

# IDENTIFIKASI SUBTIPE VIRUS AVIAN INFLUENZA ISOLAT LEGOK MENGGUNAKAN POLYMERASE CHAIN REACTION

PUDIATMOKO, BAHRUDDIN SYAHRONI HASIBUAN,  
SRI MURNI ASTUTI, EMILIA DAN ENUH RAHARJO JUSA  
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan,  
Gunungsindur, Bogor 16340

## ABSTRACT

The virology laboratory of Veterinary Drug Assay Laboratory isolated a virus which caused respiratory clinical signs in chicken from a layer farm, in Legok, Tangerang. The clinical signs of the disease were very similar to the avian influenza. The virus isolate was then identified by RT-PCR using Primer NP-1200f and NP-1529r that amplified nucleoprotein gene of all influenza virus of poultry, man, pig and horse, and using 15 pair of H1-15 primer that amplified haemagglutinin antigen (HA) of avian subtype. The result of RT-PCR showed that both of the genes of Legok isolate were amplified with NP-1200f and NP-1529r pair and H5-131f and H5-580 pair primers. The result indicated that the Legok isolate was an avian influenza subtype H5N1.

**Key word:** Avian influenza, RT-PCR, Nucleoprotein, hemagglutinin, Legok isolate.

## ABSTRAK

Laboratorium virologi Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan telah mengisolasi virus avian influenza yang berasal dari ayam dengan gejala klinis kelainan saluran pernafasan, dari peternakan ayam layer di Legok, Tangerang. Gejala penyakit yang ditimbulkan menyerupai penyakit avian influenza. Isolat virus diidentifikasi menggunakan RT-PCR dengan sepasang primer NP-1200f dan NP-1529r yang dapat mengamplifikasi gen Nucleoprotein (NP) dari semua virus influenza dari unggas, manusia, babi dan kuda serta menggunakan 15 pasang primer H1-15 yang dapat mengamplifikasi gen Hemagglutinin (HA) dari subtype virus avian influenza. Hasil RT-PCR memperlihatkan kedua gen dari virus isolat Legok tersebut dapat teramplifikasi menggunakan pasangan primer NP-1200f dan NP-1529r, dan dengan pasangan primer H5-131f dan H5-580r. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat Legok termasuk virus AI subtype H5N1.

**Kata kunci:** Avian influenza, RT-PCR, Nucleoprotein, Hemagglutinin, isolat Legok

## PENDAHULUAN

Avian influenza (AI) adalah penyakit sangat menular disebabkan oleh virus influenza tipe A, termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae* (Lamb and Krug, 1996). Virus avian influenza dibagi menjadi 15 subtype HA (H1-H15) dan 9 subtype NA (N1-N9) (Rohm *et al.*, 1996). Diantara 15 subtype HA, hanya H5 dan H7 yang tergolong sangat virulen pada unggas. Perbedaan asam amino di antara subtype HA tersebut sebesar 20%-74%, sedangkan perbedaan asam amino dalam subtype HA yang sama hanya 0%-9% (Air, 1981). Berdasarkan perbedaan asam amino ini, Lee, *et al.* (2001) telah merancang primer yang digunakan dalam RT-PCR untuk identifikasi cepat subtype HA virus avian influenza.

Pada bulan Oktober 2003 telah diisolasi virus AI dari ayam layer di Legok Tangerang dengan gejala kelainan pada saluran pernapasan. Untuk mengetahui subtype virus avian influenza tersebut dilakukan identifikasi dengan metoda RT-PCR menggunakan 15 pasang primer yang ditargetkan pada gen Hemagglutinin (HA) virus. Dari hasil identifikasi ini dapat dilaporkan bahwa cDNA dari isolat tersebut teramplifikasi dengan menggunakan sepasang primer khusus subtype H5N1.

### 1. Isolat Virus

Spesimen isolat virus yang diidentifikasi merupakan isolat virus AI strain Legok dalam cairan allantois yang diperoleh dari laboratorium virologi Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan.

### 2. Ekstraksi RNA virus berasal dari cairan allantois

RNA diekstraksi menggunakan TRIZOLLSREAGENT (INVITROGEN). Prosedur secara singkat sebagai berikut, 250 µl suspensi virus isolat dicampur dengan 750 µl trizol dalam *microtube* hingga rata. Campuran tersebut diinkubasikan pada suhu kamar (25-30°C) selama 5 menit untuk memisahkan nucleoprotein. Setelah ditambahkan dengan 200 µl chloroform, campuran dikocok dengan tangan selama 15 detik, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 10 menit. Campuran dipusing 12.000 rpm pada suhu 2-8°C selama 15 menit. Lima ratus µl fase cair pada supernatan dipindahkan ke *microtube* baru. Selanjutnya ditambahkan dengan 500 µl isoprophil alkohol. Kemudian disimpan pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah dipusing 12.000 rpm pada suhu 2-8°C selama 10 menit supernatannya dibuang. Endapan RNA dicuci dengan 1.000 µl ethanol 75% dan dipusing 12.000

rpm suhu 2–8°C selama 5 menit. RNA dikeringkan selama 7 menit dan dilarutkan dengan 10 µl air suling bebas RNase.

### 3. Pembuatan cDNA

Pembuatan cDNA menggunakan metoda *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). Prosedur ringkasnya adalah sebagai berikut, ke dalam 0,5 ml *microtube* dibuat campuran RNA/primer yang berisi 3 µl RNA contoh, 1 µl 10 mM dNTP mix, 1 µl antisense primer, 5 µl air suling bebas RNase. Campuran ini dipanaskan pada suhu 65°C selama 5 menit, kemudian didinginkan di atas es sekurang-kurangnya selama 1 menit. Pada saat pemanasan campuran diatas, disiapkan pula 9 µl pereaksi yang terdiri dari 2 µl 10X RT buffer, 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µl 0,1 M DTT dan 1 µl RNaseOut (RNase inhibitor). Campuran RNA/primer dicampur dengan

pereaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 42°C selama 2 menit. Satu µl SuperScript II RT ditambahkan ke dalam campuran tersebut, dan inkubasi dilanjutkan lagi selama 50 menit. Reaksi ini diakhiri dengan pemanasan 70°C selama 15 menit dan pendinginan di atas es. Kedalam campuran RNA, primer dan pereaksi ditambahkan 1 µl RNase H dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit.

### 4. Primer

Untuk identifikasi virus influenza dipergunakan sepasang primer yang dapat mengamplifikasi 329 bp fragmen gen nucleoprotein, NP-1200f [5'-CAG(A/G)TACTGGGC(A/T/C)ATAAG(A/G)AC-3'] dan NP-1529r [5'-GCATTGTCTCCGAAGAAATAAG-3']. Untuk mengidentifikasi subtype virus avian influenza digunakan 15 pasang primer seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Primer yang digunakan dalam RT-PCR

Primer	Primer Sequence	PCR Product (bp)
H1-795f	5'-GATACCATAACDTTTGAAGC-3' (D: G/A/T)	201
H1-996r	5'-TGGGRCATTCTCCAATAGTG-3' (R: A/G)	
H2-422f	5'-GAGAAARTWAAGATTCTGCC-3' (R: A/G; W: A/T)	551
H2-1083r	5'-CCAAACAAYCCYCTTGAYTC-3' (Y: C/T)	
H3-269f	5'-ACTGYACAYTRATAGATGC-3' (Y: C/T, R: A/G)	529
H3-896r	5'-GCATGTGAYCTCATTATTGAGC-3' (Y: C/T)	
H4-8f	5'-GCAGGGGAAACAATGCTATC-3'	669
H4-777r	5'-CCWGGYTCTACAATWGTCC-3' (W: A/T; Y: C/T)	
H5-131f	5'-ACTGYACAYTRATAGATGC-3' (Y: C/T; R: A/G; M: A/C)	449
H5-580r	5'-GTARSTCCTYTKTATTGTTBG-3' (R: A/G; S: G/C; Y: C/T; K: T/G; B: T/C/G)	
H6-661f	5'-AGCATGAATTTTGCCAAGAG-3'	301
H6-962r	5'-GGRCATTCTCCTATCCACAG-3' (R: A/G)	
H7-12f	5'-GGGATACAAAATGAAYACTC-3' (Y: C/T)	633
H7-645r	5'-CCATABARYYTRGICTGYTC-3' (B: G/T/C; Y: C/T; R: A/G)	
H8-246f	5'-GTGTGACATCCATCTGAAGG-3'	530
H8-816r	5'-GAGCAGATAGCCAAATTCAGG-3'	
H9-211f	5'-GACACCTGCACTATTGAAGG-3'	297
H9-508r	5'-GGTAGGAATTACTCTTGTGG-3'	
H10-470f	5'-GGAGGAGATAGTTTCTATGC-3'	259
H10-729r	5'-CTTTGTCCATTGACCTGAGG-3'	
H11-267f	5'-GGACAGCTCCTATGTAGCAG-3'	370
H11-997r	5'-GTCCTGTTGCAAGCTTAAGG-3'	
H12-139f	5'-GAAGAACTGTACATCGTGG-3'	401
H12-540r	5'-GTACTCATCTGTTGGACTGG-3'	
H13-203f	5'-CCACACAGGAACATAYTGTTTC-3' (Y: T/C)	230
H13-433r	5'-CTACTGAAWGAYCTGATTCC-3' (W: A/T; Y: T/C)	
H14-444f	5'-TCATCGCCGAACAATTCACC-3'	542
H14-986r	5'-GCAGTTTCCTATAGCAATCC-3'	
H15-455f	5'-GTGCGTGTAAGAGAACAGTG-3'	382
H15-837r	5'-ATTAGAGCGGAGAAAGGTGG-3'	

### 5. Amplifikasi cDNA

Amplifikasi cDNA dilakukan berdasarkan metoda *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). Amplifikasi cDNA dilakukan dalam 50 µl campuran reaksi yang mengandung 5 µl 10X PCR reaction buffer tanpa Mg, 1,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl 10 mM dNTP mix, 0,5 µl 50 µM primer (*forward*), 50 µM primer (*reverse*), 0,4 µl (2 unit) *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen), 2 µl cDNA dan 38,1 µl air suling yang telah diautoclave. Amplifikasi cDNA dilakukan menggunakan *Astec Program temperature control system PC-800*, dengan urutan perputaran suhu, 95°C selama 3 menit (denaturasi awal), 35 kali putaran 95°C selama 30 detik (denaturasi), 50°C selama 40 detik (annealing), 72°C selama 40 detik (ekstensi), dan diakhiri dengan ekstensi 72°C selama 10 menit.

**Tabel 2. Hasil amplifikasi RT-PCR virus isolat Legok**

Primer	PCR Product (bp)	Hasil Amplifikasi
NP-1200f	329	Positif
NP-1529r		
H1-795f	201	Negatif
H1-996r		
H2-422f	551	Negatif
H2-1083r		
H3-269f	529	Negatif
H3-896r		
H4-8f	669	Negatif
H4-777r		
H5-131f	449	Positif
H5-580r		
H6-661f	301	Negatif
H6-962r		
H7-12f	633	Negatif
H7-645r		
H8-246f	530	Negatif
H8-816r		
H9-211f	297	Negatif
H9-508r		
H10-470f	259	Negatif
H10-729r		
H11-267f	370	Negatif
H11-997r		
H12-139f	401	Negatif
H12-540r		
H13-203f	230	Negatif
H13-433f		
H14-444f	542	Negatif
H14-986r		
H15-455f	382	Negatif
H15-837r		

### 6. Elektroforesis

Hasil RT-PCR dielektroforesis menggunakan Mupid-2 pada 2% agarose (Promega) dengan *running buffer* TBE selama 60 menit. *Band* DNA diwarnai dengan ethidium bromide, dan gambarnya didokumentasikan menggunakan kamera digital (Fuji FinePix, A202).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

cDNA yang diperoleh dari isolat virus AI dari Legok, Tangerang dapat menghasilkan *band gen Nucleoprotein* sekitar 330 bp pada RT-PCR menggunakan primer pasangan NP1200f dan NP1529r (Tabel 2). Pasangan primer tersebut dapat mengamplifikasi gen *Nucleoprotein* yang berasal dari virus influenza yang berasal dari unggas, babi dan kuda (Altmuller *et al.*, 1989; Gorman *et al.*, 1990; Shu *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2001). Pada elektroforesis, contoh sampel dari virus AI isolat Legok dapat menghasilkan *band* DNA tersebut berarti gen *Nucleoproteinnya* dapat teramplifikasi. Hal ini menunjukkan bahwa virus isolat Legok benar sebagai virus influenza.

Untuk mendukung hasil RT-PCR menggunakan primer umum virus influenza, cDNA isolat Legok juga diuji menggunakan 15 primer HA yang dapat digunakan untuk deteksi subtype HA virus avian influenza. Terdapat satu pasang primer yang dapat mengamplifikasi gen hemagglutinin virus tersebut yaitu pasangan primer H5-131f dan H5-580r (Tabel 2), produk PCR yang dihasilkan sekitar 450 bp. Hal ini menunjukkan bahwa virus AI isolat Legok yang diidentifikasi virus avian influenza merupakan subtype H5N1.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Antonius dan Ratnawati atas bantuan reagen serta kepada Deden Amijaya atas bantuan pengambilan gambar menggunakan digital kamera.

## DAFTAR PUSTAKA

- Air, G.M.. 1981. Sequence relationship among the hemagglutination gene of 12 subtype of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78,7639-7643.
- Altmuller, A., W.M. Fitch, C. Scholtissek. 1989. Biological and genetic evolution of the nucleoprotein gene of human influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 70, 2111 – 2119.
- Gorman, O.T., W.J. Bean, Y. Kawaoka, W.G. Webster. 1990. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J. Virol.* 64. 1487 – 1497.

**Lamb, R.A., R. M. Krug.** 1996. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, R.M. Chanock, J.L. Melnick, T.P. Monath, B. Roizman (eds.), *Field Virology*, 3<sup>rd</sup> ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.

**Lee, M.S., P.C. Chang, J.H. Shien, M.C. Cheng, H.K. Shieh.** 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Met.* 97, 13-32.

**Rohm, C., N. Zhou, J. Suss, J. Mackenzie, R. G. Webster.** 1996. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 15, 508 –516.

**Shu, L.L., W.J. Bean, R.G. Webster.** 1993. Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990. *J. Virol.* 67, 2723-2729.