

Deteksi Molekuler Avian Influenza Virus dan Newcastle Disease Virus pada Ayam Petelur Komersial dengan Gejala Neurologis Menggunakan sRT-PCR

(Molecular Detection of Avian Influenza Virus and Newcastle Disease Virus in Commercial Laying Hens with Neurological Symptoms Using sRT-PCR)

Maya Ekaningtias^{1*}, Hastari Wuryastuty², Raden Wasito³

¹Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Nahdlatul Wathan Mataram, Nusa Tenggara Barat

^{2,3}Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

*email: mentias4life@gmail.com

Diterima: 1 November 2025, Diperbaiki: 24 Desember 2025, Disetujui: 31 Desember 2025

Abstract. *Viral infections in commercial poultry are not always caused by a single pathogen and may involve concurrent infections by multiple viruses. Avian influenza virus (AIV) and Newcastle disease virus (NDV) are among the most important pathogens affecting poultry health, as they often induce overlapping clinical manifestations and tissue alterations, leading to high mortality rates and substantial economic losses. This study investigated the presence of these viruses in commercial layer chickens exhibiting neurological signs, including torticollis and leg paralysis, accompanied by hemorrhagic lesions in the digestive tract, using a molecular diagnostic approach. Serum and digestive tract samples were collected from affected layer chickens originating from commercial farms with reported disease outbreaks. All samples were analyzed using simplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (sRT-PCR). RNA extraction for AIV was performed using a commercial kit, while NDV RNA was isolated using Trizol reagent. Viral detection was carried out using specific primers targeting the nucleoprotein gene of AIV and the conserved region of NDV, producing amplicons of 552 bp and 320 bp, respectively. Amplified products were visualized by electrophoresis on 1.5% agarose gel. The results demonstrated the presence of AIV-specific amplicons in serum samples and NDV-specific amplicons in digestive tract tissues, indicating concurrent infection by both viruses in the examined layer chickens. These findings confirm that sRT-PCR is a reliable molecular tool for the confirmation and differentiation of AIV and NDV infections in poultry cases presenting similar clinical signs and pathological lesions.*

Keywords: *Avian influenza virus, Newcastle disease virus, sRT-PCR, molecular diagnosis, layer chickens*

Abstrak. Infeksi virus pada unggas komersial sering kali tidak bersifat tunggal, melainkan melibatkan lebih dari satu agen patogen. Dua virus yang memiliki signifikansi tinggi dalam kesehatan unggas adalah *Avian influenza virus* (AIV) dan *Newcastle disease virus* (NDV), yang kerap menimbulkan manifestasi klinis dan perubahan jaringan yang sulit dibedakan serta berdampak pada tingginya angka kematian dan kerugian ekonomi. Penelitian ini mengevaluasi keberadaan kedua virus tersebut pada ayam petelur komersial yang menunjukkan gangguan neurologis berupa tortikolis dan kelumpuhan kaki, disertai lesi hemoragik pada saluran pencernaan, melalui pendekatan diagnostik molekuler. Sampel serum dan jaringan saluran pencernaan dikoleksi dari ayam petelur yang berasal dari peternakan komersial dengan riwayat kasus penyakit. Seluruh sampel dianalisis menggunakan metode *simplex reverse transcriptase polymerase chain reaction* (sRT-PCR). Ekstraksi RNA AIV dilakukan dengan kit komersial, sedangkan RNA NDV diisolasi menggunakan reagen Trizol. Proses amplifikasi menggunakan primer yang menargetkan gen nukleoprotein AIV dan *conserved region* NDV, dengan produk amplifikasi masing-masing berukuran 552 bp dan 320 bp. Visualisasi hasil dilakukan melalui elektroforesis gel agarosa 1,5%. Hasil pengujian menunjukkan keberadaan amplikon spesifik AIV pada sampel serum dan NDV

pada jaringan saluran pencernaan. Temuan ini mengindikasikan adanya infeksi simultan kedua virus pada ayam petelur komersial dengan gejala neurologis dan lesi hemoragik saluran pencernaan. Dengan demikian, sRT-PCR terbukti efektif sebagai metode konfirmasi diagnostik molekuler untuk mendeteksi AIV dan NDV secara spesifik pada kasus penyakit unggas dengan gejala klinis yang tumpang tindih.

Kata kunci: *Avian influenza virus, Newcastle disease virus*, diagnostik molekuler, sRT-PCR, ayam petelur

PENDAHULUAN

Avian influenza virus (AIV) dan *Newcastle disease virus* (NDV) merupakan dua patogen utama pada unggas yang hingga saat ini masih menjadi penyebab utama terjadinya wabah penyakit di industri perunggasan (Hartono et al., 2021; Sari et al., 2024). Kedua virus tersebut sering memicu kejadian penyakit berulang dengan gambaran klinis dan lesi patologis yang sulit dibedakan, disertai tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi, sehingga berdampak signifikan terhadap kerugian ekonomi pada sektor perunggasan. Kesamaan manifestasi klinis dan patologis antara infeksi AIV dan NDV menjadi tantangan tersendiri dalam peneguhan diagnosis penyakit unggas di lapangan (Sanjiwani et al., 2024).

Avian influenza (AI) merupakan penyakit unggas menular yang disebabkan oleh virus influenza tipe A yang tergolong dalam famili *Orthomyxoviridae* (Gayanti et al., 2024; Marson et al., 2020). Di Indonesia, wabah AI pertama kali dilaporkan pada akhir tahun 2003 dan diidentifikasi sebagai subtipe H5N1. Berdasarkan tingkat patogenisitasnya, virus AI diklasifikasikan menjadi highly pathogenic avian influenza (HPAI) dan low pathogenic avian influenza (LPAI).

Subtipe H5 dan H7 yang termasuk kelompok HPAI diketahui mampu menyebabkan angka kesakitan dan kematian yang sangat tinggi pada ayam komersial, serta dapat menimbulkan infeksi sistemik yang melibatkan berbagai organ tubuh unggas (Gayanti et al., 2024; Isnawati et al., 2020; Pantin-Jackwood et al., 2023). Di Indonesia, LPAI dilaporkan

berhasil diisolasi dari itik dan burung pelikan pada tahun 1983 (Ronohardjo et al., 1985). Infeksi LPAI umumnya ditandai dengan tingkat morbiditas yang relatif tinggi (>50%) namun mortalitas yang rendah (<5%). Meskipun demikian, pada unggas muda atau apabila terjadi infeksi sekunder, angka kematian dapat meningkat secara signifikan (Widianingrum et al., 2022). Secara klinis, infeksi LPAI dapat menyebabkan gangguan patofisiologis pada sistem pernapasan, pencernaan, reproduksi, dan urinaria (Sanjiwani et al., 2024).

Newcastle disease (ND) juga merupakan penyakit unggas penting dengan sejarah panjang di Indonesia. Kasus ND pertama kali dilaporkan terjadi di Pulau Jawa pada tahun 1926 (Quinn et al., 2002). Pada awal tahun 2011, wabah ND kembali meningkat dan dilaporkan menyebar secara luas pada peternakan ayam pedaging di berbagai wilayah Indonesia, termasuk Sumatera, Jawa, Bali, Kalimantan, dan Sulawesi, dengan jumlah kasus yang lebih tinggi dibandingkan tahun-tahun sebelumnya. Penyakit ND disebabkan oleh galur virulen avian paramyxovirus tipe 1 (APMV-1) yang tergolong dalam genus *Avulavirus*, subfamili *Paramyxovirinae*, famili *Paramyxoviridae* (Rell et al., 2021; Wulandari et al., 2021). Berdasarkan tingkat virulensinya pada ayam, NDV dibagi menjadi tiga patotipe, yaitu velogenik (sangat virulen), mesogenik (virulensi sedang), dan lentogenik (virulensi rendah) (Pratama et al., 2025). Isolat NDV dengan virulensi rendah

umumnya menyebabkan penyakit subklinis dengan morbiditas yang rendah, sedangkan galur velogenik dapat mengakibatkan kematian akut dan cepat pada unggas (Mo et al., 2024).

Dalam kondisi lapangan, NDV sering ditemukan menginfeksi unggas secara bersamaan dengan AIV. Kedua virus tersebut memiliki kesamaan yang signifikan dalam pola penyebaran, tingkat mortalitas, serta manifestasi klinis pada unggas komersial (Andriyani et al., 2022; Sanjiwani et al., 2024). Infeksi NDV umumnya ditandai oleh gangguan sistem saraf yang dominan, seperti ataksia, hilangnya keseimbangan, tortikolis, posisi tubuh rebah tidak normal, dan paralisis kaki (Alexander and Senne 2008; Cattoli et al. 2011). Gejala klinis tersebut juga sering dijumpai pada unggas yang terinfeksi AIV (Perkins and Swayne, 2001; Cattoli et al., 2011), bahkan dengan tingkat mortalitas yang dapat mencapai 100% (Pattison et al. 2008).

Kondisi tersebut sering dijumpai pada kasus penyakit ayam yang diperiksa di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada maupun yang ditemukan di lapangan, sehingga menyulitkan proses peneguhan diagnosis apabila hanya didasarkan pada pengamatan klinis dan patologis. Metode diagnostik konvensional yang selama ini digunakan, seperti isolasi virus dan pemeriksaan serologis, memerlukan waktu yang relatif lama serta tenaga dan sumber daya yang intensif. Oleh karena itu, diperlukan metode diagnostik yang cepat, sensitif, dan spesifik untuk mendeteksi serta membedakan infeksi AIV dan NDV secara akurat.

Seiring perkembangan teknologi diagnostik, berbagai penelitian melaporkan penerapan metode molekuler simplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (sRT-PCR) sebagai teknik yang

cepat dan sensitif untuk mendeteksi agen penyebab penyakit pernapasan dan sistemik pada unggas. Metode RT-PCR memiliki keunggulan berupa waktu analisis yang singkat, akurasi tinggi, serta sensitivitas dan spesifisitas yang baik dibandingkan metode konvensional (Lee et al., 2001; Wuryastuty and Wasito 2013).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aplikasi uji molekuler sRT-PCR dalam mendeteksi AIV dan NDV pada ayam petelur komersial yang menunjukkan gejala klinis serupa, terutama tortikolis dan paralisis kaki, serta lesi patologis berupa perdarahan berbintik pada saluran pencernaan. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk menentukan apakah kasus penyakit tersebut disebabkan oleh infeksi tunggal atau infeksi campuran antara AIV dan NDV. Identifikasi penyebab penyakit yang akurat melalui pendekatan molekuler diharapkan dapat mendukung peneguhan diagnosis secara cepat dan tepat, serta menjadi dasar dalam perumusan strategi pencegahan dan pengendalian penyakit, termasuk penerapan biosekuriti dan biosafety yang efektif pada industri perunggasan.

BAHAN DAN METODE

Sampel penelitian ini berasal dari kasus penyakit unggas yang ditemukan di lapangan pada peternakan ayam petelur komersial di wilayah Jawa Tengah selama periode 2013–2015, serta dari koleksi Laboratorium Patologi dan Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada.

Bahan uji dikumpulkan dari ayam petelur yang menunjukkan indikasi gangguan sistem saraf, antara lain tortikolis dan kelumpuhan, disertai temuan lesi perdarahan pada jaringan paru-paru dan/atau saluran pencernaan. Kasus-kasus tersebut diidentifikasi baik di lokasi

peternakan maupun melalui dokumentasi laboratorium sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Salah satu peternakan ayam petelur yang menjadi tempat penelitian



Gambar 2. Gejala tortikolis dan paralisis kaki pada ayam petelur komersial

Prosedur Penelitian

Sampel yang diambil untuk uji sRT-PCR berupa jaringan saluran pencernaan dan serum. Untuk kontrol positif NDV digunakan isolat vaksin NDV komersial (LaSota), sedangkan untuk kontrol positif AIV digunakan isolat AIV yang berasal dari cairan alantois koleksi Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam, FKH, UGM (Wuryastuti, 2014). Darah diambil dari vena sayap, serum dipisahkan dari sel darah merah, diambil dan disimpan pada suhu 4°C untuk analisis AIV lebih lanjut. Jaringan disimpan

dalam larutan NaCl fisiologis untuk ekstraksi RNA NDV.

Desain primer *polymerase chain reaction*

Pada penelitian ini, primer spesifik sRT-PCR yang digunakan untuk deteksi AIV adalah berdasarkan penelitian Wuryastuty and Wasito, (2012), sedangkan untuk deteksi NDV menggunakan primer spesifik yang berdasarkan penelitian Pang et al (2002) dan Rashid et al., (2009). Sasaran gen yang diamplifikasi untuk AIV adalah

nukleoprotein (NP), sedangkan NDV adalah gen *conserved region*, yaitu gen L (Wise et al., 2004). Pasangan primer yang

digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel berikut.

Tabel 1. Pasangan sekuen oligoprimmer yang digunakan

Gen target	Sekuen primer (5'- 3')	Produk PCR (bp)
NP AIV	NP F 5'-AGC AAA AGC AGG GTA GAT AA-3' NP R 5' -TCC TTG CAT CAG AGA GCA CA-3'	552
Conserved region NDV	F 5' -GGA GGA TGT TGG CAG CAT T-3' R 5' -GTC AAC ATA TAC ACC TCA TC-3'	320

Ekstraksi RNA *avian influenza virus* dan *newcastle disease virus*

High pure viral nucleic acid kit (Roche) digunakan untuk mengekstraksi RNA dari genom AIV. Dua ratus mikroliter sampel serum dipipet ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml steril. Dua ratus mikroliter *binding buffer*, dilengkapi poli A dan 50 µl larutan proteinase K ditambahkan ke dalam tabung Eppendorf. Campuran tersebut di *vortex* dan diinkubasi dalam *waterbath* 72°C 10 menit. Setelah inkubasi, ditambahkan lagi 100 µl *binding buffer* dan campuran tersebut dimasukkan ke dalam *high pure filter tube*, kemudian disentrifugasi dengan 8.000 rpm 1 menit. *Flowthrough* dan tabung koleksi dibuang, diganti dengan tabung koleksi baru. *Inhibitor removal buffer* (500 µl) ditambahkan ke tabung filter, kemudian disentrifugasi 8.000 rpm 1 menit. *Flowthrough* dan tabung koleksi dibuang, diganti dengan tabung koleksi baru. *Wash buffer* (450 µl) mengandung 70% etanol, ditambahkan ke dalam tabung filter, disentrifugasi 8,000 rpm 1 menit. *Flowthrough* dan tabung koleksi dibuang lagi. Tabung filter digabung dengan tabung koleksi baru, sebanyak 450 µl *wash buffer* ditambahkan lagi ke dalam tabung filter, kemudian disentrifugasi dengan 8,000 rpm 1 menit. *Flowthrough* dibuang, tapi tabung

filter-tabung koleksi yang tersisa disentrifugasi 30 detik dengan kecepatan maksimum 12,000 rpm untuk menghilangkan *wash buffer*. Selanjutnya, tabung filter ditempatkan dalam tabung Eppendorf steril dan 50 µl *elution buffer* ditambahkan ke dalam tabung filter, kemudian disentrifugasi dengan 8,000 rpm 1 menit. Sentrifugasi diulang sekali lagi dengan 12,000 rpm 30 detik untuk memaksimalkan pengumpulan RNA. Selanjutnya, tabung filter dibuang dan Eppendorf yang berisi RNA dimurnikan, disimpan pada suhu -20°C sampai pengujian RT-PCR dilakukan (Wasito et al., 2014).

Untuk ekstraksi RNA *Newcastle disease virus* (NDV) dari sampel jaringan usus, maka 100 mg sampel jaringan usus dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 2 ml steril kemudian ditambahkan 1 ml larutan Trizol ke dalam tabung tersebut, jaringan dihomogenisasi dalam *homogenizer Heidalp-p7* 3 menit. Selanjutnya, homogenat diinkubasi pada suhu kamar 5-10 menit dan sebanyak 200 µl kloroform ditambahkan ke homogenat secara perlahan. Tabung berisi campuran homogenat dikocok kuat 15- detik sehingga diperoleh pencampuran yang maksimal. Campuran diinkubasi pada suhu kamar 10 menit, kemudian disentrifugasi

dengan 12.000 rpm, suhu 4°C 15 menit. Supernatan (400 µl) diambil dengan cara dipipet perlahan-lahan dan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf steril yang berisi 500 µl larutan isopropanol dan 0,5 µl larutan glikogen. Campuran tersebut disentrifugasi dengan 12.000 rpm, suhu 4°C, 15 menit. Setelah disentrifugasi, supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 1.000 µl etanol 70% dan disentrifugasi dengan 7.500 rpm, suhu 4°C, 5 menit. Prosedur pencucian dilakukan dua kali. Setelah pencucian, supernatan dibuang dan pelet dikering-anginkan pada suhu kamar. Pelet kering diencerkan ke dalam 50 µl H₂O bebas RNase. Sebelum digunakan dalam uji RT-PCR, tabung Eppendorf berisi filtrat tersebut disimpan pada suhu -20°C (Wasito et al., 2014).

Prosedur *simplex reverse transcriptase polymerase chain reaction*

SuperScript One-Step RT-PCR dengan *Platinum Taq* (Invitrogen, USA) digunakan untuk mengamplifikasi gen NP AIV dan gen *conserved region* NDV. Sebanyak 25 µl 2x *reaction mix* (mengandung dNTP dan larutan buffer), masing-masing *forward primer* dan *reverse primer* 1,25 µl, ion Mg 2,5 µl, RNA AIV (*template*) 5 µl, RT/ *Platinum® Taq mix* 1 unit/50 µl campuran reaksi dan H₂O bebas RNase dipipet ke dalam tabung PCR hingga total volume akhir adalah 50 µl. Proses sintesis cDNA dilakukan dengan proses *reverse transcription* pada suhu 45°C-50°C 30-45 menit dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu 95°C 15 menit. Kemudian, proses dilanjutkan pada amplifikasi PCR 36-40 siklus dengan masing-masing suhu denaturasi 94°C 30 detik, *annealing* 52°C 30 detik-1 menit, ekstensi awal 72°C 1-2 menit, dan ekstensi akhir 72°C 7 menit (Wuryastuty and Wasito, 2012).

Sedangkan untuk RNA genom NDV menggunakan *reaction mix* yang sama dan ditambahkan *forward primer* dan *reverse primer* yang spesifik terhadap *conserved region* NDV dengan kondisi amplifikasi yaitu sintesis cDNA pada 45°C 45 menit, denaturasi awal pada 96°C 5 menit, dilanjutkan dengan PCR 40 siklus dan setiap siklus terdiri dari denaturasi pada 96°C 1 menit, *annealing* pada 53°C 1 menit, ekstensi pada 70°C 1 menit, dan ekstensi akhir pada 72°C 10 menit (Wasito et al., 2014).

Analisis hasil dengan elektroforesis

Elektroforesis gel agarose digunakan untuk memvisualisasikan produk PCR. Gel agarose 1,5% (w/v) dalam larutan 1X TAE *buffer*. Agarose dilarutkan dalam 1X TAE *buffer* yang dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer (*Pyrex*) dan dididihkan dengan *microwave* sampai menjadi jernih. Setelah larutan agarose agak dingin, ditambahkan 0,1 µg/µl etidium bromida dan dicampur merata kemudian dituangkan ke dalam lempeng cetakan yang telah dilengkapi dengan sisir pembentuk sumuran. Setelah gel agarose mengeras, sisir tersebut dilepas perlahan-lahan. Gel agarose diletakkan dalam *apparatus* elektroforesis dan ditambahkan TAE sebagai buffer hingga gel terendam sempurna. Produk PCR (5 µl) dan 5 µl *marker DNA* 100 bp (*Vivantis*) ditambahkan pada 2 µl *loading dye* kemudian dimasukkan ke dalam sumuran yang tersedia. Setelah semua sampel DNA masuk ke dalam sumuran, *apparatus* elektroforesis dialiri arus listrik dengan tegangan 100 volt selama 25 menit. Hasil elektroforesis diamati di bawah *UV transilluminator* sehingga akan terlihat pita DNA karena *fluorescent* yang dipantulkan. Foto-foto diambil dengan sistem *Imaging Gel Logic* 100 (Wuryastuty and Wasito, 2012).

Analisis data

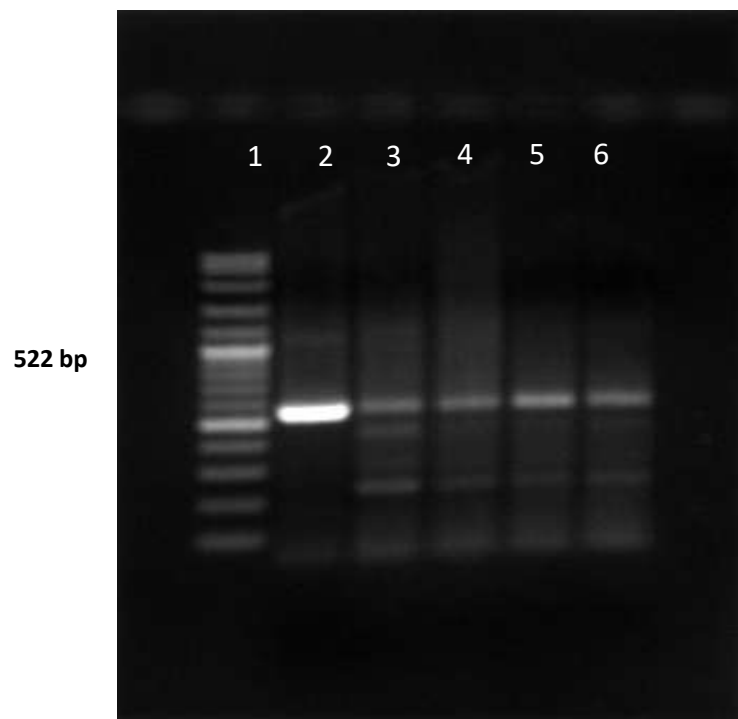
Data yang dikumpulkan dengan sRT-PCR dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan temuan penelitian.

HASIL DAN PEMBAHASAN

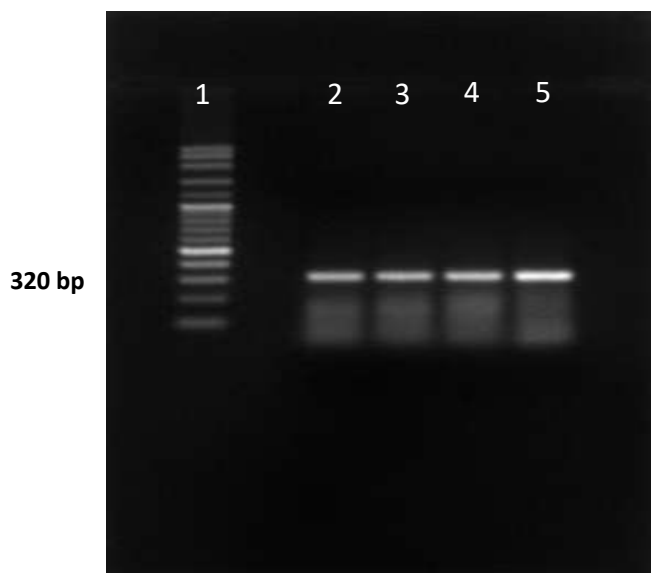
Infeksi *Avian Influenza* (AI) dan *Newcastle Disease* (ND) tetap menjadi perhatian utama dalam peternakan unggas karena dapat menimbulkan kerugian ekonomi yang besar serta angka kematian tinggi pada ayam (Zhang et al., 2025). Beberapa laporan menunjukkan bahwa unggas dapat mengalami infeksi tunggal maupun ganda oleh berbagai virus, termasuk AIV dan NDV, yang sering menimbulkan gejala klinis serupa dan mampu menular antara unggas liar dan domestik (Bosco-Lauth et al., 2023). Kesamaan gejala ini menyulitkan upaya peneguhan diagnosis dan pengendalian penyakit, sehingga metode diagnostik yang cepat, sensitif, dan spesifik sangat

dibutuhkan untuk mendukung strategi pencegahan dan potensi eradikasi AIV dan NDV pada ayam petelur komersial. Sampel yang dianalisis berasal dari ayam petelur komersial yang diduga terinfeksi AIV dan NDV berdasarkan manifestasi klinis di lapangan, yaitu tortikolis, kelumpuhan kaki, dan lesi hemoragik berbintik pada saluran pencernaan (Dewandaru et al., 2020). Analisis menggunakan metode simplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (sRT-PCR) menunjukkan amplicon berukuran 552 bp untuk gen nukleoprotein (NP) AIV dan 320 bp untuk gen conserved region NDV.

Hasil elektroforesis gel agarose yang diamati di bawah UV trans-illuminator menunjukkan pita DNA AIV sejajar dengan kontrol positif pada posisi 552 bp (Gambar 3) dan pita DNA NDV sejajar dengan kontrol positif pada posisi 320 bp (Gambar 4).



Gambar 3. Simplex RT-PCR pada 1,5% gel elektroforesis untuk gen NP AIV 552 bp pada sampel serum ayam isolat lapang. Lajur 1 DNA *marker* 100 bp (Vivantis), Lajur 2 NP kontrol positif (cairan alantois), Lajur 3, 4, 5, dan 6 sampel serum positif NP AIV.



Gambar 4. Simplex RT-PCR pada 1,5% gel elektroforesis untuk *conserved region* NDV 320 bp pada sampel saluran pencernaan ayam isolat lapang. Lajur 1 DNA *marker* 100 bp (Vivantis), lajur 2, 3, 4, dan 5 sampel saluran pencernaan positif NDV.

Secara spesifik, sediaan serum menunjukkan hasil positif untuk AIV, sedangkan sediaan jaringan saluran pencernaan positif untuk NDV. Keberhasilan deteksi AIV dan NDV sangat bergantung pada pemilihan primer yang spesifik. Hasil positif AIV menegaskan bahwa primer yang digunakan mampu mengamplifikasi gen NP AIV, sedangkan hasil positif NDV menunjukkan primer spesifik untuk gen *conserved region* NDV. Amplifikasi gen NP AIV pada semua sampel serum, terlihat pada fragmen DNA 552 bp melalui elektroforesis 1,5% pada 100 Volt, menegaskan bahwa ayam petelur komersial tersebut terinfeksi AIV. Gen NP memiliki peran penting dalam proses enkapsidasi genom virus, yang esensial untuk transkripsi, replikasi, dan pengemasan RNA virus (Chauhan & Gordon, 2022).

Selain itu, gen NP berperan dalam interaksi dengan protein seluler hospes yang memiliki aktivitas *nuclear localization signal* (NLS) yang dapat memfasilitasi pengangkutan NP dan RNA virus ke dalam inti sel hospes (Wang et al 1997) dan

interaksi langsung dengan polimerase virus untuk replikasi virus tanpa primer (Newcomb et al 2009), serta aktivasi limfosit T sitotoksik (Elton et al 1999).

Pada gel agarose 1,5%, hasil elektroforesis 100 Volt menunjukkan, bahwa fragmen DNA 320 bp merupakan gen penyandi *conserved region* NDV dan teramplifikasi pada semua sampel saluran pencernaan. Hasil positif *conserved region* NDV tersebut membuktikan, bahwa ayam petelur komersial terinfeksi NDV. Wise et al., (2004), telah melakukan amplifikasi dan karakterisasi gen L dari NDV dan menemukan bahwa substitusi pada gen L jarang terjadi jika dibandingkan dengan gen lain sehingga gen L lebih *conserved*.

Pada penelitian ini, pemilihan sampel saluran pencernaan untuk deteksi adanya NDV pada ayam petelur dengan metode sRT-PCR terkait dengan transmisi, predisposisi dan predileksi terjadinya replikasi NDV. Virus ND bereplikasi pada saluran respirasi bagian atas dan saluran pencernaan. Virus tersebut menyebar melalui aliran darah ke paru-paru, ginjal, usus, sumsum tulang sehingga terjadi

viremia menyebabkan sistem syaraf pusat, usus dan paru-paru mengalami infeksi (Quinn et al., 2002).

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa infeksi ganda virus pada hewan ternak, termasuk unggas, merupakan fenomena yang umum terjadi. Studi in vitro mengenai koinfeksi AIV dan NDV mengindikasikan bahwa kedua virus tersebut dapat saling menekan replikasi masing-masing. Ketika kedua virus diinokulasi secara bersamaan, AIV mampu menghambat pertumbuhan NDV. Sebaliknya, jika NDV diinokulasi terlebih dahulu, NDV dapat menekan replikasi AIV. Tingkat interferensi antara kedua virus ini dipengaruhi oleh jumlah virus yang digunakan serta virulensi galur yang terlibat (Ge et al., 2012).

Metode diagnostik berbasis molekuler mempunyai keunggulan dalam hal kecepatan, sensitifitas, dan spesifitas untuk mendiagnosis penyakit yang disebabkan oleh virus (Gavin and Thomson 2003). Metode RT-PCR telah digunakan secara luas untuk mengamplifikasi urutan gen berbagai virus RNA. Kecepatan diagnosis dapat mengalami peningkatan yang signifikan jika digunakan metode RT-PCR (Creelan et al., 2002). Haque et al., (2010) melaporkan, bahwa genom NDV berhasil dideteksi dengan metode RT-PCR pada sampel klinis dan *post-mortem* ayam pedaging dan ayam petelur yang terinfeksi NDV. Prosedur RT-PCR telah ditetapkan sebagai alat diagnosis yang handal untuk deteksi NDV. Metode RT-PCR lebih baik daripada metode konvensional sebagai metode uji konfirmasi untuk diagnosis NDV di lapangan (Krzysztof et al., 2006).

Penggunaan RT-PCR untuk deteksi AIV bukan pula hal yang baru. Beberapa strategi RT-PCR telah digunakan untuk mendeteksi AIV atau membedakan antara virus *influenza* A, B, dan C (Zou, 1997). Metode pemeriksaan PCR perlu dilakukan

dalam deteksi keberadaan AIV, terutama saat konsentrasi antigen sangat rendah pada spesimen (organ) yang diperiksa sehingga dapat meminimalkan kebutuhan virus hidup pada uji isolasi virus, serta dapat mendeteksi kelemahan uji lain yang berdasarkan pada pemeriksaan keberadaan antigen (Brojer et al 2009). Keunggulan RT-PCR jika dibandingkan dengan metode konvensional adalah dapat diaplikasikan pada sampel dengan untai asam nukleat yang lebih panjang, dapat mengurangi resiko terjadinya kontaminasi silang, dapat menentukan kuantifikasi sasaran, dapat mendeteksi adanya modifikasi antigenik virus, dan dapat menganalisis ekspresi genotip (Hoffman et al., 2009).

Temuan penelitian ini membuktikan bahwa dugaan infeksi ganda oleh AIV dan NDV pada ayam petelur komersial yang menunjukkan gejala klinis tortikolis, kelumpuhan kaki, serta lesi hemoragik berbintik pada saluran pencernaan dapat dikonfirmasi melalui identifikasi kedua virus tersebut menggunakan metode molekuler simplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (sRT-PCR).

SIMPULAN

Kesimpulan menunjukkan bahwa ayam petelur komersial dengan gejala tortikolis, kelumpuhan kaki, dan lesi hemoragik saluran pencernaan mengalami infeksi Avian Influenza Virus (AIV) dan Newcastle Disease Virus (NDV). Deteksi molekuler menggunakan metode simplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (sRT-PCR) berhasil mengidentifikasi ampikon spesifik gen NP AIV berukuran 552 bp pada sampel serum dan gen conserved region NDV berukuran 320 bp pada jaringan saluran pencernaan. Hasil ini mengonfirmasi terjadinya infeksi ganda AIV dan NDV. Metode sRT-PCR terbukti cepat, sensitif, dan spesifik,

sehingga efektif sebagai alat konfirmasi diagnosis untuk mendukung pengendalian dan pencegahan penyakit unggas di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Achenbach, J. E., & Bowen, R. A. (2011). Transmission of avian influenza A viruses among species in an artificial barnyard. *PLoS ONE*, 6(3), e17643.
- Alexander, D. J. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et Technique (OIE)*, 19, 443–462.
- Alexander, D. J., & Senne, D. A. (2008). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. In *Diseases of Poultry* (12th ed.). Blackwell Publishing.
- Alexander, D. J., & Stuart, J. C. (1982). Isolation of an influenza A virus from domestic fowl in Great Britain. *Veterinary Record*, 111, 416.
- Andriyani, N. R., Shanti, A. R., Angeliya, L., Anggita, M., Untari, T., Wahyuni, A. E. T. H., Asmara, W., & 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.
- Bosco-Lauth, A., Rodriguez, A., Maison, R. M., Porter, S. M., & Root, J. J. (2023). H7N9 influenza A virus transmission in a multispecies barnyard model. *Virology*, 582, 100–105.
- Brojer, C., Ågren, E. O., Uhlhorn, H., Bernodt, K., Mörner, T., Jansson, D. S., Mattsson, R., Zohari, S., Thorén, P., Berg, M., & Gavier-Widén, D. (2009). Pathology of natural highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infection in wild tufted ducks (*Aythya fuligula*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21, 1663–1670.
- Capua, I., & Alexander, D. J. (2009). *Avian influenza and Newcastle disease: A field and laboratory manual*. Springer-Verlag Italia.
- Cattoli, G., Susta, L., Terregino, C., & Brown, C. (2011). Newcastle disease: A review of field recognition and current methods of laboratory detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 637–658.
- Chauhan, R. P., & Gordon, M. L. (2022). An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates. *Virus Genes*, 58(4), 255–269.
- Chauhan, R. P., & Gordon, M. L. (2022). Influenza virus nucleoprotein: Structure, function, and antiviral targeting. *Viruses*, 14(3), 550.
- Creelan, J. L., Graham, D. A., & McCullough, S. J. (2002). Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 using one-step RT-PCR. *Avian Pathology*, 31(5), 493–499.
- 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).
- Dewandaru, R. A., et al. (2020). Pathological findings of avian influenza and Newcastle disease in layer chickens. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 14(2), 85–92.
- Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, R., McCauley,

- J., & Digard, P. (1999). Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *Journal of Virology*, 73, 735–745.
- Gavin, P. J., & Thomson, R. B. (2003). Review of rapid diagnostic tests for influenza. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4, 151–172.
- Gayanti, A. N. S., Mahardika, I. G. N. K., Winaya, I. B. O., Suarjana, I. G. K., & Apsari, I. A. P. (2024). Case of avian influenza in broiler chicken at Jatiluwih Village. *Buletin Veteriner Udayana*, 370–387.
- Ge, J., Deng, G., Wen, Z., Tian, G., Wang, Y., Shi, J., Wang, X., Li, Y., & Hu, S. (2007). Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine protects chickens from lethal H5N1 challenge. *Journal of Virology*, 81, 150–158.
- Ge, S., Zheng, D., Zhao, Y., et al. (2012). Evaluating viral interference between influenza virus and Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, 9, 128.
- Haque, M. H., Hossain, M. T., Islam, M. T., Zinnah, M. A., Khan, M. S. R., & Islam, M. A. (2010). Isolation and detection of Newcastle disease virus by RT-PCR. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 8(2), 87–92.
- Hartono, M., Sirat, M. M. P., Santosa, P. E., Siswanto, Ermawati, R., Yudhistira, G. J., Juandita, K. N., Fatmawati, S. T., & Sagala, Y. N. (2021). Vaccination program and the establishment of vaccinator candidates in the context of avian influenza and Newcastle disease prevention in Mandah Village, Lampung Selatan District.
- Hoffmann, B., Harder, T., Lange, E., Kalthoff, D., Reimann, I., & Beer, M. (2009). New real-time RT-PCR assays for detection of influenza A viruses. *Journal of Virological Methods*, 159, 29–36.
- Isnawati, R., Putra, I. P. C., Susiani, R. D., Wuryastuti, H., & Wasito, R. (2020). Deteksi virus avian influenza pada ayam pedaging komersial yang disuplementasi water additive. *Prosiding SNPBS*, 735–743.
- Kapczynski, D. R., Afonso, C. L., & Miller, P. J. (2013). Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 41, 447–453.
- Krzysztof, S., Zenon, M., & Katarzyna, D. (2006). Detection of Newcastle disease virus by RT-PCR. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 50, 3–7.
- Lee, M. S., Chang, P. C., Shien, J. H., Cheng, M. C., & Shieh, H. K. (2001). Identification and subtyping of avian influenza viruses by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 97, 13–22.
- Marson, F. G. S., Suardana, I. B. K., & Nindhia, T. S. (2020). Monitoring titer antibodies post-vaccination of avian influenza subtype H5N1 in duck livestock of Baha Village, Bali.
- Mo, J., Segovia, K., Chrzastek, K., Briggs, K., & Kapczynski, D. R. (2024). Morphologic characterization and cytokine response of chicken bone-marrow derived dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, 15, 1374838.
- Newcomb, L. L., et al. (2009). Influenza nucleoprotein interactions with polymerase. *Journal of Virology*, 83, 522–529.
- Pantin-Jackwood, M. J., et al. (2023). Pathogenicity in chickens and turkeys of a 2021 US H5N1 virus. *Viruses*, 15(11), 2273.

- Pang, Y., Wang, H., Girshick, T., & Khan, M. I. (2002). Development of multiplex PCR for avian respiratory agents. *Avian Diseases*, 46, 691–699.
- Pattison, M., McMullin, P. F., Bradbury, J. M., & Alexander, D. J. (2008). *Poultry diseases* (6th ed.). Saunders Elsevier.
- Perkins, L. E. L., & Swayne, D. E. (2001). Pathobiology of H5N1 avian influenza virus. *Veterinary Pathology*, 38, 149–164.
- Portela, A., & Digard, P. (2002). The influenza virus nucleoprotein. *Journal of General Virology*, 83, 723–734.
- Pratama, I. G. A. P., et al. (2025). Case study of velogenic Newcastle disease strain. *Buletin Veteriner Udayana*, 705–720.
- Quinn, P. J., et al. (2002). *Veterinary microbiology and microbial disease*. Blackwell Science.
- Rashid, S., et al. (2009). Multiplex PCR for avian respiratory pathogens. *Poultry Science*, 88, 2526–2531.
- Rell, F., Adi, A. A. M., & Mahardika, G. N. K. (2021). Analisis filogeni virus Newcastle disease isolat Bali. *Buletin Veteriner Udayana*, 13, 67–74.
- Ronohardjo, P., et al. (1985). Identification of influenza A virus in Indonesia. *Penyakit Hewan*, XVII(1), 249–257.
- Sanjiwani, K. A. T., et al. (2024). Multiple infections by avian influenza and Newcastle disease virus. *Buletin Veteriner Udayana*, 1316–1329.
- Sari, N. P. D. S., et al. (2024). Newcastle disease and avian influenza in broiler. *Veterinary Science and Medicine Journal*, 363–375. <https://doi.org/10.24843/vsmj.2024.v06.i04.p09>
- Swayne, D. E., & Pantin-Jackwood, M. (2008). *Pathobiology of avian influenza virus infections*. Blackwell Publishing.
- Wasito, R., et al. (2014). Detection of pathogenic H5 and H7 influenza A viruses. *Biochemical and Biotechnology Research*, 2(2), 27–31.
- Widianingrum, D. C., et al. (2022). Penyakit chronic respiratory disease (CRD). *Jurnal Sain Veteriner*, 40(2), 221–224.
- Wise, M. G., et al. (2004). RNA polymerase gene analysis of Newcastle disease virus. *Virus Research*, 104(1), 71–80.
- Wulandari, I., et al. (2021). Karakterisasi molekuler protein HN virus Newcastle disease. *Jurnal Medik Veteriner*, 4(2), 231–242.
- Wuryastuty, H., & Wasito, R. (2012). Respiratory avian influenza A (H5N1) in ducks. *Jurnal Sain Veteriner*, 30(1), 1–7.
- Wuryastuty, H., & Wasito, R. (2013). Molecular identification of avian influenza virus in house flies. *Jurnal Sain Veteriner*, 31(1), 1–7.
- Zhang, S., et al. (2025). Eco-epidemiological mechanisms of avian influenza and Newcastle virus co-infection. *Poultry Science*, 105779.
- Zou, S. (1997). Genetic screening for influenza virus variants. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2623–2627.