

DETEKSI DEOXYRIBONUCLEIC ACID (DNA) VIRUS INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS (IBR) DENGAN TEKNIK REALTIME POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) PADA SAMPEL SEMEN SAPI DAN EMBRIO TAHUN 2019

Zaza Famia¹, Lestari¹, Muhammad Ridwan Nurbintara², Hendra Wibawa¹, Ira Pramastuti¹, Vika Yuaniata¹, Herdiyanto Mulyawan¹, Bagoes Poermadjaja¹

¹ Balai Besar Veteriner Wates

² Unit Pelaksana Teknis Daerah Wilayah Tengah, Dinas Pertanian dan Pangan Kabupaten Kulon Progo

E-mail: miroroh@yahoo.co.id; drhzazafamia2@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR) disebabkan oleh infeksi virus *bovine herpes virus 1* (BHV-1). Virus ini masuk dalam famili *Herpesviridae* yang memiliki untai dasar *double stranded deoxyribonucleic acid* (DNA) dan memiliki glikoprotein utama (glikoprotein B (gB), gC dan gD). Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi DNA virus IBR pada sampel semen sapi dan embrio sapi sebagai upaya pengamanan dan pengendalian penyakit hewan di Unit Pelaksana Teknis (UPT) Perbibitan sehingga dapat diperoleh benih dan bibit ternak yang berkualitas dan bebas dari penyakit IBR. Jenis sampel terdiri dari 256 sampel semen dari UPT BIB Singosari, dan BIBD Pakem Kabupaten Sleman, dan 37 sampel embrio dari BET Cipelang Kabupaten Bogor hasil surveilans aktif tahun 2019. Pengujian dilakukan dengan teknik *realtime polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan gen glikoprotein B (gB). Teknik ini lebih cepat dan mudah sehingga akan mampu mendeteksi keberadaan virus IBR yang bersifat laten secara dini. Hasil uji *realtime* PCR IBR pada 256 sampel semen dan 37 embrio diperoleh 5 sampel semen (1,95%) positif IBR, sedangkan sampel embrio semua hasil negatif IBR. Kesimpulan yang didapat bahwa sampel semen terdeteksi BHV-1 dengan teknik *realtime* PCR IBR dan sampel embrio tidak terdeteksi BHV-1. Saran yang bisa diberikan yaitu UPT Perbibitan hendaknya melakukan pemeriksaan rutin dilakukan untuk sampel semen dan embrio untuk memonitoring dan mencegah penularan penyakit IBR dan sapi-sapi yang ada di UPT Perbibitan hendaknya dihindarkan dari faktor-faktor yang menyebabkan latensi.

Kata kunci : *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR), *bovine herpes virus 1* (BHV-1), *deoxyribonucleic acid* (DNA), *Realtime Polymerase Chain Reaction* (PCR), semen, embrio

PENDAHULUAN

Syarat utama yang harus diperhatikan untuk mendapatkan ternak yang berkualitas dan memenuhi syarat kesehatan hewan dimulai dengan memperhatikan bibit dan benihnya. Hal ini dilakukan agar ternak terhindar dari risiko penyakit hewan menular yang mengganggu produksi dan tidak optimalnya produktivitas sehingga pengamatan dan pengendalian penyakit hewan menular pada ternak perlu dilakukan karena hal ini berperan dalam menghindari kemungkinan terjadinya risiko penyakit hewan yang bisa ditularkan antar ternak. Untuk menghindari kemungkinan terjadinya risiko penyakit hewan menular pada ternak antara lain menjamin produk hasil ternak tersebut bebas dari agen penyakit. Salah satu produk hasil ternak yang perlu diamati yaitu semen dan embrio.

IBR merupakan salah satu penyakit yang ada di Indonesia yang dapat mempengaruhi produktivitas dan reproduksi dari sapi (Philpott *et al.*, 1993). Penyakit IBR disebabkan oleh Bovine Herpes Virus Tipe1 (BHV-1). Virus ini masuk dalam famili *Herpesviridae*, memiliki untai dasar *double stranded*

deoxyribonucleic acid (DNA) dan memiliki glikoprotein utama (glikoprotein B (gB), gC dan gD). Tanda-tanda umum dari penyakit IBR adalah peningkatan frekuensi pernapasan, anoreksia, demam, depresi, aborsi, penurunan produksi susu pada sapi perah, rhinitis, dan terjadi kekurusan (Radostits *et al.*, 2006). Cara penularan penyakit IBR melalui semen dengan kawin alami maupun dengan cara inseminasi buatan (Muylkens *et al.*, 2007). Berdasarkan OIE (2018) salah satu diagnosis untuk mendeteksi BHV-1 dengan teknik PCR. Teknik PCR untuk Penyakit IBR dapat dilakukan untuk kejadian infeksi laten. PCR memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi, cepat, dan mudah pengerjaannya dibandingkan dengan isolasi virus sehingga sangat ideal digunakan untuk diagnosa rutin (Saefulloh *et al.*, 2008). Pemilihan pengujian dengan PCR realtime untuk pengujian penyakit IBR menggunakan primer dengan target gen B dengan sekuen nukleotida dilakukan berdasarkan pada OIE (2018).

TUJUAN

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi DNA virus IBR pada sampel semen sapi dan embrio sapi hasil surveilans aktif tahun 2019 dengan menggunakan teknik realtime PCR sebagai upaya pengamanan dan pengendalian penyakit hewan di Unit Pelaksana Teknis (UPT) Perbibitan sehingga dapat diperoleh benih dan bibit ternak yang berkualitas dan bebas dari penyakit IBR.

MATERI DAN METODE

Sampel berupa semen sapi yang berasal dari surveilans aktif Balai Besar Veteriner Wates tahun 2019 di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Singosari dan UPT Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) Pakem Kabupaten Sleman, dan sampel embrio yang diambil di Balai Embrio Transfer Cipelang

Data dan informasi dari lapangan dimasukkan ke dalam form penerimaan contoh, kemudian dimasukkan ke dalam sistem terpadu penerimaan, pengujian dan penjawaban sampel (Si-Lab), dan untuk selanjutnya sampel-sampel dikirim ke Laboratorium Bioteknologi BBVet Wates.

Pengujian dilakukan dengan teknik *realtime polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan target gen glikoprotein B (gB). Teknik ini lebih cepat dan mudah sehingga akan mampu mendeteksi keberadaan virus IBR yang bersifat laten secara dini.

Metode pengujian menggunakan teknik *realtime* PCR dengan tahapan ekstraksi DNA dimana pada tahap ini dikerjakan di BSC class II laboratorium bioteknologi dengan cara kerja sesuai prosedur Viral Nucleic Acid Kit II (Geneaid. Cat No. VR050). DNA hasil ekstraksi langsung digunakan untuk pengujian PCR. Tahap mastermix menggunakan prosedur SensiFast Probe Lo-Rox Kit. Adapun primer yang digunakan yaitu Primer gB-F: 5'-TGT-GGA-CCT-AAA-CCT-

CAC-GGT-3' (position 57499–57519 GenBank®, accession AJ004801, Primer gB-R: 5'-GTA-GTC-GAG-CAG-ACC-CGT-GTC-3' (position 57595–57575 GenBank®, accession AJ004801), dan TaqMan Probe: 5'-FAM-AGG-ACC-GCG-AGT-TCT-TGC-CGC-TAMRA-3' (position 57525–57545 GenBank®, accession AJ004801) (OIE, 2018).

Kondisi siklus PCR berdasarkan OIE (2018) sebagai berikut:

1 X : 50 °C selama 2 menit;

1 X : 95 °C selama 5 menit

45X (siklus) : 95 °C selama 15 detik; 60 °C selama 45 detik

Produk hasil PCR untuk selanjutnya dianalisis dengan menggunakan software yang tersedia dalam mesin dan dibuat *Threshold (T)* auto pada range linear kurva amplifikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

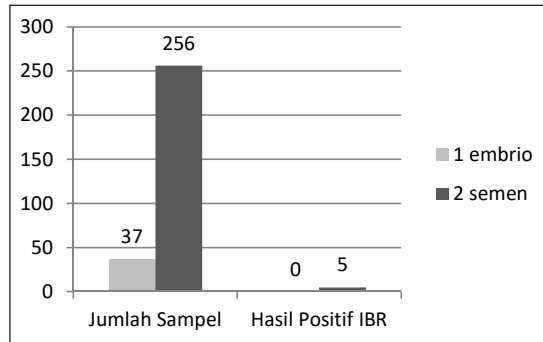
Pengambilan semen sapi dilakukan di UPT Balai Inseminasi Buatan Daerah Pakem Kabupaten Sleman (semen yang diproduksi didistribusikan di DI Yogyakarta) dan BIB Singosari (semen didistribusikan skala nasional dan internasional). Pengambilan sampel embrio dilakukan di BET Cipelang Cijeruk kabupaten Bogor dikarenakan embrio yang dihasilkan oleh BET Cipelang didistribusikan ke seluruh wilayah Indonesia.

Sampel semen dan embrio sapi yang diambil di UPT Perbibitan tersebut kemudian dilakukan pengujian PCR di laboratorium Bioteknologi BBVet Wates. Metode pengujian dilakukan menggunakan metode *realtime* PCR menggunakan target gen glikoprotein B (gB). Teknik ini lebih cepat dan mudah sehingga akan mampu mendeteksi keberadaan virus IBR yang bersifat laten (OIE, 2018).

Tabel 1. Hasil pengujian realtime PCR terhadap semen sapi dan embrio sapi

Jenis Sampel	Jumlah Sampel	Hasil Uji PCR	
		Positif	Prosentase Hasil yang Positif
Semen	256	5	1.95%
Embrio	37	0	0%

Grafik 1. . Hasil pengujian realtime PCR IBR berdasarkan jenis sampel



Dari tabel 1 dan grafik 1 dapat diketahui hasil pengujian PCR IBR sampel embrio pada 37 sampel embrio (yang dipool jadi 7 straw) dari BET Cipelang diperoleh hasil semua negatif IBR. Hasil uji realtime PCR IBR pada 256 sampel semen diperoleh 5 sampel (1.95%) positif IBR. Sampel dengan hasil uji negatif yang didapat pada kegiatan ini menunjukkan tidak terdeteksi virus IBR. Virus IBR yang tidak terdeteksi kemungkinan karena sapi yang diambil sampelnya tidak terinfeksi virus BHV-1. Namun demikian bisa juga tidak terjadinya ekskresi virus IBR dan mungkin saja virus menetap dalam keadaan laten. Hal ini belum bisa dikatakan bahwa sapi yang diambil sampel tidak terinfeksi BHV-1. (Rola *et al.*, 2003). Sampel semen dengan hasil uji positif IBR menunjukkan terdeteksi virus IBR karena virus terdeteksi kemungkinan karena terjadi ekskresi virus IBR dan virus menetap dalam keadaan laten. Virus laten ini merupakan reservoir dalam inang kebal yang akan terekskresikan bila terjadi pengaktifan kembali (reaktivasi) (Rola *et al.*, 2003).

Keadaan ternak stress, kandang terlalu padat, transportasi dan pemberian perlakuan dengan kortikosteroid adalah beberapa cara yang dapat mengaktifkan dan mempercepat proses reaktivasi virus dalam keadaan laten (Muykens *et al.*, 2007). Ekskresi virus pada hewan yang diinfeksi secara buatan akan terdeteksi dengan PCR mulai hari ke-2 hingga ke-37 pasca infeksi dan hari berikutnya akan diperoleh hasil PCR negatif. Salah satu contoh dari kortikosteroid yang bisa membuat terjadiannya infeksi laten pada ternak yaitu *dexamethazone*. Jika sapi diberi perlakuan dengan *dexamethazone* setelah hasil negatif (38 hari pasca infeksi) maka terjadi reaktivasi virus dan terekskresikan sehingga dapat terdeteksi positif dengan PCR hingga 104 hari pasca infeksi (Smits *et al.*, 2000).

Menurut Van Oirschot *et al* (1993) bahwa IBR disebabkan oleh *Alpha Herpes Virus*. Pada umumnya *Alpha Herpes Virus*, BHV-1 menyebabkan infeksi laten. Setelah infeksi, BHV-1 akan menyebar dari infeksi lokal ke sistem saraf melalui sel saraf tepi mencapai ganglia trigeminal dan lumbosakral dan menetap dalam keadaan laten (Vogel *et al.*, 2004). Menurut Rolla *et al* (2005) virus yang teraktivasi, kemudian ditransportasikan melalui axon kembali ke saraf tepi dan

dilanjutkan ke tempat asal virus masuk. Hal ini menyebabkan terjadinya penularan virus ke ternak sehat lainnya. Pengeluaran virus lewat sekresi hidung, mata, dan alat kelamin merupakan sumber penularan bagi hewan lain.

Menurut OIE (2018) salah satu diagnosis untuk mendeteksi BHV-1 dengan teknik PCR. Teknik PCR untuk penyakit IBR dapat dilakukan untuk kejadian infeksi laten. PCR memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi, cepat, dan mudah pengerjaannya dibandingkan dengan isolasi virus sehingga sangat ideal digunakan untuk diagnosa rutin (Saefulloh *et al.*, 2008). Protein pada *bovine herpes virus 1* (BHV-1) terdiri dari glikoprotein utama (glikoprotein B (gB), gC dan gD), glikoprotein tambahan (GE, G1, gH, gL, GG, gk dan gM), timidin kinase (TK), sejumlah enzim seperti UL2, UL12, UL40 (ribonucleotide reduktase), UL42 (DNA polymerase), UL50 (dUTPase), UL52 (helikase), US3 (protein kinase) dan kelompok protein regulasi (BICP0, BICP4, BICP22, BICP27, dan TIF) (Schwyzer, M and M. Ackermann, 1996). Pemilihan pengujian dengan PCR realtime untuk pengujian penyakit IBR menggunakan primer dengan target gen B dengan sekuen nukleotida dilakukan berdasarkan pada OIE (2018). Glikoprotein B (gB) merupakan glikoprotein utama dan berada pada *virion envelope* Departement of Health and Ageing Office of Gene Technology Regulator, (2005). Glikoprotein B berperan dalam proses *attachment* dan penetrasi virus ke dalam sel inang. Selain itu glikoprotein ini juga membantu dalam transmisi intrasesuler virus (Bielefeldt *et al.*, 1991; Griebel *et al.*, 1989; Griebel *et al.*, 1998).

Pemeriksaan rutin terhadap penyakit untuk sampel semen dan embrio perlu dilakukan secara rutin untuk mencegah penularan penyakit dari bibit / benih ternak pada ternak yang lain. Pemeriksaan secara rutin terhadap penyakit IBR perlu dilakukan untuk mencegah terjadinya infeksi penyakit IBR. Pengawasan penyakit IBR akan dapat dicapai melalui beberapa tahapan yaitu: faktor resiko yang ada pada inseminasi buatan diperhatikan dengan seksama, pengujian secara serologi dilakukan 2 kali dalam setahun, dan pejantan yang serologi positif terhadap BHV-1 pada Balai Inseminasi Buatan dieliminasi (Sudarisman, 2003). Selain itu perlunya dikembangkan lagi pengujian laboratorium untuk semen dan embrio untuk mencegah penularan penyakit dari bibit / benih ternak pada ternak yang lain.

KESIMPULAN DAN SARAN

Sampel semen terdeteksi BHV-1 dengan teknik *realtime* PCR dan sampel embrio tidak terdeteksi BHV-1. Saran yang bisa diberikan yaitu UPT Perbibitan hendaknya melakukan pemeriksaan rutin terhadap sampel semen dan embrio setiap kali pengambilan untuk memonitoring dan mencegah penularan penyakit IBR, sapi-sapi yang ada di UPT Perbibitan hendaknya dihindarkan dari faktor-faktor yang menyebabkan latensi dan straw semen dengan batch number yang sama yang terdeteksi positif BHV-1 tidak boleh diedarkan.

KETERBATASAN

Keterbatasan penelitian adalah minimnya dana yang digunakan untuk kegiatan monitoring dan pengujian terkait penyakit IBR pada semen sapi dan embrio sapi sehingga pengambilan sampel hanya bisa dilaksanakan di tiga lokasi (BIB Singosari, BIBD Pakem Sleman dan BET Cipelang). Namun, hal ini bukan menjadi tujuan penelitian ini karena output dari penelitian adalah mendeteksi DNA virus *BHV-1* sebagai agen penyakit IBR dengan teknik *realtime* PCR pada sampel semen sapi dan embrio.

DAFTAR PUSTAKA

- Bielefeldt Ohmann H., Babiok LA., Harland R. 1991. Cytokine Synergy with Viral Cytopathic Effects and Bacterial Products During the Pathogenesis of Respiratory Trac Infection. *Clin ImmunolImmunopath.* 60:153
- Department of Health and Ageing Office of Gene Technology Regulator. 2005. *The Biology of Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1)*. Australian Government
- Griebel PJ, Bielefeldt Ohmann H, Compos M, Qualtiere L, Davis WC, Lawman MJ, Babiuk LA. 1989. Bovine Peripheral Blood Leukocyte Population Dynamics Following Treatment with Recombinant Bovine Interferon-alpha. *J Interferon Res* 9:245-257.
- Griebel PJ, Qualtiere L, Davis WC, Gee A, Bielefelds Ohmann H, Lawman MJ, Babiuk LA. 1998. Peripheral Blood T Lymphocyte Population Dynamics and Function Following a Primary Bovine Herpesvirus Infection. *Viral Immunol.* 1:287
- Muylkens, B., J. Thiry, P. Kirten, F. Schynts and E.Thiry. 2007. *Bovine Herpesvirus-1 Infection and Infectious Bovine Rhinotracheitis*. *Vet. Res.* 38: 181 – 209.
- OIE (Office Internasional Des Epizooties). 2018. *Infectious Bovine Rhinotracheitis / Infectious Pustula Vulvovaginitis*. In: *Manual of Diagnostic Test and Vaccine for terrestrial Animals*. Vallat, B. (Ed.). Chapter 3.4.11 OIE, Paris.
- Radostits, O.M., O.C. Gay, D.C. Blood and K.W. Hinchliff. 2006. *Veterinary Medicine: A Textbook of the Disease of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, 10th. W.B. Saunders Company.
- Rola, J., M. Larska and M.P. Polak. 2005. Detection of *Bovine Herpes Virus-1* from an Outbreak of *Infectious Bovine Rhinotracheitis*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 49: 267-271.
- Rolla, J., M.P. Polak and J.F. Zmudzinski. 2003. Amplification of DNA BHV-1 Isolated From Semen of Naturally Infected Bulls. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 47: 71 – 75.
- Saeffuloh, M., R.M. Abdul Adjid, I.W.T. Wibawan dan Darminto. 2008. Pengembangan *Nested PCR* untuk Deteksi *Bovine Herpes Virus 1* (BHV-1) pada Sediaan usap Mukosa Hidung dan Semen Asal Sapi. *JITV.* 13: 155-164.

- Schwytzer, M and M. Ackermann. 1996. Molecular Virology of Ruminant Herpesvirus. *Vet. Microbiol.* 53: 67 - 77.
- Smits, C.B., C. Van Maanen, R.D. Glas, A.L.W. De Gee., T. Dijkstrab, J.T. Van Oirschot and F.A.M Rusewijk. 2000. Comparison of Three Polymerase Chain Reaction Methods for Routine Detection of *Bovine Herpes Virus 1* DNA in Fresh Bull Semen. *J. Virol. Methods* 85: 65 – 73.
- Sudarisman. 2003. Penyakit *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR) pada Sapi di Lembaga-lembaga Pembibitan Ternak di Indonesia. *Wartazoa.* 13 (3) Balai Penelitian Veteriner, Bogor.
- Vogel, F.S.F., E.F. Flores, R. Weiblen, E.R. Winkelmann, M.P. Moraes and J.F.M. Raganca. 2004. Intrapreputial Infection of Young Bulls With *Bovine Herpes Virus* Type 1.2 (BHV-1.2): Acute balanoposthitis, Latent Infection and Detection of Viral DNA in Regional Neural and Non-neural Tissues 50 Days After Experimental Reactivation. *Vet. Microbiol.* 98: 185 – 196.