

Respon Titer Antibodi dan Proteksi Virus Newcastle Disease Genotype I, II, VI dan VII Sebagai Vaksin Terhadap Infeksi Isolat Virus Newcastle Disease Chicken/Indonesia/GTT/11.
(Response of Antibody Titer and Protection of Newcastle Disease Virus Genotypes I, II, VI and VII as a Vaccine Against Infection of Newcastle Disease Virus Isolates Chicken/Indonesia/GTT/11).

Risa Indriani & NLP. Indi Dharmayanti

Balai Besar Penelitian Veteriner JL. RE Martadinata 30 Bogor 16114, E-mail : risain52@yahoo.com

Memasukkan: Januari 2016, **Diterima:** Maret 2016

ABSTRACT

The Newcastle Disease (ND) virus causes the most important disease in chicken, and very contagious in poultry in many countries. In Indonesia the Newcastle Disease or is called *tetelo* became endemic in chicken currently, the ND virus of genotype VII caused morbidity 100% and mortality 80% in chicken. The fusion and haemagglutinin-neuraminidase protein are involved in adhesion to the surface of host cells to antibodies. HN and F protein induced by the ND vaccines have neutralizing effects. The aim of this study was to compare the antibody level and protection of several ND vaccine genotypes (genotype I, II, VI and VII) in chicken against ND virus chicken / Indonesia/GTT/11 genotype VII. Our result showed that all genotype ND vaccines (I, II, VI dan VII) produce 100% protection in chicken from clinical and mortality, but the challenge virus excretion in chickens vaccinated with ND vaccine VII genotypes were significantly different ($p < 0.05$) to other groups. Response of antibody in chicken vaccinated ND genotype VII show highest mean titer (GMT 122) compared other ND vaccine. In conclusion, the ND virus chicken/Indonesia/ GTT/11 genotype VII is good to be used as inactive vaccine seed, which appropriate to the field virus circulating at this time.

Keywords: virus, Newcastle Disease, genotype, vaccine

ABSTRAK

Virus *Newcastle Disease* (ND) penyebab penyakit ND yang sangat penting, dan bersifat sangat menular pada ayam di banyak negara. Penyakit ND atau disebut juga dengan tetelo menjadi endemis di Indonesia, dan virus ND yang termasuk dalam genotipe VII menyebabkan sakit 100% dan kematian pada ayam hingga 80%. Protein *fusion* dan *haemagglutinin-neuraminidase* mempunyai peran dalam pelekatan sel permukaan dengan antibodi, dan ke dua protein tersebut diinduksi oleh virus (vaksin) yang mempunyai efek netralisasi. Studi yang bertujuan membandingkan tingkat titer antibodi dan proteksi yang diberikan dari beberapa genotipe virus ND (genotipe I, II, VI dan VII) sebagai vaksin tidak aktif pada ayam terhadap infeksi virus ND chicken/Indonesia/ GTT/11 genotipe VII telah dilakukan. Hasil studi memperlihatkan vaksin ND dari beberapa genotipe pada ayam memberikan perlindungan 100% dari gejala penyakit dan kematian, namun ekskresi virus tantangan pada ayam divaksinasi dengan vaksin ND genotipe VII berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok lain. Respon titer antibodi pada ayam divaksinasi ND genotipe VII menunjukkan rata-rata titer tertinggi (GMT 122) dibandingkan ayam divaksinasi bukan genotipe VII. Kesimpulan dari studi ini memperlihatkan virus ND chicken/Indonesia/GTT/11 genotipe VII baik dijadikan sebagai seed vaksin ND tidak aktif, dan sesuai dengan virus lapangan yang bersirkulasi saat ini.

Kata Kunci: virus, *Newcastle Disease*, genotipe, vaksin

PENDAHULUAN

Newcastle Disease (ND) adalah penyakit penting dan sangat menular pada ayam di banyak negara (Orsi *et al.* 2010; Haque *et al.* 2010; Narayanan *et al.* 2010). Penyakit ND disebabkan oleh virus ND Paramyxovirus tipe-1 (PMV-1) yang termasuk dalam keluarga *Paramyxoviridae* (Miller *et al.* 2010). Virus ND mempunyai *negative-stranded*

RNA dan enam protein yaitu; protein *fusion*, *haemagglutinin-neuraminidase*, *nucleoprotein*, *phosphoprotein*, *matrix* dan *polymeraseRNA* (Czegledi *et al.* 2006; ICTV 2005; Leeuw & Peeters 1999). Protein F dan HN terlibat dalam pelekatan (adhesi) sel-sel permukaan dengan antibodi dan ke dua protein diinduksi oleh virus (vaksin) ND yang mempunyai efek netralisasi. Virus ND menginfeksi ayam dapat dibagi dalam lima *pathotypes* yaitu:

vescerotropic-velogenic, neurotropic-velogenic, mesogenic, lentogenic dan asymptomatic. Velogenic dan mesogenic pathotypes menyebabkan gejala penyakit pada ayam seperti; diare, gangguan pernafasan, gangguan syaraf dan tingkat kematian tinggi, sedangkan virus *lentogenic* tidak menyebabkan gejala penyakit (Beard & Hanson 1984).

Pencegahan infeksi virus ND di Indonesia difokuskan pada biosekuriti dan vaksinasi menggunakan vaksin aktif dan tidak inaktif. Vaksin ND digunakan secara luas untuk mengurangi gejala penyakit dari infeksi endemis dengan virulensi rendah, melindungi ayam terhadap penyakit yang tidak virulen (Shunlin *et al.* 2009). Vaksin strain ND *Lentogenic* (Lasota and B1) dan *mesogenic* (Kumarov) digunakan sebagai vaksin aktif, sedangkan strain *velogenic* digunakan sebagai vaksin tidak aktif (vaksin emulsi). Vaksin ND aktif dan tidak aktif digunakan di dalam peternakan ayam di Indonesia, meskipun memiliki kekurangan dan kelebihan (Senne *et al.* 2004; Miller *et al.* 2009). Vaksin aktif lebih murah diproduksi dan dapat diberikan lewat minum atau *arosal*, sedangkan vaksin tidak aktif lebih mahal, tetapi lebih aman untuk digunakan. Walaupun vaksin ND telah diterapkan di Industri unggas penyakit ini masih menjadi masalah bagi peternak, Strain virus ND mempunyai perbedaan yang signifikan di dalam biologi, sitologi dan genetiknya (Liang *et al.* 2002). Hal itu menjadi alasan utama, mengapa wabah ND masih terjadi pada unggas divaksinasi dalam beberapa tahun terakhir (Patti *et al.* 2007).

Di Indonesia kasus ND menjadi endemik pada ayam, pada tahun 2007 di Bali terjadi kasus ND setiap bulan mencapai 1500-8000 ekor ayam (OIE 2009) dan pada tahun 2009 – 2010 kasus ND juga terjadi pada ayam komersial di Indonesia dan menyebabkan kematian 70 – 80% (Xiao *et al.* 2012). Isolat virus ND Indonesia telah banyak diperoleh dari lapang pada dekade 20-35 tahun yang lalu, namun informasi epidemiologi sangat terbatas. Virus RNA (ND) akan mudah bermutasi. Studi patologi dan epidemiologi penyakit ND baik di Indonesia maupun diseluruh dunia pada ayam, dan burung liar yang bermigrasi dianggap bisa menjadi pembawa (*carriers*) (Hubalek 2004). Adi *et al.* (2010) melaporkan adanya isolat virus ND noval Indonesia strain *velogenic* yang masuk dalam kelompok genotipe VII berdasarkan urutan asam amino *cleavage site* protein F dan HN. Dharmayanti *et al.*

(2014) mengidentifikasi isolat virus ND dari ayam yang telah divaksinasi dan terserang kasus ND, yang menyebabkan kematian hingga 80% pada tahun 2011 di dalam peternakan ayam komersial di Jawa Timur Indonesia. Isolat ND tersebut adalah chicken/Indonesia/GTT/11 dan berdasarkan urutan asam amino *cleavage site* protein F dan HN masuk dalam kelompok genotipe VII (Dharmayanti *et al.* 2014). Studi untuk melihat tingkat respon titer antibodi dan proteksi beberapa genotipe virus ND (Dharmayanti *et al.* 2014) terhadap isolat chicken/Indonesia/GTT/11 (Dharmayanti dkk. 2014) dilakukan, untuk mengevaluasi virus ND sebagai *seed* vaksin, yang sesuai dengan virus ND bersirkulasi saat ini di Indonesia.

BAHAN DAN CARA KERJA

Empat virus ND yang mempunyai genotipe berbeda yaitu: chicken/Indonesia/GTT/11 genotipe VII, chicken/Indonesia/1/53 genotipe VI, Indonesia/RIVS genotipe I (BBLitvet), dan Lasota (commercial) genotipe II (Dharmayanti *et al.* 2014; Mase *et al.* 2002). Virus ND diperbanyak dengan menginfeksi 10^3 EID₅₀ virus per 0,1 mL, ke dalam ruang alantois telur ayam specific pathogenic free (SPF) berembrio umur 9-11 hari, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama ≥ 48 jam. Virus ND dikumpulkan dari cairan alantois terinfeksi menjadi satu ke dalam tabung (NUNC), kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1000×g selama 15 menit. Titer virus dari setiap strain yang telah disatukan ditetapkan dengan melakukan titrasi pengenceran kelipatan 10 ke dalam ruang alantois telur ayam SPF berembrio umur 9-11 hari, dan titer hemaglutinasi (HA) diidentifikasi dengan uji hemaglutinasi dari setiap strain ND saat sebelum dan setelah tidak aktif. Cairan alantois dari setiap genotipe virus ND di buat tidak aktif, dengan menambahkan 0,1% beta-propiolactone (BPL) (Sigma, St. Louis, MO) dan diputar secara perlahan selama 4 jam pada suhu kamar, kemudian satu malam pada suhu 4°C. Virus ND yang telah tidak aktif, diuji keamanannya ke dalam ruang alantois telur ayam SPF berembrio umur 9-11 hari. Virus ND tidak aktif, bila telur terinfeksi tidak memperlihatkan kematian, dan cairan alantois tidak mengaglutinasi sel darah merah (SDM) ayam (Indriani & Dharmayanti 2014).

Emulsi vaksin *water-in-oil* disiapkan dari setiap genotipe virus ND yang tidak aktif dengan

konsentrasi antigen 256 hemaglutinasi unit (HAU) per dosis. Setiap antigen ND (chicken/Indonesia/GTT/11 genotype VII, Indonesia I/53 genotype VI, Indonesia/RIVS genotype I (BBLitvet), and Lasota (commercial) genotype II, diformulasi dengan adjuvant ISA 71VG Montanide™ (ratio antigen : adjuvant yaitu 30:70). Emulsi vaksin ND di homogenisasi di dalam tabung *Braun blender source* dan disimpan pada suhu 4°C hingga digunakan.

Ayam petelur *day old chick* / DOC (ISA Brown) sebanyak 100 ekor dipelihara dalam kandang coba laboratorium, diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Ayam umur empat minggu dipilih secara acak dan dikelompokkan menjadi lima, setiap kelompok terdiri dari 20 ekor ayam. Kelompok (1) divaksinasi ND-Indonesia GTT/11, kelompok (2) ND-Indonesia I/53, kelompok (3) ND-Indonesia/RIVS, kelompok (4) ND-Lasota, dan kelompok (5) tidak divaksinasi sebagai kontrol. Ayam divaksinasi dengan dosis vaksin 0,3 mL per ekor secara intramuskuler. Ayam umur 6 minggu (dua minggu setelah vaksinasi) dipilih 10 ekor ayam dari setiap kelompok diuji tantang dengan virus ND Indonesia/GTT/11 genotype VII. Uji tantang dengan dosis $10^{5.5}$ EID₅₀/per ekor (0,05 mL melalui tetes mata dan 0,05 mL melalui tetes hidung (Shunlin *et al.* 2009). Sampel darah ayam dikoleksi pada umur empat minggu (sebelum vaksinasi ND), umur enam minggu (setelah dua minggu vaksinasi), dan umur delapan minggu (dua minggu setelah tantang), diuji hemaglutinasi inhibisi (HI) untuk mendeteksi titer antibodi ND. Ayam uji tantang diamati setiap pagi dan sore hari, terhadap timbulnya gejala penyakit, morbiditas, dan mortalitas. Usapan orofarings dan kloaka dikoleksi pada hari ke-2, ke-5, ke-7 dan ke-14 pascatantang (Shunlin *et al.* 2009), untuk mendeteksi ekskresi virus tantang dengan diuji reisolasi, menggunakan telur ayam SPF berembrio umur 9-11 hari.

Uji hemaglutinasi inhibisi (HI) pada serum ayam coba menggunakan antigen homologus dan heterologus terhadap virus vaksin, dan prosedur mengikuti OIE (2012). Cawan mikro titer plastik dengan bentuk V pada bagian bawah, digunakan dalam uji HI. 25 µl fosfat buffer solution (PBS) dimasukkan ke dalam lubang cawan mikro, kemudian 25 µl serum sampel ditambahkan ke dalam lubang pertama, kemudian dibuat pengenceran kelipatan 2. Antigen ND 4 hemaglutinasi unit (HAU) ditambahkan kedalam setiap lubang cawan mikro, dan plate cawan

mikro digetarkan, kemudian di inkubasi pada suhu ruangan dingin ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) selama 30 menit. 25 µl sel darah merah (SDM) ayam 1% ditambahkan kedalam setiap lubang cawan mikro, dan plate cawan mikro digetarkan secara perlahan, kemudian di inkubasi pada suhu kamar dingin ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) selama 45 menit. Titer serum dinyatakan pada pengenceran tertinggi yang memperlihatkan hambatan aglutinasi (100%) pada antigen 4 HAU. Aglutinasi diuji dengan memiringkan cawan mikro. Lubang cawan mikro yang memperlihatkan SDM membentuk aliran air mata sama dengan kontrol serum positif, dianggap menghambat. Validasi hasil dibandingkan dengan kontrol serum negatif, yang tidak memberikan titer $> \frac{1}{4}$ ($> 2^2$ atau $2\log_2$). HI titer dianggap positif ketika memperlihatkan hambatan pada pengenceran serum $\geq 1/16$ ($\geq 4^2$ atau $4\log_{-2}$).

Identifikasi perbedaan antigenik diantara genotype ND, serum ayam coba dari 14 hari setelah vaksinasi diuji kros HI dan titer HI dicatat. Usapan Orfarings dan kloaka yang dikoleksi pada hari ke-2, ke-5, ke-7 dan ke-14 (Shunlin *et al.* 2009), diuji reisolasi pada telur ayam SPF berembrio umur 10 hari. Sampel yang positif, dititrisasi dengan diinfeksi ke dalam ruang alantois telur SPF tertunas umur 10 hari. Titer virus reisolasi dikalkulasi dengan metoda Reed & Munch (1938).

Data serologi kandungan antibodi (titer HI) dari sampel serum setelah vaksinasi dinyatakan dalam *geometric mean titers*. Frekuensi isolasi virus tantang di antara kelompok dianalisis dengan sidik ragam satu arah dengan *Fisher's test*.

HASIL

Virus dan Respons Vaksinasi ND

Empat virus ND yang mempunyai genotype berbeda (Dharmayanti *et al.* 2014) dipilih untuk digunakan sebagai vaksin inaktif di dalam studi ini, dan titer hemaglutinasi setiap virus ND disampaikan di dalam Tabel 1.

Ayam divaksinasi pada umur 4 minggu, dan serum ayam coba dari ayam setelah dua minggu vaksinasi di uji HI dan hasil analisa di dalam Tabel 2. Titer antibodi ND dari kelompok-kelompok divaksinasi tidak berbeda, ketika menggunakan antigen homolog dengan vaksin. Namun antigenik berbeda dalam setiap vaksin dengan uji kross HI. Empat kelipatan berbeda terlihat pada rata-rata titer *geometric* HI, antara serum dari ayam divaksinasi chicken/Indonesia/

Tabel 1. Karakteristik virus ND yang digunakan sebagai vaksin

Antigen /Virus	Titer hemaglutinasi (HA) ^a		EID ₅₀ ^b	Genotipe
	Sebelum di inaktivasi	Setelah inaktivasi		
chicken/Indonesia/RIVS	1024	512	9.3	I
Lasota	512	512	9.7	II
chicken/Indonesia I/53	128	64	7.3	VI
chicken/Indonesia/GTT/11	512	256	8.7	VII

Keterangan : a. Titer HA sebelum diinaktivasi dan setelah diinaktivasi menggunakan β -propiolacton
b. *Embryo Infected dose 50* (EID₅₀) per 0,1 mL sebagai titer kandungan virus

Tabel 2. Kross reaksi titer antibodi antara serum dengan uji HI sebelum di tantang

Serum dari vaksin ND	Antigen HI ^a			
	Indonesia/RIVS	Lasota	Indonesia I/53	Ck/Indonesia/GTT/11
Indonesia/RIVS	105^b	109	25	73
Lasota	51	111	43	68
Indonesia I/53	49	61	98	33
Indonesia/GTT/11	76	104	69	112

Keterangan : a. Uji HI dengan 4 hemaglutinasi unit (HAU) untuk setiap antigen vaksin
b. Respon homologus dengan *bold*

RIVS dengan antigen chicken/Indonesia I/53, dan ketika serum dari ayam divaksinasi chicken/Indonesia I/53 dengan antigen chicken/Indonesia/RIVS, terlihat berbeda kelipatan dua pada rata-rata titer *geometric* HI. Tiga kelipatan berbeda terlihat pada rata-rata titer *geometric* HI dari serum ayam yang divaksin Lasota, ketika digunakan antigen Lasota dan chicken/Indonesia/GTT/11.

Serum dari ayam divaksinasi chicken/Indonesia/GTT/11, titer antibodi terlihat lebih tinggi terhadap antigen homolog, dibandingkan dengan serum dari ayam yang divaksinasi strain ND lain, terhadap antigen homolog.

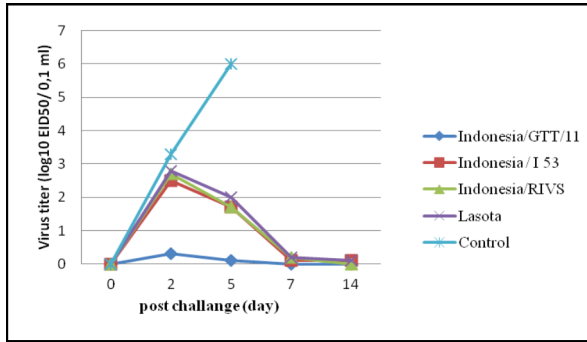
Ratan titer HI dari serum ayam setelah 14 hari tantang dianalisa, dan respons rata-rata titer meningkat kelipatan tujuh (data tidak diperlihatkan), hal ini dikarenakan infeksi virus tantang pada ayam coba.

Morbidity dan mortaliti ayam setelah diuji tantang

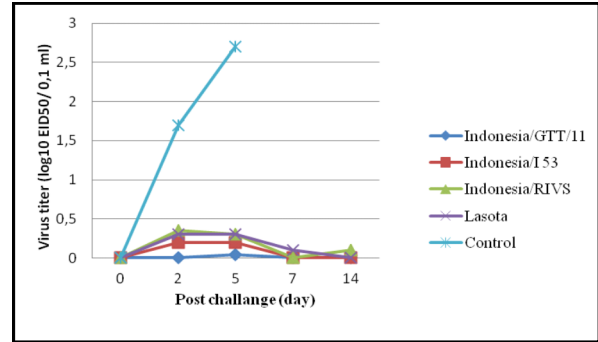
Ayam dari setiap kelompok vaksinasi ditantang dengan virus ND chicken/Indonesia/GTT/11, dan diamati setiap hari dari gejala penyakit dan kematian. Ayam dari kelompok kontrol (tidak divaksin) terlihat *conjunctivitis*, depresi yang hebat, gangguan pernafasan sebelum terjadi kematian pada hari ke-2 hingga ke-5

setelah tantang. Tingkat kematian 100% muncul pada hari ke 5 setelah tantang, dengan rata-rata waktu kematian (*mean dead time*/MDT) 3,6 hari (Tabel 3). Gambaran patologi anatomi ayam kontrol (tidak divaksin), terlihat adanya *petechial hemorrhages*, *edema* di daerah *conjunctiva* di bawah kelopak mata (Gambar 3.1), *petechial hemorrhages* pada daerah *thymus*, *multifocal hemorrhages* pada *proventriculus* dan *caecal tonsils* (Gambar 3.2 dan 3.4), juga *hemorrhage* pada *tracheal mucosa posterior* hingga *glottis*. Pada kelompok-kelompok ayam divaksinasi vaksin tidak aktif ND, dengan jelas tidak terlihat gejala penyakit ND selama uji tantang.

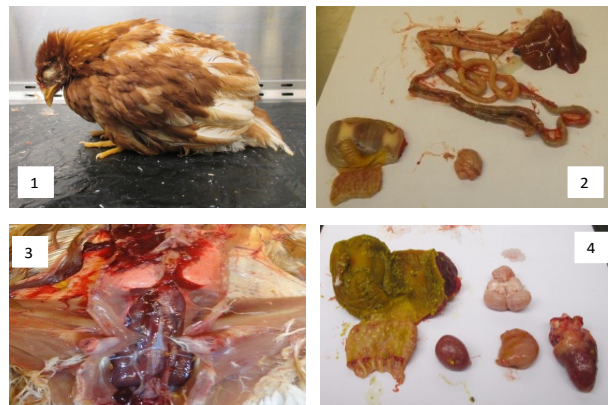
Titer virus tantang tertinggi dapat terdeteksi dari ulasan orofarings dan kloaka di dalam kelompok ayam kontrol (tidak divaksin) (Gambar 1 and 2). Pada hari ke-2 setelah tantang ekskresi virus tantang dari kloaka pada kelompok-kelompok ayam divaksin ND mempunyai titer yang rendah, dibanding ayam kelompok kontrol. Ayam divaksin chicken/Indonesia/GTT/11 memperlihatkan ekskresi virus tantang terendah dari ulasan orofarings, sedangkan melalui kloaka tidak terdeteksi, hal ini karena seed vaksin ND yang digunakan bersifat homolog dengan virus ND tantang (Gambar 2). Ekskresi titer virus



Gambar 1. Titer virus dari ulasan orofarings yang dikoleksi setelah ditantang dengan virus chicken/Indonesia/GTT/11.



Gambar 2. Titer virus dari ulasan kloaka yang dikoleksi setelah ditantang dengan virus chicken/Indonesia/GTT/11.



Gambar 3. Gangguan pernafasan penyakit yang disebabkan virus ND virulen, dan edema di dalam conjunctiva pada kelopak mata bawah (3.1), petechial hemorrhages pada saluran pencernaan termasuk caecal tonsils dan ventriculus, pembengkakan hati (3.2), pembengkakan paru (3.3), petechial hemorrhages di daerah thymus dan multifocal hemorrhages pada proventriculus (3.4).

Tabel 3. Isolasi virus setelah tantang ND Indonesia/GTT/11 pada ayam coba

Kelompok Vaksinasi	Mortalitas	Isolasi ekskresi virus (days post challenge)							
		2 ^b		5		7		14	
		oropharyngeal	cloaca	oropharyngeal	cloaca	oropharyngeal	cloaca	oropharyngeal	cloaca
Kontrol	10/10 (3,6) ^a	10/10	10/10	3/3 ^c	3/3	TD	TD	TD	TD
Indonesia/RIVS	0/10	10/10	6/10	8/10	4/10	2/10	0/10	0/10	0/10
Lasota	0/10	9/10	2/10	5/10	4/10	2/10	1/10	0/10	0/10
Indonesia I/53	0/10	8/10	3/10	6/10	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10
Indonesia/GTT/11	0/10	2/10*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

a. rata-rata waktu kematian (mean of dead time)
 b. hari setelah tantang
 c. tujuh ekor ayam mati setelah hari ke-5 tantang

* ekskresi virus tantang berbeda nyata (p<0,05) terhadap kelompok lain.
 TD. tidak dilakukan.

tantang pada semua kelompok ayam divaksinasi terlihat lebih rendah pada hari ke-5 dibanding hari ke-2 setelah tantang (Gambar 1). Ayam dari kelompok divaksinasi chicken/Indonesia/GTT/11 terlihat waktu ekskresi lebih pendek dibanding ayam-ayam dari kelompok divaksinasi ND strain lain. Dan tidak ada ekskresi virus tantang dari ayam pada semua kelompok vaksinasi pada hari ke-14 setelah tantang (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Studi ini bertujuan membandingkan tingkat titer antibodi dan proteksi dari beberapa genotipe virus ND (genotipe I, II, VI dan VII), dan melihat apakah jarak genetik strain virus vaksin ND, seperti yang disampaikan Dharmayanti et al. (2014) dapat mempengaruhi jumlah ekskresi virus setelah ayam terinfeksi virus ND sangat virulen, sehingga dapat

berdampak pada keputusan pemilihan formulasi vaksin, dan virusantang untuk menguji potensi suatu vaksin ND.

Virus ND yang digunakan pada studi ini (Tabel 1), mempunyai karakteristik virus yang berbeda dalam mengaglutinasi (HA) setelah diinaktivasi dengan B-propiolacton (Tabel 1). Titer virus Lasota terlihat tidak menurun setelah diinaktivasi, namun virus ND lainnya (Indonesia / RIVS, Indonesia I / 53 dan Indonesia / GTT / 11) mengalami penurunan satu log₂ (50%), hal ini terjadi kemungkinan karena virus Lasota lebih stabil dibanding virus ND isolat lokal Indonesia. Karakteristik 3 isolat lokal ND yang memperlihatkan penurunan saat diinaktivasi dengan B-propiolacton, memperlihatkan sifat hemaglutinasi dari virus tersebut mudah turun atau tidak stabil. King (1991) melaporkan virus ND lentogenik (Ulser) tidak memperlihatkan penurunan setelah diinaktivasi dengan 0,1% B-propiolacton, sedangkan virus ND velogenic menunjukkan penurunan setelah diinaktivasi dengan 0,1% B-propiolacton (Patti *et al.* 2007).

Titer serum dari ayam yang divaksinasi Indonesia I/53 memperlihatkan *geometric mean titer* (GMT) 98 ketika uji HI menggunakan antigen homolog (Indonesia I/53), sedangkan dengan antigen heterolog (Indonesia/GTT / 11) memperlihatkan titer *geometric mean titer* (GMT) 33 (Tabel 2), hal ini karena genotipe dari virus tersebut berbeda. Peneliti lain melaporkan hasil uji HI dari serum ayam divaksin ND genotipe berbeda, antara antigen vaksin dan antigen yang digunakan untuk uji HI, menunjukkan adanya perbedaan titer, ketika dibandingkan dengan antigen homolog (Miller *et al.* (2007). Titer antibodi ND positif adalah ≥ 16 (OIE 2012), beberapa peneliti melaporkan ayam divaksinasi ND yang mempunyai genotipe dari waktu yang lampau (genotipe I, II, IV), dan mempunyai titer >16 tidak mampu mencegah ekskresi virusantang, sampai hari ke 7 setelah ditantang virus ND yang berasal dari dekade saat ini (genotipe V dan VII) (Shunlin *et al.* 2009; Miller *et al.* 2007).

Ekskresi virusantang melalui orofarings lebih sedikit dibandingkan kloaka dari ketiga kelompok ayam divaksinasi ND, dan khusus ayam yang divaksinasi ND genotipe VII (Indonesia/GTT/11) tidak terdeteksi melalui kloaka (Gambar 2). Kemampuan virus ND berkembang di dalam sel tergantung aktifitas protein H dalam menangkap dan

melepas virus di dalam sel, dimana virus dimediasi oleh protein F (Morrison 2003). Di dalam saluran pencernaan ada beberapa faktor yang tidak spesifik dan mempengaruhi replikasi virus ND, seperti enzim protease dan berbagai pengaruh pH dalam proses pelekatan pada sel-sel reseptor. Hal ini kemungkinan mempengaruhi mengapa ekskresi virus melalui kloaka lebih sedikit dibandingkan melalui orofarings. Bouzari & Spardbrow (2006) menunjukkan virus NDantang dapat diisolasi dari kerongkongan dan trakea ayam setelah 24 jam terinfeksi. Replikasi virus terjadi di daerah limfosit, dan merespon dalam produksi imun, sehingga viral antigen yang cukup di dalam vaksin diperlukan hal ini untuk meningkatkan efektifitas dari sistem imun.

Vaksin ND di lapang dianggap tidak efektif, sementara tidak ada keseragaman jadwal vaksinasi, dan jadwal pemberian vaksinasi yang terlalu padat, bahkan beberapa petani memberikan vaksinasi ND setiap 15 hari. Frekuensi vaksinasi ND awalnya bertujuan untuk mencegah penyakit ND, namun fakta dilapang penyakit ND masih terjadi, meski kasus penyakit sporadis pada ayam yang telah divaksinasi (Adi *et al.* 2010; Xiao *et al.* 2012; Dharmayanti *et al.* 2014).

Studi ini memperlihatkan genotipe antigen vaksin ND dari dekade yang lampau (genotipe I, II, dan VI) menunjukkan respon titer antibodi lebih rendah terhadap antigen virus ND (genotipe VII) yang bersirkulasi saat ini di lapang. Ekskresi virus NDantang dari ayam yang divaksinasi ND genotipe I, II dan VI terlihat lebih tinggi dan dalam kurun waktu yang relatif panjang, dibandingkan dengan ayam yang divaksinasi ND genotipe VII. Ekskresi virusantang dengan waktu yang panjang dapat mencemari lingkungan dan menginfeksi ayam disekitar peternakan. Hasil ini mencirikan vaksin ND dari genotipe VII (chicken/Indonesia/GTT/11) lebih baik dalam memberikan respon titer antibodi dan ekskresi virusantang, sehingga isolat virus ND chicken/Indonesia/GTT/11 sangat baik digunakan sebagai seed vaksin dalam pencegahan penyakit ND saat ini dilapang, dan menjadi efektif dalam pengendalian penyakit ND di Indonesia, karena tidak saja mampu mengendalikan penyakit ND ganas dan kematian, tetapi juga melindungi infeksi dan ekskresi virus pada ayam.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari studi ini bahwa virus ND chicken/Indonesia/GTT/11 genotype VII memberikan respon vaksinasi dengan titer tinggi, dan proteksi dari ekskresi virusantang yang sangat singkat dibandingkan virus ND dari genotype I, II, dan VI, sehingga virus ini baik untuk dijadikan sebagai seed vaksin ND tidak aktif, sesuai dengan virus lapang yang bersirkulasi saat ini.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini terlaksana atas anggaran penelitian dana DIPA BBLitvet tahun 2013. Penghargaan dan ucapan terimakasih disampaikan kepada Saudara Heri Hoerudin Apipudin dan Ali Hamidi atas bantuan teknis dan pemeliharaan ayam, serta semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adi, AA., NM. Astawa, KS. Putra, Y. Hayashi, & Y. Matsumoto. 2010. Isolation and characterization of a pathogenic Newcastle Disease Virus from a natural case in Indonesia. *Veterinary Medicine Science*. 72: 313-319.
- Beard, CW. & RP. Hanson . 1984 . Newcastle disease. In : Disease of Poultry 8th Ed. M.S. Hofstad, HJ . Barnes, BW. Calnek, WM. Reid & HWjr. Yoder (Eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA . pp . 452-470.
- Bouzari, M., & P. Spardbrow. 2006. Early events following oral administration of Newcastle disease virus strain V4. *Jurnal of Poultry Science*. 43: 408 – 414.
- Czegledi, A., D. Ujvari, E. Somogyi, E. Wehmann, O. Werner, & B. Lomniczi. 2006. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research*. 120(1-2): 36-48.
- Dharmayanti, NLP I., R. Hartawan, DA .Hewajuli, & R. Indriani. 2014. Phylogenetic analysis of genotype VII of new castle disease virus in Indonesia. *African Journal of Microbiology Research*. 8(13): 1368-1374.
- Hubalek, Z. 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Disease*. 40: 639–659.
- Haque, MH., MT. Hossain, MT. Islam, MA. Zinnah, MSR. Khan, & MA. Islam. 2010. Isolation and Detection of Newcastle disease virus from field outbreaks in Broiler and Layer chickens by Reverse transcription-Polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medicine*. 8 (2): 87-92.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2005. Claccification and Nomenclature of viruses. Virus Taxonomy. Eighth report of *International Committee on Taxonomy of Viruses*: 655-659.
- Indriani, R. & NLPI. Dharmayanti. 2014. Prototipe vaksin Newcastle Disease (ND) genotype VII yang efektif dalam mengendalikan penyakit ND generasi baru. *Laporan APBN tahun 2014*. Balai Besar Penelitian Veteriner. Bogor.
- King, DJ. 1991. Evaluation of Different Methods of Inactivation of Newcastle Disease Virus and Avian Influenza Virus in Egg Fluids and Serum. *Avian Disease* . 35: 505-514.
- Leeuw De & B. Peeters. 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *Jurnal of Genetic Virology*. 80: 131-136.
- Liang, R., DJ. Cao, JQ. Li, J. Chen, X. Guo, FF. Zhuang, & MX. Duan. 2002. Newcastle Disease outbreak in westren China are cause by the genotype VIIa dan VIII. *Veterinary Microbiology*. 87: 193-203.
- Miller, PJ., CL. Afonso, E. Spackman, MA. Scott , JC. Pedersen, DA. Senne, JD. Brown, CM. Fuller, MM. Uhart, WB. Karesh, IH. Brown, DJ. Alexander & DE. Swayane. 2010. Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype-10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. *Jurnal of Virology*. 84 (21): 11496–11504.
- Miller, PJ., C. Estevez, & Q. Yu. 2009. Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian Disease*. 53: 39–49.
- Miller, PJ., DJ. King, CL. Afonso, DL. Suarez. 2007. Antigenic differences among Newcastle

- disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine*. 25: 7238–7246.
- Mase, M., K. Imai K, Y. Sanada, N. Sanada, N. Yuasa, & T Imada. 2002. Phylogenetic analysis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(10): 3826–30.
- Morrison, TG. 2003. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1614: 73–84.
- Narayanan, MS., M. Parthiban, P. Sathiya, & K. Kumanan. 2010. Molecular detection of Newcastle disease virus using Flinders Molecular detection of Newcastle disease virus using Flinders Tehnology Associates-PCR Tehnology Associates-PCR. *Journal Veterinarski Arhiv*. 80(1): 51-60.
- OIE 2009. NDV in Indonesia. Detailed country(ies) disease incidence. <http://www.oie.int/wahis/public.php>.
- Orsi, MA, L. Doretto Jr, SCA., Camillo, D. Reischak, SAM. Ribeiro, A. Ramazzoti, AO. Mendonça, FR. Spilki, MG. Buzinaro, HL. Ferreira, & CW. Arns. 2010. Prevalence of Newcastle disease virus in Broiler chickens (*Gallus gallus*) in Brazil. *Brazilian Journal Microbiology*. 41: 349-357.
- Patti, JM., DJ. King, CL. Afonso, & DL. Suarez. 2007. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine*. 25: 7238-7246.
- Reed, LJ. & H. Munch . 1938. A simple methode of estimating 50 percent and points. *American Journal of Hygiene*. 27: 494.
- Senne, DA., DJ. King, & DR Kapczynski. 2004. Control of Newcastle disease by vaccination. *Developmental Biology*. 119 :165–70.
- Shunlin, H., H. Ma, Y. Wu, W. Liu, X. Wang, Y. Liu, & X. Liu. 2009. A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. *Vaccine*. 27: 904–910.
- Xiao, S., A. Paldurai, B. Nayak, A. Samuel, EE. Bharoto, TY. Prajitno, PL. Collins, & SK. Samala. 2012. Complate genome Sequences of Newcastle Disease Virus Strain circulating in chicken population of Indonesia. *Journal of Virology*. 86: 5969–5970.