. *Acta Trop*. 172: 64-69.
- Nidom, C.A., S. Yamada, R.V. Nidom, K. Rahmawati, M.Y. Alamudi, Kholik, S. Indrasari, R.S. Hayati, K. Iwatsuki-Horimoto and Y. Kawaoka. 2012. Genetic characterization of H5N1 influenza viruses isolated from chickens in Indonesia in 2010. *Virus Genes*. 44(3): 459-465.
- Nidom, R.V., M.Y. Alamudi, S. Sillehu, S. Indrasari, R.D. Suindarti, E. Qurnianingsih, Y.P. Dachlan, Aryati, A. Syahrani, K. Rachmawati, K.P. Santoso and Chairul A Nidom. Construction of Indonesian-Strain Avian Flu Virus Seed Vaccine Using Low Pathogenic Hemagglutinin Gene and Neuraminidase Pr8 Gene through Reverse Genetics. *J Vaccines Immunol*. 3(1): 005-011.
- Ozawa, M., S.T. Victor, A.S. Taft, S. Yamada, C. Li, M. Hatta, S.C. Das, E. Takashita, S. Kakugawa, E.A. Maher, G. Neumann and Y. Kawaoka. 2011. Replication-incompetent Influenza A Viruses that Stably Express a Foreign Gene. *J Gen Virol*. 92(Pt 12): 2879-2888.
- Panus, A., S. Setyaningsih and N.L.P.I. Mayasari. 2015. Newcastle Disease Virus Infection Study on Duck and Chicken in Subang District. *JITV*. 20(2): 56-69.
- Putri, D.D., E. Handharyani, R.D. Soejodono, A. Setiyono, N.L.P.I. Mayasari and O.N. Poetri. 2017. Pathotypic Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated from Vaccinated Chicken in West Java, Indonesia. *Vet World*. 10(4): 438-444.
- Qurnianingsih, E. 2018. Desain Seed Vaksin Bivalen Virus Influenza A melalui Metode Knockout dengan Menggunakan Virus H1N1 dan H5N1 (Flu Burung) Isolat Manusia di Indonesia. Disertasi. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Samal, S.K. 1997. Newcastle Disease Virus. Maryland Regional College of Veterinary Medicine University of Maryland. Virginia, USA.



- Samal, S.K. 2011. Newcastle Disease and Related Avian Paramyxoviruses. Vol. I. The Biology of Paramyxoviruses. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
- Serrão, E., J. Meers, R. Pym, R. Copland, D. Eagles and J. Henning. 2012. Prevalence and Incidence of Newcastle Disease and Prevalence of Avian Influenza Infection of Scavenging Village Chickens in Timor-Lesté. *Prev Vet Med.* 104(3-4): 301-8.
- Terregino C. and I. Capua. 2009. Clinical Traits and Pathology of Newcastle Disease Infection and Guidelines for Farm Visit and Differential Diagnosis. In: I. Capua and D.J. Alexander. *Avian Influenza and Newcastle Disease*. Springer, Milano.
- Ui, H., S. Yamayoshi, R. Uraki, M. Kiso, K. Oishi and S. Murakami. 2017. Evaluation of Seasonal Influenza Vaccines for H1N1pdm09 and Type B Viruses based on a Replication-incompetent PB2-KO Virus. *Vaccine.* 35(15): 1892-1897.
- Uraki, R., Z. Piao, Y. Akeda, K. Iwatsuki-Horimoto, M. Kiso, M. Ozawa, K. Oishi and Y. Kawaoka. 2015. A Bivalent Vaccine based on a PB2-Knockout Influenza Virus Protects Mice from Secondary Pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.* 212(12): 1939-1948.
- Wahyono, N. D. and M. M. D. Utami. 2018. A Review of the Poultry Meat Production Industry for Food Safety in Indonesia. *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series.* 953: 012125.
- Wiseman, A., E.M. Berman and E. Klement. 2018. Risk Factors for Newcastle Disease in Broiler Farms in Israel. *Prev Vet Med.* 149: 92-97.
- Wong, S. and R.J. Webby. 2013. Traditional and New Influenza Vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 26(3): 476-492.
- Xiang, B., L. Han, P. Gao, R. You, F. Wang, J. Xiao, M. Liao, Y. Kang and T. Ren. 2017. Spillover of Newcastle Disease Viruses from Poultry to Wild Birds in Guangdong Province, Southern China. *Infect Genet Evol.* 55: 199-204.
- Xiao, S., A. Paldurai, B. Nayak, A. Samuel, E.E. Bharoto, T.Y. Prajitno, P.L. Collins and S.K. Samal. 2012. Complete Genome Sequences of Newcastle Disease Virus Strains Circulating in Chicken Populations of Indonesia. *J Virol.* 86(10): 5969-70.
- Xie, Z., L. Xie, A. Chen, J. Liu, Y. Pang, X. Deng and Q. Fan. 2012. Complete Genome Sequence Analysis of a Newcastle Disease Virus Isolated from a Wild Egret. *J Virol.* 86(24): 13854-13855.

- Yuan, X., Y. Wang, J. Yang, H. Xu, Y. Zhang, Z. Qin, H. Ai and J. Wang, 2012. Genetic and Biological Characterizations of a Newcastle Disease Virus from Swine in China. *Virology* 9: 129.
- Yune, N. and N. Abdela. 2017. Update on Epidemiology, Diagnosis and Control Technique of Newcastle Disease. *J Vet Sci Technol*. 8: 429.
- Zhao, P., L. Sun, X. Sun, S. Li, W. Zhang, L.A. Pulscher, H. Chai and M. Xing, 2017. Newcastle Disease Virus from Domestic Mink, China, 2014. *Vet Microbiol*. 198: 104-107.



## LAMPIRAN (ARTIKEL ILMIAH)

## KONSTRUKSI SEED VAKSIN BIVALEN VIRUS INFLUENZA MELALUI METODE KNOCKOUT MENGGUNAKAN VIRUS NEWCASTLE DISEASE DAN FLU BURUNG H5N1 DI INDONESIA

### Latar Belakang

Penyakit tetelo atau *Newcastle disease* (ND) disebabkan oleh galur virulen dari *avian paramyxovirus virus serotype 1* (APMV-1) yang juga dikenal sebagai virus Newcastle disease. Infeksi oleh virus ND yang virulen dikaitkan dengan gejala klinis neurologis, pernapasan, paralisis, dan mortalitas tinggi pada unggas, termasuk ayam. Penyakit ND menyebabkan kerugian ekonomi karena kematian, morbiditas, retardasi pertumbuhan, dan penurunan produksi telur, serta kerugian yang terkait dengan reaksi pasca vaksinasi (Xiang *et al.*, 2017). Selain itu, sejak 2003 hingga saat ini unggas Indonesia terserang penyakit baru yang lebih mematikan dan menular kepada manusia yaitu virus *avian influenza* (AI) (Nidom *et al.*, 2012). Pengendalian kedua virus tersebut yaitu virus ND dan AI dilakukan melalui program vaksinasi.

Virus ND adalah virus yang berbentuk pleomorfik dengan diameter sekitar 200-300 nm. Virus ND memiliki serotipe tunggal (APMV-1) dan memiliki ukuran genom sekitar 15.2 kb yang tidak tersegmentasi, beruntai tunggal, genom RNA *negative-sense* yang menyandikan nukleokapsid protein (NP), fosfoprotein (P), *matrix protein* (M), *fusion protein* (F), protein hemagglutinin-neuraminidase (HN), RNA-dependent RNA polymerases atau RdRps (L), serta dua tambahan protein nonstruktural, V dan W, yang dihasilkan oleh proses RNA *editing* dari gen P (Ganar *et al.*, 2014; Xiang *et al.*, 2017). Dari sejumlah protein tersebut hanya protein F dan HN yang mempunyai peranan dalam proses kekebalan karena dapat merangsang pembentukan antibodi protektif. Protein F merupakan target utama respon imun dan memiliki sifat imunogenik yang tinggi (Choi *et al.*, 2010).

Penyakit ND ditularkan melalui kontak langsung dengan unggas yang terinfeksi atau karier, melalui kontak dengan sekresi dan ekskresi unggas yang terinfeksi, serta melalui udara (Li *et al.*, 2009). Kutu, hewan pengerat, serangga, dan anjing juga dapat berperan sebagai vektor mekanik virus ND dari feses yang terinfeksi. Virus ND mampu menginfeksi hampir semua spesies unggas, baik unggas liar maupun yang sudah didomestikasi. Selain menginfeksi unggas, infeksi alami virus ND juga ditemukan pada babi, domba, dan cerpelai bahkan ada laporan kasus pada manusia (Yune and Abdela, 2017). Penyakit ND merupakan penyakit yang sangat penting dalam dunia peternakan yang dikategorikan oleh OIE sebagai *notifiable disease*. Infeksi virus ND selain dapat menyebabkan angka kematian mencapai 100%, juga dapat memberi dampak yang hebat bagi sektor ekonomi sehingga menimbulkan terjadinya pembatasan perdagangan internasional pada produk unggas dan embargo pada area atau negara yang mengalami wabah ND (Capua and Alexander, 2009; Cornax *et al.*, 2012).

*Outbreak* dari ND telah dilaporkan diberbagai negara di dunia, seperti Jepang (Mase *et al.*, 2002), Timor Leste (Serrão *et al.*, 2012), Yordania (Ababneh *et al.*, 2012), Pakistan (Farooq *et al.*, 2014), India (Nath and Kumar, 2017), Mesir (Ewies *et al.*, 2017), Israel (Wiseman *et al.*, 2018), dan juga di Indonesia (Xiao *et al.*, 2012; Panus *et al.*, 2015;

Putri *et al.*, 2017). Hal ini memberikan dampak yang besar pada peternakan unggas khususnya di negara berkembang. Disisi lain, industri unggas adalah penyumbang utama terhadap pasokan pangan global. Daging unggas dan telur adalah sumber protein hewani yang paling ekonomis yang tersedia di seluruh dunia. Pada tahun 2013, Amerika Serikat menduduki peringkat pertama sebagai penghasil daging unggas. Selain itu di Asia, Indonesia menduduki peringkat keempat setelah Cina, India, dan Iran (Wahyono and Utami, 2018).

Kesulitan lain dalam mengembangkan vaksin untuk memberikan hasil yang lebih baik terkait imunogenisitas, perlindungan silang terhadap galur heterogen, biaya yang lebih murah, cakupan yang luas, masa simpan yang lama, dan pengiriman yang efisien. Virus AI dan ND merupakan virus RNA yang mudah terjadi perubahan dan pergeseran antigenik dalam gen H dan N dari virus AI, vaksin tersebut dapat kehilangan keampuhannya. Masalah ini terutama menjadi perhatian untuk virus *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) (Kawaoka and Neumann, 2012). Vaksin virus ND juga dapat menghadapi masalah yang besar yang diakibatkan oleh keragaman gen fusi, yang diekspresikan dalam 16 genotipe virus yang berbeda dengan beberapa keragaman antigenik (Miller *et al.*, 2013).

Upaya terkini yang bisa dilakukan adalah dengan menggunakan teknologi *reverse genetic* terutama untuk mengubah sifat ganas dari suatu virus (Nidom *et al.*, 2017). Sedangkan untuk penerapan efisiensi dalam pembuatan vaksin bivalen dilakukan melalui teknologi *knockout* (KO) dengan dasar tubuh (*backbone*) virus influenza, dimana teknik ini didesain agar satu virus direkayasa untuk bisa membawa dua (bivalen) atau tiga (trivalen) protein antigen (Uraki *et al.*, 2015). Keuntungan dan kelebihan dari teknologi KO ini adalah virus seed vaksin yang dihasilkan dapat sekaligus membawa dua atau tiga antigen sekaligus dan dapat digunakan untuk menjawab persoalan efisiensi biaya serta waktu, seperti yang dihadapi pada produksi vaksin secara tradisional (Wong and Webby, 2013).

Berdasarkan permasalahan tersebut perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui tingkat homologi nukleotida gen penyandi protein F virus ND dari ayam isolat lapang dibandingkan dengan virus vaksin lentogenik yang digunakan di Indonesia, menganalisis hubungan kekerabatan per penyandi protein F virus ND dari ayam isolat lapang dengan virus vaksin lentogenik yang digunakan di Indonesia dan virus ND lainnya pada GenBank<sup>®</sup>. Untuk selanjutnya, dapat dimanfaatkan sebagai acuan untuk pengembangan dasar kandidat seed vaksin bivalen dengan H5N1 menggunakan teknologi KO pada industri vaksin dalam inovasi produk vaksin yang mampu melawan serangan ND dan H5N1 secara lebih efektif.

## **Bahan dan Metode**

### **Pengambilan Sampel Penelitian**

Sampel diambil dari swab kloaka ayam di peternakan. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara diulas menggunakan BD BBL<sup>™</sup> CultureSwab<sup>™</sup>. Tabung diberi kode berdasarkan jenis, asal, dan tanggal pengambilan sampel. Sampel ditransportasikan dalam rantai dingin (4-8 °C) dan dibawa ke laboratorium untuk disimpan pada *deep freezer* (-80 °C) sampai saat akan dilakukan pengujian.

### **Isolasi Virus Newcastle Disease**

Isolasi virus menggunakan TAB SAN yang berumur 8-10 hari. Proses sentrifugasi dilakukan pada 1500 rpm selama 15 menit, diinokulasikan pada cairan alantois TAB masing-masing sebanyak 0.2 mL dan dilakukan inkubasi TAB dilakukan selama 5 hari

pada suhu 37 °C (OIE, 2012). Pengamatan dilakukan setiap 8 jam untuk setiap TAB dan untuk TAB yang mati disimpan di dalam refrigerator. Sedangkan, jika TAB yang embrionya masih hidup sampai hari ke-5 inkubasi, maka TAB disimpan semalaman pada refrigerator. Cairan alantois dipanen dari TAB kemudian dilakukan uji ada tidaknya aktivitas virus dengan uji HA dan RT-PCR sebagai penegakkan bahwa virus yang terisolasi adalah virus ND.

#### Identifikasi Virus *Newcastle Disease*

Larutan PBS sebanyak 25 µL dimasukkan ke dalam setiap sumuran. Sumuran pertama diisi 25 µL sampel cairan alantois yang telah dipanen. Kemudian dilakukan pengenceran hingga sumuran ke-11 dan ditambahkan kembali PBS 25 µL pada setiap sumuran. Eritrosit 1% sebanyak 25 µL ditambahkan pada setiap sumuran. Selanjutnya dihomogenkan secara perlahan yang kemudian diinkubasi selama 40 menit pada suhu ruang. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya aglutinasi dari sel darah merah pada dasar sumuran plat yang terlihat seperti pasir (OIE, 2012).

#### Ekstraksi RNA Virus *Newcastle Disease*

Ekstraksi RNA virus ND dilakukan di *biosafety cabinet* kelas 2 (Biobase®). Isolasi RNA virus dari sampel menggunakan *Roche High Pure Viral Nucleic Acid kit* (Roche Molecular Systems, Inc.). Sampel swab kloaka sebanyak 200 µL terlebih dahulu dipersiapkan pada *microtube* (Eppendorf®) sebanyak 2 mL yang kemudian ditambahkan *working solution* 200 µL dan 50 µL *proteinase K*. Sampel diinkubasi pada suhu 72 °C selama 10 menit dan dilanjutkan dengan penambahan 100 µL *binding buffer*, kemudian dihomogenkan. Suspensi dipindahkan pada high pure filter tube kemudian disentrifugasi selama 1 menit 8000 g. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 500 µL *inhibitor removal buffer*, dan disentrifugasi selama 1 menit 8000 g. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 450 µL *wash buffer* dan disentrifugasi selama 1 menit 8000 g (supernatan dibuang dan ulangi). Supernatan dibuang kemudian disentrifugasi selama 10 detik 13000 g. *Filter tube* dipindahkan ke *microtube* baru dan ditambahkan 50 µL *elution buffer* selanjutnya di inkubasi selama 10 menit. Tahap terakhir dilakukan sentrifugasi 8000 g selama 1 menit. RNA yang berhasil diisolasi kemudian disimpan dalam *freezer* -80 °C sampai saat akan dilakukan pengujian.

#### Pengukuran Konsentrasi RNA Virus *Newcastle Disease*

Konsentrasi RNA diukur untuk memastikan *template* untuk RT-PCR telah cukup. Pertama, dimasukkan 200 µL Quant-iT™ TM Working Solution (Quant-iT™ RNA Assay Kit, Invitrogen) pada Qubit™ Assay Tubes (Invitrogen). Lalu, 2 µL RNA dimasukkan ke dalam tube tersebut. Campuran ini diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Setelah itu, diproses untuk mengukur konsentrasi RNA menggunakan Qubit™ Fluorometer (Invitrogen). Sampel RNA yang telah dideteksi oleh fluorometer diproses untuk RT-PCR.

#### Sintesis cDNA Virus *Newcastle Disease* dengan *One Step* RT-PCR

*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dilakukan untuk mengamplifikasi genom RNA virus ND. Hal ini penting karena RNA harus diubah terlebih dahulu menjadi DNA oleh metode *reverse transcriptase* sebelum diamplifikasi di PCR. *One Step* RT-PCR dilakukan di *biosafety cabinet* kelas 2 (Biobase®). 24 µL RT-PCR *master mix* (Superscript® III One-Step RT-PCR System dengan Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen) dimasukkan pada *microtube* 100 µL. Lalu, ditambahkan 1 µL RNA. Tube dimasukkan ke thermal cycler PCR (Applied Biosystems™). Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen penyandi protein F virus ND disajikan pada tabel 4.1. Reaksi PCR untuk mengamplifikasi DNA yaitu menggunakan hasil cDNA virus ND dengan metode PCR.

Thermal cycler PCR diatur dengan pre-denaturation selama 10 menit dengan suhu 94 °C, denaturation selama 1 menit dengan suhu 94 °C, annealing selama 1 menit dengan suhu 56 °C, extension selama 2 menit dengan suhu 72 °C, dan perpanjangan extension selama 10 menit dengan suhu 72 °C. Siklus PCR ini berulang selama 40 kali. Produk dari PCR (amplikon) disimpan pada suhu 4 °C. Produk PCR tersebut diproses berikutnya untuk elektroforesis untuk mendeteksi genom virus ND yang telah diamplifikasi.

Tabel 1. Daftar Primer *Forward* dan *Reverse* pada Deteksi Virus ND berdasarkan Gen *Fusion (F)* (Harsoe *et al.* 2014).

MFS1/MSF2		
<i>Forward</i>		
GAC CGC TGA CCA CGA GGT TA	~700 bp	4306-4326
<i>Reverse</i>		
AGT CGG AGG A TG T T G GCA GC		4981-5005

### Elektroforesis Gel

Elektroforesis gel digunakan untuk visualisasi hasil dari produk PCR. 1,5% gel agarosa dimasukkan ke dalam perangkat elektroforesis (Bio-Rad Laboratories). Selanjutnya, 7 µL BlueJuice (10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen) diletakkan di parafilm, lalu 1 µL amplikon ditambahkan. Berikutnya, campuran tersebut dimasukkan ke dalam well gel agarosa. Sebanyak 8 µL 100 bp DNA ladder digunakan sebagai marker (GENEON) dimasukkan ke well gel agarosa. Marker ditempatkan pada well nomor 1, lalu sampel ditempatkan di well berikutnya. Perangkat elektroforesis dijalankan pada 100 V, 400 mA selama 40 menit. Hasil dari elektroforesis divisualisasikan dengan menggunakan Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories).

### Sekuensing cDNA Virus *Newcastle Disease*

Sekuensing adalah metode untuk mengetahui tipe nukleotida yang tersusun pada genom yang teramplifikasi (produk PCR). Produk PCR dipurifikasi dengan QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen). Setelah proses purifikasi, dilakukan pelabelan menggunakan BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™). Lalu dilakukan penambahan sebanyak 5 µL BigDye<sup>®</sup> Terminator 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems™). Selanjutnya, ditambahkan 5 µL amplikon yang telah dipurifikasi, 1,5 µL primer forward dan reverse dimasukkan, dan 7 µL Nuclease Free Water (Promega). Proses berikutnya adalah memasukkan ke dalam thermal cycler (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems™). Thermal cycler tersebut diprogram dengan suhu 96 °C untuk proses *heating* pada *microtube* selama 3 menit, lalu 96 °C selama 10 detik, 50 °C selama 5 detik, 60 °C selama 4 menit. Siklus ini berulang selama 25 kali. Langkah terakhir adalah dengan suhu 4 °C hingga sampel siap dipresipitasi. Presipitasi dilakukan dengan menggunakan 100 µL dari 100% konsentrasi alkohol untuk setiap tube.

### Analisis Data Molekuler

Analisis molekuler adalah metode yang melakukan kombinasi dan perbandingan urutan nukleotida yang telah dibaca oleh *thermal cycler*. Urutan nukleotida dianalisis dengan perangkat lunak *Biological Sequence Alignment Editor* (BioEdit) versi 8.0 dan *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 6.0. Proses *alignment* dilakukan menggunakan ClustalW yang tersedia di BioEdit versi 8.0.

## Hasil dan Pembahasan

### Inokulasi Sampel Virus ND

Tujuan dari inokulasi virus pada TAB adalah untuk memperbanyak virus ND yang telah didapatkan.

### Uji Haemagglutination (HA)

Hasil positif pada uji ini adalah ditunjukkan dengan adanya aglutinasi dari sel darah merah pada dasar samurai plat yang terlihat seperti pasir. Uji HA digunakan untuk mengukur titer virus/antigen secara kuantitas. Virus yang bisa dilakukan uji HA hanya virus yang dapat mengaglutinasi sel darah merah seperti virus ND. Prinsip uji HA adalah terjadinya ikatan antara virus/antigen dengan sel darah merah yang ditandai dengan adanya agglutinasia (butiran seperti pasir). Pembentukan agglutinasia ini disebabkan karena adanya ikatan virus/antigen dengan sel darah merah. Titer virus/antigen dapat diketahui dengan melihat adanya agglutinasia di dasar lubang dari microplate pada lubang terakhir/pengenceran tertinggi. misal terjadinya agglutinasia sampai lubang ke 8, maka titer virus/antigen tersebut adalah  $\log_2^8$ , sementara untuk *well* yang negatif (tidak adanya virus/antigen) apabila *microplate* dimiringkan 45 derajat sel darah merah akan turun.

Tabel 2 Hasil Uji HA Sampel Virus ND

Nomor Sampel	Hasil Uji HA (Titer)
1	$2^3$
2	$2^4$
3	$2^5$
4	$2^4$
5	$2^4$
6	$2^4$
7	$2^3$
8	$2^4$
9	$2^4$
10	$2^4$
11	$2^4$
12	$2^3$
13	$2^1$
14	$2^5$
15	$2^3$
16	$2^5$
17	$2^5$
18	$2^4$
19	$2^3$
20	$2^4$
21	$2^4$
22	$2^4$
23	$2^4$
24	$2^2$
25	$2^4$
26	$2^4$
27	$2^4$
28	$2^4$

29	$2^4$
30	$2^5$
31	$2^7$
32	$2^{14}$
33	$2^7$
34	$2^{12}$
35	$2^{13}$
36	$2^{13}$
37	$2^{12}$
38	$2^{12}$
39	$2^{12}$
40	$2^9$
41	$2^{12}$
42	$2^4$
43	$2^{12}$
44	$2^{12}$
45	$2^{11}$
46	$2^{11}$
47	$2^{12}$
48	$2^9$
49	$2^{10}$
50	$2^{12}$
51	- (negatif)
52	- (negatif)
53	$2^1$
54	$2^2$
55	$2^2$
56	$2^3$
57	$2^2$
58	$2^2$
59	$2^2$
60	$2^1$

### Ekstraksi RNA Virus ND

Ekstraksi RNA virus ND dilakukan di *biosafety cabinet* kelas 2 (Biobase<sup>®</sup>). Isolasi RNA virus dari sampel menggunakan QIAamp Viral RNA Mini Kit. Sampel sebanyak 140  $\mu$ L terlebih dahulu dipersiapkan pada *microtube* (Eppendorf<sup>®</sup>) sebanyak 2 mL yang kemudian ditambahkan *working solution* 200  $\mu$ L dan 50  $\mu$ L proteinase K. Sampel diinkubasi pada suhu 57 °C selama 10 menit dan dilanjutkan dengan penambahan 100  $\mu$ L *binding buffer*, kemudian dihomogenkan. Suspensi dipindahkan pada *high pure filter tube* kemudian disentrifugasi selama 1 menit 8000 g. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 500  $\mu$ L inhibitor removal buffer, dan disentrifugasi selama 1 menit 8000 g. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 450  $\mu$ L wash buffer dan disentrifugasi selama 1 menit 8000 g (supernatan dibuang dan ulangi). Supernatan dibuang kemudian disentrifugasi selama 10 detik 13000 g. *Filter tube* dipindahkan ke *microtube* baru dan



ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  elution buffer selanjutnya di inkubasi selama 10 menit. Tahap terakhir dilakukan sentrifugasi 8000 g selama 1 menit. RNA virus yang berhasil diisolasi kemudian disimpan dalam *freezer*  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  sampai saat akan dilakukan pengujian.

#### Pengukuran Konsentrasi RNA Virus ND

Konsentrasi RNA diukur untuk memastikan *template* untuk RT-PCR telah cukup. Pertama, dimasukkan 200  $\mu\text{L}$  Quant-iT™ Working Solution (Quant-iT™ RNA Assay Kit, Invitrogen) pada Qubit™ Assay Tubes (Invitrogen). Lalu, 2  $\mu\text{L}$  RNA dimasukkan ke dalam tube tersebut. Campuran ini diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Setelah itu, diproses untuk mengukur konsentrasi RNA menggunakan Qubit™ Fluorometer (Invitrogen). Sampel RNA yang telah dideteksi oleh fluorometer diproses untuk *one step* RT-PCR.

#### Sintesis cDNA Virus ND dengan *One Step* RT-PCR

*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dilakukan untuk mengamplifikasi genom RNA virus ND. Hal ini penting karena RNA harus diubah terlebih dahulu menjadi DNA oleh metode *reverse transcriptase* sebelum diamplifikasi di PCR. *One Step* RT-PCR dilakukan di *biosafety cabinet* kelas 2 (Biobase®). Produk PCR tersebut diproses berikutnya untuk elektroforesis untuk mendeteksi genom virus ND yang telah diamplifikasi.



Gambar 1. Elektroforesis untuk deteksi genom virus ND hasil amplifikasi dengan primer MSF1 dan MSF2. Target *band* berukuran sekitar 700 bp (warna merah). M adalah *marker*. Nomor 1 dan 2 adalah sampel virus ND.

#### KESIMPULAN

Penelitian ini telah mendapatkan isolat virus ND isolat lapang dan dilakukan propagasi di TAB lalu karakterisasi molekuler dengan menggunakan primer MSF1 dan MSF2. Untuk selanjutnya dapat digunakan sebagai dasar pada penelitian selanjutnya.

**UCAPAN TERIMA KASIH**  
Terima kasih kepada Komunitas Pendidikan untuk Mahasiswa PMDSU Batch III tahun 2017.

**MERCK**  
Young Scientist  
Award 2018

No. 028/MCLS/LS/XI/2018

# Certificate of Achievement

presented to

**Arif Nur Muhammad  
Ansori, B.Sc.**

as

# SEMIFINALIST

at

## Merck Young Scientist Award 2018

15 November 2018



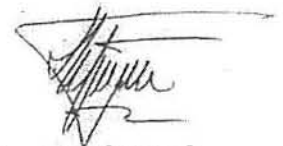
**Hermanto**

Head of Committee  
Merck Young Scientist Award 2018



**Asanga Halangoda**

Head of Research Solutions - Indonesia  
Southeast Asia  
Life Science | Research & Applied Commercial



**Syahroni**

Country Head - Indonesia  
Southeast Asia  
Life Science | Research & Applied Commercial

PT Merck Chemicals and Life Sciences  
JI.TB Simatupang No.8 Jakarta 13760

ONLY THE

HAVE SOMETHING TO FIND  
LAPORAN PENELITIAN

KONSTRUKSI SEED VAKSIN BIVALEN.

IMAGINE  
THE NEXT 350 YEARS

Celebrating ECHAIRUL A. NIDOM