

Deteksi Virus *Newcastle Disease*, *Avian Influenza*, dan *Infectious Bronchitis* dari Ayam Komersial Broiler dan Layer dengan Gejala Klinis Respirasi

Detection of Newcastle Disease, Avian Influenza, dan Infectious Bronchitis Virus from Commercial Broiler and Layer with Respiratory Clinical Signs

Ferdinand Prayogo Cahyo Santoso^{1,2}, Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni¹, Tri Untari¹,
Widya Asmara¹, Michael Haryadi Wibowo^{1*}

¹Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
Yogyakarta, Indonesia

Program Studi Doktor Sain Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

*Corresponding author; Email: mhwibowo@ugm.ac.id

Naskah diterima: 17 Januari 2024, direvisi: 13 Januari 2025, disetujui: 17 Juli 2025

Abstract

A variety of possible pathogens can cause clinical signs in the chicken's respiratory system, such as sores, nasal discharge, gasping, and so on. A virus may cause these signs, which typically result in economic losses. Establishing the cause of the symptoms requires causal diagnosis, particularly virus detection. The study aims to detect Newcastle Disease (ND), Avian Influenza (AI), and Infectious Bronchitis (IB) cases of respiratory symptoms in commercial chickens by 2023. The samples in this study were organs from commercial chicken broilers and layers with respiratory symptoms. Organs were prepared as a suspension and centrifuged it to extract the supernatants. Supernatants were extracted using commercial extraction kits to create templates for molecular detection. We performed molecular detection using the RT-PCR two-step method. We used primer pairs to detect ND, AI subtypes H5 and H9, and IB. Electrophoresis with 1.5% agarose visualized the results. We interpret the positive RT-PCR result by comparing the appearance and length of the amplicons to the positive control of each virus. We subjected positive RT-PCR samples with thick amplicon quality to sequencing and bioinformatics analysis. Results of detection with RT-PCR against 41 samples are positive ND of 1 out of 8 samples (12.5%), AI of 2 out of 17 samples (11.7%), and IB of 5 out of 16 samples (31.3%). Using RT-PCR molecular detection, we confirm the cause of respiration symptoms in commercial chickens: ND genotype VII-i, AI subtype H5 clade 2.3.2, AI subtype H9, and IB genotype GI-19 (QX-like).

Keywords: Newcastle Disease; Avian Influenza; Infectious Bronchitis; RT-PCR

Abstrak

Gejala klinis pada sistem respirasi unggas seperti *ngorok*, leleran nasal, *gasping*, dan sebagainya dapat disebabkan oleh berbagai kemungkinan agen. Kausa gangguan respirasi unggas tersebut salah satunya dapat disebabkan oleh virus, yang sudah banyak dilaporkan menyebabkan kerugian ekonomi. Diagnosis kausatif terutama deteksi virus perlu dilakukan untuk meneguhkan penyebab gejala tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi *Newcastle Disease* (ND), *Avian Influenza* (AI), dan *Infectious Bronchitis* (IB) dari kasus gejala respirasi pada ayam komersial tahun 2023. Sampel yang dikaji pada penelitian ini adalah organ dari ayam komersial broiler dan layer dengan gejala respirasi. Organ dipreparasi sebagai suspensi, lalu disentrifugasi untuk diambil supernatannya. Supernatan diekstraksi dengan menggunakan kit ekstraksi komersial untuk menghasilkan eluat sebagai *template* untuk deteksi molekuler. Deteksi molekuler dilakukan dengan metode *two-step* RT-PCR dengan tahapan : sintesis cDNA, predenaturasi, denaturasi, *annealing*,

extension, *post-extension*. Primer-primer digunakan untuk deteksi ND, AI subtipe H5 dan H9, serta IB. Hasil RT-PCR divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1,5%. Interpretasi hasil positif RT-PCR berdasarkan kemunculan dan kesesuaian panjang ampikon dibandingkan dengan kontrol positif masing-masing virus. Sampel positif RT-PCR dengan kualitas ampikon tebal, dilakukan sekuensing dan analisis bioinformatika. Hasil deteksi dengan RT-PCR terhadap 41 sampel yaitu positif ND sebanyak 1 dari 8 sampel (12,5 %), AI sebanyak 2 dari 17 sampel (11,7 %), dan IB sebanyak 5 dari 16 sampel (31,3 %). Berdasarkan deteksi molekuler dan analisis bioinformatika, maka kausa gejala respirasi pada ayam komersial terkonfirmasi disebabkan oleh virus, yaitu ND genotipe VII-i, AI subtipe H5 *clade* 2.3.2, AI subtipe H9, dan IB genotipe GI-19 (QX-like).

Kata kunci: Newcastle Disease; Avian Influenza; Infectious Bronchitis; RT-PCR; Broiler; Layer

Pendahuluan

Gejala klinis pada sistem respirasi unggas seperti *ngorok*, leleran nasal, *gaspings*, dan sebagainya dapat disebabkan oleh berbagai kemungkinan etiologi, baik kausa infeksius maupun non infeksius. Kausa infeksius dapat berupa agen dari kelompok bakteri, jamur, virus, dan parasit; sedangkan penyebab non infeksi bisa disebabkan oleh masalah pada manajemen farm, seperti akumulasi amonia yang terlalu tinggi pada kandang (Swayne *et al.*, 2020). Beberapa contoh kausa infeksius yang sudah dilaporkan secara definitif sebagai agen penyebab gangguan respirasi pada unggas yaitu : *Avibacterium paragallinarum* (Wahyuni *et al.*, 2018) dari kelompok bakteri, *Aspergillus fumigatus* (Nurrurrozi *et al.*, 2020) dari kelompok jamur, *Infectious Bronchitis* (Wibowo *et al.*, 2019) dari kelompok virus, dan *Syngamus trachea* (Suratma *et al.*, 2012) dari kelompok parasit.

Kausa gangguan respirasi unggas utamanya disebabkan oleh virus, seperti virus *Newcastle Disease* (ND), *Avian Influenza* (AI) subtipe H5 dan H9, serta *Infectious Bronchitis* (IB) yang sudah banyak dilaporkan menyebabkan kerugian ekonomi pada sektor perunggasan (Swayne *et al.*, 2020). Virus ND merupakan virus dari kelompok Paramyxovirus, yang masih berkerabat satu kelompok Myxovirus dengan virus AI dari kelompok Orthomyxovirus; sedangkan virus IB merupakan spesies *Avian coronavirus* yang hanya menyebabkan infeksi pada unggas, serta masih satu famili Coronaviridae dengan virus penyebab COVID-19 mulai akhir 2019 yang lalu (ICTV, 2020). Beberapa virus yang menyebabkan gangguan respirasi tersebut dilaporkan juga dapat menyebabkan gangguan pada sistem organ lainnya. Gejala saraf berupa

tortikolis dapat juga disebabkan oleh virus ND, seperti yang dilaporkan oleh Dewandaru (*et al.*, 2020) dan Andriyani *et al.* (2022). Virus IB varian 4/91 dan QX yang dilaporkan oleh Wibowo *et al.* (2019) ternyata tidak hanya menginfeksi saluran respirasi, tetapi juga menyebabkan kista oviduk yang berdampak pada kerugian ekonomi berupa drop produksi telur pada layer. Dampak ekonomi yang serupa juga dapat disebabkan oleh virus AI subtipe H9 (Muflihanah, 2016; Maharani *et al.*, 2022).

Diagnosis kausatif terutama deteksi virus perlu dilakukan untuk meneguhkan penyebab gejala tersebut, sehingga penanganan akan lebih tepat dan terarah. Deteksi molekuler, misalnya dengan *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) dapat dilakukan sebagai langkah diagnosis kausatif berbagai virus (OIE, 2009; OIE, 2018; OIE, 2021). Uji lainnya, misalnya uji serologis untuk deteksi antibodi seperti uji hambatan hemaglutinasi (HI) juga dapat membantu monitoring respon imun hospes terhadap penyakit viral tertentu seperti ND dan AI (FAO, 2002; OIE, 2009; OIE, 2021). Berbagai metode diagnosis kausatif tersebut dapat mengarahkan penanganan yang lebih tepat, misalnya penyusunan program vaksinasi dan sanitasi-disinfeksi (Abdel-Moneim, 2017; Swayne *et al.*, 2020).

Gejala gangguan respirasi pada ayam komersial, seperti *ngorok*, leleran nasal, dan *gaspings*, dapat disebabkan oleh berbagai agen penyebab, baik infeksius maupun non-infeksi. Virus seperti *Newcastle Disease* (ND), *Avian Influenza* (AI), dan *Infectious Bronchitis* (IB) sering dilaporkan sebagai kausa utama yang memberikan dampak signifikan pada kesehatan unggas dan kerugian ekonomi sektor perunggasan. Identifikasi penyebab

gejala tersebut masih sering menjadi tantangan, terutama karena kemungkinan adanya ko-infeksi atau keterkaitan antara agen penyebab dengan gejala. Oleh karena itu, diperlukan pendekatan diagnostik yang tepat, seperti RT-PCR untuk deteksi molekuler, guna meneguhkan diagnosis kausatif. Penelitian ini berfokus pada deteksi virus ND, AI, dan IB dari kasus ayam komersial dengan gejala gangguan respirasi pada tahun 2023 serta karakteristiknya.

Materi dan Metode

Sampel. Sampel yang dikaji pada penelitian ini adalah organ dari ayam komersial broiler dan layer dengan gejala klinis respirasi, yang berasal dari peternakan komersial yang dikirim oleh dokter hewan di lapangan. Sampel berjumlah 41 spesimen organ/*pool* organ dengan indikasi virus ND, AI, dan/atau IB. Jenis virus yang dideteksi secara molekuler berasal dari indikasi yang dilaporkan oleh pengirim sampel, yaitu dokter hewan yang merupakan investigator kasus di lapangan. Deteksi molekuler dilakukan di Laboratorium Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada.

Tabel 1. Daftar sampel dari unggas dengan gejala pernafasan yang dikaji pada penelitian ini.

No.	Kode Sampel/Tahun isolasi	Sampel organ	Indikasi
1.	MHW-M1/2023	<i>Pool</i> paru, trakea	ND
2.	MHW-M2/2023	<i>Pool</i> paru, trakea	AI
3.	MHW-M3/2023	<i>Pool</i> paru, trakea	AI
4.	MHW-LayA/2023	<i>Pool</i> paru, trakea, otak	ND
5.	MHW-LayB/2023	<i>Pool</i> paru, trakea, otak	ND
6.	MHW-BAL.OU1/2023	<i>Pool</i> oviduk, uterus	AI
7.	MHW-BAL.OU2/2023	<i>Pool</i> oviduk, uterus	AI
8.	MHW-BAL.TP1/2023	<i>Pool</i> paru, trakea	AI
9.	MHW-BAL.TP2/2023	<i>Pool</i> paru, trakea	AI
10.	MHW-BAL.OVA/2023	Ovarium	AI
11.	MHW-NUS.TP/2023	<i>Pool</i> paru, trakea	ND
12.	MHW-NUS.L/2023	<i>Pool</i> limpa	ND
13.	MHW-CIK.TP/2023	<i>Pool</i> paru, trakea	AI
14.	MHW-CIK.OVI/2023	<i>Pool</i> oviduk	AI
15.	MHW-TK/2023	<i>Pool</i> trakea	AI
16.	MHW-PK/2023	<i>Pool</i> paru	AI
17.	MHW-HK/2023	<i>Pool</i> hati	AI
18.	MHW-LK/2023	<i>Pool</i> limpa	AI
19.	MHW-TB/2023	<i>Pool</i> trakea	AI
20.	MHW-PB/2023	<i>Pool</i> paru	AI

21.	MHW-HB/2023	<i>Pool</i> hati	AI
22.	MHW-LB/2023	<i>Pool</i> limpa	AI
23.	MHW-ZBUS.P/2023	Paru	IB
24.	MHW-ZBUS.T/2023	Trakea	IB
25.	MHW-ZBUS.S/2023	Seka tonsil	IB
26.	MHW-DKP.A1/2023	<i>Pool</i> paru, trakea, limpa	ND
27.	MHW-DKP.A2/2023	<i>Pool</i> paru, trakea, seka tonsil	IB
28.	MHW-DMBU.B1/2023	<i>Pool</i> paru, trakea, limpa	ND
29.	MHW-DMBU.B2/2023	<i>Pool</i> paru, trakea, seka tonsil	IB
30.	MHW-SBUS.C1/2023	<i>Pool</i> paru, trakea, limpa	ND
31.	MHW-SBUS.C2/2023	<i>Pool</i> paru, trakea, seka tonsil	IB
32.	MHW-HDK.D1/2023	<i>Pool</i> swab (<i>take vaksin</i>)	IB
33.	MHW-HDK.D2/2023	<i>Pool</i> swab (<i>take vaksin</i>)	IB
34.	MHW-P1/Bro7/2023	Paru	IB
35.	MHW-T1/Bro7/2023	Trakea	IB
36.	MHW-SH1/Bro7/2023	Seka tonsil	IB
37.	MHW-GH1/Bro7/2023	Ginjal	IB
38.	MHW-P2/Bro8/2023	Paru	IB
39.	MHW-T2/Bro8/2023	Trakea	IB
40.	MHW-SH2/Bro8/2023	Seka tonsil	IB
41.	MHW-GH2/Bro8/2023	Ginjal	IB

Preparasi sampel. Sampel organ sesampai di laboratorium disimpan pada kondisi beku minus 70°C. Sampel organ dipreparasi dengan dilakukan *thawing* supaya mencair, selanjutnya digerus sampai halus dengan lumpang dan alu steril terutama organ trakea dan seka tonsil. Organ paru, limpa, ginjal, otak dihancurkan dengan ekstraktor mekanis sampai halus. Hancuran organ ditambahkan dengan *RNA-se free water (molecular grade)* selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 4000G untuk mengendapkan jaringan. Supernatan dikoleksi dan dipindahkan ke dalam tabung yang lain, dan disimpan pada kondisi beku minus 70°C sampai digunakan pada proses selanjutnya.

Ekstraksi dan amplifikasi RNA. Ekstraksi RNA dari supernatan organ dan/atau swab dilakukan dengan kit ekstraksi (*Viral Nucleic Acid Extraction Kit II, Geneaid*). Secara prinsip ekstraksi, sampel sebanyak 200 mikroliter diproses dengan *lisis buffer* untuk merusak dinding sel, sedangkan RNA di tangkap dengan sistem *VB column* serta dilakukan elusi dengan *RNA molecular grade water*. Hasil elusi tersebut digunakan sebagai *template* dalam uji *two-step* RT-PCR. Proses amplifikasi didahului

Tabel 2. Sekuens primer yang digunakan pada penelitian ini.

Primer	Sekuens (5' 3')	Produk	Virus target	Referensi
ND.F2.F	GCAGGGATTGTAGTAACAGGAGAT	733 bp	ND	(Andriyani <i>et al.</i> , 2022)
ND.F2.R	CCAAGAGGTGAGTCTGTGAGTCAT			
H.20.F	ATTGGTAYCATGCAAYAACTCG	583 bp	AI H5	(Geelong, Australia)
H.20.R	GGAAAYATAGGTRGTTGGRTTYTGATAG			
H9-2.F	AGGCCTCTTGTCAACGGTTT	712 bp	AI H9	(Maharani <i>et al.</i> , 2022)
H9-2.R	CCAACGCCCTCTTCACTTTA			
JP.F	AGGAATGGTAAGTTTCTGTGAGAG	670 bp	IB	(Shimazaki <i>et al.</i> , 2008)
JP.R	GCGCRGTACCRTRAYAAARTARGC			

dengan sintesis cDNA (tahap pertama) dengan kit Sensifast cDNA synthesis (Bioline) dan dilanjutkan dengan amplifikasi DNA (tahap kedua) dengan kit HS Red Mix (Bioline). Primer yang digunakan untuk mendeteksi virus pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Siklus amplifikasi dimulai dengan pembuatan cDNA (tahap pertama) pada suhu 25°C selama 20 menit, 42°C selama 15 menit, dan 85°C selama 5 menit. Siklus PCR (tahap kedua) untuk mendeteksi masing-masing virus dapat dilihat pada Tabel 3. Kontrol positif yang digunakan merupakan sediaan vaksin aktif (ND dan IB), serta sediaan antigen (AI subtype H5 dan H9) dalam bentuk kering beku yang diencerkan dengan diluen.

Visualisasi dan interpretasi hasil amplifikasi. Analisis produk RT-PCR dilakukan dengan menggunakan 1,5% agarose yang diwarnai dengan *FluorSAFE* DNA stain, menggunakan gel elektroforesis. *Running* elektroforesis dilakukan pada tegangan 110 volt, dan tahanan 300 mA, selama 35 menit. Amplikon diamati menggunakan gel doc *UVtransluminator* dan selanjutnya didokumentasikan. Interpretasi hasil positif RT-PCR berdasarkan kemunculan

dan kesesuaian panjang ampikon dibandingkan dengan kontrol positif masing-masing virus.

Sekuensing dan analisis bioinformatika. Produk RT-PCR dalam penelitian ini dikirim ke Laboratorium Genetika Science (Apical Scientific), Selangor, Malaysia untuk dilakukan sekuensing. Secara prinsip produk dikuantifikasi kembali dengan gel elektroforesis, dan dimurnikan sebelum di sekuensing. Reaksi sekuensing dilakukan secara enzimatik (*chain termination reaction*) dengan *dye terminator cycle sequencing reaction kit*. Primer yang digunakan dalam sekuensing sama dengan primer yang digunakan dalam amplifikasi. Analisis dilakukan dengan menggunakan software MEGA-X meliputi analisis dan *trimming* data *Ab1 file*, prediksi asam amino, *multiple alignment*, polimorfisme asam amino, dan konstruksi pohon filogenetik (Neighbor-Joining *bootstrap* 1000) (Kumar *et al.*, 2018). Penomoran asam amino: ND berdasarkan vaksin La Sota (DQ195265) mulai dari kodon start, AI berdasarkan standar *mature* HA dimulai setelah *signal peptide*, dan IB berdasarkan standar serotipe QXIBV (KC795604) termasuk *signal peptide*.

Tabel 3. Siklus PCR yang digunakan pada penelitian ini.

Siklus pada tahap kedua	Deteksi ND		Deteksi AI H5		Deteksi AI H9		Deteksi IB		Pengulangan
	Suhu (°C)	Waktu	Suhu (°C)	Waktu	Suhu (°C)	Waktu	Suhu (°C)	Waktu	
Predenaturasi	95	5 menit	95	7 menit	95	5 menit	95	5 menit	40x
Denaturasi	95	45 detik	94	45 detik	95	30 detik	95	30 detik	
<i>Annealing</i>	56	45 detik	52	45 detik	57	45 detik	55	45 detik	
<i>Extension</i>	72	1 menit	72	90 detik	72	1 menit	72	1 menit	
<i>Post-extension</i>	72	5 menit	72	5 menit	72	5 menit	72	5 menit	

Hasil dan Pembahasan

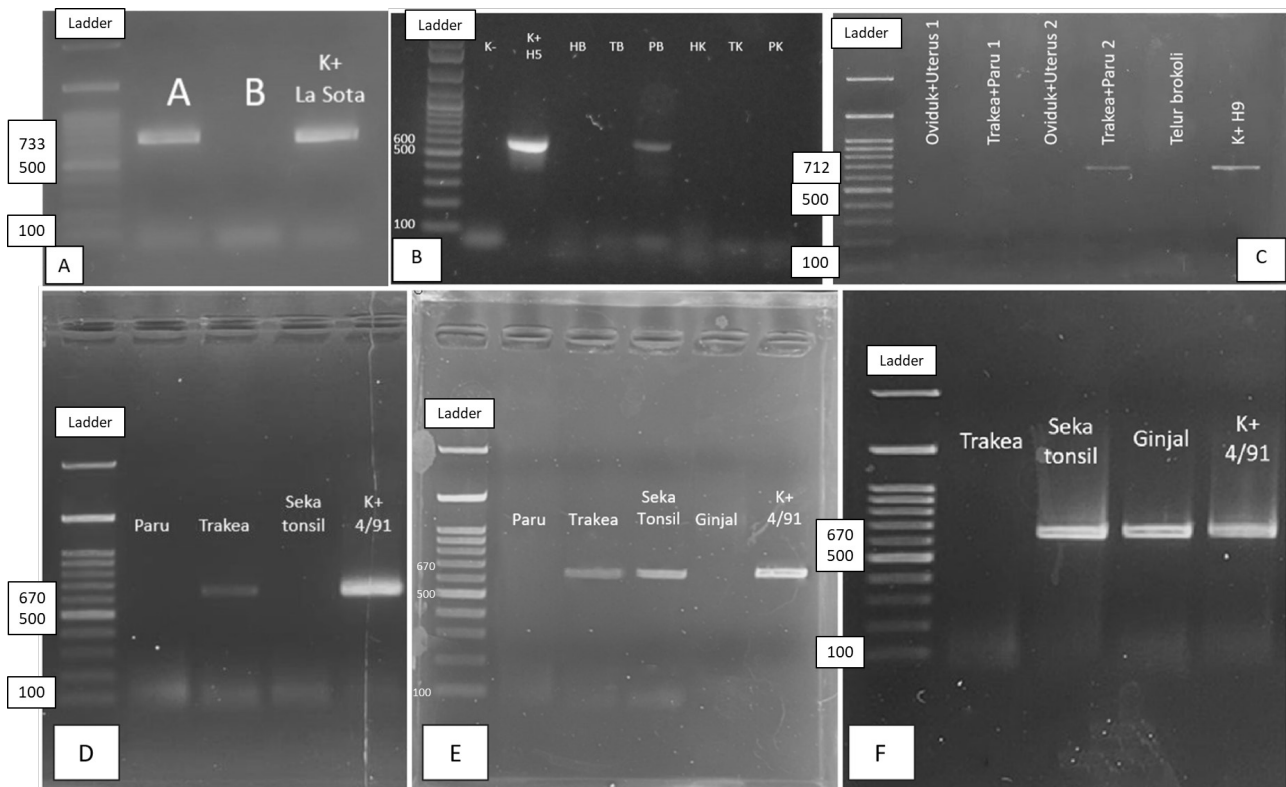
Hasil deteksi RT-PCR terhadap 41 sampel : terdeteksi positif ND dengan target primer gen fusion (F) sebanyak 1 dari 8 sampel (12,5 %) (kode MHW-LayA/2023), AI dengan target primer hemagglutinin (HA) sebanyak 2 dari 17 sampel (11,7 %) (kode MHW-BAL.TP2/2023 dan MHW-PB/2023), dan IB dengan target primer gen glikoprotein *spike 1* (S1) sebanyak 5 dari 16 sampel (31,3 %) (kode MHW-ZBUS.T/2023, MHW-T1/2023, MHW-SH1/Bro7/2023, MHW-SH2/Bro8/2023, dan MHW-GH2/Bro8/2023) (Gambar 1). Virus-virus yang terdeteksi tersebut merupakan kausa dari kasus-kasus gangguan respirasi yang dilaporkan oleh investigator lapangan pada penelitian ini. Sampel-sampel yang tidak terdeteksi virus-virus tersebut perlu dipertimbangkan diagnosis diferensialnya, misalnya dari kausa bakterial, jamur, maupun non infeksius.

Amplikon dari hasil RT-PCR yang tebal dilanjutkan sekuensing (dengan primer yang sama saat amplifikasi) dan analisis bionformatika untuk karakterisasi secara genotipik berdasarkan sekuens prediksi asam aminonya. Berdasarkan konstruksi pohon filogenetik (Gambar 2), sampel MHW-LayA/2023 (nomor akses Genbank OR915723) terkarakterisasi sebagai ND genotipe VII-i; MHW-PB/2023 (nomor akses Genbank OR915724) terkarakterisasi sebagai AI H5 *clade* 2.3.2; serta MHW-SH1/Bro7/2023 (nomor akses Genbank OR915725) dan MHW-GH2/Bro8/2023 (nomor akses Genbank OR915726) terkarakterisasi sebagai IB genotipe GI-19/QX-like. Polimorfisme asam amino pada tapak-tapak penting setiap virus (Gambar 3) teridentifikasi adanya *multi basic cleavage site* (MacLahan dan Dubovi, 2011) ¹¹²RRQKR↓F₁₇ dari sekuens asam amino F virus ND MHW-LayA/2023; *antigenic sites* (AS) N45, N64, A86 dan *receptor binding sites* (RBS) Y98 dari sekuens asam amino HA (Wibowo *et al.*, 2017); dan RBS N39, Q44, S64, V70, I129 dari sekuens asam amino S1 (Promkuntod *et al.*, 2014, Bouwman *et al.*, 2020). Sampel dengan amplikon tipis, misalnya MHW-BAL.TP2/2023 dan MHW-ZBUS.T/2023, tidak dapat dilanjutkan pada proses sekuensing, dan disarankan untuk dikultur pada telur ayam berembrio (TAB), sehingga diharapkan

terdeteksi amplikon tebal dan bisa dilanjutkan sekuensing.

Virus ND sebelumnya dilaporkan tidak hanya menyebabkan gangguan respirasi pada unggas, tetapi juga dapat menyebabkan gangguan saraf dan pencernaan (OIE, 2021; Swayne *et al.*, 2020). Beberapa tipe ND bentuk neurotropik yang menginfeksi merpati (Dewandaru *et al.*, 2020; Andriyani *et al.*, 2022) dilaporkan dapat menyebabkan gangguan saraf berupa tortikolis. Sampel yang terdeteksi positif ND (Gambar 1A), MHW-LayA/2023, pada penelitian ini berasal dari *pool* paru, trakea, dan otak dari ayam dengan gejala gangguan respirasi, serta dilaporkan adanya tortikolis, sehingga virus tersebut kemungkinan merupakan ND tipe respirasi dan saraf. Pembuktian tipe patogenisitas ND tersebut secara definitif perlu kajian lebih lanjut, misalnya uji *in vivo* seperti yang dilaporkan Utami *et al.* (2022), walaupun adanya *multi basic amino acids* dan residu F117 (Gambar 3A) merupakan marker molekuler virus ND patogen (MacLahan dan Dubovi, 2011).

Gejala gangguan respirasi yang disebabkan oleh AI, baik subtipe H5 dan H9, dilaporkan dapat diikuti dengan/tanpa gangguan reproduksi dan perdarahan pada berbagai organ visceral (Swayne *et al.*, 2020). Sampel yang terdeteksi positif AI subtipe H5 (MHW-PB/2023) pada penelitian ini tidak hanya hanya dilaporkan adanya gejala respirasi saja, tetapi juga dilaporkan adanya perdarahan hati, sehingga juga dilakukan deteksi AI subtipe H5 dari sampel hati dengan hasil negatif (Gambar 1B). Polimorfisme RBS dan AS (Gambar 3B) juga perlu dikaji secara fungsional, karena adanya kesamaan asam amino dengan *ancestral virus* Goose/Guangdong/96. Hasil negatif pada sampel perdarahan hati tersebut perlu dipertimbangkan diagnosa diferensial, misalnya *Leucocytozoon* (Suprihati dan Yuniarti, 2017; Swayne *et al.*, 2020). Sampel yang terdeteksi positif AI subtipe H9 (MHW-BAL.TP2/2023) pada penelitian ini tidak hanya dilaporkan adanya gejala respirasi saja, tetapi juga dilaporkan adanya gangguan reproduksi berupa penurunan produksi, sehingga juga dilakukan deteksi AI subtipe H9 dari sampel ovarium, oviduk, dan uterus dengan hasil negatif (Gambar 1C). Hasil

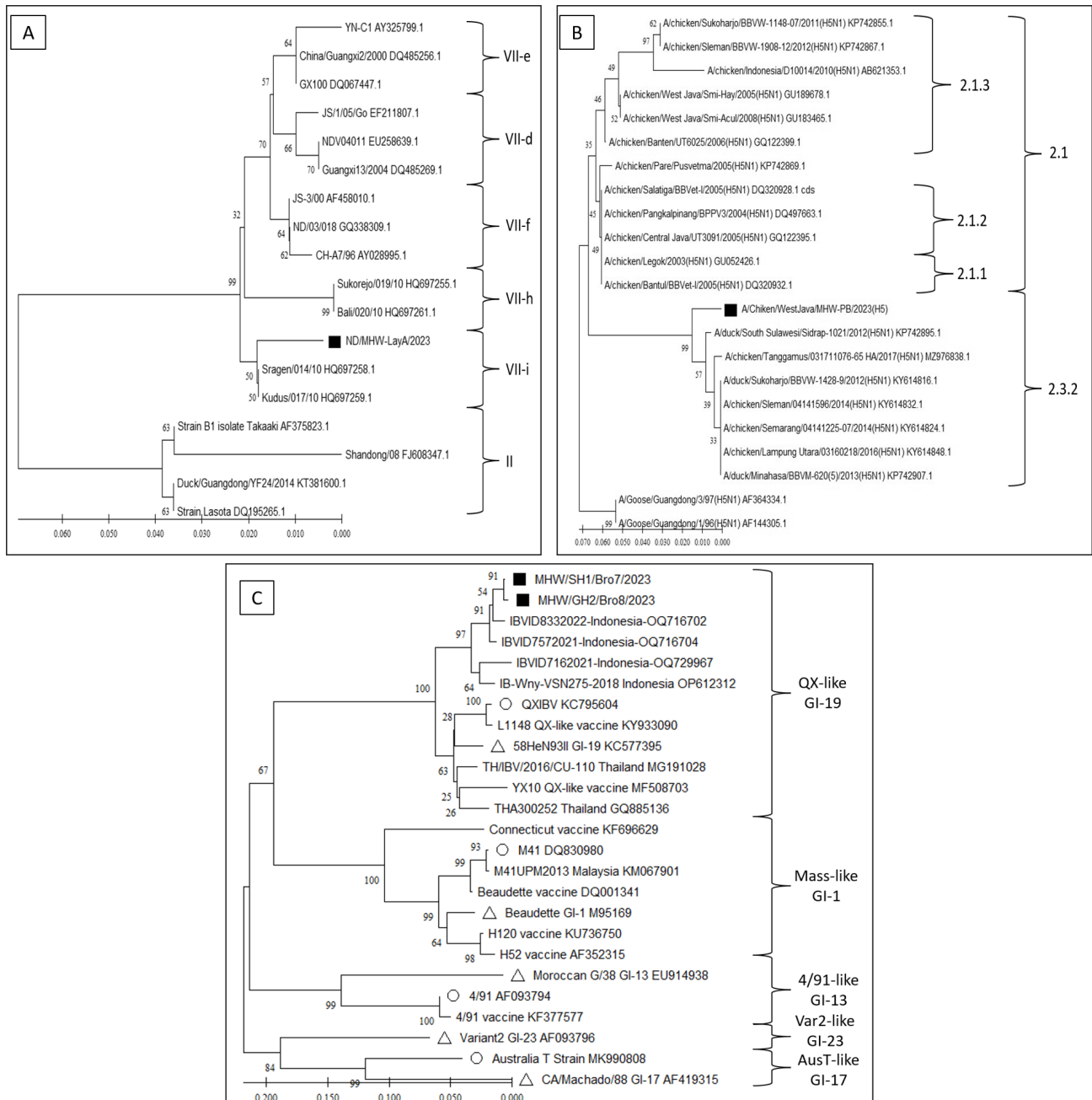


Gambar 1. A) Hasil elfo dari RT-PCR deteksi ND dengan primer F2, teramati ampikon target 733 bp pada kontrol positif virus ND LaSota (K+ LaSota) dan sampel pool A (paru, trakea, otak) (kode sampel MHW-LayA/2023). B) Hasil elfo dari RT-PCR deteksi AI sub tipe H5: teramati ampikon target 583 bp pada kontrol positif virus AI H5 (K+ H5) dan sampel pool paru kode PB (MHW-PB/2023). C) Hasil elfo dari RT-PCR deteksi AI sub tipe H9, teramati ampikon target 712 bp pada kontrol positif virus AI H9 (K+ H9) dan sampel *pool* trakea paru 2 (kode sampel MHW/BAL/TP2/2023). Hasil elfo dari RT-PCR deteksi IB dengan primer JP: teramati ampikon target 670 bp pada kontrol positif virus IB 4/91 (K+ 4/91) (793b) dan D) sampel trakea (kode MHW-ZBUS.T/2023), E) trakea (kode MHW-TH1/Bro7/2023) dan seka tonsil kode MHW-SH1/Bro7/2023, serta F) seka tonsil (kode MHW-SH2/Bro8/2023) dan ginjal (kode MHW-GH2/Bro8/2023).

negatif pada sampel dengan indikasi gangguan reproduksi tersebut perlu dipertimbangkan diagnosa diferensial seperti *egg drop syndrome* (Ockiya *et al.*, 2020), IB (Najimudeen *et al.*, 2020), dan Salmonella (Lenchenko *et al.*, 2017). Berdasarkan data tersebut, maka virus AI yang menyebabkan kasus gangguan respirasi pada penelitian ini, bukan merupakan kausa pada gangguan reproduksi dan perdarahan organ hati yang dilaporkan oleh investigator lapangan.

Virus IB, berdasarkan teori patogenesisnya, menginfeksi hospes secara intra nasal dan menyebabkan gangguan respirasi pada fase akut, kemudian dilanjutkan viremia pada fase kronis yang berdampak pada diseminasi virion di berbagai organ visceral seperti oviduk, ginjal, seka tonsil, dan beberapa organ lainnya tergantung pada tipe tropismenya (Najimudeen *et al.*, 2020). Gejala respirasi pada unggas yang dilaporkan oleh investigator lapangan terbukti disebabkan oleh IB melalui deteksi

RT-PCR (Gambar 1D, 1E, 1F). Virus IB yang terdeteksi pada organ-organ visceral seperti ginjal dan seka tonsil broiler (Gambar 1E dan 1F), juga membuktikan bahwa beberapa sampel merupakan IB fase kronis (Abdel-Moneim, 2017; Najimudeen *et al.*, 2020). Laporan gangguan reproduksi dari indukan *breedernya* tidak tersedia, maka untuk membuktikan tropisme dan dampak virus IB tersebut pada sistem reproduksi, perlu dilakukan uji *in vivo* (de Wit *et al.*, 2011). Polimorfisme RBS (Gambar 3C) juga perlu dikaji secara fungsional, karena sampel positif IB memiliki sekuens RBS yang sama walaupun berasal dari organ yang berbeda, seperti yang sebelumnya dilaporkan oleh Santoso *et al.*, (2024). Berdasarkan data tersebut, maka virus IB yang terdeteksi pada penelitian ini merupakan kausa dari gangguan respirasi yang dilaporkan, serta kemungkinan berlanjut diseminasi pada berbagai organ visceral seperti ginjal dan seka tonsil.



Gambar 2. Konstruksi pohon filogenetik dengan metode Neighbor-Joining dan *bootstrap* 1000 berdasarkan sekuens asam amino parsial (semua sampel virus pada penelitian ini ditandai dengan label ■): A) fusion virus ND; B) hemagglutinin virus AI H5; C) *spike* 1 virus IB.

		cleavage site					
A) Virus ND/sekuens asam amino F		112	113	114	115	116	117
Strain Lasota DQ195265.1		G	R	Q	G	R	L
Strain B1 isolate Takaaki AF375823.1		-	-	-	-	-	-
Duck/Guangdong/YF24/2014 KT381600.1		-	-	-	-	-	-
Sragen/014/10 HQ697258.1		R	-	K	-	F	-
Kudus/017/10 HQ697259.1		R	-	K	-	F	-
Sukorejo/019/10 HQ697255.1		R	-	R	K	F	-
Bali/020/10 HQ697261.1		R	-	R	K	F	-
ND/03/018 GQ338309.1		K	-	K	-	F	-
JS-3/00 AF458010.1		K	-	K	-	F	-
CH-A7/96 AY028995.1		K	-	K	-	F	-
YN-C1 AY325799.1		R	-	K	-	F	-
GX100 DQ067447.1		R	-	K	-	F	-
China/Guangxi2/2000 DQ485256.1		R	-	K	-	F	-
NDV04011 EU258639.1		R	-	K	-	F	-
JS/1/05/Go EF211807.1		R	-	K	-	F	-
Guangxi13/2004 DQ485269.1		R	-	K	-	F	-
MHW-LayA/2023		R	-	K	-	F	-

		RBS			
C) Virus IB/sekuens asam amino S1		39	44	64	70
QXIBV-KC795604		N	Q	H	V
58HeN93II GI-19 KC577395		-	-	S	-
YX10 QX-like vaccine MF508703		-	-	S	-
L1148 QX-like vaccine KY933090		-	-	S	-
IB-Vny-VSN275-2018-Indonesia OP612312		-	-	S	-
IBVID7162021-Indonesia OQ729967		-	-	S	-
IBVID8332022-Indonesia OQ716702		-	E	S	-
IBVID7572021-Indonesia OQ716704		-	-	S	-
MHW-SH1/Bro7/2023		-	-	S	-
MHW-GH2/Bro8/2023		-	-	S	-

		AS AS AS RBS			
B) Virus AI H5/sekuens asam amino HA		45	84	86	98
A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) AF144305.1		N	S	A	Y
A/Goose/Guangdong/3/97(H5N1) AF364334.1		-	-	-	-
A/chicken/Legok/2003(H5N1) GU052426.1		D	N	-	-
A/chicken/Pangkalpinang/BPPV3/2004(H5N1) DQ497663.1		D	N	-	-
A/chicken/West Java/Smi-Hay/2005(H5N1) GU189678.1		D	N	T	-
A/chicken/Salatiga/BBVet-I/2005(H5N1) DQ320928.1 cds		D	N	-	-
A/chicken/Central Java/UT3091/2005(H5N1) GQ122395.1		D	N	-	-
A/chicken/Pare/Pusvetma/2005(H5N1) KP742869.1		D	N	-	-
A/chicken/Bantul/BBVet-I/2005(H5N1) DQ320932.1		D	N	-	-
A/chicken/Banten/UT6025/2006(H5N1) GQ122399.1		D	N	-	-
A/chicken/West Java/Smi-Acul/2008(H5N1) GU183465.1		D	N	T	-
A/chicken/Indonesia/D10014/2010(H5N1) AB621353.1		D	N	T	-
A/chicken/Sukoharjo/BBVW-1148-07/2011(H5N1) KP742855.1		D	N	T	-
A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012(H5N1) KY614816.1		-	-	-	-
A/duck/South Sulawesi/Sidrap-1021/2012(H5N1) KP742895.1		-	-	-	-
A/chicken/Sleman/BBVW-1908-12/2012(H5N1) KP742867.1		D	N	T	-
A/duck/Minahasa/BBVM-620(5)/2013(H5N1) KP742907.1		-	-	-	-
A/chicken/Sleman/04141596/2014(H5N1) KY614832.1		-	-	-	-
A/chicken/Semarang/04141225-07/2014(H5N1) KY614824.1		-	-	-	-
A/chicken/Lampung Utara/03160218/2016(H5N1) KY614848.1		-	-	-	-
A/chicken/Tanggamus/031711076-65 HA/2017(H5N1) MZ976838.1		-	-	-	-
MHW-PB/2023		-	-	N	-

Gambar 3. Polimorfisme asam amino dari tapak-tapak penting pada setiap virus (semua sampel virus pada penelitian ini tertulis dengan cetak tebal): A) fusion virus ND; B) hemagglutinin virus AI H5; C) spike 1 virus IB.

Analisis filogenetik menunjukkan bahwa virus ND (MHW-LayA/2023) termasuk genotipe VII-i dengan multi basic cleavage site (112RRQKR↓F117) yang mendukung patogenesis tinggi dan kemampuan menyebabkan infeksi sistemik. Virus AI subtype H5 (MHW-PB/2023) yang teridentifikasi sebagai clade 2.3.2 memiliki antigenic sites (N45, N64, A86) dan receptor binding sites (Y98) yang relevan dengan adaptasi molekuler terhadap reseptor unggas, meskipun hasil deteksi negatif pada hati menunjukkan kemungkinan keterlibatan faktor lain seperti Leucocytozoon. Virus IB (MHW-SH1/Bro7/2023 dan MHW-GH2/Bro8/2023) dari genotipe GI-19/QX-like menunjukkan tropisme luas hingga ke ginjal dan seka tonsil, dengan tapak reseptor binding sites (N39, Q44, S64, V70, I129) yang seragam di berbagai organ. Temuan ini menegaskan kontribusi analisis filogenetik dan tapak penting dalam memahami patogenesis, tropisme, dan adaptasi molekuler virus penyebab gangguan respirasi pada ayam, yang dapat digunakan untuk pengembangan strategi pengendalian.

Kesimpulan

Berdasarkan deteksi molekuler dengan RT-PCR, maka dari 41 sampel pada penelitian ini terdeteksi : ND (genotipe VII-1) sebanyak 1 dari 8 sampel (12,5 %), AI (H5 clade 2.3.2 dan H9) sebanyak 2 dari 17 sampel (11,7 %), dan IB (GI-19/QX-like) sebanyak 5 dari 16 sampel (31,3 %) tersebut merupakan kausa dari gejala klinis respirasi yang dilaporkan. Analisis tapak penting

pada protein F ND, protein HA AI, dan protein S1 IB mengidentifikasi karakter molekuler yang mendukung patogenesis masing-masing virus.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada BPPTN-BH Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada (Nomor: 1135/UN1/FKH/HK4/2023 tanggal 17 April 2023) atas dukungan finansial berupa Hibah Penelitian Pengembangan Departemen sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

Daftar Pustaka

- Andriyani, N. R., Shanti, A. R., Angeliya, L., Anggita, M., Untari, T., Wahyuni, A. E. T. H., & Wibowo, M. H. (2022). Deteksi Virus Newcastle Disease pada Burung Merpati (*Columba Livia*) dan Burung Tekukur (*Streptopilia Chinensis*) yang Menunjukkan Gejala Syaraf. *Acta VETERINARIA Indonesiana*, 10(3), 220-227. <https://doi.org/10.29244/avi.10.3.220-227>
- Bouwman, Kim M., Lisa M. Parsons, Alinda J. Berends, Robert P. de Vries, John F. Cipollo, and Monique H. Verheije. (2020). 'Three Amino Acid Changes in Avian Coronavirus Spike Protein Allow Binding to Kidney. *Journal of Virology*, 94.2 1–14 <https://doi.org/10.1128/jvi.01363-19>
- de Wit, J. J., Nieuwenhuisen-van Wilgen, J., Hoogkamer, A., vande Sande, H., Zuidam,

- G. J., & Fabri, T. H. F. (2011). Induction of cystic oviducts and protection against early challenge with infectious bronchitis virus serotype D388 (genotype QX) by maternally derived antibodies and by early vaccination. *Avian Pathology*, 40(5), 463–471. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.599060>
- Dewandaru, R. A., Santoso, C., Prayogo, F., & Wibowo, M. H. (2020). Gambaran Mikroskopis Berbagai Organ Merpati yang Menunjukkan Gejala Tortikolis dan Identifikasi Virus Penyakit Tetelo Berdasarkan Uji Agar Gel Presipitasi. *Jurnal Veteriner*, 21(4). <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2020.21.4.519>
- FAO. 2002. A Basic Laboratory Manual for the Small-Scale Production And Testing of I-2 Newcastle Disease Vaccine. ISBN 974-7946-26-2. <https://www.fao.org/3/ac802e/ac802e00.htm> (Diakses: 12 November 2023).
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2020). Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. Nucleic Acids Res. 2017 Oct 13. PubMed PMID: 29040670. <https://ictv.global/taxonomy> (Diakses: 12 November 2023)
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, and Koichiro Tamura, (2020). ‘MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms’, *Molecular Biology and Evolution*, 35.6, 1547–49. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lenchenko, E. M., Van Khay, P., Vatnikov, Y. A., Medvedev, I. N., & Gavrilov, V. A. (2017). Etiological structure and differential diagnostics of salmonellosis of birds. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*, 12(4), 359–367. <https://doi.org/10.22363/2312-797X-2017-12-4-359-367>
- MacLachlan, N. James, and Edward J. Dubovi, (2011). *Fenner’s Veterinary Virology, Veterinary Medicine*.
- Maharani, N. R., Susetya, H., & Wibowo, M. H. (2022). Molecular Detection of Hemagglutinin Gene Fragment of Avian Influenza Virus H9 Subtype Obtained from Poultry Commercial Farm with Prominent Symptom of Decreased Egg Production. *HAYATI Journal of Biosciences*, 29(4), 531–539. <https://doi.org/10.4308/hjb.29.4.531-539>
- Muflihanah, Andesfha, E., Wibawa, H., Zena, F.C., Hendrawati, F., Siswani, Wahyuni, Kartini, D., Rahayuningtyas, I., Hadi, S., Mukartini, S., Poermadjaja, B., Rasa, F. S. T. (2016). Kasus Pertama Low Pathogenic Avian Influenza Subtipe H9N2 pada Peternakan Ayam Petelur di Kabupaten Sidrap, Sulawesi Selatan Indonesia. *Ratekpil dan Surveilans Kesehatan Hewan*.
- Najimudeen, S. M., Hassan, M. S. H., Cork, S. C., & Abdul-Careem, M. F. (2020). Infectious bronchitis coronavirus infection in chickens: Multiple system disease with immune suppression. *Pathogens*, 9(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100779>
- Nururrozi, A., Yanuartono, Y., Widyarini, S., Ramandani, D., & Indarjulianto, S. (2020). Clinical and pathological features of aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus* in broilers. *Veterinary World*, 13(12), 2787. <https://doi.org/10.14202%2Fvetworld.2020.2787-2792>
- OIE. (2009). Avian Influenza. OIE Terrestrial Manual. Diakses 12 November 2023. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/2.03.04_AI.pdf
- OIE. (2018). Avian Infectious Bronchitis. OIE Terrestrial Manual. Diakses 12 November 2023. https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.03.02_AIB.pdf
- OIE. (2021). Newcastle Disease. OIE Terrestrial Manual. Diakses 12 November 2023. https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf

- Ockiya, M. A., Jarikre, T. A., Jibril, A. T., & Adeyefa, C. A. O. (2017). Detection and Partial Nucleotide Sequence of Egg Drop Syndrome Virus from a Poultry Flock in Ogun State, Nigeria. <https://pcujournals.org.ng/Downloads/PCU0011031088560898>
- Promkuntod, N., R. E.W. van Eijndhoven, G. de Vrieze, A. Gröne, and M. H. Verheije. (2014) ‘Mapping of the Receptor-Binding Domain and Amino Acids Critical for Attachment in the Spike Protein of Infectious Bronchitis Virus’, *Virology*, 448, 26–32 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.09.018>
- Santoso, Ferdinand Prayogo Cahyo, Rini Widayanti, Sitarina Widyarini, and Michael Haryadi Wibowo, (2024) ‘Spike Glycoprotein 1 Partial Gene Analysis of GI-19 (QX-like) Infectious Bronchitis Virus Isolated and Propagated from Breeder, Broiler, and Layer Chickens in Java Region’, *HAYATI Journal of Biosciences*, 31.3 414–24 <https://doi.org/10.4308/hjb.31.3.414-424>
- Suprihati, E., Yuniarti, W. M. (2017). The phylogenetics of Leucocytozoon caulleryi infecting broiler chickens in endemic areas in Indonesia. *Veterinary World*, 10(11), 1324. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1324-1328>
- Suratma, N. A. (2012). The Incidence of Parasitic Diseases in Livestock in Bali. *Indonesian Bulletin of Health Research*, 17(2), 64940.
- Swayne, D. E., Boulianne, M., Logue, C. M., McDougald, L.R., Nair, V., dan Suarez, D. L. 2020. *Disease of Poultry 14th Edition*. Hoboken: Willey Blackwell
- Wahyuni, A. E. T. H., Tabbu, C. R., Artanto, S., Setiawan, D. C. B., & Rajaguguk, S. I. (2018). Isolation, identification, and serotyping of Avibacterium paragallinarum from quails in Indonesia with typical infectious coryza disease symptoms. *Veterinary World*, 11(4), 519. <https://doi.org/10.14202%2Fvetworld.2018.519-524>
- Wibowo, Michael Haryadi, Dito Anggoro, Surya Amanu, AETH Wahyuni, Tri Untari, Sidna Artanto. (2017). ‘Receptor Binding and Antigenic Site Analysis of Hemagglutinin Gene Fragments of Avian Influenza Virus Serotype H5N1 Isolated from Indonesia’, *Pakistan Veterinary Journal*, 3.2, 123–28. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283638104>
- Wibowo, M. H., Ginting, T. E., & Asmara, W. (2019). Molecular characterization of pathogenic 4/91-like and QX-like infectious bronchitis virus infecting commercial poultry farms in Indonesia. *Veterinary World*, 12(2), 277–287. <https://doi.org/10.14202%2Fvetworld.2019.277-287>