

DETEKSI *DEOXYRIBONUCLEIC ACID* (DNA) VIRUS *INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS* (IBR) DENGAN METODA *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

KETUT KARUNI NYANAKUMARI NATIH, EMILIA, YATI SURYATI, DODO HERMAWAN

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunung Sindur-Bogor 16340

ABSTRAK

Metode *Polymerase chain Reaction* (PCR) merupakan teknik biologi molekuler yang memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi untuk mengetahui keberadaan penyakit IBR secara dini. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi *deoxyribonucleic acid* (DNA) virus IBR dengan metode konvensional PCR menggunakan gen glikoprotein D (gD) dengan cara *nested* PCR (nPCR). Keberadaan DNA virus IBR strain Los Angeles dan strain Colorado terdeteksi pada 468 bp untuk *first* PCR dan 325 bp untuk *second* PCR atau nPCR. Metode ini lebih cepat dan mudah sehingga akan mampu mendeteksi keberadaan virus IBR yang bersifat laten secara dini.

Kata kunci: *Nested* PCR, IBR, gD

ABSTRACT

Polymerase chain Reaction (PCR) method is a molecular biology technique that has high sensitivity and specificity to determine the presence of an early of IBR disease. The purpose of this study is to detect the DNA of *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR) with PCR conventional method using glycoprotein gene D (gD). DNA of IBR Los angeles and colorado strain were detected at 468 bp for first PCR and 325 bp for second PCR or nPCR. This method was able to early detect the presence of potentially harmful of IBR virus.

Key words: *Nested* PCR, IBR, gD

PENDAHULUAN

Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) adalah penyakit menular pada sapi dan kerbau yang disebabkan oleh *Bovine herpesvirus type 1* (BHV-1) yang termasuk ke dalam genus *Varicellovirus*, subfamili *Alphaherpesvirinae* dan famili *Herpesviridae* (6). *Infectious Bovine Rhinotracheitis* biasanya menyebabkan infeksi saluran pernapasan yang subklinis sampai parah dengan morbiditas mencapai 100% dan mortalitas 10% (9).

Menurut Van Oirschot *et al.* 1993, sebagaimana umumnya *Alphaherpesvirinae* maka BHV-1 menyebabkan infeksi laten. Setelah infeksi, BHV-1 akan menyebar dari infeksi lokal ke sistem syaraf melalui sel syaraf tepi mencapai ganglia trigeminal dan lumbosakral dan menetap dalam keadaan laten. Sciatic, ganglia trigeminal dan tonsil adalah tempat terjadinya latensi setelah penyakit genital dan pernapasan (1). Sifat laten ini membuat virus akan terus menetap dan akan terus dibawa dan dapat diinfeksi terhadap sapi lain sehingga virus akan menyebar. Virus BHV-1 yang menetap ini dapat diaktifkan atau dipicu dengan beberapa rangsangan seperti transportasi, proses kelahiran dan pengobatan dengan *glucocorticoid* (14).

Genom virus IBR memiliki *double stranded* DNA

yang menyandi sebanyak 70 protein, yang terdiri dari 33 protein struktural dan lebih 15 protein non struktural. Glikoprotein adalah protein struktural yang mempunyai peranan penting dalam patogenesis dan sistem kebal. Glikoprotein berfungsi sebagai proteksi imunologis, replikasi, penyebaran dari sel ke sel yang lain serta pelekatan virus pada sel inang (8).

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik biologi molekuler yang memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Dengan penggunaan teknik PCR maka keberadaan penyakit IBR dapat diketahui sedini mungkin, sehingga dapat dilakukan langkah pengendalian penyakit atau tindakan oleh para pengambil kebijakan. *Gold standard* pengujian untuk mengisolasi virus IBR adalah dengan menumbuhkannya pada biakan jaringan lestari *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK), tetapi untuk mendeteksi DNA pada kejadian laten menggunakan teknik PCR (8).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan materi genetik virus IBR dengan menggunakan metode konvensional PCR, menggunakan gen gD dengan cara *nested* PCR.

MATERI DAN METODA

Virus

Virus IBR strain Los angeles yang ditumbuhkan pada sel MDBK dan sel BT (*Bovine Testicle*), virus IBR strain Colorado yang ditumbuhkan pada sel MDBK dan BHV-1 strain V-155. Strain V-155 berasal dari usap mukosa vagina sapi Australia yang ditumbuhkan pada sel MDCK (12).

Isolasi/Ekstraksi DNA

Metode isolasi/ekstraksi DNA menggunakan *Qiaamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Cat: 51304) untuk memperoleh DNA. Preparasi sebelum melakukan ekstraksi adalah dengan menambahkan 60 ml Ethanol absolut ke dalam 19 ml Buffer AW1 dan 44 ml Ethanol absolut ke dalam 13 ml Buffer AW2 (2).

Ekstraksi DNA dilakukan dengan memasukkan sampel sebanyak 180 µl ke dalam *life touch microcentrifuge tube* 1.7 ml yang bersih dan steril yang ditambah dengan 560 µl Buffer AVL. Kemudian campuran ini divortex selama 15 detik dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah itu disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Tambahkan 560 µl Ethanol absolut dan divortex selama 15 detik serta disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Larutan sebanyak 700 µl dipindahkan ke dalam *Qiaamp Spin Column* dan disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Cairan yang tertampung dalam *Collection Tube* dibuang dan sisa larutan sebanyak 520 µl dipindahkan ke dalam *Collection Tube* yang baru kemudian ditambahkan Buffer AW1 sebanyak 500 µl dan disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Cairan yang tertampung di dalam *Collection Tube* dibuang dan ditambahkan Buffer AW2 sebanyak 500 µl untuk mencuci membran *spin column*. Setelah itu disentrifus selama 3 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Cairan yang tertampung pada *Collection Tube* dibuang dan disentrifus lagi selama 1 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Selanjutnya cairan beserta *Collection Tube* diibuang. *Qiaamp Spin Column* dipindahkan ke dalam *Collection Tube* yang baru dan ditambahkan Buffer AVE sebanyak 100 µl, diinkubasi selama 1 menit dalam suhu ruang kemudian disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Tahap akhir adalah *Qiaamp Spin Column* dibuang dan filtrat yang didalam tabung adalah DNA. Simpan DNA pada suhu -20° C sampai akan digunakan untuk identifikasi selanjutnya.

Primer

Primer yang digunakan adalah dua pasang primer glikoprotein D (gD) (10,11) yaitu primer gD BHV-1 Eksternal: gD-P1F (Lokasi 351-368) 5'-GCT GTG GGA AGC GGT ACG-3' dan gD-P2R (Lokasi 817-796) 5'-GTC GAC TAT GGC CTT GTG TGC-3'; dan primer BHV-1 Internal: gD-P3F (Lokasi 394-422) 5'-ACG GTC ATA TGG TAC AAG ATC GAG AGC G-3' dan gD-P4R (Lokasi 716-696) 5'-CCA AAG GTG TAC CCG CGA GCC-3'. Primer eksternal menghasilkan fragmen 468 bp dan primer internal menghasilkan fragmen 325 bp.

Amplifikasi PCR

- First PCR Mix* menggunakan *Top TagMaster Mix Kit* (Qiagen, Cat : 200203)

Kedalam tabung 200 ul dicampurkan reagen PCR *mix* yang terdiri dari 12.5 µl 2x Top Tag Master Mix, 0.25 µl Primer gD-P1F (20 uM), 0.25 µl Primer gD-P2 (20 uM) dan 9.5 µl *RNAse Free Water* sehingga total volume mencapai 22.5 µl. Setelah itu campuran di vorteks dan sentrifus beberapa detik dan ditambahkan *template DNA* sebanyak 2.5 ul. Tabung dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* (Eppendorf) dengan program yang diawali dengan *Hot start* 94°C selama 3 menit, kemudian 35 siklus dimana masing-masing siklus terdiri dari denaturasi 94°C selama 30 detik, pelekatan (*annealing*) 60°C selama 30 detik, dan elongasi (*elongation*) 72°C selama 1 menit. Amplifikasi diakhiri dengan elongasi terakhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

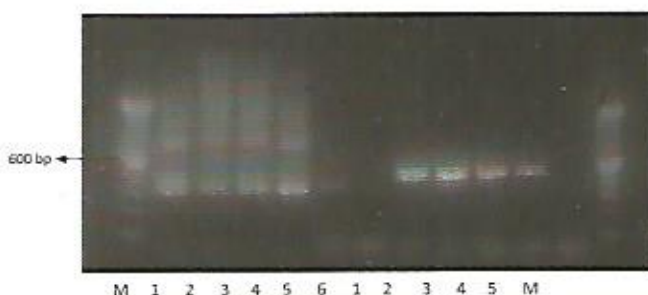
- Second PCR Mix* menggunakan *Top TagMaster Mix Kit* (Qiagen, Cat : 200203)

Kedalam tabung 200 ul dicampurkan reagen PCR *mix* yang terdiri dari 12.5 µl 2x Top Tag Master Mix, 0.25 µl Primer gD-P3F (20 uM), 0.25 µl Primer gD-P4R (20 uM) dan 11 µl *RNAse Free Water* sehingga total volume mencapai 24 µl. Setelah itu campuran di vorteks dan sentrifus beberapa detik dan ditambahkan produk PCR pertama sebanyak 1 ul Tabung dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* (Eppendorf) dengan program yang diawali dengan *Hot start* 94°C selama 3 menit, kemudian 35 siklus dimana masing-masing siklus terdiri dari denaturasi 94°C selama 30 detik, pelekatan (*annealing*) 60°C selama 30 detik, dan elongasi (*elongation*) 72°C selama 1 menit. Amplifikasi diakhiri dengan elongasi terakhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

Analisa Produk PCR

Produk PCR dianalisa dengan Elektrophoresis menggunakan gel agarose (Invitrogen) 2 % dalam buffer TAE (Invitrogen) dan *syber safe* (Invitrogen). Hasil PCR masing-masing sebanyak 10 µl kemudian dicampur dengan *loading dye* 1 µl. Campuran dimasukkan ke dalam lubang gel agarosa di dalam elektroforesis *chamber*. Salah satu lubang diisi dengan marker 100 bp (Invitrogen) sebanyak 10 µl. Elektrophoresis dilakukan pada 100 volt dan 400 mA dalam buffer TAE selama 45 menit. Hasil elektroforesis dilihat dengan menggunakan sinar biru, pada 468 bp untuk *first PCR* sedangkan 325 bp untuk *second PCR* atau *nested*.

HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 1. Hasil Nested PCR terhadap virus IBR strain Los Angeles dan Colorado

Keterangan: M = marker; *First PCR* = 468 bp (1- 5); *second PCR* atau *nested* = 325 bp (1-6); 1 = IBR LA-BK; 2 = IBR LA-BT; 3 = V155; 4 = IBR Colorado; 5&6 = kontrol negatif

Hasil uji PCR menggunakan konvensional PCR untuk mendeteksi virus IBR ditampilkan pada Gambar 1. Pada metode ini menggunakan dua pasang primer, yaitu sepasang primer eksternal (gD-P1F / gD-P2R) dan sepasang primer internal (gD-P3F/gD- P4R). Primer eksternal menghasilkan produk PCR 468 bp sedangkan primer internal menghasilkan produk PCR 325bp.

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah salah satu teknik biologi molekuler untuk memperbanyak jumlah DNA secara *in-vitro* dengan mempergunakan enzim *polymerase* dan perubahan temperatur. Dalam teknik PCR ini sangat diperlukan preparasi sampel DNA, dimana untuk mendapatkan asam nuklat merupakan langkah awal untuk menentukan keberhasilan dalam proses identifikasi DNA dari sampel yang kita akan lihat. Isolasi DNA merupakan proses yang sangat menentukan kemampuan kita untuk mengidentifikasi DNA dari sel tersebut dan tentunya dalam proses isolasi DNA ini membutuhkan perangkat terutama laboratorium yang memenuhi syarat tertentu (5).

Keunggulan PCR untuk deteksi patogen adalah teknik ini tidak memerlukan proses pembiakan, mempunyai sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. Menurut Van Engelenburg *et al.* 1993 dan Smith *et al.* 2000, pengujian dengan teknik PCR untuk mendeteksi DNA virus IBR merupakan cara yang sensitif, akurat dan pelaksanaan lebih cepat dibanding isolasi pada biakan jaringan. Dengan PCR, deteksi DNA virus IBR dapat dilakukan lebih sering karena prosesnya lebih cepat (4).

Glikoprotein D merupakan glikoprotein utama dan penting bagi BHV-1 yang berperan dalam interaksi antara virus dengan sel inang yaitu membantu proses masuknya virus ke sel inang, penyebaran virus dari sel ke sel dan fusi *virion envelope* dengan membran plasma (7).

Menurut Saepulloh *et al.* (2008), *nested PCR* memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi, cepat dan mudah pengerjaannya dibandingkan dengan isolasi virus yang merupakan metode standar, sehingga sangat ideal untuk diagnosa rutin.

Pemakaian nPCR untuk mendeteksi *herpesvirus* telah banyak dilakukan di dunia. Di Indonesia sendiri telah dilakukan untuk mendeteksi agen penyebab MCF (*Malignan Catarrhal Fever*) pada sampel usapan mukosa hidung (18) dan untuk mendeteksi agen penyebab penyakit IBR dari isolat yang berasal dari mukosa hidung dan semen sapi Jawa Timur dan Jawa Barat (12).

KESIMPULAN

Metode nPCR dengan menggunakan sepasang primer eksternal dan sepasang primer internal dari gen Glikoprotein mampu mendeteksi DNA virus IBR lebih cepat dan mudah. Metode ini akan mampu mendeteksi keberadaan virus IBR yang bersifat laten secara dini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ackerman M, Wyler R. 1984. The DNA of an IPV strain of Bovine Herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Veterinary Microbiology*. 9:53-63.
2. Anonim. 2011. Standard Operating Procedure (SOP) Deteksi Biologi Molekuler IBR. Disampaikan pada Pelatihan Bioteknologi 2011 Teknik diagnosa virus rabies dan infectious Bovine Rhinotracheitis secara molekuler di Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan 11-15 Juli 2011. PT. Gene Craft labs. Jakarta.

3. **Badiei K, Ghane M, Mostaghni K. 2010.** Seroprevalence of Bovine Herpes Virus Type 1 in the Industrial Dairy Cattle Herds in Suburb of Shiraz-iran. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4(10): 4650-4654.
4. **De Gee ALW, Wagter LHA, Hage JJ. 1996.** The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Microbiology*. 63: 163-168.
5. **Hatta M. 2007.** Prinsip dasar PCR dan aplikasinya. Di dalam Kursus Singkat Pertemuan Virologi dan Bioteknologi se Indonesia 2007 di BPPV Regional II Lampung pada tanggal 2 - 7 Juli 2007,
6. **[ICTV] International Committee on Taxonomy of Viruses. 2002.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>. Diunduh pada tanggal 8 Juni 2010.
7. **Muylkens BJ, Thiry J, Kisten P, Schynts S, Thiry E. 2007.** Bovine Herpesvirus 1 infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 38: 181-209.
8. **[OIE] Office International Epizooties. 2010.** Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis. *OIE Terrestrial Manual Chapter* 2.4.13. Paris.
9. **Radostitis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchliff KW. 2000.** *Veterinary Medicine: A textbook of the disease of cattle, sheep, pig, goats and horses*, 9th. WB Saunders Company Ltd. Hlm. 1173-1184.
10. **Rola J, Larska M, Polak MP. 2005.** Detection of Bovine Herpesvirus 1 from an outbreak of Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 49: 267-271.
11. **Saepulloh M, Adjid RMA, Wibawan IWT, Darminto. 2008.** Pengembangan *Nested* PCR untuk deteksi *Bovine Herpesvirus-1* (BHV-1) pada sediaan usap mukosa hidung dan semen asal sapi. *JITV*. 13(2): 155-163.
12. **Saepulloh M, Wibawan IWT, Sajuthi D, Setyaningsih S. 2009.** Karakterisasi molekuler Bovine Herpesvirus Type 1 isolat Indonesia. *JITV*. 14(1): 66-74.
13. **Smith CB, C Van Maanen, Glas RD, De Gee ALW, Dijkstrab T, Van Oirschot JT, Rijsewijk FAM. 2000.** Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *Journal of Virological Methods*. 85:65-73.
14. **Thiry YE, Saliki J, Bublot M, P.P. Pastoret PP. 1987.** Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 59-63.
15. **Van Engelenburg FAC, Maes RK, Van Oirschot JT, Rijsewijk FAM. 1993.** Development of a rapid and sensitive Polymerase Chain Reaction assay for detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in bovine semen. *Journal of Clinical Microbiology*. 31(12): 3129-3135.
16. **Van Engelenburg FAC, Van Schie FW, Rijsewijk FAM, Van Oirschot JT. 1995.** Excretion of Bovine Herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *Journal of Clinical Microbiology* 33(2): 308-312.
17. **Van Oirschot JT, Straver PJ, Van Lieshout, Quak J, Westenbrik F, Van Exsel AC. 1993.** A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet. Rec.* 132: 32-35.
18. **Wiyono A, Saepulloh M, Damayanti R, Sudarisman. 1995.** Teknik polymerase Chain Reaction untuk virus malignant catarrhal fever pada sediaan usap mukosa. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Veteriner, Cisarua Bogor*, 7-8 Nopember 1995: 963-969.