

**ANALISA GENETIK GEN GLIKOPROTEIN D VIRUS IBR STRAIN LOS ANGELES
DAN HUBUNGANNYA TERHADAP SUBFAMILY *Alphaherpesvirinae*: BoHV-5, CerHV-
1, CapHV-1 DAN SuidHV-1**

¹Ernes Andesfha, ²Ketut Karuni N Natih, Enuh Rahardjo Djusa, ²Nur Khusni Hidayanto

¹Unit Bioteknologi, ²Unit Uji Virologi
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur, Bogor – 16340

ABSTRAK

Pengujian dengan menggunakan metode PCR dan *sequencing* telah dilakukan terhadap isolat IBR strain Los Angeles yang ditumbuhkan di sel MDBK dan analisis genetik dilakukan terhadap *sequen reference* BoHV-1.1, BoHV-1.2, BoHV-5, CerHV-1, CapHV-1 dan SuidHV-1. Hasil *alignment* nukleotida (nt) dan asam amino (aa) menunjukkan bahwa virus IBR strain Los Angeles memiliki persentase homologi nt dan aatinggi terhadap BoHV-1.1 (nt : 100%, aa: 100%), BoHV-1.2 (nt : 98.2% , aa: 99.1%) , BoHV-5 (nt : 89.9% , aa: 97.7%) , CerHV-1 (nt : 90% , aa: 97.8%) , homologi aa terhadap CapHV-1 dan SuidHV-1 cukup tinggi yaitu 96.1% dan 93.7% tetapi homologi nt nya rendah yaitu 74.2% dan 50.4%. Hasil analisa pohon *phylogenetic* menunjukkan virus IBR strain Los Angeles termasuk dalam kelompok subtype BoHV-1.1 namun masih memiliki satu sumber cabang yang sama dengan BoHV-1.2, sedangkan cabang yang terdekat lainnya yaitu BoHV-5, CerHV-1, CapHV-1 namun untuk SuidHV-1 memiliki jarak cabang terjauh dari kelompok virus BoHV-1.1. Hasil analisis ini dapat menambah informasi genetik yaitu identitas, persentase homologi dan kestabilan genetik isolat *challenge* IBR strain Los Angeles yang digunakan di BBPMSOH.

Kata kunci: isolat, IBR, glikoprotein D, homologi, *phylogenetic*

ABSTRACT

The PCR and sequencing methods had been carried out to analyze genetic characteristic of IBR strain Los Angeles grown in cell MDBK compared to the reference sequences of BoHV-1.1, BoHV-1.2, BoHV-5, CerHV-1, CapHV-1 and SuidHV-1. Nucleotides (nt) and amino acids (aa) alignment showed that the virus IBR strain Los Angeles has a percentage homology nt and aa high to BoHV-1.1 (nt: 100%, aa: 100%), BoHV-1.2 (nt: 98.2% , aa: 99.1%), BoHV-5 (nt: 89.9%, aa: 97.7%), CerHV-1 (nt: 90%, aa: 97.8%), homology aa to CapHV-1 and SuidHV-1 is quite high, 96.1% and 93.7%, but the homology nt - is low at 74.2% and 50.4%. Phylogenetic tree analysis showed IBR virus strain Los Angeles belongs to a group subtype BoHV-1.1, but still has one source of the same branch with BoHV-1.2, while the branches of the other nearby are BoHV-5, CerHV-1, CapHV-1 but to SuidHV -1 have branch farthest distance from virus group BoHV-1.1. Our results support genetic information, such as the identity, the percentage of homology and genetic stability of challenge isolates IBR strain Los Angeles that used in BBPMSOH.

Keywords: isolates, IBR, glycoprotein D, homology, *phylogenetic*

PENDAHULUAN

Bovine Herpesvirus-1 (BoHV-1) termasuk dalam genus *Varicellovirus* dan famili *Herpesviridae*, subfamili *Alphaherpesvirinae*. Berdasarkan sifat antigenik dan genomiknya, dibedakan menjadi subtype 1.1, 1.2a, 1.2b⁽¹²⁾. Subtipe 1 (BoHV-1.1) sering menyebabkan penyakit *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR), banyak ditemukan dalam saluran respirasi dan prevalensi kasus banyak ditemukan di Eropa, Amerika Timur dan Amerika Selatan. Subtipe 2a (BoHV-1.2a) secara umum banyak ditemukan pada gejala klinis infeksi saluran respirasi dan genital seperti halnya IBR, *Infectious Pustular Vulvovaginitis* (IPV), *Infectious Balanoposthitis* (IPB) dan abortus. Subtipe 2a prevalensi kasus banyak ditemukan di Brazil dan Eropa sebelum tahun 1970⁽²³⁾, sedangkan subtype 2b juga ditemukan pada infeksi saluran respirasi dan IPV/IPB tapi tidak menyebabkan abortus, prevalensi subtype ini sering ditemukan di Australia atau Eropa⁽⁶⁾. Subtipe BoHV-1.2 kurang virulen dibandingkan subtype BoHV-1.1⁽⁵⁾.

Terdapat beberapa virus yang bersifat heterolog namun masih dalam subfamili *Alphaherpesvirinae* dan memiliki hubungan dekat dengan BoHV-1 yaitu *Bovine herpesvirus 5* (BoHV-5), *Cervine herpesvirus* (CerHV-1), *Caprine herpesvirus* (CapHV-1) yang banyak ditemukan pada ruminansia, kelompok *alphaherpesvirus* lainnya yang ditemukan pada babi yaitu *Suid herpesvirus/pseudorabies*. Virus BoHV-5, CerHV-1 dan CapHV-1 memiliki kedekatan/*cross reaction* dengan virus BoHV-1 melalui uji serologis^(16,17). Reaksi silang ditemukan antara BoHV-1 terhadap virus BoHV-5, CapHV-1 dan CerHV-1 dengan metode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *seroneutralization test* (SN)^(10,11).

Virus BoHV-5 penyebab *encephalitis* pada sapi muda, virus ini telah berhasil diisolasi pada kasus *outbreak* yang terjadi secara alami dan juga melalui suatu pengujian⁽⁷⁾. *Suid herpesvirus-1* penyebab penyakit *pseudorabies* pada babi yang umum ditemukan endemis hampir di seluruh dunia⁽⁸⁾ yang menyebabkan aborsi, mumifikasi, *stillborn* atau tetap hidup namun kondisinya lemah⁽⁴⁾. Virus CapHV-1 menyebabkan aborsi pada kambing dan memiliki hubungan yang sangat dekat virus alphaherpesvirus terutama virus BoHV-1⁽²⁵⁾. Virus CerHV-1 penyebab penyakit mata pada kijang merah pertama kali diisolasi pada kasus *outbreak* di peternakan kijang di Skotlandia tahun 1982⁽¹⁴⁾.

Gejala klinis infeksi virus BoHV-1 terlihat setelah masa inkubasi 2-4 hari yaitu terlihat nasal *discharge* bentuk serosa, air liur, demam, nafsu makan berkurang, dan hewan terlihat depresi. Dalam beberapa hari *discharge* dari hidung dan mata berubah menjadi mukopurulen, jika terjadi perkawinan alami maka dapat menyebabkan infeksi genital yaitu *vulvovaginitis* atau *balanoposthitis*. Namun, sebagian besar infeksi terjadi sangat ringan atau subklinis⁽²⁴⁾. Virus BHV-1 dapat ditularkan melalui aerosol secara langsung atau kontak langsung diantara kelompok hewan dan secara tidak langsung melalui semen terkontaminasi dari *shedding* virus pejantan yang terinfeksi BoHV-1⁽²⁾.

Genom virus BoHV-1 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 kekebalan. Glikoprotein D terdiri dari 417 asam amino berfungsi sebagai proteksi imunologis, replikasi, penyebaran dari sel ke sel yang lain serta perlekatan virus pada sel inang⁽¹⁵⁾.

Glikoprotein D virus BoHV-1 memiliki homologi terhadap glikoprotein D *Herpes Simplex Virus-1* ⁽¹⁹⁾. Glikoprotein D merupakan suatu bagian utama pada *envelop virus* dan membran plasmada sel yang terinfeksi virus ⁽²²⁾.

Gold standard pengujian untuk mengisolasi virus BoHV-1 adalah dengan menumbuhkan virus BHV-1 pada biakan jaringan lestari yaitu sel kultur *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK). Beberapa metode lain juga telah dikembangkan untuk mendeteksi keberadaan virus BoHV-1 secara cepat dan spesifik yaitu metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), metode ini mampu mendeteksi secara dini adanya infeksi laten virus BoHV-1 ⁽¹⁷⁾.

Untuk mendeteksi *subtype* virus BoHV-1 diperlukan uji karakterisasi tingkat molekular yaitu dengan menggunakan metode *sequencing*, karena *subtype* virus BoHV-1.1 dan BoHV-1.2 memiliki persentase kesamaan asam amino dan nukleotida yang sangat tinggi. Nukleotida hasil *sequencing* dianalisa bioinformatika sehingga dapat diketahui identitasnya, persentase homologi *sequen*, posisi nukleotida dan asam amino yang berbeda, perbedaan antara *sequen* sampel dan *sequen reference* dari *Genbank*. Analisa pohon *phylogenetic* untuk mengetahui evolusi genetik suatu isolat sehingga diketahui kekerabatan/ kelompoknya terhadap *sequen reference* dari *Genbank*.

Salah satu penyakit yang disebabkan oleh virus BoHV-1 adalah penyakit IBR yang termasuk dalam daftar Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS) yang menyebabkan kerugian ekonomi yang tinggi dan memerlukan prioritas dalam pengendalian dan penanggulangan penyakit ⁽⁹⁾ untuk itu diperlukan metode pengujian yang sensitif, spesifik dan akurat. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui karakter genetik IBR strain Los Angeles yang digunakan sebagai isolate *challenge* pengujian vaksin IBR di BBPMSOH dalam uji Serum Netralisasi (SN) pada sel kultur. Selanjutnya urutan nukleotida virus IBR strain Los Angeles dibandingkan dengan *sequen referenced* dari BoHV-1, BoHV-2 dan subfamili *Alphaherpesvirinae* yang terdapat dalam *Genbank* untuk mengetahui identitas, persentase homologi, perbedaan asam amino serta analisis kekerabatan melalui pohon *phylogenetic*. Pengujian ini diharapkan dapat menambah informasi tentang variasi genetik dari isolate *challenge* IBR strain Los Angeles yang digunakan di BBPMSOH.

MATERI DAN METODE

MATERI

a. Isolat dan Reference

Isolate virus IBR strain Los Angeles (titer $10^{6.3}$) yang ditumbuhkan di sel MDBK. Referensi *sequen* dari *GenBank*:

- *Subtype* BoHV-1.1: *accession number* KJ652529.1, KJ652534.1, AF078730.1, KJ652535.1, M59846.1, EU523745.1, dan JN787954.1.
- *Subtype* BoHV-1.2: *accession number* AF078731.1
- Kelompok *Alphaherpesvirus* lain: *accession number* AF078732.1 (BoHV-5), AF078735.1 (CerHV-1), AJ271966.1 (SuidHV-1), dan AY437088.1 (CapHV-1).

b. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan adalah *Qiaamp DNA Mini Kit (Qiagen-Germany)*, etanol absolut 96%, *Qiagen Toptaq Master Mix Kit (Qiagen-Germany)*, 2 pasang Primer, RT-PCR *Grade Water*, agarose, SYBR Safe, *Buffer Tris Acetate EDTA (TAE) 10X*, *DNA marker 100 bp*, *blue jus*, *blanko solution*, tisu (Kim wipes), *Illustra Gel Band Purification Kit*, Big Dye Terminator Kit, Big Dye X Terminator Kit, *Buffer Anode Container (ABC)*, *Cathoda Buffer Container (CBC)*, dan Polymer POP7.

Alat yang digunakan adalah Mesin PCR *thermocycler*, Mupid 2, *Nano Drop 2000*, *single channel*, *tips filter* ukuran 0,5-10 μL , 10–100 μL , 100–1000 μL , *vortex plate*, *plate 96 well*, *tube 0.2 mL*, *capillary array 50 cm*, *septa ABC*, *CBC*, *septa plate 96*, dan *retainer plate*, mesin *Genetic Analyzer 3500* 8 kapiler.

METODE

Metode PCR

Ekstraksi: sampel dan negatif kontrol diekstraksi menggunakan kit dan metode ekstraksi *Qiaamp DNA Mini Kit*. Pengujian ini menggunakan metode *nested PCR*, primer yang digunakan adalah primer spesifik virus BoHV-1 target gen glikoprotein D *Reference Rola et al 2005*. PCR tahap I (*first PCR*) menggunakan primer gD1_F (GCTGTGGGAAGCGGTACG) dan gD2_R (GTCGACTATGGCCTTGTGTGC), PCR tahap II (*second PCR*) menggunakan primer gDN1_F (ACGGTCATATGGTACAAGATCGAGAGCG) dan gDN2_R (CCAAAGGTGTACCCGCGAGC).

Master mix: PCR menggunakan *Qiagen Toptaq Master Mix Kit*, *reagent master mix* untuk PCR tahap I adalah *Toptaq Master Mix* 12.5 μL , Primer gD1_F (20 μM) 0.25 μL , Primer gD2_R (20 μM) 0.25 μL , RT-PCR *grade water* 9.5 μL , DNA hasil ekstraksi 2.5 μL . *Reagent master mix* untuk PCR tahap II adalah *Toptaq Master Mix* 12.5 μL , Primer gDN1_F (20 μM) 0.25 μL , Primer gDN2_R (20 μM) 0.25 μL , RT-PCR *grade water* 11 μL , DNA hasil PCR tahap I sebanyak 1 μL .

Amplifikasi: DNA untuk PCR tahap I *thermocycler*: Hot Start 95°C 5 menit, 35 cycle: 95°C 30 detik, 60°C 45 detik, 72°C 1 menit, Final elongasi 72°C 5 menit. Sedangkan tahap *thermocycler* PCR tahap II: Hot Start 95°C 5 menit, 35 cycle: 95°C 30 detik, 67°C 45 detik, 72°C 1 menit, Final elongasi 72°C 5 menit.

Elektroforesis: menggunakan mesin Mupid 2, 100 volt selama 40 menit, DNA *Ladder* 100 bp, buffer TAE 1x, agarose 2%, *loading dye*, dan *SYBR Safe*. Pembacaan hasil elektroforesis menggunakan mesin *safe imager*.

Metode DNA Sequencing

Isolat yang hasilnya positif pada uji *nested PCR* dilakukan pemotongan gel agarose setelah tahap elektroforesis, posisi pemotongan gel agarose yang diambil adalah pada pita ampikon 325 bp, kemudian dilakukan purifikasi menggunakan *Gel Band Purification Kit (Eco Healthcare – UK, Cat. 28-9034-70)*, DNA yang telah dipurifikasi selanjutnya dihitung

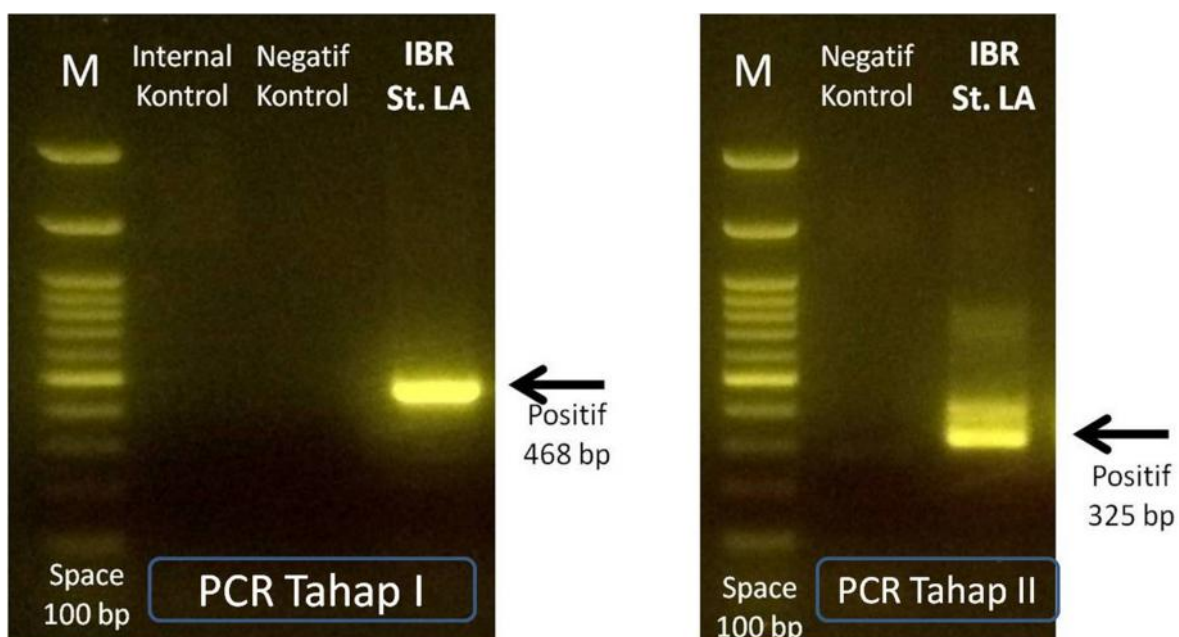
konsentrasi dan tingkat kemurniannya menggunakan mesin NanoDrop (Thermo - USA, Nanodrop 2000).

Konsentrasi DNA yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan pengenceran sesuai dengan target panjang amplicon DNA yang diinginkan menggunakan RT PCR *grade water*. Target panjang nukleotida IBR gen glikoprotein D (primer *reference* Rola dkk. 2005) adalah 325 bp, untuk panjang nukleotida sampai 500 dibutuhkan konsentrasi DNA 5-10 ng/ μ L. Tahap selanjutnya pengujian *Cycle Sequencing* menggunakan *Bigdye Terminator Cycle Sequencing Kit* dan primer yang digunakan pada PCR tahap II. Reagent yang digunakan pada master mix untuk *Cycle Sequencing* adalah *Big dye Terminator* 2 μ L, *buffer sequencing* 2 μ L, Primer g_DN1 forward / g_DN2_Reverse (20 μ M) 2 μ L, RT_PCR *grade water* 3.5 μ L, DNA yang telah diencerkan 1.5 μ L. Tahap *thermocycler*: *Hot start* 96°C 1 menit, 25 cycle: 96°C 10 detik, 50°C 5 detik, 60°C 4 menit.

Produk hasil *cycle sequencing* dipurifikasi menggunakan *Big Dye X-Terminator Kit* dengan perbandingan 10 μ L produk hasil *cycle sequencing* ditambah 45 μ L *SAM Solution* dan 11 μ L *Big Dye X-Terminator Kit* yang dimasukkan dalam satu tube divortex selama 30 menit. Selesai divortex, tube *dispin* dan diambil bagian supernatan. 10 μ L produk hasil purifikasi *Bigdye X-Terminator* dimasukkan ke dalam plate 96 *well* kemudian ditutup dengan *septa well* dan dimasukkan dalam *sampel retainer*. Selanjutnya dilakukan pemasangan *buffer* katoda, anoda serta *polymer POP 7* yang belum kedaluarsa. *Running Electroforesis Genetic Analyzer* menggunakan *capillary array* 50 cm 8 kapiler, protokol: *Std_Seq_Assay_POP7_Z* selama \pm 2 jam 16 menit. Perangkat lunak yang digunakan adalah *software Sequencing Analysis, Seqscape*, NCBI (BLAST) dan MEGA5.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil PCR



Gambar 1. Hasil PCR virus IBR strain Los Angeles

Pengujian PCR tahap I (gambar 1 kiri) untuk isolat IBR strain Los Angeles menunjukkan hasil positif pada panjang amplicon 468 bp dan pada PCR tahap II (gambar 1 kanan) hasilnya positif pada panjang amplicon 325 bp. Dengan hasil positif pada kedua pengujian PCR dapat

disimpulkan bahwa tahap pengerjaan ekstraksi hingga amplifikasi DNA berjalan baik dan pada tahap amplifikasi tidak terdapat inhibitor sehingga diperoleh panjang amplicon DNA sesuai dengan target yang diinginkan. Pada pengujian PCR tahap I digunakan primer dengan target panjang amplicon yang lebih besar, sedangkan pada PCR tahap II digunakan primer dengan target panjang amplicon yang lebih pendek dan bersifat lebih spesifik pada gen glikoprotein D sehingga pada PCR tahap II pita amplicon lebih pendek.

Pada pengujian PCR ini tidak digunakan kontrol positif karena isolat yang diuji yaitu isolat IBR strain Los Angeles merupakan kontrol positif yang digunakan dalam pengujian PCR IBR dan uji SN sehingga sudah diketahui secara tepat suhu *annealing* kedua pasang primer namun informasi genetik belum diketahui dan membutuhkan pengujian lanjutan yaitu *DNA sequencing* dan analisa bioinformatika. Hasil PCR untuk internal kontrol pada master mix PCR dan negatif kontrol saat ekstraksi menunjukkan tidak ada pita DNA (negatif). Hasil negatif ini menunjukkan tidak ada kontaminasi saat ekstraksi dan *master mix* PCR, artinya tahap ekstraksi hingga amplifikasi dilakukan secara benar dan bersih sehingga tidak ada kontaminasi pada setiap tahap pengujian.

Isolat IBR strain Los Angeles yang telah ditumbuhkan di sel MDBK memiliki titer $10^{6.3}$ dan mampu menimbulkan *cytopathic effect* (CPE) yaitu kerusakan pada sel MDBK sehingga sel terlihat berlubang-lubang berwarna gelap. Penggunaan isolat IBR strain Los Angeles sebagai isolat *challenge* pada pengujian vaksin IBR pada uji Serum Neutralisasi (SN) untuk mengetahui potensi suatu vaksin IBR dalam pembentukan titer antibodi.

Target gen pengujian PCR yaitu glikoprotein D merupakan glikoprotein utama dan essential bagi BoHV-1 yang berperan dalam interaksi antara virus dengan sel inang yaitu membantu proses masuknya virus ke sel inang, penyebaran virus, dan *fusion virion envelope* dengan membran plasma⁽¹³⁾. Selain itu, lokasi glikoprotein D (gD) yang strategis, yaitu berada pada virion *envelope* dan permukaan sel yang terinfeksi menjadikan gen gD merupakan target penting untuk respon tanggap kebal inang dan memiliki sifat imunogenisitas yang tinggi⁽³⁾, sehingga diharapkan mampu mengurangi replikasi virus dan *shedding virus* dari tubuh *host*⁽²⁰⁾.

Virus BoHV-1 merupakan salah satu virus yang memiliki kemampuan merusak sel MDBK yang terlihat berupa *Cytopathic effect* (CPE), sel MDBK yang rusak terlihat seperti lubang-lubang kosong berwarna gelap, kemampuan virus membentuk CPE juga dimiliki oleh virus BVDV, *Parainfluenza 3 bovine*, CPE yang dibentuk masing-masing virus memiliki karakteristik tersendiri, kemampuan mengenali dan membedakan kekhasan CPE masing-masing virus diperlukan pengalaman yang banyak dalam mengamati macam-macam type CPE.

2. Hasil Sequencing

a. Nukleotida

Sequen Isolat Virus IBR strain Los Angeles (panjang nukleotide ± 325)

```
ACGGTCATATGGTACAAGATCGAGAGCGGGTGC GCCCGGCCGCTGTACTACATGGAGTACACCGA
GTGCGAGCCCAGGAAGCACTTTGGGTACTGCCGCTACCGCACACCCCGTTTTGGGACAGCTTCCT
GGCGGGCTTCGCCTACCCACGGACGACGAGCTGGGACTGATTATGGCGGCGCCCGCGGGCTCGT
CGAGGGCCAGTACCGACGCGCGCTGTACATCGACGGCACGGTCGCCTATAACAGATTTTCATGGTTTC
GCTGCCGGCCGGGGACTGCTGGTTCTCGAACTCGGCGGGCTCGCGGGTACACCTTTGG
```

b. BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*)

Tabel 1. Hasil *Alignment* menggunakan aplikasi BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bovine herpesvirus type 1.1 isolate NVSL challenge 97-11, complete genome	597	597	100%	3e-167	100%	JX898220.1
Bovine herpesvirus 1 glycoprotein D (US6) gene, complete cds	597	597	100%	3e-167	100%	JN787954.1
Bovine herpesvirus type 1.1 complete genome	597	597	100%	3e-167	100%	AJ004801.1
Bovine herpesvirus type 1.1 Jura glycoprotein D precursor, gene, partial cds	597	597	100%	3e-167	100%	AF078730.1
Bovine herpesvirus 1 aenomic US region	597	597	100%	3e-167	100%	Z98199.1
Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gIV gene, complete cds	597	597	100%	3e-167	100%	M59846.1
Bovine herpesvirus type 1.2 strain K22, complete genome	577	577	99%	4e-161	99%	KM258880.1
Bovine herpesvirus type 1.2 K22 glycoprotein D precursor, gene, partial cds	577	577	99%	4e-161	99%	AF078731.1

Nukleotida hasil *sequencing* selanjutnya disejajarkan / *alignment* menggunakan aplikasi BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) di website NCBI (*Genbank*), tujuannya untuk indentifikasi nukleotida hasil *sequencing* terhadap nukleotida yang memiliki tingkat kesamaan terdekat di dalam database *GenBank*. Hasil *alignment* yaitu isolat virus IBR strain Los Angeles dikonfirmasi sebagai virus *Bovine Herpesvirus-1* dengan nilai persentase *Ident* 100% terhadap *sequen reference* di *Genbank* dengan *accession number* yang terdapat dalam Tabel 1. Dari hasil BLAST pada tabel di atas bahwa virus IBR strain Los Angeles dikonfirmasi 100% sebagai virus dalam subtype BoHV -1.1 yaitu virus yang menyebabkan penyakit IBR, dengan demikian isolat *challenge* yang dipakai dalam pengujian vaksin IBR di BBPMSOH dan terus dilakukan pasase secara rutin sejak tahun 1990 tidak mengalami perubahan genetik (stabil) yaitu tetap sebagai virus IBR subtype BoHV-1.1.

c. Persentase Homologi dan Perbedaan Sequen Nukleotida dan Asam Amino

Tabel 2. Persentase Homologi dan Perbedaan Sequen nt dan aa Isolat IBR Strain Los Angeles

Reference subfamili <i>Alphaherpesvirinae</i>	Persentase Homologi <i>Sequen</i>		Persentase Perbedaan <i>Sequen</i>	
	Nukleotida (nt)	Asam Amino	Nukleotida (nt)	Asam Amino
BoHV-1.1	100	100	0	0
BoHV-1.2	98.2	99.1	1.8	0.9
BoHV-5	89.9	97.7	10.1	2.3
CerHV-1	90	97.8	10	2.2
CapHV-1	50.4	93.7	25.8	3.9
SuidHV-1	74.2	96.1	49.6	6.3

Tabel 2 menampilkan persentase homologi dan perbedaan *sequen* isolat IBR strain Los Angeles terhadap *sequence reference* yang digunakan dari *Genbank*. Persentase homologi nt dan aaisolat IBR strain Los Angeles terhadap *reference sequence* kelompok BoHV-1.1 100% homologi identik, dan terhadapBoHV-1.2 diperoleh homologi nt : 98.2% dan aa : 99.1%. Homologi cukup tinggi juga terhadapBoHV-5 (nt: 89.9%, aa : 97.5%) dan CerHV-1 (nt: 90%,

aa: 97.8%), namun terhadap SuidHV-1 dan CapHV-1 diperoleh persentase homologi nt yang rendah yaitu 50.4% dan 74.2% tetapi homologi asam amino cukup tinggi yaitu 93.7% dan 96.1%. Hal ini terjadi karena nukleotida penyusun asam amino saat diterjemahkan menjadi asam amino hasilnya tidak mengubah kode asam amino sehingga persentase homologi asam amino tetap tinggi.

Hasil analisa di atas sesuai dengan hasil studi Ros and Belak⁽¹⁶⁾, virus BoHV-1 (1.1 dan 1.2) memiliki homologi yang tinggi terhadap BoHV-5 (nt: 88.6-88.8%, aa: 88.8-90.5%), CerHV-1 (nt: 77.1-77.5%, aa: 86.0-86.6%) sedangkan terhadap virus Prv/ SuidHV-1 memiliki homologi yang rendah yaitu nt: 52.9-53.1%, aa: 40.1-40.7%.

Tabel 3 menampilkan perbedaan nukleotida yang diperoleh dari hasil *alignment*/penjajaran nukleotida isolate IBR strain Los Angeles terhadap semua *sequen reference* yang digunakan. *Sequen* nukleotida subtype BoHV-1.1 dan BoHV-1.2 memiliki kesamaan nukleotida sampai nukleotida nomor 116, selanjutnya terdapat 4 perbedaan nukleotida, berikut berturut-turut pada BoHV-1.1 dan BoHV-1.2: nomor 117 (Timin : Cytosin), nomor 153 (Cytosin: Adenin), nomor 290 (Timin : Cytosin) dan nomor 330 (Cytosin: Adenin) secara keseluruhan perbedaan nukleotida/perbedaan genetik antara BoHV-1.1 dan BoHV-1.2 hanya 1.8%. Namun perbedaan nukleotida antara subtype BoHV-1.1 terhadap BoHV-5: 10,1%, CerHV-1: 10% , SuidHV-1: 49.6% dan CerHV-1: 25.8% (Tabel 2).

Dari hasil tabel 3 yaitu *alignment sequen* asam amino untuk isolatvirus IBR strain Los Angeles dibandingkan dengan kelompok *sequen reference* BoHV-1.1 tidak ada perbedaan asam amino (100% identik). Perbedaan asam amino antara isolat IBR strain Los Angeles dan BoHV-1.2 hanya 0,9% yaitu pada asam amino nomor 97, pada sub tipe BoHV-1.1 asam amino nomor 97 adalah Leusin (L) sedangkan subtype BoHV-1.2 Prolin (P). Saat isolat IBR strain Los Angeles dibandingkan dengan *sequen reference* virus *SuidHV-1/pseudorabies* memiliki perbedaan yang cukup signifikan yaitu 6.3% namun terhadap virus subfamili *Alphaherpesvirinae* lainnya yaitu BoHV-5, CerHV-1 dan CapHV-1 perbedaanya hanya 2.3% , 2.2 % dan 3.9% (terdapat dalam Tabel 3).

Hasil analisis pohon *phylogenetic* (gambar 2) model *Maximum Likelihood* parameter Kimura-2 dengan menggunakan *bootstrap* 2000 replikasi menunjukkan isolat IBR strain Los Angeles (kotak merah) termasuk dalam kelompok sub tipe BoHV-1.1 yaitu subtype virus yang dominan menyebabkan penyakit IBR. Isolat IBR strain Los Angeles berada dalam satu cabang bersama kelompok *sequen reference* BoHV-1.1 dengan *accession number* KJ652529.1, KJ652534.1, AF078730.1, KJ652535.1, M59846.1, EU523745.1, dan JN787954.1. Sedangkan sub tipe B-1.2 dengan *accession number* AF078731.1 membentuk cabang terpisah dari sub tipe BoHV-1.1 namun masih berasal dari sumber cabang yang sama.

Penggunaan *bootstrap* 2000 replikasi dimaksudkan untuk membedakan BoHV-1 sub tipe 1.1 dan sub tipe 1.2 karena kedua sub tipe tersebut memiliki tingkat homologi/kekerabatan yang tinggi hingga 100% (homologi asam amino) dan 99.6% (homologi nukleotida)⁽¹⁷⁾, sedangkan hasil homologi antara isolat IBR strain Los Angeles terhadap *sequen reference* sub tipe BoHV-1.2 yaitu 99.1 % (homologi asam amino) dan 98.2 % (homologi nukleotida).

Analisis pohon *phylogenetic* untuk subfamili *Alphaherpesvirinae* yang lain yaitu BoHV-5, CerHV-1, SuidHV-1 dan CapHV-1 telah membentuk cabang tersendiri atau berbeda dengan cabang kelompok BoHV-1. Hal ini sesuai dengan hasil analisis persentase homologi dan perbedaan sekuen nukleotida dan asam amino antara isolat IBR strain Los Angeles terhadap BoHV-5, CerHV-1, SuidHV-1, dan CapHV-1 berikut ini: 10.1%, 10%, 49.6% dan 25.8 %. Pada pohon *phylogenetic* terlihat *sequen reference* virus SuidHV-1 memiliki cabang yang berbeda dan terjauh dari kelompok virus BoHV-1 sesuai dengan persentase perbedaan sekuen nukleotida yaitu 49.6%. Hasil analisa yang sama juga ditemukan pada hasil studi Ros and Belak¹⁶, analisa pohon *phylogenetic* untuk isolat BoHV-1.1 memiliki satu sumber cabang dengan BoHV-1.2, sedangkan cabang yang terdekat lainnya yaitu BoHV-5, CerHV-1, CapHV-1 namun untuk Prv/SuidHV-1 memiliki jarak cabang terjauh dari kelompok virus BoHV-1.

Tabel 3. Hasil Alignment Sekuen Nukleotida antara Isolat IBR strain Los Angeles dengan *Sequen Reference* BoHV-1.1, BoHV-1.2 dan subfamili *Alphaherpesvirinae*

#BoHV-1_strain_Los_Angeles	ACG GTC ATA TGG TAC AAG ATC GAG AGC GGG TGC GCC CGG CCG CTG TAC TAC ATG GAG TAC	[60]
#KJ652529.1 BoHV-1.1/2004/MN1/USA_gd	---	[60]
#KJ652534.1 BoHV-1.1/2012/1/MN6/USA_gd	---	[60]
#AF078730.1 BoHV-1.1_Jura_gd_1999_sweden	---	[60]
#KJ652535.1 BoHV-1.1/Abu-Hammad/2013/1/Egypt_gd	---	[60]
#M59846.1 HSBGIV_BoHV-1_gd_1993	---	[60]
#EUS23745.1 BoHV-1_PD_ADMAS-1_gd_2008_INDIA	---	[60]
#JN787954.1 BoHV-1_gd_(US6)_2012_china	---	[60]
#AF078731.1 BoHV-1.2_K22_gd_1999_sweden	---	[60]
#AF078732.1 BoHV-5_N565_gd_1999_sweden	...T..A	[60]
#AF078735.1 Cervid herpesvirus_1_Banffshire_82_gd_1999_sweden	..C..G.G	[60]
#AJ271966.1 Suid herpesvirus_1_strain_Kaplan_gd_2006_Germany	CAC..G.GCC	[60]
#AY437088.1 Caprine herpesvirus_1_strain_E/CH_gd_2006_Belgium	...CGC	[60]
#BoHV-1_strain_Los_Angeles	ACC GAG TGC GAG CCC AGG AAG CAC TTT GGG TAC TGC CGC TAC CGC ACA CCC CCG TTT TGG	[120]
#KJ652529.1 BoHV-1.1/2004/MN1/USA_gd	---	[120]
#KJ652534.1 BoHV-1.1/2012/1/MN6/USA_gd	---	[120]
#AF078730.1 BoHV-1.1_Jura_gd_1999_sweden	---	[120]
#KJ652535.1 BoHV-1.1/Abu-Hammad/2013/1/Egypt_gd	---	[120]
#M59846.1 HSBGIV_BoHV-1_gd_1993	---	[120]
#EUS23745.1 BoHV-1_PD_ADMAS-1_gd_2008_INDIA	---	[120]
#JN787954.1 BoHV-1_gd_(US6)_2012_china	---	[120]
#AF078731.1 BoHV-1.2_K22_gd_1999_sweden	...C	[120]
#AF078732.1 BoHV-5_N565_gd_1999_sweden	..G..C	[120]
#AF078735.1 Cervid herpesvirus_1_Banffshire_82_gd_1999_sweden	..G..A..C	[120]
#AJ271966.1 Suid herpesvirus_1_strain_Kaplan_gd_2006_Germany	G...C	[120]
#AY437088.1 Caprine herpesvirus_1_strain_E/CH_gd_2006_Belgium	CAA...C	[120]
#BoHV-1_strain_Los_Angeles	GAC AGC TTC CTG GCG GGC TTC GCC TAC CCC ACG GAC GAC G-A GCT GGG ACT GAT TAT GGC	[180]
#KJ652529.1 BoHV-1.1/2004/MN1/USA_gd	---	[180]
#KJ652534.1 BoHV-1.1/2012/1/MN6/USA_gd	---	[180]
#AF078730.1 BoHV-1.1_Jura_gd_1999_sweden	---	[180]
#KJ652535.1 BoHV-1.1/Abu-Hammad/2013/1/Egypt_gd	---	[180]
#M59846.1 HSBGIV_BoHV-1_gd_1993	---	[180]
#EUS23745.1 BoHV-1_PD_ADMAS-1_gd_2008_INDIA	---	[180]
#JN787954.1 BoHV-1_gd_(US6)_2012_china	---	[180]
#AF078731.1 BoHV-1.2_K22_gd_1999_sweden	...A	[180]
#AF078732.1 BoHV-5_N565_gd_1999_sweden	...G...	[180]
#AF078735.1 Cervid herpesvirus_1_Banffshire_82_gd_1999_sweden	AC...	[180]
#AJ271966.1 Suid herpesvirus_1_strain_Kaplan_gd_2006_Germany	TGG..C.CCG.TCC	[180]
#AY437088.1 Caprine herpesvirus_1_strain_E/CH_gd_2006_Belgium	.C...T...T.T	[180]
#BoHV-1_strain_Los_Angeles	GGC GCC CGC GCG G-C TCG TCG AGG GCC AGT ACC GAC GCG CGC TGT ACA TCG ACG GCA CGG	[240]
#KJ652529.1 BoHV-1.1/2004/MN1/USA_gd	---	[240]
#KJ652534.1 BoHV-1.1/2012/1/MN6/USA_gd	---	[240]
#AF078730.1 BoHV-1.1_Jura_gd_1999_sweden	---	[240]
#KJ652535.1 BoHV-1.1/Abu-Hammad/2013/1/Egypt_gd	---	[240]
#M59846.1 HSBGIV_BoHV-1_gd_1993	---	[240]
#EUS23745.1 BoHV-1_PD_ADMAS-1_gd_2008_INDIA	---	[240]
#JN787954.1 BoHV-1_gd_(US6)_2012_china	---	[240]
#AF078731.1 BoHV-1.2_K22_gd_1999_sweden	---	[240]
#AF078732.1 BoHV-5_N565_gd_1999_sweden	...C...	[240]
#AF078735.1 Cervid herpesvirus_1_Banffshire_82_gd_1999_sweden	...C...	[240]
#AJ271966.1 Suid herpesvirus_1_strain_Kaplan_gd_2006_Germany	T...T...G.G	[240]
#AY437088.1 Caprine herpesvirus_1_strain_E/CH_gd_2006_Belgium	C...AA	[240]
#BoHV-1_strain_Los_Angeles	T-C GCC TAT ACA GAT TTC ATG GTT TCG CTG CC- GGC CGG --G G-A CTG CTG GTT CTC GAA	[300]
#KJ652529.1 BoHV-1.1/2004/MN1/USA_gd	---	[300]
#KJ652534.1 BoHV-1.1/2012/1/MN6/USA_gd	---	[300]
#AF078730.1 BoHV-1.1_Jura_gd_1999_sweden	---	[300]
#KJ652535.1 BoHV-1.1/Abu-Hammad/2013/1/Egypt_gd	---	[300]
#M59846.1 HSBGIV_BoHV-1_gd_1993	---	[300]
#EUS23745.1 BoHV-1_PD_ADMAS-1_gd_2008_INDIA	---	[300]
#JN787954.1 BoHV-1_gd_(US6)_2012_china	---	[300]
#AF078731.1 BoHV-1.2_K22_gd_1999_sweden	...C	[300]
#AF078732.1 BoHV-5_N565_gd_1999_sweden	...C..G..C	[300]
#AF078735.1 Cervid herpesvirus_1_Banffshire_82_gd_1999_sweden	...C..C..C	[300]
#AJ271966.1 Suid herpesvirus_1_strain_Kaplan_gd_2006_Germany	A-..AT..CTC..C	[300]
#AY437088.1 Caprine herpesvirus_1_strain_E/CH_gd_2006_Belgium	C-..A...C..C	[300]
#BoHV-1_strain_Los_Angeles	A-C TCG GCG CGG CTC GCG GGT ACA CCT TTG G	[331]
#KJ652529.1 BoHV-1.1/2004/MN1/USA_gd	---	[331]
#KJ652534.1 BoHV-1.1/2012/1/MN6/USA_gd	---	[331]
#AF078730.1 BoHV-1.1_Jura_gd_1999_sweden	---	[331]
#KJ652535.1 BoHV-1.1/Abu-Hammad/2013/1/Egypt_gd	---	[331]
#M59846.1 HSBGIV_BoHV-1_gd_1993	---	[331]
#EUS23745.1 BoHV-1_PD_ADMAS-1_gd_2008_INDIA	---	[331]
#JN787954.1 BoHV-1_gd_(US6)_2012_china	---	[331]
#AF078731.1 BoHV-1.2_K22_gd_1999_sweden	...A	[331]
#AF078732.1 BoHV-5_N565_gd_1999_sweden	G-...AG...	[331]
#AF078735.1 Cervid herpesvirus_1_Banffshire_82_gd_1999_sweden	G-...AGA	[331]
#AJ271966.1 Suid herpesvirus_1_strain_Kaplan_gd_2006_Germany	G-T GGA C-A C-G AC	[331]
#AY437088.1 Caprine herpesvirus_1_strain_E/CH_gd_2006_Belgium	G-..G.A..A..T.ACG	[331]

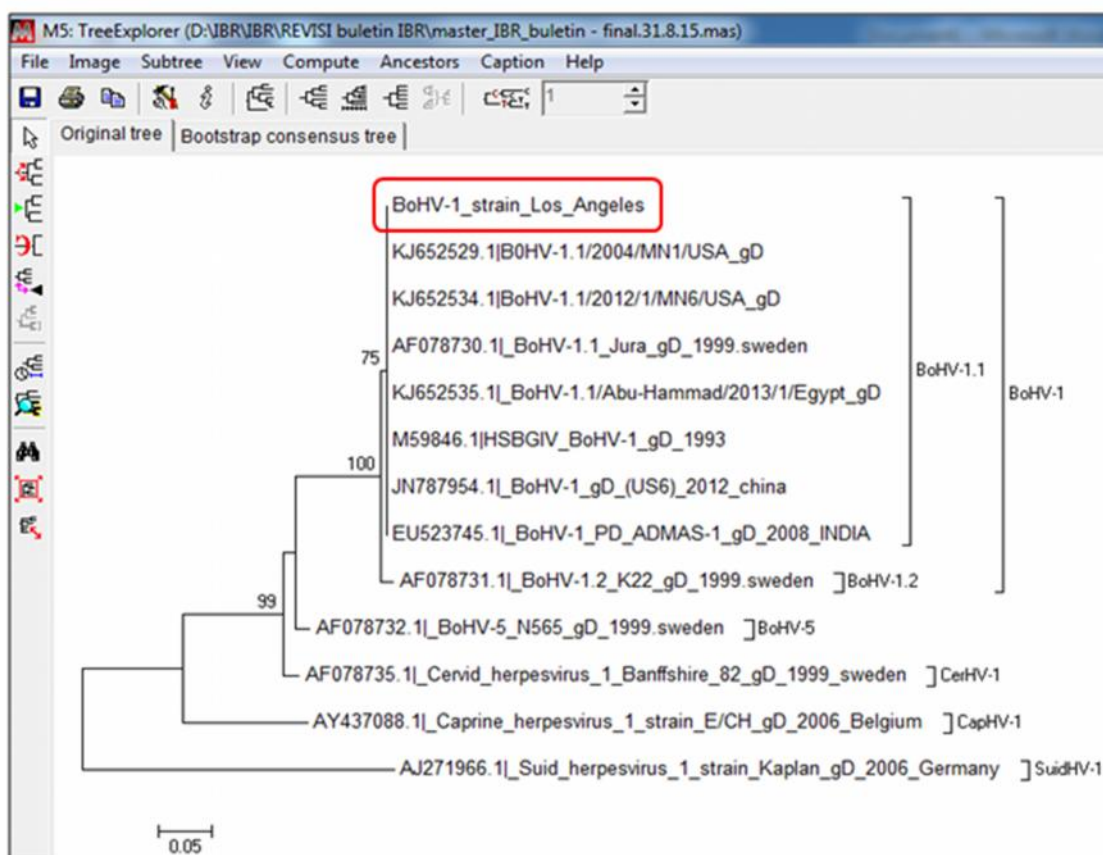
Catatan : sequen menggunakan primer internal lokasi gDN1_F (394-422), gDN2_R (716-696)

Tabel 4. Hasil *Alignment Sequen* Asam amino antara Isolat IBR strain Los Angeles dengan *Sequen Reference* BoHV-1.1, BoHV-1.2 dan subfamili *Alphaherpesvirinae*

#BoHV-1_strain_Los_Angeles	TVIWYKIESG CARPLYMEY TECEPRKHFG YCRYRTPFFW DSFLAGFAYP TDD-AGTDYG [60]
#KJ652529.1 BoHV-1.1/2004/MN1/USA_gD [60]
#KJ652534.1 BoHV-1.1/2012/1/MN6/USA_gD [60]
#AF078730.1 _BoHV-1.1_Jura_gD_1999.sweden [60]
#KJ652535.1 _BoHV-1.1/Abu-Hammad/2013/1/Egypt_gD [60]
#M59846.1 HSBGIV_BoHV-1_gD_1993 [60]
#EU523745.1 _BoHV-1_PD_ADMAS-1_gD_2008_INDIA [60]
#JN787954.1 _BoHV-1_gD_(US6)_2012_china [60]
#AF078731.1 _BoHV-1.2_K22_gD_1999.sweden [60]
#AF078732.1 _BoHV-5_N565_gD_1999.sweden S..D.K... ..G.....-..AGH. [60]
#AF078735.1 _Cervid herpesvirus_1_Banffshire_82_gD_1999_swedenV.....D.....T.....A.H. [60]
#AJ271966.1 _Suid herpesvirus_1_strain_Kaplan_gD_2006_Germany	H.A..R.AD..HL..FI..AD.D..QI..R..R..T.M.WTFS.DYMF..E.-.AAH. [60]
#AY437088.1 _Caprine herpesvirus_1_strain_E/CH_gD_2006_Belgium	..A..R..H.....V...Q..D.N....H.....A...S...T..A.-.ARH. [60]
#BoHV-1_strain_Los_Angeles	GARA-SSRAS TDARCTSTAR -AYTDFMVL -GR--LIVLE -SARLAGTPL [110]
#KJ652529.1 BoHV-1.1/2004/MN1/USA_gD [110]
#KJ652534.1 BoHV-1.1/2012/1/MN6/USA_gD [110]
#AF078730.1 _BoHV-1.1_Jura_gD_1999.sweden [110]
#KJ652535.1 _BoHV-1.1/Abu-Hammad/2013/1/Egypt_gD [110]
#M59846.1 HSBGIV_BoHV-1_gD_1993 [110]
#EU523745.1 _BoHV-1_PD_ADMAS-1_gD_2008_INDIA [110]
#JN787954.1 _BoHV-1_gD_(US6)_2012_china [110]
#AF078731.1 _BoHV-1.2_K22_gD_1999.swedenP..... [110]
#AF078732.1 _BoHV-5_N565_gD_1999.swedenP...G.....L...FA--G.....S...S [110]
#AF078735.1 _Cervid herpesvirus_1_Banffshire_82_gD_1999_sweden-P...G.....FA--R.....R...S [110]
#AJ271966.1 _Suid herpesvirus_1_strain_Kaplan_gD_2006_Germany	.SG.-.T...G.W.P...-IL.....A.PEGQECPPAR -GP-T.R.SS [110]
#AY437088.1 _Caprine herpesvirus_1_strain_E/CH_gD_2006_Belgium	R..E.....GGP....T..-T.....FA--E....* -A.LT....S [110]

Catatan: sequen menggunakan primer internal lokasi gDN1_F (394-422), gDN2_R (716-696)

d. Pohon *Phylogenetic*



Gambar 2. Hasil Analisis Pohon *Phylogenetic*

Virus BoHV-1 setelah masuk dan menginfeksi akan menyebar dari infeksi lokal ke sistem saraf melalui sel saraf 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 ke sapi lain sehingga virus akan menyebar. Virus BoHV-1 yang menetap ini dapat diaktifkan atau dipicu dengan beberapa hal seperti transportasi, proses kelahiran dan pengobatan dengan glucocorticoid⁽¹³⁾.

Penyakit IBR yang bersifat laten dan menetap merupakan sumber penularan dan *shedding* virus, penyakit yang termasuk dalam daftar PHMS dapat dicegah dengan beberapa cara yaitu mencegah masuknya agen penyakit dari luar berupa produk impor yang membawa agen penyakit IBR, mencegah menyebarnya penyakit dari pusat-pusat pembibitan ternak, menjamin bebasnya semen beku yang digunakan dalam program inseminasi buatan dengan menghindari adanya kontaminasi semen dengan agen penyakit IBR dan beberapa cara lain dalam hubungannya dengan masalah penularan penyakit secara congenital⁽¹⁸⁾. Pencegahan dapat juga dilakukan dengan cara vaksinasi.

KESIMPULAN

1. Metode PCR dan *sequencing* pada gen target glikoprotein D telah mampu mendeteksi DNA virus BoHV-1, hal ini dapat dijadikan sebagai metode secara akurat dan tepat untuk karakterisasi genetik kelompok virus BoHV-1.
2. Hasil analisis aplikasi BLAST dan pohon *phylogenetic* menyimpulkan isolat IBR strain Los Angeles dikonfirmasi 100% sebagai virus dalam sub tipe BoHV -1.1 yaitu virus yang menyebabkan penyakit IBR dan walaupun terus dipasase tidak mengalami perubahan genetik.
3. Hasil *alignment* nukleotida (nt) dan asam amino (aa) menunjukkan bahwa virus IBR strain Los Angeles memiliki persentase homologi nt dan aa tinggi terhadap BoHV-1.1 (nt : 100%, aa: 100%), BoHV-1.2 (nt : 98.2% , aa: 99.1%) , BoHV-5 (nt : 89.9% , aa: 97.7%) , CerHV-1 (nt : 90% , aa: 97.8%) , homologi aa terhadap CapHV-1 dan SuidHV-1 cukup tinggi yaitu 96.1% dan 93.7% tetapi homologi nt rendah yaitu 74.2% dan 50.4%.
4. Masih diperlukan kajian karakteristik genetik dan analisa epidemiologi terhadap isolat virus BoHV-1 di Indonesia untuk mengetahui sub tipe genetik sehingga terdapat kesesuaian sub tipe isolat virus BoHV-1 di lapangan dan vaksin yang digunakan.

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. **Afshar A. & Eaglesome MD.** 1990. Viruses Associated with Bovine Serum. *Veterinary Bulletin*, 60, 93-109.
3. **Baranowski EG, Keil J, Lyaku FA, Rijsewijk P, Van Oirschot P, Pastoret. & E. Thiry.** 1996. Structural and Functional Analysis of Bovine Herpesvirus 1 Minor Glycoprotein. *Veterinary Microbiology*, 53, 91-101.
4. **Carter GR. & Flores EF.** 2006. Wise, we all love pigs D.J. "Herpesviridae". A Concise *Review of Veterinary Virology*. Retrieved 2006-06-04
5. **Edwards S. Chasey D. & White H.** 1983. Experimental Infectious Bovine Rhinotracheitis: Comparison of Four Antigen Detection Methods. *Res. Vet. Sci.*, 34, 42-45.
6. **Edwards S, White H. & Nixon P.** 1990. A Study of the Predominant Genotypes of Bovine Herpesvirus 1 Isolated in the UK. *Veterinary Microbiology* 22, 213-223.
7. **Eugster AK, Angulo AA. & Jones LP.** 1974. Herpesvirus Encephalitisin Range Calves. *Proc Annu Meet Am Assoc Vet Lab Diagn* 17, 267-290.
8. **Fenner, Frank J, Gibbs E, Paul J, Murphy & Frederick A, Rott Rudolph, Studdert, Michael J, White. & David O.** 1993. *Veterinary Virology* 2nd edition. Academic Press, Inc. ISBN 0-12-253056-X.

9. **Keputusan Menteri Pertanian.** No.4026/Kpts./OT.140/3/2013. Penetapan Jenis Penyakit Hewan Menular Strategis. Jakarta. 2013
10. **Lyaku JR, Nettleton PF. & Marsden M.** 1992. A Comparison of Serological Relationships among Five Ruminant Alphaherpesviruses by ELISA. *Arch. Virol.* 124, 333–341.
11. **Martin WBG, Castrucci F, Frigeri & Ferrari M.** 1990. A Serological Comparison of Some Animal Herpesviruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 13,75–84.
12. **Metzler AE, Matile H, Gassmann U, Engels M. & Wyler R.** 1985. European Isolates of Bovine Herpesvirus 1: A Comparison of Restriction Endonuclease Sites, Polypeptides, and Reactivity with Monoclonal Antibodies. *Arch. Virol.*, 85, 57–69.
13. **Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts S & Thiry E.** 2007. Bovine Herpesvirus 1 Infection and Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Vet. Res.* 38, 181-209.
14. **Nettleton PF, Sinclair JA, Herring JA, Inglis DM, Fletcher TJ, Ross HM. & Bonniwell MA.** 1986. Prevalence of Herpesvirus Infection in British Red Deer and Investigations of Further Disease Outbreaks. *Vet. Rec.*8, 267–270.
15. **OIE.** 2010. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis. OIE Terrestrial Manual Chapter 2.4.13. Paris.
16. **Ros C. & Belak S.** 1999. Studies of Genetic Relationships between Bovine, Caprine, Cervine, and Ruminant Alphaherpes Viruses and Improved Molecular Methods for Virus Detection and Identification. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1247-1253.
17. **Schwytzer M. & Ackermann M.** 1996. Molecular Virology of Ruminant Herpesvirus. *Vet. Microbiol.* 53, 67-77.
18. **Sudarisman.** 2007. Penularan Kongenital Penyakit Infeksius Bovine Rhinotracheitis (IBR) pada Sapi dan Kerbau di Indonesia. BBalitvet. Bogor.
19. **Tikoo SK, Fitzpatrick DR, Babiuk LA. & Zamb TJ.** 1990. Molecular Cloning, Sequencing, and Expression of Functional Bovine Herpesvirus 1 Glycoprotein Giv in Transfected Bovine Cells. *J. Virol.* 64, 5132–5142.
20. **Tikoo SK, Campos M. & Babiuk LA.** 1995. Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1). Biology, Pathogenesis, and Control. *Adv. Virus Res.* 45, 191-223.
21. **Thiry YE, Saliki J, Bublot M. & Pastoret PP.** 1987. Reactivation of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus by Transport. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*10, 59-63.
22. **Van Drunen Littel, Van den Hurk S, Van den Hurk JV, Gilchrist JE, Misra V. & Babiuk LA.** 1984. Interactions of Monoclonal Antibodies and Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV–1) Glycoproteins: Characterization of Their Biochemical and Immunological Properties. *Virology* 135, 466–479.
23. **Van Oirschot JT.** 1995. Bovine Herpesvirus in Semen of Bulls and the Risk of Transmission: A Brief Overview. *Veterinary Quarterly.* 17, 29-33.
24. **Van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Maris-Veldhuis MA, Weerdmeester K. & Rijsewijk FAM.** 1997. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay To Detect Antibodies Against Glycoprotein gE of Bovine Herpesvirus 1 Allows Differentiation between Infected and Vaccinated Cattle. *J. Virol. Methods,* 67, 23–34.
25. **Williams NM, Vickers ML, Tramontin RR, Petrites-Murphy MB. & Allen GP.** 1997. Multiple Abortions Associated with Caprine Herpesvirusinfection in A Goat Herd. *J Am Vet Med Assoc* 211,89–91.