

**IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS YANG DIISOLASI DARI
JOGJAKARTA DENGAN REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN
REACTION GEN PEPLOMER S-1**

**IDENTIFICATION OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS ISOLATED FROM
JOGJAKARTA BY REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN
REACTION OF THE PEPLOMER S-1 GENE**

Untari, Sardjono, Darjono

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Virus *infectious bronchitis* (IB) pada ayam dari isolat lapangan diidentifikasi dengan teknik *Reverse Transcriptase Potymerase Chain Reaction* (RT-PCR), berdasarkan pada sequen gen S-1 yang *conserved*. Primer spesifik S1OLIGO5' dan S1OLIGO3' digunakan untuk amplifikasi RNA virus IB. Pada penelitian ini diketahui isolat dari peternakan ayam di Jogjakarta positif teridentifikasi virus IB dan diindikasikan virus IB tersebut merupakan varian baru (pita pada 600bp) yang hampir sama dengan kontrol virus vaksin variant 4-91 (pita pada 700 bp). Pita tersebut berbeda secara signifikan dengan virus vaksin *strain* Massachusetts referensi yang biasanya digunakan untuk vaksinasi di daerah tersebut dengan pita pada 1720 bp.

Kata kunci: Virus *Avian Infectious Bronchitis*, *Reverse Transcriptase Potymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

ABSTRACT

In the present study was used reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to identify avian infectious bronchitis virus (IBV) field isolate base on the conserved S-1 gene sequences. Primers spesific S1OLIGO5' and S1 OLIGO3' were used to amplify the IBV genomic RNA. Using spesific primer in RT-PCR provides a rapid and accurate means of identifying IBV. This research demonstrated that this sample isolate in Jogjakarta was positif IBV (band 600 bp), indicated that this isolate similar to the variant 4-91 of control vaccine (band 700 bp). This band was significantly different from Massachusetts reference strain vaccine which is usually used to vaccinate in this area that predicted band at 1720 bp.

Key words: Avian Infectious Bronchitis Virus, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

PENDAHULUAN

Penyebab penyakit IB adalah virus RNA untai tunggal, *plus sense* termasuk genus *Coronavirus*, familia *Coronaviridae* (Cavanagh dan Naqi, 1997). Sampai sekarang diketahui ada lebih dari 30 serotipe (Picault *et al.*, 2003). Banyaknya serotipe atau varian yang ditemukan tersebut menunjukkan bahwa virus IB dapat dengan mudah mengalami mutasi dan perubahan antigenik yang karakteristik yang bisa disebabkan karena pergeseran maupun penyimpangan asam nukleat (Cavanagh *et al.*, 1992). Kegagalan vaksinasi IB terjadi karena sedikit atau bahkan tidak ada proteksi silang di antara serotipe tersebut (Zanella *et al.*, 2000).

Infeksi virus IB sulit didiagnosa karena isolat lapangan tidak mudah dikultivasi *in vitro* dan karena multi serotipe. Untuk deteksi atau identifikasi virus IB secara konvensional terlalu banyak waktu karena virus harus dipasase minimal 6 kali pada telur ayam berembrio dan dilihat dari perubahan yang tampak pada embrio tidak spesifik, yaitu adanya kekerdilan yang juga bisa disebabkan oleh virus yang lain. Uji yang dapat digunakan untuk diagnosa IB diantaranya uji hambatan hemaglutinasi (HH), tetapi lebih bersifat *strain*-spesifik (Untari, 2000; King dan Hopkins, 1984), uji netralisasi bersifat *serotype*-spesifik (Zella dan Torsen, 1987). Uji Elisa lebih sensitif tetapi kurang spesifik (Untari, 2000; Zella dan Torsen, 1987). Teknik *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dan *biotin label probe* virus IB dapat digunakan untuk deteksi langsung virus dari swab trakea maupun dari cairan alantois (Kwon *et al.*, 1993^b). Teknik RT-PCR lebih cepat untuk membedakan serotipe virus IB dibandingkan uji HH dan netralisasi yang memerlukan waktu lebih lama (Jackwood *et al.*, 1997). Teknik tersebut sekarang telah banyak digunakan untuk membedakan tipe virus IB (Kwon *et al.*, 1993^a; Nix *et al.*, 2000).

Virus IB, bagian sub unit S-1 dipilih untuk dibandingkan sekuennya karena memperlihatkan variabilitas yang tinggi diantara serotipe, tetapi relatif *conserved* diantara strain yang sama, Epitop S-1 termasuk untuk netralisasi dikode oleh *hypervariabel region* (Cavanagh *et al.*, 1988).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk deteksi dan identifikasi virus *avian infectious bronchitis* isolat lapangan dengan RT-PCR gen peplomer S-1 yang bertanggung jawab terhadap variabilitas serotipe virus IB, sehingga bermanfaat memberi informasi lebih cepat dan akurat adanya infeksi lapangan virus IB di peternakan ayam serta dapat memberi petunjuk munculnya serotipe atau varian baru virus IB di suatu daerah tertentu.

MATERI DAN METODE

Dalam penelitian ini digunakan telur ayam bebas penyakit (*specific pathogen free/SPF*) (Vaccindo, Bogor), sampel berupa seka tonsil yang diduga mengandung virus IB isolat lapangan yang berasal dari peternakan ayam di Daerah Istimewa Yogyakarta dengan gejala ayam petelur mengalami penurunan kualitas dan kuantitas produksi telur secara drastis. Sebagai pembeda adalah virus IB vaksin hidup *strain* Massachusetts H120 dan virus vaksin hidup IB varian 4-91 (Nobilis, Intervet, Holland), *agarosa* (Boehringer, Ingelheim, Germany), etidium bromida, 20 mM Tris HCl (pH 5), 1 mM *Etilene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA), PCR kit (*Ready To Go™ RT-PCR Bead*, Amersham, Pharmacia) yang setiap beadnya. mengandung 200 µM: dNTP, *Moloney Murine Leukemia Virus - Reverse Transcriptase* (MMuLV-RT), *RNA guard™ Ribonuclease Inhibitor*, *Rnase /DNase Free Bovine Serum Albumin* (BSA), 2 unit *Taq DNA polymerase*, 10 mM Tris HCl, 60 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂. Dua primer yaitu S1OLIGO3 (5'CAT AAC TAA CAT AAG GGCAA3') dan S1OLIGO5 (5'TGA AAA CTG AAC AAA AGA CA 3'), *sodium dodecyl sulfate* (SDS), *proteinase K* (Amersham, Pharmacia, USA).

Virus dipropagasi pada telur ayam berembrio umur 10 hari dengan cara diinokulasikan 0,2 ml suspensi virus ke dalam ruang alantois. Cairan alantois dipanen setelah diinkubasi 48 jam dalam mesin tetas Beberapa telur dibiarkan selama 7 hari setelah diinokulasi, untuk melihat lesi yang karakteristik akibat infeksi virus IB yaitu adanya kekerdilan embrio.

Prosedur ekstraksi RNA secara cepat digunakan metodenya Jackwood *et al.* (1992) dengan modifikasi. Tiga ratus mikroliter 20% larutan SDS dan 75µl dari 10mg/ml *proteinase-K* ditambahkan pada 3 ml cairan alantois kemudian diinkubasi 15 menit 37°C selanjutnya diinkubasi 30 menit 56°C. RNA diekstraksi dengan *buffer phenol* satu kali dan dua kali dengan kloroform isoamil alkohol (49:1). RNA dipresipitasi dengan menambahkan 0,1x volume 3M *sodium asetat* (pH 5) dan 2x volume dari 100% etanol. Setelah diinkubasi -20°C semalam, larutan tersebut disentrifus 15 menit 12.000 x g dalam temperatur 4°C sehingga terdapat endapan RNA. RNA diresuspensi dalam 10µl air yang ditambah *dietyl pirocarbonat* (DEPC) 0,01%.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

RNA yang didapat dibuat cDNA dengan digunakan *Ready To Go™ RT-PCR Bead* untuk

reaksi RT-PCR. *Bead* dalam tabung diletakkan di es kemudian ditambahkan 43µl air DEPC, 1-3 µl larutan RNA, 2 µl pd (N)6, 1 µl primer S1OLIGO 5', 1 µl primer S1OLIGO 3'. Reaksi RT PCR berlangsung dalam *thermal cycler* pada suhu 50°C selama 5 menit, kemudian reaksi dihentikan dengan pemanasan 95°C, 5 menit. Program *thermal cycler* untuk proses PCR adalah denaturasi pada suhu 94°C, 1 menit, *annealing* pada 48°C, 1 menit, polimerisasi 72°C, 2 menit, sebanyak 35 siklus. Final elongasi pada 72°C selama 15 menit. Produk PCR dianalisa pada 1% gel agarose yang mengandung etidium bromid (0,5 µg/ml). Hasil amplifikasi DNA dilihat dengan transiluminator.

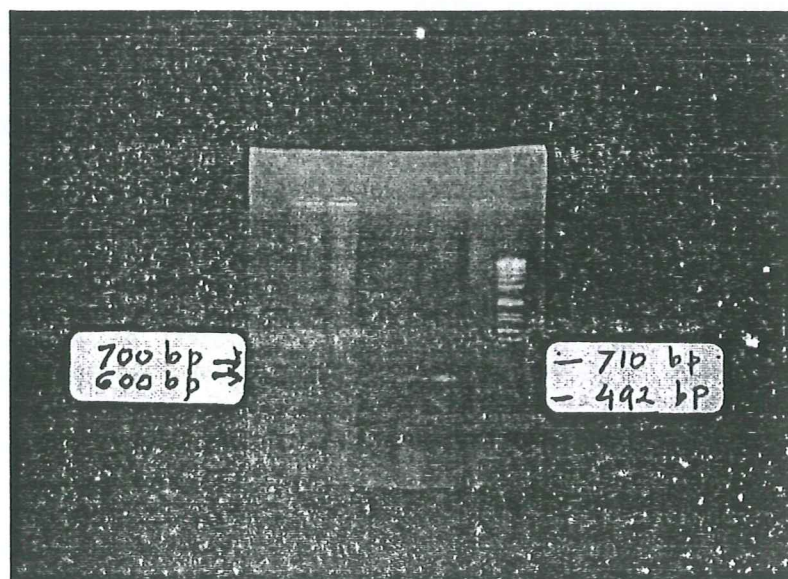
HASIL DAN PEMBAHASAN

Virus RNA setelah diamplifikasi dengan teknik RT-PCR menggunakan primer yang spesifik menunjukkan pita 600 bp (Gambar 1). Hasil tersebut lebih kecil dari prediksi semula yaitu 1720 bp. Hasil penelitian ini seperti halnya penelitian Kwon *et al.* (1993^a), dengan digunakan primer yang sama (S1OLIGO5 dan S1OLIGO3), teridentifikasi isolat virus dengan pita pada 800 bp. Kontrol virus varian dari vaksin 4-91 juga menunjukkan pita 700 bp (Gambar 1).

Hasil amplifikasi dengan berat molekul yang lebih kecil tersebut dideterminasi sebagai virus IB varian. Berat molekul yang kecil tersebut kemungkinan juga bisa disebabkan oleh produk non spesifik *annealing* primer, atau karena adanya sebagian gen yang hilang (*truncated gene*) atau dari partikel *defectif interfering*.

Virus varian secara antigenik berbeda dengan beberapa serotipe virus yang telah diketahui seperti Massachusetts, Connecticut, Holte, Gray, Arkansas, JMK, IOWA 97, SE 17, Florida 88, dengan primer tersebut setelah dilakukan RT PCR serotipe-serotipe tersebut menunjukkan pita pada 1720 bp (Kwon *et al.*, 1993^a). Hasil penelitian sekarang diindikasikan adanya virus varian baru yang berbeda dengan virus vaksin yang sekarang beredar di Indonesia yaitu *strain* Massachusetts HI20 yang sekarang telah dipakai secara luas di peternakan ayam. Variasi antigenik bisa terjadi akibat mutasi dan rekombinasi (Cavanagh *et al.*, 1992). Ketika ayam terinfeksi atau divaksin dengan menggunakan lebih dari satu tipe virus IB maka kemungkinan akan muncul rekombinasi dari kedua tipe virus IB tersebut, sehingga diduga munculnya tipe virus IB baru disebabkan karena penggunaan vaksin yang tidak terkontrol (Jones, 2000).

Tingkat kemiripan yang rendah antara virus yang ada di lapangan dengan vaksin yang dipakai menyebabkan tingkat perlindungan yang rendah atau bahkan tidak adanya perlindungan sama sekali dari vaksin yang digunakan sehingga mengakibatkan kegagalan vaksinasi di peternakan ayam. Vaksin 4-91 merupakan vaksin yang baru diperkenalkan di peternakan ayam, tetapi penggunaannya masih terbatas, tampaknya lebih bisa melindungi dari pada *strain* Massachusetts, namun demikian dilihat dari produk pita yang dihasilkan, menunjukkan perbedaan antara virus IB isolat lapangan (600 bp) dengan vaksin yang ada (700 bp) untuk vaksin 4-91 dan 1720 bp untuk vaksin Massachusetts referensi). Untuk lebih meyakinkan



Gambar 1. Gambar c DNA hasil amplifikasi RT-PCR virus IB isolat Jogjakarta (*lane* 4, 5, 7) pita pada 600 bp dan kontrol virus vaksin varian 4-91 (*lane* 3) pita pada 700 bp. *Lane* 8 adalah marker DNA VII dari produk pabrik.

tingkat kemiripan antara virus lapangan dan virus vaksin yang ada, perlu dilakukan sekuensing sehingga akan diketahui perbedaan nukleotidanya dengan jelas.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa dengan teknik RT-PCR isolat dari peternakan ayam di Jogjakarta teridentifikasi virus IB yang diindikasikan sebagai varian baru yang ditunjukkan produk pita pada 600 bp. Hasil pita tersebut mirip dengan kontrol virus vaksin varian 4-91 (700 bp) tetapi berbeda dengan virus vaksin strain Massachusetts dari referensi (1720 bp).

Untuk mengetahui tingkat kemiripan antara virus isolat lapangan dengan virus yang ada dalam vaksin, maka perlu dilakukan sequencing gen S-1 dari virus isolat tersebut, sehingga diketahui secara pasti bagian nukleotida dari gen S-1 yang mengalami penghilangan, mutasi atau rekombinasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih sebesar-besarnya kami ucapkan kepada Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, yang telah memberi dana untuk pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Cavanagh, D., Davis, P.J., and Mockett, A.P.A., 1988. Amino acid Within Hypervariable Region I of Avian Coronavirus IBV (Massachusetts Serotype) Spike Glycoprotein Are Associated with Neutralization Epitopes. *Virus Res.*, 11: 141-150.
- Cavanagh, D., Davis, P.J and Cook, J.K., 1992. Infectious Bronchitis Virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathology* 21:401-408.
- Cavanagh, D. and Naqi, 1997. Infectious Bronchitis Virus. Dalam *Diseases of Poultry*. Tenth Ed. Iowa State University Press, Ames, IOWA, USA. Hal.: 511-528.
- Gillespie, J.H. and J.F. Timoney, 1988. Hagan and Bruner's Infectious Disease of Domestic Animals. 7th ed. Cornell University Press. Ithaca and London.
- Jackwood, M.W. Yousef, N.M.H. and Hilt, D.A., 1997. Further Development and Use of a Molecular Serotype Identification Test for Infectious Bronchitis Virus. *Avian Dis.* 41: 105-110.
- Jackwood, M.W., Kwon, H.M, Hilt, D.A. 1992. Infectious Bronchitis Virus Detection in Allantoic Fluid using the Polymerase Chain Reaction and a DNA Probe. *Avian Dis.* 36: 403-409.
- Jones, R.C., 2000. Infectious Bronchitis an old disease with new twists. *International Health Review.* 7-8.
- King, D. J. and Hopkins, S. R. 1984. Rapid Serotyping of Infectious Bronchitis Virus Isolates with the Haemagglutination-Inhibition Test. *Avian Dis.* V.28: 727-733.
- Kwon, H.M., Jackwood, M.W. and Gelb, Jr.J., 1993^a. Differentiation of Infectious Bronchitis Virus Serotypes Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Avian Dis.* 37: 194-202.
- Kwon, H.M., Jackwood, M.W., Brown, T.P., and Hilt, D.A., 1993^b. Polymerase Chain Reaction and Biotin-Labeled DNA Probe for Detection of Infectious Bronchitis Virus in Chickens. *Avian Dis.* 37: 149-156.
- Nix, W.A., Troeber, D.S., Kingham, B.F., Keeler, Jr. C.L. and Gelb, Jr.J., 2000. Emergence of Subtype Strain of the Arkansas Serotype of Infectious Bronchitis Virus in Delmarva Broiler Chickens. *Avian Dis.* 44: 568-581.
- Picault, J.P., Lalmande, J., Alee, C. and Morm, Y. 2003. The pathogenicity and prophylaxy of Infectious bronchitis serotype CR 88 in chickens. *World Poultry.* Vol.19: 34-36.
- Untari, T. 2000. Evaluasi Hasil Vaksinasi Virus Infectious Bronchitis dengan uji Hambatan Hemaglutinasi dan Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Laporan Penelitian, Fakultas Kedokteran Hewan, UGM, Jogjakarta.
- Zanella, A., Coaro, R., Fabris, G., Marchi, Lavazza, A., 2000. Avian Infectious Bronchitis Virus: Isolation of an Apparently New Variant in Italy. *Vet. Rec.* 146: 191-193.
- Zella, G. K. and Thorsen. J. 1987. Determination of The Antigenic Relationships Among Six Serotypes of Infectious Bronchitis Using The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Serum-Neutralization Test. *Avian Dis.* V.31: 455-458.